

УДК 617.546-001-085.214.2:577.115:57.084

## НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ДОКОЗАГЕКСАЕНОВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ КОМПРЕССИОННОЙ СПИНАЛЬНОЙ ТРАВМЫ

О.С. Огурцова<sup>1,2</sup>, И.В. Манжуло<sup>1,2</sup>, Н.А. Латышев<sup>1</sup>, С.П. Касьянов<sup>1</sup>, И.В. Дюйзен<sup>1,2</sup><sup>1</sup> Тихоокеанский государственный медицинский университет (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2),<sup>2</sup> Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17)**Ключевые слова:** полиненасыщенные жирные кислоты, нейропротективное действие, крысы, эксперимент.

### NEUROPROTECTIVE ACTION OF DOCOSAHEXAENOIC ACID IN THE SIMULATION OF COMPRESSION SPINAL CORD INJURY

O.S. Ogurtsova, I.V. Manzhulo, N.A. Latyshev, S.P. Kasyanov, I.V. Dyuzhen

*Pacific State Medical University (2 Ostryakova Ave. Vladivostok 690950 Russian Federation), Institute of Marine Biology named after A. V. Zhirmunskiy FEB RAS (17 Palchevskogo St. Vladivostok 690041 Russian Federation)***Background.** One of the promising neuroprotective agents are drugs of polyunsaturated fatty acids, including docosahexaenoic acid (DHA) which has a proven ability to be metabolized into compounds that regulate inflammation and restore structural and metabolic integrity of nerve tissue after injury.**Methods.** Using male rats with the weight of about 250 g the researchers simulated spinal cord injury and then visually monitored the locomotor activity according to vegetative function restorability scale (VVV scale). Part of the test animals have been injected DHA emulsion (subdermally in a dose of 45 mg/kg) for 3 weeks. After 5 weeks the scholars took the animals out of the experience and performed a morphological study of the spinal cord.**Results.** Hind limb locomotor activity after taking DHA recovered significantly better. Restoration of vegetative functions was observed at the average on the ninth day after injury. Morphological state of post-traumatic defect zone and adjacent areas indicated that the recovery of functions in the animals treated with DHA could be defined by the drug ability to modulate post-traumatic degenerative and regenerative processes.**Conclusions.** The experimental results indicate that the use of DHA contributes to the development of a number of metabolic and cellular processes that lead to better recovery of motor function in the animals with spinal cord injury.**Keywords:** polyunsaturated fatty acids, neuroprotective action, rats, experiment.

Pacific Medical Journal, 2014, No. 2, p. 64–69.

Травма центральной нервной системы стоит на третьем месте в мире среди причин инвалидизации трудоспособного населения, что определяет высокую социальную значимость данной патологии. Медицинский аспект актуальности данной проблемы определяется весьма ограниченным числом препаратов, способных оказывать лечебное воздействие в острый посттравматический период и на этапах реабилитации. Поэтому в крупнейших лабораториях мира активно ведутся поиск и разработка лекарственных средств, обладающих нейропротективными свойствами. Травма спинного мозга приводит к гибели нейронов и глиальных клеток, а также к разрушению восходящих и нисходящих спинномозговых трактов, сопровождаясь развитием не только моторного и вегетативного дефицита в нижних

сегментах спинного мозга, но и возникновением болевых феноменов [6, 14]. Морфологическую и нейрохимическую основу данных процессов составляют базовые патофизиологические механизмы – воспаление, некроз, апоптоз, эксайтотоксичность и окислительный стресс. Эти механизмы усиливают действие первичной травмы и формируют комплекс взаимосвязанных и взаимообуславливающих, растянутых во времени процессов, ведущих к необратимым изменениям в мозге. Комплексное воздействие на данные патологические механизмы может служить залогом успешной нейропротективной терапии.

Одним из перспективных средств для защиты нервной ткани от внешних и внутренних повреждений считаются препараты полиненасыщенных жирных кислот. Недавними исследованиями показано, что их действие на нервную ткань опосредуется влиянием на синтез, метаболизм, везикулярный транспорт и рецепторные эффекты нейротрансмиттеров, нейромодуляторов и ряда сигнальных молекул. Полиненасыщенные жирные кислоты могут непосредственно или косвенно модулировать неврологическую активность за счет ее «классических» противовоспалительных свойств, реализуемых в периферических тканях и дистальных отделах нервной системы [7]. Одним из наиболее перспективных соединений из этой группы является докозагексаеновая кислота (ДГК), обладающая способностью метаболизироваться в мозге в высокоэффективные соединения (нейропротектины), действие которых связано не только с регуляцией воспалительного процесса, но и с восстановлением структурной и метаболической целостности нервной ткани после повреждения [5]. В экспериментах показано, что ДГК оказывает нейропротекторное действие при хронических дегенерационных процессах [2, 9], однако ее значение при острых травматических повреждениях мозга нуждается в детальном изучении.

**Материал и методы.** Работа выполнена на 16 самцах крыс средним весом 250 г, содержащихся в стандартных условиях вивария. Исследование проходило в соответствии с Правилами проведения работ и использования экспериментальных животных (Приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.), дизайн исследования одобрен этическим комитетом Института биологии моря ДВО РАН. Крыс содержали в виварии в соответствии с «Санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-

биологических клиник» (от 06.04.1993 г.). Животные получали стандартную диету (корм для лабораторных мышей и крыс ЗАО «БиоПро») следующего состава: протеин (21,5 %), клетчатка (4 %), метионин и цистеин (0,8 %), кальций (1 %), фосфор (0,4 %), хлористый натрий (0,35 %); калорийность не менее 13,2 МДж/кг.

Для повреждения спинного мозга (с сохранением целостности мозговых оболочек) использовалась модель травмы путем кратковременной (20 с) механической компрессии спинного мозга (Th<sub>12</sub>–L<sub>1</sub>) тонким пинцетом с гладкими браншами и фиксированным разъемом 1 мм [10]. Животные были разделены на две группы: «травма» и «ДГК». Последняя включала крыс, ежедневно после травмы получавших подкожно эмульсию докозагексаеновой кислоты в дозе 45 мг/кг в течение 3 недель. Препарат докозагексаеновой кислоты (99 %), полученный по оригинальной методике, был предоставлен сотрудниками лаборатории фармакологии Института биологии моря ДВО РАН.

Для изучения восстановления локомоторных функций после повреждения использовались физиологические методы исследования – визуальный мониторинг двигательной активности и вегетативных функций. Диагностика параметров двигательной активности проводилась с использованием патентованной шкалы BBB (Basso, Beattie, Bresnahan, locomotor rating scale), включающей набор из 21 критерия качественной и количественной оценки движений в задних конечностях животных [4].

Изъятие материала для последующего гистологического исследования осуществляли спустя пять недель после операции. Для этого животных анестезировали путем внутрибрюшинного введения тиопентала натрия (3 %, 60 мг/кг), затем перфузировали 4 % раствором параформальдегида, приготовленным на 0,1М фосфатном буфере (pH 7,2). Для оценки пролиферативной активности нейрональных и глиальных элементов на парафиновых срезах спинного мозга толщиной 10 мкм методом иммунопероксидазной реакции определяли наличие маркера пролиферации – Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA; Abcam ab29, США, 1:2000). Использованный в работе иммуногистохимический метод состоял из следующих этапов: фиксация кусочков ткани (4 % параформальдегид на 0,1М фосфатном буфере, pH 7,2) в течение 12 часов и их последующая промывка; прединкубация в растворах, блокирующих эндогенную пероксидазную активность и неспецифическое связывание антител; обработка срезов в растворе первичных антител (4°C, 24 часа); обработка вторичными антителами и постановка иммунопероксидазной реакции. Вторичные антитела, меченые пероксидазой хрена (PI-2000 (anti-mouse), США, 1:100), были получены от Vector Laboratories и использовались в соответствии с инструкциями фирмы-производителя. Для проведения иммунопероксидазной реакции применяли хромоген (Thermo scientific, DAB Plus, TL-060-QHD, США).

Затем срезы тщательно отмывали 0,1М фосфатным буфером (pH 7,2), обезжизивали и заключали в бальзам по стандартной методике.

Для общеморфологического анализа тканей срезы спинного мозга толщиной 10 мкм после парафиновой проводки окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике. Все препараты просматривали в световом микроскопе AxioScope A1 (Carl Zeiss, Германия) и фотографировали при помощи цифровой камеры AxioCam ICc3 (Carl Zeiss, Германия). Морфометрическую обработку полученных снимков проводили при помощи метода случайного отбора полей зрения, описанного Г.Г. Автандиловым [1].

Полученные данные обрабатывали методами вариационной статистики с использованием пакета программ Graph Pad Prizm 4.0. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента.

**Результаты исследования.** Первые признаки восстановления локомоторной активности задних конечностей в обеих группах регистрировались к концу 1-й недели после повреждения спинного мозга. К концу срока наблюдения в группе «травма» оценка по шкале BBB составила  $3,1 \pm 0,5$  балла, что соответствовало активным движениям в двух суставах. Этот показатель был ниже, чем в группе «ДГК», где он составил в среднем  $6,5 \pm 0,5$  балла (рис. 1). В этой группе через пять недель после операции мы наблюдали крыс, способных удерживать собственный вес во время ходьбы с опорой на подошвы. У животных обеих групп восстановление вегетативных функций наблюдалось в среднем на 9-е сутки после операции.

К 5-й неделе после травмы область посттравматического некроза спинного мозга крыс обеих групп была представлена одиночной или множественными кистами. Полости кист в большей или меньшей степени заполняла новообразованная ткань, окруженная глиомезодермальной капсулой. Морфологический состав и особенности расположения клеточных элементов в рубцовой ткани у животных экспериментальных групп

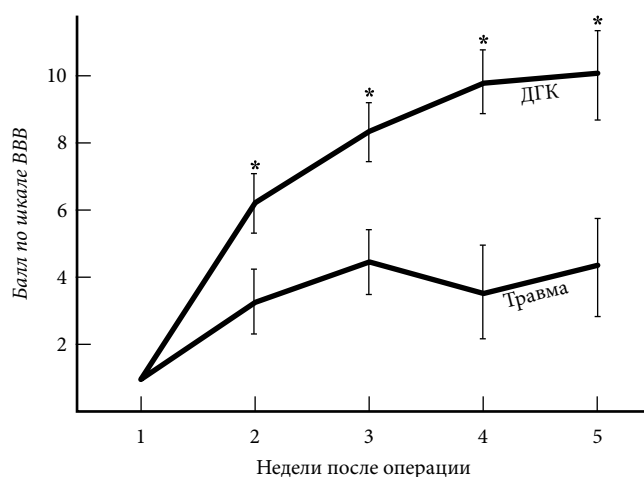


Рис. 1. Локомоторная активность крыс после травмы в динамике (\* Достоверные различия с группой «травма» в сходных точках наблюдения).

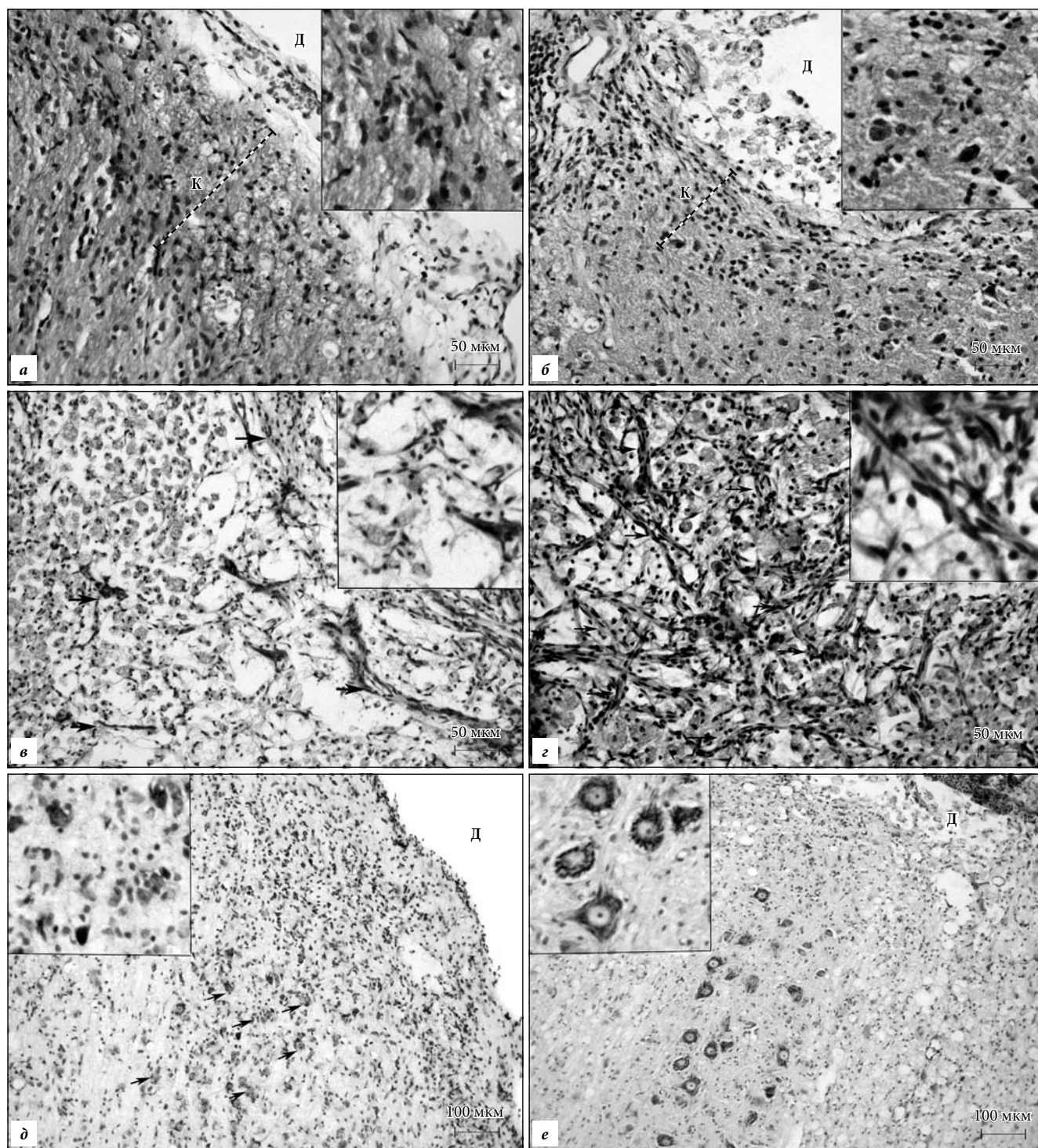


Рис. 2. Состояние тканей спинного мозга при компрессионной травме (а, в, д) и терапии ДГК (б, г, е):

а, б – строение и толщина капсулы (К) посттравматических кист; в – у животных группы «травма» область тканевого дефекта (Д) заполнена многочисленными макрофагами, среди которых располагаются единичные кровеносные сосуды (стрелка, вклейка); г – у животных группы «ДГК» большая часть тканевого дефекта заполнена сетью новообразованных капилляров (стрелки, вклейка), среди которых располагаются макрофаги; д – скопление глиоцитов и формирование нейрофагических узелков (стрелки, вклейка) на месте дегенерировавших мотонейронов у животных группы «травма»; е – мотонейроны спинного мозга животных группы «ДГК» с признаками морфологической сохранности. Окр. гематоксилином и эозином (а–г) и толуидиновым синим (д, е).

различалась. В срезах спинного мозга крыс группы «травма» область тканевого дефекта была окружена плотной многослойной демаркационной зоной, в состав которой входили глиоциты, фибробласты и большое количество соединительнотканых волокон

(рис. 2, а). В стенке рубца, в прилежащей нервной ткани, а также в полости кист регистрировалось большое количество макрофагов, в т.ч. гемосидерофагов, что указывало на продолжающийся воспалительный процесс. Полости кист заполняли, преимущественно,

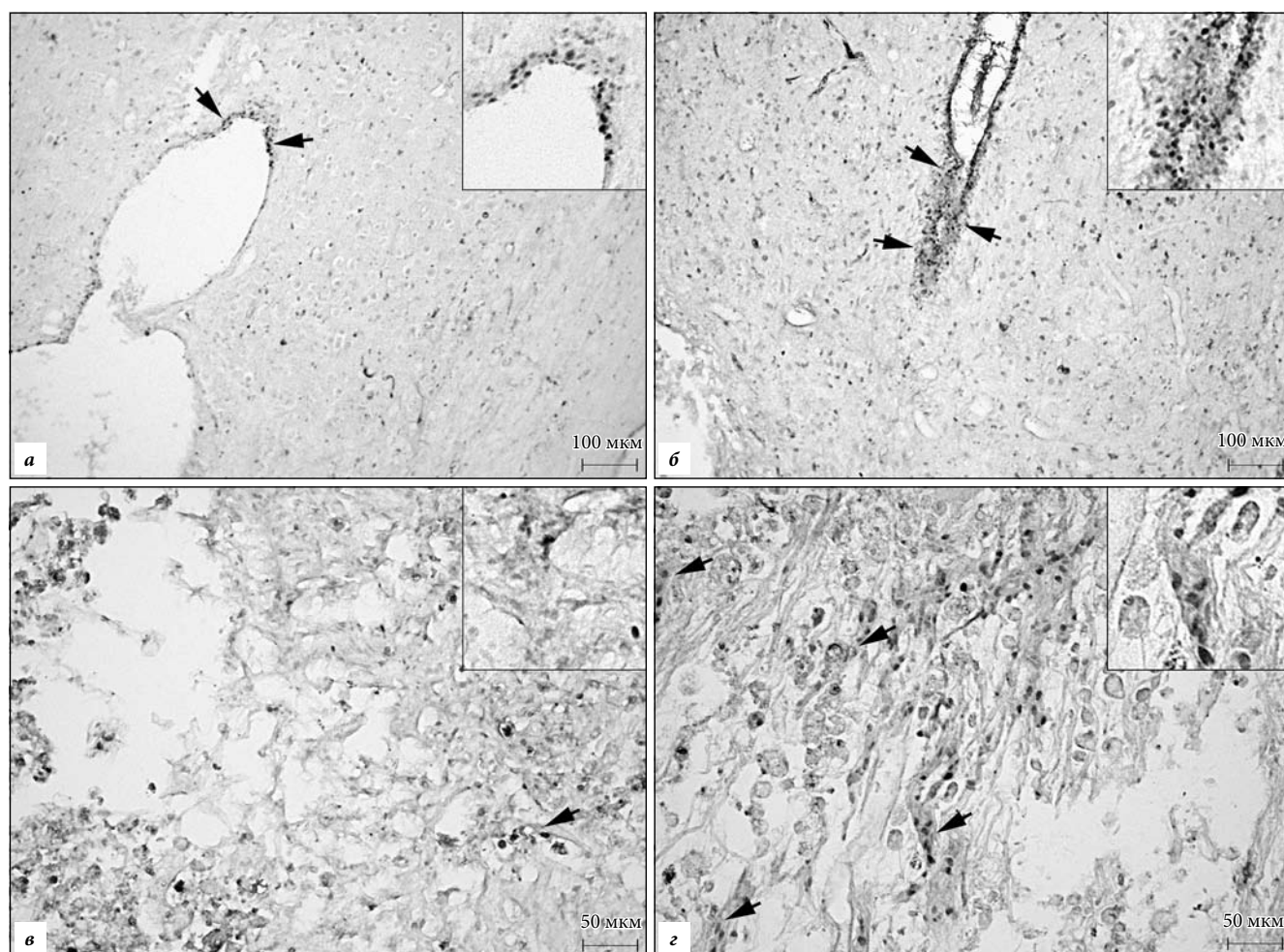


Рис. 3. Распределение PCNA-позитивных элементов (стрелки) в спинном мозге животных с компрессионной травмой (а, в) и после терапии ДГК (б, г):

а, б – локализация PCNA в ткани мозга, окружающей посттравматический дефект, и в эндимиоцитах спинномозгового канала (стрелки, вклейки); в, г – PCNA-позитивные элементы в составе новообразованных капилляров, заполняющих пространство посттравматической кисты.

макрофаги, фибробласты и небольшое число новообразованных кровеносных сосудов (рис. 2, в).

В тканях спинного мозга и глиомезодермальном рубце у крыс группы «ДГК» макрофагов было значительно меньше, и они концентрировались, преимущественно, в просветах посттравматических полостей. Тонкая демаркационная зона была представлена рыхлой соединительной тканью, прослойки которой внедрялись в глубину послеоперационной кисты на 100–150 мкм, где, объединяясь друг с другом, формировали многочисленные септы (рис. 2, б). В составе стенки капсулы, а также в ткани, заполнявшей место дефекта, наблюдалось значительное число новообразованных капилляров, зачастую, формировавших густую сеть (рис. 2, г).

Заметные отличия регистрировались и в прилежащих к рубцу участках сохраненной нервной ткани. В спинном мозге животных, получавших ДГК, признаки морфологической сохранности демонстрировали нейроны, расположенные в непосредственной близости от зоны дефекта (рис. 2, е). В этот же период у животных группы «травма» на расстоянии

100–200 мкм от рубца сохраненных нейронов практически не обнаруживалось. На месте дегенерировавших или находящихся в процессе деструкции нервных клеток располагались многочисленные глиальные (нейрофагические) узелки (рис. 2, д).

Течение посттравматического процесса характеризовалось выраженной пролиферативной активностью нейрональных и глиальных элементов как в ростральном, так и в каудальном сегментах спинного мозга. Детальное исследование маркера пролиферации PCNA показало, что активность пролиферативного процесса, а также организующие его клеточные элементы в тканях животных разных экспериментальных групп заметно различались. Так, на 5-й неделе послеоперационного периода выраженность пролиферации в каудальном сегменте спинного мозга была достоверно выше, чем в ростральном. При этом более активно восстановительный процесс протекает в участках, отстоявших от дефекта на 750–1000 мкм, а не в зонах, непосредственно прилежавших к капсуле кисты. Основными клеточными элементами, ядра которых содержали PCNA, были глиоциты серого и белого

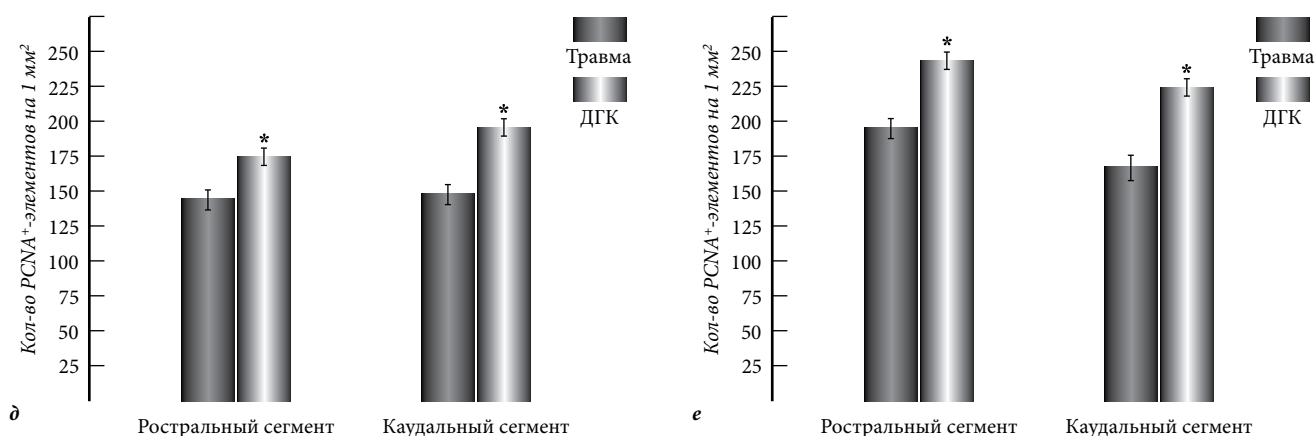


Рис. 4. Сравнительная оценка пролиферативной активности:

число PCNA-позитивных элементов в ростральном и каудальном сегментах спинного мозга крыс при компрессионной травме и терапии ДГК; а – участки, непосредственно прилежащие посттравматическому дефекту, б – участки, расположенные на 750–1000 мкм от зоны рубца (\* Достоверные различия с группой «травма»).

вещества, а также эпендимные клетки центрального канала (рис. 3, а, б). В целом, подсчет PCNA-позитивных элементов в нервной ткани, окружавшей травматический дефект, демонстрировал, что у животных, получавших ДГК, процесс пролиферации протекал более активно, чем у животных без фармакологической поддержки (рис. 4, а, б). Кроме того, большое число PCNA-позитивных клеток обнаруживалось в стенках новообразованных капилляров, пронизывающих толщу рубца (рис. 3, в, г).

**Обсуждение полученных данных.** Результаты эксперимента свидетельствуют о том, что использование докозагексаеновой кислоты способствует развитию ряда метаболических и клеточных событий, приводящих к более успешному восстановлению двигательных функций у животных с поврежденным спинным мозгом. Анализ локомоторной активности показывает, что у животных группы «ДГК» формировалось не только более раннее (2-я неделя), но и более полное восстановление функций нижних конечностей. Результаты настоящего исследования во многом согласуются с данными, полученными V.R. King et al. (2006) на другой модели центральной нейротравмы [9].

Морфологическое состояние зоны посттравматического дефекта и прилежащих участков нервной ткани указывало на то, что наблюдавшееся восстановление функций у животных, получавших докозагексаеновую кислоту, могло определяться способностью препарата модулировать посттравматические дегенеративные и регенераторные процессы. Известно, что ранняя (первые 2 недели) пролиферативная активность в области травматического дефекта направлена на формирование капсулы, защищающей интактную нервную ткань от разрушительных последствий травмы. В отсроченный период (5–6 недель), когда снижается выраженность воспалительных и некротических процессов, эффективность пролиферации обеспечивает восстановление структурной (и/или функциональной)

целостности поврежденного участка мозга. Основными источниками новообразованных клеток являются оболочки мозга, эпендимоциты и подлежащие участки нервной ткани, а также эндотелиоциты и фибробласты, формирующие микроциркуляторное русло в области тканевой репарации [6].

Глубину неврологического дефицита у больных со спинальными травмами определяет не только высота и степень повреждения спинного мозга, но и особенности течения восстановительного процесса. При этом характер образующейся на месте тканевого дефекта капсулы, особенность тканевого состава посттравматического дефекта и характер его ревакуляризации являются условиями, определяющими быстроту и эффективность роста аксонов к участкам каудального сегмента мозга [6]. Морфологический анализ тканей экспериментальных животных позволяет сделать некоторые предположения относительно механизмов реализации восстановительного эффекта докозагексаеновой кислоты. Во-первых, препарат обеспечивает ограничение зоны мозгового дефекта за счет формирования тонкой рыхлой капсулы, в составе которой фиброзный компонент представлен в минимальном объеме. Данный эффект, очевидно, является следствием противовоспалительного действия докозагексаеновой кислоты, механизмы которого довольно полно описаны в литературе и связаны с уменьшением продукции медиаторов воспаления и снижением выраженности оксидативного стресса [12]. Снижение интенсивности и длительности воспаления и вторичной воспалительной дегенерации тканей способствует более раннему запуску репаративных событий с привлечением минимальных клеточных и фибриллярных ресурсов. Кроме того, в ряде экспериментов показано, что докозагексаеновая кислота способна ингибировать активацию астроцитов – основных элементов глиомезодермального рубца, формирующих препятствие росту регенерирующих аксонов [3].

Во-вторых, под действием докозагексаеновой кислоты усиливается образование новых кровеносных сосудов в зоне посттравматического дефекта, что может обеспечивать восстановление объема утраченной в результате повреждения ткани и организацию направленного роста аксонов по ходу кровеносных сосудов [15].

В третьих, докозагексаеновая кислота активирует пролиферативные процессы в участках относительно интактной нервной ткани. Локализация PCNA-позитивных ядер в составе серого и белого вещества мозга, а также их размерные характеристики позволяют предполагать, что в составе популяции пролиферирующих клеток большая доля принадлежит олигодендроцитам. Данные клетки являются наиболее уязвимыми при развитии т.н. второй волны апоптоза, пик которой приходится на 3–4-ю недели посттравматического периода [14]. В настоящее время активно обсуждается способность полиненасыщенных жирных кислот напрямую модулировать транскрипционные процессы через активацию ретиноидных рецепторов [8, 11], что является особенно актуальным для восстановления клеточных компонентов центральной нервной системы, характеризующихся довольно низким регенераторным потенциалом. Восстановление миелиновой оболочки центральных аксонов может считаться поэтому дополнительным нейропротективным ресурсом докозагексаеновой кислоты в условиях повреждения центральной нервной системы.

В четвертых, препарат демонстрирует прямое протективное действие в отношении нейронов, расположенных в непосредственной близости от зоны дефекта. Защита нейронов от токсических, воспалительных и ишемических воздействий, как установлено в последние годы, является результатом действия основных метаболитов докозагексаеновой кислоты в нервной ткани – нейропротектинов [13].

В целом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что докозагексаеновая кислота обладает комплексным влиянием на течение посттравматического процесса в центральной нервной системе, что свидетельствует о ее высоком терапевтическом потенциале. Многие механизмы реализации нейропротективного и регенераторного действия докозагексаеновой кислоты нуждаются в дополнительных детальных исследованиях, способных обеспечить его внедрение в клиническую практику для лечения посттравматической патологии центральной нервной системы.

*Работа выполнена при финансовой поддержке грантов Дальневосточного отделения РАН № 12-III-A-06-090, № 12-I-П7-02, № 14-III-B-06-123 и № 14-III-B-06-124.*

#### Литература

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия: руководство. М.: Медицина, 1990. 384 с.
2. Манжуло И.В., Дюйзен И.В., Огурцова О.С. [и др.] Дозозависимый антиболевого эффект докозагексаеновой кислоты при экспериментальной периферической нейропатии // Тихоокеанский медицинский журнал. 2013. № 2. С. 28–30.

3. Манжуло И.В. Нейро-глиальные взаимодействия в механизмах развития боли и лекарственного обезболивания у крыс: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Владивосток, 2013. 23 с.
4. Basso D.M., Beattie M.S., Bresnahan J.C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats // J. Neurotrauma. 1995. Vol. 12. P. 1–21.
5. Bazan N.G. Omega-3 fatty acids, pro-inflammatory signaling and neuroprotection // Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care. 2007. Vol. 10. P. 136–141.
6. Bradbury E.J., Carter L.M. Manipulating the glial scar: Chondroitinase ABC as a therapy for spinal cord injury // Brain Res. Bull. 2011. Vol. 84. P. 306–316.
7. Farooqui A.A., Horrocks L.A., Farooqui T. Modulation of inflammation in brain: a matter of fat // J. Neurochem. 2007. Vol. 101. P. 577–599.
8. Jump D.B. Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription // Curr. Opin. Lipidol. 2002. Vol. 13. P. 155–164.
9. King V.R., Huang W. Omega-3 fatty acids improve recovery, whereas omega-6 fatty acids worsen outcome, after spinal cord injury in the adult rat // J. Neurosci. 2006. Vol. 26. P. 4672–4680.
10. Marquesa S.A., Garcez V.F., Del Bel E.A. [et al.] A simple, inexpensive and easily reproducible model of spinal cord injury in mice: Morphological and functional assessment // J. Neurosci. Meth. 2009. Vol. 177. P. 183–193.
11. Melanie J.S., Derek W.G. Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution // Prog. Lipid Res. 2011. Vol. 50. P. 35–51.
12. Sarsilmaz M., Songur A., Ozyurt H. [et al.] Potential role of dietary omega-3 essential fatty acids on some oxidant/antioxidant parameters in rats corpus striatum // Prostagland. Leukot. Essent. Fatty Acids. 2003. Vol. 69. P. 253–259.
13. Serhan C.N., Gotlinger K., Hong S. [et al.] Anti-inflammatory actions of neuroprotectin D1/protectin D1 and its natural stereoisomers: assignments of dihydroxy-containing docosatrienes // J. Immunol. 2006. Vol. 176. P. 1848–1859.
14. Totoiu M.O., Keirstead H.S. Spinal cord injury is accompanied by chronic progressive demyelination // J. Comp. Neurol. 2005. Vol. 486. P. 373–383.
15. Vestweber D. Endothelial cell contacts in inflammation and angiogenesis // International Congress Series. 2007. Vol. 1302. P. 17–25.

*Поступила в редакцию 09.04.2014.*

#### Нейропротекторное действие докозагексаеновой кислоты при моделировании компрессионной спинальной травмы

О.С. Огурцова<sup>1,2</sup>, И.В. Манжуло<sup>1,2</sup>, Н.А. Латышев<sup>1</sup>, С.П. Касьянов<sup>1</sup>, И.В. Дюйзен<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Тихоокеанский государственный медицинский университет (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2), <sup>2</sup> Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17)

**Резюме.** Введение докозагексаеновой кислоты крысам с компрессионной спинальной травмой ускоряло восстановление их локомоторной активности. Выявленный эффект связан с реализацией нейропротекторного действия исследуемого препарата за счет оптимизации воспалительного процесса, улучшения качественного состава рубца и усиления пролиферативной активности в тканях, его окружающих. Результаты эксперимента свидетельствуют о том, что использование докозагексаеновой кислоты способствует развитию ряда метаболических и клеточных событий, приводящих к более успешному восстановлению двигательных функций у животных с поврежденным спинным мозгом.

**Ключевые слова:** полиненасыщенные жирные кислоты, нейропротективное действие, крысы, эксперимент.