

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «КАЗАНСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

ШЕВЧЕНКО РОМАН ВАСИЛЬЕВИЧ

**ТРАНСТРАВМАТИЧЕСКАЯ ЭПИДУРАЛЬНАЯ ЭЛЕКТРОСТИМУЛЯЦИЯ
СПИННОГО МОЗГА В СОЧЕТАНИИ С ДВИГАТЕЛЬНОЙ ТРЕНИРОВКОЙ
В МОДЕЛИ НА МИНИ-СВИНЬЯХ**

3.3.3. Патологическая физиология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Исламов Рустем Робертович

Казань – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1 Травма спинного мозга	14
1.1.1 Частота встречаемости травм спинного мозга	15
1.1.2 Патофизиология травмы спинного мозга	16
1.1.2.1 Механизмы первичного повреждения.....	16
1.1.2.2 Механизмы вторичного повреждения.....	17
1.2 Диагностика и лечение травмы спинного мозга	19
1.2.1 Диагностика травмы спинного мозга	19
1.2.2 Лечение и реабилитация	21
1.3 Электростимуляция спинного мозга	24
1.3.1 История развития электростимуляции.....	26
1.3.2 Стимуляция периферических нервов	31
1.3.3 Функциональная электростимуляция	34
1.3.4 Эпидуральная электростимуляция	36
1.3.4.1 Механизмы действия эпидуральной электростимуляции.....	36
1.3.4.2 Влияние ЭЭС на центральные генераторы паттерна.....	37
1.3.4.3 Ограничения и перспективы развития эпидуральной электростимуляции	38
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	41
2.1 Тренировка на беговой дорожке	44
2.2 Оперативные вмешательства на животных	45
2.2.1 Имплантация стимулирующих и референтных электродов	45
2.2.2 Контузионная спинальная травма.....	46

2.2.3 Послеоперационный уход	48
2.3 Эпидуральная электрическая стимуляция	49
2.4 Электромиография	50
2.5 Кинематика суставов.....	51
2.6 Поведенческий тест	52
2.7 Гистологическое исследование	54
2.7.1 Морфометрический анализ сохранности серого вещества спинного мозга	55
2.7.2 Иммунофлуоресцентное исследование спинного мозга и камбаловидной мышцы	56
2.8 Статистический анализ	59
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ.....	60
3.1 Восстановление двигательной активности.....	60
3.2 Видеоанализ кинематики суставов задней конечности.....	61
3.3 Электрофизиологические исследования камбаловидной мышцы	67
3.3.1. Моторные вызванные потенциалы при стимуляции спинного мозга....	67
3.3.2 М-ответ и Н-рефлекс камбаловидной мышцы при стимуляции седалищного нерва.....	69
3.4 Гистологическое исследование спинного мозга и камбаловидной мышцы	71
3.4.1 Морфометрический анализ сохранности серого вещества спинного мозга	71
3.4.2 Иммунофлуоресцентное исследование серого вещества спинного мозга	73
3.4.2.1 Маркеры стресса и апоптоза	74
3.4.2.2 Реакция клеток нейроглии.....	78
3.4.3 Морфометрический анализ камбаловидной мышцы.....	86

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	89
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	99
ВЫВОДЫ	102
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	104
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	105
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	107
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА.....	127

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Травма спинного мозга (ТСМ) у человека является тяжелым и прогностически неблагоприятным травматическим повреждением. По данным Всемирной Организации Здравоохранения, в мире ежегодно регистрируют до полумиллиона случаев ТСМ. В Российской Федерации ежегодно ТСМ получают более 18 тысяч человек [49]. При этом более 80% пострадавших составляют лица в возрасте от 17 до 45 лет, что делает проблему их реабилитации чрезвычайно важной и актуальной [9, 10]. Посттравматические последствия, включающие гибель нейронов, разрывы нервных волокон, ишемические и воспалительные повреждения спинного мозга вызывают тяжелый двигательный, сенсорный и вегетативный дефицит, сопровождающийся хронической невропатической болью и патологическим гипертонусом скелетной мускулатуры [132, 164]. Эти болезненные состояния значительно снижают качество жизни пациентов, а последующие потеря трудоспособности и инвалидность увеличивают их зависимость от лиц, осуществляющих за ними уход [27]. Негативный прогноз усугубляют вторичные осложнения, такие как пролежни, респираторные инфекции, сердечно-сосудистые нарушения, способные приводить к летальным исходам. Кроме того, затраты на лечение и социальное обеспечение подобных пациентов составляют серьёзную статью расходов для их семей и для бюджета государства [117, 136]. На сегодняшний день не существует эффективного метода лечения ТСМ, позволяющего восстановить утраченные функции в полном объёме, и пациенты получают преимущественно симптоматическую терапию.

В качестве дополнительного подхода к нейрореабилитации пациентов с ТСМ широко применяют электрическую стимуляцию спинного мозга [69, 119, 163]. Эпидуральная электростимуляция (ЭЭС) зарекомендовала себя в качестве эффективного метода, позволяющего стимулировать активность локальных нейронных спинномозговых сетей и связанные с ними функции [169]. В

клинических исследованиях пациенты с ТСМ на фоне ЭЭС поясничного отдела спинного мозга приобретали способность контролировать волевые движения и самостоятельную ходьбу [23, 119].

Однако, несмотря на многочисленные свидетельства, что в восстановлении функций спинного мозга после травмы могут участвовать нейронные сети, расположенные как выше, так и ниже эпицентра повреждения [47, 99], возможное влияние комбинированной ЭЭС в этих областях спинного мозга остаётся практически неизученным.

Степень разработанности темы исследования

Анализ известных способов нейромодуляции спинного мозга при ТСМ показывает, что существующие подходы преимущественно ориентированы на стимуляцию сегментов, расположенных ниже уровня повреждения. Для обеспечения возможности движений нижних конечностей электростимуляцию проводят с помощью эпидуральных электродов, устанавливаемых на уровне поясничного утолщения, что активирует центральный генератор паттерна шагания (ЦГП) [44]. Однако и в вышележащих отделах происходят ключевые процессы проявления нейропластичности: формирование новых синаптических связей и перестройка сохранившихся нейронных сетей, а это процессы обязательные для восстановления функциональных связей между супраспинальными двигательными центрами и отделами, расположенными ниже эпицентра травмы [99]. Таким образом, отсутствие электростимуляции выше уровня повреждения существенно ограничивает нейрореабилитационный потенциал и не позволяет в полной мере реализовать возможности нейромодуляции при ТСМ. Указанные недостатки обуславливают необходимость разработки новых подходов комбинированной эпидуральной электростимуляции как ростральных, так и каудальных относительно эпицентра нейротравмы сегментов.

Большинство экспериментов в области нейромодуляции при ТСМ выполнено на мелких лабораторных животных, что лимитирует трансляцию полученных результатов в клиническую практику [52, 78]. Использование крупных животных,

таких как свиньи, позволяет значительно адекватнее моделировать патофизиологию ТСМ у человека и испытывать новые способы лечения спинальной травмы с последующим их внедрением в практическую медицину [20, 50, 98, 169, 178].

Ранее был разработан метод для лечения контузионной травмы грудного отдела спинного мозга у свиней, основанный на применении двухуровневой эпидуральной электростимуляции с расположением стимулирующих электродов в шейном и поясничном сегментах спинного мозга [48]. Было показано, что сочетанная стимуляция на уровнях C5 и L2 оказывает положительный эффект на посттравматическую нейрорегенерацию спинного мозга свиней. Однако недостатком данного метода явилась избыточность электростимуляции на уровне шейного утолщения (C5) для активации центрального генератора паттерна шагания (ЦГП), поскольку у свиней с грудной травмой сохраняется супраспинальный контроль над передними конечностями. Кроме того, дистальное расположение верхней точки стимуляции от эпицентра травмы вероятно может снижать эффективность формирования транстравматической нейронной сети.

Цель исследования: изучить механизмы нейромодуляции спинного мозга мини-свиньи с неполной контузионной травмой в нижнегрудном отделе методом двухуровневой эпидуральной электростимуляции выше и ниже эпицентра нейротравмы в сочетании с двигательной тренировкой.

В соответствии с целью исследования были сформулированы следующие задачи:

1. Разработать протокол двухуровневой эпидуральной электростимуляции в модели на мини-свиньях с неполной контузионной травмой спинного мозга на уровне Th8-Th9, включающий в себя транстравматическую стимуляцию в области непосредственно прилегающей к эпицентру травмы (Th8) и на уровне центрального генератора паттерна шагания (L2) в сочетании с двигательной тренировкой на беговой дорожке.
2. Оценить влияние шестинедельной двухуровневой эпидуральной электростимуляции, сочетающейся с двигательной тренировкой, на

поведенческий тест PTIBS и кинематику суставов задних конечностей свиней с неполной контузионной травмой спинного мозга.

3. Исследовать действие двухуровневой эпидуральной электростимуляции течение 6 недель, сочетающейся с двигательной тренировкой, на электрофизиологические и морфологические характеристики скелетной мышцы задней конечности свиней с неполной контузионной травмой спинного мозга.
4. Изучить морфологические, клеточные и молекулярные изменения в спинном мозге свиней выше и ниже эпицентра нейротравмы через шесть недель двухуровневой эпидуральной электростимуляции в сочетании с двигательной тренировкой.

Научная новизна

С помощью поведенческих тестов, электрофизиологических и гистологических методов исследования установлена эффективность двухуровневой эпидуральной электростимуляции спинного мозга выше (Th5) и ниже (L2) уровня его неполной контузионной травмы в нижнегрудном отделе (Th8-Th9) у свиней в сочетании с двигательными тренировками на беговой дорожке, в сравнении с контрольными животными без ЭЭС. У опытных свиней с ТСМ двухуровневая ЭЭС в течение 6 недель приводила к лучшей сохранности серого вещества в прилежащем к эпицентру нейротравмы ростральном сегменте спинного мозга за счет снижения количества вступивших в апоптоз (Caspase3-положительных) клеток и уменьшения Hsp27-иммунопозитивной площади, соответствующей локализации белка теплового шока, что свидетельствует о нейропротекторном действии двухуровневой ЭЭС. Кроме того, у опытных животных в ростральном сегменте также выявлено большее, по сравнению с контрольными животными, количество миелинообразующих олигодендроглиальных клеток, что обеспечивает благоприятные условия для транстравматической регенерации аксонов. В каудальном сегменте у опытных животных обнаружено уменьшение Hsp27-иммунопозитивной площади и

снижение количества негативно влияющих на процессы регенерации клеток микроглии, участвующих в развитии астроглиоза и нейровоспаления. Важно отметить, что в условиях двухуровневой ЭЭС при стимуляции седалищного нерва показано восстановление характеристик М-ответа и Н-рефлекса камбаловидной мышцы, что сочеталось с сохранением массы и фенотипа этой мышцы, а также средней площади поперечного сечения мышечных волокон. Эти изменения хорошо согласуются с частичным восстановлением произвольной моторной активности в задних конечностях, что соответствует двум балам по шкале поведенческого теста PTIBS.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическое значение работы подтверждается фундаментальными исследованиями механизмов действия двухуровневой ЭЭС в модели на свиньях с неполной контузионной ТСМ в нижнегрудном отделе на коррекцию негативных последствий нейротравмы. Двухуровневая ЭЭС в сочетании с двигательной тренировкой в течение 6 недель способствовала восстановлению произвольных движений в задних конечностях, что коррелирует с позитивными молекулярными и клеточными изменениями в спинном мозге свиней выше и ниже эпицентра нейротравмы и восстановлением морфологических, электрофизиологических и фенотипических характеристик скелетных мышц задних конечностей. Анализ результатов дает основание полагать, что двухуровневая ЭЭС способна модулировать ключевые механизмы, лежащие в основе нейропластичности спинного мозга, выражающиеся в его морфо-функциональном посттравматическом восстановлении.

Практическая значимость выполненного исследования заключается в разработке протокола двухуровневой ЭЭС и его практического применения в сочетании с двигательными тренировками на беговой дорожке в модели на свиньях с неполной контузионной травмой спинного мозга. Экспериментальное подтверждение позитивного действия двухуровневой ЭЭС на посттравматическое восстановление спинного мозга свидетельствует, что этот способ нейромодуляции

способствует регенерации нервной ткани выше и ниже эпицентра повреждения с определенными механизмами действия. Результаты исследования, полученные на свиньях, могут явиться обоснованием для разработки протокола способа нейрореабилитации пациентов с травмой спинного мозга с помощью двухуровневой ЭЭС и сформируют основу для его внедрения в практическую медицину.

Методология и методы исследования

Эксперимент выполнен на девяти самках вьетнамских вислобрюхих свиней весом 20-25 кг. Протокол экспериментальных исследований, включая анестезию, операционные вмешательства, послеоперационный уход и эвтаназию был одобрен на заседании Локального этического комитета Казанского государственного медицинского университета (протокол №10 от 20 декабря 2022 года). Работы диссертационного исследования были частично поддержаны грантом РФФИ № 16-15-00010 по теме: «Клеточно-опосредованная генная терапия в сочетании с электростимуляцией при травме спинного мозга». За 2 недели до оперативных вмешательств животных обучали ходьбе на беговой дорожке. На первом этапе оперативных вмешательств свиньям подшивали стимулирующие электроды к твёрдой мозговой оболочке на уровне сегментов Th5 и L2. Через 1 нед после имплантации электродов у всех животных между позвонками Th8 и Th9 моделировали неполную контузионную спинальную травму. Через 2 нед после ТСМ у опытных животных сочетали тренировку на беговой дорожке с ЭЭС по запатентованному протоколу (Патент РФ №2831229 «Способ нейромодуляции для лечения последствий травмы спинного мозга»). В течение 6 недель (через день по 30 мин) животным проводили утренний сеанс транстравматической электростимуляции выше места травмы на уровне Th5 и вечерний сеанс – ниже места травмы на уровне L2 для активации центрального генератора паттерна шагания. Эффективность нейромодуляции спинного мозга после ТСМ в условиях двухуровневой ЭЭС изучали с помощью поведенческих тестов, электрофизиологических и гистологических методов исследования. Обработку

первичных данных проводили в среде R версии 4.4.0 (R Foundation for Statistical Computing, Вена, Австрия).

Положение, выносимое на защиту:

Двухуровневая эпидуральная электростимуляция спинного мозга свиней с неполной контузионной травмой в нижнегрудном отделе, включающая в себя транстравматическую стимуляцию в области, непосредственно прилегающей к эпицентру травмы, в комбинации со стимуляцией центрального генератора паттерна шагания в поясничной области и двигательной тренировкой приводит к коррекции негативных последствий спинальной травмы, что выражается в сохранности серого вещества спинного мозга в области повреждения, улучшении морфо-функциональных характеристик скелетных мышц и частичном восстановлении произвольной активности задних конечностей.

Степень достоверности и апробация работы

Поставленные в исследовании задачи решались с помощью современных поведенческих, электрофизиологических, гистологических и статистических методов. Все перечисленные методы исследования соответствуют общепринятым мировым критериям, что подтверждает достоверность и обоснованность полученных результатов.

Результаты исследования были доложены на 77-й международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов (Волгоград, 2019), IV национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2019), IX международном молодежном научном медицинском форуме «Белые цветы» (Казань, 2022); X Международном молодежном научном медицинском форуме «Белые цветы» посвященном 150-летию С.С. Зимницкого (Казань, 2023); XI Международном молодежном научном медицинском форуме «Белые цветы» посвященном 150-летию Н.А. Семашко (Казань, 2024); XII международном молодежном научном медицинском форуме «Белые цветы» посвященном 250-

летию К.Ф. Фукса (Казань, 2026); Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2026).

Внедрение результатов исследования

Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс кафедры общей патологии и кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ, из них 2 статьи из перечня ВАК, 2 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в международных библиографических базах Scopus и WoS, 1 патент.

Личный вклад автора

Диссертант лично принимал участие в планировании дизайна эксперимента, формулировании целей и задач исследования. Соискатель самостоятельно выполнил экспериментальную часть работы, проводил процедуры электростимуляции, электрофизиологические исследования, поведенческие тесты, забирал биологический материал, готовил гистологические препараты, анализировал и проводил статистическую обработку полученных данных, готовил к печати статьи и тезисы по результатам выполненных работ. Текст диссертации, положение, выносимое на защиту, и выводы исследования подготовлены лично диссертантом.

Структура и объем диссертационной работы

Диссертационная работа содержит 131 страницу печатного текста, состоит из 4 глав, а именно введение, обзор литературы, материал и методы исследования, результаты собственного исследования, обсуждение результатов, заключение, выводы, список сокращений, список литературы и список иллюстративного

материала. Диссертация включает в себя 4 таблицы, 22 рисунка. Список литературы содержит 189 источников.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Травма спинного мозга

Травма спинного мозга относится к заболеваниям, которые приводят к тяжелым физическим и эмоциональным страданиям пациента. В зависимости от характера повреждения спинного мозга, ТСМ подразделяют на полную и неполную. Полная ТСМ вызывает необратимое повреждение в зоне травмы, приводящее к полной утрате сенсорных и моторных функций ниже уровня поражения. Напротив, неполная ТСМ проявляется частичным повреждением спинного мозга, с частичным сохранением сенсорных и моторных функций ниже уровня травмы. Чаще всего, чувствительная функция остается более сохранной, что обусловлено разницей в расположении сенсорных и моторных трактов в спинном мозге. В зависимости от уровня травмы у пациента могут развиваться множество различных нарушений, в том числе респираторные расстройства, дизурии, дисфункции желудочно-кишечного тракта. Все эти патологические нарушения отрицательно влияют на качество жизни таких пациентов, но помимо медицинских последствий, ТСМ влечет за собой и колоссальное экономическое бремя как для самих пациентов, так и для их семей, поскольку такие пациенты требуют пожизненного ухода [117, 136]. Указанные проблемы индивидуальных и социально-экономических последствий ТСМ определяют активное развитие фундаментальных и клинических исследований по разработке патогенетических методов коррекции негативных последствий спинальной травмы.

За последние три десятилетия был достигнут значительный прогресс в лечении и медицинской реабилитации пациентов, что привело к улучшению прогноза после ТСМ [12, 92, 103]. Тем не менее, большинство из этих подходов главным образом нацелены на снижение количества осложнений и максимальное сохранение остаточных функций после ТСМ, а не на восстановление утраченных моторных функций до нормального или максимально возможного уровня [139].

Новые стратегии в терапии и реабилитации после ТСМ включают в себя тренировки с системами поддержки веса, экзоскелеты нижних конечностей, функциональную электростимуляцию мышц и электростимуляцию спинного мозга [84, 92, 131]. Недавние клинические исследования показали, что применение ЭЭС спинного мозга может восстанавливать некоторые произвольные движения ниже эпицентра нейротравмы [63, 141]. Эти данные получили дальнейшее подтверждение в работах, показавших восстановление самостоятельной ходьбы после полной ТСМ с помощью ЭЭС и задачно-ориентированного обучения [74, 119]. Несмотря на ограниченное количество исследований, положительные эффекты ЭЭС на вегетативные, сердечно-сосудистые, респираторные и моторные функции организма подтверждают ее потенциал в качестве терапевтического вмешательства после ТСМ.

1.1.1 Частота встречаемости травм спинного мозга

Травмы спинного мозга составляют 6-8% от общего количества травм [6, 9]. В крупных городах Российской Федерации частота ТСМ может достигать 0,58-0,6 случаев на 10 000 населения, и каждый год добавляет, в среднем, еще 8000 подобных пациентов. Более 80% пациентов составляют лица от 17 до 45 лет и наиболее часто – в возрасте до 29 лет (1,9 случая на 10000 населения) [9, 10]. При этом до 76% пострадавших составляют лица мужского пола [6].

На догоспитальном этапе летальность при ТСМ достигает 37% [6], что может быть связано с невозможностью быстрой доставки пострадавшего в специализированное учреждение, с наличием развившихся ранних или поздних осложнений травмы. На этапе госпитализации смертность пациентов варьирует в пределах 8-58% [6]. В 57-96% случаев ТСМ приводит к инвалидизации пациента, что, в целом, составляет 0,7% от общего количества инвалидов [9].

Основными причинами травм позвоночника и спинного мозга остаются падение с высоты (17-71%), дорожно-транспортные происшествия (10-26%) и

травмы, полученные по причине самоповреждения или насилия (9-51%) [18, 49]. У большинства пострадавших ТСМ сочетается с переломами конечностей (26%), черепно-мозговыми травмами (18%) или травмами органов брюшной полости (16%), что усугубляет исход спинальной травмы [18].

1.1.2 Патофизиология травмы спинного мозга

Понимание патофизиологии травмы спинного мозга необходимо для оценки потенциальных механизмов, посредством которых электрическая стимуляция может способствовать улучшению посттравматической регенерации спинного мозга. Патогенез ТСМ носит двухфазный характер и включает первичное повреждение и последующий каскад вторичных повреждений [53].

1.1.2.1 Механизмы первичного повреждения

Первичное повреждение представляет собой травматическое поражение спинного мозга, возникающее в результате прямого механического воздействия. В клинической практике наиболее распространенной формой травматического повреждения спинного мозга является контузия с длительной компрессией [165]. Тем не менее, также возможны транссекция, дистракция в сочетании с компрессией [53, 126]. Как следствие всех этих повреждающих факторов, в эпицентре травмы развиваются необратимые первичные повреждения (размозжение нервной ткани, разрывы нервных проводников, кровоизлияние), от выраженности которых будет зависеть исход полученной ТСМ [24]. Однако сохранность реактивной ткани вокруг очага поражения для последующей успешной регенерации нервной ткани является предметом патогенетической коррекции негативных последствий ТСМ [82].

1.1.2.2 Механизмы вторичного повреждения

Вторичные повреждения обусловлены сложным каскадом патофизиологических реакций, расширяющих зону поражения нервной ткани в ростральном и каудальном направлениях от эпицентра ТСМ. Эти нарушения начинаются непосредственно после первичного повреждения и продолжается на протяжении острой (0-48 часов), подострой (48 часов - 14 суток) и хронической (от нескольких суток до нескольких лет) фаз ТСМ [156, 181]. Понимание этих событий имеет важное значение, поскольку отсроченный характер каскада вторичных повреждений делает их потенциально доступными для терапевтического воздействия.

Вторичные повреждения, развивающиеся непосредственно вслед за первичными, характеризуются выраженным некрозом нейронов, дегенерацией аксонов, воспалительной реакцией, ишемией, вазогенным отеком и нарушением целостности гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Практически одновременно возникает ионный дисбаланс во внеклеточном пространстве. Активация потенциал-зависимых натриевых и кальциевых каналов, нарушение работы ионных насосов (Na^+/K^+ -АТФазы), а также глутамат-индуцированная деполяризация мембран изменяют уровень содержания Ca^{2+} и Na^+ [100, 110]. Развившийся дисбаланс запускает в нейронах внутриклеточные сигнальные каскады, активирующие перекисное окисление липидов, образование активных форм кислорода и высвобождение избыточного количества глутамата, способствуя дальнейшей гибели нервных клеток [100, 179]. Глутаматная эксайтотоксичность приводит к гибели не только нейронов, но и клеток нейроглии, например, олигодендроцитов, что повышает уязвимость аксонов и препятствует проведению по ним потенциала действия [110, 175].

Кроме того, ТСМ индуцирует выраженный воспалительный ответ, сохраняющийся неопределенно долго. Являясь резидентными иммунными клетками спинного мозга, микроглия наряду с астроцитами и периферическими

иммунными клетками (нейтрофилами и макрофагами) активно отвечают на первичное повреждение [126]. Помимо выполнения дренажных функций, активированные фагоциты высвобождают токсичные кислородные продукты, индуцирующие перекисное окисление липидов, и ферменты, разрушающие тканевый матрикс, что в конечном итоге усиливает дегенерацию нервной ткани [96]. Травматизация сосудистой системы спинного мозга приводит к нарушению целостности ГЭБ, снижающего перфузию спинного мозга, развитию ишемии мозга [108, 179].

Вторичные повреждения продолжаются и в подострой фазе ТСМ, при этом сосудистые и воспалительные реакции по-прежнему способствуют расширению зоны поражения нервной ткани. Ангиогенез в поврежденном спинном мозге начинается в интервале между 3 и 7 сутками после травмы [41]. Однако проницаемость ГЭБ и отек сохраняются, что способствует миграции лейкоцитов из кровотока в зону повреждения [137, 187]. Макрофаги и микроглия продолжают поддерживать нейровоспаление, необходимое для элиминации тканевого детрита, но также приводящее к более обширному повреждению тканей, постепенно вовлекаемых в воспалительный процесс [28, 127]. Для предотвращения дальнейшего расширения очага поражения и последующего повреждения прилежащих тканей начинает формироваться глиальный рубец, отграничивающий зону травмы. Одновременно с началом ангиогенеза начинается пролиферация гиперактивированных астроцитов [58], которые вокруг эпицентра поражения создают защитный барьер, препятствующий дальнейшему распространению повреждения [124].

Хроническая фаза вторичного повреждения проявляется созреванием глиального рубца [58, 96]. Несмотря на благоприятную роль рубцовой ткани в предотвращении дальнейшего распространения повреждения, белки внеклеточного матрикса в составе глиального рубца, а также миелин-ассоциированные ингибиторы (Nogo, MAG и OMgp) препятствуют росту аксонов и, таким образом, формированию утраченных нейронных связей [24, 87]. Поэтому, у пациентов с хронической ТСМ функциональное восстановление ограничено [179].

После ТСМ нейровоспаление сохраняется неопределенно долго и может вносить вклад в развитие ряда осложнений, включая нейропатические боли [91]. Нейропатические боли связаны со сложными периферическими, центральными и супраспинальными механизмами, которые до конца не изучены [150]. Они включают комплексные изменения в нарушенных нейронных сетях, реактивности клеток микроглии и астроцитов, потенциально способствующих центральной сенситизации [80].

Таким образом, патофизиология ТСМ представляет собой двухстадийный процесс. Первичное повреждение вследствие механического воздействия создает зону необратимого повреждения тканей, а вслед за этим разворачивается каскад вторичных повреждений, которые расширяют зону поражения спинного мозга и определяют отдаленные исходы ТСМ. Поскольку вторичные повреждения развиваются отсрочено, возникает перспектива патогенетической коррекции негативных последствий ТСМ именно в этот период.

В этом плане электрическая стимуляция, воздействуя на ключевые звенья вторичного повреждения, способна ограничить его распространение и создать условия для структурно-функционального восстановления спинного мозга.

1.2 Диагностика и лечение травмы спинного мозга

1.2.1 Диагностика травмы спинного мозга

После поступления в отделение пострадавшего с подозрением на ТСМ, проводят первичный осмотр и сбор анамнеза для обнаружения следов травмы, наличия сопутствующих повреждений и определения области поражения для дальнейшего инструментального обследования.

После осмотра и сбора анамнеза проводят неврологическое обследование по шкале ISCSCI (International Standards for Neurological Classification of Spinal Cord Injury – Международный стандарт неврологической и функциональной

классификации травмы спинного мозга) – оценивают силу сокращения мышц, определяют характер тактильной и болевой кожной чувствительности [140].

Силу сокращения определяют в 10 группах мышц, каждая из которых соответствует определенному сегменту спинного мозга, например, сегменту L2 соответствуют мышцы разгибатели бедра. Тестирование проводят по 5-ти бальной шкале, где 5 баллов является нормой, т.е. преодоление полного сопротивления сокращению мышцы, а 0 баллов соответствует полному параличу.

Оценку чувствительности проводят суммарно в 56 точках тела с двух сторон. Точки на теле также соответствуют сегментам спинного мозга, например, мизинец соответствует сегменту C8. Тест оценивают в баллах (от 0 до 2), где норма равна 2 баллам. Исследование болевой чувствительности проводят уколом иглой в контрольную точку, тактильной – прикосновением мягкой кисточкой. Дополнительно проводят проверку чувствительности анального кольца и при ее наличии исключают полную травму спинного мозга [19].

Специализированные медицинские учреждения снабжены аппаратурой для магнитно-резонансной томографии (МРТ) и рентгеновской компьютерной томографии (РКТ), чувствительность которых в диагностике травмы спинного мозга достигает 98-99% [4]. Однако, первоначально, пострадавший может поступить в учреждение без высокотехнологичного оборудования. Поэтому проводят рентгенографию позвоночного столба в двух проекциях. Несмотря на сравнительно низкую диагностическую чувствительность (до 66%), рентгенография позволяет получить информацию о нарушении оси позвоночного столба, обнаружить смещения и деформации позвонков, и оценить состояние окружающих тканей [4].

«Золотым» стандартом диагностики травм спинного мозга принято считать РКТ [114]. При подозрении на наличие сочетанной травмы, проводят сканирование не только отдела, на который указывает симптоматика, но и остальных отделов позвоночника. При наличии каких-либо сомнений по результатам исследования, дополнительно показано проведение МРТ. Обследование при помощи МРТ направлено на оценку мягкотканых структур. МРТ дает возможность обнаружить

повреждения спинного мозга, кровоизлияния и их локализацию, наличие грыж межпозвоночных дисков и кист [155].

При отсутствии возможности проведения МРТ, для визуализации наличия компрессии спинного мозга, деформации позвоночного канала, повреждения твердой мозговой оболочки, используется миелография. Миелография – метод рентгенодиагностики, включающий введение контрастного вещества в позвоночный канал с последующей рентгенографией позвоночного столба. Для установления локализации и границ блока субарахноидального пространства применяют два вида миелографии: восходящую (для определения нижнего уровня блока) с введением препарата на границе поясничного и крестцового отделов и нисходящую (для определения верхнего уровня блока) введением контраста посредством субокципитальной пункции [155, 166].

Также уровень повреждения возможно определить при помощи электрофизиологических методов, таких как регистрация вызванных моторных потенциалов и соматосенсорных вызванных потенциалов [13].

1.2.2 Лечение и реабилитация

Применяемые в настоящее время консервативный и хирургический методы лечения ТСМ имеют свои преимущества и недостатки. Поэтому, изолированно друг от друга эти методы применяют редко и результаты лечения зависят от правильной комбинации этих двух подходов. При этом наиболее важным является оказание помощи на догоспитальном этапе. Манипуляции на этом этапе нацелены на восстановление кровоснабжения места травмы и предотвращения дальнейшего увеличения участков поражения.

На догоспитальном этапе приоритетной задачей является предотвращение летального исхода и поддержание жизни пострадавшего на месте получения травмы, что рекомендует протокол системы ATLS (Advanced Trauma Life Support – Расширенная поддержка жизнедеятельности при травмах). Он включает

обеспечение проходимости дыхательных путей, поддержание оксигенации и стабилизацию гемодинамики, а также обязательную иммобилизацию позвоночника. Благодаря использованию этого протокола у пострадавших снизилась частота ухудшения неврологической симптоматики на этапе транспортировки в лечебное учреждение [94].

В отделении реанимации пациенты получают стандартный комплекс оказания помощи для пациентов с множественными травмами. В дополнение к этому, из-за особенностей состояния при повреждении спинного мозга (проявление дыхательной недостаточности, гипоксии), для таких пациентов может быть востребованы соответствующие лечебные манипуляции.

При оказании помощи пациентам с ТСМ комплекс лечебных мероприятий включает: оперативное вмешательство, коррекцию дыхательной недостаточности, поддержание функционирования сердечно-сосудистой системы и проведение консервативной терапии [35]. Крайне важно в самые короткие сроки провести хирургическую декомпрессию спинного мозга, путем извлечения костных отломков, либо их правильной репозиция, а также стабилизации позвоночного столба [123].

При коррекции дыхательной недостаточности основным является обеспечение пациента с ТСМ необходимым количеством кислорода, в основном при травмах шейного отдела, что обусловлено параличом дыхательных мышц. Это приводит к гипоксии и повреждению различных органов и тканей, в том числе усугубляет состояние и спинного мозга [112].

Главной задачей в стратегии поддержания сердечно-сосудистой системы являются недопущение развития у пациента гипотензии, поддержание систолического давления не ниже 100 мм рт.ст. для сохранения перфузии спинного мозга и профилактика тромбообразования, так как вероятность тромбоза глубоких вен у таких пациентов варьирует от 47 до 100 % при отсутствии профилактических мероприятий [54]. Для профилактики ортостатической гипотензии пациентам в постоперационном периоде следует носить специальные бандажи или чулки.

Консервативное лечение ТСМ направленно как на снижение неврологических последствий вследствие первичного повреждения спинного мозга, так и на предупреждение вторичного повреждения обусловленных воспалением и сосудистыми нарушениями [118]. Арсенал лекарственных средств включает: кортикостероиды, ганглиозиды GM1, антагонисты опиоидных рецепторов, миноциклин, блокаторы кальциевых и натриевых каналов [7, 107, 185].

Назначение кортикостероидов в срок до 8 часов после получения травмы и дальнейшая терапия на протяжении двух суток улучшает прогноз и реабилитацию у пациентов [94]. Ганглиозиды GM1 положительно влияют на синаптическую передачу и стимулируют рост нервных волокон при начале их использования в первые 72 часа после травмы [42]. Антагонисты опиоидных рецепторов подавляют действие эндогенных опиоидов, которые обладают сосудорасширяющим эффектом и способствуют развитию гипотензии, усугубляя ишемию спинного мозга. Таким образом, применение антагонистов предупреждает нарушения в кровообращении спинного мозга вследствие гипотензии. Блокаторы калиевых каналов, такие как Фампридин и HP-184 способствуют восстановлению проведения по поврежденным немиелинизированным волокнам.

Помимо вышеуказанных базовых задач, у пациентов с ТСМ могут возникать различные проблемы со стороны кишечника и мочевого пузыря. В зависимости от полноты и уровня травмы, при неврологической дисфункции кишечника может потребоваться соблюдение специальных диет и прием либо препаратов, формирующих содержимое кишечника, либо слабительных препаратов. При неврологической патологии мочеиспускания производят катетеризацию мочевого пузыря.

Как правило пациенты с ТСМ длительно пребывают в лежачем положении и примерно у половины возникают пролежни. Наиболее часто наблюдают пролежни седалищных бугров и крестца. Для их профилактики применяют специальные матрацы либо, при их отсутствии, периодически изменяют положение тела.

Главная цель реабилитации пациентов с ТСМ – как можно более полное восстановление утраченных функций организма. Это особенно важно в связи с тем,

что значительная их часть инвалидизируется и ранняя нейрореабилитация необходима для социальной и профессиональной адаптации.

Около 81% пациентов в течение первого года страдают от болевого синдрома. У 83 % болевой синдром продолжается в течение 25 лет. Поэтому, борьба с болью является важным этапом реабилитации. Возможно применение нескольких вариантов лечения и их комбинации: фармакологическая терапия, физиотерапия и хирургическое вмешательство. Существует несколько схем применения препаратов в зависимости от выраженности болевого синдрома: нестероидные противовоспалительные препараты назначают при слабой боли, опиоидные препараты (например, кодеин) применяют комплексно вместе с ненаркотическими анальгетиками при умеренной боли; морфин и фентанил в комплексе с ненаркотическими анальгетиками используют при сильных болях и в подобных ситуациях возможно субдуральное введение морфина [94].

Применение немедикаментозных методов включает в себя работу с психологом, различные виды электростимуляции, лечебные массажи, анаэробные и аэробные упражнения, лечебная гимнастика. Так как многие пациенты не могут в полной мере восстановить утраченные функции, то для улучшения их качества жизни были созданы специальные механизмы и приспособления. Они включают специальные кровати, механические или электрические либо роботизированные кресла-каталки, позвоночные ортезы, ортезы для верхних или нижних конечностей [11].

1.3 Электростимуляция спинного мозга

Электрическая стимуляция является признанным перспективным направлением нейрореабилитации пациентов с ТСМ, что обосновано рядом фундаментальных нейрофизиологических наблюдений [22, 74, 78, 98, 119]. А. Sherwood с соавт. (1992) установили, что даже при «клинически полных» повреждениях после ТСМ часто сохраняются остаточные супраспинальные связи

ниже уровня поражения [149]. Это обстоятельство свидетельствует о способности подлежащих нейронных структур получать нисходящие сигналы, однако их интенсивности недостаточно для инициации моторного ответа. R. Edgerton и др. (2004) показали, что несмотря на утрату супраспинального контроля, нейронные сети каудальнее места травмы в значительной степени сохраняют свою морфологическую и функциональную целостность и способны к активации при внешнем воздействии [134]. Таким образом, прямой доступ к этим нейронным сетям посредством стимуляции открывает возможность для модуляции их активности. M.R. Dimitrijevic с соавт. (1998) отметили особую важность способности пояснично-крестцового центрального генератора шагательных движений (central pattern generator, CPG) отвечать на экзогенную электрическую стимуляцию, что способствует восстановлению локомоторных паттернов [57]. Следовательно, применение электрической стимуляции дистальнее места повреждения позволяет инициировать двигательную активность даже в тех случаях, когда спинальные нейронные сети утратили способность к активации за счет естественных супраспинальных влияний.

В настоящее время разработан ряд технологических подходов для стимуляции нервной системы при ТСМ. Среди стратегий, направленных на активацию спинальных структур ниже уровня поражения, наиболее перспективными зарекомендовали себя эпидуральная электростимуляция, стимуляция периферических нервов (СПН) и функциональная электростимуляция (ФЭС).

Данные, полученные в клинике и в экспериментах на животных показывают, что электрическая стимуляция спинного мозга положительно влияет на спинномозговое и периферическое кровообращение, что создает благоприятные условия для начала процессов регенерации [8].

1.3.1 История развития электростимуляции

Применение электричества в медицинских целях восходит к глубокой древности и свои первые подобные «навыки» человек получил при контактах с электрическими рыбами. Следует отметить, что «рыбье электричество» возникло независимо у разных представителей надкласса Рыбы (*Pisces*) благодаря удвоению гена натриевого канала, исходно работающего в мышцах. По объему выработки электроэнергии современных электрических рыб разделяют на слабых и сильных. Слабые – африканские мормиры (*Mormyroidea*) и южноамериканские гимноты (*Gymnotiformes*) – генерируют разряды до одного вольта и не способные никому нанести вреда. Эти рыбы используют электричество для коммуникации, навигации и обнаружения пищи в мутной воде и темноте. Сильные рыбы генерируют разряды мощностью до нескольких сотен вольт. В частности, электрические скаты (*Torpediniformes*) вырабатывают напряжение до 220 вольт, нильский электрический сом (*Malapterurus electricus*) вдвое больше, а электрический угорь (*Electrophorus electricus*) – до 860 вольт. Эти хищники, применяют электричество, чтобы глушить своих жертв, но также применяют «рыбий электрошок» для самообороны. С его помощью они также ощущают заряды в окружающей среде, сочетая «электрическую разведку» с «электрическим нападением» [17].

Исторически для лечения различных болей, подагры и даже при родах применяли только сильных электрических рыб. Изображения нильского сома найдены в гробнице архитектора Ти в некрополе Саккара (V династия, около 2750 г. до н.э.), а также в других некрополях (Мерерука, Меир) [172]. Однако древние египтяне своеобразно утилизировали его для лечения. В знаменитом медицинском папирусе Георга Эберса (1500-1600 гг. до н.э.), упомянут рецепт (304) от воспаления, включающий мазь, сделанную из пепла головы сома, смешанной с жиром или маслом. Поскольку египтяне называли рыбу *ddb* или *djedeb* (« жало»), возможно, они считали, что она сохраняет часть своих свойств после смерти.

Античные авторы подробно описывали лечебное применение электрических скатов. Платон, а позднее Аристотель отмечали «оглушающее» действие скатов, что дало грекам основание называть их νάρκη (narke), ставшее корнем современного термина «наркоз» [109]. Хотя следует отметить, что древние греки больше внимания уделяли диетическим свойствам их мяса. Древние римляне называли этих рыб «торпедо» от лат. torpeō (быть застывшим, оцепенелым). Личный врач императора Клавдия Скрибоний Ларгос в 46 г. до н.э. описал случай излечения от подагры вольноотпущенника Нерона, случайно наступившего на ската, и рекомендовал помещать живую рыбу на больное место до наступления онемения [115]. Клавдий Гален (131-201 гг. н.э.) применял разряды скатов для лечения подагры и головной боли, в том числе пытаясь облегчить мигрень императора Коммода. Имеются сведения о лечении императора Нерона от ревматизма путем помещения в бочку со скатами [8, 106]. Арабские путешественники XVI в. сообщали об использовании электрических сомов в Эфиопии для лечения малярии, для чего пациентов привязывали к столу и прикладывали рыбу к суставам, вызывая нестерпимую боль, после чего болезнь отступала [106]. Однако в те далекие времена было мало понимания роли электричества в функционировании нервной системы.

Научный подход к изучению электричества начался в XVI-XVII веках. В 1600 г. Уильям Гильберт, придворный врач Елизаветы I и Якова I, в своем труде *De magnete, magneticisque corporibus et de Magno Magnete Tellure* (О магните, магнитных телах и большом магните – Земле») впервые описал магнитное поле Земли, а также отделил собственно магнетизм от так называемого «эффекта янтаря» (статическое электричество) и ввел в оборот прилагательное «электрический» от др.-греч. названия янтаря ἤλεκτρον (электрон). В том же году немецкий физик Отто фон Герике создал первый электростатический генератор – шар из серы, натираемый руками [3, 32].

В 1720-х годах XVIII в. английский физик Стивен Грей продемонстрировал проводимость электричества и возможность электризации человека, разделив материалы на проводники и непроводники. Английский физиолог и химик Стивен

Гейлс предположил, что нервы функционируют за счет «электрической энергии». Аббат Жан-Антуан Нолле безуспешно пытался лечить паралич статическими зарядами [32]. Бенджамин Франклин создал аппарат для получения статического электричества и применял его с лечебной целью (позднее метод называли франклинизацией). К 1752 году, когда Иоганн Шеффер опубликовал книгу «Электрическая медицина», многие врачи уже использовали электричество, не понимая механизма его действия [32].

Переломным моментом явился феномен сокращения мышц лягушки при контакте с металлом и искрой электрической машины, случайно обнаруженным Луиджи Гальвани (1786). После пяти лет экспериментов он в 1791 г. опубликовал свою знаменитую книгу *De Viribus Electricitatis in Motu Musculari Commentarius* (Трактат о силах электричества при мышечном движении), где изложил теорию *electricitas animalis* (животного электричества), предположив, что электричество генерируется в организме [32]. Алессандро Вольта, изначально поддержавший Гальвани, к 1793 году доказал, что электричество возникает от контакта двух разнородных металлов, и создал первый источник постоянного тока – знаменитый «вольтов столб». Александр фон Гумбольдт (1797) экспериментально подтвердил правоту обоих ученых, признав существование как биметаллического, так и животного электричества [32].

В Российской империи физик В.В. Петров проводил исследования влияния тока на живые ткани и описал наркотическое действие электричества на рыб, результаты которых изложил в книге «Известия о гальвано-вольтовых опытах» (1803). В 1804 году физиолог и анатом И.Е. Грузинов защитил в Московском университете диссертацию *De galvanismo ejusque usu in praxi medica* («О гальванизме и его применении в медицинской практике») [3, 81]. Племянник Гальвани, врач и физик Джованни Альдини применял токи для лечения психических расстройств, сообщив о реабилитации пациента с симптомами, сходными с шизофренией [32].

В 1830-х годах физик Карло Маттеуччи обнаружил генерацию тока поврежденными тканями [16]. Ученик естествоиспытателя Иоганна Мюллера,

Эмиль Дюбуа-Реймон открыл нервный импульс и усовершенствовал индукционную катушку Фарадея для контролируемой стимуляции, заложив основу фарадизма – применения переменного тока в медицине [5].

В 1848-1850 годах французский невролог и «отец электротерапии» Гийом Бенжамен Дюшен наблюдал увеличение мышечной массы при фарадизации и установил, что стимуляция через двигательные точки дает более сильные сокращения. Позднее эти наблюдения подтвердил немецкий невролог Роберт Ремак (1867). Немецкий терапевт Гуго фон Цимссен детально описал расположение двигательных точек (1857), Р. Ремак первым применил электростимуляцию к болезненным точкам и представил движущийся катод для стимуляции мышц. В 1859 году немецкий физиолог Эдуард Пфлюгер сформулировал закон: катод действует как раздражитель, анод – как депрессант [3].

В 1858-1859 годах доктор Дж.Б. Фрэнсис в Филадельфии запатентовал устройство для обезболивания при удалении зубов после 164 успешных процедур, хотя его устройство было осуждено Пенсильванской ассоциацией хирургов-стоматологов, методы, использованные Фрэнсисом, распространились по всей Америке и Европе. У.Г. Оливер из Буффало сообщил о 98% успехе применения виброгенератора для обезболивания в стоматологии, а Хардинг в Лондоне подтвердил эти результаты [115].

В 1874 году была предпринята первая документированная электрическая стимуляция коры головного мозга у пациента в сознании [106]. Во второй половине XIX века электротерапия широко распространилась в Европе. В парижской клинике Сальпетриер первый кабинет электротерапии открылся в 1875 году под руководством доктора Ромена Вигуру, а Жак Д'Арсонваль присоединился к команде Вигуру и в 1894 году стал одним из основателей Парижской школы электричества [101].

После доклада Флекснера (1910 г.), установившего в медицине строгие научные стандарты, электротерапия была объявлена шарлатанством из-за отсутствия доказательств. Это привело к ее исключению из практики и на десятилетия задержало развитие и внедрение медицинских электроприборов [130].

В то же время активно развивалась электрификация, и ученые, включая лабораторию Т.А. Эдисона, отрицали какое-либо влияние электромагнитных полей на живые организмы, игнорируя наблюдения Арсена Д'Арсонваля о магнитных фосфенах [32].

Несмотря на это, отдельные исследования продолжались. В 1900х годах врач Л. Робинович применяла ток силой до 18 мА для анестезии при ампутациях [81]. В годы Первой мировой войны во Франции Кловис Венсан применял болезненную электротерапию для лечения «военного невроза», что вызвало осуждение коллег [45]. В 1919 году Чарльз Кент запатентовал первый коммерческий стимулятор Electreat, первоначально коммерчески реализуемый как «панацея», но позже стал первым прибором, привлеченным к ответственности по закону 1938 года за необоснованные заявления [125].

В начале 20 века Россия не производила самостоятельно оборудование для физиотерапии. В СССР с 1922 года Николай Коротнев наладил производство физиотерапевтической аппаратуры и в 1927 году опубликовал книгу «Электротерапия», став основоположником отечественной школы нервно-мышечной стимуляции [3]. В 1933 году И.М. Томпсон и В.Т. Инман использовали электроанальгезию для картирования кожных нервов. В 1938 году Уго Черлетти ввел электросудорожную терапию в психиатрии [115]. Пьер Параф в 1948 году сообщил об успешном лечении 127 пациентов с невралгиями [109].

В 1950-х годах немецкий врач Рейнхольд Фолль разработал метод электропунктуры, основанный на измерении пониженного электрического сопротивления в акупунктурных точках, что позволило диагностировать заболевания по изменениям проводимости [115].

В 1967 году произошли два ключевых события, определивших развитие современной нейромодуляции. П. Уолл и Б. Свит, основываясь на теории «воротного контроля боли», впервые клинически применили чрескожную электрическую стимуляцию нервов (ЧЭНС), стимулируя Аβ-волокна для анестезии [125]. В том же году нейрохирург Норман Шили имплантировал первую систему

стимуляции спинного мозга пациенту с невропатической болью, установив электрод субдурально [106].

В 1973 году Й. Хособучи применил глубокую стимуляцию мозга при невропатической лицевой боли [109]. В 1984 году случайно обнаруженный эффект стимуляции спинного мозга при стенокардии привел к уже целенаправленным имплантациям системы стимуляции спинного мозга для лечения неразрешимой стенокардии в Австралии (1987). Развитие технологии кардиостимуляторов позволило создать надежные имплантируемые генераторы импульсов и многополярные электроды [106].

В 1988 году Д.М. Виротиус в редакционной статье журнала «Journal of Medical Rehabilitation» объявил «новую эру» электростимуляции в реабилитации. В этом же году У. Гибсон применил электростимуляцию для профилактики атрофии мышц при иммобилизации, а также началось ее применение в комбинации с гепарином для профилактики тромбозов у страдающих параплегией [60].

Современный этап (с начала 90-х годов XX в.) характеризуется технологическим совершенствованием. В 1990 году Луис Стинус предложил интерференционные высокочастотные токи для послеоперационной анальгезии [115]. Европейский проект CALIES (Computer Aided Locomotion by Implanted Electrical Stimulation – Компьютерное управление передвижением с помощью имплантированной электростимуляции) был направлен на восстановление движения у пациентов с параплегией [60]. В 2005 году высокотоновая внешняя мышечная стимуляция показала преимущество перед классической чрескожной электрической стимуляцией нервов при диабетической нейропатии и почечной недостаточности [120].

1.3.2 Стимуляция периферических нервов

Электрическую стимуляцию можно применять непосредственно к периферическим нервам ниже уровня повреждения. Выделяют два основных

направления использования периферической стимуляции: с терапевтической целью (стимуляция периферических нервов, СПН) и с функциональной целью (функциональная электростимуляция, ФЭС).

Подобно ЭЭС, исторически СПН берет начало в лечении нейропатической боли после того, как группа исследователей добилась ее облегчения с помощью стимуляции подглазничного нерва [182]. Более широкая коммерческая доступность устройств для СПН способствовала ее распространению при различных болевых синдромах, включая фантомные боли у ампутантов, боли в спине и головные/лицевые боли [144]. В контексте спинальной травмы СПН также нашла применение как для купирования нейропатической боли [167], так и в попытках восстановления моторных и вегетативных функций [65, 151].

Разработано множество устройств для СПН, различающихся по степени инвазивности и специфичности стимуляции нервов. Чрескожные устройства обеспечивают доступную и временную стимуляцию посредством накожных или игольчатых электродов соответственно [25]. Альтернативными являются имплантируемые системы долговременной стимуляции. Процедура их установки включает хирургическое выделение целевого нерва и фиксацию электродной матрицы с последующим подшиванием устройства к тканям и соединением с внутренним или наружным генератором импульсов [129]. Имплантируемые стимуляторы могут охватывать нерв снаружи, используя спиральные, манжеточные или платформенные конструкции электродов. Более специфичные и инвазивные устройства предусматривают проникновение в толщу нерва для избирательной активации отдельных нервных пучков [90].

Применение СПН после ТСМ продемонстрировало положительные эффекты в отношении моторных, вегетативных функций и нейропатической боли. Исследование 2015 года показало, что применение шестинедельного протокола односторонней чрескожной электростимуляции общего малоберцового нерва у пациентов с ТСМ позволило уменьшить моторную дисфункцию на стороне стимуляции [151]. Двусторонняя стимуляция большеберцового нерва значительно улучшила уродинамические показатели у 15 пациентов с нейрогенной детрузорной

гиперактивностью после ТСМ [65]. В другом исследовании было обнаружено, что однократный сеанс чрескожной стимуляции нервов нижних конечностей приводит к снижению спастичности у пациентов с ТСМ [152].

На модели контузионной травмы спинного мозга у крыс на уровне Th11-Th12, ежедневная электростимуляция крестцового нерва игольчатым электродом в течение 14 дней, улучшила моторные и вегетативные функции, проявившиеся в улучшении показателей в тесте «открытое поле», сокращении времени до первой дефекации и улучшении качества и консистенции фекалий [66]. Также было показано, что стимуляция седалищного нерва после ТСМ на уровне Th8 у грызунов способствует росту аксонов через зону повреждения [55, 71]. Эти исследования демонстрируют, что использование СПН после ТСМ перспективно не только для улучшения двигательных функций, но и других аспектов, значимо повышающих качество жизни пациентов.

Как и все методы электростимуляции, СПН также имеет свои ограничения. Так, параметры электростимуляции чаще всего подбирают индивидуально, и они могут варьировать в зависимости от желаемого эффекта. В отличие от ЭЭС, для СПН доступно несколько типов устройств, использующих различные методы стимуляции и степени инвазивности, что позволяет более гибко применять этот метод в терапии [25]. Имплантируемые электроды, как правило, применяют для долгосрочного использования, поскольку они обычно обеспечивают более точную активацию нервов при более низких параметрах стимуляции [83]. Однако их установка требует хирургического вмешательства с присущими ему рисками и осложнениями, а сам процесс имплантации может потенциально привести к повреждению нерва вследствие наложения швов или образования рубцов и спаек. Кроме того, не исключается смещение или поломка электрода, из-за чего может потребоваться повторная операция, которая также влечет за собой риски [153].

Неоднократно предпринимались попытки преодолеть указанные ограничения за счет разработки более компактных и менее инвазивных устройств. В частности, группа ученых из Австралии (2019) представили «графт-антенну» – золотую полосу, интегрированную в хитозановый каркас, допускающие

минимально инвазивную имплантацию посредством лазерной фиксации в тканях и дальнейшую беспроводную СПН с использованием магнитной стимуляции [157]. Однако эффективность этого метода при в условиях ТСМ остается не изученной, а его эффективность была проверена только при перерезке нерва. В том же году американские исследователи разработали «инъеэлектрод» – инъецируемый «жидкий» электрод с проводящими свойствами, который застывает и формирует гибкий электрод вокруг целевого нерва [25]. Несмотря на то, что эти разработки требуют дальнейшего изучения, они представляют собой менее инвазивные методы, способные расширить применение СПН для терапии ТСМ.

1.3.3 Функциональная электростимуляция

Функциональная электростимуляция использует стимуляцию периферических нервов для активации мышечных сокращений, необходимых для выполнения пациентом конкретной функциональной задачи. Как и в случае с СПН, для ФЭС применяют чрескожные, или имплантируемые электроды [116]. Стимуляция направлена непосредственно на периферические нервы, а не на мышечную ткань, так как более низкие требования к мощности при стимуляции нервов снижают риск повреждения тканей и дискомфорта для пациента [128].

ФЭС демонстрирует многообещающие улучшения функций пациентов после ТСМ. Недавнее исследование с участием 27 пациентов с хронической неполной моторной ТСМ оценило эффективность 16-недельной программы тренировок на беговой дорожке с поддержкой веса тела в сочетании с ФЭС нижних конечностей. Участники группы, во время ходьбы с ФЭС, показали значимо более высокие показатели по субшкале мобильности опросника SCIM (Spinal Cord Independence Measure – Мера независимости спинного мозга) по сравнению с контрольной группой, выполнявшей аэробные и силовые упражнения [21]. У 24 пациентов в течение первых 6 месяцев после ТСМ комбинация ФЭС со стандартными тренировками привела к значительному улучшению функции захвата по сравнению

с применением только тренировок [84]. Недавнее исследование показало, что ФЭС-терапия способна достоверно увеличивать мышечную массу, улучшать функцию мышц и метаболизм [29]. Сообщалось также о положительном влиянии на сердечно-сосудистую систему, хотя в недавней работе с использованием ФЭС значимого снижения риска сердечно-сосудистых заболеваний не наблюдалось [37]. Несмотря на необходимость дальнейших исследований для уточнения кардиоваскулярных эффектов, улучшения моторной функции подчеркивают потенциал ФЭС при ТСМ.

Многие ограничения, установленные для стимуляции периферических нервов, применимы и к ФЭС. При ФЭС используют чрескожную стимуляцию с помощью временных накожных электродов, правильное размещение которых может быть затруднительным и требовать значительных временных затрат. Имплантируемые системы позволяют решить эту проблему, однако их применение связано с инвазивным вмешательством и риском неисправности устройства. Как и в случае с СПН, разработка более простых и менее инвазивных устройств будет способствовать более широкому внедрению имплантируемых систем ФЭС. Отдельной проблемой ФЭС является быстрое развитие мышечного утомления при стимуляции, что, вероятно, обусловлено обратным порядком рекрутирования мышечных волокон при электрическом воздействии [59]. Электростимуляция в первую очередь активирует нервные волокна большого диаметра, в то время как при естественном сокращении первыми рекрутируются волокна малого диаметра [128]. Изменение порядка рекрутирования приводит к более быстрому утомлению мышц, что ограничивает продолжительность и эффективность реабилитации с использованием ФЭС. Несмотря на то, что эта проблема сохраняется, был опробован ряд стратегий для снижения утомляемости, однако их успешность неоднозначна [158].

1.3.4 Эпидуральная электростимуляция

Эпидуральная электростимуляция – метод стимуляции спинного мозга, либо отдельно его корешков эпидуральными электродами [132]. Эпидуральную стимуляцию первоначально применяли для облегчения труднопереносимой боли у пациентов. При проведении лечения электроды устанавливают эпидурально и подключают к внешнему стимулятору для настройки частоты и силы тока. После произведения настройки и получения положительного результата (снижение боли), устанавливают подкожный генератор импульсов. Спектр применения ЭЭС был расширен после неожиданного улучшения двигательной функции у пациента с рассеянным склерозом, проходившего курс анальгезирующей терапии. Различные варианты стимуляции спинного мозга стали применять, помимо обезболивания, например, для снижения спастичности мышц [132, 164]. Также, в результате исследований, были получены данные о том, что благодаря эпидуральной стимуляции можно вызывать движения в парализованных конечностях у пациентов с полным нарушением проводимости по двигательным путям. [95]

1.3.4.1 Механизмы действия эпидуральной электростимуляции

ЭЭС обеспечивает посттравматическую регенерацию спинного мозга за счет повышения нейропластичности через различные молекулярные и клеточные механизмы, способствующие росту аксонов и формированию новых нейронных связей [26]. Это имеет решающее значение для восстановления сохранившихся супраспинальных проводящих путей, контролирующих двигательную функцию спинного мозга.

Посттравматическая ЭЭС спинного мозга повышает жизнеспособность выживших в области повреждения нейронов [62]. Нейропротекторное действие экзогенных электрических импульсов на спинномозговые нейроны может быть связано с активацией различных внутриклеточных сигнальных каскадов. Приток

ионов кальция через потенциал зависимые Ca^{2+} -каналы приводит к повышению уровня внутриклеточного Ca^{2+} , что активирует известные цитоплазматические сигнальные молекулы, такие как фосфолипазы, протеинкиназу C и фосфоинозитид-3-киназу (PI3K) [43]. Впоследствии внутриклеточные сигналы, индуцированные Ca^{2+} , активируют факторы транскрипции, например, CREB [36] и NF- κ B [111], а также MAPK/ERK [183] и PI3K/Akt [189] сигнальные каскады, регулирующие экспрессию генов, которые кодируют нейротрофические факторы, такие как мозговой нейротрофический фактор BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*) [72] и нейротрофин-3 [162]. В свою очередь нейротрофические факторы способствуют росту аксонов и образованию утраченных синапсов [70]. Дополнительно ЭЭС повышает синаптическую пластичность за счет увеличения экспрессии белков, таких как синаптофизин [184] и стимулирует дифференцировку олигодендроглиальных клеток, обеспечивающих миелинизацию аксонов [76].

1.3.4.2 Влияние ЭЭС на центральные генераторы паттерна

Одним из основных объектов воздействия ЭЭС являются центры управления сложными, ритмическими паттернами движений (ходьба, плавание и дыхание), автономно генерируемые в спинном мозге. За эти паттерны отвечают специализированные нейронные сети – центральные генераторы паттернов (ЦГП) [88]. Они функционируют с помощью механизмов реципрокного торможения и активности пейсмейкерных нейронов, что позволяет генерировать скоординированные, повторяющиеся движения [88]. Благодаря сложной нейромодуляции, ЦГП обладают высокой степенью адаптации, что обеспечивает гибкость двигательной активности [104]. Тот факт, что нейронные сети ЦГП способны генерировать ритмическую двигательную активность даже в отсутствие нисходящих команд от головного мозга, дает основание применять ЭЭС для модуляции ЦГП после травмы спинного мозга.

Активация с помощью электрических импульсов пояснично-крестцовой области спинного мозга через ЦПП повышает возбудимость двигательных нейронных сетей [44] и, таким образом, может восстанавливать произвольный контроль над скелетными мышцами нижних конечностей, позволяя пациенту с ТСМ стоять и совершать шагательные движения. В сочетании с реабилитационными тренировками ЭЭС закрепляет двигательные модели, связанные с активностью ЦПП, способствуя со временем функциональному восстановлению спинного мозга [145]. Адаптируя параметры стимуляции под потребности пациента ЭЭС может также регулировать и координацию движений, генерируемых ЦПП. Указанное свидетельствует о значительном потенциале ЭЭС в восстановлении локомоторных функций и улучшении результатов нейрореабилитации [131]. Кроме того, было установлено, что одновременная нейромодуляция сенсорных путей вместе с активацией ЦПП обеспечивает синергичный эффект на восстановление двигательной функции спинного мозга [97, 146].

1.3.4.3 Ограничения и перспективы развития эпидуральной электростимуляции

Несмотря на многообещающие перспективы в коррекции моторных и вегетативных функций, метод ЭЭС имеет ряд ограничений. Прежде всего, имплантация электродов требует хирургического вмешательства, которое, хотя обычно и проходит без осложнений, но потенциально может нарушать стабильность позвоночника и несет риск развития инфекционных осложнений [73]. Альтернативным методом является чрескожная стимуляция спинного мозга. Однако, несмотря на предварительные данные об улучшении произвольных движений, мышечной силы и функций при использовании чрескожной стимуляции, эти испытания носят пилотный характер и необходимы дальнейшие исследования, подтверждающие ее эффективность [177].

Сама технология ЭЭС также требует дальнейшей оптимизации для повышения эффективности. Параметры стимуляции обычно подбирают индивидуально, что делает процесс оптимизации паттернов активации весьма трудоемким, ограничивающим начало реабилитации [73]. Кроме того, стимуляция обычно подается в непрерывном режиме. Однако непрерывные импульсы ЭЭС могут нарушать естественную проприоцептивную чувствительность, имеющую критическое значение для восстановления локомоторной функции [68]. Также, в исследованиях при ТСМ часто используют те же электроды, что и для терапии хронической боли, и они не оптимизированы для процедур по восстановлению моторной функции [73]. Это ограничение было частично преодолено в недавнем исследовании, где была разработана оптимизированная матрица электродов для реабилитации после ТСМ. Дальнейшее использование таких матриц может повысить эффективность будущих исследований [23].

К тому же, участники исследований ЭЭС, как правило, проходят интенсивную физическую реабилитацию, которая, вероятно, превосходит по объему стандартный протокол реабилитации при ТСМ [73]. Например, A. Rowald с соавт. (2022) проводили группе пациентов персонализированную реабилитацию от одного до трех час/сутки курсом 4-5 раз в неделю на протяжении 5 месяцев, что составило от 80 до 300 часов реабилитации [23]. А в другом исследовании средний объем реабилитации в условиях стационара составил 55,3 часа [171]. Это несоответствие в объемах реабилитационных мероприятий необходимо учитывать при интерпретации результатов исследований ЭЭС. В реальной клинической практике для пациентов с имплантированными системами ЭЭС может оказаться невозможным соблюдение тех режимов физической терапии, проводимых в исследованиях, что способно повлиять на конечные результаты. В этой связи оптимизация протоколов ЭЭС и программ реабилитации является ключевым направлением, повышающим доступность и эффективность метода в будущем.

В настоящее время стимуляция спинного мозга стала стандартом лечения хронической боли и двигательных нарушений. Уменьшились размеры электродов, что сделало их более удобными к имплантации. Они содержат больше каналов для

программирования, а технология генераторов импульсов значительно усовершенствовалась [8]. Развитие метода ЭЭС также должно сопровождать решение важных этических вопросов, касающихся доступности передовых технологий лечения ТСМ для разных групп населения и информированности пациентов об ожидаемых результатах, потенциальных рисках и длительности лечения.

Стратегию развития ЭЭС спинного мозга в настоящее время связывают с комбинированным использованием стимуляции на разных сегментах одного уровня, или на разных отдаленных друг от друга уровнях спинного мозга. В дополнение к возбуждению нейрональных сетей спинного мозга, контролирующих ЦПП, электростимуляция сегментов травмированного спинного мозга в различных его отделах показала свою эффективность [176]. Такой способ позволяет пространственно и функционально активировать нейронные сети по спинному мозгу, чтобы синергически модулировать возбудимость оптимальной популяции пула интернейронов. Существующие подходы в клинической практике преимущественно ориентированы на стимуляцию сегментов, расположенных ниже уровня повреждения спинного мозга. Для обеспечения движений нижних конечностей электростимуляцию проводят с помощью эпидуральных электродов, устанавливаемых на уровне поясничного утолщения, что активирует ЦПП [44]. Однако в вышележащих отделах происходят ключевые процессы нейропластичности: формирование новых синаптических связей и перестройка сохранившихся нейронных сетей, что обязательно для восстановления функциональных связей между супраспинальными двигательными центрами и отделами, расположенными ниже эпицентра травмы [99]. Таким образом, отсутствие электростимуляции выше уровня повреждения существенно ограничивает нейрореабилитационный потенциал и не позволяет в полной мере реализовать возможности нейромодуляции при ТСМ. Указанный недостаток обуславливает необходимость разработки новых подходов к эпидуральной электростимуляции, учитывающих двухуровневую стимуляцию как роstralных, так и каудальных сегментов относительно эпицентра нейротравмы.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперимент выполнен на девяти мини-свиньях (вьетнамских вислобрюхих) самках весом 20-25 кг. Животные были размещены в индивидуальных клетках в стандартных лабораторных условиях с неограниченным доступом к пище и воде и 12-часовым циклом день/ночь. Протокол экспериментальных исследований, включая анестезию, операционные вмешательства, послеоперационный уход и эвтаназию был одобрен Локальным этическим комитетом Казанского государственного медицинского университета (протокол №10 от 20 декабря 2022 года). Все экспериментальные процедуры проводились в соответствии со стандартами минимизации страданий животных и размером экспериментальных групп. В эксперимент животных включали после периода адаптации не менее 7 дней. Подопытные животные были разделены на следующие экспериментальные группы: контрольная (ТСМ-группа) – свиньи после контузионной травмы спинного мозга, проходившие двигательную реабилитацию на беговой дорожке ($n = 3$); опытная группа (ТСМ-ЭЭС-группа) – животные с ТСМ, проходившие двигательную реабилитацию на беговой дорожке в условиях двухуровневой ЭЭС ($n = 3$); и интактная группа – здоровые животные ($n = 3$) для сбора исходных результатов поведенческих, электрофизиологических и морфологических исследований. Животных выводили из эксперимента через восемь недель после ТСМ. Эвтаназию осуществляли под глубоким наркозом путем передозировки ингаляционного наркотического вещества («Изофлуран», Laboratorios Karizoo, S.A., Барселона, Испания). Малое число свиней в контрольной и опытной группах, как и в других доклинических исследованиях, выполненных на небольшом количестве крупных животных, объясняется сложностью оперативных вмешательств, проводимых длительное время комплексных экспериментальных процедур, а также содержанием и уходом за животными с повреждением мозга [30, 77].

Нейромодуляцию для патогенетической коррекции последствий травмы

спинного мозга осуществляли посредством транстравматической двухуровневой эпидуральной электростимуляции ниже и выше места нейротравмы во время тренировки на беговой дорожке. У свиней до моделирования ТСМ в нижнегрудном отделе (Th8-Th9) имплантировали эпидуральные электроды выше нейротравмы на уровне Th5 и ниже – на уровне L2. Через 7-10 дней после ТСМ электрическую стимуляцию спинного мозга проводили с помощью электростимулятора Digitimer DS7A через сутки в утренний сеанс на уровне Th5 для стимулирования формирования транстравматической нейронной сети и в вечерний сеанс – на уровне L2 для стимулирования центрального генератора паттерна шагательных движений и восстановления проприоспинальной нейронной сети спинного мозга. Эффективность двухуровневой ЭЭС у опытных животных с ТСМ оценивали в течение 6 недель с помощью поведенческих тестов двигательной активности, анализа кинематики суставов задних конечностей и электрофизиологических методов. Через 8 недель после ТСМ состояние спинного мозга выше и ниже эпицентра повреждения и камбаловидной мышцы изучали гистологическими методами исследования (Рисунок 1).

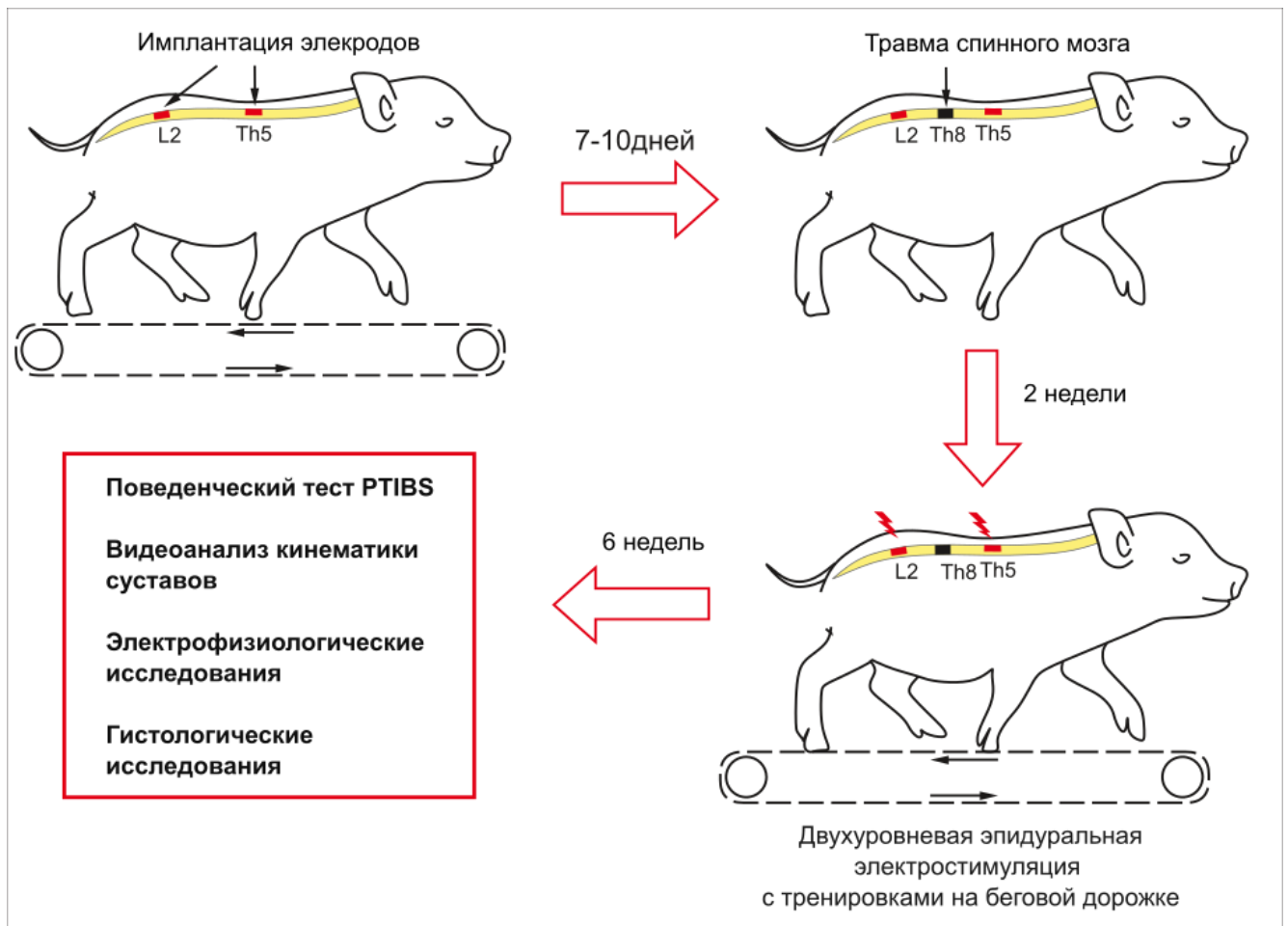


Рисунок 1– Дизайн эксперимента: на первом этапе исследования свиньям устанавливали электроды на грудном (Th5) и поясничном (L2) уровнях и обучали ходьбе на беговой дорожке; на втором этапе моделировали контузионную травму спинного мозга в нижнегрудном отделе (Th8-Th9); третий этап исследования начинали через 2 недели после разрешения спинального шока. В течение 6 недель животным проводили через сутки транстравматическую эпидуральную электростимуляцию на уровне Th5 в утренний сеанс и в вечерний сеанс ЭЭС на уровне L2. Эффективность восстановления локомоторного аппарата оценивали с помощью поведенческих тестов, электрофизиологических и гистологических методов исследования

В дизайн исследования не входили группы контроля со стимуляцией на одном уровне. Во-первых, это обусловлено целью исследования, заключающейся в разработке принципиально нового метода двухуровневой эпидуральной

электростимуляции, в котором один из электродов устанавливается выше травмы непосредственно вблизи эпицентра для транстравматической ЭЭС, а второй ниже повреждения – для стимуляции ЦГП. При этом процедура ЭЭС на уровне поясничного утолщения при нейротравме в грудном отделе хорошо изучена в моделях на животных с ТСМ и успешно применяется в практической медицине [78, 93, 119, 146, 169].

Во-вторых, ранее в исследованиях на крысах с ТСМ на уровне Th8-Th9 двухуровневая ЭЭС проводилась одновременно выше в удаленной от нейротравмы области на уровне С5 (5-го шейного позвонка) и ниже нейротравмы на уровне L2 – на уровнях сегментов спинного мозга, включающих в себя генераторы паттернов шагания, отвечающие за функции передних и задних конечностей, соответственно [46].

В другом исследовании на мини-свиньях с ТСМ в нижнегрудном отделе (Th8-Th9) двухуровневая ЭЭС проводилась также на уровне С5 и L2, но отдельно, в утренние и вечерние часы [48]. Результаты этих работ являются основой для настоящего диссертационного исследования по разработке протокола двухуровневой ЭЭС при ТСМ.

Таким образом, небольшая выборка животных, ограниченное количество групп сравнения, с учетом проведенных ранее исследований по двухуровневой ЭЭС, соответствуют поставленной цели исследования, в конкретные задачи которого входят разработка протокола двухуровневой ЭЭС и оценка его эффективности симулирования посттравматического морфо-функционального восстановления спинного мозга у свиней.

2.1 Тренировка на беговой дорожке

В течение 2-х недель до операции и со 2-й по 8-ю недели после моделирования спинальной травмы животных тренировали на беговой дорожке. Тренировки проводили каждый второй день в течение 30 мин утром и вечером с интервалом в

7-8 часов. Во время тренировки животное фиксировали к тренажёру ветеринарной попоной вокруг туловища так, чтобы нагрузка на задние конечности поддерживалась на уровне от 5% до 20% от веса животного. Скорость движения ленты беговой дорожки составляла 1 км/ч. Если животные не проявляли самостоятельной двигательной активности задними конечностями, исследователь самостоятельно перемещал задние конечности животных, имитируя ходьбу. Через 2 недели после ТСМ тренировку на беговой дорожке свиней из группы ТСМ-ЭЭС сочетали с двухуровневой ЭЭС на уровне Th5 и L2.

2.2 Оперативные вмешательства на животных

За 12 часов до операции свиньям ограничивали доступ к воде и пище. Непосредственно перед операцией животным внутримышечно вводили антибиотик Байтрил 2,5% (Байер, Владимир, Россия) 0,2 мл/кг и в качестве вводного наркоза – Золетил 100 (Virbac Sante Animale, Carros, Франция) в дозе 10 мг/кг. После достижения необходимого уровня седации животное помещали на операционный стол и поддерживали анестезию с помощью ингаляционного аппарата (Minor Vet Optima, Zoomed, Москва, Россия) с изофлураном (Laboratorios Karizoo, S.A., Барселона, Испания) в виде 2,0%-2,5% смеси с кислородом (кислород без смеси включали за 3-5 мин до окончания операции). Операционное поле выбривали и обрабатывали антисептическими растворами (10% раствор повидон-йода) (Nemofarm, Вршац, Сербия), затем дважды спиртовым раствором хлоргексидина биглюконата 0,05% (ООО "Росбио", Санкт-Петербург, Россия) для наружного применения. Во время операции температуру тела животного поддерживали на уровне 38°C с помощью ветеринарного термоматраса.

2.2.1 Имплантация стимулирующих и референтных электродов

Для ЭЭС животным из контрольной и опытной групп имплантировали

одножильные проволочные стимулирующие и референсные электроды, покрытые тефлоновым напылением (AS632, Cooner Wire, Калифорния, США). После ламинэктомии грудного Th5 и поясничного L1 позвонков стимулирующие электроды фиксировали лигатурами к твердой мозговой оболочке. Верхний электрод располагался на уровне Th5 грудного сегмента спинного мозга, нижний – на уровне L2 поясничного сегмента. Для предотвращения натяжения электродов во время двигательной активности свиней из проволоки формировали петли, которые помещали под поверхностную фасцию спины. Референсные электроды имплантировали в *m. trapezius* в шейной и в *m. erector spinae* в поясничной областях. Референт в *m. trapezius* использовали для стимуляции на уровне Th5, референт в *m. erector spinae* – для стимуляции на уровне L2, что обеспечивало локальное замыкание стимуляционного тока и минимизировало нецелевую активацию мышц.

Для соединения с электрофизиологическим оборудованием провода подключали к 12-канальному разъему (Omnetics Connector Corporation, Minneapolis, MN, 55432-USA). Разъем подшивали под кожу в области холки.

Послеоперационный уход включал:

1. антибактериальную терапию (Цефазолин, "Белмедпрепараты" Минск, Беларусь; 1 гр/5 мл, р/сут, в/м, 7 суток);
2. обезболивающую терапию (Кеторол, "Dr. Reddy 's", Хайдарабад, Индия; 30 мг/мл, д/сут, в/м, 7 суток);
3. инфузионную терапию (NaCl 0,9% раствор 400,0 мл, р/сут, п/к, 5 суток).

Обработку и перевязку послеоперационных ран выполняли ежедневно. Восстановительный период длился 7-10 дней.

2.2.2 Контузионная спинальная травма

Через 7-10 дней после имплантации электродов у свиней моделировали контузионную травму спинного мозга, как описано в работе Lee и др. [20]. Модель

травмы методом "свободного падения груза" была выбрана в связи с воспроизводимостью и простотой выполнения, а также с большим количеством ранее опубликованных результатов с использованием этого подхода. Животное последовательно проходило все этапы предоперационной подготовки, как описано ранее. Перед повреждением спинного мозга животным устанавливали силиконовый мочевого катетер диаметром 18 Fr для отведения мочи во время операции и в раннем послеоперационном периоде. Во время операции через катетер в ушной вене вводили около 400 мл раствора Рингера. Венозный катетер оставлялся в вене для последующих послеоперационных инфузий. Доступ к спинному мозгу осуществлялся поэтапно. Продольный разрез кожи и подкожной клетчатки выполняли по задней срединной линии в проекции остистых отростков Th7–Th12. После этого скелетные мышцы препарировали от костных структур позвонков и рассекали межостистые и надостистые связки на уровне Th8–Th9. Доступ к спинному мозгу для нанесения травмы открывали путем ламинэктомии (удаления дужек) Th8–Th9 позвонков. Перед нанесением травмы металлический цилиндр импактора фиксировали на расстоянии 1 мм от открытой поверхности спинного мозга. Животное фиксировали в оптимальной позе с вытянутым прямым позвоночником. Контузионную травму индуцировали однократным падением металлического стержня массой 50 г с высоты 50 см внутри цилиндра импактора. Сокращение скелетных мышц задних конечностей и появление обширной гематомы в месте контакта с металлическим стержнем подтвердили возникновение спинальной травмы во время операции. Адекватность модели контузионной травмы спинного мозга также была подтверждена развитием у всех экспериментальных животных центрального типа паралича задних конечностей и гистологическим исследованием области повреждения спинного мозга в конце эксперимента.

2.2.3 Послеоперационный уход

Ежедневно всем животным проводили перевязку послеоперационной раны и надлежащую антибактериальную, обезболивающую, противовоспалительную, инфузионную и витаминную терапию:

1. Клафоран (цефотаксим) («Красфарма» Красноярск, РФ) - 1 гр/5 мл, р/сут, в/м, 10 дней;
2. Кеторол (кеторолак) («Д-р Реддис», Индия) - 30мг/мл, 2 р/д, в/м, 5 дней.
3. Актовегин («Такеда», Ярославль, Российская Федерация) - 2мл, 1 р/сут, в/м, 3 дня;
4. Димедрол (ОАО «Дальхимфарм», Хабаровск, Российская Федерация) - 1 мл, р/сут, в/м, 10 дней;
5. Дексаметазон («KRKA» Ново-Место, Словения) - 1 мл, р/сут, п/к 10 дней.
6. Прозерин (ОАО «Новибхимфарм» Новосибирск, Российская Федерация) - 0.5 мл, р/сут, п/к, 10 дней;
7. Рибоксин (ОАО «Дальхимфарм», Хабаровск, РФ) - 5 мл, р/сут, в/м, 10 дней;
8. Тиамин (B1)/Пиридоксин (B6) (ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов» г. Борисов, Беларусь) - 2 мл, р/сут, п/к, 10 дней;
9. Цианокобаламин (B12) (ОАО «Ереванская химико-фармацевтическая компания» г. Ереван, Армения) - 2 мл, р/сут, в/м, 10 дней;
10. Аскорбиновая кислота (ФКП «Армавирская биофабрика» Армавир, РФ) - 4 мл, р/сут, в/м, 10 дней;
11. Раствор Рингера («Красфарма» Красноярск, РФ) - 400 мл, р/сут, в/в, 3 дня;

Послеоперационный мониторинг экспериментальных животных включал оценку состояния послеоперационной раны и 12-канального разъема, наличие пассажа мочи по мочевого катетеру, появление дефекации, аппетита, двигательной активности.

2.3 Эпидуральная электрическая стимуляция

Процедуру ЭЭС у животных из группы TCM-ЭЭС проводили отдельно на уровне Th5 и L2 во время тренировки на беговой дорожке со 2-й по 8-ю недели после TCM. Стимуляция на уровне Th5 была направлена на повышение активности нейронов выше повреждения спинного мозга и взаимодействия с нейронными сетями ниже эпицентра травмы. Стимуляцию на уровне L2 применяли для активации центрального генератора паттерна шагательных движений, контролирующего движения задних конечностей. Для ЭЭС использовали стимулятор Digitimer DS7A (Digitimer Ltd., Welwyn Garden, Великобритания), который управлялся программным обеспечением LabChart (AD Instruments Inc., Colorado Springs, CO, США) посредством аналого-цифрового преобразователя (АЦП) PowerLab 8/35 (AD Instruments Inc., Colorado Springs, CO, США).

Параметры ЭЭС устанавливали таким образом, чтобы животные совершали шагательные движения при ходьбе в соответствии со скоростью движения ленты беговой дорожки. Силу тока при ЭЭС подбирали индивидуально для каждого животного, чтобы не вызывать дискомфорт. Процедуру ЭЭС проводили двумя сеансами по 30 минут утром и вечером через день.

Во время утренней процедуры стимуляцию проводили выше места повреждения спинного мозга на уровне Th5, где сила тока находилась в диапазоне 7-15 мА, частота 20-25 Гц, длительность импульса 0,2 мс. При этом животные в течение процедуры демонстрировали отсутствие каких-либо движений в задних конечностях, как и без стимуляции. Тазобедренный, коленный и голеностопные суставы не сгибались, а обе задние конечности волочились на движущейся беговой дорожке.

В вечерний сеанс стимуляцию спинного мозга осуществляли ниже эпицентра нейротравмы на уровне L2 позвонка. Стимуляция считалась успешной, если возникали активные шагательные движения задних конечностей, опирающихся на движущуюся беговую дорожку. Сила тока в этом случае составляла 13-25 мА,

частота 20-25 Гц, длительность импульса 0,2 мс.

2.4 Электромиография

Для электрофизиологических исследований были использованы электростимулятор Digitimer DS7A (Digitimer Ltd., Welwyn Garden, Великобритания), АЦП PowerLab 8/35 (AD Instruments Inc., Colorado Springs, CO, США), усилитель BSamp с фильтрами от 5 Гц до 2 кГц (Biosignal amplifier, g.tec medical engineering GmbH, Schieldberg, Австрия) и система сбора и анализа данных LabChart (AD Instruments Inc., Colorado Springs, CO, США).

Моторные вызванные потенциалы (МВП) регистрировали в камбаловидной мышце левой конечности во время ЭЭС на уровне Th5 и L2 до и через две недели после ТСМ, чтобы оценить рабочее состояние стимулирующих электродов для последующей эффективной ЭЭС. Стимуляцию проводили одиночными прямоугольными импульсами, где интенсивность стимулов составляла 8-92 мА, длительность - 0,2 мс, частота - 1 импульс в 30 с. Перед электромиографией животных после премедикации подключали к ингаляционному аппарату. Мышечные ответы регистрировали с помощью игольчатых электродов (нержавеющая сталь, диаметр – 0,6 мм, длина – 50 мм), которые вводились в камбаловидную мышцу в месте расхождения медиальной и латеральной головок икроножной мышцы. Известно, что после установки вокруг эпидуральных электродов и в зоне ламинэктомии может формироваться плотная фиброзная ткань, а также возможно смещение электродов относительно твердой мозговой оболочки, что приводит к потере эффективности электростимуляции [34]. Поэтому регистрация в камбаловидной мышце МВП, вызванных ЭЭС на уровне Th5 и L2 после имплантации и 2 недели после ТСМ, является свидетельством сохранности интерфейса «электрод-нервная ткань» и его функциональной стабильности. Для оценки эффективности двухуровневой ЭЭС на 8-й неделе после ТСМ применяли классические нейрофизиологические тесты (анализ М-ответа и Н-рефлекса),

отражающие состояние нервно-мышечного аппарата.

М-ответ и Н-рефлекс регистрировали в камбаловидных мышцах левых задних конечностей свиней до ТСМ и в конце эксперимента через 8 недель. Для этого стимулирующие электроды из нержавеющей стали (диаметр 0,6 мм, длина 50 мм) вводили в область проекции седалищного нерва (на 2 см ниже большого вертела бедренной кости и на 1 см книзу от бедренной кости). Стимуляцию проводили одиночным прямоугольным импульсом. Интенсивность стимулов составляла 3-64 мА, длительность – 0,2 мс, частота – 1 импульс в 30 с. Во время каждого тестирования контролировали положение электродов и углы в суставах задних конечностей, чтобы исключить влияние этих параметров на регистрируемые мышечные ответы. При каждой интенсивности стимуляции подавалось не менее 5 импульсов тока, а ответы усреднялись. Амплитуду вызванных потенциалов оценивали, когда амплитуда ответа была максимальной для М-ответа и Н-рефлекса (при средней интенсивности стимуляции 64 ± 12 мА).

2.5 Кинематика суставов

Кинематику тазобедренного, коленного и голеностопного суставов левой задней конечности анализировали во время ходьбы экспериментальных животных на беговой дорожке за 2 недели до моделирования ТСМ и каждые две недели начиная с 4-й недели после операции. Согласно протоколу исследования, свиньям в проекциях гребня подвздошной кости, большого вертела бедренной кости, коленного, голеностопного суставов и копыта наносили цветные контрастные метки [135] (Рисунок 2). Видеосъемку во время ходьбы проводили с помощью камеры Sony FDR-AX53. Каждый сеанс записи длился 10-15 с, при котором животное совершало не менее 5 шагательных движений. У животных из опытной группы (ТСМ-ЭЭС) кинематику суставов исследовали без ЭЭС, а также в сочетании со стимуляцией спинного мозга на уровне L2. Для видеоанализа объема движений в исследуемых суставах использовали программу Kinovea 0.8.25 [142].

Кинематика суставов рассчитывалась как разница между максимальным и минимальным углом суставов при оценке 5 шагательных движений.

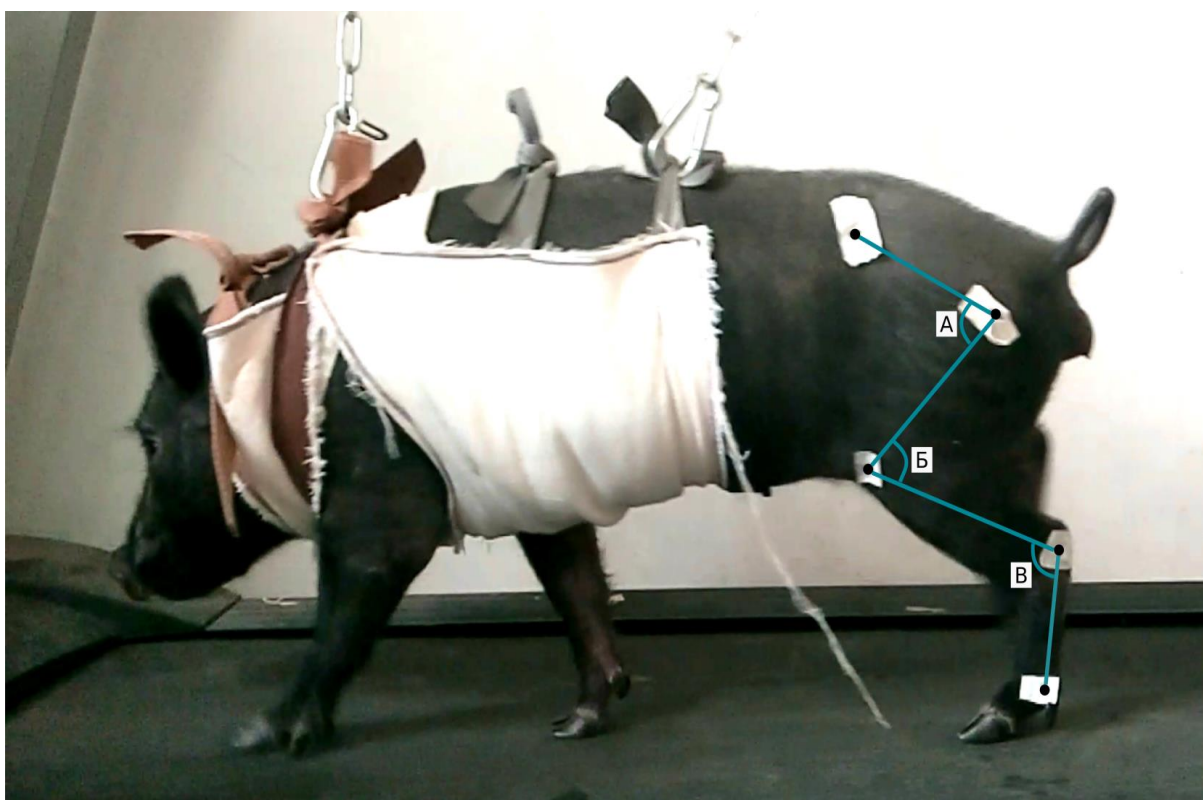


Рисунок 2 – Анализ кинематики суставов. Объем движений задних конечностей оценивали по изменениям угловых градусов в тазобедренном (А), коленном (Б) и голеностопном (В) суставах задних конечностей свиней во время ходьбы на беговой дорожке

2.6 Поведенческий тест

Двигательную функцию у свиней с ТСМ исследовали до моделирования нейротравмы и через 2, 4, 6, 8 недель после операции с помощью шкалы поведения свиньи при травме грудного отдела спинного мозга (PTIBS – Porcine Thoracic Injury Behavior Scale) [20]. Экспериментальных свиней помещали в центр арены (2,5 м × 2,5 м) и регистрировали движения в задних конечностях по 10-балльной шкале PTIBS, согласно которой двигательная функция задних конечностей характеризовалась в диапазоне от отсутствия движений задних конечностей

(оценка в 1 балл) до нормальной ходьбы (оценка в 10 баллов) (Таблица 1). Неврологический осмотр подопытных свиней обнаружил центральный тип паралича задних конечностей. Животные утратили способность к активным движениям, крестец и колени обеих задних конечностей лежали на полу. Этот факт и ранние исследования стали обоснованием для анализа кинематики и электрофизиологических исследований с одной, левой задней конечности [77, 121].

Таблица 1 – Расшифровка баллов шкалы поведения свиньи при травме грудного отдела спинного мозга (PTIBS)

Оценка, баллы	Описание
1	Нет активных движений задними конечностями, крестец и колени лежат на полу
2	Есть активные движения задними конечностями, крестец и колени лежат на полу
3	Активные движения задних конечностей, с единичными «весовыми разгибаниями», которые поднимают крестец и колено с пола (тазобедренные суставы сгибаются, а коленные суставы сгибаются и разгибаются)
4	Активные ползущие и ритмические движения задних конечностей (не менее трех возвратно-поступательных движений). Крестец постоянно приподнят над полом, наблюдаются единичные «весовые разгибания» задних конечностей
5	Животное может сделать минимум 2 шага (максимум 6 шагов) с постоянно приподнятым крестцом и коленями. Коленные суставы разгибаются не полностью. Постановка копыта имеет комбинированное положение (дорсальное и плантарное). Баланс животного во время шагания ослаблен

Продолжение Таблицы 1

Оценка, баллы	Описание
6	Животное может сделать более 6 шагов с постоянно приподнятым крестцом и коленями. Коленные суставы разгибаются не полностью. Постановка копыта имеет комбинированное положение (дорсальное и плантарное). Баланс животного во время шагания ослаблен
7	Животное может сделать минимум 2 шага (максимум 6 шагов) с полным разгибанием коленных суставов. Постановка копыта имеет комбинированное положение (дорсальное и плантарное). Баланс животного во время шагания ослаблен
8	Животное может сделать минимум 6 шагов с полным разгибанием коленных суставов. Постановка копыта имеет комбинированное положение (дорсальное и плантарное). Баланс животного во время шагания ослаблен
9	Животное может сделать минимум 6 шагов с полным разгибанием коленных суставов. Постановка копыта имеет плантарное положение. Туловище животного во время ходьбы неустойчиво
10	Животное демонстрирует нормальную ходьбу с устойчивым балансом туловища

2.7 Гистологическое исследование

Гистологические исследования включали анализ сохранности серого вещества спинного мозга, иммунофлуоресцентное исследование передних и задних рогов спинного мозга и камбаловидной мышцы (*m. soleus*). Через 8 недель после моделирования ТСМ контрольных и опытных свиней выводили из эксперимента под глубокой анестезией. Грудной отдел спинного мозга выделяли из позвоночного столба и препарировали ростральный (РС) и каудальный (КС) сегменты длиной 15

мм каждый, относительно эпицентра нейротравмы (Рисунок 3). У intactных животных для исследования забирали нижнегрудные сегменты спинного мозга (Th7-Th10). Камбаловидные мышцы выделяли и взвешивали с обеих задних конечностей у животных из intactной, опытной и контрольной групп. Полученные образцы спинного мозга и камбаловидных мышц фиксировали в 4% растворе параформальдегида в фосфатно-солевом буфере (pH=7,4), инкубировали в 30% растворе сахарозы, погружали в среду для заморозки TBS (Triangle Biomedical Science, США) и готовили срезы на криостате Microm HM 560 (Thermo Scientific, Уолтем, Массачусетс, США).

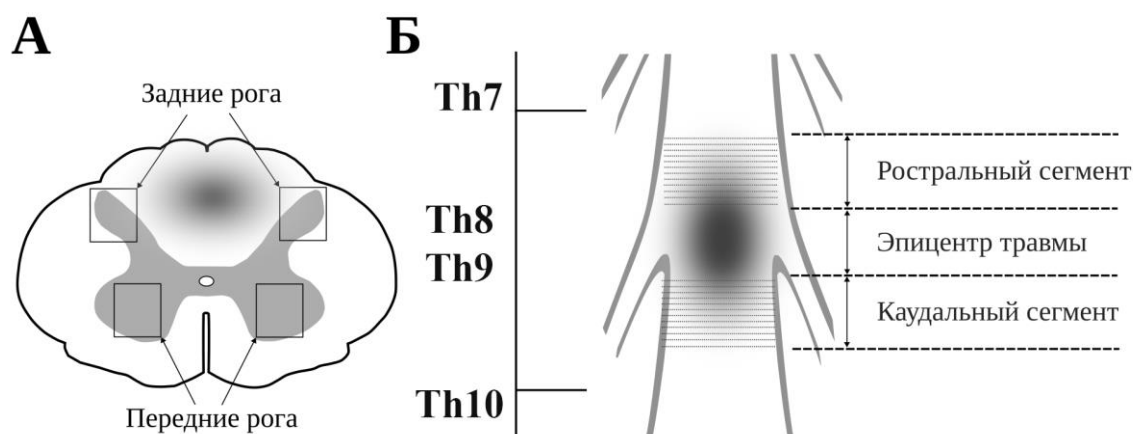


Рисунок 3 – Схематическое изображение исследованных областей серого вещества спинного мозга свиньи на поперечных гистологических срезах (А), приготовленных из рострального и каудального сегментов относительно эпицентра нейротравмы (Б)

2.7.1 Морфометрический анализ сохранности серого вещества спинного мозга

Криостатные поперечные срезы спинного мозга толщиной 20 мкм переносили на предметное стекло, окрашивали гематоксилином и эозином и получали оцифрованные изображения с помощью микроскопа Axioscope A1 (Carl Zeiss, Германия) при использовании объектива с 4-х кратным увеличением. Площадь

патологических полостей в сером веществе спинного мозга измеряли относительно всей площади серого вещества и анализировали в программе ImageJ (NIH). Площадь сохранного серого вещества выражали в процентах.

2.7.2 Иммунофлуоресцентное исследование спинного мозга и камбаловидной мышцы

Для иммунофлуоресцентного окрашивания спинного мозга готовили свободно плавающие поперечные срезы рострального и каудального сегментов толщиной 20 мкм. Для типирования скелетных мышечных волокон камбаловидной мышцы готовили срезы толщиной 10 мкм, которые монтировали на предметное стекло. Готовые срезы трижды промывали в растворе фосфатно-солевого буфера с 1% Triton X-100 в течение 5 минут. Неспецифические места связывания блокировали в течение 1 часа при комнатной температуре в фосфатно-солевом буфере, содержащем 1% Тритон X-100 и 5% сыворотку осла.

Экспрессию белков-мишеней в клетках спинного мозга выявляли с помощью специфических антител (АТ). Устойчивость клеток спинного мозга к стрессу и апоптозу оценивали с помощью АТ к белку теплового шока 27 кДа (Hsp27) и АТ к эффекторной каспазе 3 (Caspase3). Астроциты идентифицировали АТ против глиального фибриллярного кислого белка (GFAP), олигодендроциты – АТ против фактора транскрипции олигодендроцитов 2 (Olig2), клетки микроглии – АТ к белку ионизированной Са-связывающей адаптерной молекулы 1 (Iba1). Для типирования мышечных волокон скелетной мышцы использовали АТ к тяжелым цепям медленного миозина (Таблица 2). Для каждого маркера анализировали 10 срезов от животного на расстоянии 200 мкм.

После 12-часовой инкубации с первичными АТ при 4°C срезы 3 раза по 10 минут промывали в фосфатно-солевом буфере. Для визуализации мест связывания первичных АТ с целевыми белками применяли ослиные иммуноглобулины, конъюгированные с флуорохромами Alexa 488, Alexa 555 и Alexa 647 (Таблица 2).

Инкубацию срезов со вторичными АТ проводили в течение 2 ч при комнатной температуре. В качестве негативного контроля специфичности иммунофлуоресцентной реакции срезы спинного мозга окрашивали только вторичными антителами. Дополнительно, клеточные ядра окрашивали с помощью DAPI (10мкг/мл; Sigma) в течение 10 минут при комнатной температуре и заключали в среду для защиты от выцветания флуоресценции Fluoroshield™ (Sigma Aldrich, США).

Окрашенные микропрепараты оцифровывали с помощью люминесцентного микроскопа Axioscope A1 (Carl Zeiss, Германия). Цифровые изображения в исследуемых областях были получены с помощью объектива $\times 20$ с четырех полей с каждого среза. Иммунопозитивные структуры в передних и задних рогах серого вещества спинного мозга анализировали по отдельности в квадрате площадью 0,05 мм² в программе ImageJ (NIH, США) слепым методом, при котором экспериментатор не знал о принадлежности срезов к исследуемым группам. Поля зрения выбирали в пределах передних и задних рогов, избегая артефактов окрашивания, зон механического повреждения и областей с неравномерной плотностью ткани. Параметры экспозиции унифицировали в пределах одной серии окрашивания. При подсчете количества иммунопозитивных клеток (Caspase3, Olig2 и Iba1) учитывали ко-локализацию в четко-визуализируемых клетках DAPI-позитивных ядер. Уровень экспрессии белка теплового шока и глиального фибриллярного кислого белка оценивали по величине относительной Hsp27-позитивной и GFAP-позитивной площади. Разграничение целевого флуоресцентного сигнала и фонового свечения проводили с помощью автоматического подсчета порога методом Оцу в программе ImageJ (NIH, США).

На микропрепаратах камбаловидной мышцы в 10 полях зрения подсчитывали и выражали в процентах количество медленных (иммунопозитивных) мышечных волокон. Морфологическую оценку *m. soleus* проводили на микропрепаратах, окрашенных гематоксилином и эозином. Среднюю площадь поперечного сечения 200 мышечных волокон выражали в мкм².

Таблица 2 – Первичные(*) и вторичные(**) антитела, использованные для иммунофлуоресцентного исследования

Антитела	Хозяин	Разведение	Производитель
Glial fibrillary acidic protein (GFAP) *	Мышь	1:200	Santa Cruz (Cat № sc-33673)
Oligodendrocyte transcription factor 2 (Olig2) *	Кролик	1:100	Abcam (Cat № ab18258)
Ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba1) *	Кролик	1:150	Abcam (Cat № ab178847)
Heat shock protein 27 kDa (Hsp27) *	Кролик	1:200	Abcam (Cat № ab12351)
Caspase 3 *	Кролик	1:200	Cell Signaling Technology (Cat №9661)
Slow skeletal myosin heavy chain *	Кролик	1 : 100	Abcam (Cat № ab234431)
Anti-mouse IgG conjugated with Alexa 488 **	Осел	1:200	Invitrogen (Cat # A-21202)
Anti-mouse IgG conjugated with Alexa 647 **	Осел	1:200	Invitrogen (Cat # A32787TR)
Anti-rabbit IgG conjugated with Alexa 488 **	Осел	1:200	Invitrogen (Cat # A-21206)
Anti-rabbit IgG conjugated with Alexa 647 **	Осел	1:200	Invitrogen (Cat # A32795TR)

2.8 Статистический анализ

Для оценки характера распределения количественных признаков и визуализации выборочных данных использовались боксплоты и столбчатые диаграммы. В тексте и таблицах данные гистологического исследования представлены в виде медианы с указанием первого (Q1) и третьего квартиля (Q3). Результаты электрофизиологического исследования (МВП, М-ответ, Н-рефлекс) и поведенческого теста (тест PTIBS) выражены в виде среднего значения и его стандартной ошибки ($\text{Mean} \pm \text{SE}$). Сравнение трёх экспериментальных групп проведено с использованием непараметрического критерия Краскела – Уоллиса. При обнаружении значимых различий применялся апостериорный тест Данна для множественных сравнений с поправкой Холма. Для анализа кинематики суставов была реализована линейная модель смешанных эффектов, в которой каждое экспериментальное животное выступало в качестве случайной переменной, с последующим получением скорректированных средних значений. Статистически значимыми принимались различия с $p < 0,05$.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Восстановление двигательной активности

Оценка по 10-бальной шкале поведения свиньи при травме грудного отдела спинного мозга PTIBS у подопытных животных до моделирования ТСМ показала результат, соответствующий 10 баллам, здоровые свиньи демонстрировали нормальную ходьбу с устойчивым балансом туловища. Через 2 недели после нанесения нейротравмы у животных из обеих контрольной и опытной групп двигательная функция соответствовала 1 баллу (отсутствие активных движений задних конечностей, крестец и колени лежат на полу). В течение следующих 6 недель у контрольных свиней результаты PTIBS значительно не изменились. У животных из опытной группы в условиях двухуровневой ЭЭС через 8 недель после спинальной травмы были зарегистрированы активные произвольные движения задних конечностей, а двигательная функция была оценена в $2,33 \pm 0,58$ балла, что показывает тенденцию к улучшению в сравнении с контрольной группой ($p = 0,099$) (Рисунок 4).

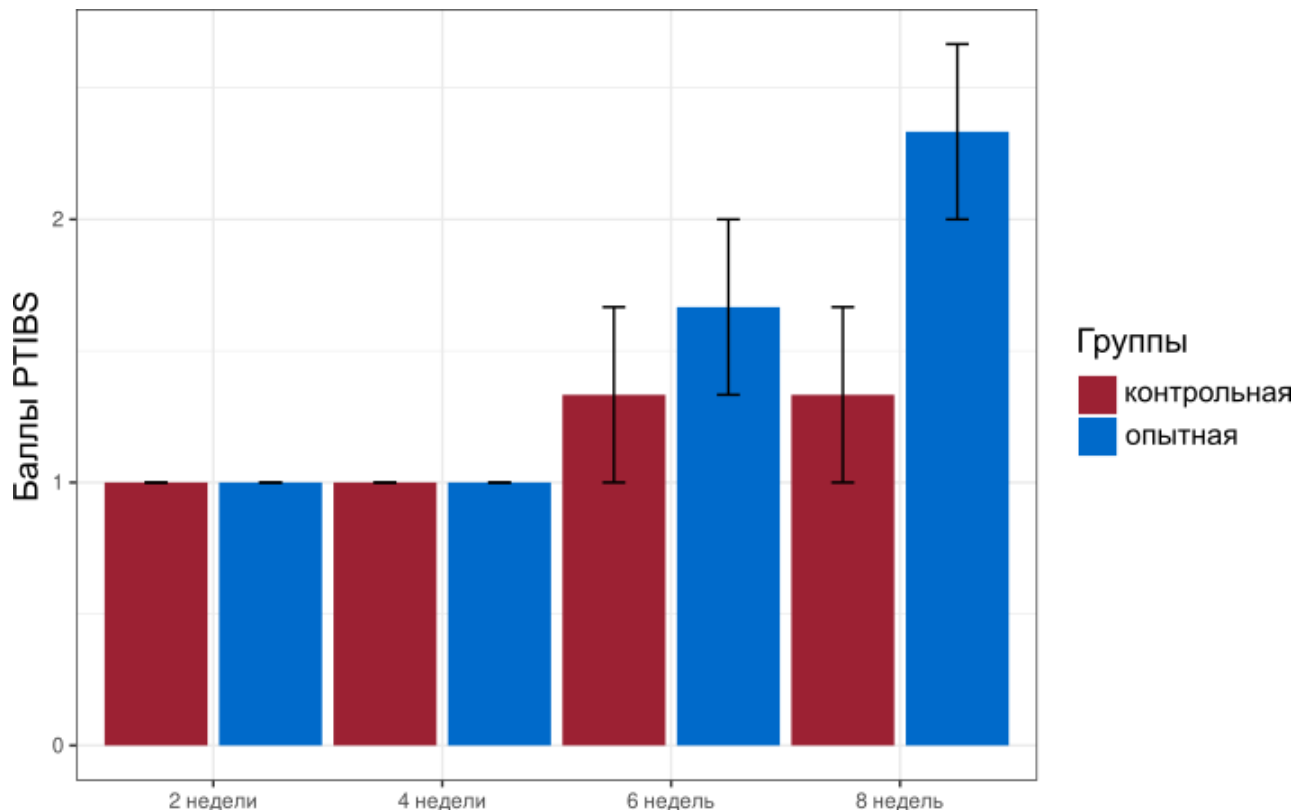


Рисунок 4 – Результат сравнительного анализа поведенческого теста по 10-бальной шкале PTIBS (Porcine Thoracic Injury Behavioral Scale) животных из контрольной и опытной групп через 2, 4, 6, 8 недель после моделирования спинальной травмы

3.2 Видеоанализ кинематики суставов задней конечности

Анализ кинематики суставов левой задней конечности у интактных животных во время ходьбы на беговой дорожке продемонстрировал движение тазобедренного сустава в диапазоне 13° [12,7;13,4], коленного сустава – $41,4^{\circ}$ [39,3;43,6] и голеностопного сустава – $37,6^{\circ}$ [35,8;39,4] (базовые значения) (Рисунки 5-7).

У животных из контрольной группы во время тренировки на беговой дорожке объем движения в тазобедренном суставе через 4 недели после ТСМ составил $4,2^{\circ}$ [3,8;5,6], через 6 недель – 6° [5,4;6,5] и через 8 недель – $5,8^{\circ}$ [5,3;6,5] (Рисунок 5); в коленном суставе – $2,8^{\circ}$ [2,8;4,8], 11° [10,8;12,5] и 20° [16;21,8] через 4, 6, и 8 недель

после нейротравмы, соответственно (Рисунок 6). Диапазон движения голеностопного сустава в группе контроля на 4, 6, и 8 неделях эксперимента составил $13,8^{\circ}$ [12,2;14,9], 8° [7,5;11,7] и 11° [10,5;14,6], соответственно (Рисунок 7).

У животных из опытной группы во время тренировки на беговой дорожке без эпидуральной стимуляции результаты оценки кинематики суставов были близки к показателям контрольной группы. Так, в тазобедренном суставе объем движения через 4, 6, и 8 недель после ТСМ составил $4,4^{\circ}$ [4,2;5,3], $5,8^{\circ}$ [5;6,1], $9,6^{\circ}$ [7,3;10,6] соответственно (Рисунок 5). В коленном суставе – $5,8^{\circ}$ [5,1;6,9], $12,4^{\circ}$ [10,6;14,2], и $16,4^{\circ}$ [15,1;17,4] через 4, 6 и 8 недель после моделирования нейротравмы (Рисунок 6). Объем движения в голеностопном суставе через 4, 6, и 8 недель после ТСМ составил $15,2^{\circ}$ [14,8;15,2], 16° [14,3;23,9], и 11° [10,8;28,9], соответственно (Рисунок 7).

Животные из опытной группы в условиях тренировки на беговой дорожке и эпидуральной электростимуляции демонстрировали существенное улучшение локомоторной активности задних конечностей.

Тазобедренный сустав: амплитуда движения через 4 недели после ТСМ составила $5,8^{\circ}$ [5;6,1], на 6 неделе – $7,8^{\circ}$ [6,8;7,9] и на 8 неделе – $9,2^{\circ}$ [8,4;12,3] (с увеличением амплитуды относительно контрольной группы на 8 неделе – $p=0,03$) (Рисунок 5).

В коленном суставе амплитуда движения достоверно увеличилась относительно контрольной группы и состояния без ЭЭС на большинстве сроков наблюдения и составила $22,2^{\circ}$ [16,7;25,8] на 4 неделе ($p=0,03$ с контрольной; $p=0,03$ с опытной), 26° [16,2;34] на 6 неделе (все $p>0,1$) и $39,2^{\circ}$ [35,1;40,6] на 8 неделе ($p=0,01$ с контрольной; $p=0,002$ с опытной). К 8-й неделе объем движений во время ЭЭС достигал $\sim 94\%$ от физиологической нормы интактных животных (Рисунок 6).

В голеностопном суставе объем движений через 4, 6 и 8 недель после травмы соответствовал $31,8^{\circ}$ [26,6;44,1], $36,8^{\circ}$ [26,4;47,5] и 45° [34,5;49,6] ($p=0,048$ с контрольной), приближаясь к физиологическим значениям интактных животных $37,6^{\circ}$ [35,8;39,4] и достигая 98% от нормы уже к 6-й неделе (Рисунок 7).

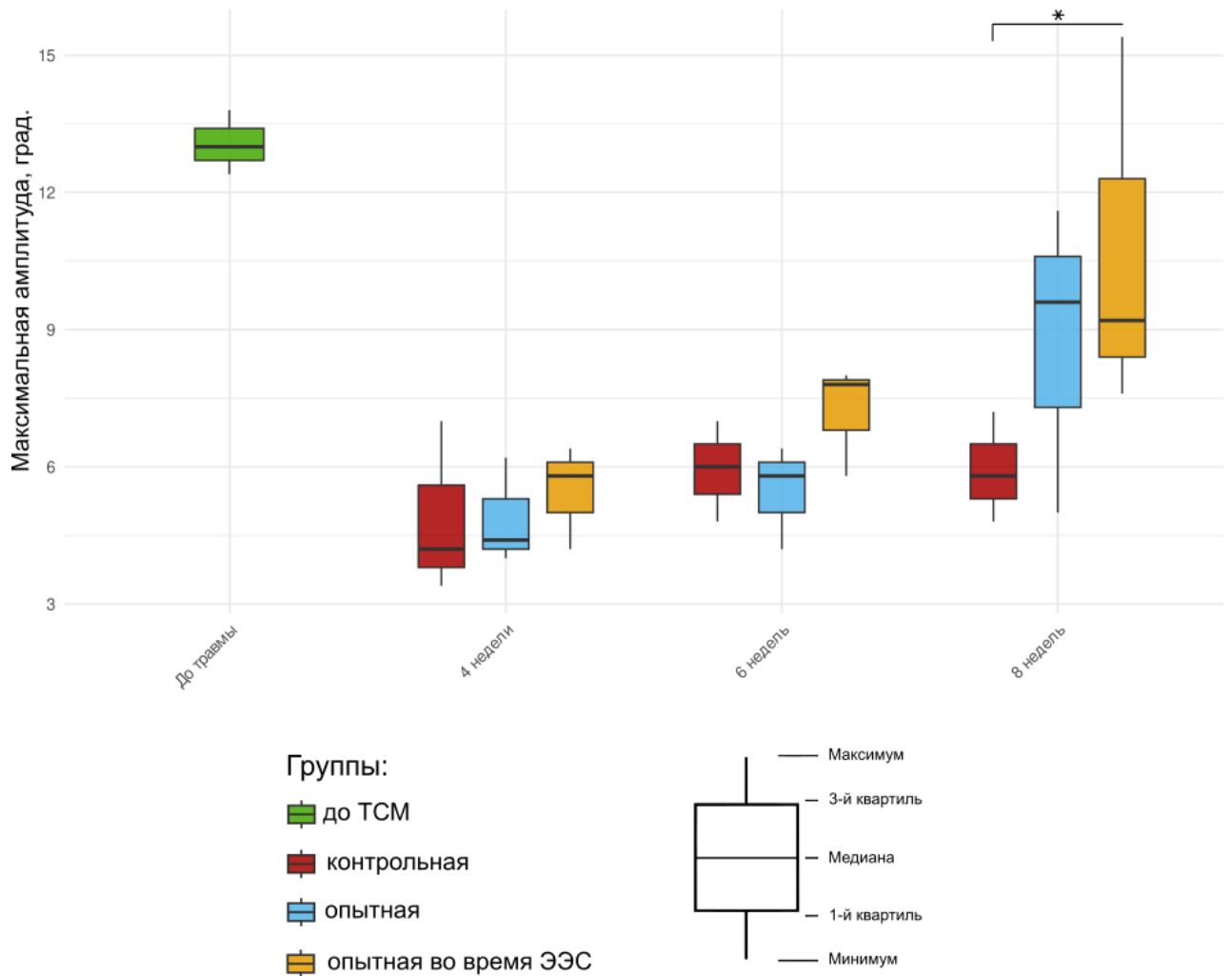


Рисунок 5 – Анализ кинематики тазобедренного сустава у свиней во время тренировки на беговой дорожке до травмы спинного мозга (до ТСМ), у контрольных свиней после ТСМ (контрольная группа) и у свиней из опытной группы без эпидуральной стимуляции во время тренировки на беговой дорожке (опытная группа) и во время стимуляции на уровне L2 (опытная группа во время ЭЭС). * – статистически значимые различия, $p < 0,05$

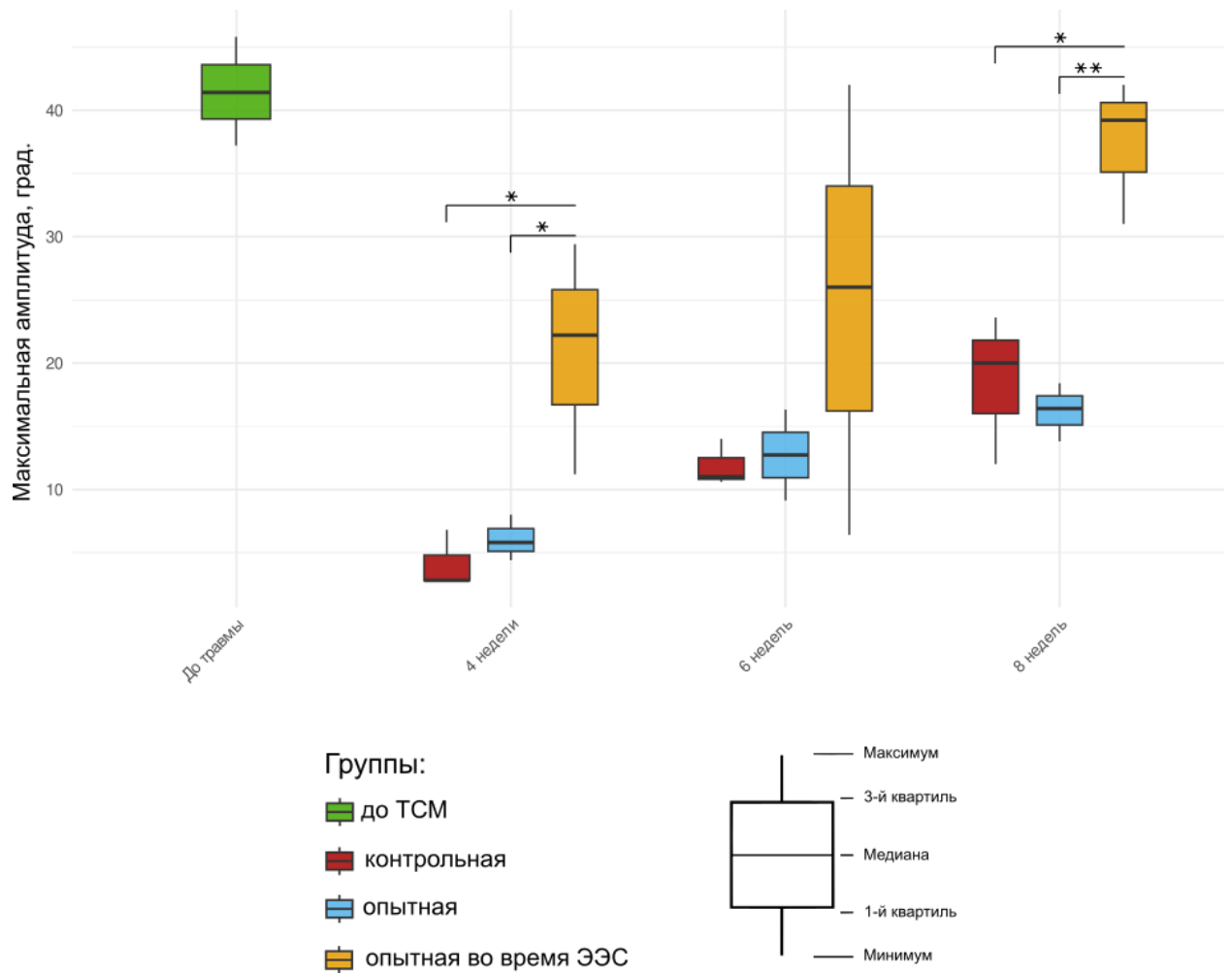


Рисунок 6 – Анализ кинематики коленного сустава у свиней во время тренировки на беговой дорожке до травмы спинного мозга (до ТСМ), у контрольных свиней после ТСМ (контрольная группа) и у свиней из опытной группы без эпидуральной стимуляции во время тренировки на беговой дорожке (опытная группа) и во время эпидуральной стимуляции на уровне L2 (опытная группа во время ЭЭС). * – статистически значимые различия, $p < 0,05$; ** – статистически значимые различия, $p < 0,01$

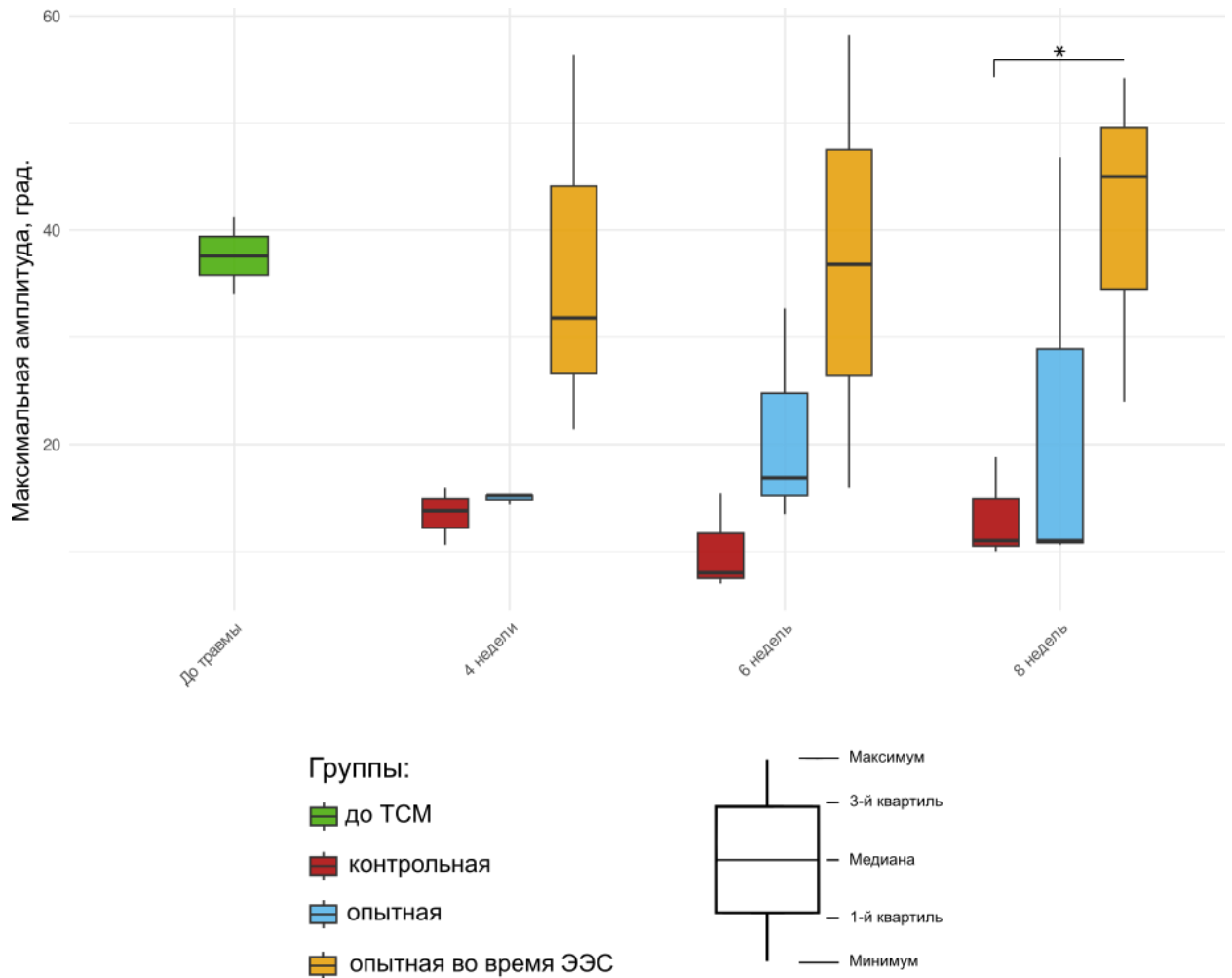
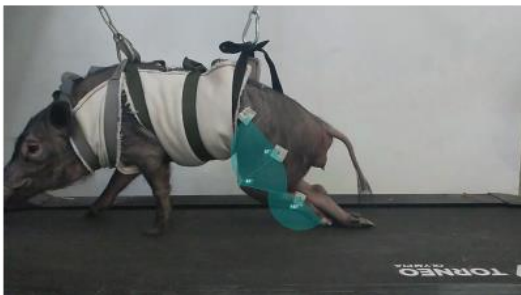


Рисунок 7 – Анализ кинематики голеностопного сустава у свиней во время тренировки на беговой дорожке до травмы спинного мозга (до ТСМ), у контрольных свиней после ТСМ (контрольная группа) и у свиней из опытной группы без эпидуральной стимуляции во время тренировки на беговой дорожке (опытная группа) и во время эпидуральной стимуляции на уровне L2 (опытная группа во время ЭЭС). * – статистически значимые различия, $p < 0,05$

Видеоанализ шагательных движений на 8-й неделе после ТСМ наглядно демонстрирует сохранение минимальной амплитуды в контрольной группе и значительное увеличение амплитуды движений в суставах у свиней опытной группы во время ЭЭС на уровне L2 (Рисунок 8).

А



Б

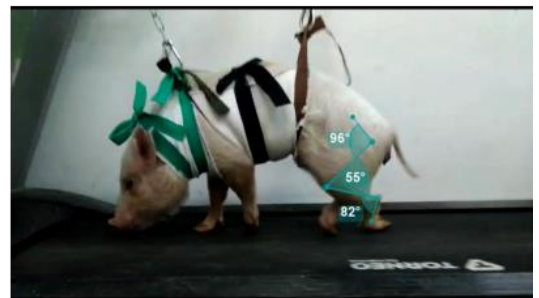
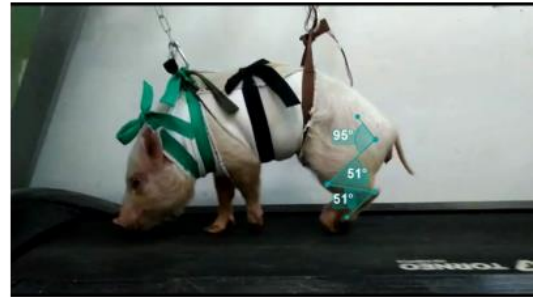


Рисунок 8 – Видеоанализ кинематики суставов на 8 неделе после спинальной травмы у животных из контрольной группы (А) и у животных из опытной группы во время ЭЭС на уровне L2 (Б)

3.3 Электрофизиологические исследования камбаловидной мышцы

3.3.1. Моторные вызванные потенциалы при стимуляции спинного мозга

Моторные вызванные потенциалы (МВП) регистрировали в левых камбаловидных мышцах подопытных животных во время ЭЭС на уровне Th5 и L2 сегментов спинного мозга до моделирования ТСМ и через 14 суток после операции. Во время стимуляции на уровне Th5 до ТСМ (Рисунок 9) амплитуда МВП постепенно увеличивалась с ростом интенсивности стимуляции, достигая максимума при 65 мА. Через 2 недели после ТСМ стимуляция на уровне Th5 вызывала многокомпонентный МВП с аналогичной динамикой, где амплитуда МВП составила $58 \pm 6,5 \%$. Во время стимуляции на уровне L2 до ТСМ были зарегистрированы ранний (РО), средний (СО) и поздний (ПО) ответы (Рисунок 10). Амплитуда раннего, среднего и позднего ответов увеличивалась по мере увеличения интенсивности стимуляции и достигала максимума при силе тока 65 мА. Через 14 суток после ТСМ стимуляция на уровне L2 не вызывала раннего ответа, амплитуда среднего ответа составляла $90 \pm 14\%$ и не отличалась от значений до травмы ($p=0,57$), а амплитуда позднего ответа составила $61 \pm 17\%$ и показала тенденцию к снижению ($p=0,095$) в сравнении с показателями до ТСМ.

Таким образом, через 14 суток после моделирования спинальной травмы ЭЭС, как выше, так и ниже эпицентра травмы, активирует структуры спинного мозга и скелетных мышц свиней из опытной группы. Полученные данные свидетельствуют о рабочем состоянии электродов, 12-канального разъема и электрофизиологического оборудования и, что все системы могут быть использованы для последующей 6-ти недельной двухуровневой ЭЭС. Важно также отметить, что зарегистрированные МВП при стимуляции на уровне Th5 через 2 недели после ТСМ свидетельствуют о частичной сохранности аксонов проводящих путей спинного мозга в области повреждения.

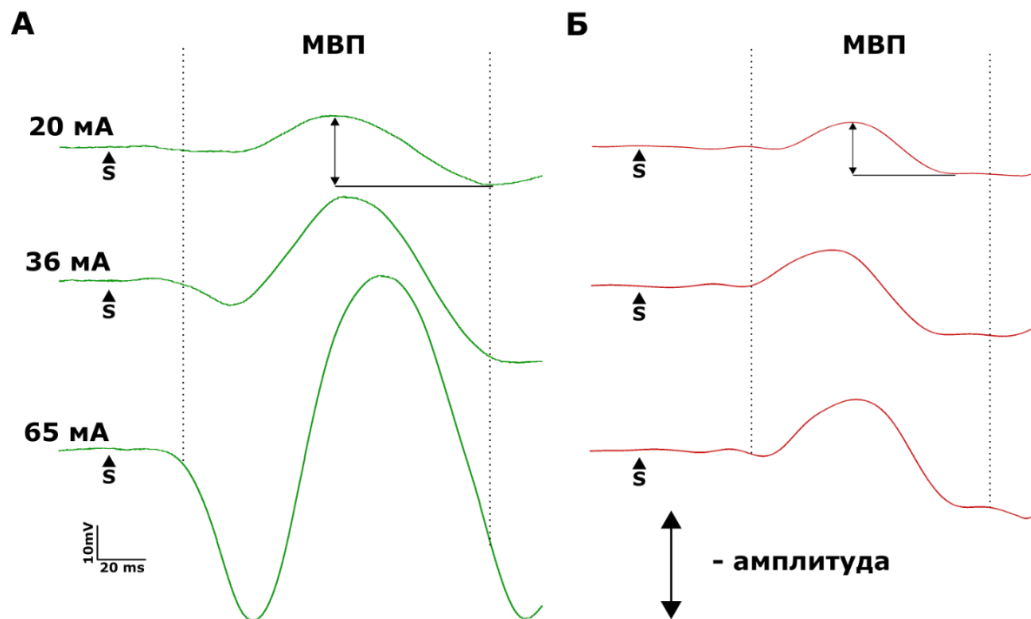


Рисунок 9 – Кривые моторных вызванных потенциалов (МВП) камбаловидной мышцы, вызванные ЭЭС при различных силах тока на уровне Th5: А) МВП до травмы спинного мозга, Б) МВП через 2 недели после травмы спинного мозга. S-стимул

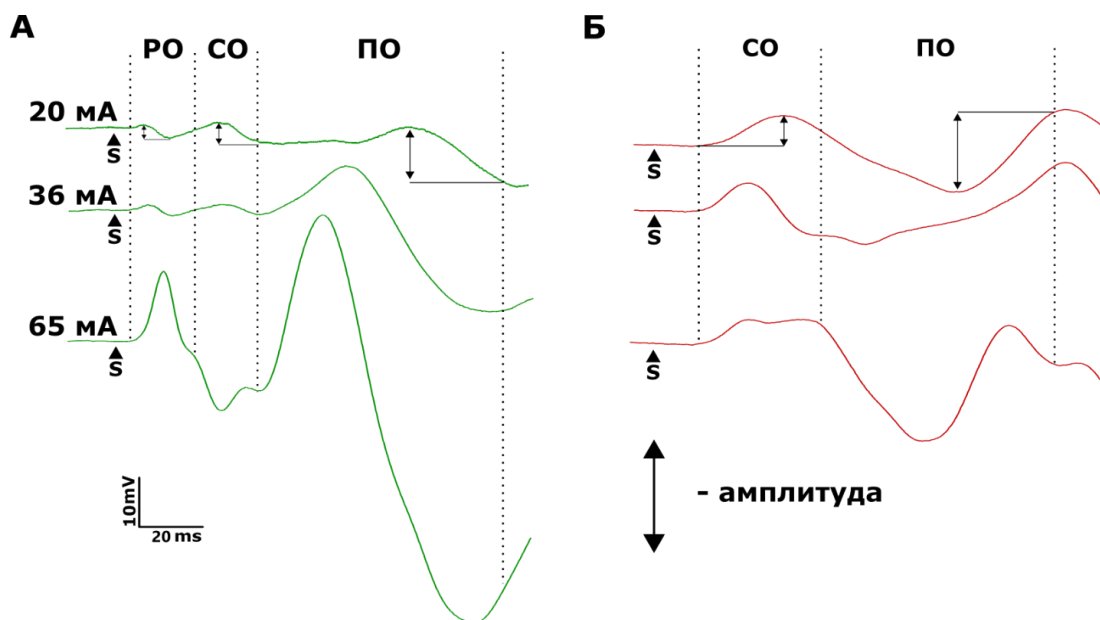


Рисунок 10 – Кривые моторных вызванных потенциалов (МВП) камбаловидной мышцы свиньи, вызванные ЭЭС на уровне L2: А) МВП до травмы спинного мозга при различных силах тока, Б) МВП через 2 недели после травмы спинного мозга. S-стимул

3.3.2 М-ответ и Н-рефлекс камбаловидной мышцы при стимуляции седалищного нерва

Анализ электромиограмм *m. soleus* в ответ на стимуляцию седалищного нерва до повреждения спинного мозга показал наличие прямого моторного М-ответа с короткой длительностью и моносинаптического Н-рефлекса (Рисунок 11). Через 8 недель после ТСМ у животных из контрольной группы наблюдался многофазный М-ответ, в котором отмечалось снижение амплитуды до $43,5 \pm 3,5 \%$ в сравнении с интактными животными ($p = 0,007$) и тенденция к увеличению длительности до $190,1 \pm 8,1\%$ ($p = 0,06$). У животных из опытной группы через 8 недель после ТСМ регистрировались прямой М-ответ и моносинаптический Н-рефлекс (Рисунок 11), при этом амплитуда М-ответа ($99 \pm 13\%$) достоверно не отличалась от показателей до травмы ($p = 0,86$), а также показатели амплитуды Н-рефлекса были ближе к показателям до травмы и составляли $54 \pm 9,8\%$, а длительность ответов не отличалась от полученных до ТСМ (Рисунок 12).

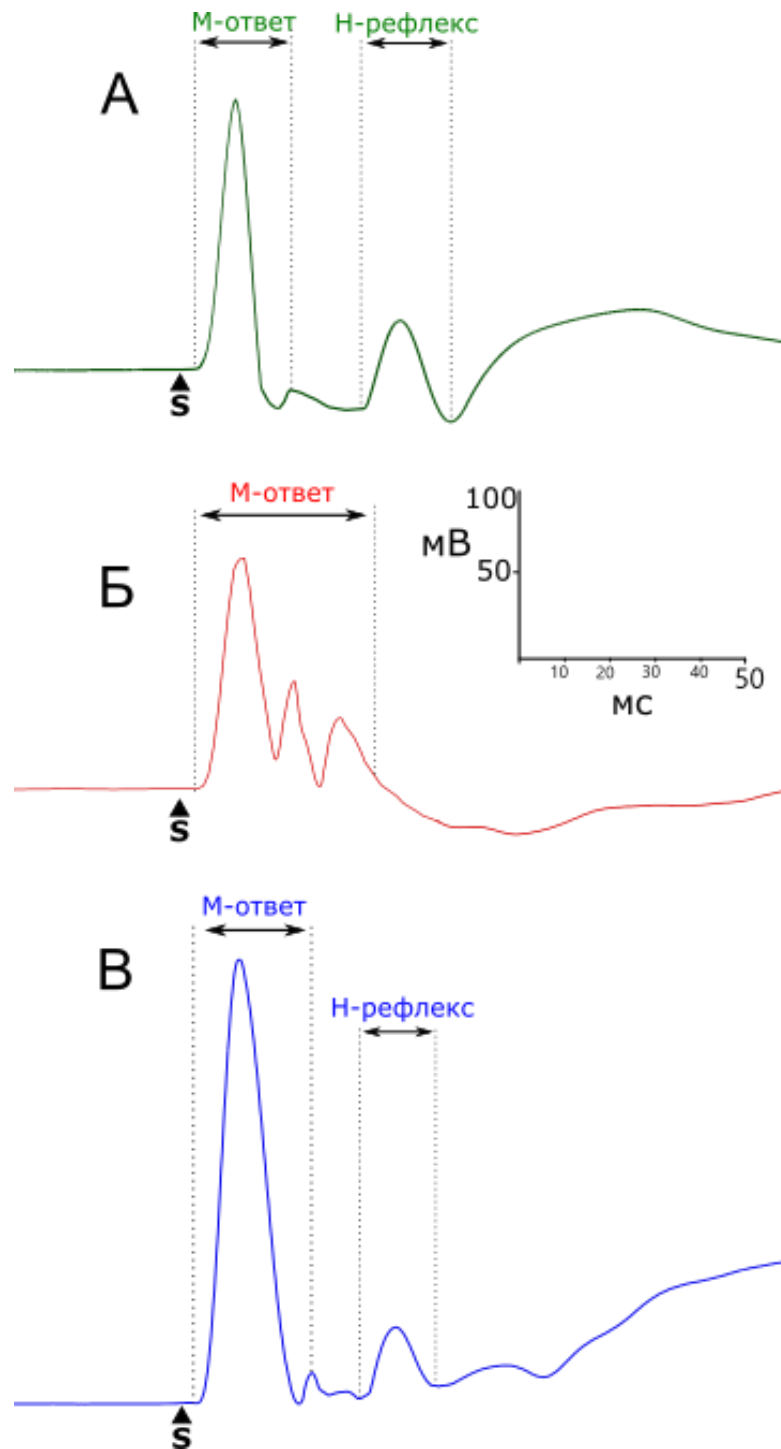


Рисунок 11 – Примеры кривых М-ответа и Н-рефлекса камбаловидной мышцы свиньи при стимуляции седалищного нерва: А) до моделирования спинальной травмы, Б) через 8 недель после травмы спинного мозга в контрольной группе, В) через 8 недель после травмы спинного мозга в опытной группе. S-стимул

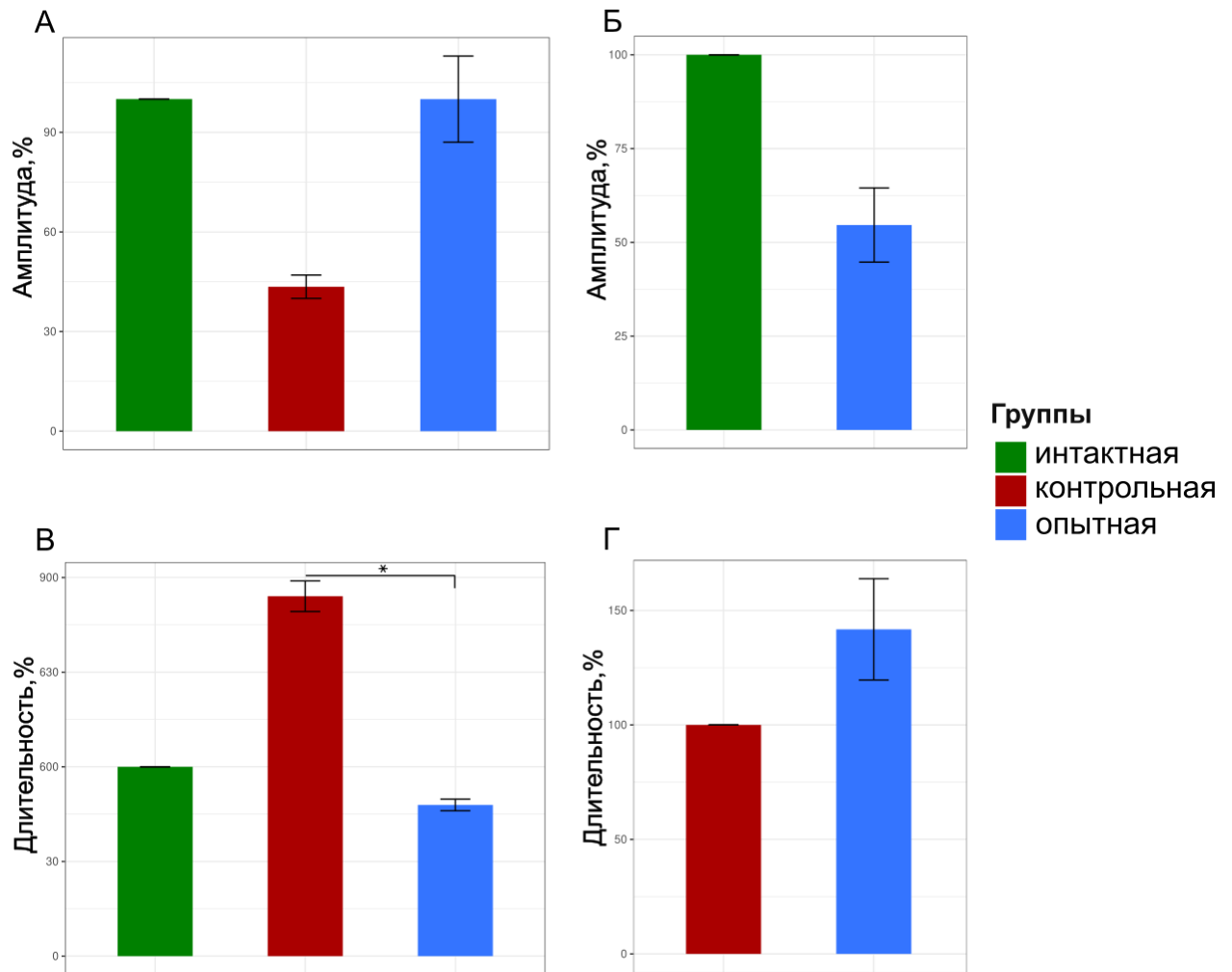


Рисунок 12 – Сравнительные гистограммы амплитуд М-ответа (А) и Н-рефлекса (Б), длительностей М-ответа (В) и Н-рефлекса (Г) камбаловидной мышцы свиньи при стимуляции седалищного нерва до травмы спинного мозга и через 8 недель после операции

3.4 Гистологическое исследование спинного мозга и камбаловидной мышцы

3.4.1 Морфометрический анализ сохранности серого вещества спинного мозга

На 60 сутки после ТСМ сравнительный анализ относительной площади сохранного серого вещества спинного мозга в ростральном (РС) и каудальном (КС) сегментах относительно эпицентра нейротравмы (Рисунок 13) проводили между

контрольной и опытной группами (Рисунок 14). Относительная площадь сохранного серого вещества в контрольной группе составила 71,91% [70,97; 73,00] в РС и 69,00% [68,65; 70,31] в КС. Тенденция к большей сохранности нервной ткани в каудальных сегментах (72,18% [71,67; 74,04]) показана у животных опытной группы в сравнении с контрольной ($p=0,089$), в ростральных сегментах площадь была численно выше, чем у контрольных животных и составляла 75,47% [72,89; 78,02].

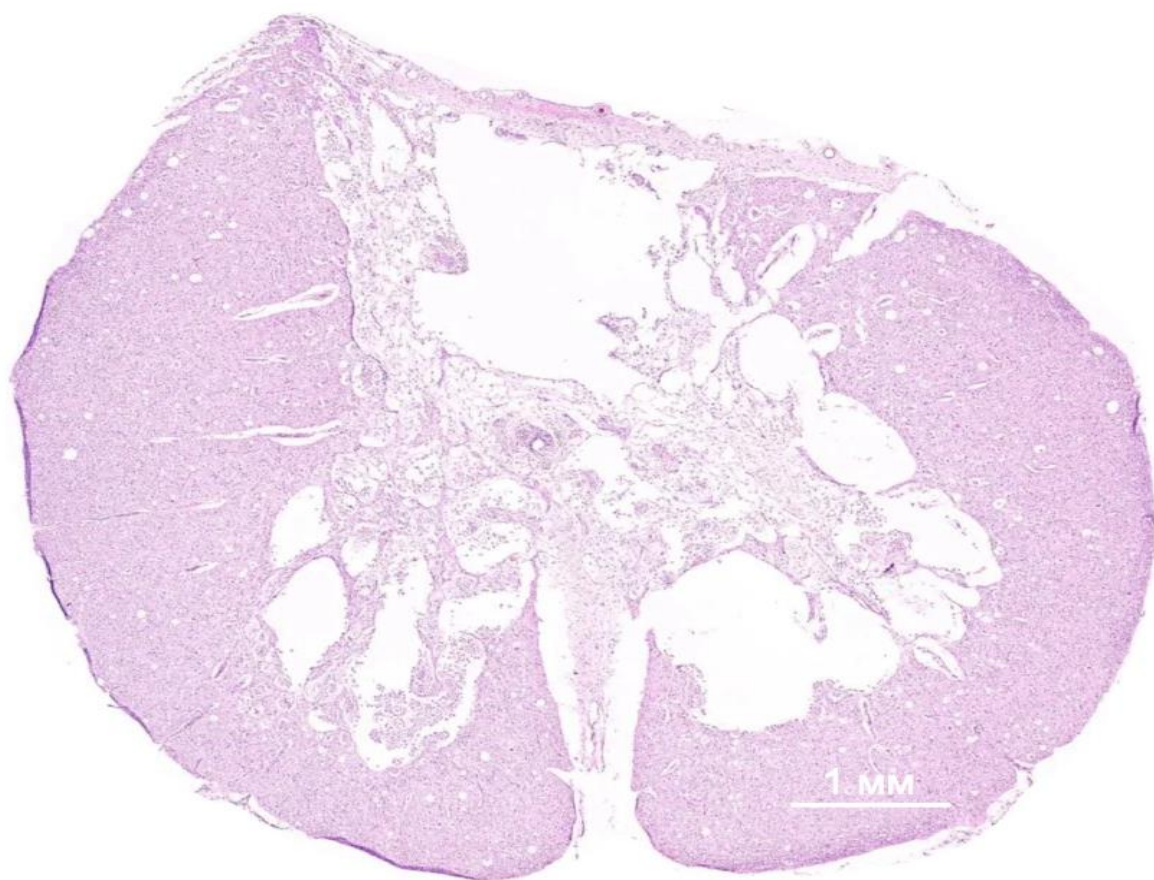


Рисунок 13 – Поперечный срез спинного мозга на уровне эпицентра через 8 недель после моделирования контузионной травмы; окраска гематоксилином и эозином

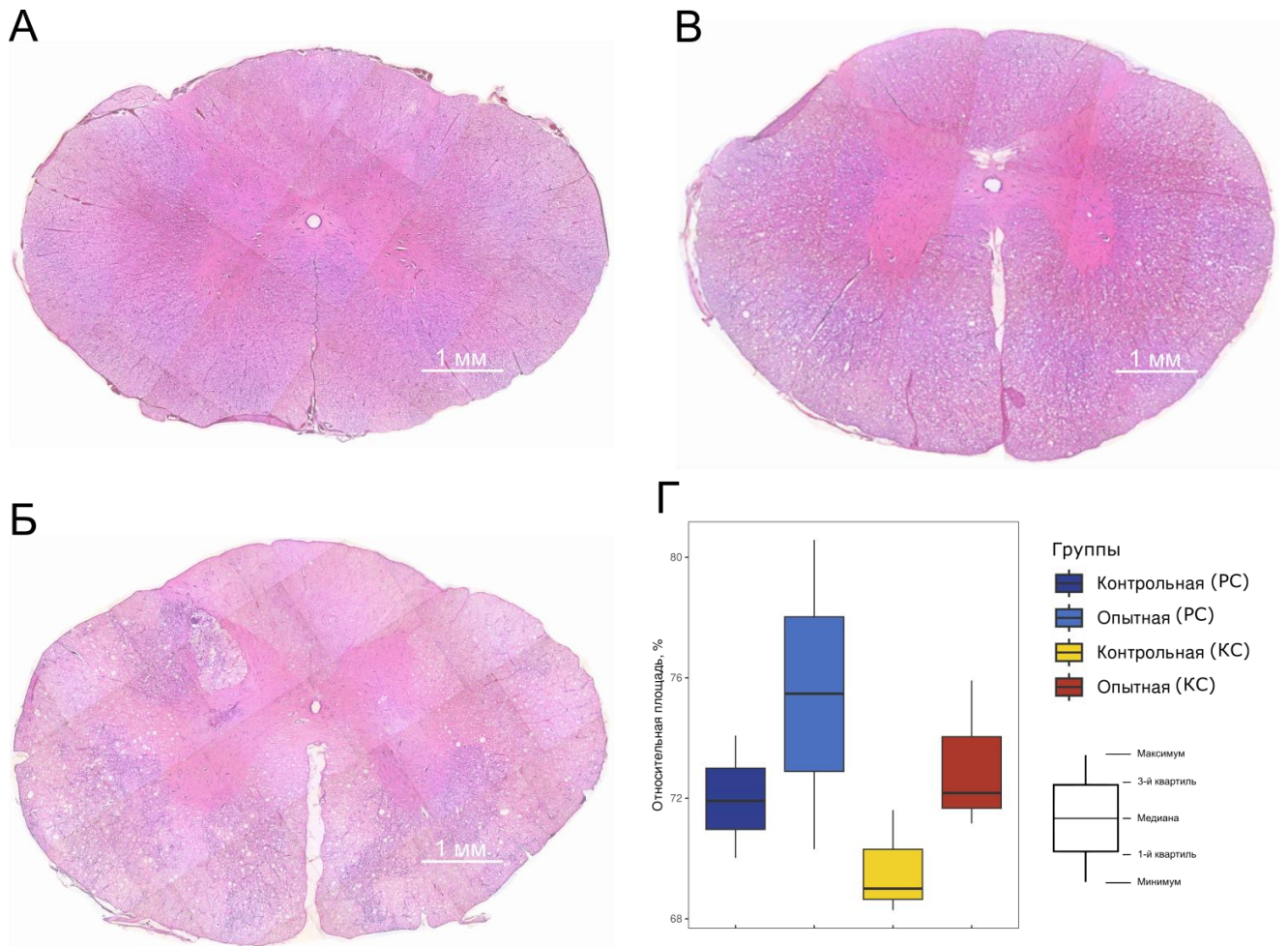


Рисунок 14 – Поперечные срезы спинного мозга, окрашенные гематоксилином и эозином, интактной свиньи (А), контрольного животного через 8 недель после ТСМ (Б) и опытного животного через 8 недель после ТСМ (В). Г – Результаты морфометрического анализа относительной площади сохранности серого вещества спинного мозга экспериментальных животных в ростральном (РС) и каудальном (КС) сегментах относительно эпицентра нейротравмы

3.4.2 Иммунофлуоресцентное исследование серого вещества спинного мозга

Иммунофлуоресцентное окрашивание срезов спинного мозга использовали для оценки экспрессии молекул клеточного стресса и апоптоза, а также ремоделирования клеток нейроглии (астроцитов, олигодендроцитов и клеток микроглии) в передних и задних рогах РС и КС спинного мозга относительно эпицентра ТСМ.

3.4.2.1 Маркеры стресса и апоптоза

Посттравматическую выживаемость клеток спинного мозга оценивали по характеру экспрессии белка теплового шока Hsp27 и проапоптозного белка Caspase3 с помощью соответствующих специфических АТ.

Анализ экспрессии Hsp27 в передних и задних рогах спинного мозга выявил существенные различия между группами. В передних рогах в ростральных сегментах относительная Hsp27-позитивная площадь у животных опытной группы (31,62% [30,73; 31,84]) была меньше, чем в контрольной группе (37,41% [36,80; 38,04]; $p = 0,022$), и не отличалась от интактных животных ($p = 0,32$). В передних рогах каудальных сегментов в контрольной группе экспрессия Hsp27 (40,65% [39,96; 41,78]) была выше по сравнению с интактными животными ($p = 0,022$), в то же время, у животных опытной группы уровень экспрессии Hsp27 в каудальных сегментах (36,61% [35,47; 36,76]) не отличался от интактных значений ($p = 0,52$). В задних рогах серого вещества спинного мозга выявлена аналогичная динамика. Так в контрольной группе экспрессия Hsp27 была выше как в ростральных (38,19% [38,01; 39,95]; $p = 0,018$), так и в каудальных сегментах (42,12% [41,55; 42,75]; $p = 0,003$) по сравнению с интактными животными (35,28% [34,35; 35,56]). Нейромодуляция с помощью ТЭЭС нормализовала экспрессию Hsp27. В задних рогах ростральных сегментов опытной группы показатели (36,68% [36,38; 37,24]) достоверно не отличались от интактных значений ($p = 0,24$), а в каудальных сегментах были ниже (36,55% [35,58; 37,04]; $p = 0,022$) по сравнению с контролем и не отличались от данных интактной группы ($p = 0,47$) (Таблица 3, Рисунок 15).

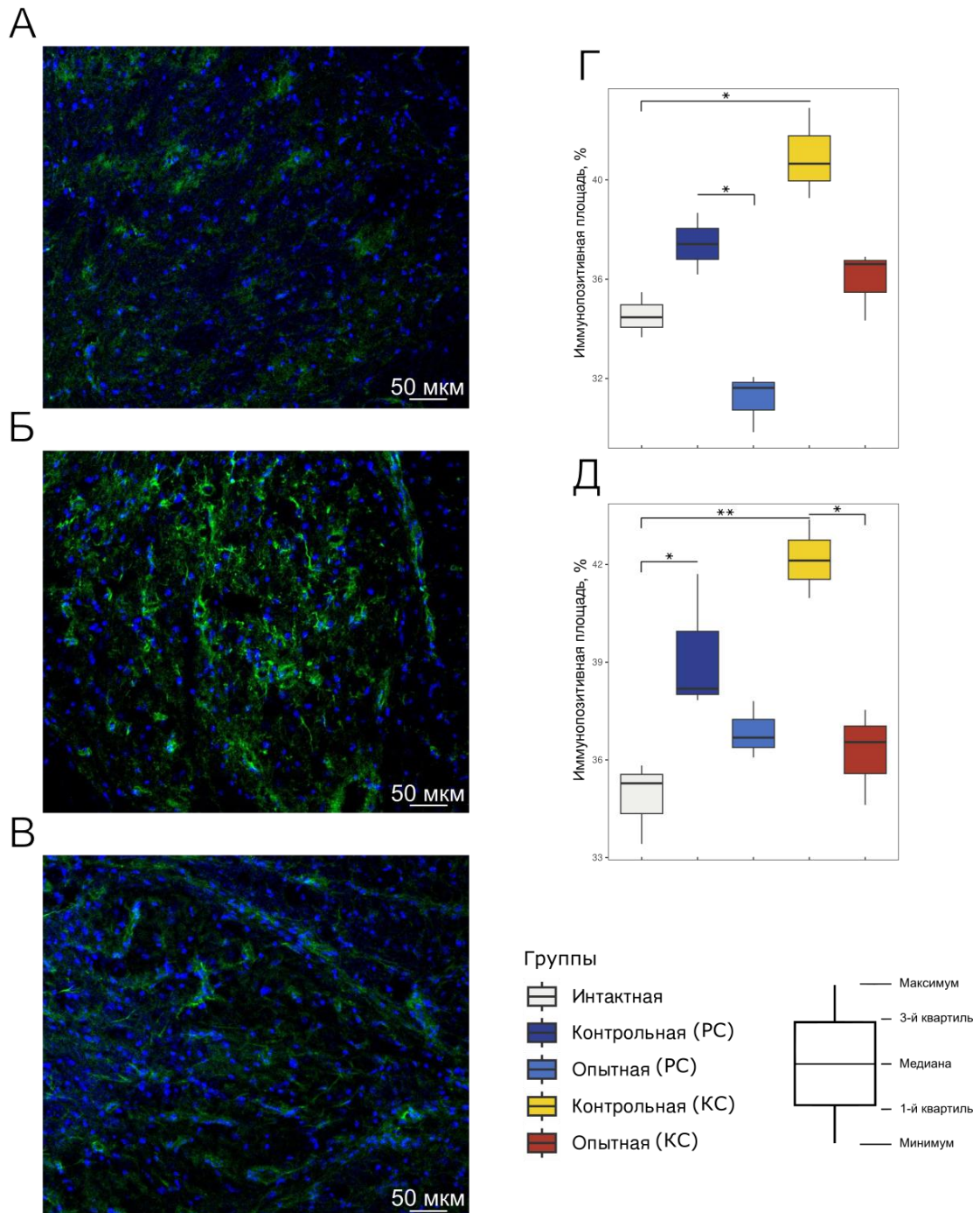


Рисунок 15 – Экспрессия белка теплового шока Hsp27 (зеленое свечение) в задних рогах спинного мозга интактной свиньи (А), контрольного животного (Б) и опытного животного (В). Результаты морфометрического анализа Hsp27-позитивной площади в передних (Г) и задних (Д) рогах спинного мозга экспериментальных животных в ростральном (РС) и каудальном (КС) сегментах относительно эпицентра нейротравмы. Примечание: ядра клеток докрашены DAPI (синее свечение); * – статистически значимые различия, $p < 0,05$; ** – статистически значимые различия, $p < 0,01$

Анализ экспрессии Caspase3, как и сохранность серого вещества спинного мозга, выполненный между контрольной и опытной группами, продемонстрировал антиапоптотический эффект ТЭЭС. В ростральных сегментах задних рогов спинного мозга количество Caspase3-положительных клеток в опытной группе (13,50 кл/0,05мм² [12,50; 13,50]) было меньше, чем в контрольной (25,50 кл/0,05мм² [24,25; 25,75]; $p = 0,008$). В передних рогах межгрупповые различия не достигли статистической значимости, но при этом в ростральных сегментах обнаружена численная тенденция к снижению количества клеток, вступающих в апоптоз, в опытной группе (12,50 кл/0,05мм² [12,25; 13,00]) по сравнению с контрольной (15,67 кл/0,05мм² [14,83; 16,08]; $p = 0,125$) (Таблица 3, Рисунок 16).

Полученные данные демонстрируют позитивное действие ТЭЭС на вторичное повреждение спинного мозга путем нормализации экспрессии Hsp27 и сдерживания гибели клеток. Причём наиболее выраженный эффект показан в ростральных сегментах, что свидетельствует о создании условий для формирования транстравматической нейронной сети.

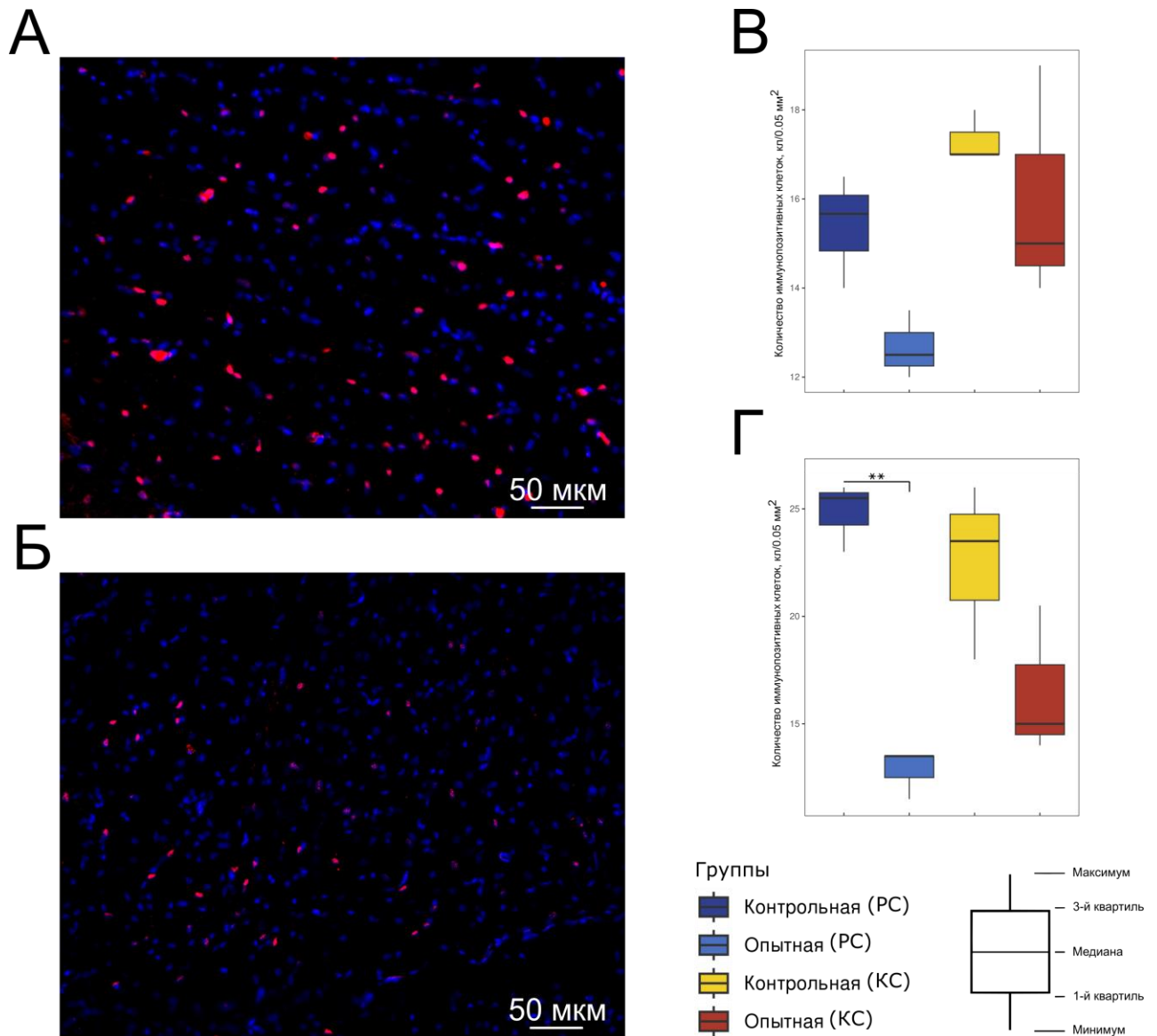


Рисунок 16 – Экспрессия проапоптозного белка Caspase3 (красное свечение) в задних рогах спинного мозга контрольного (А) и опытного животного (Б). Результаты морфометрического анализа количества Caspase3-позитивных клеток в передних (В) и задних (Г) рогах спинного мозга экспериментальных животных в ростральном (РС) и каудальном (КС) сегментах относительно эпицентра нейротравмы. Примечание: ядра клеток докрашены DAPI (синее свечение); ** – статистически значимые различия, $p < 0,01$

**Таблица 3 – Результаты иммунофлуоресцентного анализа экспрессии
молекул клеточного стресса и апоптоза в спинном мозге**

Показатель	Сегмент	Группа	Передние рога СМ	Задние рога СМ
Относительная Hsp27- позитивная площадь, %	Интакт		34,47 [34,07; 34,97]	35,28 [34,35; 35,56]
	РС	Контроль	37,41 [36,80; 38,04]	38,19 [38,01; 39,95]
		Опыт	31,62 [30,73; 31,84]	36,68 [36,38; 37,24]
	КС	Контроль	40,65 [39,96; 41,78]	42,12 [41,55; 42,75]
		Опыт	36,61 [35,47; 36,76]	36,55 [35,58; 37,04]
Количество Caspase3- позитивных клеток, 0,05 мм ²	РС	Контроль	15,67 [14,83; 16,08]	25,50 [24,25; 25,75]
		Опыт	12,50 [12,25; 13,00]	13,50 [12,50; 13,50]
	КС	Контроль	17,00 [17,00; 17,50]	23,50 [20,75; 24,75]
		Опыт	15,00 [14,50; 17,00]	15,00 [14,50; 17,75]

3.4.2.2 Реакция клеток нейроглии

Реакцию глиальных клеток на травму спинного мозга в передних и задних рогах спинного мозга в РС и КС проводили с использованием АТ против глиального фибриллярного кислого белка (GFAP, маркера астроцитов), АТ против ионизированной кальций-связывающей адаптерной молекулы 1 (Iba1, маркера клеток микроглии) и АТ против фактора транскрипции олигодендроцитов 2 (Olig2) (Таблица 4).

Анализ экспрессии GFAP выявил выраженную активацию астроцитов после травмы. В задних рогах спинного мозга контрольных животных GFAP-иммунопозитивная площадь была больше интактных значений (15,36% [14,51;

15,79] как в ростральных (27,08% [26,63; 27,83]; $p = 0,005$), так и в каудальных сегментах (26,81% [25,50; 27,47]); $p = 0,022$) (Таблица 4, Рисунок 17). В передних рогах контрольных животных повышение GFAP-иммунопозитивной площади выявлено только в ростральных сегментах (26,10% [25,65; 27,90]) по сравнению с интактными свиньями (22,87% [22,71; 23,31]; $p = 0,022$). У опытных животных в каудальных сегментах задних рогов показана численная тенденция к снижению GFAP-позитивной площади (19,46% [19,20; 20,71]) по сравнению с контролем (26,81% [25,50; 27,47]; $p = 0,144$). При этом в каудальных сегментах задних рогов показатели опытной группы не отличались от интактных значений (19,46% [19,20; 20,71], $p = 0,411$). В то же время в ростральных сегментах у опытных животных сохранялось достоверное повышение GFAP-позитивной площади относительно интактных животных (передние рога: $p = 0,011$; задние рога: $p = 0,022$) и эти значения не отличались от контрольных.

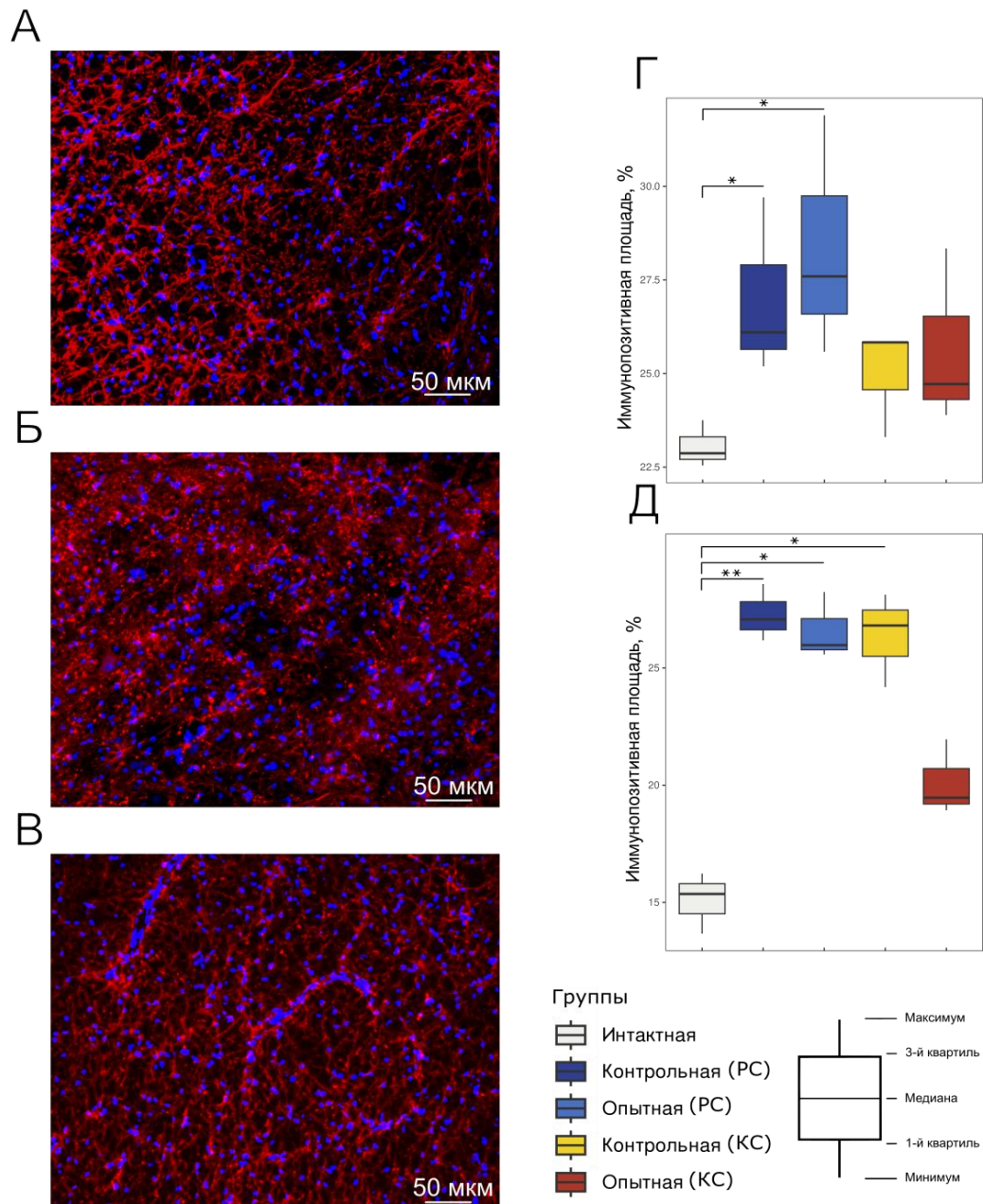


Рисунок 17 – Экспрессия глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) (красное свечение) в задних рогах спинного мозга интактной свиньи (А), контрольного животного через 8 недель после ТСМ (Б) и опытного животного через 8 недель после ТСМ в условиях транстравматической эпидуральной электростимуляции (В). Результаты морфометрического анализа GFAP-позитивной площади в передних (Г) и задних (Д) рогах спинного мозга экспериментальных животных в ростральном (РС) и каудальном (КС) сегментах относительно эпицентра нейротравмы. Примечание: ядра клеток докрашены DAPI (синее свечение); * – статистически значимые различия, $p < 0,05$; ** – статистически значимые различия, $p < 0,01$

Сравнительный анализ количества Iba1-позитивных клеток также обнаружил увеличение клеток микроглии в спинном мозге контрольных свиней. В задних рогах контрольные животные демонстрировали большее количество клеток в каудальных сегментах (41,50 кл/0.05мм² [38,50; 42,00]) по сравнению с интактными (22,50 кл/0.05мм² [22,25; 25,25]; $p = 0,002$); при этом в ростральном отделе значения (31,00 кл/0.05мм² [29,75; 33,00]) показывали тенденцию к увеличению по сравнению с интактными животными ($p=0,06$) (Таблица 4, Рисунок 18). В передних рогах контрольных свиней количество Iba1-положительных клеток было больше как в ростральном (29,75 кл/0.05мм² [27,04; 30,12]; $p = 0,049$), так и в каудальном (33,00 кл/0.05мм² [32,50; 33,88]; $p = 0,001$) сегментах при сравнении с интактными животными (21,00 кл/0.05мм² [18,12; 21,50]).

У опытных животных численная тенденция к снижению количества микроглиальных клеток при сравнении с контрольными показана в задних рогах ростральных (24,00 кл/0.05мм² [23,25; 26,25]; $p = 0,155$) и каудальных сегментов (29,60 кл/0.05мм² [29,05; 30,80]; $p = 0,169$). При этом показатели опытной группы в этих областях не отличались от интактных значений ($p = 0,647$ и $p = 0,089$). В передних рогах опытных животных в ростральном (25,75 кл/0.05мм² [23,88; 26,88]) и каудальном (26,75 кл/0.05мм² [26,38; 28,12]) сегментах количество Iba1-позитивных клеток также достоверно не отличалось от интактных свиней в ростральном отделе ($p = 0,272$). Эти данные могут указывать на нормализацию распределения клеток микроглии в области эпицентра нейротравмы и особенно в каудальном сегменте.

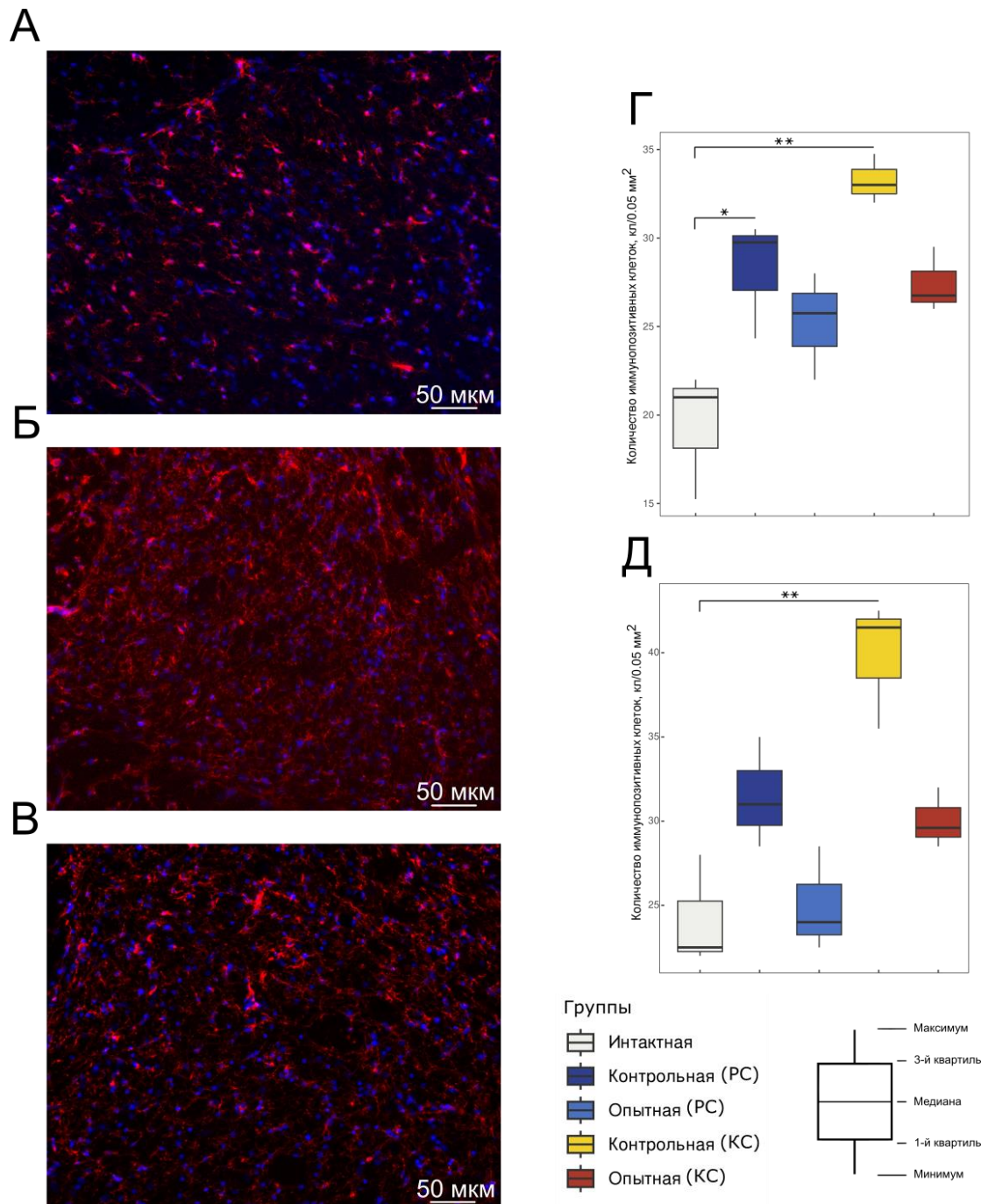


Рисунок 18 – Экспрессия ионизированной кальций-связывающей адаптерной молекулы Iba1 (красное свечение) в задних рогах спинного мозга интактной свиньи (А), контрольного животного (Б) и опытного животного (В). Результаты морфометрического анализа количества Iba-позитивных клеток в передних (Г) и задних (Д) рогах спинного мозга экспериментальных животных в ростральном (РС) и каудальном (КС) сегментах относительно эпицентра нейротравмы. Примечание: ядра клеток докрашены DAPI (синее свечение); * – статистически значимые различия, $p < 0,05$; ** – статистически значимые различия, $p < 0,01$

Анализ экспрессии Olig2 выявил посттравматическую гибель олигодендроцитов в контрольной группе. В передних рогах контрольных свиней количество Olig2-положительных клеток было снижено относительно интактных значений (34,00 кл/0.05мм² [33,50; 36,12]) как в ростральных (21,50 кл/0.05мм² [21,00; 22,25]; $p = 0,012$), так и в каудальных сегментах (20,50 кл/0.05мм² [20,00; 21,25]; $p = 0,004$). В задних рогах при сравнении с интактной группой (43,25 кл/0.05мм² [42,38; 44,62]) также показана аналогичная динамика – снижение Olig2-позитивных клеток в ростральных (24,00 кл/0.05мм² [23,88; 25,50]; $p = 0,011$) и каудальных сегментах (22,50 кл/0.05мм² [22,25; 23,50]; $p = 0,002$) (Рисунок 19).

Действие ТЭЭС способствовало сохранению популяции олигодендроцитов в области повреждения спинного мозга. В передних рогах в ростральных сегментах количество Olig2-положительных клеток в опытной группе (29,75 кл/0.05мм² [27,88; 33,88]) было выше, чем в контрольной (21,50 кл/0.05мм² [21,00; 22,25]; $p = 0,049$), и не отличалось от интактных значений (34,00 кл/0.05мм² [33,50; 36,12]; $p = 0,584$), что указывает на нормализацию пула олигодендроцитов под действием электростимуляции. В каудальных сегментах передних рогов выявлена тенденция к увеличению количества клеток в опытной группе в сравнении с контрольной ($p = 0,131$), но при этом не отличалось от интактных показателей ($p = 0,171$). В задних рогах также отмечался протективный эффект ТЭЭС. В ростральных сегментах отмечена тенденция к увеличению количества олигодендроцитов у опытных животных (35,25 кл/0.05мм² [32,88; 35,38]) по сравнению с контролем (24,00 кл/0.05мм² [23,88; 25,50]; $p = 0,083$) и при этом показатели опытной группы не отличались от интактных значений (43,25 кл/0.05мм² [42,38; 44,62]; $p = 0,411$). В каудальных сегментах задних рогов межгрупповые различия контрольной и опытной групп были менее выражены (опытная: 28,00 кл/0.05мм² [27,00; 28,62]; контрольная: 22,50 кл/0.05мм² [22,25; 23,50]; $p = 0,171$). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что ТЭЭС создаёт благоприятные условия для выживания олигодендроцитов, особенно в отделах, расположенных выше эпицентра травмы, что может способствовать ремиелинизации аксонов и формированию транстравматической нейронной сети.

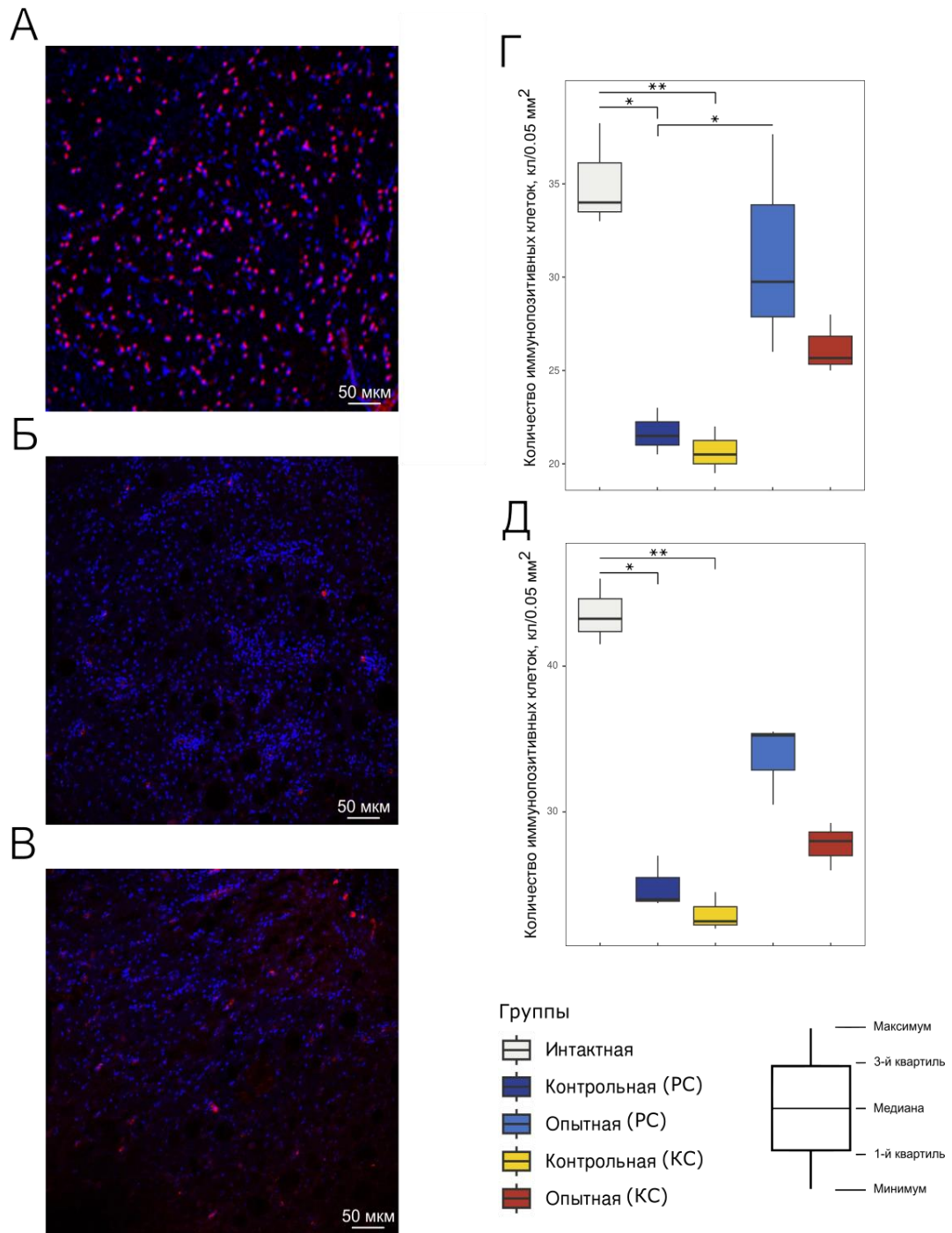


Рисунок 19 – Экспрессия фактора транскрипции олигодендроцитов Olig2 (красное свечение) в задних рогах спинного мозга интактной свиньи (А), контрольного животного (Б) и опытного животного (В). Результаты морфометрического анализа количества Olig2-позитивных клеток в передних (Г) и задних (Д) рогах спинного мозга экспериментальных животных в ростральном (РС) и каудальном (КС) сегментах относительно эпицентра нейротравмы. Примечание: ядра клеток докрашены DAPI (синее свечение); * – статистически значимые различия, $p < 0,05$; ** – статистически значимые различия, $p < 0,01$

Таблица 4 – Результаты иммунофлуоресцентного анализа реакции клеток нейроглии спинного мозга.

Показатель	Сегмент	Группа	Передние рога СМ	Задние рога СМ
Относительная GFAP- позитивная площадь, %	Интакт		22,87 [22,71; 23,31]	15,36 [14,51; 15,79]
	РС	Контроль	26,10 [25,65; 27,90]	27,08 [26,63; 27,83]
		Опыт	27,60 [26,59; 29,75]	25,98 [25,78; 27,11]
	КС	Контроль	25,83 [24,57; 25,84]	26,81 [25,50; 27,47]
		Опыт	24,72 [24,31; 26,53]	19,46 [19,20; 20,71]
Количество Olig2- позитивных клеток, 0,05 мм ²	Интакт		34,00 [33,50; 36,12]	43,25 [42,38; 44,62]
	РС	Контроль	21,50 [21,00; 22,25]	24,00 [23,88; 25,50]
		Опыт	29,75 [27,88; 33,88]	35,25 [32,88; 35,38]
	КС	Контроль	20,50 [20,00; 21,25]	22,50 [22,25; 23,50]
		Опыт	25,67 [25,33; 26,83]	28,00 [27,00; 28,62]
Количество Iba1- позитивных клеток, 0.05 мм ²	Интакт		21,00 [18,12; 21,50]	22,50 [22,25; 25,25]
	РС	Контроль	29,75 [27,04; 30,12]	31,00 [29,75; 33,00]
		Опыт	25,75 [23,88; 26,88]	24,00 [23,25; 26,25]
	КС	Контроль	33,00 [32,50; 33,88]	41,50 [38,50; 42,00]
		Опыт	26,75 [26,38; 28,12]	29,60 [29,05; 30,80]

3.4.3 Морфометрический анализ камбаловидной мышцы

Через 8 недель после моделирования контузионной ТСМ масса камбаловидной мышцы у контрольных животных составила 4,41 г [3,89; 5,14] и была достоверно меньше, чем у интактных свиней (10,64 г [9,97; 11,55]; $p = 0,025$). У животных опытной группы масса мышцы (10,59 г [9,47; 11,50]) не отличалась от интактных значений (10,64 г [9,97; 11,55]; $p = 0,655$) и была численно выше, чем в контрольной группе (4,41 г [3,89; 5,14]; $p = 0,074$). О предотвращении денервационной атрофии мышцы под действием ТЭЭС также свидетельствует морфологическая сохранность мышечных волокон (Рисунок 20).

Средняя площадь поперечного сечения мышечных волокон у контрольных свиней (1000,41 мкм² [968,72; 1118,70]) демонстрировала тенденцию к снижению по сравнению с интактными животными (1333,20 мкм² [1289,88; 1426,43]; $p = 0,101$). В опытной группе площадь волокон (1480,72 мкм² [1407,85; 1639,59]) не отличалась от интактных значений (1333,20 мкм² [1289,88; 1426,43]; $p = 0,456$) и была достоверно больше, чем в контрольной группе (1000,41 мкм² [968,72; 1118,70]; $p = 0,017$) (Рисунок 20).

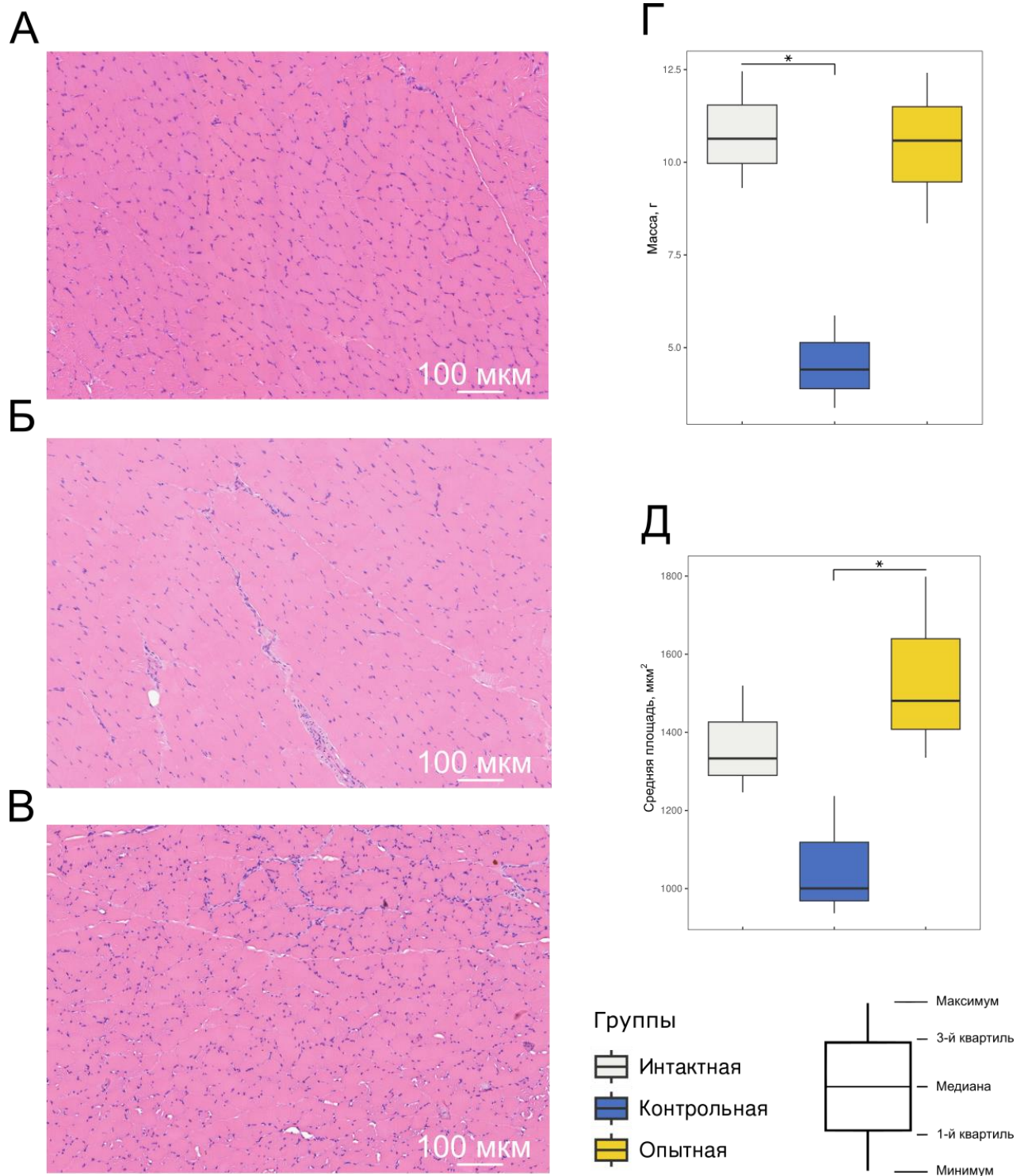


Рисунок 20 – Поперечные срезы камбаловидной мышцы (*m. soleus*), окрашенные гематоксилином и эозином, интактной свиньи (А), контрольного животного (Б) и опытного животного (В). Результаты анализа массы камбаловидных мышц (Г), Результаты морфометрического анализа средней площади поперечного сечения мышечных волокон (Д). Примечание: * – статистически значимые различия, $p < 0,05$

Иммунофлуоресцентный анализ *m. soleus* контрольных животных обнаружил снижение относительного содержания медленных (тип I) волокон до 44,35% [42,34; 47,75] ($p = 0,007$) при сравнении с интактными значениями (91,74% [90,13; 93,91]). В опытной группе доля медленных волокон сохранилась на уровне 70,37% [68,52; 73,91], что численно приближается к интактным значениям ($p = 0,180$) и превышает показатели контрольной группы (44,35% [42,34; 47,75]; $p = 0,180$) (Рисунок 20). Хотя межгрупповые различия не достигли статистической значимости из-за малого размера выборки ($n=3$), тенденция к поддержанию медленного фенотипа мышцы и сдерживание атрофии мышечных волокон свидетельствуют, что ТЭЭС способствует сохранности нейромоторных единиц (Рисунок 21).

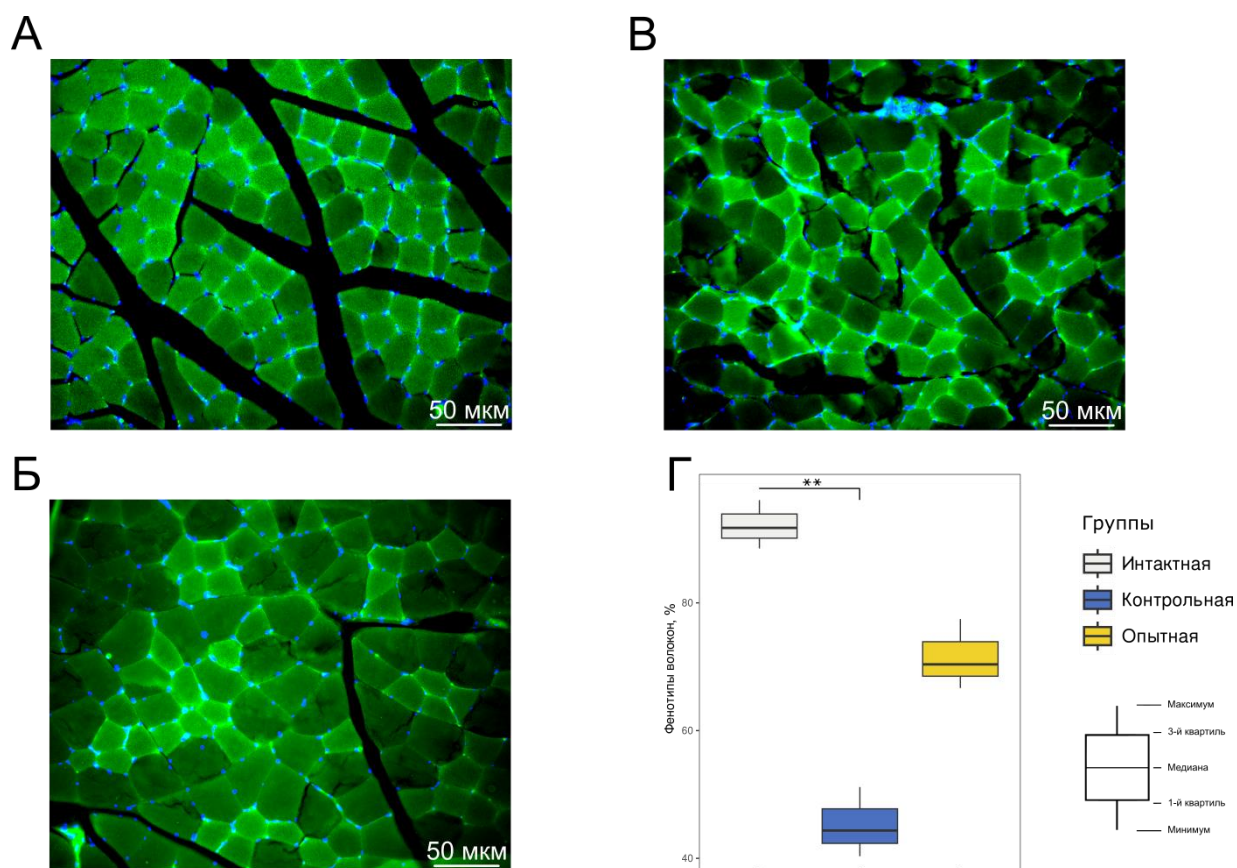


Рисунок 21 – Иммунофлуоресцентное окрашивание с помощью антител к тяжелым цепям медленного миозина (зеленое свечение) камбаловидной мышцы (*m. soleus*) интактной свиньи (А), контрольного (Б) и опытного животного (В). Результаты морфометрического анализа относительного содержания медленных мышечных волокон (Г). Примечание: ядра клеток докрашены DAPI (синее свечение); ** – статистически значимые различия, $p < 0,01$

ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на определённый прогресс, существующие терапевтические подходы пока не позволяют добиться существенного улучшения качества жизни у пациентов с ТСМ. Большинство исследований в области патогенеза и способов коррекции негативных последствий ТСМ было проведено на мелких лабораторных животных (мышях и крысах), организация локомоторного аппарата и спинальной нейрональной сети, генерирующей ритмические движения (центральный генератор паттернов, ЦГП), которых имеют некоторое сходство с таковыми у человека [39, 57]. В то же время, грызуны имеют гораздо меньшие размеры спинного мозга и более короткие проводящие пути головного и спинного мозга [20]. В экспериментах с ТСМ были обнаружены признаки специфичные только для грызунов [138, 168]. Например, активация сенсорной обратной связи у крыс может значительно улучшить двигательную функцию после тяжелой ТСМ, что обычно не наблюдается у пациентов с такими повреждениями [79]. Таким образом, результаты способов коррекции ТСМ у грызунов не могут быть напрямую транслированы в клиническую практику лечения ТСМ у человека. Для устранения этого разрыва исследования необходимо проводить на крупных животных, морфофизиологические характеристики которых максимально приближены к человеческим. В связи с этим была выбрана модель свиньи, чья функциональная нейроанатомия и физиологические характеристики спинного мозга близки к таковым у человека [20, 50, 169, 178].

В современной нейрореабилитации двигательная тренировка и стимуляция спинного мозга относятся к числу наиболее эффективных терапевтических методик для восстановления сенсомоторной функции после ТСМ. Многочисленные исследователи сообщают, что комбинация различных реабилитационных стратегий может усилить функциональное восстановление после ТСМ [51, 146]. Ключевым компонентом реабилитации является двигательная тренировка, которая активирует афферентные сигналы, поступающие в спинной мозг необходимые для

формирования правильного двигательного паттерна [1, 143, 145]. При этом было показано, что ЭЭС эффективна для облегчения паттернов ходьбы у крыс [78, 93, 180] и кошек [22, 33, 98], а также у людей с ТСМ [63, 147, 148].

Механизмы терапевтического действия ЭЭС, вероятно, многокомпонентны. Они могут включать как активацию интернейронных спинальных сетей, которые интегрируют и обрабатывают широкий спектр соматосенсорных сигналов, необходимых для выполнения двигательной задачи [22, 78, 97, 133], так и прямое возбуждение локальных спинальных нейронных групп [61], а также, по некоторым данным, модуляцию локального кровотока [40, 85]. Верхние поясничные сегменты могут играть ключевую роль в облегчении двигательных задач, одновременно взаимодействуя с мультисегментарными сетями для обеспечения адекватного двигательного ответа [97]. Восстановление двигательной функции после ТСМ в значительной степени зависит от супраспинального контроля [154], координирующего движения конечностей у четвероногих животных [20, 31, 38] или между руками и ногами у человека [2, 113, 188], что связывают с проприоспинальной системой. Проприоспинальная нейронная сеть спинного мозга отвечает за взаимодействие между мультисегментарными и, в частности, между шейной и поясничной локомоторными сетями [186] и способна активировать спинальные интернейроны, участвующие в сложном моторном контроле [102]. У здоровых добровольцев чрескожная стимуляция спинного мозга в области поясничных сегментах облегчала ритмическую активность в нижних конечностях. Комбинация стимуляции шейных сегментов со стимуляцией поясничных сегментов также способствовала улучшению паттерна ходьбы [97].

Восстановление двигательных функций после полной ТСМ ранее приписывалось влиянию нисходящих путей, косвенно проводящих супраспинальную сигнализацию через место травмы [20, 75, 160]. При ТСМ остаточные субфункциональные связи способны передавать супраспинальное влияние ниже уровня травмы, такой профиль травмы известен как «неполный» [75, 160]. Роль этих остаточных субфункциональных связей после ТСМ и механизмы их реактивации электрической стимуляцией остаются в значительной степени

неизвестными [146, 161]. Нейронные сети ниже и выше травмы способны формировать транстравматическую сеть, которая может реорганизовываться с течением времени в функциональную нейронную структуру, участвующую в восстановлении двигательных функций, таких как произвольный моторный контроль с помощью ЭЭС. Ожидается, что электрическая стимуляция спинальных сетей выше травмы может облегчить активность нейронных сетей ниже травмы, особенно когда нисходящие пути от мозга неспособны эффективно прорасти через место травмы и обеспечить необходимое взаимодействие между нейронными сетями выше и ниже травмы [47, 86, 99]. В этой связи, propriospinalная система, состоящая из коротких и длинных аксонов, которые соединяют большинство спинальных сегментов, участвуя в модуляции выполнения большинства двигательных команд [159, 170], по-видимому, является важным компонентом в формировании транстравматической нейронной сети, непосредственно взаимодействующей с сохранившимися аксонами кортикоспинального тракта.

Важно отметить, что у животных при квадрипедальной ходьбе (на четырех конечностях) стимулирование шейного генератора паттерна шагания (вместе с поясничным генератором паттерна шагания) при спинномозговой травме в нижнегрудном отделе может способствовать восстановлению ходьбы на четырех конечностях за счет активного вовлечения в ходьбу передних конечностей [48]. У человека электрическая стимуляция нейронных сетей в шейной области, при спинномозговой травме в нижнегрудном отделе, такого эффекта, как у квадрипедальных животных, не имеет, но может способствовать сохранению локальной активности этих нейронных сетей, особенно при полном повреждении спинного мозга.

Таким образом, после травмы спинного мозга происходит значительная реорганизация нейронных сетей как выше, так и ниже уровня повреждения, включая формирование новых синаптических соединений аксонов супраспинальных трактов выше эпикентра травмы [122, 173]. Исходя из вышеизложенного, был разработан подход, направленный на воздействие с помощью ЭЭС на компоненты транстравматической нейронной сети,

расположенные как выше, так и ниже уровня повреждения спинного мозга у свиньи, анатомическая и функциональная организация спинного мозга которой близка к человеческой, что делает полученные результаты более релевантными для последующей трансляции в практическую медицину.

В настоящем исследовании для формирования транстравматической нейронной сети, обеспечивающей коммуникативные взаимодействия между нейронами проприоспинальной системы выше и ниже эпикентра повреждения у свиньи с ТСМ в нижнегрудном отделе на уровне Th8-Th9 стимуляцию осуществляли: (1) выше эпикентра нейротравмы на уровне Th5 (5-го грудного позвонка), непосредственно прилегающего к эпикентру нейротравмы, где происходит активация регенерации поврежденных аксонов и формирование новых функциональных связей между нейронами спинного мозга, локализованных ниже эпикентра травмы, и супраспинальными нейронами, локализованных в двигательных центрах головного мозга, и (2) ниже эпикентра нейротравмы на уровне L2 (2-го поясничного позвонка), где присутствуют генераторы шагательных движений, что позволяет не только стимулировать восстановление транстравматических нейронных связей между сегментами спинного мозга выше и ниже повреждения, но и поддерживать активность двигательных нейронов ниже нейротравмы и комплементарно восстанавливать функции нижних конечностей.

Таким образом, применение двухуровневой эпидуральной электростимуляции сфокусировано на анатомическом и функциональном интегрировании регенерирующих после травмы аксонов. Другими словами, с помощью двухуровневой эпидуральной электростимуляции нейронные сети выше и ниже места повреждения могут образовывать транстравматическую сеть, которая со временем может реорганизоваться в функциональную нейронную структуру, участвующую в восстановлении волевых двигательных функций.

При стимуляции на уровне L2 до травмы были зарегистрированы ранний (РО), средний (СО) и поздний (ПО) ответы, что соответствует данным литературы [56, 78, 133]. Согласно сложившимся представлениям, ранний компонент связан с прямой активацией эфферентных волокон или мотонейронов, средний компонент

соответствует моносинаптическому ответу, а поздний компонент – активации полисинаптической нейронной сети, включающей не менее трёх синапсов [78]. Через 14 дней после ТСМ ранний ответ при стимуляции L2 отсутствовал, а амплитуда среднего и позднего ответа была снижена. Это может свидетельствовать о снижении возбудимости спинальной локомоторной сети в результате травматического спинального шока [14].

При стимуляции на уровне Th5 через 14 дней после ТСМ амплитуда МВП снизилась по сравнению с показателем до моделирования спинальной травмы, а форма ответа стала многокомпонентной. Наблюдаемые изменения могут указывать на модуляцию функционального состояния проводящих путей, проходящих через зону повреждения. Многокомпонентный характер ответа, вероятно, связан с различной проводимостью по эфферентным волокнам в спинном мозге и/или различной скоростью вовлечения двигательных единиц. Сохранение регистрируемых ответов при стимуляции выше уровня травмы свидетельствует о том, что определённый уровень супраспинального влияния, прошедшего через зону повреждения, сохраняется, что создаёт основу для формирования транстравматической нейронной сети [14].

Через 8 недель после ТСМ у животных из контрольной группы М-ответ камбаловидной мышцы при стимуляции седалищного нерва имел многофазную форму, что отражает посттравматическую реорганизацию двигательных единиц. Функциональная разгрузка после ТСМ инициирует атрофические изменения в мышцах задних конечностей, что может приводить к уменьшению количества двигательных единиц и их асинхронному вовлечению при активации. Отсутствие Н-ответа у контрольных животных, вероятно, связано с увеличенной длительностью М-ответа, вследствие чего поздняя часть М-ответа может накладываться на Н-ответ [14].

У животных опытной группы в условиях ЭСС кривая М-ответа была схожа с кривой до ТСМ, а амплитуда была выше, чем в группе контроля, что отражает синхронное вовлечение двигательных единиц. Численное снижение амплитуды Н-ответа у этих животных может указывать на снижение возбудимости

соответствующих мотонейронов. Предыдущие электрофизиологические исследования показали, что эпидуральная стимуляция спинного мозга способна изменять свойства мотонейронов, снижая их возбудимость [67, 105]. Кроме того, при стимуляции седалищного нерва происходит активация множества афферентных волокон, включая чувствительные волокна от мышц-антагонистов, которые могут оказывать тормозное влияние на регистрируемую активность. Важно отметить, что активация интраспинальных тормозных механизмов после ТСМ, как известно, способствует восстановлению локомоторной активности [64, 174].

Результаты электрофизиологических исследований подтверждаются данными анализа кинематики суставов задних конечностей. В опытной группе объём движений в коленном и голеностопном суставах во время стимуляции на уровне L2 был больше, чем в контрольной, причём в голеностопном суставе значения приблизились к показателям, зарегистрированным до травмы [14]. Относительно высокая амплитуда движений в голеностопном суставе может быть связана с восстановлением активности передней большеберцовой мышцы, ответственной за сгибание стопы. Известно, что в условиях механической разгрузки наиболее выраженные изменения происходят преимущественно в мышцах-разгибателях, а движения в каждом суставе могут координироваться отдельными нейронными сетями [89]. Расположение стимулирующего электрода на уровне поясничного утолщения может способствовать увеличению числа активируемых мотонейронов, иннервирующих переднюю большеберцовую мышцу, что обеспечивает восстановление сгибания стопы.

Через 8 недель после травмы показатели PTIBS в опытной группе были лучше при сравнении с контрольными животными, демонстрируя тенденцию в пользу более эффективного восстановления двигательной функции в условиях ЭЭС. В целом, результаты поведенческого тестирования, где надёжность PTIBS считается высокой [20], соответствуют данным электрофизиологических исследований камбаловидной мышцы и анализа кинематики суставов задних конечностей, демонстрируя улучшение двигательной функции у свиней в условиях

двухуровневой эпидуральной электростимуляции в сочетании с двигательной тренировкой на беговой дорожке.

Морфометрический анализ серого вещества спинного мозга не выявил статистически значимых различий в относительной площади между группами ($p > 0,05$ для всех попарных сравнений). Тем не менее, отмечена тенденция к большей сохранности ткани в ростральных сегментах у животных опытной группы ($75,45 \pm 5,13\%$) по сравнению с контролем ($72,01 \pm 2,03\%$). Отсутствие статистически значимых различий, вероятно, обусловлено индивидуальной вариабельностью и ограниченным объёмом выборки, однако данная тенденция позволяет предположить, что ЭЭС может замедлять процессы вторичной дегенерации, развивающиеся после первичного механического повреждения.

Так, полученные данные убедительно свидетельствуют об антиапоптотическом действии ЭЭС. В ростральных сегментах задних рогов (на уровне травмы) количество Caspase3-положительных клеток в опытной группе было достоверно ниже, чем в контрольной ($p = 0,008$), что подтверждает способность электростимуляции подавлять активацию каспазного каскада апоптоза. Анализ экспрессии белка теплового шока Hsp27, индуцируемого при клеточном стрессе, также выявил нейропротекторный эффект ЭЭС. В передних рогах ростральных сегментов уровень экспрессии Hsp27 в опытной группе был достоверно ниже, чем в контрольной ($p = 0,022$), а в задних рогах каудальных сегментов также наблюдалось значимое снижение Hsp27 у опытных животных по сравнению с контролем ($p = 0,022$) [15]. Эти результаты согласуются с концепцией, согласно которой электрическая стимуляция модулирует экспрессию стресс-индуцируемых белков, подавляет апоптотические каскады и снижает общий уровень клеточного стресса в повреждённом спинном мозге.

Травма спинного мозга запускает немедленный ответ со стороны нейроглии, включающий активацию астроцитов и микроглии, а также гибель олигодендроцитов. Данное исследование показало положительное действие двухуровневой ЭЭС на ремоделирование нейроглии. В каудальных сегментах задних рогов наблюдалась тенденция к снижению GFAP-положительной площади

у животных опытной группы по сравнению с контролем ($p = 0,144$). Во всех группах наблюдалась активация микроглии, однако у опытных животных количество Iba1-положительных клеток не отличалось от интактных, что указывает на противовоспалительный эффект ЭЭС и снижение нейротоксического компонента воспалительной реакции. Анализ количества олигодендроцитов показал, что посттравматическая гибель этих клеток наблюдалась у всех животных с ТСМ, однако двухуровневая ЭЭС способствовала их выживанию. Количество Olig2-положительных клеток в передних рогах ростральных сегментов было достоверно выше в опытной группе по сравнению с контрольной ($p = 0,049$), что свидетельствует о сохранении пула олигодендроглиальных клеток [15]. Таким образом, данные демонстрируют, что двухуровневая ЭЭС способствует благоприятному ремоделированию нейроглии, создавая условия для регенерации аксонов и восстановлению утраченных нейронных связей.

Нейропротекторные эффекты двухуровневой ЭЭС на уровне спинного мозга также подтверждаются данными о лучшей сохранности скелетных мышц задних конечностей. Через 8 недель после травмы масса камбаловидной мышцы (*m. soleus*) у контрольных животных была достоверно меньше, чем у интактных ($p = 0,025$). Площадь поперечного сечения мышечных волокон также демонстрировала тенденцию к снижению в контрольной группе по сравнению с интактной ($p = 0,101$). В то же время животные опытной группы показали лучшие результаты: масса мышцы не отличалась от интактных значений ($p = 0,655$), а поперечная площадь мышечных волокон была достоверно больше, чем в контрольной группе ($p = 0,017$). Анализ фенотипа мышцы выявил, что у интактных животных доля медленных мышечных волокон (тип I) равнялась 92,12%. Травма привела к значительной фенотипической перестройке камбаловидной мышцы: в контрольной группе доля медленных волокон достоверно снизилась до 45,28% ($p = 0,007$); в опытной группе доля медленных волокон сохранилась на уровне 71,50%, что численно приближается к показателям интактной группы и превосходит контрольные значения, однако статистически значимых различий ни с одной из групп исследования выявлено не было ($p = 0,180$ для обоих попарных сравнений).

Сохранение преимущественно медленного фенотипа камбаловидной мышцы имеет ключевое функциональное значение, поскольку такие волокна более устойчивы к утомлению и необходимы для поддержания позы и длительной локомоции. Полученные данные указывают на то, что двухуровневая ЭЭС не только предотвращает денервационную атрофию мышцы, но и способствует сохранению её фенотипического профиля, максимально приближая его к нормальному [15].

Таким образом, в настоящем исследовании для коррекции негативных последствий спинальной травмы разработана и экспериментально проверена методика двухуровневой эпидуральной электростимуляции спинного мозга. На свиньях с ТСМ установлено, что двухуровневая эпидуральная электростимуляция оказывает положительное действие на структурное и функциональное посттравматическое восстановление спинного мозга, что подтверждается улучшениями поведенческих тестов, положительными изменениями в сером веществе спинного мозга, в суставах и скелетных мышцах задних конечностях.

Однако следует отметить, что настоящее исследование имеет ряд методологических ограничений, которые следует учитывать при интерпретации полученных данных. Основным ограничением является небольшой размер экспериментальных групп, обусловленный сложностью работ с крупными животными, высокой трудоемкостью выполнения исследования на экспериментальной модели и строгими этическими требованиями. Это снижает статистическую мощность исследования, что в свою очередь проявляется в наличии тенденций к улучшению отдельных показателей, не достигших уровня статистической значимости. Кроме того, несмотря на наличие контрольной группы с двигательной тренировкой без электростимуляции, в работе не представлены группы с изолированной одноуровневой ЭЭС (только Th5 или только L2), что не позволяет оценить индивидуальный вклад каждого уровня стимуляции в общий эффект двухуровневой ЭЭС, а также другие ограничения, такие как фиксированные параметры стимуляции, период наблюдения в течение 8 недель, использование косвенных маркеров формирования транстравматической нейронной сети определяют вектор дальнейших исследований, направленных на увеличение

статистической мощности, введение дополнительных методов исследования и проведение долгосрочных наблюдений.

Тем не менее, результаты, полученные в настоящем диссертационном исследовании, и поставленные новые задачи создают основу для последующих комплексных доклинических испытаний на крупных животных по применению двухуровневой ЭЭС для стимулирования посттравматической регенерации спинного мозга.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проблема терапии пациентов с негативными последствиями спинальной травмы остаётся одной из наиболее актуальных в практической медицине. Современные методы лечения ТСМ, ввиду сложности и недостаточной изученности процессов регенерации в ЦНС, относительно ограничены и направлены главным образом на более раннее хирургическое вмешательство и противовоспалительную терапию. Поэтому после выписки из стационара качество жизни пациентов с ТСМ напрямую зависит от своевременной, квалифицированной и комплексной нейрореабилитации. Одним из эффективных способов нейрореабилитации таких пациентов считается электрическая стимуляция спинного мозга. В настоящее время существуют множество протоколов электростимуляции в зависимости от локализации и тяжести ТСМ с различной эффективностью на посттравматическое восстановление спинного мозга. Проведённое исследование на экспериментальной модели контузионной травмы спинного мозга в нижнегрудном отделе (Th8-Th9) у свиней продемонстрировало эффективность двухуровневой ЭЭС на уровне грудного Th5 и поясничного L2 сегментов в сочетании с двигательной тренировкой на беговой дорожке.

Применение разработанного протокола двухуровневой ЭЭС у животных с ТСМ в течение 6 недель привело к частичному восстановлению произвольных движений задних конечностей, что соответствовало двум баллам по шкале PTIBS. Электрофизиологический анализ подтвердил частичное восстановление характеристик М-ответа и появление Н-рефлекса камбаловидной мышцы при стимуляции седалищного нерва, что свидетельствует о реактивации мотонейронного пула и восстановлении рефлекторных дуг. На уровне скелетной мускулатуры двухуровневая ЭЭС спинного мозга предотвратила денервационную атрофию камбаловидной мышцы, сохранив её массу и площадь поперечного сечения мышечных волокон, а также поддержала изначально медленный фенотип

мышцы, критически важный для устойчивости к утомлению и постурального контроля.

Иммунофлуоресцентный анализ спинного мозга животных после ТСМ выявил нейропротекторный эффект двухуровневой ЭЭС. В ростральных сегментах, прилегающих к эпицентру травмы, установлено подавление апоптотического каскада (снижение количества Caspase3-положительных клеток) и уменьшение клеточного стресса (снижение экспрессии Hsp27). Электростимуляция способствовала благоприятному ремоделированию нейроглии, о чем свидетельствовала тенденция к сдерживанию астроглиоза в каудальном сегменте (снижение количества клеток микроглии), а также сохранение популяции олигодендроглиальных клеток в ростральном сегменте, что создаёт хорошие предпосылки для регенерации аксонов через эпицентр повреждения и формирования транстравматической нейронной сети.

Таким образом, двухуровневая ЭЭС спинного мозга животных после ТСМ, направленная на анатомо-функциональное интегрирование сегментов выше и ниже уровня повреждения, препятствует развитию ключевых патогенетических звеньев вторичного повреждения спинного мозга. Сочетанное действие ЭЭС поясничного утолщения для активации центрального генератора паттерна шагания и транстравматической ЭЭС непосредственно выше уровня нейротравмы для стимулирования регенерации аксонов через область повреждения и формирования транстравматической нейронной сети обеспечивает нейромодулирующий эффект, выражающийся в положительных молекулярных и клеточных изменениях в сером веществе спинного мозга, сохранности морфо-функциональных характеристик скелетных мышц и, как следствие, частичное восстановление двигательной активности задних конечностей (Рисунок 22). Разработанный подход демонстрирует высокий трансляционный потенциал и может служить основой для внедрения новых протоколов нейрореабилитации пациентов с ТСМ.

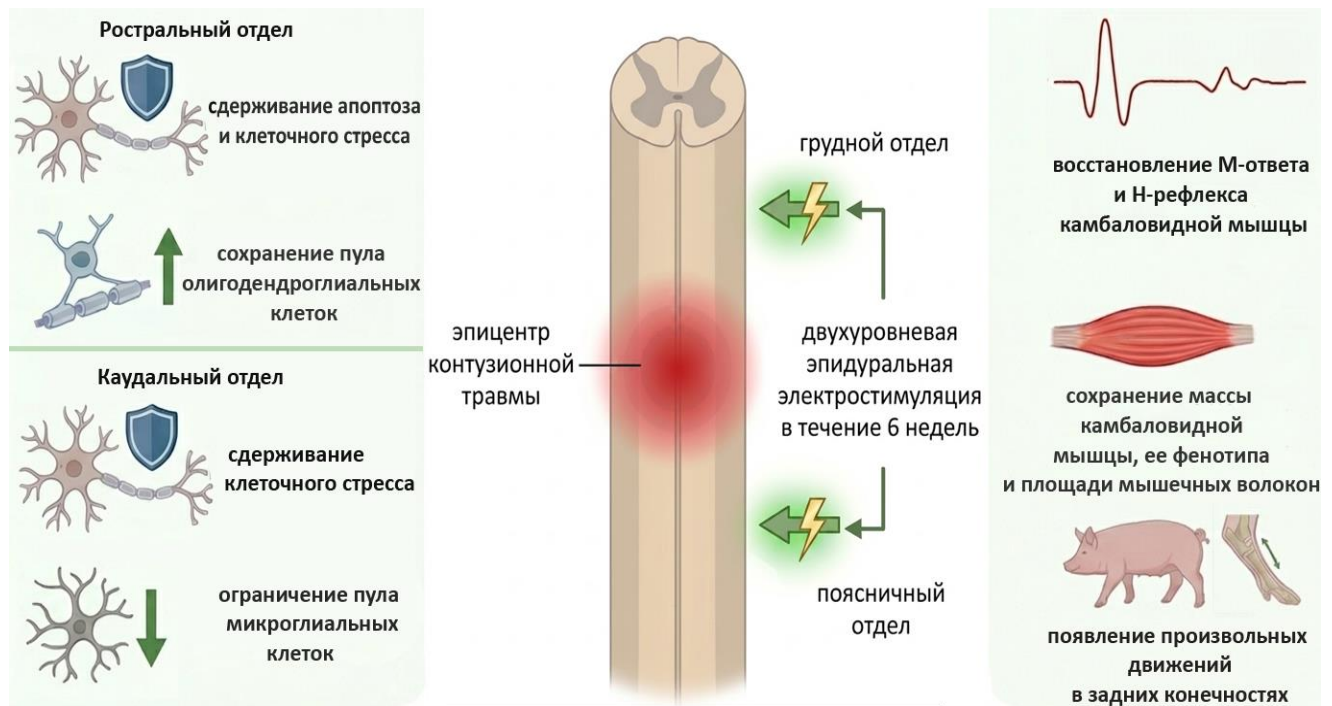


Рисунок 22 – Транстравматическая эпидуральная электростимуляция в области, непосредственно прилегающей к эпицентру травмы, в комбинации со стимуляцией центрального генератора паттерна шагания в поясничной области и двигательными тренировками на беговой дорожке оказывает положительное действие на патофизиологические аспекты контузионной травмы спинного мозга. Сдерживание вторичных повреждений в спинном мозге выше и ниже эпицентра повреждения позитивно влияет на восстановление локомоторного аппарата

ВЫВОДЫ

1. В модели на свиньях с неполной контузионной травмой спинного мозга на уровне Th8-Th9 разработан новый протокол двухуровневой эпидуральной электростимуляции. Двухуровневую эпидуральную электростимуляцию спинного мозга начинают через 2 недели после нейротравмы и проводят в течение 6 недель в сочетании с двигательной тренировкой на беговой дорожке. Двухуровневая эпидуральная электростимуляция проводится раздельно: утренний сеанс включает в себя транстравматическую эпидуральную электростимуляцию на уровне Th5, в области, непосредственно прилегающей к эпицентру нейротравмы с целью формирования транстравматической нейронной сети, и в вечерний сеанс – на уровне центрального генератора паттерна шагания (L2) для активации движений задних конечностей.

2. У свиней с неполной контузионной травмой спинного мозга двухуровневая эпидуральная электростимуляция, сочетающаяся с двигательной тренировкой, в течение 6 недель способствует частичному восстановлению произвольных движений задних конечностей, что соответствует двум баллам по шкале поведенческого теста PTIBS.

3. У свиней с неполной контузионной травмой спинного мозга через шесть недель двухуровневой эпидуральной электростимуляции, сочетающаяся с двигательной тренировкой, в камбаловидной мышце происходит восстановление характеристик М-ответа и Н-рефлекса при сохранности массы мышцы, ее фенотипа и средней площади поперечного сечения мышечных волокон.

4. У свиней с неполной контузионной травмой спинного мозга двухуровневая эпидуральная электростимуляция в сочетании с двигательной тренировкой в течение 6 недель сдерживала развитие негативных последствий спинальной травмы в прилегающих к эпицентру повреждения областях. В ростральном сегменте спинного мозга лучшая сохранность серого вещества обусловлена снижением количества вступивших в апоптоз (Caspase3-положительных) клеток,

уменьшением Hsp27-иммунопозитивной площади, соответствующей локализации белка теплового шока, и большим количеством миелинообразующих олигодендроглиальных клеток, что обеспечивает благоприятные условия для формирования транстравматической нейронной сети. В каудальном сегменте у опытных животных обнаружено уменьшение Hsp27-иммунопозитивной площади и сдерживание роста количества негативно влияющих на процессы регенерации клеток микроглии, участвующих в развитии астроглиоза и нейровоспаления.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Полученные результаты открывают несколько направлений для углубления исследований в области транстравматической нейромодуляции. Приоритетным представляется оптимизация параметров электростимуляции, в частности внедрение систем, способных корректировать частоту и амплитуду импульсов в реальном времени. Параллельно целесообразно проведение долгосрочных наблюдений для оценки устойчивости терапевтического эффекта на хронических стадиях травмы (6–12 месяцев), что позволит определить оптимальную продолжительность курса ТЭЭС. Повышение статистической мощности исследования за счёт увеличения выборки и стандартизации протокола станет важным шагом для обеспечения воспроизводимости данных в многоцентровых доклинических исследованиях. Перспективным также является изучение комбинированных подходов, сочетающих ТЭЭС с фармакологической, генной или клеточной терапией, направленными на модуляцию нейровоспаления, усиление регенерации аксонов и формирования утраченных нейронных связей.

Накопленный экспериментальный опыт создаёт предпосылки для разработки рекомендаций по трансляции метода в клиническую практику: инициирование пилотных исследований у пациентов с грудной локализацией травмы спинного мозга позволит оценить безопасность, переносимость и функциональную эффективность двухуровневой эпидуральной стимуляции в период нейрореабилитации.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АЦП	аналого-цифровой преобразователь
в/м	внутримышечно
ГЭБ	гематозэнцефалический барьер
Гц	Герц
д/сут	дважды в сутки
КС	каудальный сегмент
мА	миллиампер
мс	миллисекунды
М-ответ	моторный ответ
МВП	моторный вызванный потенциал
МРТ	магнитно-резонансная томография
п/к	подкожно
ПД	потенциал действия
р/сут	один раз в сутки
РКТ	рентгеновская компьютерная томография
РС	ростральный сегмент
СПН	стимуляция периферических нервов
ТСМ	травма спинного мозга
ТЭЭС	транстравматическая эпидуральная электростимуляция
ФЭС	функциональная электростимуляция
ЦГП	центральный генератор паттерна шагания
ЭМГ	электромиография
ЭЭС	эпидуральная электростимуляция
АТ	антитело
BDNF	мозговой нейротрофический фактор
DAPI	4',6-диамидино-2-фенилиндол

GFAP	глиальный фибриллярный кислый белок
Hsp27	белок теплового шока 27 кДа
Iba1	ионизированная кальций-связывающая адаптерная молекула 1
L	поясничный позвонок
m.erector spinae	мышца, выпрямляющая позвоночник
m.soleus	камбаловидная мышца
m.trapezius	трапециевидная мышца
Olig2	фактор транскрипции олигодендроцитов 2
PTBS	шкала поведения свиньи при травме грудного отдела спинного мозга
Th	грудной позвонок

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Афферентная активация генератора шагательных движений у спинализированной кошки в ранний период после спинализации / О. А. Никитин, И. Н. Богачева, П. Е. Мусиенко [и др.] // Вестник тверского государственного университета. Серия : Биология и экология. – 2007. – № 6. – С. 22-30.
2. Взаимовлияние верхних и нижних конечностей при циклических движениях / И. А. Солопова, В. А. Селионов, Д. С. Жванский, А. А. Гришин // Физиология Человека. – 2011. – Т. 37, № 4. – С. 55-64.
3. Давиденко, В. Ю. Многоканальная электростимуляция / В. Ю. Давиденко. – Тернополь: Учебники и пособия, 2000. – 301 с.
4. Давранов, Э. Э. Сравнительная эффективность клинико-инструментальных методов диагностики при травматических повреждениях спинного мозга / Э. Э. Давранов, З. Х. Равшанов, Ж. Ф. Кадиров // Вестник ассоциации пульмонологов Центральной Азии. – 2025. – Т. 14, № 9. – С. 49-58.
5. Даминов, Р. Г. Общие вопросы электростимуляции больных с травмами и заболеваниями нервной системы / Р. Г. Даминов, М. Р. Даминов // Невский врачебный вестник. – 2000. – № 2. – С. 12-15.
6. Журкин, К. И. Клинико-эпидемиологические аспекты позвоночно-спинномозговой травмы в России / К. И. Журкин, В. Ю. Мурылёв // Энигма. – 2021. – № 29-1. – С. 64-68.
7. Карпов, Д. А. Нейропротективная терапия при спинномозговой травме / Д. А. Карпов, Ш. М. Сафин, Я. В. Трифонов // Современные проблемы науки и образования. – 2022. – № 4. – С. 139.
8. Марчукова, С. М. Медицина в зеркале истории / С. М. Марчукова. – Санкт-Петербург : Европейский Дом, 2003. – 272 с.
9. Морозов, И. Н. Эпидемиология позвоночно-спинномозговой травмы (обзор) / И. Н. Морозов, С. Г. Млявых // Медицинский альманах. – 2011. – № 4. – С. 157-159.

10. Острое травматическое повреждение спинного мозга в Санкт-Петербурге. Эпидемиологические данные: частота, гендерные и возрастные особенности / С. В. Лобзин, Л. М. Мирзаева, Н. В. Цинзерлинг [и др.] // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. – 2019. – Т. 11, № 2. – С. 27-34.
11. Реабилитация больных с травматической болезнью спинного мозга / В. В. Крылов, М. Б. Цыкунов, Б. А. Поляев [и др.]. – Москва : Московские учебники, 2010. – 640 с.
12. Реабилитация при заболеваниях и повреждениях нервной системы / К. В. Котенко, В. А. Елифанов, А. В. Елифанов, Н. Б. Корчажкина. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2016. – 656 с.
13. Травма спинного мозга и позвоночника: учебное пособие / В. А. Бывальцев, А. А. Калинин, В. В. Шепелев, Ц. Б. Балданов. – Иркутск : Иркутский государственный медицинский университет, Кафедра нейрохирургии и инновационной медицины, 2021. – 120 с.
14. Транстравматическая эпидуральная электростимуляция спинного мозга в модели на свиньях / Р. В. Шевченко, Ф. О. Фадеев, А. А. Измайлов [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2023. – Т. 175, № 1. – С. 10-15.
15. Транстравматическая эпидуральная электростимуляция способствует сохранности спинного мозга и скелетных мышц у свиней / Р. В. Шевченко, Р. Р. Гарифулин, В. В. Валиуллин [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2024. – Т. 178, № 10. – С. 516-520.
16. Чёрч, Д. Гений в ваших генах / Д. Чёрч. – Санкт-Петербург : Весь, 2010. – 358 с.
17. Электрические рыбы как объект фундаментальных исследований / В. М. Олышанский, В. Д. Барон, Е. Макмагон, Д. В. Зленко // Известия высших учебных заведений. Прикладная нелинейная динамика. – 2023. – Т. 31, № 6. – С. 776-812.
18. Эпидемиология травм позвоночника и спинного мозга / В. С. Толкачев, С. П. Бажанов, В. Ю. Ульянов [и др.] // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2018. – Т. 14, № 3. – С. 592-595.

19. 2009 Review and Revisions of the International Standards for the Neurological Classification of Spinal Cord Injury / W. P. Waring, F. Biering-Sorensen, S. Burns [et al.] // The Journal of Spinal Cord Medicine. – 2010. – Vol. 33, № 4. – P. 346-352.
20. A novel porcine model of traumatic thoracic spinal cord injury / J. H. T. Lee, C. F. Jones, E. B. Okon [et al.] // Journal of Neurotrauma. – 2013. – Vol. 30, № 3. – P. 142-159.
21. A randomized trial of functional electrical stimulation for walking in incomplete spinal cord injury: Effects on walking competency / N. Kapadia, K. Masani, B. Catharine Craven [et al.] // The Journal of Spinal Cord Medicine. – 2014. – Vol. 37, № 5. – P. 511-524.
22. Activation of spinal locomotor circuits in the decerebrated cat by spinal epidural and/or intraspinal electrical stimulation / I. Lavrov, P. E. Musienko, V. A. Selionov [et al.] // Brain Research. – 2015. – Vol. 1600. – P. 84-92.
23. Activity-dependent spinal cord neuromodulation rapidly restores trunk and leg motor functions after complete paralysis / A. Rowald, S. Komi, R. Demesmaeker [et al.] // Nature Medicine. – 2022. – Vol. 28, № 2. – P. 260-271.
24. Alizadeh, A. Traumatic Spinal Cord Injury: An Overview of Pathophysiology, Models and Acute Injury Mechanisms / A. Alizadeh, S. M. Dyck, S. Karimi-Abdolrezaee // Frontiers in Neurology. – 2019. – Vol. 10. – P. 282.
25. An Injectable Neural Stimulation Electrode Made from an In-Body Curing Polymer/Metal Composite / J. K. Trevathan, I. W. Baumgart, E. N. Nicolai [et al.] // Advanced Healthcare Materials. – 2019. – Vol. 8, № 23. – P. e1900892.
26. And yet it moves: Recovery of volitional control after spinal cord injury / G. Taccola, D. Sayenko, P. Gad [et al.] // Progress in Neurobiology. – 2018. – Vol. 160. – P. 64-81.
27. Anderson, K. D. Targeting recovery: priorities of the spinal cord-injured population / K. D. Anderson // Journal of Neurotrauma. – 2004. – Vol. 21, № 10. – P. 1371-1383.
28. Another barrier to regeneration in the CNS: activated macrophages induce extensive retraction of dystrophic axons through direct physical interactions / K. P. Horn, S. A. Busch, A. L. Hawthorne [et al.] // The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience. – 2008. – Vol. 28, № 38. – P. 9330-9341.

29. Atkins, K. D. Effects of functional electrical stimulation on muscle health after spinal cord injury / K. D. Atkins, C. S. Bickel // *Current Opinion in Pharmacology*. – 2021. – Vol. 60. – P. 226-231.
30. Autologous Genetically Enriched Leucoconcentrate in the Preventive and Acute Phases of Stroke Treatment in a Mini-Pig Model / Z. Safiullov, A. Izmailov, M. Sokolov [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2022. – Vol. 14, № 10. – P. 2209.
31. Ballion, B. Forelimb locomotor generators and quadrupedal locomotion in the neonatal rat / B. Ballion, D. Morin, D. Viala // *The European Journal of Neuroscience*. – 2001. – Vol. 14, № 10. – P. 1727-1738.
32. Becker, R. O. Electromagnetism and Life / R. O. Becker, A. A. Marino. – State University of New York Press, 1982. – 234 p.
33. Bioelectric activity of spinal cord in patients with vertebrospinal pathologies / Y. P. Gerasimenko, I. N. Bogacheva, N. A. Shcherbakova, A. N. Makarovskii // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2001. – Vol. 132, № 5. – P. 1106-1109.
34. Biomaterials. Electronic dura mater for long-term multimodal neural interfaces / I. R. Minev, P. Musienko, A. Hirsch [et al.] // *Science*. – 2015. – Vol. 347, № 6218. – P. 159-163.
35. Boos, N. Spinal Disorders: Fundamentals of Diagnosis and Treatment. Spinal Disorders / N. Boos, M. Aebi. – Berlin : Springer Science & Business Media, 2008. – 1162 p.
36. Calcium regulation of neuronal gene expression / A. E. West, W. G. Chen, M. B. Dalva [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2001. – Vol. 98, № 20. – P. 11024-11031.
37. Cardiometabolic Effects of High-Intensity Hybrid Functional Electrical Stimulation Exercise after Spinal Cord Injury / R. Solinsky, H. Mercier, G. Picard, J. A. Taylor // *PM & R: the journal of injury, function, and rehabilitation*. – 2021. – Vol. 13, № 9. – P. 937-944.
38. Cazalets, J. R. Coupling between lumbar and sacral motor networks in the neonatal rat spinal cord / J. R. Cazalets, S. Bertrand // *The European Journal of Neuroscience*. – 2000. – Vol. 12, № 8. – P. 2993-3002.

39. Cazalets, J. R. Localization and organization of the central pattern generator for hindlimb locomotion in newborn rat / J. R. Cazalets, M. Borde, F. Clarac // *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. – 1995. – Vol. 15, № 7 Pt 1. – P. 4943-4951.
40. Changes in spinal cord hemodynamics reflect modulation of spinal network with different parameters of epidural stimulation / S. Tang, C. A. Cuellar, P. Song [et al.] // *NeuroImage*. – 2020. – Vol. 221. – P. 117183.
41. Characterization of vascular disruption and blood-spinal cord barrier permeability following traumatic spinal cord injury / S. A. Figley, R. Khosravi, J. M. Legasto [et al.] // *Journal of Neurotrauma*. – 2014. – Vol. 31, № 6. – P. 541-552.
42. Chinnock, P. Gangliosides for acute spinal cord injury / P. Chinnock, I. Roberts // *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. – 2005. – Vol. 2005, № 2. – P. CD004444.
43. Clapham, D. E. Calcium signaling / D. E. Clapham // *Cell*. – 2007. – Vol. 131, № 6. – P. 1047-1058.
44. Closed-loop neuromodulation of spinal sensorimotor circuits controls refined locomotion after complete spinal cord injury / N. Wenger, E. M. Moraud, S. Raspopovic [et al.] // *Science Translational Medicine*. – 2014. – Vol. 6, № 255. – P. 255ra133.
45. Clovis Vincent (1879-1947): founder of French neurosurgery and promoter of oncologic neurosurgery / M. Karamanou, G. Androutsos, M. Lymperi [et al.] // *Journal of B.U.ON.: official journal of the Balkan Union of Oncology*. – 2012. – Vol. 17, № 1. – P. 190-195.
46. Combination of epidural electrical stimulation with ex vivo triple gene therapy for spinal cord injury: a proof of principle study / F. O. Fadeev, F. V. Bashirov, V. A. Markosyan [et al.] // *Neural Regeneration Research*. – 2021. – Vol. 16, № 3. – P. 550-560.
47. Combinatorial tissue engineering partially restores function after spinal cord injury / J. S. Hakim, B. R. Rodysill, B. K. Chen [et al.] // *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. – 2019. – Vol. 13, № 5. – P. 857-873.
48. Combined Supra- and Sub-Lesional Epidural Electrical Stimulation for Restoration of the Motor Functions after Spinal Cord Injury in Mini Pigs / F. Fadeev, A. Ereemeev, F. Bashirov [et al.] // *Brain Sciences*. – 2020. – Vol. 10, № 10. – P. 744.

49. Comparative analysis and forecast of spinal cord injury burden in BRICS countries (1990–2021): insights from the Global Burden of Disease Study 2021 / K. Yuan, M. Ou, S. Chen [et al.] // *Frontiers in Public Health*. – 2025. – Vol. 13. – P. 1642367.
50. Comparative Morphometry of the Wisconsin Miniature Swine™ Thoracic Spine for Modeling Human Spine in Translational Spinal Cord Injury Research / G. S. Miranpuri, D. T. Schomberg, P. Stan [et al.] // *Annals of Neurosciences*. – 2018. – Vol. 25, № 4. – P. 210-218.
51. Côté, M.-P. Rehabilitation Strategies after Spinal Cord Injury: Inquiry into the Mechanisms of Success and Failure / M.-P. Côté, M. Murray, M. A. Lemay // *Journal of Neurotrauma*. – 2017. – Vol. 34, № 10. – P. 1841-1857.
52. Courtine, G. Spinal cord repair: advances in biology and technology / G. Courtine, M. V. Sofroniew // *Nature Medicine*. – 2019. – Vol. 25, № 6. – Spinal cord repair. – P. 898-908.
53. Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon / J. W. Rowland, G. W. J. Hawryluk, B. Kwon, M. G. Fehlings // *Neurosurgical Focus*. – 2008. – Vol. 25, № 5. – Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies. – P. E2.
54. Deep venous thrombosis in patients with chronic spinal cord injury / M. Mackiewicz-Milewska, S. Jung, A. C. Kroszczyński [et al.] // *The Journal of Spinal Cord Medicine*. – 2016. – Vol. 39, № 4. – P. 400-404.
55. Depolarization and electrical stimulation enhance in vitro and in vivo sensory axon growth after spinal cord injury / I. Goganau, B. Sandner, N. Weidner [et al.] // *Experimental Neurology*. – 2018. – Vol. 300. – P. 247-258.
56. Development of a multi-electrode array for spinal cord epidural stimulation to facilitate stepping and standing after a complete spinal cord injury in adult rats / P. Gad, J. Choe, M. S. Nandra [et al.] // *Journal of Neuroengineering and Rehabilitation*. – 2013. – Vol. 10. – P. 2.
57. Dimitrijevic, M. R. Evidence for a spinal central pattern generator in humans / M. R. Dimitrijevic, Y. Gerasimenko, M. M. Pinter // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 1998. – Vol. 860. – P. 360-376.

58. Dissecting the Dual Role of the Glial Scar and Scar-Forming Astrocytes in Spinal Cord Injury / T. Yang, Y. Dai, G. Chen, S. Cui // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2020. – Vol. 14. – P. 78.
59. Dolbow, D. R. Improving the Efficiency of Electrical Stimulation Activities After Spinal Cord Injury / D. R. Dolbow, W. R. Holcomb, A. S. Gorgey // *Current Physical Medicine and Rehabilitation Reports*. – 2014. – Vol. 2, № 3. – P. 169-175.
60. Dolhem, R. The history of electrostimulation in rehabilitation medicine / R. Dolhem // *Annales De Readaptation Et De Medecine Physique: Revue Scientifique De La Societe Francaise De Reeducation Fonctionnelle De Readaptation Et De Medecine Physique*. – 2008. – Vol. 51, № 6. – P. 427-431.
61. Dose dependence of the 5-HT agonist quipazine in facilitating spinal stepping in the rat with epidural stimulation / R. M. Ichiyama, Y. Gerasimenko, D. L. Jindrich [et al.] // *Neuroscience Letters*. – 2008. – Vol. 438, № 3. – P. 281-285.
62. Early electrical field stimulation prevents the loss of spinal cord anterior horn motoneurons and muscle atrophy following spinal cord injury / C. Zhang, W. Rong, G.-H. Zhang [et al.] // *Neural Regeneration Research*. – 2018. – Vol. 13, № 5. – P. 869-876.
63. Effect of epidural stimulation of the lumbosacral spinal cord on voluntary movement, standing, and assisted stepping after motor complete paraplegia: a case study / S. Harkema, Y. Gerasimenko, J. Hodes [et al.] // *Lancet*. – 2011. – Vol. 377, № 9781. – P. 1938-1947.
64. Effect of spinal cord injury severity on alterations of the H-reflex / J. K. Lee, G. S. Emch, C. S. Johnson, J. R. Wrathall // *Experimental Neurology*. – 2005. – Vol. 196, № 2. – P. 430-440.
65. Effects of Bilateral Transcutaneous Tibial Nerve Stimulation on Neurogenic Detrusor Overactivity in Spinal Cord Injury: A Urodynamic Study / K. Kamboonlert, S. Panyasriwanit, N. Tantisiriwat, W. Kitisomprayoonkul // *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*. – 2021. – Vol. 102, № 6. – P. 1165-1169.
66. Effects of sacral nerve electrical stimulation on 5-HT and 5-HT_{3A}R/5-HT₄R levels in the colon and sacral cord of acute spinal cord injury rat models / Y. Zhu, J. Cheng, J. Yin [et al.] // *Molecular Medicine Reports*. – 2020. – Vol. 22, № 2. – P. 763-773.

67. Elbasiouny, S. M. Suppressing the excitability of spinal motoneurons by extracellularly applied electrical fields: insights from computer simulations / S. M. Elbasiouny, V. K. Mushahwar // *Journal of Applied Physiology*. – 2007. – Vol. 103, № 5. – P. 1824-1836.
68. Electrical spinal cord stimulation must preserve proprioception to enable locomotion in humans with spinal cord injury / E. Formento, K. Minassian, F. Wagner [et al.] // *Nature Neuroscience*. – 2018. – Vol. 21, № 12. – P. 1728-1741.
69. Electrical stimulation and denervated muscles after spinal cord injury / S. Chandrasekaran, J. Davis, I. Bersch [et al.] // *Neural Regeneration Research*. – 2020. – Vol. 15, № 8. – P. 1397-1407.
70. Electrical stimulation for the treatment of spinal cord injuries: A review of the cellular and molecular mechanisms that drive functional improvements / R. M. Dorrian, C. F. Berryman, A. Lauto, A. V. Leonard // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2023. – Vol. 17. – P. 1095259.
71. Electrical stimulation of intact peripheral sensory axons in rats promotes outgrowth of their central projections / E. Udina, M. Furey, S. Busch [et al.] // *Experimental Neurology*. – 2008. – Vol. 210, № 1. – P. 238-247.
72. Electrical stimulation promotes BDNF expression in spinal cord neurons through Ca(2+)- and Erk-dependent signaling pathways / W. Wenjin, L. Wenchao, Z. Hao [et al.] // *Cellular and Molecular Neurobiology*. – 2011. – Vol. 31, № 3. – P. 459-467.
73. Emergence of Epidural Electrical Stimulation to Facilitate Sensorimotor Network Functionality After Spinal Cord Injury / J. S. Calvert, P. J. Grahn, K. D. Zhao, K. H. Lee // *Neuromodulation: Journal of the International Neuromodulation Society*. – 2019. – Vol. 22, № 3. – P. 244-252.
74. Enabling Task-Specific Volitional Motor Functions via Spinal Cord Neuromodulation in a Human With Paraplegia / P. J. Grahn, I. A. Lavrov, D. G. Sayenko [et al.] // *Mayo Clinic Proceedings*. – 2017. – Vol. 92, № 4. – P. 544-554.
75. Epidural spinal cord stimulation and carry-over effect in chronic spinal cord injury patients / M. R. Dimitrijevic, J. A. Halter, P. C. Sharkey, A. M. Sherwood // *Applied Neurophysiology*. – 1987. – Vol. 50, № 1-6. – P. 449-450.

76. Epidural Spinal Cord Stimulation Promotes Motor Functional Recovery by Enhancing Oligodendrocyte Survival and Differentiation and by Protecting Myelin after Spinal Cord Injury in Rats / G. Li, Z.-K. Fan, G.-F. Gu [et al.] // *Neuroscience Bulletin*. – 2020. – Vol. 36, № 4. – P. 372-384.
77. Epidural Stimulation Combined with Triple Gene Therapy for Spinal Cord Injury Treatment / R. Islamov, F. Bashirov, F. Fadeev [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21, № 23. – P. 8896.
78. Epidural stimulation induced modulation of spinal locomotor networks in adult spinal rats / I. Lavrov, C. J. Dy, A. J. Fong [et al.] // *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. – 2008. – Vol. 28, № 23. – P. 6022-6029.
79. Evaluation of direct and cell-mediated triple-gene therapy in spinal cord injury in rats / R. R. Islamov, A. A. Izmailov, M. E. Sokolov [et al.] // *Brain Research Bulletin*. – 2017. – Vol. 132. – P. 44-52.
80. Finnerup, N. B. Neuropathic Pain: From Mechanisms to Treatment / N. B. Finnerup, R. Kuner, T. S. Jensen // *Physiological Reviews*. – 2021. – Vol. 101, № 1. – P. 259-301.
81. Francis, J. Electroanaesthesia--from torpedo fish to TENS / J. Francis, J. Dingley // *Anaesthesia*. – 2015. – Vol. 70, № 1. – P. 93-103.
82. From basics to clinical: a comprehensive review on spinal cord injury / N. A. Silva, N. Sousa, R. L. Reis, A. J. Salgado // *Progress in Neurobiology*. – 2014. – Vol. 114. – From basics to clinical. – P. 25-57.
83. Functional electrical stimulation and spinal cord injury / C. H. Ho, R. J. Triolo, A. L. Elias [et al.] // *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America*. – 2014. – Vol. 25, № 3. – P. 631-654, ix.
84. Functional electrical stimulation therapy of voluntary grasping versus only conventional rehabilitation for patients with subacute incomplete tetraplegia: a randomized clinical trial / M. R. Popovic, N. Kapadia, V. Zivanovic [et al.] // *Neurorehabilitation and Neural Repair*. – 2011. – Vol. 25, № 5. – P. 433-442.
85. Functional Ultrasound Imaging of Spinal Cord Hemodynamic Responses to Epidural Electrical Stimulation: A Feasibility Study / P. Song, C. A. Cuellar, S. Tang [et al.] // *Frontiers in Neurology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 279.

86. GDNF Schwann cells in hydrogel scaffolds promote regional axon regeneration, remyelination and functional improvement after spinal cord transection in rats / B. K. Chen, N. N. Madigan, J. S. Hakim [et al.] // *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. – 2018. – Vol. 12, № 1. – P. e398-e407.
87. Geoffroy, C. G. Myelin-associated inhibitors in axonal growth after CNS injury / C. G. Geoffroy, B. Zheng // *Current Opinion in Neurobiology*. – 2014. – Vol. 27. – P. 31-38.
88. Grillner, S. Central pattern generators for locomotion, with special reference to vertebrates / S. Grillner, P. Wallén // *Annual Review of Neuroscience*. – 1985. – Vol. 8. – P. 233-261.
89. Grillner, S. On the central generation of locomotion in the low spinal cat / S. Grillner, P. Zangger // *Experimental Brain Research*. – 1979. – Vol. 34, № 2. – P. 241-261.
90. Günter, C. Safety of long-term electrical peripheral nerve stimulation: review of the state of the art / C. Günter, J. Delbeke, M. Ortiz-Catalan // *Journal of Neuroengineering and Rehabilitation*. – 2019. – Vol. 16, № 1. – P. 13.
91. Hains, B. C. Activated microglia contribute to the maintenance of chronic pain after spinal cord injury / B. C. Hains, S. G. Waxman // *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. – 2006. – Vol. 26, № 16. – P. 4308-4317.
92. Harvey, L. A. Physiotherapy rehabilitation for people with spinal cord injuries / L. A. Harvey // *Journal of Physiotherapy*. – 2016. – Vol. 62, № 1. – P. 4-11.
93. Hindlimb stepping movements in complete spinal rats induced by epidural spinal cord stimulation / R. M. Ichiyama, Y. P. Gerasimenko, H. Zhong [et al.] // *Neuroscience Letters*. – 2005. – Vol. 383, № 3. – P. 339-344.
94. Holtz, A. Spinal cord injury / A. Holtz. – New York : Oxford University Press, 2010. – vi+319 p.
95. Human lumbar cord circuitries can be activated by extrinsic tonic input to generate locomotor-like activity / K. Minassian, I. Persy, F. Rattay [et al.] // *Human Movement Science*. – 2007. – Vol. 26, № 2. – P. 275-295.
96. Inflammation after spinal cord injury: a review of the critical timeline of signaling cues and cellular infiltration / D. J. Hellenbrand, C. M. Quinn, Z. J. Piper [et al.] // *Journal of Neuroinflammation*. – 2021. – Vol. 18, № 1. – P. 284.

97. Initiation and modulation of locomotor circuitry output with multisite transcutaneous electrical stimulation of the spinal cord in noninjured humans / Y. Gerasimenko, R. Gorodnichev, A. Puhov [et al.] // *Journal of Neurophysiology*. – 2015. – Vol. 113, № 3. – P. 834-842.
98. Initiation of locomotor activity in spinal cats by epidural stimulation of the spinal cord / Y. P. Gerasimenko, V. D. Avelev, O. A. Nikitin, I. A. Lavrov // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. – 2003. – Vol. 33, № 3. – P. 247-254.
99. Inman, D. M. Ascending sensory, but not other long-tract axons, regenerate into the connective tissue matrix that forms at the site of a spinal cord injury in mice / D. M. Inman, O. Steward // *The Journal of Comparative Neurology*. – 2003. – Vol. 462, № 4. – P. 431-449.
100. Ion channel blockers and spinal cord injury / W.-M. Liu, J.-Y. Wu, F.-C. Li, Q.-X. Chen // *Journal of Neuroscience Research*. – 2011. – Vol. 89, № 6. – P. 791-801.
101. Jean-Martin Charcot's medical instruments: Electrotherapeutic devices in La Leçon Clinique à la Salpêtrière / F. Brigo, A. Balasse, R. Nardone, O. Walusinski // *Journal of the History of the Neurosciences*. – 2021. – Vol. 30, № 1. – P. 94-101.
102. Jordan, L. M. Propriospinal neurons involved in the control of locomotion: potential targets for repair strategies? / L. M. Jordan, B. J. Schmidt // *Progress in Brain Research*. – 2002. – Vol. 137. – P. 125-139.
103. Katoh, H. Regeneration of Spinal Cord Connectivity Through Stem Cell Transplantation and Biomaterial Scaffolds / H. Katoh, K. Yokota, M. G. Fehlings // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2019. – Vol. 13. – P. 248.
104. Kiehn, O. Decoding the organization of spinal circuits that control locomotion / O. Kiehn // *Nature Reviews. Neuroscience*. – 2016. – Vol. 17, № 4. – P. 224-238.
105. Knikou, M. Repeated transspinal stimulation decreases soleus H-reflex excitability and restores spinal inhibition in human spinal cord injury / M. Knikou, L. M. Murray // *PloS One*. – 2019. – Vol. 14, № 9. – P. e0223135.
106. Kreis, P. Spinal Cord Stimulation: Percutaneous Implantation Techniques / P. Kreis, S. Fishman. – New York : Oxford University Press, 2009. – 166 p.

107. Lee, B.-J. Review: Steroid Use in Patients With Acute Spinal Cord Injury and Guideline Update / B.-J. Lee, J. H. Jeong // Korean Journal of Neurotrauma. – 2022. – Vol. 18, № 1. – P. 22-30.
108. Leonard, A. V. The relative contribution of edema and hemorrhage to raised intrathecal pressure after traumatic spinal cord injury / A. V. Leonard, E. Thornton, R. Vink // Journal of Neurotrauma. – 2015. – Vol. 32, № 6. – P. 397-402.
109. Lévêque, M. Histoire de la chirurgie de la douleur — la neuromodulation / M. Lévêque, P. Cornu // Chirurgie de la douleur: De la lésion à la neuromodulation / ed. M. Lévêque. – Paris : Springer, 2014. – P. 77-87.
110. Li, S. Na(+)-K(+)-ATPase inhibition and depolarization induce glutamate release via reverse Na(+)-dependent transport in spinal cord white matter / S. Li, P. K. Stys // Neuroscience. – 2001. – Vol. 107, № 4. – P. 675-683.
111. Lilienbaum, A. From calcium to NF-kappa B signaling pathways in neurons / A. Lilienbaum, A. Israël // Molecular and Cellular Biology. – 2003. – Vol. 23, № 8. – P. 2680-2698.
112. Lin, V. W. Spinal Cord Medicine: Principles and Practice / V. W. Lin. – New York : Demos, 2003. – 1071 p.
113. Locomotor-like leg movements evoked by rhythmic arm movements in humans / F. Sylos-Labini, Y. P. Ivanenko, M. J. Maclellan [et al.] // PloS One. – 2014. – Vol. 9, № 3. – P. e90775.
114. Looby, S. Spine trauma / S. Looby, A. Flanders // Radiologic Clinics of North America. – 2011. – Vol. 49, № 1. – P. 129-163.
115. Macdonald, A. J. R. A Brief Review of the History of Electrotherapy and Its Union with Acupuncture / A. J. R. Macdonald // Acupuncture in Medicine. – 1993. – Vol. 11, № 2. – P. 66-75.
116. Marquez-Chin, C. Functional electrical stimulation therapy for restoration of motor function after spinal cord injury and stroke: a review / C. Marquez-Chin, M. R. Popovic // Biomedical Engineering Online. – 2020. – Vol. 19, № 1. – P. 34.
117. Meaning of self-management from the perspective of individuals with traumatic spinal cord injury, their caregivers, and acute care and rehabilitation managers: an

- opportunity for improved care delivery / S. E. P. Munce, F. Webster, M. G. Fehlings [et al.] // BMC Neurology. – 2016. – Vol. 16. – P. 11.
118. Medicinal and injection therapies for mechanical neck disorders / P. Peloso, A. Gross, T. Haines [et al.] // The Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2007. – № 3. – P. CD000319.
119. Neuromodulation of lumbosacral spinal networks enables independent stepping after complete paraplegia / M. L. Gill, P. J. Grahn, J. S. Calvert [et al.] // Nature Medicine. – 2018. – Vol. 24, № 11. – P. 1677-1682.
120. Neuromuscular electrostimulation techniques: historical aspects and current possibilities in treatment of pain and muscle wasting / A. Heidland, G. Fazeli, A. Klassen [et al.] // Clinical Nephrology. – 2013. – Vol. 79 Suppl 1. – P. S12-23.
121. New Therapy for Spinal Cord Injury: Autologous Genetically-Enriched Leucoconcentrate Integrated with Epidural Electrical Stimulation / R. Islamov, F. Bashirov, A. Izmailov [et al.] // Cells. – 2022. – Vol. 11, № 1. – P. 144.
122. Newly regenerated axons via scaffolds promote sub-lesional reorganization and motor recovery with epidural electrical stimulation / A. M. Siddiqui, R. Islam, C. A. Cuellar [et al.] // NPJ Regenerative medicine. – 2021. – Vol. 6, № 1. – P. 66.
123. Operative treatment of 733 patients with acute thoracolumbar spinal injuries: comprehensive results from the second, prospective, Internet-based multicenter study of the Spine Study Group of the German Association of Trauma Surgery / M. Reinhold, C. Knop, R. Beisse [et al.] // European Spine Journal. – 2010. – Vol. 19, № 10. – P. 1657-1676.
124. Orr, M. B. Spinal Cord Injury Scarring and Inflammation: Therapies Targeting Glial and Inflammatory Responses / M. B. Orr, J. C. Gensel // Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics. – 2018. – Vol. 15, № 3. – P. 541-553.
125. Ottestad, E. History of Peripheral Nerve Stimulation-Update for the 21st Century / E. Ottestad, D. S. Orlovich // Pain Medicine. – 2020. – Vol. 21, № Suppl 1. – P. S3-S5.

126. Oyinbo, C. A. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade / C. A. Oyinbo // *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. – 2011. – Vol. 71, № 2. – P. 281-299.
127. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury / B. K. Kwon, W. Tetzlaff, J. N. Grauer [et al.] // *The Spine Journal: Official Journal of the North American Spine Society*. – 2004. – Vol. 4, № 4. – P. 451-464.
128. Peckham, P. H. Functional electrical stimulation for neuromuscular applications / P. H. Peckham, J. S. Knutson // *Annual Review of Biomedical Engineering*. – 2005. – Vol. 7. – P. 327-360.
129. Peripheral nerve stimulation: black, white and shades of grey / V. Harsh, P. Mishra, P. K. Gond, A. Kumar // *British Journal of Neurosurgery*. – 2019. – Vol. 33, № 3. – P. 332-336.
130. Peripheral Nerve Stimulation in Painful Conditions of the Upper Extremity-An Overview / V. Yaccarino, M. Y. Jin, A. Abd-Elseyed [et al.] // *Biomedicines*. – 2022. – Vol. 10, № 11. – P. 2776.
131. Personalized neuroprosthetics / D. Borton, S. Micera, J. del R. Millán, G. Courtine // *Science Translational Medicine*. – 2013. – Vol. 5, № 210. – P. 210rv2.
132. Pinter, M. M. Epidural electrical stimulation of posterior structures of the human lumbosacral cord: 3. Control Of spasticity / M. M. Pinter, F. Gerstenbrand, M. R. Dimitrijevic // *Spinal Cord*. – 2000. – Vol. 38, № 9. – P. 524-531.
133. Plasticity of spinal cord reflexes after a complete transection in adult rats: relationship to stepping ability / I. Lavrov, Y. P. Gerasimenko, R. M. Ichiyama [et al.] // *Journal of Neurophysiology*. – 2006. – Vol. 96, № 4. – Plasticity of spinal cord reflexes after a complete transection in adult rats. – P. 1699-1710.
134. Plasticity of the spinal neural circuitry after injury / V. R. Edgerton, N. J. K. Tillakaratne, A. J. Bigbee [et al.] // *Annual Review of Neuroscience*. – 2004. – Vol. 27. – P. 145-167.
135. Pronounced species divergence in corticospinal tract reorganization and functional recovery after lateralized spinal cord injury favors primates / L. Friedli, E. S. Rosenzweig,

Q. Barraud [et al.] // *Science Translational Medicine*. – 2015. – Vol. 7, № 302. – P. 302ra134.

136. Quality of life, burden and satisfaction with care in caregivers of patients with a spinal cord injury during and after rehabilitation / A. P. M. Backx, A. I. F. Spooren, H. M. H. Bongers-Janssen, H. Bouwsema // *Spinal Cord*. – 2018. – Vol. 56, № 9. – P. 890-899.

137. Quantitative analysis of cellular inflammation after traumatic spinal cord injury: evidence for a multiphasic inflammatory response in the acute to chronic environment / K. D. Beck, H. X. Nguyen, M. D. Galvan [et al.] // *Brain: A Journal of Neurology*. – 2010. – Vol. 133, № Pt 2. – P. 433-447.

138. Quantitative magnetic resonance imaging characteristics: evaluation of prognostic value in the dog as a translational model for spinal cord injury / T. M. Boekhoff, C. Flieshardt, E.-M. Ensinger [et al.] // *Journal of Spinal Disorders & Techniques*. – 2012. – Vol. 25, № 3. – P. E81-87.

139. Ramer, L. M. Restoring function after spinal cord injury: towards clinical translation of experimental strategies / L. M. Ramer, M. S. Ramer, E. J. Bradbury // *The Lancet. Neurology*. – 2014. – Vol. 13, № 12. – P. 1241-1256.

140. Rater Agreement on the ISCSCI Motor and Sensory Scores Obtained Before and After Formal Training in Testing Technique / M. J. Mulcahey, J. Gaughan, R. R. Betz, L. C. Vogel // *The Journal of Spinal Cord Medicine*. – 2007. – Vol. 30, № 1. – P. S146-S149.

141. Recovery of Over-Ground Walking after Chronic Motor Complete Spinal Cord Injury / C. A. Angeli, M. Boakye, R. A. Morton [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. – 2018. – Vol. 379, № 13. – P. 1244-1250.

142. Reliability and applicability of a low-cost, camera-based gait evaluation method for clinical use / S. Spanos, A. Kanellopoulos, K. Petropoulakos [et al.] // *Expert Review of Medical Devices*. – 2023. – Vol. 20, № 1. – P. 63-70.

143. Restoration of Motor Functions in Spinal Rats by Electrical Stimulation of the Spinal Cord and Locomotor Training / N. V. Pavlova, I. N. Bogacheva, E. Yu. Bazhenova [et al.] // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. – 2020. – Vol. 50, № 5. – P. 599-606.

144. Review of Recent Advances in Peripheral Nerve Stimulation (PNS) / K. Chakravarthy, A. Nava, P. J. Christo, K. Williams // *Current Pain and Headache Reports*. – 2016. – Vol. 20, № 11. – P. 60.
145. Rossignol, S. Dynamic sensorimotor interactions in locomotion / S. Rossignol, R. Dubuc, J.-P. Gossard // *Physiological Reviews*. – 2006. – Vol. 86, № 1. – P. 89-154.
146. Shah, P. K. Spinal Epidural Stimulation Strategies: Clinical Implications of Locomotor Studies in Spinal Rats / P. K. Shah, I. Lavrov // *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*. – 2017. – Vol. 23, № 6. – P. 664-680.
147. Shapkov, I. T. Spinal locomotor generators in humans: problems in assessing effectiveness of stimulations / I. T. Shapkov, E. I. Shapkova // *Meditinskaya Tekhnika*. – 1998. – № 4. – P. 24-27.
148. Sheffler, L. R. Neuromuscular electrical stimulation in neurorehabilitation / L. R. Sheffler, J. Chae // *Muscle & Nerve*. – 2007. – Vol. 35, № 5. – P. 562-590.
149. Sherwood, A. M. Evidence of subclinical brain influence in clinically complete spinal cord injury: incomplete SCI / A. M. Sherwood, M. R. Dimitrijevic, W. B. McKay // *Journal of the Neurological Sciences*. – 1992. – Vol. 110, № 1-2. – P. 90-98.
150. Shiao, R. Neuropathic Pain After Spinal Cord Injury: Challenges and Research Perspectives / R. Shiao, C. A. Lee-Kubli // *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. – 2018. – Vol. 15, № 3. – P. 635-653.
151. Short-term peripheral nerve stimulation ameliorates axonal dysfunction after spinal cord injury / M. Lee, M. C. Kiernan, V. G. Macefield [et al.] // *Journal of Neurophysiology*. – 2015. – Vol. 113, № 9. – P. 3209-3218.
152. Sivaramakrishnan, A. Comparison of transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) and functional electrical stimulation (FES) for spasticity in spinal cord injury - A pilot randomized cross-over trial / A. Sivaramakrishnan, J. M. Solomon, N. Manikandan // *The Journal of Spinal Cord Medicine*. – 2018. – Vol. 41, № 4. – P. 397-406.

153. Slavin, K. V. Technical aspects of peripheral nerve stimulation: hardware and complications / K. V. Slavin // *Progress in Neurological Surgery*. – 2011. – Vol. 24. – P. 189-202.
154. Sparing of Descending Axons Rescues Interneuron Plasticity in the Lumbar Cord to Allow Adaptive Learning After Thoracic Spinal Cord Injury / C. N. Hansen, T. D. Faw, S. White [et al.] // *Frontiers in Neural Circuits*. – 2016. – Vol. 10. – P. 11.
155. Spinal Cord Injury: Animal Models, Imaging Tools and the Treatment Strategies / D. Cizkova, A.-N. Murgoci, V. Cubinkova [et al.] // *Neurochemical Research*. – 2020. – Vol. 45, № 1. – P. 134-143.
156. Spinal Cord Injury: Pathophysiology, Multimolecular Interactions, and Underlying Recovery Mechanisms / A. Anjum, M. D. Yazid, M. Fauzi Daud [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21, № 20. – Spinal Cord Injury. – P. 7533.
157. Stimulation and Repair of Peripheral Nerves Using Bioadhesive Graft-Antenna / A. Sliow, Z. Ma, G. Gargiulo [et al.] // *Advanced Science*. – 2019. – Vol. 6, № 11. – P. 1801212.
158. Strategies for Rapid Muscle Fatigue Reduction during FES Exercise in Individuals with Spinal Cord Injury: A Systematic Review / M. O. Ibitoye, N. A. Hamzaid, N. Hasnan [et al.] // *PloS One*. – 2016. – Vol. 11, № 2. – P. e0149024.
159. Subpopulations and functions of long C3-C5 propriospinal neurones / B. Alstermark, A. Lundberg, M. Pinter, S. Sasaki // *Brain Research*. – 1987. – Vol. 404, № 1-2. – P. 395-400.
160. Suprasegmentally induced motor unit activity in paralyzed muscles of patients with established spinal cord injury / M. R. Dimitrijevic, M. M. Dimitrijevic, J. Faganel, A. M. Sherwood // *Annals of Neurology*. – 1984. – Vol. 16, № 2. – P. 216-221.
161. Supraspinal and Afferent Signaling Facilitate Spinal Sensorimotor Network Excitability After Discomplete Spinal Cord Injury: A Case Report / A. Militskova, E. Mukhametova, E. Fatykhova [et al.] // *Frontiers in Neuroscience*. – 2020. – Vol. 14. – P. 552.

162. Tail Nerve Electrical Stimulation and Electro-Acupuncture Can Protect Spinal Motor Neurons and Alleviate Muscle Atrophy after Spinal Cord Transection in Rats / Y.-T. Zhang, H. Jin, J.-H. Wang [et al.] // *Neural Plasticity*. – 2017. – Vol. 2017. – P. 7351238.
163. Targeted neurotechnology restores walking in humans with spinal cord injury / F. B. Wagner, J.-B. Mignardot, C. G. Le Goff-Mignardot [et al.] // *Nature*. – 2018. – Vol. 563, № 7729. – P. 65-71.
164. Tator, C. H. Spinal cord stimulation: therapeutic benefits and movement generation after spinal cord injury / C. H. Tator, K. Minassian, V. K. Mushahwar // *Handbook of Clinical Neurology*. – 2012. – Vol. 109. – Spinal cord stimulation. – P. 283-296.
165. Tator, C. H. Update on the pathophysiology and pathology of acute spinal cord injury / C. H. Tator // *Brain Pathology*. – 1995. – Vol. 5, № 4. – P. 407-413.
166. Teasdale, E. Guidelines for cervical myelography: lumbar versus cervical puncture technique / E. Teasdale, P. Macpherson // *The British Journal of Radiology*. – 1984. – Vol. 57, № 682. – Guidelines for cervical myelography. – P. 789-793.
167. The effect of low-frequency TENS in the treatment of neuropathic pain in patients with spinal cord injury / E. C. Celik, B. Erhan, B. Gunduz, E. Lakse // *Spinal Cord*. – 2013. – Vol. 51, № 4. – P. 334-337.
168. The pig model of chronic paraplegia: a challenge for experimental studies in spinal cord injury / M. Zurita, C. Aguayo, C. Bonilla [et al.] // *Progress in Neurobiology*. – 2012. – Vol. 97, № 3. – P. 288-303.
169. The Role of Functional Neuroanatomy of the Lumbar Spinal Cord in Effect of Epidural Stimulation / C. A. Cuellar, A. A. Mendez, R. Islam [et al.] // *Frontiers in Neuroanatomy*. – 2017. – Vol. 11. – P. 82.
170. The role of propriospinal interneurons in recovery from spinal cord injury / J. R. Flynn, B. A. Graham, M. P. Galea, R. J. Callister // *Neuropharmacology*. – 2011. – Vol. 60, № 5. – P. 809-822.
171. The SCIRehab project: treatment time spent in SCI rehabilitation. Physical therapy treatment time during inpatient spinal cord injury rehabilitation / S. Taylor-Schroeder, J. LaBarbera, S. McDowell [et al.] // *The Journal of Spinal Cord Medicine*. – 2011. – Vol. 34, № 2. – P. 149-161.

172. The “torpedo” effect in medicine / G. Tsoucalas, M. Karamanou, M. Lymperi [et al.] // *International Maritime Health*. – 2014. – Vol. 65, № 2. – P. 65-67.
173. The Translesional Spinal Network and Its Reorganization after Spinal Cord Injury / P. Krupa, A. M. Siddiqui, P. J. Grahm [et al.] // *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*. – 2022. – Vol. 28, № 2. – P. 163-179.
174. Thompson, A. K. Operant conditioning of a spinal reflex can improve locomotion after spinal cord injury in humans / A. K. Thompson, F. R. Pomerantz, J. R. Wolpaw // *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. – 2013. – Vol. 33, № 6. – P. 2365-2375.
175. Totoiu, M. O. Spinal cord injury is accompanied by chronic progressive demyelination / M. O. Totoiu, H. S. Keirstead // *The Journal of Comparative Neurology*. – 2005. – Vol. 486, № 4. – P. 373-383.
176. Transcutaneous electrical spinal-cord stimulation in humans / Y. Gerasimenko, R. Gorodnichev, T. Moshonkina [et al.] // *Annals of physical and rehabilitation medicine*. – 2015. – Vol. 58, № 4. – P. 225-231.
177. Transcutaneous Spinal Cord Stimulation and Motor Rehabilitation in Spinal Cord Injury: A Systematic Review / A. Megía García, D. Serrano-Muñoz, J. Taylor [et al.] // *Neurorehabilitation and Neural Repair*. – 2020. – Vol. 34, № 1. – P. 3-12.
178. Translational Relevance of Swine Models of Spinal Cord Injury / D. T. Schomberg, G. S. Miranpuri, A. Chopra [et al.] // *Journal of Neurotrauma*. – 2017. – Vol. 34, № 3. – P. 541-551.
179. Traumatic spinal cord injury / C. S. Ahuja, J. R. Wilson, S. Nori [et al.] // *Nature Reviews. Disease Primers*. – 2017. – Vol. 3. – P. 17018.
180. Unique Spatiotemporal Neuromodulation of the Lumbosacral Circuitry Shapes Locomotor Success after Spinal Cord Injury / P. K. Shah, S. Sureddi, M. Alam [et al.] // *Journal of Neurotrauma*. – 2016. – Vol. 33, № 18. – P. 1709-1723.
181. Update on traumatic acute spinal cord injury. Part 1 / R. Galeiras Vázquez, M. E. Ferreiro Velasco, M. Mourelo Fariña [et al.] // *Medicina Intensiva*. – 2017. – Vol. 41, № 4. – P. 237-247.

182. Wall, P. D. Temporary abolition of pain in man / P. D. Wall, W. H. Sweet // *Science*. – 1967. – Vol. 155, № 3758. – P. 108-109.
183. Wiegert, J. S. Activity-dependent calcium signaling and ERK-MAP kinases in neurons: a link to structural plasticity of the nucleus and gene transcription regulation / J. S. Wiegert, H. Bading // *Cell Calcium*. – 2011. – Vol. 49, № 5. – P. 296-305.
184. Wirelessly powered, fully internal optogenetics for brain, spinal and peripheral circuits in mice / K. L. Montgomery, A. J. Yeh, J. S. Ho [et al.] // *Nature Methods*. – 2015. – Vol. 12, № 10. – P. 969-974.
185. Woller, S. A. Opioid administration following spinal cord injury: implications for pain and locomotor recovery / S. A. Woller, M. A. Hook // *Experimental Neurology*. – 2013. – Vol. 247. – P. 328-341.
186. Yamaguchi, T. Descending pathways eliciting forelimb stepping in the lateral funiculus: experimental studies with stimulation and lesion of the cervical cord in decerebrate cats / T. Yamaguchi // *Brain Research*. – 1986. – Vol. 379, № 1. – P. 125-136.
187. Yao, C. Revascularization After Traumatic Spinal Cord Injury / C. Yao, X. Cao, B. Yu // *Frontiers in Physiology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 631500.
188. Zehr, E. P. Regulation of arm and leg movement during human locomotion / E. P. Zehr, J. Duysens // *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*. – 2004. – Vol. 10, № 4. – P. 347-361.
189. Zhong, J. RAS and downstream RAF-MEK and PI3K-AKT signaling in neuronal development, function and dysfunction / J. Zhong // *Biological Chemistry*. – 2016. – Vol. 397, № 3. – P. 215-222.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

Рисунок 1– Дизайн эксперимента: на первом этапе исследования свиньям устанавливали электроды на грудном (Th5) и поясничном (L2) уровнях и обучали ходьбе на беговой дорожке; на втором этапе моделировали контузионную травму спинного мозга в нижнегрудном отделе (Th8-Th9); третий этап исследования начинали через 2 недели после разрешения спинального шока. В течение 6 недель животным проводили через сутки транстравматическую эпидуральную электростимуляцию на уровне Th5 в утренний сеанс и в вечерний сеанс ЭЭС на уровне L2. Эффективность восстановления локомоторного аппарата оценивали с помощью поведенческих тестов, электрофизиологических и гистологических методов исследования.....	43
Рисунок 2 – Анализ кинематики суставов. Объем движений задних конечностей оценивали по изменениям угловых градусов в тазобедренном (А), коленном (Б) и голеностопном (В) суставах задних конечностей свиней во время ходьбы на беговой дорожке.....	52
Таблица 1 – Расшифровка баллов шкалы поведения свиньи при травме грудного отдела спинного мозга (PTIBS).....	53
Рисунок 3 – Схематическое изображение исследованных областей серого вещества спинного мозга свиньи на поперечных гистологических срезах (А), приготовленных из роstralного и каудального сегментов относительно эпицентра нейротравмы (Б)	55
Таблица 2 – Первичные(*) и вторичные(**) антитела, использованные для иммунофлуоресцентного исследования.....	58
Рисунок 4 – Результат сравнительного анализа поведенческого теста по 10-бальной шкале PTIBS (Porcine Thoracic Injury Behavioral Scale) животных из контрольной и опытной групп через 2, 4, 6, 8 недель после моделирования спинальной травмы	61
Рисунок 5 – Анализ кинематики тазобедренного сустава у свиней во время тренировки на беговой дорожке до травмы спинного мозга (до TCM), у	

- контрольных свиней после ТСМ (контрольная группа) и у свиней из опытной группы без эпидуральной стимуляции во время тренировки на беговой дорожке (опытная группа) и во время стимуляции на уровне L2 (опытная группа во время ЭЭС). * – статистически значимые различия, $p < 0,05$ 63
- Рисунок 6 – Анализ кинематики коленного сустава у свиней во время тренировки на беговой дорожке до травмы спинного мозга (до ТСМ), у контрольных свиней после ТСМ (контрольная группа) и у свиней из опытной группы без эпидуральной стимуляции во время тренировки на беговой дорожке (опытная группа) и во время эпидуральной стимуляции на уровне L2 (опытная группа во время ЭЭС). * – статистически значимые различия, $p < 0,05$; ** – статистически значимые различия, $p < 0,01$ 64
- Рисунок 7 – Анализ кинематики голеностопного сустава у свиней во время тренировки на беговой дорожке до травмы спинного мозга (до ТСМ), у контрольных свиней после ТСМ (контрольная группа) и у свиней из опытной группы без эпидуральной стимуляции во время тренировки на беговой дорожке (опытная группа) и во время эпидуральной стимуляции на уровне L2 (опытная группа во время ЭЭС). * – статистически значимые различия, $p < 0,05$ 65
- Рисунок 8– Видеоанализ кинематики суставов на 8 неделе после спинальной травмы у животных из контрольной группы (А) и у животных из опытной группы во время ЭЭС на уровне L2 (Б)..... 66
- Рисунок 9 – Кривые моторных вызванных потенциалов (МВП) камбаловидной мышцы, вызванные ЭЭС при различных силах тока на уровне Th5: А) МВП до травмы спинного мозга, Б) МВП через 2 недели после травмы спинного мозга. S-стимул 68
- Рисунок 10 – Кривые моторных вызванных потенциалов (МВП) камбаловидной мышцы свиньи, вызванные ЭЭС на уровне L2: А) МВП до травмы спинного мозга при различных силах тока, Б) МВП через 2 недели после травмы спинного мозга. S-стимул 68
- Рисунок 11 – Примеры кривых М-ответа и Н-рефлекса камбаловидной мышцы свиньи при стимуляции седалищного нерва: А) до моделирования спинальной

травмы, Б) через 8 недель после травмы спинного мозга в контрольной группе, В) через 8 недель после травмы спинного мозга в опытной группе. S-стимул.....	70
Рисунок 12 – Сравнительные гистограммы амплитуд М-ответа (А) и Н-рефлекса (Б), длительностей М-ответа (В) и Н-рефлекса (Г) камбаловидной мышцы свиньи при стимуляции седалищного нерва до травмы спинного мозга и через 8 недель после операции.....	71
Рисунок 13 – Поперечный срез спинного мозга на уровне эпицентра через 8 недель после моделирования контузионной травмы; окраска гематоксилином и эозином	72
Рисунок 14 – Поперечные срезы спинного мозга, окрашенные гематоксилином и эозином, интактной свиньи (А), контрольного животного через 8 недель после ТСМ (Б) и опытного животного через 8 недель после ТСМ (В). Г – Результаты морфометрического анализа относительной площади сохранности серого вещества спинного мозга экспериментальных животных в ростральном (РС) и каудальном (КС) сегментах относительно эпицентра нейротравмы.....	73
Рисунок 15 – Экспрессия белка теплового шока Hsp27 (зеленое свечение) в задних рогах спинного мозга интактной свиньи (А), контрольного животного (Б) и опытного животного (В). Результаты морфометрического анализа Hsp27-позитивной площади в передних (Г) и задних (Д) рогах спинного мозга экспериментальных животных в ростральном (РС) и каудальном (КС) сегментах относительно эпицентра нейротравмы. Примечание: ядра клеток докрашены DAPI (синее свечение); * – статистически значимые различия, $p < 0,05$; ** – статистически значимые различия, $p < 0,01$	75
Рисунок 16 – Экспрессия проапоптозного белка Caspase3 (красное свечение) в задних рогах спинного мозга контрольного (А) и опытного животного (Б). Результаты морфометрического анализа количества Caspase3-позитивных клеток в передних (В) и задних (Г) рогах спинного мозга экспериментальных животных в ростральном (РС) и каудальном (КС) сегментах относительно эпицентра нейротравмы. Примечание: ядра клеток докрашены DAPI (синее свечение); ** – статистически значимые различия, $p < 0,01$	77

Таблица 3 – Результаты иммунофлуоресцентного анализа экспрессии молекул клеточного стресса и апоптоза в спинном мозге	78
Рисунок 17 – Экспрессия глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) (красное свечение) в задних рогах спинного мозга интактной свиньи (А), контрольного животного через 8 недель после ТСМ (Б) и опытного животного через 8 недель после ТСМ в условиях транстравматической эпидуральной электростимуляции (В). Результаты морфометрического анализа GFAP-позитивной площади в передних (Г) и задних (Д) рогах спинного мозга экспериментальных животных в ростральном (РС) и каудальном (КС) сегментах относительно эпицентра нейротравмы. Примечание: ядра клеток докрашены DAPI (синее свечение); * – статистически значимые различия, $p < 0,05$; ** – статистически значимые различия, $p < 0,01$	80
Рисунок 18 – Экспрессия ионизированной кальций-связывающей адаптерной молекулы Iba1 (красное свечение) в задних рогах спинного мозга интактной свиньи (А), контрольного животного (Б) и опытного животного (В). Результаты морфометрического анализа количества Iba-позитивных клеток в передних (Г) и задних (Д) рогах спинного мозга экспериментальных животных в ростральном (РС) и каудальном (КС) сегментах относительно эпицентра нейротравмы. Примечание: ядра клеток докрашены DAPI (синее свечение); * – статистически значимые различия, $p < 0,05$; ** – статистически значимые различия, $p < 0,01$	82
Рисунок 19 – Экспрессия фактора транскрипции олигодендроцитов Olig2 (красное свечение) в задних рогах спинного мозга интактной свиньи (А), контрольного животного (Б) и опытного животного (В). Результаты морфометрического анализа количества Olig2-позитивных клеток в передних (Г) и задних (Д) рогах спинного мозга экспериментальных животных в ростральном (РС) и каудальном (КС) сегментах относительно эпицентра нейротравмы. Примечание: ядра клеток докрашены DAPI (синее свечение); * – статистически значимые различия, $p < 0,05$; ** – статистически значимые различия, $p < 0,01$	84
Таблица 4 – Результаты иммунофлуоресцентного анализа реакции клеток нейроглии спинного мозга.....	85

Рисунок 20 – Поперечные срезы камбаловидной мышцы (*m. soleus*), окрашенные гематоксилином и эозином, интактной свиньи (А), контрольного животного (Б) и опытного животного (В). Результаты анализа массы камбаловидных мышц (Г), Результаты морфометрического анализа средней площади поперечного сечения мышечных волокон (Д). Примечание: * – статистически значимые различия, $p < 0,05$ 87

Рисунок 21 – Иммунофлуоресцентное окрашивание с помощью антител к тяжелым цепям медленного миозина (зеленое свечение) камбаловидной мышцы (*m. soleus*) интактной свиньи (А), контрольного (Б) и опытного животного (В). Результаты морфометрического анализа относительного содержания медленных мышечных волокон (Г). Примечание: ядра клеток докрашены DAPI (синее свечение); ** – статистически значимые различия, $p < 0,01$ 88