

На правах рукописи

МАНЖУЛО  
ОЛЬГА СЕРГЕЕВНА

**НЕЙРО- И ГЛИОТРОПНАЯ АКТИВНОСТЬ ДОКОЗАГЕКСАЕНОВОЙ  
КИСЛОТЫ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ КОМПРЕССИОННОЙ ТРАВМЫ  
СПИННОГО МОЗГА У КРЫС**

1.5.22. Клеточная биология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Владивосток – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки  
«Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского»  
Дальневосточного отделения Российской академии наук

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН Дюйзен Инесса Валерьевна

**Официальные оппоненты:**

**Степаничев Михаил Юрьевич**, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук, ведущий научный сотрудник лаборатории функциональной биохимии нервной системы

**Калиниченко Сергей Георгиевич**, доктор медицинских наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины»

Защита диссертации состоится 12 октября 2021 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 005.008.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук по адресу: 690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, д. 17.

Телефон: 7 (423) 2310905, факс: 7 (423) 2310900. e-mail: inmarbio@mail.primorye.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук:  
<http://www.wimb.dvo.ru/misc/dissertations/index.php/sovet-d-005-008-01/55-manzhulo-olga-sergeevna>

Отзывы просим присылать на e-mail: mvaschenko@mail.ru

Автореферат разослан «    » 2021 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

*Ващенко*

М.А. Ващенко

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Ежегодно во всем мире 250–500 тысяч человек страдает от повреждений спинного мозга различной этиологии, что определяет высокую социальную значимость данного патологического состояния (Evaniew et al., 2015). Медицинский аспект актуальности данной проблемы определяется ограниченным числом препаратов, способных оказывать терапевтическую активность в острый и хронический посттравматический период. Травма спинного мозга (ТСМ) приводит к повреждению спинномозговых трактов и сопровождается двигательными и вегетативными нарушениями (Totoiu et al., 2005). Морфо-химическую основу данных событий определяет ряд патофизиологических процессов, таких как воспаление, эксайтотоксичность, некроз, апоптоз и оксидативный стресс.

При ТСМ локальная регуляция воспалительных и реконструктивных процессов в поврежденных тканях спинного мозга обеспечивается глиальными клетками – микро- и астроглиоцитами (Kandel and Squire, 2000). Одним из важнейших процессов, определяющих глубину посттравматического процесса, является развитие локального иммунного ответа, реализуемого специфической активностью микроглии/макрофагов. При ТСМ иммунный ответ разнонаправленный (Wynn et al., 2013; Ginhoux et al., 2014), он обеспечивается различной степенью активности микроглии/макрофагов типов M1 (провоспалительных) и M2 (антивоспалительных) на разных этапах патофизиологического процесса (Frangogiannis, 2008). Микроглия/макрофаги типа M1 обеспечивают цитотоксическую активность, благодаря высокому уровню секреции провоспалительных цитокинов и хемокинов. Напротив, микроглия/макрофаги типов M2 за счет эффективного фагоцитоза мертвых клеток, секреции антивоспалительных факторов и выраженной рецепторной экспрессией, участвует в уменьшении воспаления и способствует ремоделированию тканей (Zhang et al., 2013; Lim et al., 2017).

Астроциты играют важную роль в поддержании гомеостаза в центральной нервной системе (ЦНС): регулируют концентрацию ионов и обеспечивают метаболическую поддержку соседних нейронов; обеспечивают стабилизацию синапсов и поддержание целостности гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). В острый посттравматический период астроциты в области повреждения активно пролиферируют, претерпевая ряд морфологических изменений, секретируют большое количество белков и в комплексе с фибробластами становятся основным компонентом посттравматического глиального рубца (Fitch and Silver, 1997). Традиционно считается, что астроглиальный шрам, изначально формирующий демаркационную линию, в дальнейшем препятствует росту и регенерации

аксонов в поврежденном спинном мозге (Silver and Miller, 2004). Однако последние исследования показали, что отсутствие астроглиального рубца после травмы не приводит к усилению роста аксонов (Anderson, 2016; Liddelow and Barres, 2016). Реактивные астроциты в глиальном рубце экспрессируют различные нейротрофические факторы, цитокины и виментин (Ridet et al., 1997; Teshigawara et al., 2013; Shigyo et al., 2016), а также демонстрируют адаптивную пластичность и способны восстанавливать внеклеточную ионную среду (Syková et al., 1992). Астроглиальный шрам играет важную роль в восстановлении ГЭБ, способствуя образованию новых гемокapилляров, снижая миграцию клеток крови и диффузию воспалительных агентов в системный кровоток, тем самым уменьшая повреждающее действие травмы (Herrmann et al., 2008). Таким образом, результаты современных исследований корректируют догму об ингибирующем влиянии глиального шрама на регенерацию аксонов, и указывают на то, что некоторые компоненты астроглиального шрама могут способствовать формированию условий для скорейшего восстановления гомеостаза и микроциркуляции в очаге травмы, и, в конечном счете, – прорастанию нервных волокон.

Одним из перспективных соединений для терапии повреждений центральной и периферической нервной системы являются препараты на основе полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), противовоспалительные, антиоксидантные и мембраностабилизирующие свойства которых исследованы на большом числе соматических заболеваний (Paterniti et al., 2014). Результаты детальных исследований действия ПНЖК в патологии нервной системы позволяют предполагать наличие у препаратов особых тканеспецифических механизмов действия, реализуемых в уникальной среде нервной ткани (Bazan et al., 2006).

Среди ПНЖК наибольший интерес представляет докозагексаеновая кислота (ДГК). Считается, что терапевтическое действие ДГК опосредовано не только влиянием на физико-химические свойства клеточных мембран, но и участием в синтезе и метаболизме широкого спектра нейротрансмиттеров, нейромедиаторов и сигнальных молекул (Fargoqui, 2007). ДГК и ее производные демонстрируют выраженную противовоспалительную и нейропротекторную активность в различных экспериментальных моделях, и является перспективным соединением для предотвращения острой нейродегенерации, поскольку способна одновременно модулировать несколько сигнальных путей, способствующих разрешению патологического процесса после ТСМ (Bazan et al., 2006; De Smedt-Peyrusse et al., 2008; López-Vales et al., 2010). Также, ДГК принимает активное участие в регуляции  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  ионных каналов (Vreugdenhil et al., 1996). Эكсайтотоксичность, возникающая в результате чрезмерного высвобождения глутамата из поврежденных нейронов является

важнейшим патофизиологическим фактором ТСМ, поэтому регулирование ионных каналов может служить эффективным средством снижения гипервозбудимости участков нервной ткани в области травмы (Satkunendrarajah and Fehlings, 2013).

**Степень разработанности темы.** На сегодняшний день, механизмы патофизиологического процесса развивающегося после повреждения спинного мозга по-прежнему являются предметом многочисленных исследований в ведущих научных центрах в России и за рубежом (Almad et al., 2011; Witiw et al., 2015; Okadaa et al., 2018). В этой связи, детальное изучение особенностей астро- и микроглиальной активности при ТСМ позволит по-новому взглянуть на патогенез повреждения центральной нервной системы и наметить пути направленного поиска новых биологически активных препаратов с нейро- и глиотропной активностью. Патофизиологическое значение некроза, воспаления, оксидативного стресса и системных иммунных реакций при ТСМ определяет ведущую роль противовоспалительных препаратов в терапии травмы нервной системы. В настоящее время одним из основных подходов в терапии ТСМ является применение гормональных противовоспалительных средств. Глюкокортикоидные гормоны, обладая мощным противовоспалительным, антиоксидантным, антипролиферативным и сопутствующим метаболическим и нейропротективным действием, до настоящего времени остаются средствами неотложной помощи при спинальных травмах (Pan et al., 2002). Однако, угроза развития сопутствующих инфекционных осложнений, а также негативное влияние на активность регенеративных и репаративных процессов в поврежденных тканях, не позволяет рассматривать данные препараты для длительной терапии посттравматических состояний (Okutan et al., 2007) и определяет необходимость разработки новых терапевтических стратегий в лечении ТСМ. Учитывая длительный, многоступенчатый характер развития патофизиологических процессов в очаге травматического повреждения, комплексное влияние ТСМ на основные функциональные системы организма, оправданным является разработка препарата с широким спектром биологической активности, включающим как противовоспалительные, так и прорегенераторные эффекты.

Перспективными в этом отношении представляются соединения липидной природы, полученные из морских гидробионтов, в частности ДГК. Метаболизм ДГК в мозге приводит к образованию высокоактивных соединений (резолвины и нейропротектины), действие которых связано не только с регуляцией воспалительного процесса, но и с восстановлением структурной и метаболической целостности нервной ткани после повреждения (Bazan, 2005). Несмотря на большой интерес исследователей к высокому нейротропному потенциалу ДГК, данные о влиянии препарата на морфо-химические аспекты функционирования астро- и

микроглии в условиях нейротравмы имеют, зачастую, фрагментарный и противоречивый характер и нуждаются в дополнительном более детальном исследовании.

**Цель и задачи исследования.** Цель настоящей работы – выявление механизмов противовоспалительного и нейропротекторного действия докозагексаеновой кислоты при моделировании компрессионной травмы спинного мозга.

Задачи исследования:

1. Провести визуальное и инструментальное тестирование параметров двигательной активности и вегетативных функций у животных с моделью компрессионной травмы спинного мозга и терапией докозагексаеновой кислотой.
2. Охарактеризовать морфологическое состояние зоны посттравматического рубца и прилежащих к нему сегментов спинного мозга после повреждения.
3. Оценить выраженность процесса демиелинизации и восстановления нервных волокон после травмы спинного мозга.
4. С помощью иммуногистохимических методов изучить динамику активности про- и противовоспалительной микроглии/макрофагов при компрессионной травме спинного мозга.
5. Провести картирование астроглии и виментина в центральном, ростральном и каудальном сегментах спинного мозга в разные сроки после повреждения.
6. Обосновать нейротропные и глиотропные механизмы реализации противовоспалительного и нейропротекторного действия докозагексаеновой кислоты после повреждения спинного мозга.

**Научная новизна.** В настоящем исследовании впервые дана комплексная характеристика нейро- и глиотропной активности ДГК, способствующей заметному улучшению двигательных функций у животных с компрессионной травмой спинного мозга. Впервые установлено, что нейропротективное действие ДГК реализуется за счет активации процессов ремиелинизации, пролиферации, а также восстановления нервных волокон. При терапии повреждения спинного мозга ДГК увеличивает активность астроцитов с синхронным усилением экспрессии виментина, что приводит к ускорению васкуляризации посттравматического рубца и восстановлению нервных волокон в области повреждения. В настоящем исследовании впервые дана обширная характеристика динамики активности общего пула и отдельных фенотипов микроглии/макрофагов на этапах острого и хронического воспаления при компрессионной травме спинного мозга. Показано, что ДГК ингибирует микроглию/макрофаги провоспалительного типа (M1) с одновременным увеличением активности противовоспалительного типа (M2) макрофагов. Комплексное и длительное влияние ДГК на процессы воспаления, пролиферации и репарации является

решающим фактором в восстановлении нервных волокон и двигательной активности животных.

**Теоретическая и практическая значимость.** Данное исследование расширяет представление о роли глиальных клеток в механизмах развития травмы спинного мозга. Выявленные в работе топографические и динамические особенности морфологии и активности астро- и микроглии спинного мозга в острый посттравматический период и на этапах реабилитации формируют вектор для направленного поиска новых биологически активных соединений с комплексным влиянием на нервную ткань. Результаты анализа локомоторной активности экспериментальных животных и характеристика клеточных механизмов реализации нейропротекторного действия ДГК формирует теоретические предпосылки для использования данного препарата в терапии компрессионной травмы спинного мозга.

**Методология и методы диссертационного исследования.** В настоящем исследовании использован комплекс современных экспериментальных подходов, включающих применение экспериментально-физиологических, общеморфологических, иммуногистохимических и биохимических методов исследования. Компрессионная травма спинного мозга была выполнена на уровне Т9 позвонка, в течение одной минуты проводилась экстрадуральная компрессия вокруг открытого спинного мозга с помощью сосудистого зажима (с силой 50 г, Оскар, Китай) что вызвало острое компрессионное повреждение (Marquesa et al., 2009). Восстановление двигательной активности после повреждения спинного мозга оценивали с помощью тестирования локомоторной активности в открытом поле с использованием оценочной шкалы Basso-Beattie-Bresnahan (Basso et al., 1995). Проводили иммуногистохимическое выявление широкого спектра нейрональных (MBP, TH) и глиальных (PCNA, GFAP, Vimentin, Iba-1, CD86, CD163) маркеров. Полученные препараты фотографировали на микроскопе (Axio Image Z2, Carl Zeiss, Германия), оборудованном CCD-камерой (AxioCam HRc, Carl Zeiss, Германия). Анализ данных реализован с помощью программного обеспечения ImageJ (НИН, США) и с использованием пакета программ GraphPad Prism 4.00. Для выявления белка виментина и антиоксидантного фермента использованы первичные культуры микро- и астроглиальных клеток, после обработки ДГК применяли иммуноферментный анализ и определение уровня активности супероксиддисмутазы.

**Личный вклад** автора заключается в подготовке и реализации всех этапов экспериментальных работ и статистическом анализе полученных данных, а также в подготовке иллюстраций и выступлении с докладами на конференциях и написании научных публикаций. Автором выполнено моделирование компрессионной травмы спинного мозга,

физиологическое тестирование двигательной активности животных после операции, реализованы все этапы гистологических и иммуногистохимических методов исследования.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Введение ДГК животным с компрессионной травмой спинного мозга способствует более полному восстановлению локомоторной активности животных.
2. Применение ДГК после повреждения спинного мозга индуцирует процессы пролиферации и ремиелинизации, а также обеспечивает восстановление аксонов на всех этапах патофизиологического процесса.
3. Компрессионная травма спинного мозга сопровождается выраженным воспалительным процессом, использование ДГК приводит к снижению активности микроглии/макрофагов провоспалительного типа M1 с синхронным усилением активности макрофагов противовоспалительного типа M2.
4. Астроцитоз, индуцированный введением ДГК, обеспечивает ускоренную изоляцию травмированного участка спинного мозга от окружающих тканей, способствуя более быстрой васкуляризации и реиннервации.

**Степень достоверности результатов.** Достоверность результатов основывается на использовании современных методов исследования, достаточном объеме выборки, корректном анализе полученных данных и использовании современных методов статистического анализа, а также публикации результатов работы в рецензируемых зарубежных научных журналах. Материалы, представленные в диссертационной работе, находятся в полном соответствии с первичной документацией – протоколами исследований. Использование достаточного объема выборок позволило проанализировать полученные данные и оценить достоверность полученных результатов. Специфичность иммуногистохимического и иммуноцитохимического окрашивания подтверждалось использованием негативного контроля в каждой группе экспериментов. Результаты, научные положения и выводы базируются на экспериментальных данных, приведенных в виде рисунков, фотографий и таблиц.

**Апробация работы и публикации.** Полученные результаты были представлены на XIV Всероссийской молодежной школе-конференции по актуальным проблемам химии и биологии, МЭС ТИБОХ (Владивосток, Россия, 2012); на IX Дальневосточном медицинском конгрессе «Человек и лекарство» (Владивосток, Россия, 2012); на Международной конференции ASCB/EMBO (Сан Диего, США, 2018); на IV Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, Россия, 2019) и ежегодной научной конференции Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (Владивосток, Россия, 2017-2018).

По теме диссертации опубликовано 7 работ, включая 3 статьи в журналах, входящих в список, рекомендованный ВАК, из которых две статьи опубликовано в изданиях, входящих в Scopus/Web of Science.

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа состоит из введения, основных глав: «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», а также выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 137 страницах, иллюстрирована 22 рисунками и 2 таблицами. Список литературы содержит 289 наименований, из них 283 на английском языке.

**Финансовая поддержка работы.** Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 17-74-20006.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Характеристика экспериментальной модели.** В работе использовали самок крыс линии Вистар ( $240 \pm 20$  г, возраст 2 месяца,  $n=42$ ). Крыс содержали по 7 особей в одной клетке со свободным доступом к пище и воде, при постоянной температуре ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) и влажности ( $55 \pm 15\%$ ) с 12-часовым циклом день/ночь. Все процедуры были одобрены Комитетом по этике работы с животными при Национальном научном центре морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН в соответствии с рекомендациями по защите животных. Для проведения операции животных анестезировали раствором Золетила 100 (Virbac) и Рометара (Bioveta) в соотношении 1:4, соответственно. Кожа была разрезана вдоль средней линии спины, затем были рассечены паравертебральные мышцы грудных позвонков (T8-T10). Ламинэктомия была выполнена на уровне T9 позвонка, в течение одной минуты проводилась экстрадуральная компрессия вокруг открытого спинного мозга с помощью сосудистого зажима (с силой 50 г, Оскар, Китай), что вызвало острое компрессионное повреждение (Marquesa et al., 2009). Животные в ложнооперированной группе подвергались хирургическому вмешательству, идентичному описанному, но без травмы спинного мозга. Мышцы и кожа сшивались послойно, затем наносили антибактериальный спрей. Крысам помогали в выделении мочи два раза в день до восстановления функции мочевого пузыря.

В исследовании использовали три группы животных: группа «ЛЮ» ( $n=14$ ) – ложнооперированные животные; группа «Травма» ( $n=14$ ) – животные с компрессионной травмой спинного мозга; и группа «Травма+ДГК» ( $n=14$ ) – животные с компрессионной травмой спинного мозга и терапией ДГК. Очищенный препарат докозагексаеновой кислоты в форме этилового эфира, был предоставлен для исследования сотрудниками лаборатории фармакологии ННЦМБ ДВО РАН. Эмульсию для введения готовили непосредственно перед использованием путем смешивания ДГК с 0.9% физиологическим раствором (1:2).

Животным вводили подкожно эмульсию ДГК в дозе 45 мг/кг (общий объем 150 мкл) ежедневно в течение 3 недель после ТСМ. Крысам в группах «ЛО» и «Травма» подкожно вводили 0.9% физиологический раствор ежедневно в течение 3 недель после операции.

**Исследование двигательной активности.** Восстановление двигательной активности после компрессионной травмы спинного мозга оценивали с помощью тестирования локомоторной активности в открытом поле с использованием оценочной шкалы Basso-Beattie-Bresnahan (BBB), которая основана на 21-балльной шкале, специально разработанной для крыс с повреждениями спинного мозга (Basso et al., 1995). Каждое животное тестировали в открытом поле в течение 5 мин один раз в неделю вплоть до 5 недели после травмы. У ложноперированных животных оценка локомоторной активности составляет максимальный 21 балл.

**Гистологические и иммуногистохимические методы исследования.** Для характеристики острого и хронического посттравматических периодов сбор материала осуществляли на 7 и 35 сут после операции. Крыс анестезировали передозировкой Золетила 100 (Virbac) и Рометара (Bioveta) в соотношении 1:4, и транскардиально перфузировали 20 мл ледяного физиологического раствора (+4 °C), а затем 20 мл холодного фиксатора (4% параформальдегид в 0.1 М фосфатном буфере, pH 7.2). Поясничный сегмент спинного мозга немедленно удаляли и фиксировали в течение 6 ч при 4 °C в свежем забуференном 4% параформальдегиде. Отмывку от фиксатора производили 0.1 М фосфатным буфером (pH 7.2) 3 раза с интервалом в 3-4 ч. Для общеморфологического анализа использовали продольные парафиновые срезы спинного мозга толщиной 10 мкм, залитые в парафин по стандартной методике (Роскин и Левинсон, 1957). После депарафинирования срезы окрашивали гематоксилином 15 мин (BioOptica, Италия), промывали проточной водой, затем последовательно погружали в раствор эозина и три порции спиртов, просветляли ксилолом в течение 10 мин и заключали в монтажную среду без толуола Dako (Dako, CS705, США).

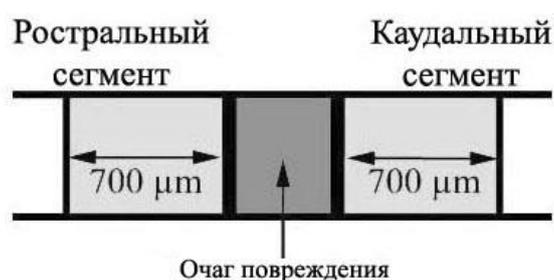
Для иммуногистохимического исследования срезы депарафинировали и инкубировали в 3% перекиси водорода в течение 10 мин. После трех промывок в фосфатном буфере (pH 7.2, 0.1 М) срезы инкубировали в блокирующем буфере, содержащем 2% раствор бычьего сывороточного альбумина (Santa Cruz, SC-2323, США) и 0.25% Triton X-100 (Gerbu, США) в течение 60 мин при комнатной температуре. Срезы инкубировали в течение 24 ч при +4 °C с первичными антителами, представленными в таблице 1. Для контроля иммуногистохимической реакции использовали отрицательный контроль без использования первичных антител. Соответствующие вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (PI-1000, против кролика; PI-2000, против мыши), использовали в соответствии с инструкциями производителя (Vector Laboratories, США, 1:100). Срезы

инкубировали в растворе вторичных антител в течение 45 мин при комнатной температуре. После промывки срезы обрабатывали в течение 5-10 мин хромогеном (Thermo Scientific, DAB Plus (TL-060-QHD); Vector Labs, Nova RED substrate kit (SK4800), США) для выявления реакции иммунопероксидазы. Срезы промывали PBS, обезвоживали и помещали в монтажную среду без толуола (Dako, CS705, США). Изображения получали с разрешением 2776×2080 с помощью сухого объектива 20×NA 0.45 (Plan-Apochromat, Carl Zeiss, Германия) на микроскопе (Axio Image Z2, Carl Zeiss, Германия), оборудованном CCD-камерой (AxioCam HRc, Carl Zeiss, Германия).

**Таблица 1** – Характеристика первичных антител

Маркер	Антитела	Производитель	Рабочее разведение
Основной белок миелина	ОБМ	Thermo Scientific (RB-1460-A), США	1:500
Катехоламинергические аксоны	ТН	Vector Laboratories (Т 489), США	1:100
Пролиферация и репарация клеток	PCNA	Abcam (ab29), США	1:2000
Микроглия/макрофаги	Iba-1	Abcam (ab108539), США	1:300
Провоспалительная М1-микроглия/макрофаги	CD86	Abcam (ab53004), США	1:2000
Антивоспалительные М2-макрофаги	CD163	Abcam (ab182422), США	1:500
Астроглия	GFAP	Vector Laboratories (G 805), США	1:200
Белок виментин	Vimentin	Abcam (ab92547), США	1:1000

**Количественная обработка данных.** Для анализа использовали не менее 70 изображений исследуемых маркеров для каждой группы животных. Изображения были проанализированы в трех областях: центр травмы ( $\pm 250$  мкм от центра повреждения), ростральный сегмент 700 мкм и каудальный сегмент 700 мкм от центра травмы (рис. 1).



**Рисунок 1** – Сегменты, используемые для подсчета активности исследуемых маркеров.

Количество PCNA-позитивных элементов определяли в каждом десятом срезе спинного мозга с помощью программного обеспечения ImageJ (НИН, США). Оценку площади иммуногистохимического окрашивания основного белка миелина, виментина, ТН-позитивных катехоламинергических нервных волокон, GFAP-позитивных астроцитов, Iba-1-, CD86- и CD163-позитивной микроглии/макрофагов в ростральном, центральном и каудальном сегменте спинного мозга рассчитывали в каждом десятом срезе спинного мозга с

использованием программного обеспечения ImageJ (НИН, США). Обработка каждой микрофотографии включала следующие этапы: преобразование в черно-белую версию (8-битное изображение); вычитание фона; бинаризация. Для измерения площади окрашивания исследуемого маркера выбирали область интереса, затем рассчитывали процент окрашенной области относительно общей площади.

**Культура клеток.** Первичную культуру микроглии и астроцитов получали от 1-2 дневных щенков крыс в соответствии с протоколом (Schildge et al., 2013). Клетки содержали в DMEM/F12 (Gibco, США) с 10% фетальной бычьей сывороткой (ФБС) (Gibco, США) и пенициллином-стрептомицином (Gibco, США) во флаконе T75 и выращивали с 5% CO<sub>2</sub> в инкубаторе при 37 °С. Для пассирования клеток использовали 0.05% трипсин-ЭДТА (Gibco, США) в течение 5 минут. Для анализа супероксиддисмутазы (СОД) и проведения иммуноферментного анализа (ИФА) клетки высевали в 24-луночные планшеты при концентрации 10000/см<sup>2</sup> клеток в 800 мкл среды. Культивируемую микроглию и астроциты крыс обрабатывали раствором носителя или 1 мкМ ДГК в течение 2 сут в среде DMEM/F12 (1:1), содержащей 10% ФБС. После обработки клетки микро- и астроглии инкубировали в буфере для лизиса (рН 7.5, 140 мМ NaCl, 50 мМ Трис-НСl, 1% NP-40, 10 мМ ЭДТА, 20 мМ NaF, 20 мМ β-глицерофосфата, 1 мМ PMSF, 1 мМ DTT, 1 мМ ванадата натрия и коктейль из ингибиторов протеазы; Roche). Концентрацию общего белка в пробах определяли с использованием набора BCA (Pierce, Rockford, IL). Поглощение при 450 нм измеряли с помощью спектрофотометра iMark Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad). Общую активность СОД анализировали в супернатантах с использованием коммерческого набора (19160, Sigma Aldrich, США) и рассчитывали, как Ед/мг белка. Калибровочную кривую строили с использованием СОД (S9697, Sigma Aldrich, США). Концентрацию белка виментина в культуре клеток микро- и астроглии определяли количественно с использованием ИФА набора для виментина в соответствии с протоколом производителя (ЕКС39874, Biomatik, США). *In vitro* эксперименты проводили независимо минимум три раза.

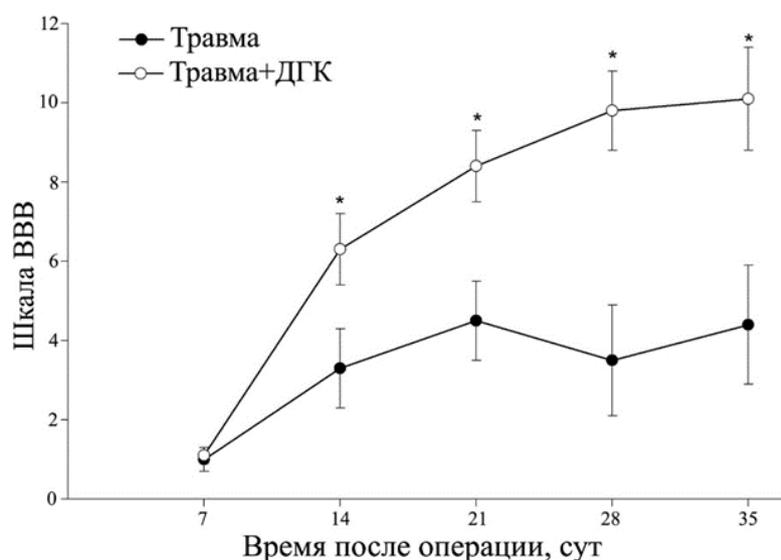
**Статистическая обработка данных.** Данные полученные при иммуногистохимическом исследовании, после проверки нормальности распределения, подвергались статистическому анализу с использованием однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA), с последующим анализом Тьюки. Данные, полученные при физиологическом тестировании животных и в биохимических методах исследования, сравнивали с использованием теста Манна-Уитни. Данные представлены как среднее значение±SEM, а  $p < 0.05$  принято как статистически значимое. Все статистические тесты выполнены с использованием пакета программ GraphPad Prism 4.00.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе проведено исследование нейро- и глиотропной активности докозагексаеновой кислоты при моделировании компрессионной травмы спинного мозга. Полученные результаты свидетельствуют, что использование ДГК способствует развитию ряда метаболических и клеточных событий, приводящих к более успешному восстановлению двигательных функций задних конечностей животных при повреждении поясничного сегмента спинного мозга. Улучшение показателей локомоторной активности осуществляется путем модуляции микроглиальной, астроглиальной, пролиферативной и антиоксидантной активности препарата ДГК, а также за счет усиления экспрессии виментина, запуска процессов ремиелинизации и восстановления катехоламинергических нервных волокон.

### Восстановление двигательной активности крыс с компрессионной травмой спинного мозга и терапией ДГК

В нашем исследовании первые признаки проявления двигательной активности задних конечностей после травмы спинного мозга и терапии ДГК регистрировались уже на 7 сут после операции. Постепенное восстановление локомоторной активности наблюдалось в течение 5 недель после операции в обеих экспериментальных группах. Анализ локомоторной активности показывает, что у животных группы «Травма+ДГК» формируется не только более раннее (через 2 недели), но и более полное восстановление функций нижних конечностей (рис. 2) (Manzhulo et al., 2018).



**Рисунок 2** – Двигательная активность животных с компрессионной травмой спинного мозга и терапией ДГК. Данные представлены как среднее значение±SEM, \*значимые различия между группой «Травма» и «Травма+ДГК»,  $P < 0.05$ ,  $n=7$  в каждой группе (тест Манна-Уитни).

## **Нейротропная активность ДГК при терапии компрессионного повреждения спинного мозга**

Для характеристики механизмов повреждающего действия ТСМ в острый посттравматический период и на этапах реабилитации проведено иммуногистохимическое картирование катехоламинергических нервных волокон, процесса пролиферации и основного белка миелина. Для оценки нейропротекторного действия ДГК после ТСМ использовали маркер катехоламинергических нервных волокон как важный элемент восстановления вегетативной иннервации органов малого таза, а также с целью характеристики общего состояния нервных волокон и их прорастания через фиброзный рубец. В нашем исследовании введение ДГК после ТСМ способствует увеличению площади окрашивания ТН-позитивных нервных волокон уже к 7 сут после операции, данная динамика сохраняется до конца эксперимента (табл. 2). Наши результаты в целом согласуются с данными, полученными ранее при моделировании ТСМ, где ДГК обеспечивает целостность нервных волокон с 7 по 42 сут после операции за счет протективного действия на цитоскелет аксонов (Ward et al., 2010).

Кроме того, ДГК активирует пролиферативные процессы в участках поврежденной ткани спинного мозга. Локализация PCNA-позитивных ядер в составе серого и белого вещества спинного мозга позволяет предполагать, что в популяции пролиферирующих клеток большая доля принадлежит олигодендроцитам. Об этом свидетельствуют результаты анализа распределения в травматическом очаге и прилежащих к нему участках нервной ткани основного белка миелина, сохранность которого у животных, получавших терапию ДГК, достоверно выше на всех этапах эксперимента (табл. 2). Секретирующие ОБМ олигодендроциты являются наиболее уязвимыми при развитии второй волны апоптоза, пик которой приходится на 3-4 недели посттравматического периода (Totoiu and Keirstead, 2005). Данный эффект ДГК реализуется путем регуляции антиапоптотических белков Bcl-2 и Bcl-xL, а также путем ингибирования экспрессии проапоптотических белков Bax и Bad (Paterniti et al., 2014). А также, вероятно, за счет показанного в нашем исследовании усиления экспрессии антиоксидантного фермента супероксиддисмутазы в культуре клеток микро- и астроглии.

**Таблица 2** – Количественная характеристика активности исследуемых иммуногистохимических маркеров.

Площадь окрашивания и количество клеток измеряли в трех участках спинного мозга: в очаге повреждения, в роstralном и каудальном сегменте от центра травмы. Данные представлены как среднее значение $\pm$ SEM, значимые различия между группой «Травма» и «Травма+ДГК» при \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001; n=70 (количество срезов в каждой группе животных) (one-way ANOVA, тест Тьюки).

« $\leftrightarrow$ » – нет данных.

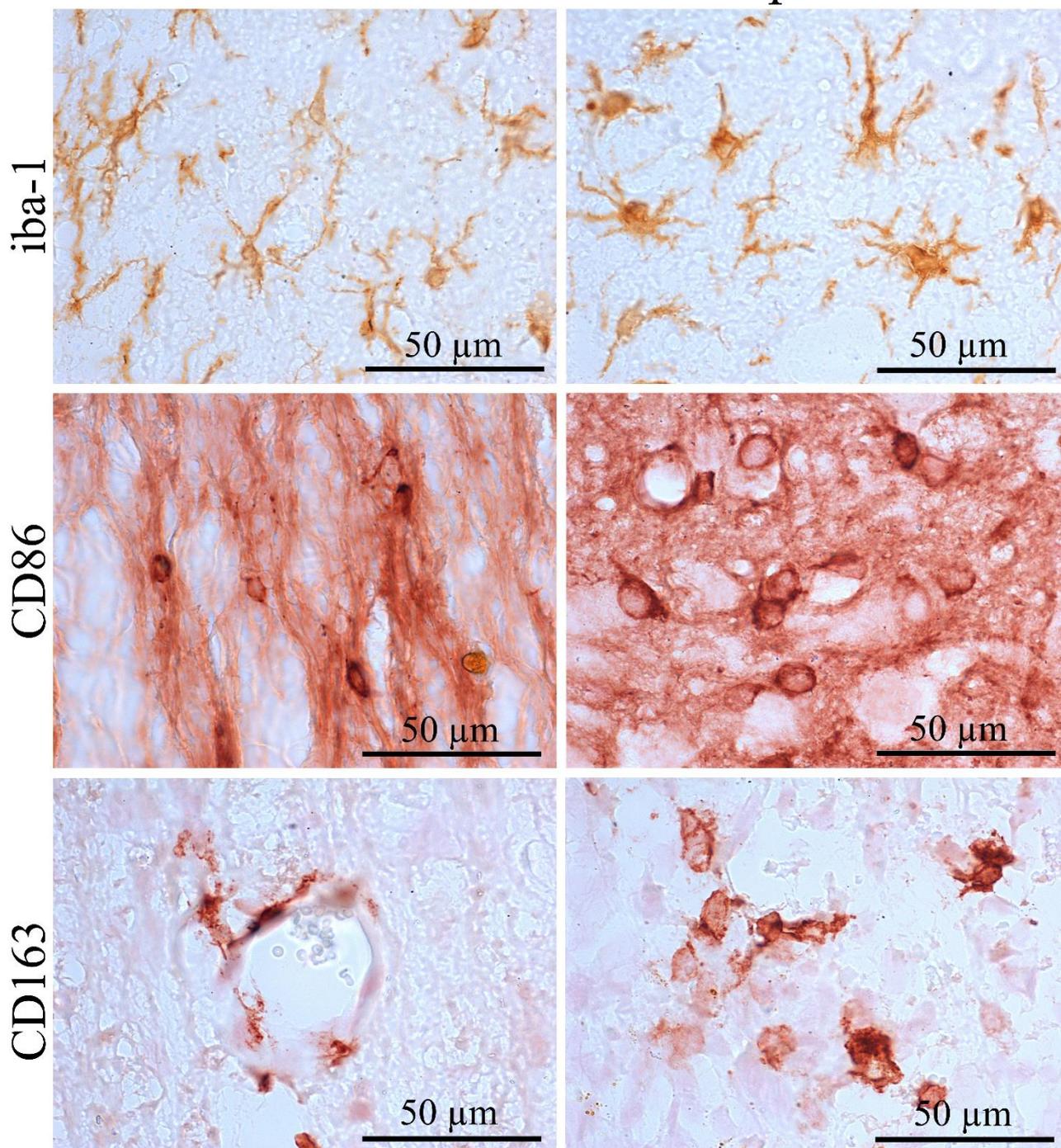
ИГХ маркер	Травма						Травма+ДГК					
	7 суток			35 суток			7 суток			35 суток		
	Ростр.	Центр.	Кауд.	Ростр.	Центр.	Кауд.	Ростр.	Центр.	Кауд.	Ростр.	Центр.	Кауд.
<b>ОБМ</b> (S, %)	15,6 $\pm$ 2,4	5,3 $\pm$ 0,7	13,9 $\pm$ 1,7	17,1 $\pm$ 1	5,2 $\pm$ 0,5	19,7 $\pm$ 1,3	20,3 $\pm$ 1,8	8,4 $\pm$ 1*	16,4 $\pm$ 1,16	22,7 $\pm$ 1,2**	8,2 $\pm$ 0,4***	24,9 $\pm$ 1,1
<b>TH</b> (S, %)	0,5 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,1	1 $\pm$ 0,1	3,5 $\pm$ 0,7	1 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,1**	1,9 $\pm$ 0,1*	2,05 $\pm$ 0,4*	1,6 $\pm$ 0,2*	3,4 $\pm$ 0,5	1,1 $\pm$ 0,1
<b>PCNA</b> (КОЛ-ВО/ММ <sup>3</sup> )	3612 $\pm$ 513	–	5099 $\pm$ 552	14548 $\pm$ 1231	–	14765 $\pm$ 1228	5418 $\pm$ 639*	–	7604 $\pm$ 736**	17671 $\pm$ 1107*	–	19385 $\pm$ 1299*
<b>Iba-1</b> (S, %)	4,1 $\pm$ 0,5	13,3 $\pm$ 1	4,2 $\pm$ 0,6	1,9 $\pm$ 0,2	2,9 $\pm$ 0,3	1,3 $\pm$ 0,2	4,1 $\pm$ 0,4	14 $\pm$ 1,5	4,7 $\pm$ 0,5	3,4 $\pm$ 0,3***	2,9 $\pm$ 0,2	3,6 $\pm$ 0,3***
<b>CD86</b> (S, %)	1,7 $\pm$ 0,3	1,7 $\pm$ 0,2	1,8 $\pm$ 0,3	4,1 $\pm$ 0,2	4,1 $\pm$ 0,4	3,1 $\pm$ 0,3	1,9 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,2	3 $\pm$ 0,3*	2,7 $\pm$ 0,3*	2,5 $\pm$ 0,2*
<b>CD163</b> (S, %)	0,1 $\pm$ 0,02	0,9 $\pm$ 0,08	0,06 $\pm$ 0,01	0,8 $\pm$ 0,07	0,5 $\pm$ 0,06	0,7 $\pm$ 0,05	0,2 $\pm$ 0,04**	1,4 $\pm$ 0,2*	0,3 $\pm$ 0,06***	1 $\pm$ 0,09*	0,8 $\pm$ 0,08*	1 $\pm$ 0,1*
<b>GFAP</b> (S, %)	6,8 $\pm$ 0,4	1,8 $\pm$ 0,2	9,3 $\pm$ 0,6	15,4 $\pm$ 1	4,9 $\pm$ 0,3	11,6 $\pm$ 0,9	14,5 $\pm$ 1***	3,4 $\pm$ 0,2**	15 $\pm$ 0,6***	20,4 $\pm$ 1,1**	6,8 $\pm$ 0,4***	15,6 $\pm$ 0,9**
<b>Виментин</b> (S, %)	5,1 $\pm$ 0,5	16,4 $\pm$ 0,9	3,6 $\pm$ 0,4	19,3 $\pm$ 1,1	30,6 $\pm$ 1,8	17,3 $\pm$ 1	12,2 $\pm$ 1,7**	21,7 $\pm$ 1,2*	10,4 $\pm$ 0,7***	31,1 $\pm$ 1,7***	39 $\pm$ 1,5***	28,8 $\pm$ 1,7***

### **Антивоспалительная активность ДГК при терапии травмы спинного мозга**

Компрессионная травма спинного мозга сопровождается выраженным воспалительным процессом на всем сроке наблюдения, основным исполнителем которого в тканях ЦНС являются микроглиальные клетки. Травматическое повреждение ведет к развитию локального микроглиоза, наиболее выраженного в зоне травматического рубца. Морфологические признаки активированной микроглии/макрофагов (ретракция отростков и гипертрофия клеточных тел; амёбовидная форма, обеспечивающая миграцию клеток к очагу повреждения) наблюдаются во всех группах животных при ТСМ (рис. 3). В острый посттравматический период микроглиальная реакция у животных всех экспериментальных групп не демонстрирует достоверных отличий. Спустя 5 недель общий пул *iba-1*-позитивной микроглии/макрофагов заметно уменьшается во всех исследованных зонах, что свидетельствует об уменьшении воспалительного процесса. При этом темпы снижения микроглиоза в группе животных, получавших ДГК, заметно ниже, чем у животных группы «Травма» (табл. 2). Данная парадоксальная, на первый взгляд, ситуация, протекает на фоне восстановления двигательной активности, усиления процессов ремиелинизации и восстановления нервных волокон после ТСМ. Одним из возможных объяснений данного феномена следует считать биохимическую и функциональную неизоморфность микроглиальных/макрофагальных клеток. Последние исследования в данной области демонстрируют, что состояние активированной и реактивной микроглии/макрофагов имеет двойственную функциональную организацию, представленную провоспалительной (тип M1, классический) и антивоспалительной (тип M2, альтернативный) функциями (Kobayashi et al., 2013; Lim et al., 2017). По данным нашего исследования в острый посттравматический период активация провоспалительного (CD86-иммунопозитивного) типа микроглии/макрофагов происходит во всех группах синхронно и не демонстрирует достоверных отличий (табл. 2; рис. 3). Данную динамику нельзя рассматривать как негативную, так как усиление активности провоспалительной микроглии/макрофагов в острый посттравматический период, необходимо для осуществления взаимодействия с лейкоцитами, путем привлечения их в очаг повреждения для участия в процессах демаркации поврежденных тканей (DiSabato et al., 2016). При этом к 35 сут после ТСМ, когда воспалительные процессы несут на себе деструктивную функцию, введение ДГК приводит к достоверному снижению уровня активности M1-типа микроглии/макрофагов (табл. 2).

ЛО

Травма



**Рисунок 3** – Локализация *iba-1*-, *CD86*- и *CD163*-позитивной микроглии/макрофагов в спинном мозге ложнооперированных животных и при ТСМ.

В то же время микроглия/макрофаги типа M2 экспрессируют противовоспалительные молекулы, такие как IL-4, IL-10 и маркеры клеточной поверхности CD163 и CD206, а также оказывает нейропротекторное действие (Hjorth et al., 2013). Результаты настоящего исследования показывают, что на 7 и 35 сут после операции введение ДГК приводит к усилению активности типа M2 (*CD163*-иммунопозитивных) макрофагов, что, очевидно,

является решающим фактором в нормализации тканевого гомеостаза и создании предпосылок для восстановления двигательной активности животных (табл. 2; рис. 3). Несмотря на большое количество экспериментальных данных, молекулярные механизмы, регулирующие микроглиальную/макрофагальную полярность на разных этапах развития патофизиологического процесса сопровождающего ТСМ, на сегодняшний день остаются неизвестны.

### **Астроцитоз при повреждении спинного мозга и терапии ДГК**

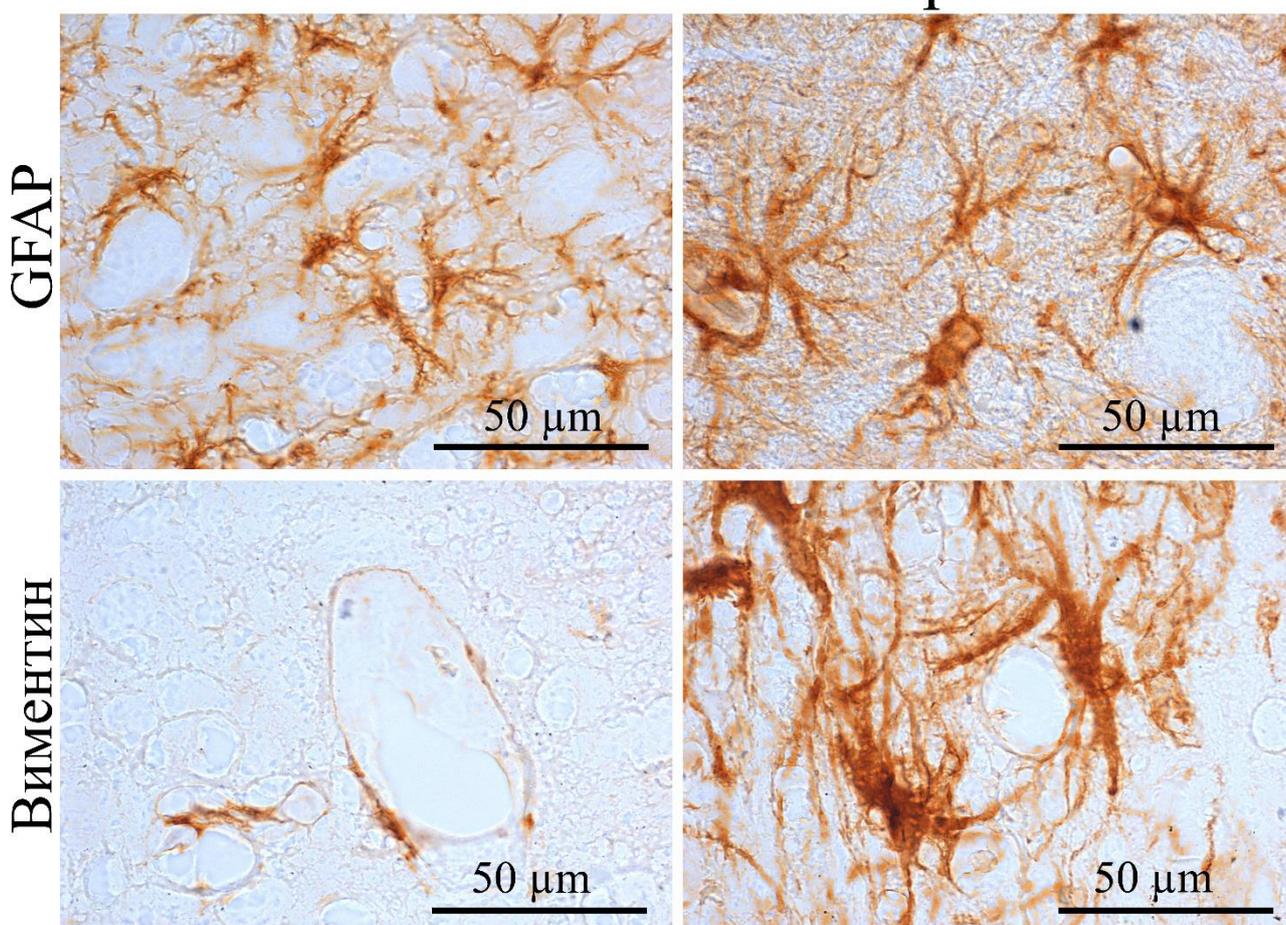
Скорость образования и морфологическое состояние рубцовой ткани, ограничивающей травмированную зону, является решающим фактором, обеспечивающим стабилизацию зоны травмы и препятствующим распространению некротических процессов на прилежащие участки мозга. В этом процессе иницирующая роль принадлежит астроцитам, которые на участке повреждения и вокруг него начинают активно пролиферировать, подвергаются морфологическим изменениям и усиливают экспрессию различных белков, в этот момент они являются основными компонентами глиального рубца (рис. 4). Как показано в настоящей работе у животных группы «Травма» в острый период реактивный астроглиоз в окружающих тканях выражен довольно слабо - число астроцитов в роstralном сегменте достоверно снижается относительно уровня контроля, а в каудальном остается неизменным. Введение ДГК экспериментальным животным приводит к развитию быстрой астроцитарной реакции, которая формирует нарастающую динамику к концу наблюдения (табл. 2). Мы считаем, что индуцированный введением ДГК астроцитоз обеспечивает ускоренную изоляцию травмированного участка мозга от окружающих тканей, ограничивая распространение патологических процессов на соседние ткани. Формируемый в результате рубец, как показано в нашей работе, характеризуется более тонкой стенкой, рыхлым строением и большим числом новообразованных кровеносных сосудов. Долгое время считалось, что астроглиальный шрам препятствует регенерации аксонов и восстановлению спинного мозга после травмы (Silver and Miller, 2004; Klapka and Müller, 2006). Однако недавно полученные результаты представляют убедительные доказательства того, что образование астроцитарного шрама в определенной степени способствует, а не ингибирует регенерацию аксонов после ТСМ (Liddel et al., 2016; Anderson et al., 2016). Так, астроциты экспрессируют ряд нейротрофических факторов необходимых для поддержания и нормального функционирования нейронов (Kimelberg and Norenberg, 1989), а некоторые из них, такие как фактор роста нервов, стимулируют рост аксонов, большая часть которых проходит вдоль стенки элементов микроциркуляторного русла. Таким образом,

повышение уровня астроцитоза вероятно связано с защитным действием, направленным на рядом расположенные нейроны и их аксоны (Eady, 2012).

В настоящем исследовании с 7 по 35 сут после операции наблюдается увеличение экспрессии виментина в исследуемых регионах спинного мозга всех экспериментальных групп, однако активность виментина в очаге повреждения значительно превышает данный показатель в ростральном и каудальном сегменте спинного мозга (табл. 2; рис. 4). Ранее установлена связь между виментином и состоянием нейронов, показано, что добавление виментина к первичной нейрональной культуре клеток индуцирует рост аксонов (Teshigawara et al., 2013). Кроме того, экзогенное введение виментина мышам с ТСМ улучшает двигательную активность, увеличивает количество реактивных астроцитов и усиливает рост 5-НТ-позитивных аксонов в ростральном и каудальном сегментах спинного мозга (Shigyo et al., 2016). Показано, что астроциты с усиленной экспрессией виментина индуцируют рост аксонов после повреждения спинного мозга и имплантации Шванновских клеток у взрослых крыс (Hsu and Xu, 2005). В совокупности представленные данные демонстрируют, что экспрессия виментина может быть увеличена в реактивных астроцитах, что способствует удлинению аксонов после травмы и восстановлению двигательной активности после ТСМ. В рамках настоящего исследования установлено, что введение ДГК животным после повреждения спинного мозга, наряду с выраженным астроцитозом, приводит к усилению экспрессии виментина на 7 и 35 сут после операции во всех исследуемых сегментах спинного мозга. Параллельно с этим в экспериментах *in vitro* на первичной культуре клеток микро- и астроглии установлено, что обработка клеток ДГК приводит к увеличению экспрессии внутриклеточного виментина практически в два раза. Полученные результаты в экспериментах *in vitro* и *in vivo* впервые демонстрируют, что ДГК индуцирует усиление экспрессии виментина микро- и астроглией, что происходит одновременно с улучшением показателей локомоторной активности у крыс с ТСМ (Manzhulo et al., 2018).

ЛО

Травма



**Рисунок 4** – Локализация GFAP-положительной астроглии и белка виментина в спинном мозге ложнооперированных животных и при ТСМ.

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что ДГК обладает комплексным действием, реализуемым на разных этапах посттравматического процесса в центральной нервной системе, что свидетельствует о ее высоком терапевтическом потенциале. В то же время многие механизмы реализации противовоспалительного, нейропротекторного и регенеративного действия ДГК нуждаются в дополнительных детальных исследованиях, способных обеспечить его внедрение в клиническую практику для лечения посттравматической патологии центральной нервной системы.

## ВЫВОДЫ

1. Компрессионная травма спинного мозга сопровождается выраженным дефицитом вегетативных функций и локомоторной активности экспериментальных животных. Введение ДГК приводит не только к более раннему, но и более полному восстановлению функций задних конечностей.

2. Повреждение спинного мозга сопровождается образованием некротической области, окруженной плотной глио-мезодермальной капсулой. Применение ДГК обеспечивает ограничение очага повреждения за счет образования более тонкого и рыхлого рубца с высоким содержанием кровеносных сосудов и нервных волокон.

3. Травма спинного мозга сопровождается процессом демиелинизации, особенно выраженном в очаге повреждения. Системное введение ДГК не предотвращает повреждение миелиновых оболочек в острый период травмы, но на поздних сроках индуцирует процессы ремиелинизации как в центре повреждения, так и в прилежащих сегментах спинного мозга.

4. При повреждении спинного мозга активация астроцитов в ростральном и каудальном сегментах происходит на поздних сроках наблюдения. Введение ДГК сопровождается более ранней и выраженной астроцитарной реакцией и ведет к усилению экспрессии виментина во всех исследуемых сегментах спинного мозга.

5. Течение посттравматического процесса сопровождается увеличением репаративной и пролиферативной активности в зонах, прилежащих к очагу повреждения. Введение ДГК увеличивает число PCNA-позитивных элементов в нервной ткани и индуцирует экспрессию антиоксидантного фермента супероксиддисмутазы в культуре клеток микро- и астроглии.

6. Компрессионная травма спинного мозга характеризуется усилением воспалительного процесса в острый посттравматический период с постепенным его снижением на этапах реабилитации. При введении ДГК реакция микроглии/макрофагов обеспечивается за счет M2-антивоспалительного типа макрофагов.

7. Фармакологическая активность ДГК при моделировании спинальной травмы обеспечивается за счет влияния на активность глиальных клеток спинного мозга, сопровождается развитием антиоксидантной, антивоспалительной, репаративной и пролиферативной активности, способствуя раннему формированию астроглиального рубца, усилению процессов ревакуляризации и реиннервации в травматическом очаге и прилежащих участках нервной ткани.

**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ***Статьи из списка, рекомендованного ВАК:*

1. **Manzhulo O.**, Tyrtysnaia A., Kipyushina Y., Dyuzen I., Manzhulo I. Docosahexaenoic acid induces changes in microglia/macrophage polarization after spinal cord injury in rats // *Acta Histochemica*. 2018. Vol. 120. P. 741–747.
2. Manzhulo I., Tyrtysnaia A., Kipyushina Y., Dyuzen I., Ermolenko E., **Manzhulo O.** Docosahexaenoic acid improves motor function in the model of spinal cord injury // *Neuroscience Letters*. 2018. Vol. 672. P. 6–14.
3. **Огурцова О.С.**, Манжуло И.В., Латышев Н.А., Касьянов С.П., Дюйзен И.В. Нейропротекторное действие докозагексаеновой кислоты при моделировании компрессионной спинальной травмы // *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2014. № 2. С. 64–69.

*Работы в материалах конференций:*

1. **Манжуло О.С.**, Дюйзен И.В., Манжуло И.В. Докозагексаеновая кислота модулирует микроглиальную/макрофагальную активность при компрессионной травме спинного мозга // *Гены и клетки*. 2019. Т. 14. С. 144–145.
2. **Manzhulo O.**, Tyrtysnaia A., Dyuzen I., Manzhulo I., Kipyushina Y. Docosahexaenoic acid improves motor function after spinal cord injury in rats by induces changes in microglia/macrophage polarization // *EMBO-ASCB Meeting, San Diego, USA, December 8–12, 2018*. San Diego: The American Society for Cell Biology, 2018. Vol. 29. P. 377.
3. **Огурцова О.С.**, Дюйзен И.В. Экспериментальная оценка нейротропного действия докозагексаеновой кислоты при тяжелой спинальной травме // *Материалы IX Дальневосточного медицинского конгресса «Человек и лекарство», Владивосток, 20 сентября 2012. г. Владивосток: Изд-во Медицина ДВ, 2012. С. 65–66.*
4. **Огурцова О.С.**, Дюйзен И.В. Нейропротекторное действие докозагексаеновой кислоты в модели спинальной травмы у крыс // *XIV Всероссийская молодежная школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии, Морская экспериментальная станция ТИБОХ ДВО РАН, 11–18 сентября 2012. г. Владивосток: ТИБОХ ДВО РАН, 2012. С. 43.*

МАНЖУЛО  
ОЛЬГА СЕРГЕЕВНА

**НЕЙРО- И ГЛИОТРОПНАЯ АКТИВНОСТЬ ДОКОЗАГЕКСАЕНОВОЙ  
КИСЛОТЫ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ КОМПРЕССИОННОЙ ТРАВМЫ  
СПИННОГО МОЗГА У КРЫС**

1.5.22. Клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук