Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского»
Дальневосточного отделения Российской академии наук

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

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, чл.-корр. РАН
Дюйзен Инесса Валерьевна

Владивосток – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ **6**

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ **15**

1.1. Травма спинного мозга: воспаление, некроз, апоптоз, фиброз **15**

1.2. Клеточные и молекулярные механизмы репарации спинного мозга **21**

1.3. Методы и подходы к терапии травматического повреждения спинного мозга **28**

1.4. Роль омега-3 жирных кислот в центральной нервной системе в норме и при развитии патологических состояний **37**

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ **44**

2.1. Характеристика используемой экспериментальной модели **44**

2.2. Исследование двигательной активности **45**

2.3. Гистологические методы исследования **47**

2.4. Иммуногистохимические методы исследования **47**

2.5. Количественная обработка данных **49**

2.6. Культура клеток **50**

2.7. Определение супероксиддисмутазы **51**

2.8. Иммуноферментный анализ **52**

2.9. Статистическая обработка данных **52**

ГЛАВА 3. ВОССТАНОВЛЕНИЕ ДВИГАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ КРЫС С КОМПРЕССИОННОЙ ТРАВМОЙ СПИННОГО МОЗГА И ТЕРАПИЕЙ ДГК **53**

ГЛАВА 4. НЕЙРОТРОПНАЯ АКТИВНОСТЬ ДГК ПРИ ТЕРАПИИ ТРАВМЫ СПИННОГО МОЗГА **55**

4.1. Морфологическая характеристика области повреждения спинного мозга **55**

4.2. Докозагексаеновая кислота обеспечивает сохранность миелина и усиливает процессы ремиелинизации 57

4.3. Распределение катехоламинергических нервных волокон при компрессионной травме и терапии ДГК 62

ГЛАВА 5. ГЛИОТРОПНАЯ АКТИВНОСТЬ ДГК ПРИ ТЕРАПИИ ТРАВМЫ СПИННОГО МОЗГА 66

5.1. Антиоксидантная активность докозагексаеновой кислоты 66

5.2. Пролиферация и репарация клеток при повреждении спинного мозга и терапии ДГК 68

5.3. Активность микроглии/макрофагов при компрессионной травме спинного мозга и терапии ДГК 71

5.3.1. Распределение провоспалительной микроглии/макрофагов при повреждении спинного мозга и терапии ДГК 77

5.3.2. Распределение антивоспалительных макрофагов при повреждении спинного мозга и терапии ДГК 82

5.4. Активность астроцитов при компрессионной травме спинного мозга и терапии ДГК 87

5.5. Локализация и активность виментина при повреждении спинного мозга и терапии ДГК 94

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 100

ВЫВОДЫ 105

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 107

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТФ – аденозинтрифосфорная кислота

ГАМК – γ-аминомасляная кислота

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДГК – докозагексаеновая кислота

ОБМ – основной белок миелина

ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты

ПНС – периферическая нервная система

СОД – супероксиддисмутаза

ТСМ – травма спинного мозга

ФЭС – функциональная электростимуляция

ХСПГ – хондроитинсульфат протеогликанов

ЦНС – центральная нервная система

ЭПК – эйкозапентаеновая кислота

ЭСК – эмбриональные стволовые клетки

AA – арахидоновая кислота

AMPA – α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота

BDNF – нейротрофический фактор мозга

CNTF – цилиарный нейротрофический фактор

DHEA – N-докозагексаеноилэтаноламид

FGFs – фактор роста фибробластов

GDNF – нейротрофин секретируемый глией

GGF2 – фактор роста глии 2

Iba-1 – ионизированная кальций-связывающая адаптерная молекула 1

IFNγ – интерферон γ

IL-1 – интерлейкин 1

IL-6 – интерлейкин 6

IL-10 – интерлейкин 10

MaR – марезин

NG2 – нейрональный/глиальный антиген 2

NGF – фактор роста нервов

NMDA – ионотропный рецептор глутамата N-метил-D-аспартат

NPD1 – нейропротектин D1

NSC – предшественники нейронов дикого типа

NT3 – нейротрофин 3

PCNA – ядерный антиген пролиферирующих клеток

PD – протектин

PDGF – фактор роста тромбоцитов

PPARα – альфа рецептор активатора пероксисом

Rv – резолвин

S-IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста 1

TGFβ – трансформирующий ростовой фактор β

TH – тирозингидроксилаза

TLR – Toll-подобные рецепторы

TNF-α – фактор некроза опухоли α

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

ВВЕДЕНИЕ

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 М1 (провоспалительных) и М2 (антивоспалительных) на разных этапах патофизиологического процесса (Frangogiannis, 2008). Микроглия/макрофаги типа М1 обеспечивают цитотоксическую активность, благодаря высокому уровню секреции провоспалительных цитокинов и хемокинов. Напротив, микроглия/макрофаги типов М2 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 гемокапилляров, 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), антивоспалительные,

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 ткане-специфических 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 (Farooqui, 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 Na^+, K^+, Ca^{2+} ионных каналов (Vreugdenhil et al., 1996). Эксайтотоксичность, 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 антивоспалительных препаратов в терапии травмы нервной системы. В настоящее время одним из основных подходов в терапии ТСМ является применение гормональных антивоспалительных 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 антивоспалительные, 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 антивоспалительного 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 антивоспалительной 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 антивоспалительного 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 (М1) с одновременным увеличением активности антивоспалительного типа (М2) 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 (NIH, 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 М1 с синхронным усилением активности макрофагов антивоспалительного типа М2.

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.

Благодарности. Выражаю признательность своему научному руководителю чл.-корр. РАН Инессе Валерьевне Дюйзен за всестороннюю помощь, опытное руководство и поддержку на протяжении всех лет работы в лаборатории. Благодарю ст.н.с., к.б.н. Тыртышную Анну Алексеевну и н.с., к.б.н. Кипрюшину Юлию Олеговну за помощь в освоении биохимических методов исследования и в работе с культурой клеток.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Травма спинного мозга: воспаление, некроз, апоптоз, фиброз

Патологический процесс, наблюдаемый после травмы спинного мозга, условно можно разделить на две стадии: первичную и вторичную. Первичная травма обусловлена непосредственным механическим воздействием и длится от нескольких секунд до нескольких минут. В течение первых нескольких секунд после травмы происходит нарушение микроциркуляции, вызывающее кровоизлияние и отек. Дальнейшее снижение перфузии крови в область травмы приводит к блокированию поступления питательных веществ и кислорода к месту повреждения. В то же время тромбоз и вазоспазм провоцируют обострение ишемии, а затем происходит некроз, вызванный механическим разрушением клеточных мембран. Данный процесс сопровождается чрезмерным высвобождением глутамата, которое достигает эксайтотоксических уровней в связи с дисрегуляцией потоков ионов Na^+ и Ca^{2+} (Кармен, 2011). В первые часы после травмы некроз и апоптоз нейронов и глиальных клеток наблюдается вблизи очага повреждения. Второй пик апоптоза приходится на 10-12 сут, сопровождается гибелью олигодендроцитов и распространяется на участки, отдаленные от травмы. В этот период большая часть нервных клеток, выживших в острую фазу посттравматического процесса и потенциально способных обеспечить регенерацию и восстановление поврежденных нервных проводников, вступают на путь апоптоза (Witiw et al., 2015).

Вторичная волна посттравматического повреждения мозга развивается на фоне прогрессирующего каскада разрушения ткани, в условиях системной вегетативной дисфункции. Механизмы ранней фазы вторичной травмы концептуально можно разделить на непосредственные (в течение двух часов), ранние острые (в течение 48 часов) и подострые (в течение двух недель) фазы (Witiw et al., 2015). Патологический процесс вторичной травмы включает демиелинизацию, прогрессирование аксонального и нейронального некроза, ишемию нервной ткани и отек, окислительный стресс, воспаление, образование

посттравматических полостей и кист. На стадии вторичной травмы из-за обширного апоптоза и аутофагии олигодендроцитов неповрежденные или слегка повреждённые аксоны разрушаются вследствие прогрессирования демиелинизации (Almad et al., 2011). В последующем формируется глиальный шрам, который действует как мощный барьер, защищающий нервную ткань от распространения повреждающего воспалительного процесса, но одновременно с этим препятствующий восстановлению аксонов (Okadaa et al., 2018).

Независимо от причины или области повреждения, зону травмы спинного мозга можно разделить на три тканевых элемента, каждый из которых обладает уникальной клеточной организацией патологического процесса: (1) очаг повреждения, часто именуемый фиброзным шрамом (мезенхимальным или соединительнотканным рубцом); (2) астроглиальный шрам, который окружает очаг поражения; и (3) окружающая зона, представленная условно интактной нервной тканью, которая остается относительно сохранной и функциональной, характеризуется присутствием большого количества реактивной глии и рассматривается как источник регенеративных процессов (O'Shea et al., 2017).

При повреждении спинного мозга нарушаются клеточные мембраны, в результате чего происходит высвобождение ферментов, нейромедиаторов и биологически активных веществ, что, в конечном счете, приводит к мощной воспалительной реакции (David and Kroner, 2011; Woodcock and Morganti-Kossmann, 2013). Воспаление опосредовано высвобождением цитокинов, хемокинов, активных форм кислорода и вторичных мессенджеров. Данные медиаторы продуцируются микро- и астроглией, эндотелиальными и периферическими иммунными клетками, проникающими в ткань мозга через разрушенный ГЭБ. Однако именно микроглия играет основную роль при нейровоспалении (DiSabato et al., 2016). Микроглиальные клетки присутствуют как в сером, так и белом веществе спинного и головного мозга и составляют около 10% от всей клеточной популяции ЦНС. Микроглиоциты выполняют роль резидентных макрофагов в ЦНС и продуцируют большое количество провоспалительных медиаторов. Так, при повреждении ЦНС происходит

немедленная активация микроглии, затем следует умеренное высвобождение цитокинов (IL-1β, IL-6 и TNFα), хемокинов (CCL2, CCL5, CXCL1) и выход из поврежденных сосудов большого числа периферических иммунных клеток (DiSabato et al., 2016). Первыми в очаг воспаления мигрируют нейтрофилы, затем моноциты и лимфоциты, одновременно с воспалительной реакцией активируются макрофаги. После травмы происходит быстрая инфильтрация нейтрофилов в травматический очаг, присутствие которых кратковременно и длится в течение трех суток после травмы. В этот же период в зону повреждения приходят моноциты и лимфоциты, достигая максимальной концентрации у мышей на 42 сутки (Ankeny et al., 2006, Sroga et al., 2003), а у людей через два месяца после травмы (Fleming et al. 2006). Ранее установлено, что мигрирующие из кровотока макрофаги имеют два пика активности, примерно через 7 и 60 сут после травмы, что предполагает разделенные во времени волны инфильтрации (Blight, 1992; Beck et al., 2010). Кроме того, функциональная активность макрофагов, в том числе и микроглии, является гетерогенной. Один тип макрофагов способствует дегенерации (провоспалительный тип M1), тогда как другой (антивоспалительный тип M2), способствует процессам регенерации (Kigerl et al., 2009) спинного мозга после травмы. В настоящее время считается, что в поврежденном участке мозга одновременно реализуются обе стратегии макрофагальной активности и на этапах воспалительного и восстановительного процесса существует динамический континуум различных типов макрофагов, а не обособленная активность отдельных типов (Heppner et al., 2015).

Большинство травм спинного мозга приводят к образованию обширного фиброзного шрама; данный компонент рубца связывают с разрушением мозговых оболочек и сопутствующей пролиферацией, и миграцией фибробластов, которые продуцируют плотный внеклеточный матрикс (Fan et al., 2018). Однако, ушибы, не вызывающие явного нарушения мозговых оболочек, также способны привести к образованию фиброзного рубца (Loy et al., 2002; Silver and Miller, 2004). У крыс фиброзный шрам состоит из белков внеклеточного матрикса, включая коллаген IV типа, ламинин и фибронектин (Loy et al., 2002). Через 3-7 сут после травмы, до

начала созревания фиброзного шрама, происходит ангиогенез в очаге поражения. При этом, несмотря на то что формируется базальная мембрана, ее фрагменты не полностью объединяются с эндотелиальными клетками, и реваскуляризация остается неудовлетворительной (Loy et al., 2002). Перициты также принимают участие в образовании рубца, что указывает на активную роль ангиогенных элементов в структуре фиброзного шрама (Göritz et al., 2011; Soderblom et al., 2013). В целом, фиброзный шрам, образованный плотным осаждением внеклеточного матрикса и активной работой продуцирующих волокна фибробластов и формирующий демаркационную линию между поврежденной и сохранной нервной тканью, в силу темпов своего образования и морфологической структуры, становится фактором, препятствующим регенерации аксонов через очаг повреждения (Kjell and Olson, 2016).

Активное участие в патологическом процессе после ТСМ принимают астроглиальные клетки спинного мозга. Астроциты представлены двумя основными подтипами: протоплазматический и фиброзный. Протоплазматические астроциты обнаружены по всему серому веществу спинного мозга и имеют несколько ветвящихся отростков. Фиброзные астроциты распределены по белому веществу спинного мозга и имеют несколько длинных волокнообразных отростков (Горяйнов, 2013). Астроциты выполняют ряд важных функций при развитии как серого, так и белого вещества спинного мозга, принимая участие в управлении ростом развивающихся аксонов и миграцией нейробластов (Powell and Geller, 1999). Кроме того, астроциты обеспечивают формирование и функционирование развивающихся синапсов путем высвобождения сигнальных молекул, таких как тромбоспондин (Barres, 2008; Christopherson et al., 2005). Астроциты регулируют синаптический прунинг в процессе развития, высвобождая медиаторы, которые вызывают экспрессию комплимента C1q в синапсах и тем самым маркируют их для элиминации микроглией (Stevens et al., 2007). Что касается развития белого вещества, потеря или дисфункция коннексинов астроцитов и щелевых контактов приводит к демиелинизации (Lutz et al., 2009). Астроциты играют важную роль в синаптической передаче

посредством регулируемого высвобождения высокоактивных медиаторов, таких как глутамат, пурины (АТФ и аденозин), ГАМК и D-серин (Halassa et al., 2007; Nedergaard et al., 2003). Высвобождение из астроцитов данных нейро- и глиотрансмиттеров происходит в ответ на изменения синаптической активности нейронов и поддерживает их возбуждение (Perea et al., 2009; Shigetomi et al., 2008). Помимо прямого воздействия на синаптическую активность через высвобождение глиотрансмиттеров, астроциты могут оказывать мощное и долгосрочное действие на синаптические функции посредством высвобождения различных факторов роста и цитокинов (Christopherson et al., 2005; Stevens et al., 2007). Так, фактор некроза опухоли α (TNFα) способен оказывать влияние на гомеостатическое синаптическое масштабирование, индуцируя синтез рецепторов AMPA в постсинаптической мембране (Stellwagen and Malenka, 2006). Астроциты экспрессируют ряд нейроактивных стероидов (нейростероидов), в том числе – эстрадиол, прогестерон и различные посредники, и метаболиты с выраженной синаптической активностью, в том числе на ГАМК-рецепторы (Garcia-Segura and Melcangi, 2006). Таким образом, астроциты регулируют активность нейротрансмиттеров, участвуют в синаптогенезе, опосредуют иммунный ответ, экспрессируют молекулы внеклеточного матрикса, способствуют миграции клеток, а также принимают участие в дифференцировке и созревании ЦНС (Sofroniew and Vinters, 2010; Clarke and Barres, 2013).

Астроциты участвуют во многих патологических процессах в ЦНС, включая воспаление, ишемию, инфекцию и дегенерацию. После активации астроцитов наблюдаются изменения их морфологии, экспрессии генов и клеточной физиологии (Sofroniew and Vinters, 2010). Начиная с 1-2 сут после повреждения спинного мозга, и в течение последующих 7-10 сут, активированные астроциты пролиферируют и мигрируют к краям поврежденной ткани, образуя астроцитарный шрам (рубец) (Kjell and Olson, 2016). У крыс формирование рубца завершается через 2-3 недели после травмы, в составе рубца присутствуют элементы, структурно напоминающие ГЭБ здоровой ЦНС, который выполняет функцию высокоселективного фильтра и защищает нервную систему от

циркулирующих в крови микроорганизмов, токсинов, клеточных и гуморальных факторов иммунной системы (Kjell and Olson, 2016). При этом основная функция астроцитарного шрама заключается в изоляции воспалительных клеток в зоне повреждения и защите соседней жизнеспособной нервной ткани (Wanner, 2013; Sofroniew, 2015). В составе астроцитарного шрама реактивные астроциты экспрессируют различные медиаторы, являющиеся ингибиторами роста аксонов, например, протеогликаны. При этом есть ряд исследований, доказывающих, что некоторое количество аксонов может проходить через данный барьер (Anderson et al., 2016; Cregg et al., 2014). В физиологических условиях астроциты также продуцируют протеогликаны, но после травмы наблюдается увеличение их синтеза (Anderson et al., 2016). Синтезировать некоторые протеогликаны также способен ряд других клеток, присутствующих в области повреждения. При этом именно астроцитарный шрам, образованный вокруг места повреждения, связывают с осаждением хондроитинсульфат протеогликанов (ХСПГ) и снижением роста аксонов (Gaudet et al., 2018). Для того чтобы проверить гипотезу о том, что ХСПГ снижают аксональный рост после повреждения спинного мозга, Bradbury с коллегами использовали ферментативное ингибирование ХСПГ в условиях травмы спинного мозга, в результате чего наблюдалось улучшение функционального восстановления и регенерации аксонов через участки повреждения (Bradbury et al., 2002). Астроциты, формирующие шрам, долгое время считались основной причиной отсутствия регенерации аксонов ЦНС (Silver and Miller, 2004), но на сегодняшний день большое количество исследований опровергает данное заключение. Так, ингибирование шрамообразующих астроцитов и удаление хронических астроцитарных рубцов не приводит к спонтанной регенерации двигательных, чувствительных и серотонинергических аксонов (Anderson et al., 2016). К тому же шрамообразующие астроциты экспрессируют матричный белок-ламинин, поддерживающий рост аксонов (Anderson et al., 2016), а ингибирование его синтеза приводит к снижению скорости регенерации после ТСМ (Anderson et al., 2016). После травмы ЦНС при стимуляции соответствующими нейротрофическими факторами поврежденные

аксоны осуществляют рост вдоль астроцитов (Kawaja and Gage, 1991). Так спонтанная регенерация аксонов после травмы в нижних сегментах позвоночника осуществляется вдоль астрогиальных мостиков, сформированных при стимуляции соединительнотканным фактором роста (Mokalled et al., 2016). Таким образом, астроцитарный рубец определенным образом способствует, а не препятствуют регенерации аксонов. (O'Shea et al., 2017).

Граница астроцитарного рубца непрерывна и окружена сохранной, но активированной нервной тканью, содержащей все элементы, присущие нормально функционирующей ткани. Данная область достигает больших размеров и простирается от очага повреждения и границы астроцитарного шрама во всех направлениях. Она представлена гипертрофированной реактивной глией, которая включает астроциты, микроглию и олигодендроциты. Гипертрофированные астроциты в активированной нервной ткани находятся в тесном взаимодействии с функционирующими нейронами, и отличаются фенотипически и функционально от новообразованной астроглии. Результаты некоторых исследований свидетельствуют о том, что гипертрофированные реактивные астроциты принимают активное участие в стимулировании прорастания аксонов и регуляции синаптической пластичности (O'Shea et al., 2017). Таким образом, образование астроцитарного шрама и реактивные астроциты могут оказывать как отрицательное, так и положительное действие на регенерацию поврежденной ткани. На сегодняшний день механизмы данного явления остаются не до конца исследованными и являются предметом широких дискуссий.

1.2. Клеточные и молекулярные механизмы репарации спинного мозга

Подробное описание причин и симптомов повреждения спинного мозга датируется древним египетским медицинским текстом, папирусом Эдвина Смита (XVII век до н.э.) (van Middendorp et al., 2010). Тем не менее, только с конца прошлого века начали активно исследовать способы терапии повреждения спинного мозга. Современное представление об ингибировании и стимуляции нейротрофических факторов, а также иммунологических, воспалительных и

рубцеобразующих процессов, развивающихся при повреждении ЦНС, привели к разработке нескольких терапевтических стратегий. Данные подходы, самостоятельно или в сочетании с различными вариантами трансплантации клеток или тканей, дают надежду на частичное или полное восстановление спинного мозга после травмы (Olson, 2013, Tuszynski et al., 2014; Ahuja and Fehlings, 2016; Watzlawick et al., 2016). Травма спинного мозга крыс является основной экспериментальной моделью, позволяющей оценить различные терапевтические стратегии (Gomes-Osman et al., 2016; Reier et al., 2012). В спинном мозге мышей после травмы большинство клеток в области повреждения сохраняют способность активно пролиферировать, при этом рассеченные участки спинного мозга не теряют контакт друг с другом и, как следствие, не происходит образование кист (Ma et al., 2001). В этой связи после полной перерезки спинного мозга мыши довольно часто наблюдается умеренная регенерация аксонов и восстановление утраченных функций (Inman and Steward, 2003). У человека и крыс спонтанного восстановления спинного мозга после повреждения не наблюдается, а формирование посттравматических кист является типичным патофизиологическим процессом (Metz et al., 2000; Josephson et al., 2001).

В эмбриональном периоде при формировании ЦНС наблюдается активный рост аксонов, но даже в этот период поддержание роста обеспечивается определенным набором нейротрофических факторов. Но по мере созревания, нейроны ЦНС теряют способность к аксональному росту (Goldberg, 2003). После пересечения, аксоны ЦНС демонстрируют практически полное отсутствие спонтанного образования новых конусов роста (Bradke, 2012). Однако недавние исследования показали, что аксоны чувствительных нейронов после повреждения спинного мозга крыс, гораздо чаще прорастают в трансплантаты, если их периферические концы предварительно подрезать, формируя подобие ранней травмы. Подобная ранняя травма также способствует некоторой регенерации сенсорных аксонов через очаг повреждения, сформировавшийся после ТСМ (Neumann, 2002). Отсутствие восстановления аксонов в ЦНС и их успешная регенерация в периферической нервной системе (ПНС), очевидно, обусловлена не

нейрональными различиями, а отличием окружающей их среды. Показано, что большинство нейронов ЦНС приобретают способность к регенерации аксонов, если они окружены миелин-образующими клетками (Schwab, 2010).

Рост и пространственная ориентация аксонов регулируется четырьмя основными сигнальными путями: диффузная хемоаттракция, контактная хемоаттракция, диффузная хеморегуляция и контактная хеморегуляция, которые функционируют благодаря сигнальным молекулам, поступающим из окружающей среды (Tessier-Lavigne, 1996). Данные сигнальные пути оказывают активное действие на восстановление аксонов после ТСМ. Как присутствие, так и отсутствие данных молекулярных сигналов обуславливает активность восстановления аксонов (Lin, 2007). Диффузную хемоаттракцию впервые связали с регенерацией аксонов ЦНС Кахал и Телло; они показали, что перерезанные аксоны ЦНС проявляют способность к росту благодаря трансплантации нервов периферической нервной системы в очаг повреждения. Основываясь на данных наблюдениях, Кахал предположил, что в отличие от развивающейся ЦНС и повреждения периферических нервов, при травме ЦНС взрослых животных, не наблюдается процессов диффузной хемоаттракции, которые необходимы для аксонального роста. В тоже время ряд исследований демонстрируют, что введение нейротрофических факторов (нейротрофический фактор мозга (BDNF), нейротрофин-3 (NT3), нейротрофин секретируемый глией (GDNF), фактор роста нервов (NGF)) в очаг повреждения после ТСМ, способствует селективному восстановлению аксонов (Anderson et al., 2016; Deng et al., 2013). Контактная хемоаттракция или поддержка аксонального роста опосредуется семейством молекул межклеточного матрикса, таких как ламинины, синдеканы и протеогликаны гепарансульфата (Anderson et al., 2016; Plantman et al., 2008; Edwards and Hammarlund, 2014; Farhy-Tselnicker et al., 2014; Masu, 2016). Во время развития аксональный рост определяется комбинацией привлекающих и отталкивающих сигнальных молекул, а их градиенты регулируют направление роста (Tessier-Lavigne and Goodman, 1996). Скорость роста определяется отношением привлекающих и отталкивающих молекул друг к другу, таким

образом, чтобы преобладание концентрации одного типа молекул могло преодолеть концентрацию другого (Tom et al., 2004). Например, ингибирование ламинин-интегринных взаимодействий может препятствовать росту аксонов *in vitro* (Plantman et al., 2008), а их стимуляция приводит к устойчивой регенерации аксонов после ТСМ (Anderson et al., 2016). Диффузная хеморегуляция опосредована сигнальными молекулами Wnt, семафоринами, нетринами и другими молекулами, способными создавать градиенты во время развития (Masu, 2016; Hollis, 2016). Интересно, что семафорины и нетрины могут выступать одновременно в роли отталкивающих и привлекающих молекул для различных аксонов в зависимости от комбинации сигнальных молекул в конусе роста (Lin and Holt, 2007; Masu, 2016). При этом установлено, что ингибирование семафоринов отдельно или в сочетании с выключением ингибиторов образования миелина недостаточно для спонтанного восстановления серотонинергических аксонов после ТСМ (Lee et al., 2010).

В течение первых нескольких суток после ТСМ запускаются процессы демиелинизации вследствие гибели олигодендроцитов, вызванной прямым повреждающим воздействием и различными факторами среды (Nave and Trapp, 2008). В их число входят провоспалительные цитокины (IL-1β, TNF-α), цитотоксичность, опосредуемая глюкоза-аденозинтрифосфатом, отек, а также повреждение, индуцируемое свободными радикалами (Almad et al., 2011; Plemel et al., 2014). Известно, что единичный олигодендроцит может иметь связь с 30-80 аксонами, причем каждое соединение завершается в междоузлие (O'Rourke et al., 2014). Таким образом, гибель одного олигодендроцита вызывает целую серию демиелинизаций (Chong et al., 2012; Young et al., 2013). Другой причиной демиелинизации считают повреждение аксоно-олигодендроцитарного сигнального пути (Alizadeh et al., 2015); при отсутствии питания аксонов происходит быстрая дегенерация олигодендроцитов с последующей демиелинизацией (Lappe-Siefke et al., 2003). В недавних исследованиях установлено, что новообразованные олигодендроциты имеют потенциал к восстановлению миелина при травматическом повреждении спинного мозга.

Процесс регенерации миелина новообразованными олигодендрацитами может продолжаться до трех месяцев после ТСМ. Ранее установлено, что большинство олигодендроцитов, участвующих в процессах ремиелинизации, образуются из клеток-предшественников олигодендроцитов. Маркером клеток-предшественников олигодендроцитов является нейрональный/глиальный антиген 2 (NG2) или фактора роста тромбоцитов (PDGF) (Alizadeh et al., 2015). После травмы спинного мозга клетки-предшественники олигодендроцитов мигрируют в область повреждения и активно пролиферируют. Сразу после травмы и в течение недели количество клеток-предшественников олигодендроцитов постоянно увеличивается, и поддерживается на высоком уровне в течение одного месяца. Данный процесс регулируется различными сигнальными молекулами, такими как факторы роста, цитокины и транскрипционные факторы. Предыдущие исследования подтвердили, что нейротрофин 3, фибронектин и PDGF способствуют пролиферации клеток-предшественников олигодендроцитов (Hill et al., 2013). В тоже время PDGF и фибронектин усиливают миграцию клеток-предшественников олигодендроцитов путем образования фосфорилированных внеклеточных сигнально-регулируемых протеинкиназ 1 и 2 (ERK1/2) (Tripathi et al., 2016), а холинергический нейротрофический фактор и ингибитор лейкоза способствуют их раннему созреванию. Клетки-предшественники олигодендроцитов становятся зрелыми олигодендроцитами и приобретают способность к восстановлению повреждённого миелина после миграции, пролиферации, дифференцировки и созревания. Таким образом, клеткам-предшественникам олигодендроцитов отводится главная роль в восстановлении миелина (Hackett et al., 2016). Тем не менее, количество новообразованного миелина недостаточно для восстановления всех поврежденных аксонов после ТСМ, а скорость ремиелинизации не синхронизирована со скоростью демиелинизации. Подобный дисбаланс вызывает увеличение количества демиелинизированных аксонов что, в конечном счете, приводит к инвалидности, дегенерации, а также к сенсорным и двигательным нарушениям.

В патофизиологии ТСМ значительную роль играют взаимодействия клеток нервной ткани с другими клеточными популяциями (Domingues et al., 2016). Перициты, эндотелиальные клетки, фибробласты, гематогенные макрофаги и другие иммунные клетки оказывают влияние на аксональный рост в связи с модулирующими влияниями активированной астро- и микроглии. Перициты и фибробласты являются основными клетками не нейрональной природы в очаге повреждения. Соединения, продуцируемые данными клеточными популяциями, в число которых входит коллаген IV типа и протеогликан хондроитинсульфат ингибируют аксональный рост (Klapka and Müller, 2006). Тем не менее, рост аксонов через очаг повреждения больше зависит от наличия хемоаттрактивных факторов, стимулирующих рост, чем от данных ингибиторов. Например, клеточные трансплантаты на основе фибробластов способны поддерживать регенерацию аксонов после травмы спинного мозга, но только в присутствии специфических факторов роста, стимулирующих аксоны (Blesch and Tuszynski, 2007). В очаге повреждения после травмы спинного мозга факторы роста, необходимые для восстановления сенсорных аксонов, не продуцируются, но высокий уровень их содержания в составе трансплантационных биоматериалов вносит существенный вклад в стратегию терапевтического воздействия (Anderson et al., 2016).

Иммунные и провоспалительные клетки оказывают активное действие на рост аксонов после повреждения ЦНС. Нейтрофилы, поступившие из крови, и микроглия активируются в течение первых 24 часов после ТСМ. Вскоре после этого (через 2-3 сут) моноциты крови мигрируют в место повреждения, где дифференцируются в макрофаги, которые становятся фенотипически и морфологически неотличимыми от активированной микроглии (Donnelly and Popovich, 2008). Макрофаги принимают активное участие в восстановлении ткани после повреждения ЦНС (Horn et al., 2008). Фенотип макрофагов определяется микроокружением и может изменяться в ответ на поступление новых сигнальных молекул (Stout and Suttles, 2004). Данная «функциональная адаптация» позволяет макрофагам принимать участие во всех фазах восстановления, способствуя

воспалительному процессу и репарации ткани, усилению пролиферации клеток и экспрессии противовоспалительных цитокинов. Однако при активации вне данной последовательности макрофаги могут прерывать различные фазы восстановления, а их продолжающаяся активация может привести к дезадаптивному хроническому воспалению и дисфункциональному заживлению травмы (Werdin et al., 2009; Nathan and Ding, 2010). При ТСМ активируются макрофаги с различными функциональными фенотипами (Kigerl et al., 2009; David and Kroner, 2011; Shechter and Schwartz, 2012; Ren and Young, 2013; Thawer et al., 2013). В период острой воспалительной реакции после повреждения основная часть макрофагов представлена фенотипами M1 и M2a (Lech and Anders, 2013). Макрофаги типа M1 секретируют провоспалительные цитокины (IL-1β, IL-6, TNF-α), тогда как макрофаги M2a экспрессируют противовоспалительные молекулы, такие как аргиназа-1 (Novak and Koh, 2013a). Посредством высвобождения провоспалительных цитокинов макрофаги типа M1 привлекают нейтрофилы в область травмы, и усиливают воспалительный ответ, способствуя удалению поврежденных тканей. В тоже время, макрофаги M1 проявляют усиленную фагоцитарную активность в отношении поврежденных клеток, уничтожают бактерии, а также утилизируют отработанные нейтрофилы. Макрофаги M2a инициируют фазу восстановления посредством высвобождения противовоспалительных цитокинов, увеличивают пролиферацию и миграцию клеток посредством высвобождения аргиназы-1 и способствуют началу формирования новой ткани посредством секреции различных факторов роста (Novak and Koh, 2013a; Novak and Koh, 2013b). В то же время в подострый период макрофаги продолжают секретировать провоспалительные цитокины, но начинается экспрессия IL-10, которую обеспечивают макрофаги типа M2b (Mantovani et al., 2004; Martinez et al., 2008, Lech and Anders, 2013). На более поздних стадиях восстановления M2b-опосредованное высвобождение IL-10, вероятно, стимулирует активацию макрофагов M2c, о чем свидетельствует повышенная экспрессия прототипического маркера M2c, трансформирующего фактор роста-β (TGF-β) (Mantovani et al., 2004, Novak and Koh, 2013a). В период

ремоделирования нервной ткани преобладают, главным образом, макрофаги M2c, о чем свидетельствует высокая экспрессия TGF-β и CD206 (рецептор маннозы) с одновременным снижением активности аргиназы-1 (Lech and Anders, 2013, Novak and Koh, 2013a). При успешном восстановлении ткани число макрофагов возвращается к нормальному уровню в течение трех месяцев после повреждения (Sindrilaru et al., 2011).

Таким образом, после ТСМ все популяции глиальных клеток прямо или косвенно усиливают воспалительные процессы, усугубляя повреждение спинного мозга, но одновременно с этим индуцирют процессы репарации, способствуя восстановлению его функций (Hai-feng Wang, 2017).

1.3. Методы и подходы к терапии травматического повреждения спинного мозга

На сегодняшний день накоплен значительный объём экспериментальных и клинических данных, свидетельствующих о существенном, но ограниченном самовосстановлении спинного мозга после ТСМ. Самопроизвольная регенерация происходит на первых этапах после повреждения, но снижается через несколько недель (von Meyenburg et al., 1998). При этом потенциал самовосстановления строго ограничен, что может быть связано с местным высвобождением специфических белков-ингибиторов, которые блокируют рост нейритов (Schwab and Caroni, 1988). Повреждение спинного мозга не сопровождается образованием новых нейронов, однако происходит пролиферация клеток-предшественников в центральном канале спинного мозга, которые затем дифференцируются в глиальные клетки (Azari et al., 2005; Horky et al., 2006; Yang et al., 2006; Vessal et al., 2007).

После ТСМ наблюдаются процессы частичной спонтанной ремиелинизации, при этом можно достичь восстановления проводимости аксонов и без ремиелинизации, даже если денудированные аксоны сохраняются в обширной области демиелинизации. Известно, что для восстановления проводимости требуется усиление экспрессии Na^+-каналов по всей длине

демиелинизированных междоузлий. Поскольку миелинизация играет важную роль в эффективном распространении потенциала действия и защите аксонов, индукция ремиелинизация является перспективным подходом для терапии ТСМ (Waxman, 2006). Ранее показано, что при трансплантации генетически модифицированных клеток-предшественников нейронов (делеция гена, отвечающего за синтез ОБМ) (NPCs) наблюдается их дифференцировка в нейроны, астроглию и олигодендроциты, трансплантация способствует росту аксонов и предотвращает атрофию, сходным образом с клетками-предшественниками нейронов дикого типа (NSC). Однако, несмотря на позитивный эффект, трансплантация NPCs в повреждённый спинной мозг не приводит к восстановлению локомоторной активности, в отличии NSC дикого типа способных к синтезу основного белка миелина и восстановлению двигательных функций (Csobonyeiova et al., 2019). Известно, что для восстановления двигательных функций после травмы поврежденный спинной мозг не нуждается в полной реконструкции. Так при формировании ТСМ у кошек, двигательная активность практически восстанавливается при сохранности 5-10% миелина белого вещества, локализованного на границе с мягкой мозговой оболочкой спинного мозга (Bunge et al., 1993). Ремиелинизация оставшихся аксонов белого вещества спинного мозга способствует преодолению функционального дефицита – частичному восстановлению функций кишечника, мочевого пузыря и дыхания. Поэтому восстановление белого вещества спинного мозга путем предотвращения вторичного повреждения, вероятно, является одним из терапевтических подходов.

На сегодняшний день в литературе представлено два основных подхода для усиления процессов ремиелинизации: клеточная трансплантация и стимулирование процессов репарации. В качестве источников клеток для трансплантации наиболее активно исследуют Шванновские клетки, клетки обонятельной луковицы, предшественники нейронов и олигодендроцитов, стромальные клетки и эмбриональные стволовые клетки (Biernaskie et al., 2007).

Трансплантация клеток-предшественников олигодендроцитов при повреждении спинного мозга усиливает процессы ремиелинизации и способствует улучшению двигательной активности (Duncan et al., 2009).

Стромальные клетки из красного костного мозга при введении в боковой желудочек головного мозга новорожденных мышей дифференцируются в астроциты (Kopen et al., 1999), а при культивировании в соответствующих условиях они могут дифференцироваться в нейроны (Woodbury et al., 2000). Пересадка красного костного мозга в демиелинизированный спинной мозг крыс приводит к довольно обширной ремиелинизации (Sasaki et al., 2001). Тем не менее, концепция трансдифференцировки (способность стволовых клеток, не принадлежащих к ЦНС, дифференцироваться в клетки нервной системы) столкнулась с существенным противоречием, поскольку явная трансдифференцировка может просто отражать эффекты, достигнутые вследствие длительного культивирования *in vitro* (D'Amour and Gage, 2002; Morshead et al., 2002).

Концепция трансплантации клеток поднялась на совершенно новый уровень с тех пор, как стали доступны эмбриональные стволовые клетки (ЭСК). ЭСК мыши исследуют более 20 лет, но исследования ЭСК человека все еще находятся на ранней стадии. Ряд уникальных особенностей делают ЭСК перспективными кандидатами для трансплантации с целью восстановления спинного мозга после ТСМ. Во-первых, ЭСК способны к неограниченному делению сохраняя при этом генетическую стабильность (хотя важно исследовать кариотипы культивируемых клеток перед их трансплантацией, поскольку любой тип делящихся клеток, многократно пассированный в искусственных условиях, может стать генетически нестабильным). Во-вторых, ЭСК, будучи плюрипотентными, могут дифференцироваться в клетки любого типа в организме млекопитающих и, следовательно, представляют собой невероятный ресурс для восстановления поврежденной ткани (Donovan and Gearhart, 2001). В-третьих, геномом ЭСК можно широко манипулировать, что невозможно при использовании стволовых клеток, полученных от взрослых организмов, клеток-предшественников или

соматических клеток. В лабораторных условиях они могут быть сконструированы для контролируемой экспрессии различных факторов или генов, имеющих терапевтический потенциал. Например, при трансплантации в очаг повреждения спинного мозга ЭСК способны секретировать нейротрофические факторы, такие, как нейротрофин-3 (NT3) и нейротрофический фактор мозга (BDNF), которые обеспечивают нейропротекцию и стимулируют олигодендроциты к пролиферации, способствуя процессам ремиелинизации аксонов (Enzmann et al., 2006). В-четвертых, они гораздо реже, чем другие клетки, вызывают иммунный ответ реципиента и поэтому менее уязвимы для отторжения (Li et al., 2004). Более того, генетические манипуляции могут сделать их еще менее иммуногенными. Таким образом, ЭСК имеют огромный потенциал в биомедицинских исследованиях при терапии ТСМ и широкого спектра других заболеваний.

Регуляция микросреды поврежденного спинного мозга считается одной из перспективных терапевтических стратегий. Целью является повышение выживаемости трансплантированных клеток и индукция внутреннего потенциала эндогенных стволовых клеток. Время трансплантации клеток является одним из наиболее важных моментов, которые необходимо учитывать, поскольку клеточная трансплантация в остром периоде ТСМ приводит к частому отторжению клеток вследствие наличия мощной провоспалительной среды, а трансплантация в хроническом периоде приводит к низкой частоте приживления и восстановления функций из-за глиального рубца (Kim et al., 2013).

Стимулирование процессов эндогенной репарации рассматривается в качестве перспективного подхода для ремиелинизации. Конечная цель состоит в том, чтобы использовать потенциал эндогенных стволовых клеток для замены утраченных клеток, не прибегая к трансплантации. Усиление пролиферации и дифференцировки эндогенных нейрональных/прогениторных клеток является одним из перспективных подходов, позволяющих избежать проблем этического характера и возможных проблем, связанных с клеточными манипуляциями *in vitro*. Не так давно считалось, что нервная система не имеет потенциала к пролиферации и самообновлению. Однако на сегодняшний день известно, что

ЦНС взрослых организмов содержит клетки-предшественники или стволовые клетки, которые постоянно дифференцируются в нервные клетки. Клетки-предшественники олигодендроцитов составляют 5-8% от всей популяции глиальных клеток ЦНС (Vaughn and Peters, 1968), активно пролиферируют при демиелинизации и дифференцируются в олигодендроциты, утраченные в результате повреждения спинного мозга (Raff et al., 1983), эксайтотоксичности или вирусной инфекции (Gensert и Goldman, 1997). Нейроны постоянно образуются как минимум в двух регионах головного мозга: в субвентрикулярной зоне (которая включает в себя выстилки боковых желудочков) и в субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа. Кроме того, стволовые клетки находятся вокруг центрального канала спинного мозга, в области паренхимы (Horner and Gage, 2000). Эпендимальные клетки спинного мозга во время эмбрионального развития образуются из нейроэпителиальных стволовых клеток, расположенных в вентральной нервной трубке. У низших позвоночных клетки эпендимы играют важную роль в регенерации, наблюдаемой после перерезки спинного мозга. Однако у млекопитающих *in vivo* они дифференцируются только в астроциты и олигодендроциты, но *in vitro* в соответствующих условиях способны к образованию нейросфер (Shihabuddin et al., 2000; Vroemen et al., 2003). Более того, при трансплантации нейрональных стволовых клеток, полученных из ЦНС, или недифференцированных нейрональных клеток-предшественников, полученных из ЭСК, в интактный или поврежденный спинной мозг, наблюдаются процессы дифференцировки данных клеточных популяций в зрелые нейроны (McDonald et al., 1999; Han et al., 2002). Следовательно, в организме присутствует набор факторов, которые ограничивают или предотвращают дифференцировку эндогенных стволовых клеток в новые нейроны (Cao et al., 2001, 2002), а выявление данных факторов и их ингибирование является перспективным направлением в терапии ТСМ. В качестве стимуляторов пролиферации эндогенных стволовых клеток хорошо зарекомендовали себя факторы роста фибробластов (FGFs), инсулиноподобный фактор роста 1 (S-IGF-1) и цилиарный нейротрофический фактор (CNTF) (Tripathi and McTigue, 2008).

Успешной регенерации после ТСМ препятствует ряд ингибирующих молекул, высвобождающихся в результате повреждения ЦНС. В конце 1980-х годов Caroni и Schwab продемонстрировали, что после повреждения ЦНС, патологический миелин олигодендроцитов является одним из мощных ингибиторов роста нейритов. В результате исследований было обнаружено две ингибирующие белковые фракции (35 и 250 кДа), впоследствии идентифицированные как Nogo-A. Для ингибирования Nogo-A было разработано моноклональное антитело IN-1, использование которого приводит к умеренной регенерации аксонов и восстановлению локомоторной активности после ТСМ (Caroni and Schwab, 1988b). Хондроитинсульфат протеогликан играет основную роль в ингибировании регенерации аксонов при повреждении ЦНС. Применение фермента хондроитиназы ABC отщепляет ингибирующие гликозаминогликаны от белкового ядра ХСПГ, тем самым нейтрализуя ингибирующие аксональный рост свойства ХСПГ. Локальное и системное введение хондроитиназы ABC приводит к росту нейритов и функциональному восстановление при повреждении спинного мозга (Shields et al., 2008). В настоящее время под пристальным вниманием находится роль белков, способствующих аксональному росту (неогенин, нетрин, семафорин), их сигнальные пути играют ключевую роль в регуляции регенерации аксонов (Belegu et al., 2007; Shifman et al., 2009). Также охарактеризован ряд нейротрофинов, стимулирующих процессы регенерации аксонов в области повреждения, таких, как фактор роста фибробластов-2 (FGF-2), глиальный фактор роста-2 (GGF-2), GDNF и фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) (Zai et al., 2005).

На сегодняшний день накоплен значительный арсенал терапевтических стратегий, нацеленных на восстановление физиологических функций после ТСМ. Основной целью нейропротекторной терапии является предотвращение вторичного повреждения и уменьшение его патологического действия.

Ранее проведено исследование синтетического трипептида (Lys-Asp-Ile), на предмет его нейропротекторных свойств и способности стимулировать рост нейритов. Эксперименты на эмбриональных нейрокортикальных нейронах

человека показали, что данный трипептид является универсальным и мощным ингибитором N-метил-D-аспартата (NMDA), α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты (AMPA) и рецепторов глутамата (Moykkynen et al., 2005), а также модулирует синаптическую пластичность и обеспечивает защиту нейронов гиппокампа крыс от повреждения (Liebkind et al., 2003).

Кальпаины — это кальций-зависимые цистеиновые протеазы, обладающие способностью расщеплять миелин, большое количество белков цитоскелета, рецепторы факторов роста, факторы транскрипции и белки, связанные с клеточным циклом (Onose et al., 2009). Повышение уровня внутриклеточного кальция, сопровождающего ТСМ, приводит к чрезмерной активации кальпаинов, а его неконтролируемая активность способствует деградации ключевых компонентов цитоскелета, мембраны и миелина. В сочетании с активностью каспаз данные процессы провоцируют клеточную гибель и апоптоз (Sribnick et al., 2007). Экспериментальные исследования с использованием ингибиторов кальпаина (4-хинолинон-2-карбоксамиды) продемонстрировали снижение апоптотической гибели клеток, уменьшение глиоза и улучшение неврологического статуса (Nam et al., 2008).

В последние годы проведен ряд клинических испытаний препаратов для лечения пациентов с ТСМ, в том числе метилпреднизолона, налоксона, тирилазад мезилата, моносиалоганглиозида GM1, лазароидов, лития и интерлейкина-10. В ходе исследований только метилпреднизолон продемонстрировал некоторую клиническую эффективность. Метилпреднизолон является одним из наиболее часто используемых коммерческих препаратов при терапии ТСМ, его фармакологическое действие основано на противовоспалительных эффектах стероидов. Метилпреднизолон является сильнодействующим синтетическим глюкокортикоидом, который регулирует высвобождение противовоспалительных цитокинов, оказывает антиоксидантный эффект, уменьшает экспрессию провоспалительных цитокинов (TNF-α, IL-1 и IL-6), что в комплексе способствует выраженной нейропротекции при моделировании ТСМ на животных (Pan et al., 2002). Однако, в результате применения высоких доз метилпреднизолона в

течение 48-часов при терапии пациентов с острой травмой спинного мозга, наблюдается ряд сопутствующих инфекционных осложнений (тяжелый сепсис и пневмония), данные проявления побочного действия препарата несоизмеримо велики в сравнении с восстановлением неврологических функций. Однако более короткий 24-часовой курс внутривенного введения метилпреднизолона вызывает гораздо меньшую частоту осложнений, с выраженным улучшением показателей локомоторных функций. Методология применения данного препарата в течение последних 30 лет является источником противоречивых данных относительно его эффективности. Лишь в 2012 году метаанализ, включающий 6 ключевых рандомизированных клинических исследований, установил, что у пациентов, получавших метилпреднизолон в течение первых 8 ч после травмы, наблюдается улучшение двигательной активности, что может иметь колоссальные функциональные последствия для восстановления пациентов. В результате предложено использовать метилпреднизолон пациентам в течение первых 8 часов после травмы с 24-часовым курсом внутривенного введения, без значительных медицинских противопоказаний (Okutan et al., 2007).

Еще одним из перспективных терапевтических подходов является электростимуляция, способствующая выраженному восстановлению двигательных и вегетативных функций после травматического повреждения нервной системы. В клинической практике уже применяют кохлеарные имплантаты для восстановления слуха, электростимуляцию двигательных нейронов для восстановления дыхания и захвата рук и глубокую электростимуляцию головного мозга для лечения симптомов болезни Паркинсона (McDonald and Sadowsky, 2002). Электростимуляцию также применяют в качестве компенсаторной терапии для предотвращения атрофии, возникающей в результате паралича (de Abreu et al., 2009). Эргометрия с использованием функциональной электростимуляции (ФЭС) (при которой стимуляция позволяет парализованным конечностям находиться в режиме ходьбы) в настоящее время применяется в клинике после ТСМ. Большое количество публикаций демонстрируют практические преимущества ФЭС, включая увеличение

мышечной массы (Scremin et al., 1999), более высокую плотность кости (Frotzler et al., 2009), улучшение сердечно-сосудистых функций (Faghri et al., 1992), и функций кишечника (Johnston et al., 2005), снижение спастичности (Daly et al., 1996) и уменьшение инфекций мочевого пузыря (Kutzenberger et al., 2005). В настоящее время накоплено большое количество экспериментальных данных, свидетельствующих о том, что электростимуляция приводит к некоторому восстановлению периферической и центральной нервной системы после травмы. У экспериментальных животных после ТСМ применение ФЭС способствует частичному восстановлению ходьбы с поддержкой массы тела (Lavrov et al., 2008). При перерезке седалищного нерва у крыс применение электростимуляции способствует высвобождению BDNF из двигательных нейронов, повышению экспрессии белков, способствующих регенерации сенсорных аксонов и улучшению реиннервации двигательных функций через культю дистального нерва (Ahlborn et al., 2007). В модели пересечения дорсального корешка спинного мозга на уровне Т8 электростимуляция приводит к регенерации аксонов ЦНС из ганглиев дорсальных корешков посредством передачи сигналинга через цАМФ (Udina et al., 2008). Электростимуляция кортикальных пирамидных нейронов у крыс усиливает образование синапсов в спинном мозге во время эмбрионального развития (Brus-Ramer et al., 2007). При этом электростимуляцию можно использовать в сочетании с другими методами лечения для улучшения функционального восстановления после ТСМ.

Таким образом, для успешного восстановления спинного мозга после повреждения необходимо использование большого комплекса стратегий, при этом терапия должна фокусироваться на нескольких мишенях и применяться через определенные интервалы времени. Комплексное восстановление должно включать мощную антивоспалительную терапию, предотвращение вторичного повреждения и стимулирование эндогенного регенераторного потенциала ЦНС.

1.4. Роль омега-3 жирных кислот в центральной нервной системе в норме и при развитии патологических состояний

К основным омега-3 полиненасыщенным жирным кислотам (ПНЖК) относятся альфа-линоленовая кислота (АЛК), эйкозапентаеновая кислота (ЭПК), докозапентаеновая кислота (ДПК) и докозагексаеновая кислота (ДГК). После попадания в организм АЛК преобразуется в ЭПК, а затем в ДПК и, наконец, в ДГК, при этом, ЭПК и ДГК – это незаменимые омега-3 ПНЖК, которые являются высокоактивными липидами, направленное действие которых осуществляется посредством взаимодействия и активации рецепторов GPR120. Показано, что стимуляция рецептора GPR120 приводит к повышению внутриклеточных уровней Ca^{2+}, данный рецептор функционирует как сенсор омега-3 жирных кислот в провоспалительных макрофагах и зрелых адипоцитах. Через GPR120, ЭПК и ДГК оказывают мощное противовоспалительное действие путем ингибирования Toll-подобных рецепторов (TLR) и TNFα. Механизм GPR120-опосредованного противовоспалительного действия включает ингибирование трансформации фактора роста β-активированной киназы 1 посредством β-аррестин-2-зависимого взаимодействия (Hull, 2011).

Омега-3 ПНЖК, в частности ЭПК и ДГК, служат предшественниками мощных биологически активных и противовоспалительных липидов, в том числе резолвинов (Rv), протектинов (PD) и марезинов (MaR). Однако, молекулы Rv, PD и MaR не ингибируют запуск воспалительного каскада, а оказывают направленное действие на сигнальные пути для более успешного разрешения воспалительной реакции. К настоящему времени охарактеризовано девять молекул резолвинов, а также два протектина и два вида марезинов (Куликов и др., 2012).

Резолвины делятся на два класса, причем резолвины E-серии (RvE1, RvE2 и RvE3) синтезируются из ЭПК, а резолвины D-серии (RvD1–RvD6) получают из ДГК. Резолвины E-серии снижают воспаление, регулируют инфильтрацию полиморфноядерных нейтрофилов путем блокирования трансэндотелиальной

миграции, снижают активность дендритных клеток, которые являются мощными антигенпрезентирующими клетками и вызывают опосредованные Т-клетками воспалительные реакции, а также регулируют экспрессию IL-12 (Куликов и др., 2012).

Протектины (NPD1 и AT-PD1) ингибируют хемотаксис полиморфноядерных лейкоцитов, агрегацию тромбоцитов, образование активных форм кислорода (АФК) и активность ЦОГ-2 в нейтрофилах.

Марезины (MaR1 и MaR2) образуются путем направленного действия липоксигеназы-12 на ДГК. Марезин 1 вырабатывается главным образом макрофагами и обладает сильным противовоспалительным, рассасывающим, обезболивающим и ранозаживляющим действием. Основными клеточными мишенями для действия марезина 1 являются клетки гладких мышц сосудов и эндотелиальные клетки, в которых он ингибирует выработку аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ). Марезин 2 уменьшает инфильтрацию нейтрофилов и усиливает макрофаг-опосредованный фагоцитоз мертвых и поврежденных клеток. Две родственные структуры, называемые марезиноподобными медиаторами (MaR-L1 и MaR-L2), образуются, когда марезины, продуцируемые макрофагами, высвобождаются и подвергаются действию тромбоцитов (Tang et al., 2018).

Наряду с описанными выше механизмами системного антивоспалительного действия ПНЖК, в центральной нервной системе данные соединения демонстрируют ряд уникальных тканеспецифических эффектов.

Наиболее высокий уровень содержания в общем составе липидов мозга приходится на омега-3 и омега-6 ПНЖК, в особенности на ДГК и арахидоновую кислоту (АА) (Hashimoto et al., 2017). Комплекс жирных кислот, входящих в состав нейрональных мембран, оказывает влияние на ряд клеточных функций посредством прямого воздействия на биофизические свойства мембраны, а также путем создания пула предшественников, выступающих в качестве сигнальных молекул и медиаторов, образующихся при метаболизме липидов. На сегодняшний день большое количество исследований подтверждают, что омега-3 ПНЖК

способны прямо или косвенно модулировать неврологическую активность на разных уровнях нервной системы, используя множество разнообразных механизмов действия (Dyall and Michael-Titus, 2008). Омега-3 ПНЖК конкурируют с воспалительными и пиретическими свойствами, присущими омега-6 ПНЖК, посредством вытеснения арахидоновой кислоты из фосфолипидов, присутствующих в клеточных мембранах. Кроме того, омега-3 ПНЖК конкурируют с ферментами, которые способствуют превращению арахидоновой кислоты в биоактивные молекулы эйкозаноиды. При увеличении потребления с пищей омега-3 ПНЖК, по сравнению с омега-6 ПНЖК, наблюдается снижение активности моноцитов, нейтрофилов и эозинофилов при осуществлении синтеза различных медиаторов воспаления, а также ингибирование высвобождения тромбоксана-А2 – мощного стимулятора коагуляции. Ранее установлена способность омега-3 ПНЖК регулировать различные пути передачи сигнала. Например, ЭПК и ДГК ингибируют cAMP-зависимую киназу, протеинкиназу С и Ca2+/кальмодулин-зависимую протеинкиназу (Mirnikjoo et al., 2001; Seung Kim et al., 2001), а также активацию митоген-активированной протеинкиназы в гиппокампе (Mirnikjoo et al., 2001). Установлено, что омега-6 ПНЖК намного менее эффективны при ингибировании активности митоген-активированной протеинкиназы по сравнению с омега-3 жирными кислотами. Дефицит омега-3 приводит к нарушению холинергической нейропередачи в гиппокампе крыс (Aid et al., 2003), а депривация – на 10% снижает связывание мускаринового рецептора с агонистами (Dyall and Michael-Titus, 2008).

В ЦНС омега-3 модулируют дофаминергическую, серотонинергическую и холинергическую нейротрансмиссию. Хронический дефицит омега-3 приводит к значительному снижению уровня высвобождения дофамина (Hashimoto et al., 2017) и образования везикул для накопления дофамина в лобной коре головного мозга (Zimmer et al., 2000). Напротив, увеличение потребления омега-3 значительно увеличивает содержание дофамина в данном регионе мозга (Chalon et al., 1998). Также дефицит омега-3 приводит к снижению интенсивности

высвобождения серотонина в гиппокампе крыс при стимулировании фенфлурамином (препарат, регулятор аппетита) (Kodas et al., 2004). В недавнем исследовании влияния добавок омега-3 ПНЖК на серотонинергическую нейротрансмиссию у мышей, подвергшихся умеренному стрессовому воздействию (Vancassel et al., 2008), установлено, что стресс вызывает значительное снижение уровня серотонина в лобной коре, полосатом теле и гиппокампе, при добавлении в диету омега-3 ПНЖК наблюдается восстановление уровня серотонина до контрольных показателей. На модели латеральной гемисекции спинного мозга показано, что повреждение приводит к снижению плотности распределения серотонинергических аксонов в ростральном и каудальном сегменте спинного мозга. При этом введение ДГК стимулирует общую плотность распределения серотонинергических аксонов, что способствует модуляции пластичности спинного мозга после повреждения (Ciranna, 2006). Кроме регулирования процессов нейроплатичности, введение ДГК оказывает влияние на синаптическую пластичность, выступая в роли модулятора синаптической передачи, путем усиления синтеза специфических пресинаптических и постсинаптических белков и повышения экспрессии синаптофизина. Синаптофизин является трансмембранным гликопротеидом, его основная роль состоит в образовании синаптических везикул и их экзоцитозе, кроме того он принимает участие в образовании каналов в мембране синаптических везикул и в высвобождении ряда нейротрансмиттеров. Ранее показано, что после гемисекции или перерезки спинного мозга активность синаптофизина снижается в каудальном сегменте спинного мозга (Macias et al., 2009), при этом введение ДГК стабилизирует его активность на уровне интактных животных (López-Dolado et al., 2013).

После острого неврологического повреждения омега-3 ПНЖК оказывают нейропротекторное и нейрорегенеративное действие. Развитие патологического процесса после травмы спинного мозга инициирует молекулярные события, часть которых регулируется действием ПНЖК. Первичная травма приводит к эксайтотоксичности (Hall and Braughler, 1986), которая активирует цитозольную

фосфолипазу А2 (cPLA2), высвобождающую АА, что приводит к образованию провоспалительных простагландинов. Другим ключевым событием при нейротравме является перекисное окисление липидов (Azbill et al., 1997), которое вызывает прямое повреждение структуры нейрональной мембраны, а также индуцирует микрососудистое повреждение и вторичную ишемию (Hall and Springer, 2004). Кроме того, перекисное окисление липидов может инициировать дальнейшие побочные эффекты, потенциально приводящие к окислению белка и гидроксилированию ДНК и РНК (Kasai et al., 1991), что приводит к дальнейшему разрушению тканей и гибели клеток (Xu et al., 2005).

Ранее на модели транзиторной ишемии спинного мозга крыс, показано, что введение омега-3 жирных кислот снижает количество поврежденных нейронов и улучшает функциональный прогноз (Lang-Lazdunski et al., 2003). Также установлено, что омега-3 ПНЖК, в частности ЭПК и ДГК обладают терапевтическим потенциалом, направленным на уменьшение эксайтотоксичности (Lauritzen et al., 2000; Blondeau et al., 2002), снижение воспалительных процессов (Mori and Beilin, 2004), а также обладают выраженным антиоксидантным действием (Satkunendrarajah and Fehlings, 2013). ДГК модулирует активность трансмембранных рецепторов (G-белки), ионных каналов и ферментов, тем самым регулируя множество сигнальных каскадов, приводящих к их активации и/или инактивации (Salem et al., 2001). Быстрое действие ДГК может осуществляться посредствам ионных каналов. Например, ДГК способна блокировать повышение индукции глутамата вызванной деполяризацией, а также активацию глутаматных рецепторов приводящую к эксайтотоксичности. Данный механизм действия осуществляется за счет ингибирования вольтаж-чувствительных Na^+ и Ca^{2+} каналов (Vreugdenhil et al., 1996) и двухдоменных фоновых K^+ каналов, т. е. TREK-1, TREK-2 и TRAAK (Lauritzen et al., 2000). Также ДГК является лигандом ретиноидных рецепторов, в частности – рецептора RXR (de Urquiza et al., 2000), что способствует модуляции экспрессии генов, участвующих в процессах нейропротекции после повреждения спинного мозга (Schrage et al., 2006). Хронический дефицит омега-3 ПНЖК значительно снижает

активность Na^+/K^+ АТФазы в мозге крысы (Bourre et al., 1989), а также уменьшает эффективность сигналинга, связанного с G белками (Niu et al., 2004). Мембранно-связанный фосфолипид ДГК выполняет роль положительного модулятора биосинтеза фосфатидилсерина в нервной ткани, что имеет ключевое значение в механизмах выживаемости клеток после различных нейропатологических состояний (Hamilton et al., 2000). Было высказано предположение, что антиапоптотическое действие ДГК обусловлено индуцированием накопления фосфатидилсерина (Akbar and Kim 2002). В то же время, дефицит ДГК приводит к снижению уровня фосфатидилсерина, что указывает на регуляцию передачи клеточного сигналинга через фосфатидилсерин (Salem et al., 2001).

Системное введение ДГК животным с лигированием седалищного нерва снижает интенсивность и продолжительность нейрогенного болевого синдрома, приводит к более ранней стабилизации распределения веса, предотвращает холодовую аллодинию и дистрофические изменения в ткани денервированной конечности. ДГК снижает уровень активности субстанция P- и NO-ергической нейротрансмиссии и уменьшает астроцитоз в задних рогах спинного мозга. Анальгетическая активность ДГК при нейропатической боли, вероятно, связана с подавлением реактивного астроцитоза и ингибированием SP- и NO-сигнальных путей (Manzhulo et al., 2016). Внутривенное введение ДГК через 30 мин после компрессионной травмы спинного мозга или гемисекции значительно увеличивает выживаемость нейронов и олигодендроцитов, а также улучшает двигательную активность в течение 6 недель после травмы. Данная эффективность ДГК опосредована значительным снижением перекисного окисления липидов, окисления белков и РНК/ДНК, одновременно со значительным уменьшением индукции экспрессии COX-2 и рекрутирования макрофагов (Dyall and Michael-Titus, 2008).

Считается, что ключевая роль омега-3 ПНЖК заключается в производстве большого количества метаболитов и нейромедиаторов, принимающих активное участие в различных функциях нервной системы в норме и при развитии патологического процесса (Marcheselli et al., 2003; Mukherjee et al., 2004; Bazan,

2006). Докозагексаеновая кислота посредствам высокоактивных метаболитов модулирует экспрессию провоспалительных и противовоспалительных цитокинов. Так, под действием мембранно-связанной фосфолипазы А2 в определенных условиях наблюдается процесс образования свободной ДГК, которая в итоге метаболизируется в высокоактивные соединения – докозатриены (Echeverríaa et al., 2017). Данные соединения способны ингибировать провоспалительные цитокины и транскрипционные факторы, такие как TNF-α и NF-κB, что, с одной стороны, уменьшает экспрессию проапоптотических белков Bax и Bad, а, с другой стороны, увеличивает экспрессию антиапоптотических белков Bcl-2 и Bcl-xL (Hong et al., 2003). Нейропротектин D1, являющийся метаболитом ДГК, способен подавлять экспрессию провоспалительного фермента ЦОГ-2 и апоптоз в мозге мышей с болезнью Альцгеймера (Serhan et al., 2004). Кроме того, в головном мозге ДГК метаболизируется до эндоканнабиноидоподобного производного этаноламида – синаптамид (N-докозагексаеноилэтаноламид, DHEA), который стимулирует рост нейритов, способствует дифференцировке нервных стволовых клеток и повышает глутаматергическую синаптическую активность. Синаптамид способствует уменьшению нейровоспаления путем ингибирования воспалительных реакций макрофагов; эффективность синаптамида, вероятно, является результатом направленной активации PPARα (рецепторы активируемые пероксисомными пролифераторами). В конечном счете, данные метаболиты способствуют более успешной нейропротекции и выживанию клеток при развитии патологических процессов (Mukherjee et al., 2004; Bazan 2006).

Таким образом, применение ДГК при травме центральной и периферической нервной системы имеет значительный терапевтический потенциал, основанный на широком спектре механизмов действия данного соединения и практически полном отсутствии побочных эффектов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В настоящем исследовании использован комплекс современных экспериментальных подходов, включающих применение экспериментально-физиологических (мониторинг двигательной активности), общеморфологических (окраска гематоксилин-эозином), иммуногистохимических и иммуноцитохимических (выявление широкого спектра нейрональных и глиальных маркеров) и биохимических (иммуноферментный анализ, выявление супероксиддисмутазы) методов исследования. Использованы первичные культуры микро- и астроглиальных клеток, а также световая и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия.

2.1. Характеристика используемой экспериментальной модели

В работе использовали самок крыс линии Вистар (240±20 г, возраст 2 месяца, n=42). Крыс содержали по 7 особей в одной клетке с произвольным доступом к еде и воде, при постоянной температуре (23±2 °C) и влажности (55±15%) с 12-часовым циклом свет/темнота (освещение в 7:00 утра). Крыс приручали по 5 мин один раз в день в течение 5 дней перед экспериментом. 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 (Т8-Т10). Ламинэктомия 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). Животные в ложнооперированной группе подвергались хирургическому вмешательству, идентичному описанному, но без травмы спинного мозга.

Мышцы и кожа сшивались послойно, затем наносили антибактериальный спрей. Всех животных оставляли для восстановления на теплой подложке (37 ºС) до восстановления терморегуляции. Затем они были возвращены в клетки со свободным доступом к еде и воде. Животным помогали в выделении мочи два раза в день до восстановления функции мочевого пузыря.

В исследовании использовали три группы животных: группа «ЛО» (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 докозагексаеновой кислотой. Очищенный препарат ДГК, 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. Животным в группах «ЛО» и «Травма» подкожно вводили 0.9% физиологический раствор ежедневно в течение 3 недель после операции. При этом по 7 животных из каждой группы выводили из эксперимента на 7 и 35 сут после операции.

2.2. 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 (табл. 1), специально разработанной для крыс с повреждениями спинного мозга (Basso et al., 1995). Эта шкала оценивает 10 различных категорий, которые варьируют от движения конечностей до положения хвоста и включают подробные наблюдения за суставами, движениями, положением стопы и координацией. В настоящем эксперименте каждое животное тестировали в открытом поле в течение 5 мин

один раз в неделю вплоть до 5 недели после травмы. У ложнооперированных животных оценка локомоторной активности составляет 21 балл.

Таблица 1 – Шкала «BBB» для оценки двигательной активности

Балл	**Характеристика локомоторной активности**
0	отсутствуют движения в задних конечностях
1	вялые движения в одном или двух суставах (обычно бедро или колено)
2	бодрые движения в одном суставе и/или бодрые движения в одном суставе и вялые движения в одном из других суставов
3	бодрые движения в двух суставах
4	вялые движения всех трёх суставов
5	вялые движения двух суставов и интенсивное движение в третьем
6	бодрые движения в двух суставах и вялое движение в третьем
7	бодрые движения в трёх суставах задней части тела
8	передвижение с опорой веса или опора всем весом тела на подошвенную поверхность лапы
9	вес удерживается подошвенными поверхностями лап и только когда животное стоит неподвижно
10	редкие удержания веса во время ходьбы с опорой на подошвы, отсутствие координации между передними и задними лапами
11	частые удержания собственного веса во время ходьбы с опорой на подошвы и отсутствие координации между передними и задними лапами
12	частые удержания собственного веса во время ходьбы с опорой на подошвы и случайная координация между передними и задними лапами
13	частые удержания собственного веса во время ходьбы с опорой на подошвы и частая координация между передними и задними лапами
14	стабильные удержания собственного веса во время ходьбы с опорой на подошвы и хорошая координация между передними и задними лапами
15	стабильные подошвенные движения и координация между передними и задними лапами и отсутствие пальцевого зазора или случайный пальцевой зазор после перемещения, преобладающая позиция лап – параллельно телу
16	стабильные подошвенные движения и стабильная координация передними и задними лапами отсутствие ротации лап после ходьбы
17	уверенные, качественные движения лап с использованием подошв, качественная координация в передних и задних лапах, отсутствует клиренс большого пальца во время ходьбы, после уверенных

	перемещений конечностей преобладающая позиция лап - параллельно телу
18	качественные движения лап с использованием подошв, качественная координация в передних и задних лапах, отсутствует клиренс большого пальца во время ходьбы, после уверенных перемещений конечностей преобладающая позиция лап параллельно к началу и ротирована к концу контакта
19	качественные движения лап с использованием подошв, качественная координация в передних и задних лапах, отсутствует клиренс большого пальца во время ходьбы, после уверенных перемещений конечностей преобладающая позиция лап параллельно к началу и к концу контакта, хвост всё время в нижней части тела
20	уверенная ходьба подошвами и хорошо координированная походка, хороший клиренс большого пальца, преобладающая позиция лап параллельно до и после контакта, уверенно поднимает хвост, нестабильность позвоночника
21	уверенная походка подошвами и координированная ходьба, стабильный клиренс большого пальца, позиция лап параллельно всё время, хорошо поднимает хвост, стабильный позвоночник

2.3. Гистологические методы исследования

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 20 мин, 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).

2.4. 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 (PBS), 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. Затем материал заливали в парафин по стандартной методике (Роскин, Левинсон, 1957).

Для иммуногистохимического исследования получали продольные парафиновые серийные срезы спинного мозга толщиной 10 мкм. Затем депарафинировали и инкубировали в 3% перекиси водорода для блокирования эндогенной пероксидазы перед иммуногистохимическим окрашиванием. После трех промывок в PBS 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 спинного мозга инкубировали в течение 24 ч при +4 °C с первичными антителами, представленными в таблице 2. Для контроля иммуногистохимической реакции использовали отрицательный контроль с PBS вместо первичного антитела. 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 2 – Характеристика первичных антител

Маркер	**Антитела**	**Производитель**	**Рабочее разведение**
Основной белок миелина	MBP	Thermo Scientific (RB-1460-A), США	1:500
Катехоламинергические аксоны	TH	Vector Laboratories (T 489), США	1:100
Пролиферация и репарация клеток	PCNA	Abcam (ab29), США	1:2000
Астроглия	GFAP	Vector Laboratories (G 805), США	1:200
Белок виментин	Vimentin	Abcam (ab92547), США	1:1000
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

2.5. Количественная обработка данных

Для анализа использовали не менее 70 изображений исследуемых маркеров для каждой группы животных. Изображения были проанализированы в трех областях: центр травмы (±250 мкм от центра повреждения), ростральный сегмент 700 мкм и каудальный сегмент 700 мкм от центра повреждения (рис. 1). Количество PCNA-позитивных элементов определяли в каждом десятом срезе спинного мозга с помощью программного обеспечения ImageJ (NIH, США). Количество иммунопозитивных клеток/мм^3 рассчитывали по формуле: $d=(n*10^6)/(S*10)$, где d – плотность клеток в мм^3; n – количество иммунопозитивных клеток; 10^6 – коэффициент для преобразования мкм^2 в мм^2; S – площадь области исследования в мкм^2; 10 – толщина среза в мкм.

Оценку площади иммуногистохимического окрашивания основного белка миелина, виментина, TH-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 (NIH, 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 необходимую область, затем рассчитывали процент окрашенной области относительно не окрашенной.

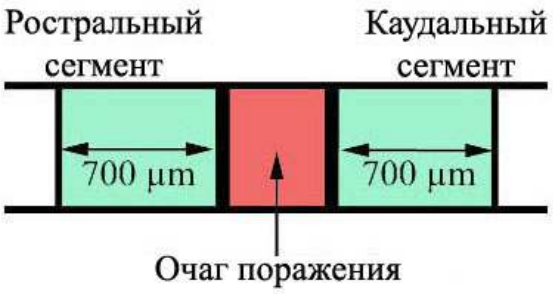

Рисунок 1 – Сегменты, используемые для подсчета активности исследуемых маркеров.

2.6. 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 (Gibco, США) и пенициллином стрептомицином (Gibco, США) во флаконе T75 и выращивали с 5% CO_2 в инкубаторе при 37 ºC. Для пассирования клеток использовали 0.05% трипсин-ЭДТА (Gibco, США) в течение 5 минут. Микроглию выявляли с помощью иммуноцитохимического анализа на iba-1 (Abcam (ab108539), США) (рис. 2А), а астроциты с помощью окрашивания на GFAP (Vector Laboratories (VP-G805), США) (рис. 2Б).

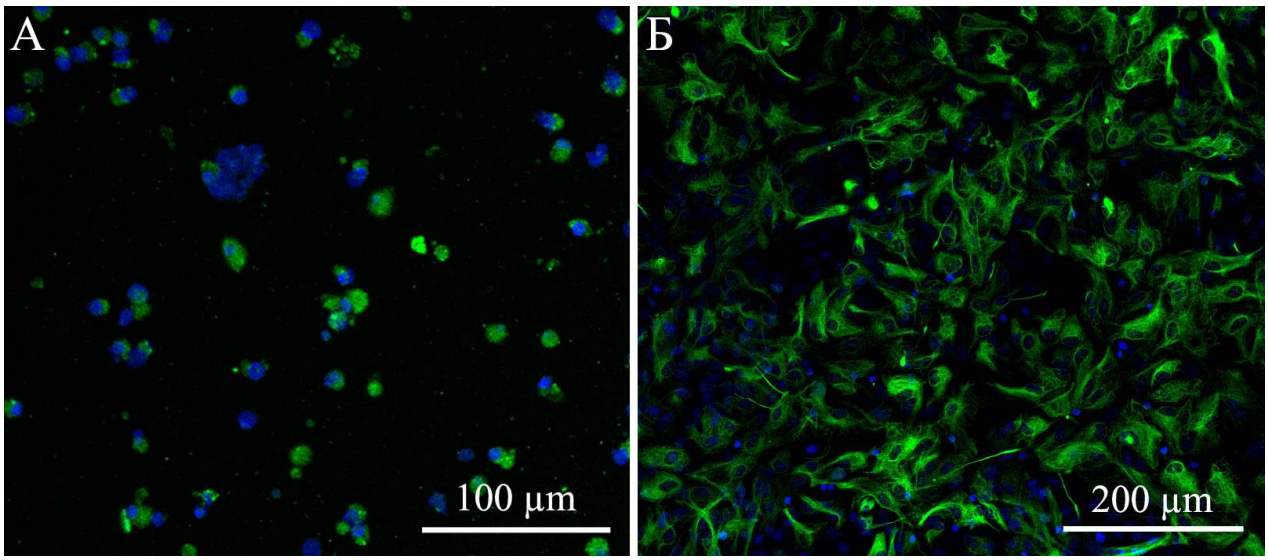

Рисунок 2 – Культура клеток микроглии (зеленый – iba-1-позитивная микроглия) (А) и астроцитов (зеленый – GFAP-позитивная астроглия) (Б). Синий – ядра клеток, окрашенные DAPI.

Для анализа супероксиддисмутазы (СОД) и проведения иммуноферментного анализа (ИФА) клетки высевали в 24-луночные планшеты при концентрации 10000/см^2 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% FBS. Затем клетки подвергались лизированию с использованием буфера для лизиса (pH 7.5, 140 мМ NaCl, 50 мМ Трис-HCl, 1% NP-40, 10 мМ EDTA, 20 мМ NaF, 20 мМ β-глицерофосфата, 1 мМ PMSF, 1 мМ DTT, 1 мМ ванадата натрия и ингибиторы протеаз). Концентрацию белка для анализа СОД и виментина определяли с использованием набора для анализа белка BCA (Pierce, Rockford, IL). Поглощение при 450 нм измеряли с помощью спектрофотометра (iMark Microplate Absorbance Reader, Bio-Rad).

2.7. Определение супероксиддисмутазы

После обработки клетки микро- и астроглии инкубировали в буфере для лизиса (pH 7.5, 140 мМ NaCl, 50 мМ Трис-HCl, 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 для анализа белков BCA (Pierce, Rockford, IL). Поглощение при 450 нм измеряли с помощью 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 супероксиддисмутазы (S9697, Sigma Aldrich, США). Эксперимент проводили независимо минимум три раза.

2.8. Иммуноферментный анализ

Концентрацию белка виментина в культуре клеток микро- и астроглии определяли количественно с использованием набора ИФА для виментина в соответствии с протоколом производителя (EKC39874, Biomatik, США). Эксперимент проводили независимо минимум три раза.

2.9. 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 были показаны как среднее значение±SEM, а $p<0.05$ было принято как статистически значимое. Все статистические тесты были выполнены с использованием пакета программ GraphPad Prism 4.00.

ГЛАВА 3. ВОССТАНОВЛЕНИЕ ДВИГАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ КРЫС С КОМПРЕССИОННОЙ ТРАВМОЙ СПИННОГО МОЗГА И ТЕРАПИЕЙ ДГК

Шкала BBB позволяет дать характеристику прогрессивного восстановления двигательного аппарата после компрессионной травмы спинного мозга и представляет собой ранжированную шкалу для оценки локомоторной активности на ранних, промежуточных и поздних стадиях патофизиологического процесса (Basso et al., 1995). 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. К 35 сут после операции балл по шкале BBB в группе «Травма» составил 4.4±1.5, что соответствует вялым движениям всех трёх суставов задних конечностей. Данный показатель был значительно ниже, чем у животных получавших терапию ДГК, который составил в среднем 10.1±1.3 балла (рис. 3), что соответствует редкому удержанию веса во время ходьбы с опорой на подошвы и отсутствием координации между передними и задними лапами. У всех животных с компрессионной травмой спинного мозга восстановление вегетативных функций наблюдалось на 9 сут после операции. У ложнооперированных крыс оценка локомоторной активности составляла 21 балл.

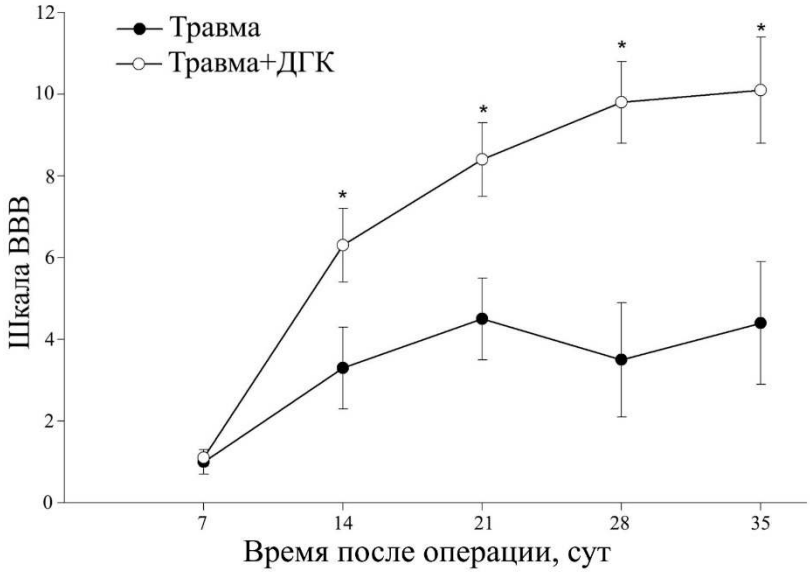

Рисунок 3 – Двигательная активность животных с компрессионной травмой спинного мозга и терапией ДГК. Данные представлены как среднее значение±SEM, *значимые различия между группой «Травма» и «Травма+ДГК», $P<0.05$, $n=7$ в каждой группе (тест Манна-Уитни).

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 (Manzhulo et al., 2018). Результаты данного исследования во многом согласуются с данными, полученными на других экспериментальных моделях центральной нейротравмы. Так, при моделировании латеральной гемисекции спинного мозга, введение ДГК уже в течение первых нескольких сут приводит к частичному восстановлению локомоторной активности при тестировании в открытом поле (King and Huang, 2006), а через 7 и 14 сут наблюдается улучшение двигательных функций, включающих тонкую регуляцию моторики, которая осуществляется за счет модуляции процессов нейропластичности (Cafferty et al., 2008). Ранее показано, что в основе функциональной реабилитации лежит способность аксонов прорастать к каудальным мишеням через проприоспинальные интернейроны (Bareyre et al., 2004) и образование дополнительных синаптических связей с мотонейронами (Bareyre et al., 2005).

ГЛАВА 4. НЕЙРОТРОПНАЯ АКТИВНОСТЬ ДГК ПРИ ТЕРАПИИ ТРАВМЫ СПИННОГО МОЗГА

4.1. Морфологическая характеристика области повреждения спинного мозга

Через 7 сут после компрессионной травмы спинного мозга у животных всех экспериментальных групп наблюдается выраженное повреждение нервной ткани. Очаг повреждения заполнен большим количеством поврежденных клеточных элементов, вокруг очага начинает формироваться глиомезодермальная капсула (рис. 4). К 35 сут после операции область повреждения спинного мозга у животных с травмой увеличивается в размерах и представлена множеством кист, образованных в месте посттравматического некроза. Полость кист заполнена новообразованной тканью и окружена сформированной глиомезодермальной капсулой. Морфологическое состояние и распределение клеточных элементов, входящих в состав ткани рубца, у разных экспериментальных групп животных значительно отличается. У животных с компрессионной травмой спинного мозга область повреждения окружена плотной многослойной демаркационной тканью, состоящей из фибробластов и большого количества волокон соединительной ткани. В полостях кист и прилежащей нервной ткани наблюдается большое количество макрофагов и гемосидерофагов, что указывает на продолжающийся воспалительный процесс.

В области повреждения у крыс группы «Травма+ДГК» макрофаги преимущественно концентрируются в просвете посттравматической полости. Демаркационный рубец тонкий, представлен рыхлой тканью, которая внедряется в послеоперационную кисту на 100-150 мкм и формирует большое количество септ внутри посттравматической кисты. В очаге повреждения и в области стенки капсулы, окружающей зону травмы, наблюдаются многочисленные новообразованные капилляры (рис. 4).

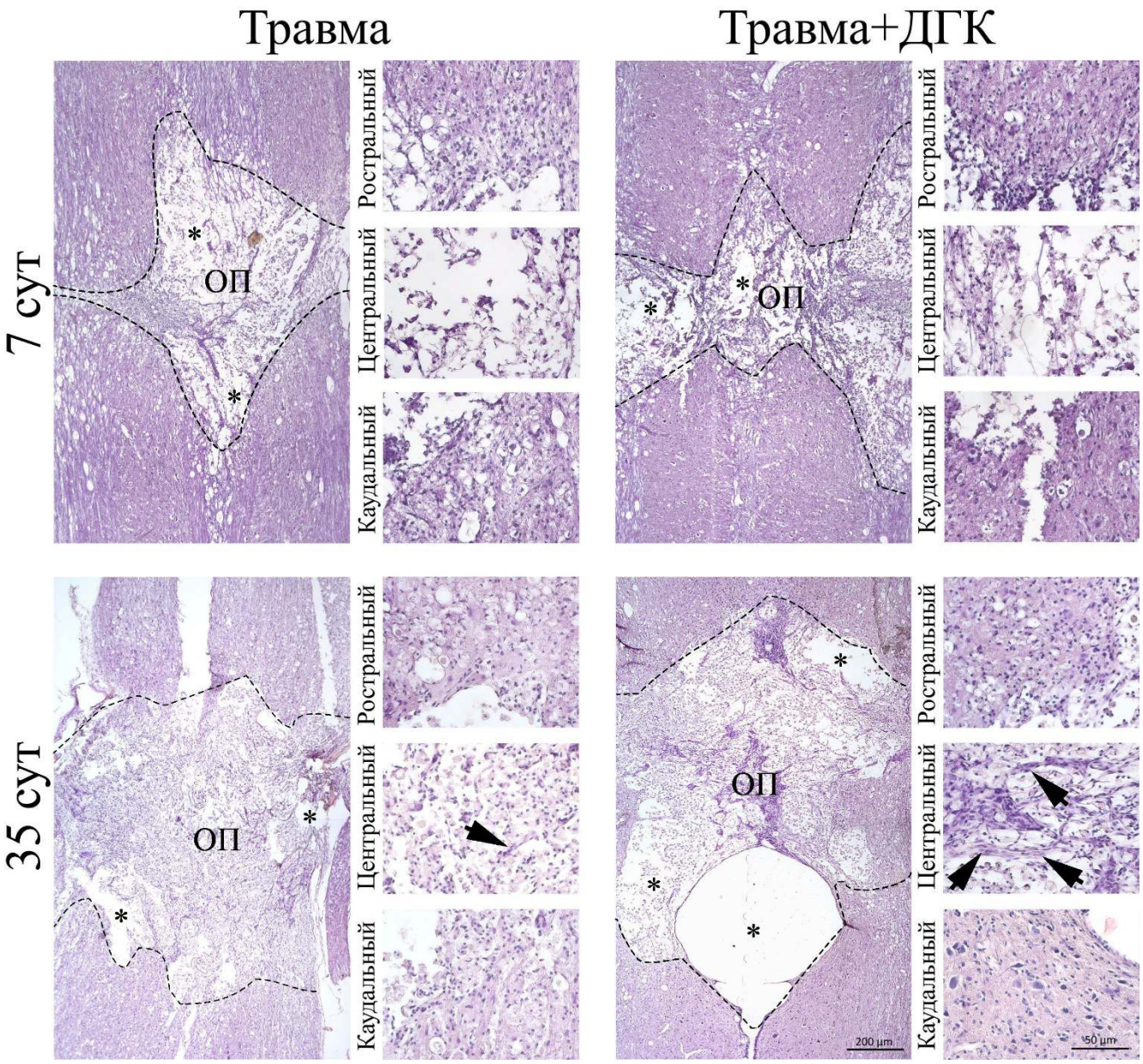

Рисунок 4 – Морфологическая структура спинного мозга при ТСМ и терапии ДГК. ОП – очаг повреждения. Звездочкой обозначены полости кист. Стрелками обозначены новообразованные капиляры. Окраска гематоксилин – эозин.

Повреждение спинного мозга сопровождается образованием некротической области, которая постепенно увеличивается в размерах вследствие вторичной гибели нейронов, вызванной острым воспалением, отеком и апоптозом. Травматическое повреждение сопровождается развитием патологического процесса, в котором принимают участие, как клетки центральной нервной системы, так и периферические иммунные клетки, которые приводят к

образованию глиального рубца и формированию среды, ингибирующей рост аксонов в месте повреждения (Burda and Sofroniew, 2014; Cregg et al., 2014). При терапии компрессионной травмы спинного мозга ДГК обеспечивает ограничение очага повреждения за счет образования более тонкого и рыхлого рубца, в составе которого фиброзная ткань представлена в минимальном объёме. Это, очевидно, опосредованно антивоспалительным потенциалом ДГК, направленным на уменьшение выработки провоспалительных цитокинов и снижение выраженности окислительного стресса (King and Huang, 2006). Снижение воспалительной реакции в поздний послеоперационный период способствует более раннему запуску процессов репарации с привлечением минимального количества клеточных и фибриллярных ресурсов (Mukherjee et al., 2004). Применение ДГК усиливает также новообразование кровеносных сосудов в области посттравматического дефекта, что способствует восстановлению поврежденной ткани и обеспечивает направленный рост аксонов по ходу расположения кровеносных сосудов (Bazan, 2006).

4.2. Докозагексаеновая кислота обеспечивает сохранность миелина и усиливает процессы ремиелинизации

Миелинизация аксонов в ЦНС — это динамический процесс, который регулируется эндогенной нейрональной и глиальной активностью и способствует интеграции взаимодействия моторных, сенсорных и когнитивных функций (Alizadeh et al., 2015). Нейрональная активность регулирует скорость миелинизации путем изменения количества клеток-предшественников олигодендроцитов, индукция нейрональной активности приводит к увеличению количества клеток-предшественников олигодендроцитов, в то время как ингибирование активности нейронов уменьшает их количество. При ТСМ повреждение и гибель олигодендроцитов приводит к демиелинизации, при этом спонтанная ремиелинизация наблюдается даже в хроническом периоде после ТСМ, но ее недостаточно для восстановления неврологических функций. Поэтому усиление процессов ремиелинизации, с помощью фармакологических средств,

остается важным терапевтическим направлением после повреждения спинного мозга (Belegu et al., 2007; Alizadeh et al., 2015).

Количественный анализ содержания основного белка миелина (ОБМ) в нервной ткани – один из способов оценить степень морфологической и функциональной сохранности аксонов и морфологической сохранности их миелиновой оболочки после ТСМ. Данный факт объясняется способностью ОБМ к компактизации миелина и стабилизации мембраны нервных клеток. Параметры распределения ОБМ, с одной стороны, демонстрируют выраженность демиелинизации, а с другой – свидетельствуют об активности механизмов регенерации и ремиелинизации (Alizadeh et al., 2015). В нашей работе показано, что во всех экспериментальных группах животных с ТСМ, основная часть ОБМ-позитивных структур располагается в ростральном и каудальном сегментах, а в очаге повреждения иммунопозитивное окрашивание миелина значительно снижено (рис. 5).

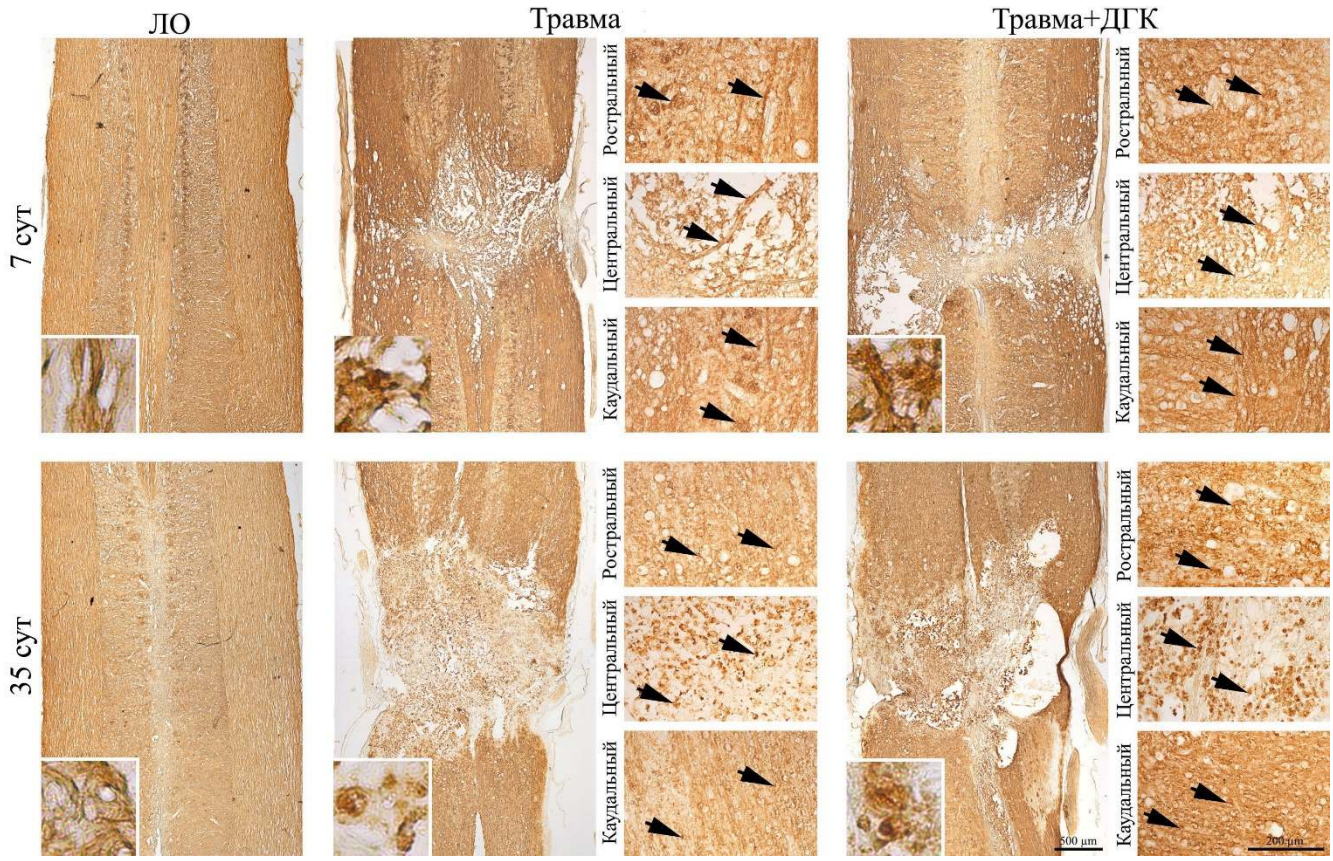

Рисунок 5 – Локализация основного белка миелина (стрелки, вклейки) в спинном мозге в норме, при ТСМ и терапии ДГК.

К 7 сут площадь окрашивания ОБМ-позитивных структур ростального и каудального сегментов в группе «Травма» достоверно не отличалась от группы животных с терапией ДГК. Однако, в очаге повреждения в группе «Травма» демиелинизация более выражена (5,3±0,7%) чем в группе «Травма+ДГК» (8,4±1%). К 35 сут в группе «Травма+ДГК» площадь окрашивания ОБМ-позитивных структур значительно выше как в очаге повреждения (8,2±0,4%), так и в соседних сегментах спинного мозга (ростральный (22,7±1,2%), каудальный (24,9±1,1%)), в сравнении с группой «Травма» (очаг повреждения (5,2±0,5%), ростральный (17,1±1%) и каудальный (19,7±1,3%) сегмент). В группе «ЛО» на 7 и 35 сут после операции не наблюдалось изменений в распределении и локализации ОБМ, площадь окрашивания составила 26,3±1,9% (рис. 6).

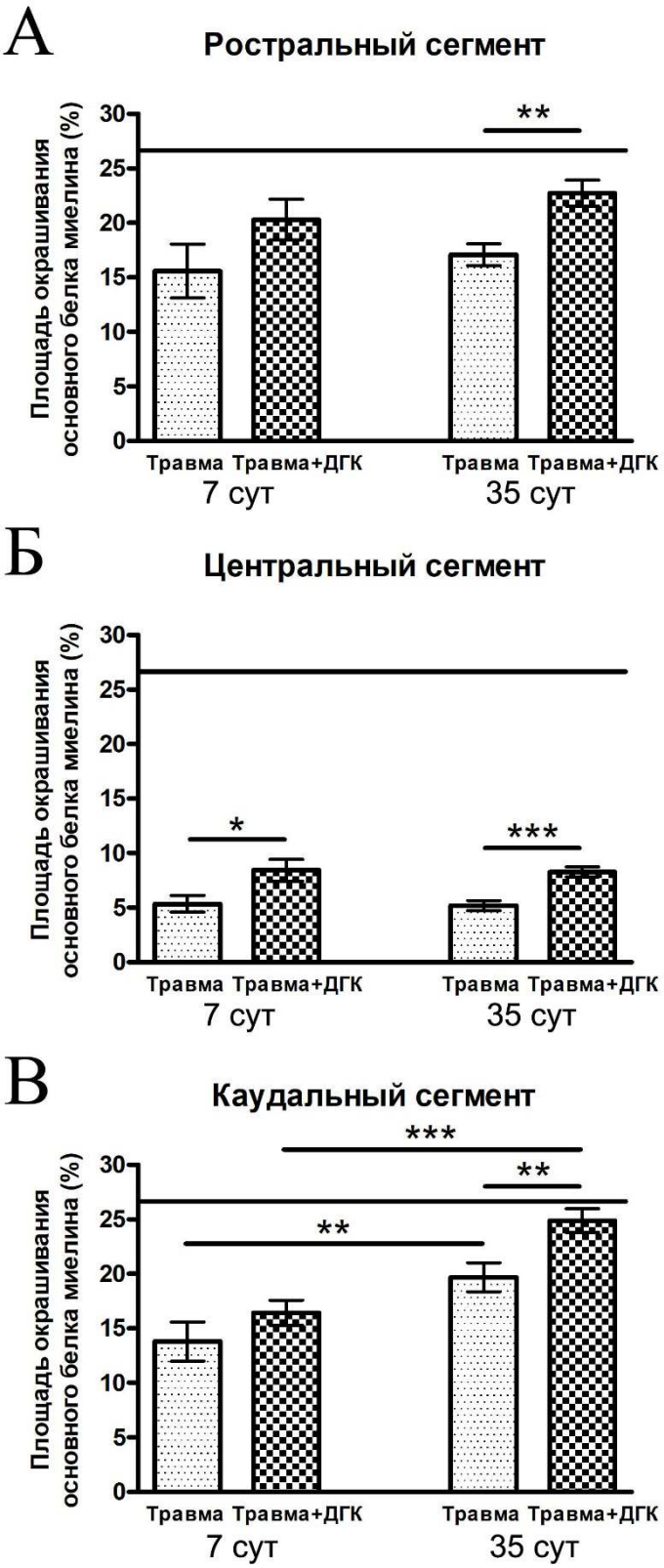

Рисунок 6 – Площадь ОБМ-позитивного окрашивания измеряли в трех участках спинного мозга: в очаге повреждения (Б), в ростральном (А) и каудальном сегменте (В) от центра травмы; линия – ложнооперированные животные. Данные представлены как среднее значение±SEM, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, n=70 (количество срезов в каждой группе) (one-way ANOVA, тест Тьюки).

Иммуногистохимическое картирование ОБМ позволяет оценить не только глубину повреждения миелиновой оболочки, но и характер ремиелинизации поврежденных аксонов. В период от 7 до 35 сут после операции четко прослеживаются процессы демиелинизации, особенно выраженные в очаге повреждения (Manzhulo et al., 2018). Ранее показано, что даже через три месяца после ТСМ в поврежденном спинном мозге наблюдаются признаки демиелинизации и дисмиелинизации (образование патологического миелина) как в очаге повреждения, так и в каудальном сегменте спинного мозга. Демиелинизация и/или дисмиелинизация приводят к дегенерации аксонов, что способствует снижению скорости проводимости сигналов. Так, частичная демиелинизация и дисмиелинизация через 8 недель после ТСМ сопровождается снижением скорости проводимости сигнала через ремиелинизированные аксоны на 21%, подобное изменение скорости может привести к параличу (Alizadeh et al., 2015).

Ряд исследований подтверждают, что стимулирование процессов ремиелининизации приводит к более быстрому восстановлению физиологических функций после ТСМ (Belegu et al., 2007; Alizadeh et al., 2015). В нашем эксперименте, введение ДГК не предотвращает повреждение миелиновых оболочек через 7 сут после ТСМ, однако в отсроченный период (35 сут после операции) ДГК индуцирует процессы ремиелинизации как в центре повреждения, так и в ростральном и каудальном сегментах спинного мозга. Об этом свидетельствует нарастание площади иммуногистохимического окрашивания ОБМ (Manzhulo et al., 2018). Ранее показано, что введение ДГК после ТСМ способствует снижению повреждения белого вещества спинного мозга за счет увеличения выживаемости олигодендроцитов через 7 сут после ТСМ. Однако, несмотря на сохранение олигодендроцитов в белом веществе спинного мозга, ДГК не препятствует дегенерации миелиновой оболочки вокруг поврежденных аксонов на начальном этапе развития вторичного повреждения. При этом на поздних стадиях после ТСМ, введение ДГК приводит не только к увеличению количества олигодендроцитов, но и улучшает экспрессию основного белка

миелина с образованием миелиновых оболочек (Huang et al., 2007). Кроме того, *in vivo* показано, что применение ДГК уменьшает демиелинизацию, вызванную купризоном, и улучшает двигательные и когнитивные функции животных (Chen et al., 2014).

4.3. Распределение катехоламинергических нервных волокон при компрессионной травме и терапии ДГК

Тирозин-гидроксилаза (ТН) является ферментом, лимитирующим скорость биосинтеза катехоламинов – дофамина, норадреналина и адреналина. Спускающиеся к спинному мозгу катехоламинергические нервные волокна замыкаются на нейронах задних рогов, тем самым, регулируя уровень их активности (Сухарева и др., 2016). Иммуногистохимическое выявление ТН использовали для характеристики сохранности и восстановления нисходящих катехоламинергических аксонов после ТСМ (рис. 7).

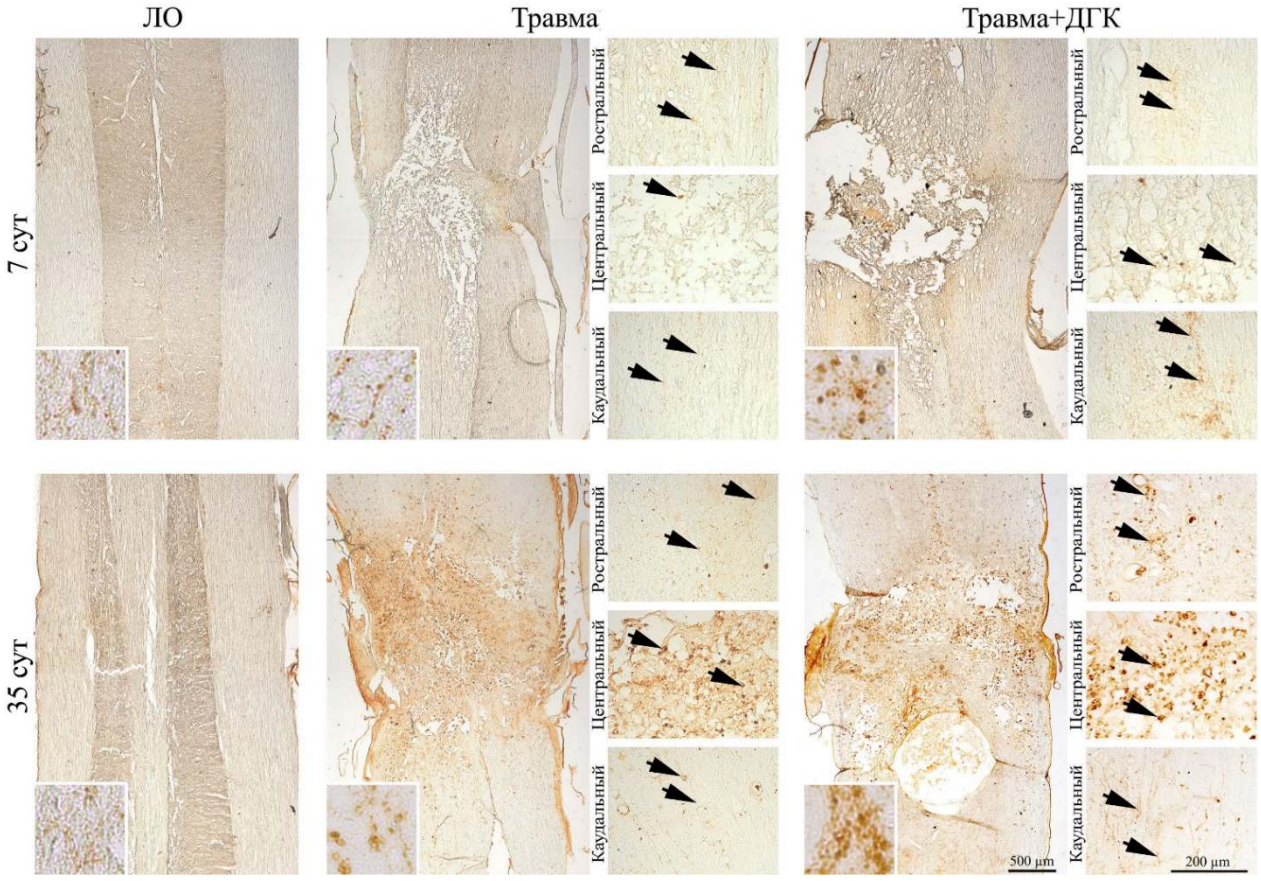

Рисунок 7 – Локализация ТН-позитивных нервных волокон (стрелки, вклейки) в спинном мозге в норме, при ТСМ и терапии ДГК.

К 7 сут в группе «Травма+ДГК» площадь окрашивания ТН-позитивных волокон была значительно выше как в очаге повреждения (1,9±0,1%), так и в соседних сегментах спинного мозга (ростральный (1,1±0,1%), каудальный (2,05±0,4%)), в сравнении с группой «Травма» (очаг повреждения (1,1±0,2%), ростральный (0,5±0,1%) и каудальный (0,8±0,1%) сегмент). К 35 сут площадь окрашивания катехоламинергических аксонов каудального сегмента и в центре повреждения в группе «Травма» достоверно не отличается от группы животных с терапией ДГК. Однако, в ростральном сегменте в группе «Травма+ДГК» процесс восстановления нервных волокон более выражен (1,6±0,2%), чем в группе «Травма» (1±0,1%). В группе «ЛО» на 7 и 35 сут после операции не наблюдалось изменений в распределении и локализации ТН, площадь окрашивания составила 0,8±0,1% (рис. 8).

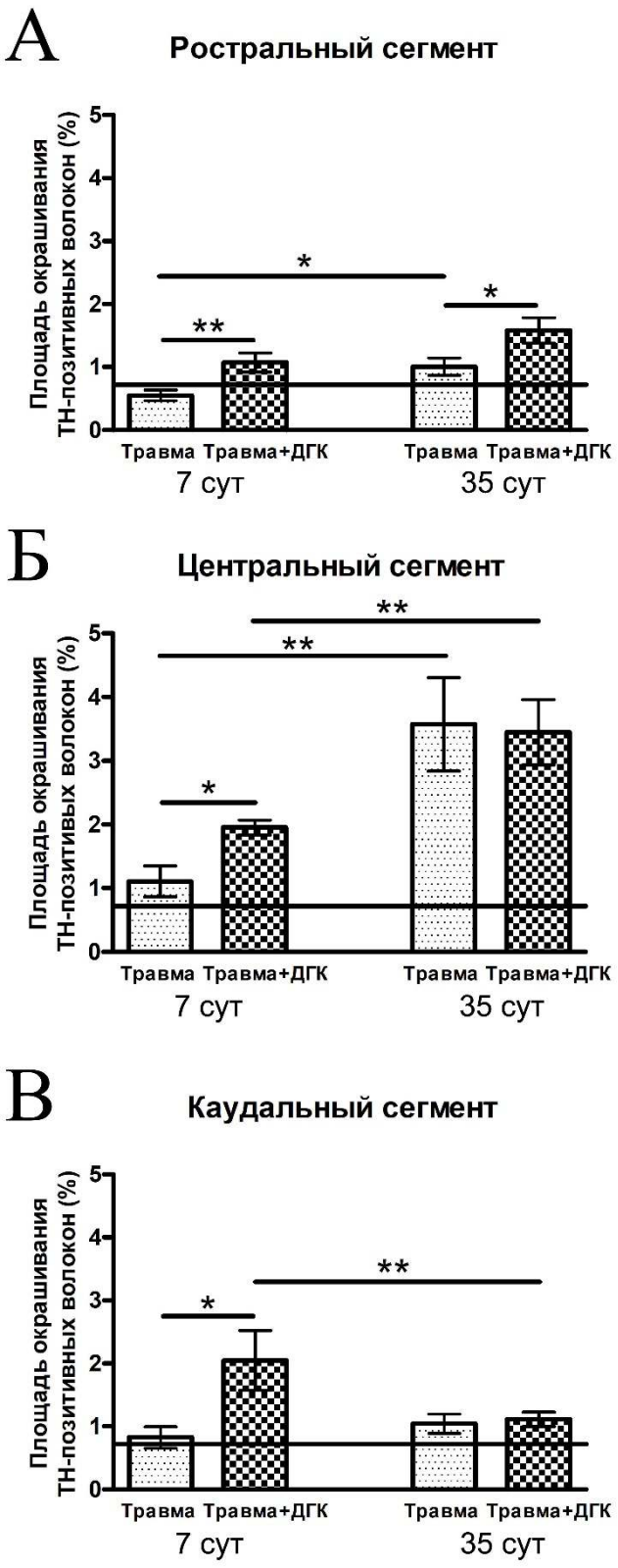

Рисунок 8 – Площадь ТН-позитивного окрашивания измеряли в трех участках спинного мозга: в очаге повреждения (Б), в ростральном (А) и каудальном (В) сегменте от центра травмы; линия – ложнооперированные животные. Данные представлены как среднее значение±SEM, *P<0.05, **P<0.01, n=70 (количество срезов в каждой группе) (one-way ANOVA, тест Тьюки).

В настоящем исследовании 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 волокон и их прорастания через фиброзный рубец. Компрессионная травма спинного мозга к 7 и 35 сут после операции не приводит к снижению активности катехоламинергических аксонов в ростральном и каудальном сегментах спинного мозга в сравнении с ложнооперированными животными. Ранее в модели латеральной гемисекции спинного мозга показано, что травматическое повреждение на 7 и 21 сут после операции не сопровождается снижением плотности распределения аксонов в ростральном и каудальном сегментах (Saruhashi et al., 2009). 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. 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). При этом введение ДГК стимулирует общую плотность распределения аксонов, как в очаге повреждения, так и в ростральном и каудальном сегментах и способствует модуляции пластичности спинного мозга после повреждения (Ciranna, 2006). Известно, что катехоламины, в частности норадреналин и адреналин, принимают активное участие в регуляции вегетативных функций, а также в модуляции сенсорных процессов (Сухарева и др., 2016). В нашем эксперименте, несмотря на то, что у всех экспериментальных животных с ТСМ наблюдалось восстановление вегетативных функций примерно к 9 сут после операции, введение ДГК способствует более качественному восстановлению функций органов малого таза, очевидно за счет увеличения числа катехоламиненргических нервных волокон спинного мозга, особенно на начальных этапах патофизиологического процесса.

ГЛАВА 5. ГЛИОТРОПНАЯ АКТИВНОСТЬ ДГК ПРИ ТЕРАПИИ ТРАВМЫ СПИННОГО МОЗГА

5.1. Антиоксидантная активность докозагексаеновой кислоты

Супероксиддисмутазы представляют собой группу ферментов, катализирующих процесс преобразования супероксидных радикалов (O_2^-) в молекулярный кислород (O_2) и перекись водорода (H_2O_2), защищая клетки от активных форм кислорода и, следовательно, играют основную роль в защите организма от окислительного стресса (Gargouri et al., 2018). Первичная травма, вызванная ТСМ, сопровождается вторичной фазой повреждения, которая включает окислительный стресс и как следствие – воспаление и гибель клеток (Olby, 2010). В настоящем исследовании при культивировании микро- и астроглии с добавлением ДГК в концентрации 1 мкМ, через 2 сут после совместного культивирования, показано, что ДГК стимулирует увеличение уровня активности супероксиддисмутазы практически в два раза по сравнению с необработанными клетками (рис. 9).

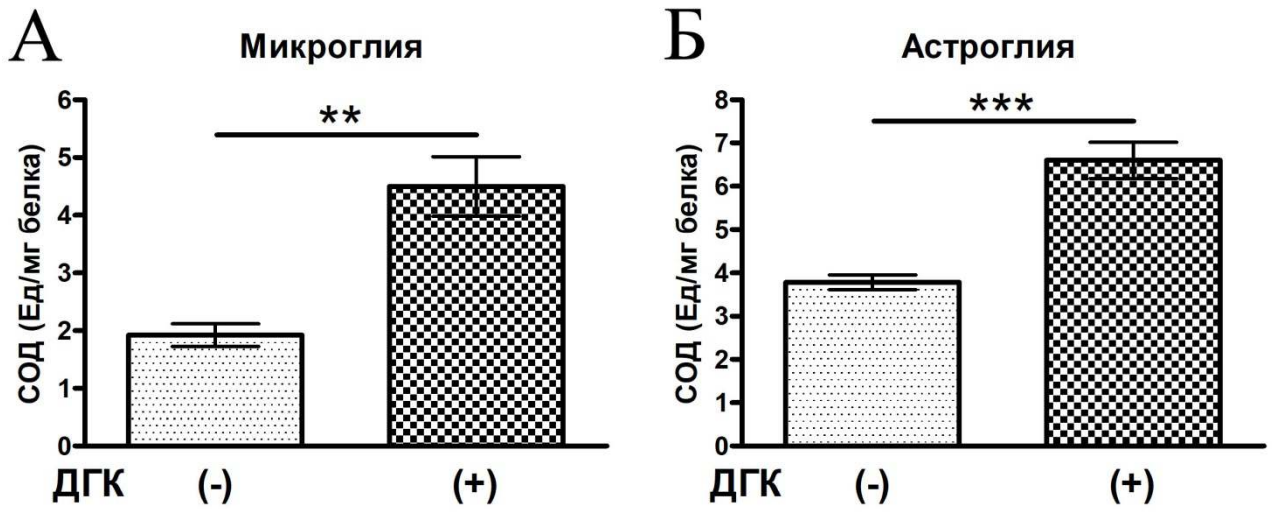

Рисунок 9 – ДГК повышает активность СОД в культуре клеток микроглии (А) и астроглии (Б). **P<0.01, ***P<0.001, n=9 (тест Манна-Уитни).

Повреждение спинного мозга сопровождается высвобождением активных форм кислорода (АФК) и азота, в том числе супероксиды, гидроксильные радикалы, синглетный кислород, перекись водорода и пероксинитрит (Bains and Hall, 2012). В физиологических условиях свободные радикалы обеспечивают клеточный сигналинг, однако, во время развития патофизиологического процесса происходит их чрезмерное высвобождение, что приводит к ингибированию антиоксидантной защиты и как следствие – к окислительному стрессу и вторичному повреждению (Jia et al., 2009). Митохондрии являются основными источниками образования АФК при повреждении ЦНС. Они потребляют до 90% кислорода при окислительном фосфорилировании, следовательно, при их повреждении усиливается высвобождение АФК (Wingrave et al., 2003). В то же время нейтрофилы и макрофаги после повреждения спинного мозга увеличивают потребление кислорода и индуцируют высвобождение супероксидных радикалов во внеклеточную среду посредством активации НАДФН-оксидазы (Taoka et al., 1997).

В группу антиоксидантов входят ферменты (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза/редуктаза и пероксиредоксин), жирорастворимые (α-токоферол, каротиноиды, хиноны и некоторые полифенолы) и водорастворимые антиоксиданты (аскорбиновая кислота), а также ряд других соединений (глутатион, мочевая кислота, пируват, аминокислоты, трансферрин, ферритин и церулоплазмин). Окислительный стресс зависит от баланса между скоростью образования и дезактивации свободных радикалов, и регулируется транскрипционным фактором Nrf2, посредством которого происходит индукция экспрессии антиоксидантных белков и ферментов, таких как СОД, глутатионпероксидаза и ферменты 2-фазы детоксикации, которые включают гемоксигеназу-1 и пероксиредоксин (Lei et al., 2016).

В нашем исследовании культивирование микроглии и астроглии с добавлением ДГК, приводит к усилению экспрессии СОД в 2 раза по сравнению с необработанными клетками (Manzhulo et al., 2018). Ранее показано, что ДГК индуцирует экспрессию антиоксидантных ферментов, таких как каталаза,

глутатионпероксидаза и марганцевая супероксиддисмутаза в астроцитах мыши и у крыс во время постнатального развития (Becerir et al., 2013; Jiang et al., 2013). Нейропротектин D1 (PD1) является высокоактивным метаболитом ДГК и обладает выраженной антивоспалительной активностью, особенно при АФК-индуцированных повреждениях головного мозга. При этом нейропротекторная активность PD1 опосредована дефосфорилированием Bcl-xL и зависит от активации сигнального пути PI3K/Akt. Нейропротектин D1 играет важную роль в терапии нейродегенерации и болезни Альцгеймера, где дисфункция митохондрий, образование АФК и перекисное окисление ПНЖК приводит к апоптозу нейронов (Zhu et al., 2018).

5.2. Пролиферация и репарация клеток при повреждении спинного мозга и терапии ДГК

PCNA (proliferating cell nuclear antigen) загружается на двухцепочечную ДНК с помощью фактора репликации C (RFC), где PCNA функционирует как скользящий зажим, который связывает и закрепляет полимеразы на ДНК. PCNA взаимодействует и регулирует активность многих белков, участвующих в созревании фрагментов Оказаки, восстановлении эксцизии нуклеотидов и восстановлении ДНК. Он также взаимодействует с белками, участвующими в других процессах, таких как контроль клеточного цикла, эпигенетическое наследование и специфический протеолиз в S-фазе (Boehm et al., 2016).

В нашей работе детальное исследование маркера пролиферации и репарации PCNA показало, что основными клеточными элементами, ядра которых содержали PCNA, являются глиоциты серого и белого вещества, а также эпендимные клетки центрального канала (рис. 10).

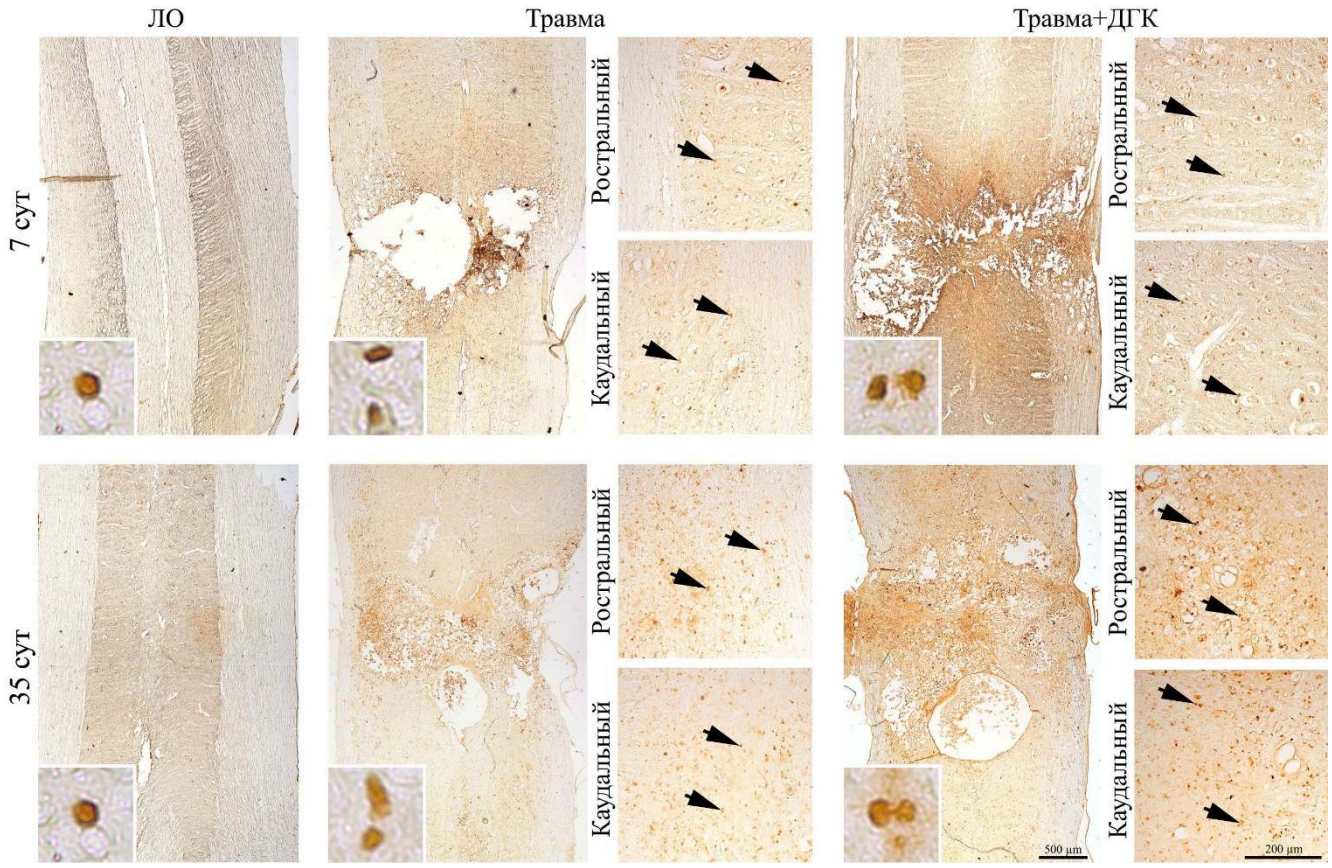

Рисунок 10 – Локализация PCNA-позитивных клеточных ядер (стрелки, вклейки) в спинном мозге в норме, при ТСМ и терапии ДГК.

У интактных и ложнооперированных животных пролиферативная активность в спинном мозге находится на минимальном уровне. Травматическое воздействие активирует новообразование клеточных элементов, при этом темпы пролиферации в значительной степени зависят от использования терапии ДГК. К 7 сут после операции пролиферативная активность в группе «Травма» была достоверно ниже (ростральный (3612±513 клеток в мм^3) и каудальный (5099±552 клеток в мм^3) сегмент), чем у животных с введением ДГК (ростральный (5418±639 клеток в мм^3) и каудальный (7604±736 клеток в мм^3) сегмент). К 35 дню активность пролиферативного процесса в ростральном (14548±1231 клеток в мм^3) и каудальном (14765±1228 клеток в мм^3) сегментах спинного мозга в группе «Травма» была значительно ниже, чем у животных группы «Травма+ДГК» (ростральный (17671±1107 клеток в мм^3) и каудальный (19385±1299 клеток в мм3)

сегмент). В группе «ЛО» на 7 и 35 сут после операции не наблюдалось изменений в количестве PCNA-позитивных клеток (1521±127 клеток в мм^3) (рис. 11).

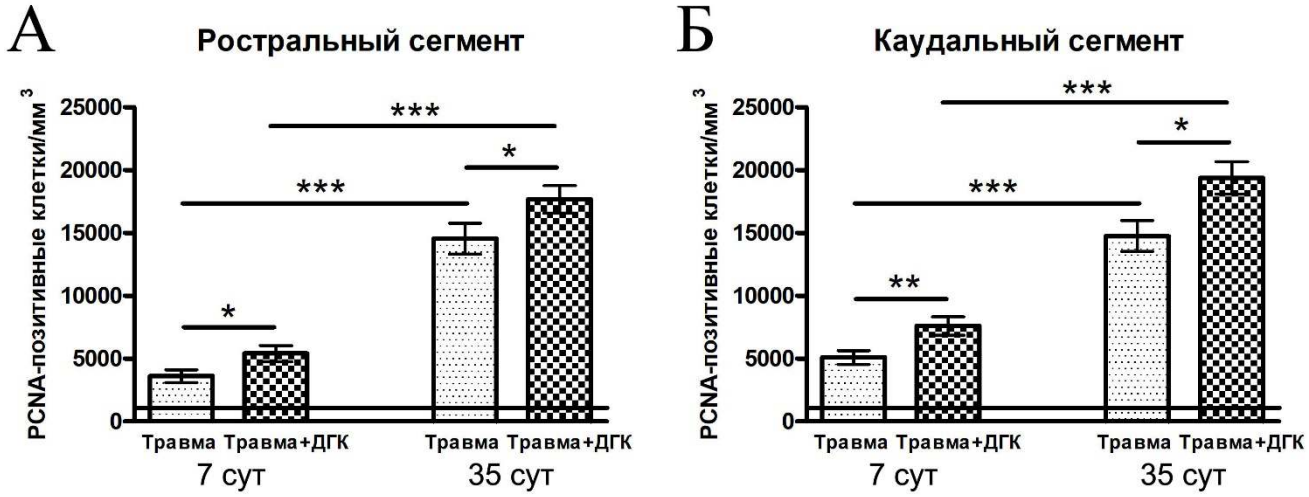

Рисунок 11 – Количество PCNA-позитивных клеточных ядер измеряли в двух участках спинного мозга: в ростральном (А) и каудальном сегменте (Б) от центра травмы; линия – ложнооперированные животные. Данные представлены как среднее значение±SEM, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, n=70 (количество срезов в каждой группе) (one-way ANOVA, тест Тьюки).

На начальных этапах после ТСМ патофизиологический процесс сопровождается пролиферацией глиальных и нейральных клеток-предшественников и астроцитов (Burda and Sofroniew, 2014). В более позднем периоде после ТСМ, наблюдали дифференцировку клеток-предшественников олигодендроцитов, уменьшение деградации и некоторое ремоделирование аксонов, формирование астроцитарных рубцов и остановку процессов Валлеровской дегенерации (Shechter and Schwartz, 2012; Burda and Sofroniew, 2014). В нашей работе показано, что активность пролиферации в спинном мозге животных разных экспериментальных групп заметно отличалась. Течение посттравматического процесса с 7 по 35 сут после операции характеризуется увеличением пролиферативной активности нейрональных и глиальных элементов как в ростральном, так и в каудальном сегментах спинного мозга всех

экспериментальных животных. При этом введение ДГК активирует пролиферативные процессы в участках повреждения (Manzhulo et al., 2018). Локализация PCNA-позитивных ядер в составе серого и белого вещества спинного мозга позволяют предполагать, что в составе популяции пролиферирующих клеток большая доля принадлежит олигодендроцитам. Данные клетки являются наиболее уязвимыми при развитии второй волны апоптоза, пик которой приходится на 3-4-ю недели посттравматического периода (Totoiu and Keirstead, 2005). Данный эффект ДГК, вероятно, реализуется за счет регуляции антиапоптотических белков Bcl-2 и Bcl-xL, а также ингибирования экспрессии проапоптотических белков Bax, Bad (Paterniti et al., 2014; Manzhulo et al., 2016), и как показано в наших предыдущих исследованиях – белка p53 (Manzhulo et al., 2015). В настоящее время активно обсуждается способность ПНЖК напрямую модулировать транскрипционные процессы через активацию ретиноидных рецепторов (Jump et al., 2002; Melanie et al., 2011), что является особенно актуальным для восстановления клеточных компонентов ЦНС, характеризующихся довольно низким регенераторным потенциалом. Поэтому восстановление миелиновой оболочки аксонов (глава 4.2) за счет усиление пролиферации и дифференцировки олигодендроцитов может считаться дополнительным нейропротективным ресурсом ДГК при повреждении спинного мозга.

5.3. Активность микроглии/макрофагов при компрессионной травме спинного мозга и терапии ДГК

Морфо-химическим проявлением увеличения общего пула микроглии/макрофагов принято считать повышение активности ионизированного кальций-связывающего адаптера-1 (Iba-1), присутствующего в складках клеточных мембран наряду с F-актином (Inoue, 2006). При развитии патофизиологических процессов в ЦНС, таких как инфекция, опухоль, воспаление, травма и ишемия, микроглия, выполняющая роль иммунных клеток, мгновенно активируется. При этом активированная микроглия/макрофаги

пролиферирует и мигрирует к очагу повреждения, проявляя бактерицидную, цитотоксическую и фагоцитарную активность для уменьшения повреждения и играет важную роль в защитных механизмах организма. Микроглия/макрофаги секретирует различные медиаторы и может проявлять как нейропротекторную, так и нейротоксическую активность (Wu et al., 2005). В настоящем исследовании для характеристики уровня активности микроглии/макрофагов после ТСМ провели иммуногистохимическое картирование маркера iba-1. У ложнооперированных животных микроглиоциты спинного мозга имеют небольшие клеточные тела (8-11 мкм) с узким ободком цитоплазмы и несколькими тонкими, маловетвистыми и длинными отростками. Морфологические признаки активированной микроглиии/макрофагов (ретракция отростков и гипертрофия клеточных тел; амебовидная форма, обеспечивающая миграцию клеток к очагу повреждения) наблюдали во всех группах животных при ТСМ (рис. 12).

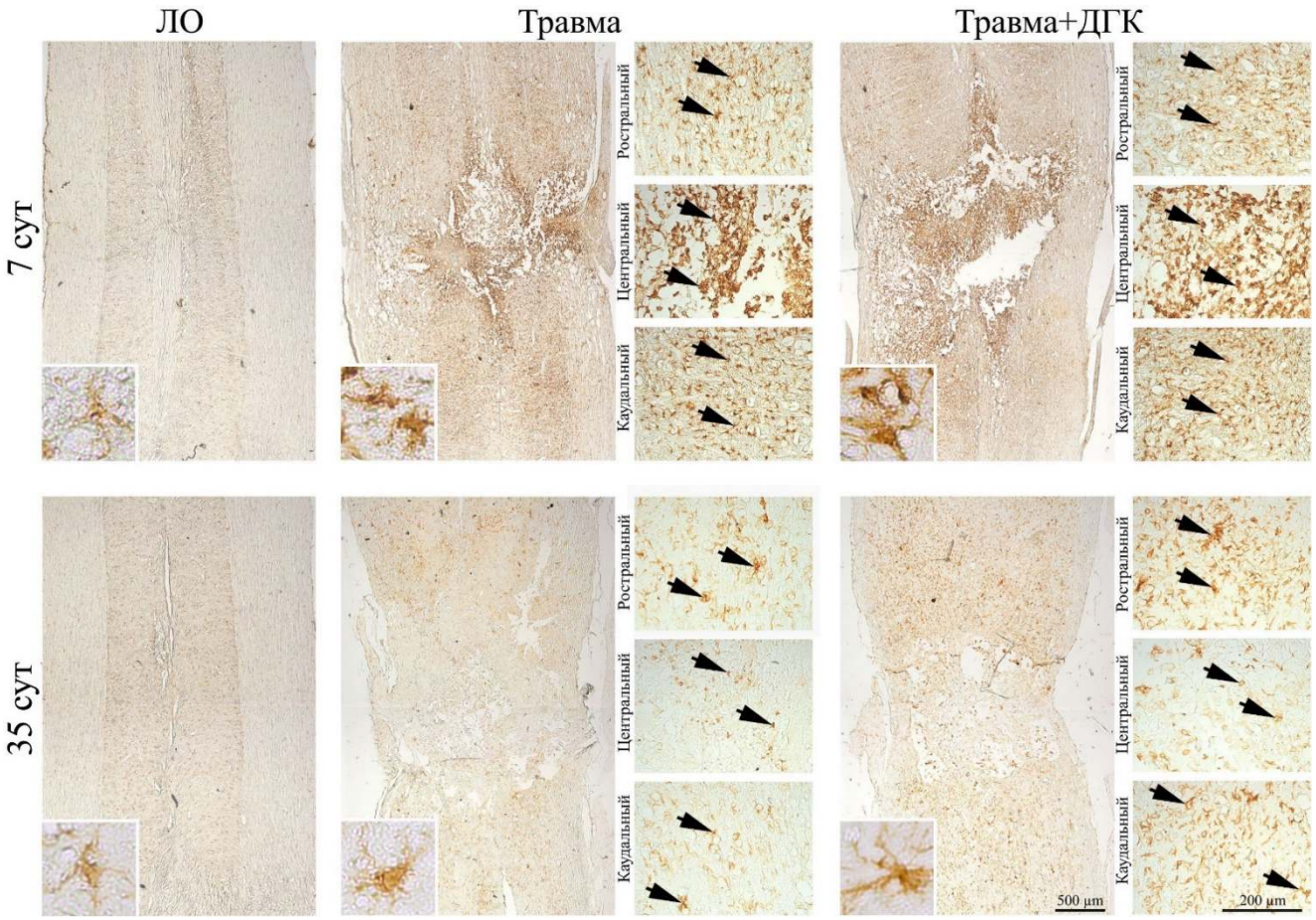

Рисунок 12 – Локализация iba-1-позитивной микроглии/макрофагов (стрелки, вклейки) в спинном мозге в норме, при ТСМ и терапии ДГК.

К 7 сут площадь iba-1-позитивной микроглии/макрофагов всех сегментов спинного мозга в группе «Травма» достоверно не отличалась от группы «Травма+ДГК». К 35 сут после операции активность микроглии/макрофагов в группе «Травма» была значительно ниже в ростральном (1,9±0,2%) и каудальным (1,3±0,2%) сегментах спинного мозга, чем у животных с терапией ДГК (ростральный (3,4±0,3%) и каудальный (3,6±0,3%) сегмент); в очаге повреждения площадь окрашивания не изменялась. В группе «ЛО» на 7 и 35 сут после операции не было изменений в распределении iba-1-позитивной микроглии/макрофагов, площадь окрашивания составила 0,9±0,1% (рис. 13).

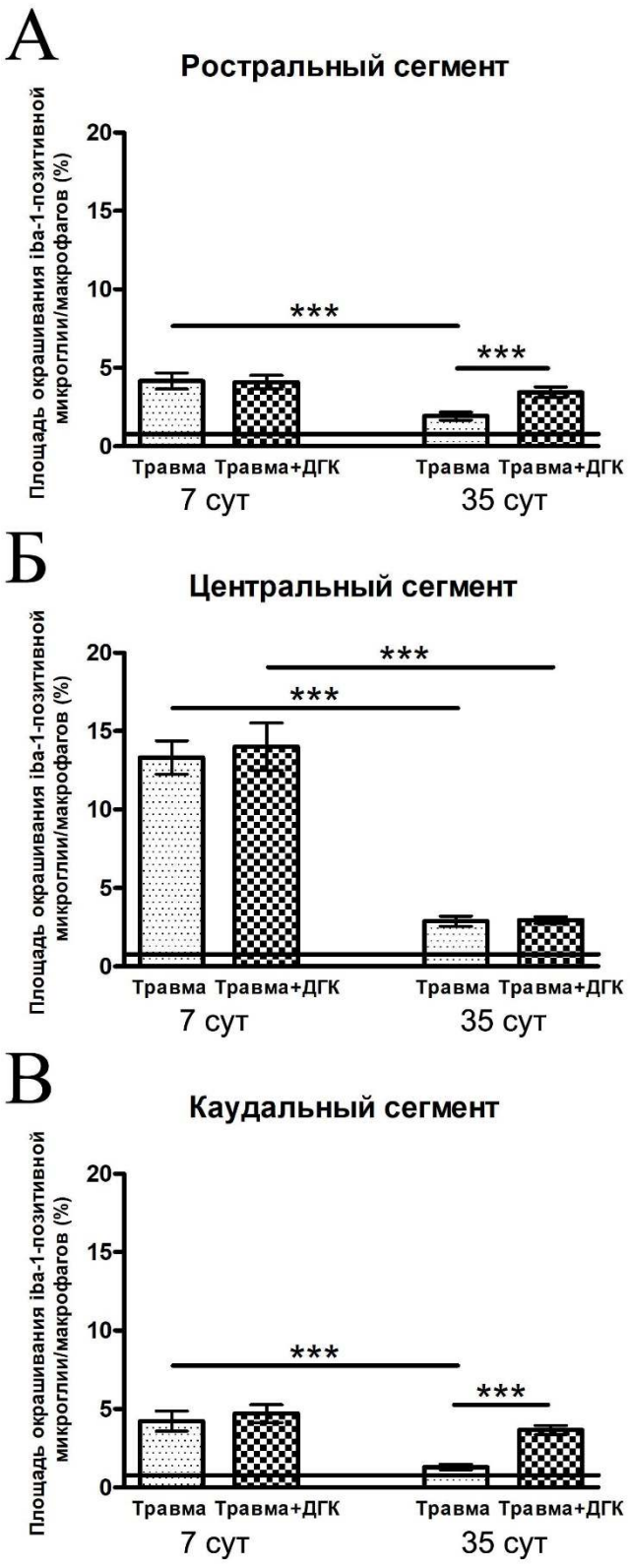

Рисунок 13 – Площадь iba-1-позитивного окрашивания измеряли в трех участках спинного мозга: в очаге повреждения (Б), в ростральном (А) и каудальном сегменте (В) от центра травмы; линия – ложнооперированные животные. Данные представлены как среднее значение±SEM, ***P<0.001, n=70 (количество срезов в каждой группе) (one-way ANOVA, тест Тьюки).

Течение посттравматического процесса после операции характеризуется резким нарастанием числа активированных микроглиацитов/макрофагов (с 1 по 7 сут после операции) с последующим снижением (с 7 по 35 сут) активности у всех экспериментальных животных (Manzhulo et al., 2018). Ранее показано, что усиление активности микроглии/макрофагов в острой фазе после повреждения спинного мозга приводит к активации врожденного иммунитета и способствует удалению чужеродных микроорганизмов и раневого мусора из очага повреждения, посредством усиления процессов фагоцитоза и высвобождения провоспалительных цитокинов (Galli et al., 2012). В хронической фазе, через 2-3 недели после травмы, запускается процесс ремоделирования поврежденной ткани, который длится от нескольких месяцев до нескольких лет. При этом прекращается острая воспалительная реакция, образование рубцов и ангиогенез (Gurtner et al., 2008). При введении ДГК площадь окрашивания iba-1-позитивной микроглии/макрофагов на 7 сут после операции не отличается от данного показателя у животных без терапии. Однако, на 35 сут после ТСМ, в группе с введением ДГК наблюдается выраженное усиление активности микроглии/макрофагов (Manzhulo et al., 2018). Данная парадоксальная, на первый взгляд, ситуация, протекает на фоне восстановления двигательной активности, усиления процессов ремиелинизации и восстановления катехоламинергических аксонов после ТСМ. Одним из возможных объяснений данного явления следует считать биохимическую и функциональную неизоморфность микроглиальных/макрофагальных клеток.

На протяжении последних 20 лет микроглия/макрофаги были дихотомизированы в двух основных фенотипах активации. Две основные клеточные субпопуляции с различными функциями включают классически активированные или воспалительные (тип М1) и альтернативно активированные или противовоспалительные (тип М2) микроглию/макрофаги. Данный феномен образования двух различных функциональных фенотипов (М1/М2) принято назвать «поляризацией» микроглии/макрофагов (Cassetta et al., 2011; Biswas et al., 2012). Тип М1 – классически активированная микроглия/макрофаги, активация

которых наблюдается при действии ЛПС и интерферона-гамма (IFN-γ) и опосредована большим количеством высвобождения оксида азота, провоспалительных цитокинов (TNF-α, IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-12, IL-23) и циклооксигеназы-2 (COX-2). Микроглия/макрофаги типа M1 обеспечивает удаление патогенных микроорганизмов за счет активации оксидазы НАДФН с последующим образования АФК. Тип M1 микроглии/макрофагов обладает выраженной антимикробной и противоопухолевой активностью, при этом хроническая воспалительная реакция приводит к повреждению ткани из-за чрезмерного высвобождения АФК и препятствует процессам регенерации. На этапах хронической воспалительной реакции происходит запуск механизмов, ингибирующих воспаление за счет активации типа M2 противовоспалительной микроглии/макрофагов (Biswas et al., 2012; Garzetti et al., 2014). Тип M2 – альтернативно активированная микроглия/макрофаги, поляризация которых происходит под действием IL-4, IL-13 и IL-10 за счет активации сигнальных путей STAT6, STAT3 (Porta et al., 2015) и характеризуются усиленным высвобождением IL-10, TGF-β, аргиназы-1 (Arg-1), CCL17 и CCL24. Микроглия/макрофаги M2 обеспечивают процесс фагоцитоза апоптотических клеток, способствуют восстановлению тканей и заживлению ран, обладают проангиогенными и профиброзными свойствами (Jetten et al., 2014), снижают воспаление и стимулируют ремоделирование поврежденных тканей (Hinz et al., 2012; Mantovani et al., 2013). В зависимости от стимула активации, макрофаги типа M2 можно разделить на четыре различных подтипа: M2a, M2b, M2c и M2d (Mantovani and Locati, 2008). Активации макрофагов подтипа M2a способствуют цитокины IL-4 и IL-13, при этом наблюдается экспрессия CD206 и антагонистов рецепторов IL-1 (IL1Ra) (Martinez et al., 2008). К поляризации макрофагов в подтип M2b приводит стимуляция агонистами толл-подобных рецепторов (TLR) или лигандами рецептора IL-1. Макрофаги M2b экспрессируют как анти-, так и провоспалительные цитокины (IL-10, IL-1β, IL-6 и TNF-α) (Martinez et al., 2008). Макрофаги M2c активируют глюкокортикоиды и IL-10, данный подтип характеризуется противовоспалительной активностью, оказывая

антиапоптотическое действие за счет экспрессии IL-10 и TGF-β (Martinez et al., 2008). Наконец, четвертый подтип макрофагов M2d, активируется под действием агонистов TLR через рецепторы аденозина, что способствует снижению активности провоспалительных цитокинов и увеличению экспрессии противовоспалительных цитокинов (IL-10) и фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) (Hasko et al., 2007; Pinhal-Enfield et al., 2003). Однако на сегодняшний день показано, что активация микроглии/макрофагов не может быть просто подразделена на типы M1 и M2. Микроглия/макрофаги не всегда являются равными с точки зрения происхождения или дифференцировки ткани, и в зависимости от участвующих агонистов цитокинов и толл-подобных рецепторов, эти клетки могут проявлять множество различных форм активации, происходящих из двух крайних состояний: IFN-γ- (M1) или IL-4-активированной (M2) микроглии/макрофагов. Таким образом, определение классической и альтернативной активации микроглии/макрофагов не является идеальным, чтобы по-настоящему описать сложность поляризации статуса активации подмножеств макрофагов в воспалительных и гомеостатических условиях в определенный момент времени (Rolot, 2018). При этом ряд иммуногистохимических маркеров, используемых в нашем исследовании, позволяет охарактеризовать не только крайние формы поляризации микроглии/макрофагов типов M1 и M2, но и определить их функциональный статус в острый период и на этапах реабилитации после ТСМ.

5.3.1. Распределение провоспалительной микроглии/макрофагов при повреждении спинного мозга и терапии ДГК

Провоспалительные цитокины, как известно, высвобождаются активированными иммунными клетками, инициируют ранний иммунный ответ на инфекцию и повреждение путем взаимодействия с лейкоцитами, привлекая их в очаг повреждения и участвуя в их активации. CD86 является маркером клеточной поверхности микроглии/макрофагов типа M1, экспрессирующей провоспалительные молекулы, такие как TNF-α, IFN-γ и оксид азота (Talamonti et

al., 2017). Микроглия принимает активное участие в патофизиологическом процессе после повреждения спинного мозга, быстро изменяет транскрипционный профиль и продуцирует провоспалительные цитокины (TNF-α, IL-6, IL-12, IL-1) и хемокины (CCL2, CCL5, CXCL1). Активированная микроглия претерпевает перестройку цитоскелета, которая обуславливает процесс миграции в место повреждения и фагоцитарную активность. Кроме того, данный процесс обеспечивает изменение экспрессии рецепторов клеточной поверхности, в том числе CD86 и CD68. При некоторых патологических состояниях на поверхности микроглии/макрофагов экспрессируются антигены главного комплекса гистосовместимости, что позволяет микроглиальным/макрофагальным клеткам выступать в роли антиген-презентирующих (King et al., 2006). В целом активация микроглии/макрофагов и сопутствующая экспрессия провоспалительных цитокинов необходима для обеспечения процессов нейропротекции. Тем не менее, чрезмерная или хроническая активация микроглии/макрофагов способствует запуску патологических процессов, таких как эксайтотоксичность и нейродегенерация. В нашей работе мы исследовали уровень активности провоспалительного типа М1 микроглии/макрофагов после ТСМ и терапии ДГК путем картирования маркера клеточной поверхности CD86.

Результаты проведенного анализа свидетельствуют о том, что число клеток, несущих на своей поверхности маркер провоспалительного фенотипа микроглии/макрофагов, постепенно увеличивается во всех исследуемых регионах спинного мозга экспериментальных животных с ТСМ (рис. 14). При этом в спинном мозге животных, получавших ДГК, выраженность этого процесса значительно ниже, чем у животных без терапевтической поддержки (рис. 14, 15).

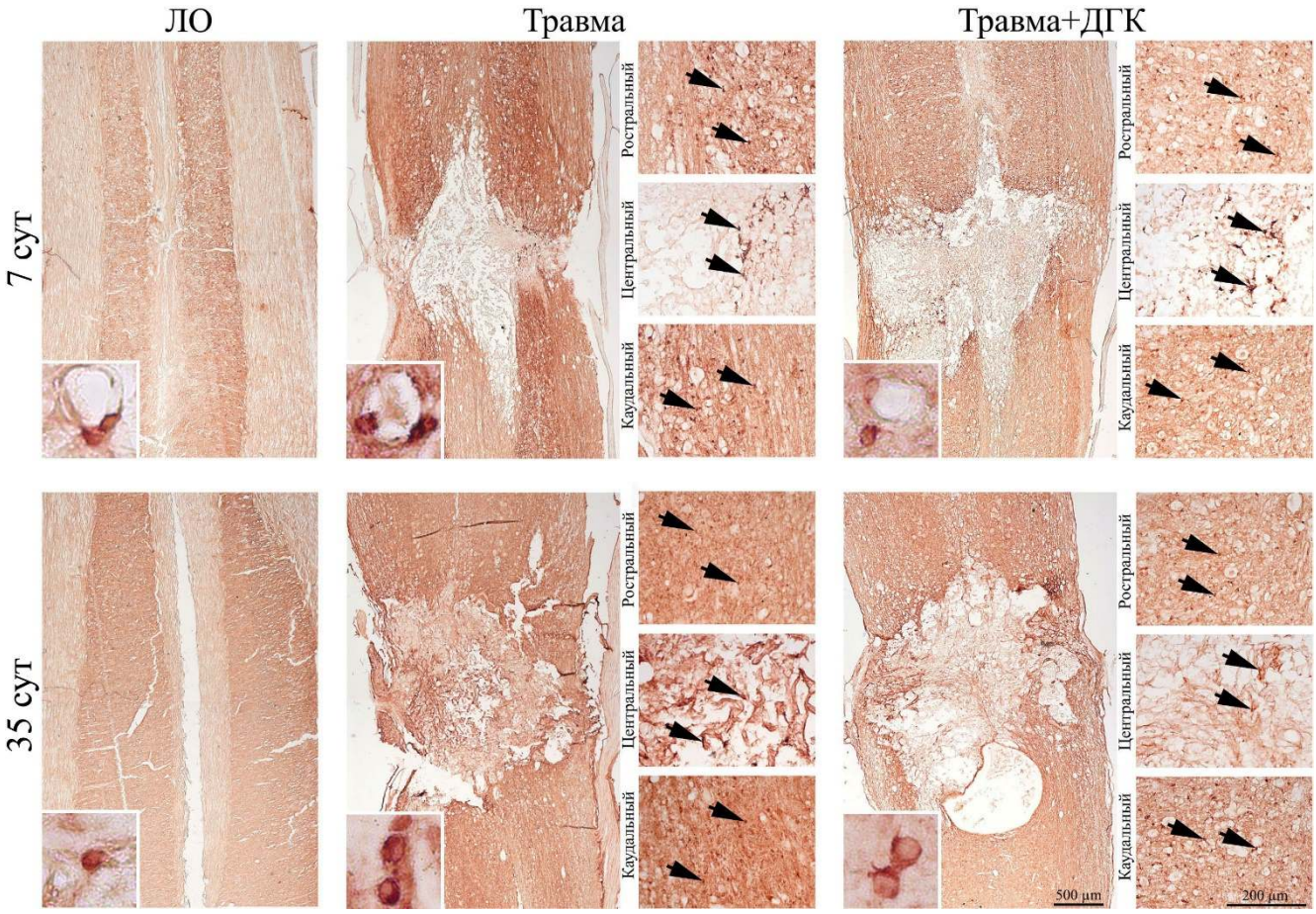

Рисунок 14 – Локализация CD86-позитивной микроглии/макрофагов (стрелки, вклейки) в спинном мозге в норме, при ТСМ и терапии ДГК.

К 7 дню площадь окрашивания CD86-позитивной микроглии/макрофагов всех сегментов спинного мозга в группе «Травма» достоверно не отличалась от группы «Травма+ДГК». Однако, к 35 сут в группе «Травма» активность CD86-позитивной микроглии/макрофагов была значительно выше во всех исследуемых регионах спинного мозга (очаг поражения (4,1±0,4%), ростральный (4,1±0,2%) и каудальный (3,1±0,3%) сегмент), по сравнению с группой «Травма+ДГК» (очаг поражения (2,7±0,3%), ростральный (3±0,3%) и каудальный (2,5±0,2%) сегмент). В группе «ЛО» на 7 и 35 сут после операции не наблюдалось изменений в площади окрашивания CD86-позитивной микроглии/макрофагов (0,2±0,01%) (рис. 15).

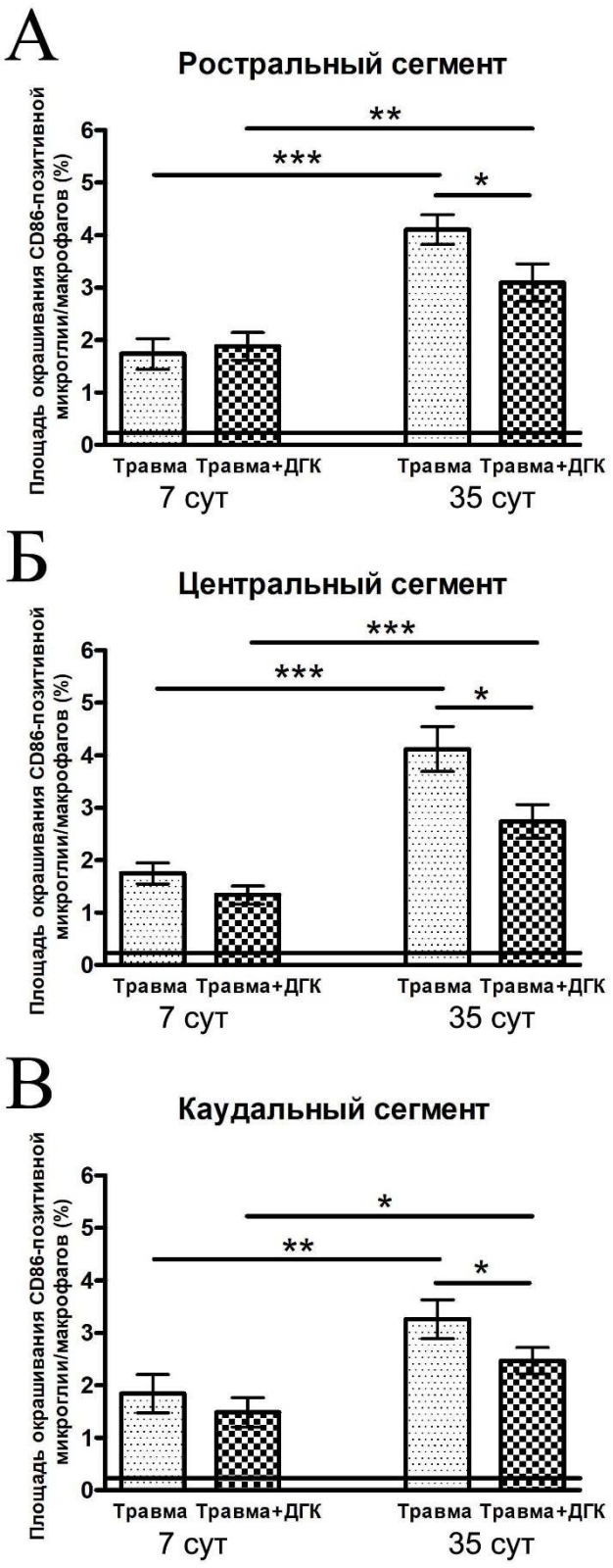

Рисунок 15 – Площадь CD86-позитивного окрашивания измеряли в трех участках спинного мозга: в очаге повреждения (Б), в ростральном (А) и каудальном сегменте (В) от центра травмы; линия – ложнооперированные животные. Данные представлены как среднее значение±SEM, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, n=70 (количество срезов в каждой группе) (one-way ANOVA, тест Тьюки).

К 7 сут после операции не наблюдалось изменений в динамике активности микроглии/макрофагов типа М1 между группами «Травма» и «Травма+ДГК». Однако данное явление нельзя рассматривать как негативное, 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 репарации поврежденных тканей (DiSabato et al., 2016). Тогда как на этапах реабилитации, к 35 сут после ТСМ, когда воспалительные процессы несут на себе деструктивную функцию, введение ДГК приводит к снижению уровня активности CD86-позитивной микроглии/макрофагов (Manzhulo et al., 2018).

В основе выявленного эффекта ДГК можно рассматривать несколько молекулярных механизмов. После ТСМ активированная микроглия экспрессирует рецепторы ретиноевой кислоты, в тоже время ДГК является эндогенным лигандом для данного типа рецепторов (de Urquiza et al., 2000) и уже в микромолярных концентрациях способствует их активации (Lengqvist et al., 2004). В исследованиях *in vitro* показано, что усиление активности рецепторов ретиноевой кислоты с помощью агониста (9-цис-ретиноевая кислота), приводит к подавлению воспалительного ответа, вызванного ЛПС в культуре клеток микро- и астроглии (Xu and Drew, 2006). Таким образом, ДГК способствует снижению процесса воспаления путем модуляции активности активированной микроглии. Известно также, что ДГК принимает активное участие в регуляции трансмембранных белков, таких как G-белки, которые передают сигнал с рецептора третьего типа на белки-эффекторы, тем самым регулируя множество сигнальных каскадов, приводящих к активации или инактивации рецепторов (Salem et al., 2001). Мембранно-связанная фосфолипаза А2 образует свободную ДГК, которая затем метаболизируется в высокоактивные соединения докозатриены, которые ингибируют транскрипционный фактор NF-κB и TNF-α, что, с одной стороны, уменьшает экспрессию проапоптотических белков Bax и Bik, а с другой – увеличивает экспрессию антиапоптотического белка Bcl-2 и способствует выраженной клеточной нейропротекции (Mukherjee et al., 2004;

Bazan, 2006). Показано, что высокоактивный метаболит ДГК – нейропротектин D1, подавляет экспрессию провоспалительного фермента COX-2 и апоптоз при развитии нейродегенеративных заболеваний головного мозга (Dyall and Michael-Titus, 2008). Кроме того, ДГК регулирует активность Na^+, K^+, Ca^{2+} ионных каналов и обладает выраженной антиоксидантной активностью (Satkunendrarajah и Fehlings, 2013), в том числе показанной в нашем исследовании. Поскольку одним из важнейших процессов, сопровождающих ТСМ является эксайтотоксичность, возникающая в результате чрезмерного высвобождения глутамата, регулирование ионных каналов может служить эффективным средством снижением чрезмерной возбудимости в месте повреждения (Satkunendrarajah и Fehlings 2013). Также среди возможных анти-воспалительных механизмов действия ДГК рассматривают ингибирование p38 MAP-киназы и активацию рецепторов клеточного ядра, активируемых пролифератором пероксисом (Peroxisome Proliferator Activated Receptor – PPARγ), который регулирует метаболизм липидов, а также гомеостаз глюкозы. Выступая в качестве молекулярного сенсора эндогенных жирных кислот и их производных, PPARγ регулирует экспрессию генов кодирующих ферменты и транспортные белки, которые контролируют гомеостаз липидов, что в итоге приводит к стимуляции окисления жирных кислот и улучшению метаболизма липопротеинов и обеспечивает антивоспалительную активность (Ajmone-Cat et al., 2012).

5.3.2. Распределение антивоспалительных макрофагов при повреждении спинного мозга и терапии ДГК

Периваскулярные макрофаги представляют собой антиген-презентующие клетки ЦНС, которые играют важную роль в регуляции деятельности иммунной системы. Эти клетки функционируют в тесной связи с периферической иммунной системой при повреждении центральной и периферической нервной системы (Williams et al., 2001). CD163 представляет собой специфический маркер для периваскулярных клеток, который экспрессируется на поверхности клеток или в растворенной форме локализуется в цитоплазме (Graeber et al., 1989). CD163

является высокоспецифическим рецептором к комплексу гемоглобин-гаптоглобин и экспрессируется исключительно на моноцитах и макрофагах, принимая активное участие в эндоцитозе комплексов гемоглобина с гаптоглобином, обеспечивая защиту ткани от гемоглобин-опосредованного окислительного стресса (Kristiansen et al., 2001). Макрофаги, экспрессирующие CD163, вовлечены в процесс разрешения воспаления путем высвобождения противовоспалительных цитокинов (IL10) (Romero-Sandoval et al., 2008). Нейропротекторная активность макрофагов типа M2 реализуется за счет экспрессии противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-10) и маркеров клеточной поверхности CD163 и CD206 (Hjorth et al., 2013).

В настоящем исследовании, для характеристики активации макрофагов типа M2, использовали CD163. При развитии острого и хронического воспалительного процесса после повреждения, CD163-позитивные макрофаги защищают окружающие ткани от избыточного воспаления за счет поглщения и нейтрализации свободного гемоглобина путем связывания с гаптоглобином посредством CD163-опосредованного эндоцитоза, а также экспрессии противовоспалительных цитокинов (IL-10) и гемоксигеназы (Kristiansen et al., 2001).

Увеличение активности CD163-позитивных макрофагов в исследуемых регионах спинного мозга в период с 7 по 35 сут после операции наблюдалось у животных всех экспериментальных групп (рис. 16). Первоначально иммунопозитивные клетки концентрируются в зоне повреждения; в периферических участках нервной ткани их содержание значительно ниже. В последующем (с 7 по 35 сут) наблюдается обратная динамика – число CD163-позитивных макрофагов в зоне очага снижается, а в ростральном и каудальном сегментах происходит значительное увеличение популяции данных клеток. При этом на всех этапах наблюдения у животных, получавших терапию ДГК, число M2-позитивных клеток достоверно выше в сравнении с группой «Травма» (рис. 16, 17).

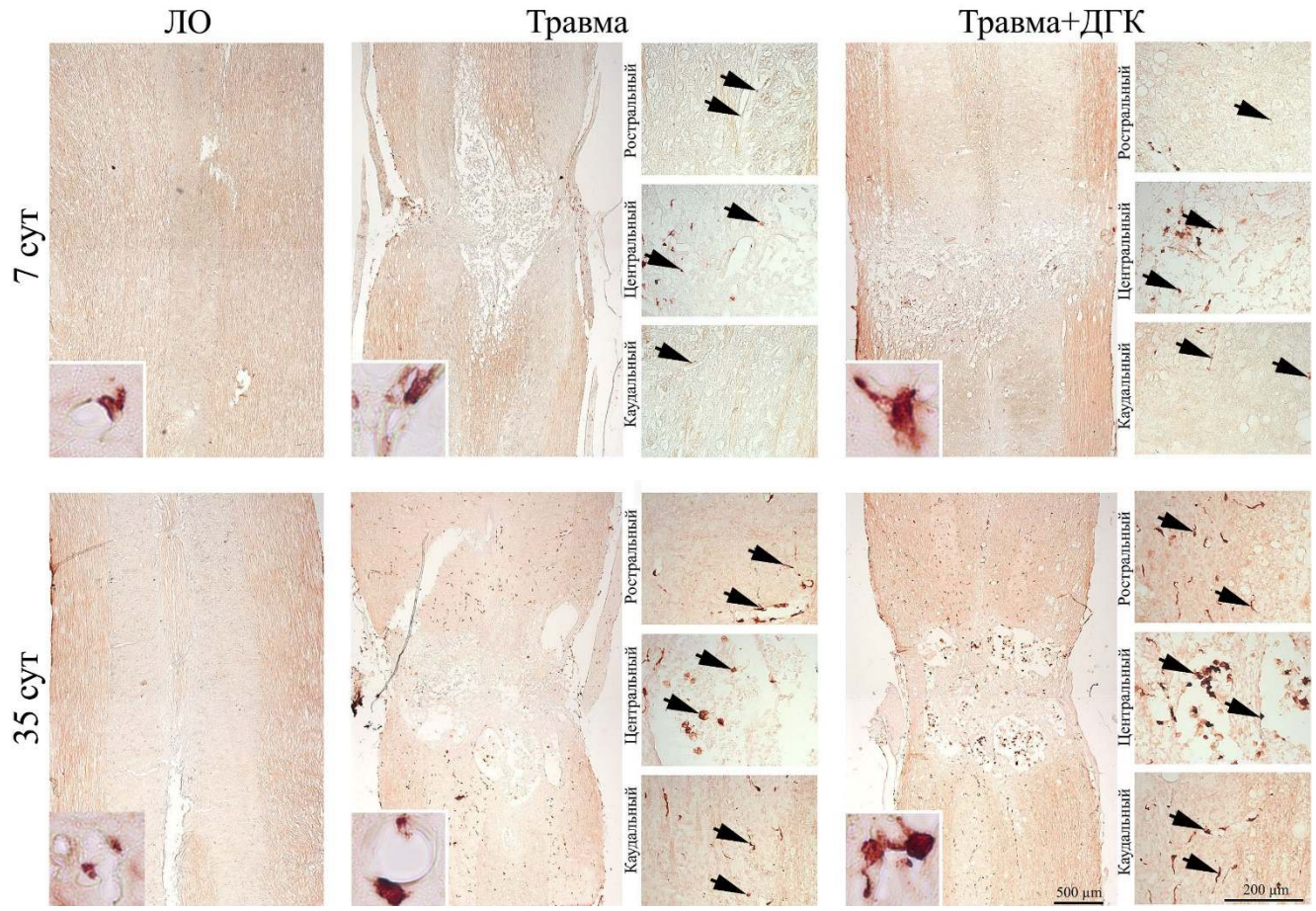

Рисунок 16 – Локализация CD163-позитивных макрофагов (стрелки, вклейки) в спинном мозге в норме, при ТСМ и терапии ДГК.

К 7 сут после операции активность CD163-позитивных макрофагов, в группе «Травма» была ниже как в очаге повреждения (0,9±0,08%), так и в соседних сегментах спинного мозга (ростральный (0,1±0,02%), каудальный (0,06±0,01%)), по сравнению с группой «Травма+ДГК» (очаг повреждения (1,4±0,2%), ростральный (0,2±0,04%) и каудальный (0,3±0,06%) сегмент). К 35 сут данная тенденция сохраняется, в группе «Травма» площадь окрашивания CD163 была достоверно ниже (очаг поражения (0,5±0,06%), ростральный (0,8±0,07%) и каудальный (0,7±0,05%) сегмент) по сравнению с животными с терапией ДГК (очаг поражения (0,8±0,08%), ростральный (1±0,09%) и каудальный (1±0,1%) сегмент). В группе «ЛО» через 7 и 35 сут после операции не наблюдалось изменений в площади окрашивания CD163-позитивных макрофагов (0,05±0,01%) (рис. 17).

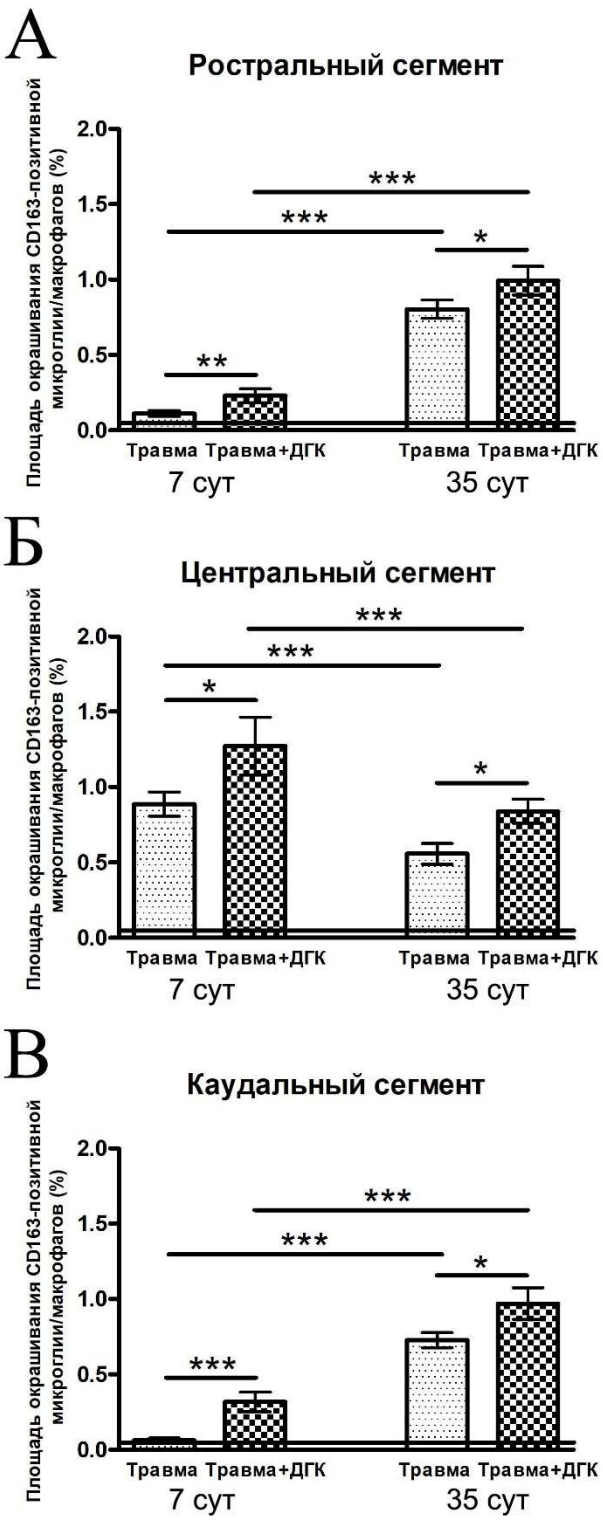

Рисунок 17 – Площадь CD163-позитивного окрашивания измеряли в трех участках спинного мозга: в очаге повреждения (Б), в ростральном (А) и каудальном сегменте (В) от центра травмы; линия – ложнооперированные животные. Данные представлены как среднее значение±SEM, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, n=70 (количество срезов в каждой группе) (one-way ANOVA, тест Тьюки).

Усиление активности CD163-позитивных макрофагов, наблюдаемое нами в ростральном и каудальном сегментах спинного мозга с 7 по 35 сут после операции, очевидно необходимо для обеспечения процессов ремоделирования нервной ткани на этапах реабилитации. Тогда как в центре повреждения наблюдается обратная реакция, с 7 по 35 сут после ТСМ происходит снижение активности CD163-позитивных макрофагов, вероятно, для более успешного разрешения острой воспалительной реакции за счет усиления процессов фагоцитоза поврежденных тканей, нейтрализации и поглощения гемоглобина (Manzhulo et al., 2018). Реализация фагоцитарной активности микроглиальными/макрофагальными клетками, а также экспрессия ключевого противовоспалительного цитокина IL-10 многими авторами рассматривается как важный элемент восстановления и репарации тканей после повреждения (Liao et al., 2012; Thompson et al., 2013).

Терапия ДГК приводит к усилению активности антивоспалительного типа CD163-позитивных макрофагов на всех этапах послеоперационного периода, что очевидно, лежит в основе нейропротекции и восстановления двигательной активности животных (Manzhulo et al., 2018). Ранее установлено, что введение ДГК после ТСМ приводит к улучшению локомоторной активности, связанной со значительным снижением воспалительных маркеров, таких как CD68 (King et al., 2006). На различных клеточных и животных моделях показано, что ДГК приводит к ингибированию экспрессии маркеров клеточной поверхности микроглии/макрофагов типа M1 (CD86 и CD40), уменьшает продукцию провоспалительных цитокинов (IL-1β, TNF-α и IFN-γ) (Kong et al., 2010) и оказывает стимулирующее действие на экспрессию маркеров клеточной поверхности микроглии/макрофагов типа M2 (CD206) (Talamonti et al., 2017). В исследованиях Talamonti et al. (2017), показано что нарушение системного синтеза ДГК как *in vitro*, так и *in vivo*, приводит к дисбалансу в формировании макрофагов типов M1/M2, с преобладанием типа M1. Данная работа подтверждает, что ДГК играет ключевую роль в контроле баланса про- и анти-воспалительной активности микроглия/макрофагов. Несмотря на большое количество экспериментальных

данных, механизмы, регулирующие микроглиальную/макрофагальную полярность на разных этапах развития патофизиологического процесса после ТСМ на сегодняшний день остаются неизвестны.

5.4. Активность астроцитов при компрессионной травме спинного мозга и терапии ДГК

Астроциты являются наиболее распространенным типом клеток в ЦНС, обеспечивая поддержку для развития и поддержания функции ЦНС. В то же время астроциты участвуют в процессе повреждения и во множестве неврологических расстройств, при которых они становятся реактивными или дисфункциональными (Sloan and Barres, 2014; Ben Haim et al., 2015). В нашем исследовании для выявления реактивной астроглии проводили иммуноокрашивание глиального фибриллярного кислого белка (GFAP). GFAP входит в состав семейства белков промежуточных филаментов, в том числе виментина, нестина и других белков, участвующих в формировании клеточного цитоскелета. Иммуногистохимическое картирование экспрессии GFAP является общепризнанным методом идентификации астроцитов. Тем не менее, существуют некоторые ограничения в использовании GFAP в качестве маркера астроцитов, так как с его помощью можно идентифицировать большую часть, но не всю клеточную популяцию. GFAP не является маркером абсолютно всех астроцитов здоровой ткани ЦНС или вдали от места повреждения, в экспрессии GFAP астроцитами проявляется как региональная, так и локальная изменчивость, которая динамически регулируется большим количеством меж- и внутриклеточных сигнальных молекул (Ren, 2010; Donegan et al., 2013).

В настоящем исследовании показана временная и региональная динамика астроцитарной реакции при повреждении спинного мозга и терапии ДГК. У животных обеих экспериментальных групп наблюдается заметное снижение плотности распределения астроцитов в очаге повреждения в острый период, который сменяется постепенным нарастанием данного показателя к 35 сут. Выраженный астроцитоз регистрируется в ростральном и каудальном сегментах

спинного мозга, причем его активность нарастает к концу наблюдения (рис. 18, 19). Следует отметить, что на всех этапах послеоперационного периода у животных, получавших ДГК, активность астроцитарной реакции более выражена, чем у животных в группе «Травма».

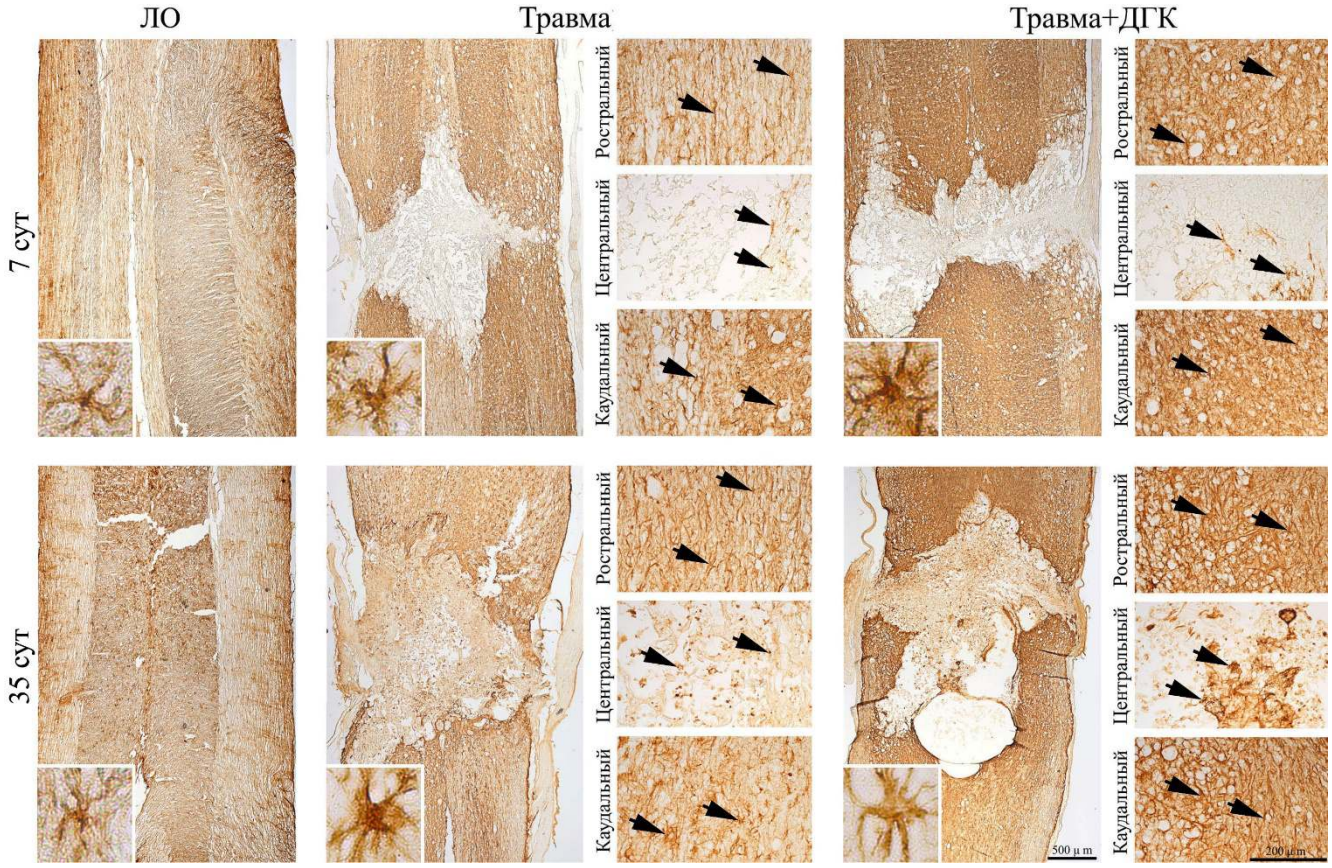

Рисунок 18 – Локализация GFAP-позитивной астроглии (стрелки, вклейки) в спинном мозге при ТСМ и терапии ДГК.

К 7 сут после операции площадь окрашивания GFAP у крыс с ТСМ была снижена во всех регионах спинного мозга (очаг повреждения (1,8±0,2%), ростральный (6,8±0,4%) и каудальный (9,3±0,6%) сегмент), по сравнению с группой «Травма+ДГК» (очаг повреждения (3,4±0,2%), ростральный (14,5±1%) и каудальный (15±0,6%) сегмент). К 35 сут во всех экспериментальных группах в очаге повреждения и в ростральном сегменте спинного мозга площадь реактивных астроцитов увеличивалась по сравнению с 7 сут после операции. При введении ДГК наблюдался значительный прирост GFAP-позитивных астроцитов во всех регионах спинного мозга (очаг повреждения (6,8±0,4%), ростральный

(20,4±1,1%) и каудальный (15,6±0,9%) сегмент), по сравнению с группой «Травма» (очаг повреждения (4,9±0,3%), ростральный (15,4±1%) и каудальный (11,6±0,9%) сегмент). В группе «ЛО» на 7 и 35 сут после операции не наблюдалось изменений в площади окрашивания GFAP-позитивной астроглии (8,2±0,7%) (рис. 19).

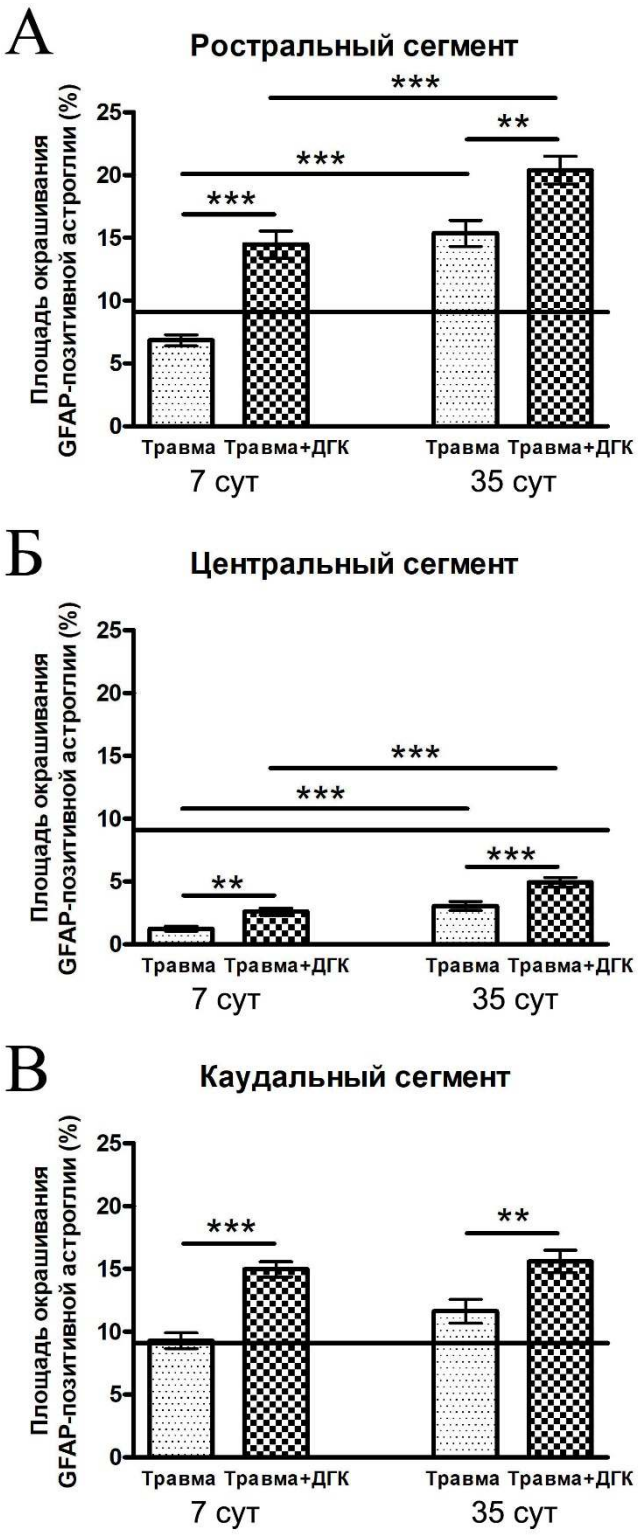

Рисунок 19 – Площадь GFAP-позитивного окрашивания измеряли в трех участках спинного мозга: в очаге повреждения (Б), в ростральном (А) и каудальном сегменте (В) от центра травмы; линия – ложнооперированные животные. Данные представлены как среднее значение±SEM, **P<0.01, ***P<0.001, n=70 (количество срезов в каждой группе) (one-way ANOVA, тест Тьюки).

В ходе патофизиологического процесса реактивные астроциты экспрессируют широкий спектр медиаторов, таких как цитокины, хемокины и факторы роста, которые оказывают нейропротекторное или нейротоксическое действие (Sloan and Barres, 2014). В последние годы ведутся широкие дискуссии относительно того, способствует или препятствует активация астроцитов процессам нейропротекции. Наиболее вероятный ответ заключается в том, что суммарный результат активации астроцитов зависит не столько от числа клеток, сколько является результатом сложного интегративного взаимодействия между про- и противовоспалительными, а также нейротоксическими и нейротрофическими процессами, происходящими при участии астроцитарной глии (Ben Haim et al., 2015). Например, цитокины, являются основными эффекторными молекулами, обеспечивающими поддержание данного баланса, поскольку они выполняют двойную роль, усиливая или ингибируя нейровоспаление. В этой связи выявление нейропротекторной и/или нейротоксической активности астроцитов при нейровоспалении оказалось чрезвычайно сложным, поскольку они не только высвобождают широкий спектр про- (IL-10, TGFβ, INFβ) и антивоспалительных (IL-1β, IL-6, TNFα, IL-15,) цитокинов, но и экспрессируют широкий арсенал рецепторов цитокинов и сами являются мишенью их аутокринных или паракринных эффектов (Ben Haim et al., 2015).

В соответствии с ранее установленной нами антивоспалительной активностью препарата ДГК, действие которого направлено на поляризацию микроглии/макрофагов в сторону типа М2, и сопутствующее усиление активности астроглии, интересно отметить, что астроциты, по-видимому, участвуют в подавлении активации микроглии через петлю отрицательной обратной связи (Ouali Alami et al., 2018). Исследования *in vitro* продемонстрировали, что среда, кондиционированная астроцитами или сокультивирование микроглии с астроцитами ослабляет активацию микроглии при действии различных активаторов воспалительного процесса (Xu et al., 2018). Точный механизм подобного действия астроглии, на сегодняшний день не до конца установлен,

однако считается, что в данном взаимодействии активное участие принимает TGFβ, проявляющий нейропротекторное действие в экспериментальных моделях эксайтотоксичности или ишемии (Stoll et al., 2004). Кроме того, астроциты находятся в тесном взаимодействии с нейронами, обеспечивая процесс глиотрансмиссии посредством экспрессии транспортеров для различных нейромедиаторов и нейромодуляторов, включая глутамат, γ-аминомасляную кислоту (ГАМК), глицин и гистамин. Данные транспортеры обеспечивают быстрое удаление нейротрансмиттеров, высвобождаемых в синаптическую щель, что необходимо для прекращения синаптической передачи и стабилизации возбудимости нейронов и их защиты от эксайтотоксичности (Nakagawa and Kaneko, 2010).

Сразу после травмы спинного мозга (острая фаза) астроциты на участке повреждения и вокруг него начинают активно пролиферировать, подвергаются морфологическим изменениям и усиливают экспрессию внеклеточных белков, в этот момент они являются основными компонентами глиального рубца (Fitch and Silver, 2008). В нашем исследовании наблюдается увеличение активности реактивных астроцитов в ростральном и каудальном сегментах спинного мозга при ТСМ. Однако, лечение ДГК, наряду с улучшением показателей локомоторной активности животных, запуска процессов ремиелинизации и восстановлением нейритов, приводит к еще более выраженному астроглиозу через 7 и 35 сут после операции во всех исследуемых сегментах спинного мозга (Manzhulo et al., 2018). Долгое время считалось, что астроглиальный шрам ухудшает регенерацию аксонов после травмы, тем самым препятствуя восстановлению спинного мозга (Silver and Miller, 2004; Klapka and Muller, 2006). В недавнем исследовании Андерсон с коллегами показали, что удаление астроцитарного шрама не способствует усилению роста аксонов, а, напротив, индуцирует гибель новообразованных нервных проводников. В своем эксперименте Андерсон с коллегами ингибировали образование реактивных астроцитов с использованием двух генетически модифицированных моделей мышей для удаления или уменьшения глиального рубца – в первой модели пролиферирующие

шрамообразующие астроциты были выборочно купированы, а во второй транскрипционный фактор STAT3 (необходим для образования шрамформирующих реактивных астроцитов) полностью ингибировали в астроцитах. В обоих случаях исследователи обнаружили, что спонтанного отрастания поврежденных аксонов через шрам не происходит. Кроме того, у животных, лишенных шрама, наблюдается увеличение свободной полости от аксонов до места повреждения в сравнении с животными дикого типа, что указывает на то, что реактивные астроциты поддерживают поврежденные нейроны в ходе регенерации их отростков (Anderson et al., 2016). В совокупности полученные результаты представляют убедительные доказательства того, что образование астроцитарного шрама в определенной мере способствует, а не ингибирует регенерацию аксонов после ТСМ (Liddelow et al., 2016; Anderson et al., 2016). Ранее на различных моделях повреждения центральной нервной системы с применением терапии ДГК получен ряд данных, указывающих на важную роль астроцитов в прогрессировании и разрешении некоторых нейропатологий. Ряд авторов считает, что астроциты являются клетками-мишенями для ДГК в ЦНС, так как активность астроцитов в значительной степени зависит от состояния их клеточных мембран. Изменение количества ДГК в клеточных мембранах астроцитов оказывает активное влияние на биофизические свойства мембран-связывающих белков (рецепторов, транспортеров и белков цитоскелета) и сигнальные пути, связанные с липидными мессенджерами, в частности, высвобождение арахидоновой кислоты и синтез эйкозаноидов (Salem et al., 2001; Broughton and Wade, 2002). Арахидоновая кислота и ее эйкозаноидные производные способны оказывать направленное действие на основные свойства астроцитов, такие как регуляция объема, поглощение глутамата и глюкозы (Yu et al., 1993). В тоже время в модели ишемического инсульта, у крыс получавших ДГК, зарегистрировано увеличение GFAP-позитивных астроцитов уже в течение первых 24 часов, что происходит одновременно с увеличением выживаемости нейронов по сравнению с крысами, обработанными физиологическим раствором. Вклад астроцитов в нормальное функционирование спинного и головного мозга

был продемонстрирован многими авторами. Астроциты экспрессируют ряд нейротрофических факторов (NGF, CNTF, GDNF, FGF) необходимых для поддержки и нормального функционирования нейронов, а некоторые из них, такие как фактор роста нервов, стимулируют рост аксонов (Kimelberg and Norenberg, 1989; Tower et al., 1992). Таким образом, повышение уровня астроцитоза может быть связано с возможным защитным действием ДГК, направленным на рядом расположенные нейроны и их аксоны.

5.5. Локализация и активность виментина при повреждении спинного мозга и терапии ДГК

Виментин является белком промежуточных филаментов и обычно распознается как внутриклеточный белок, который участвует в клеточных процессах, таких как клеточная адгезия и миграция (Ivaska et al., 2007). Кроме того, недавние исследования подтверждают внеклеточную локализацию виментина, при этом на сегодняшний день недостаточно изучен механизм, за счет которого происходит его секреция. Однако показано, что секреция виментина астроцитами способствует росту аксонов и восстановлению локомоторной активности у мышей с ТСМ (Teshigawara et al., 2013). В нашем исследовании после ТСМ наблюдается многократное усиление активности виментина в области повреждения и прилежащих участках нервной ткани (рис. 20).

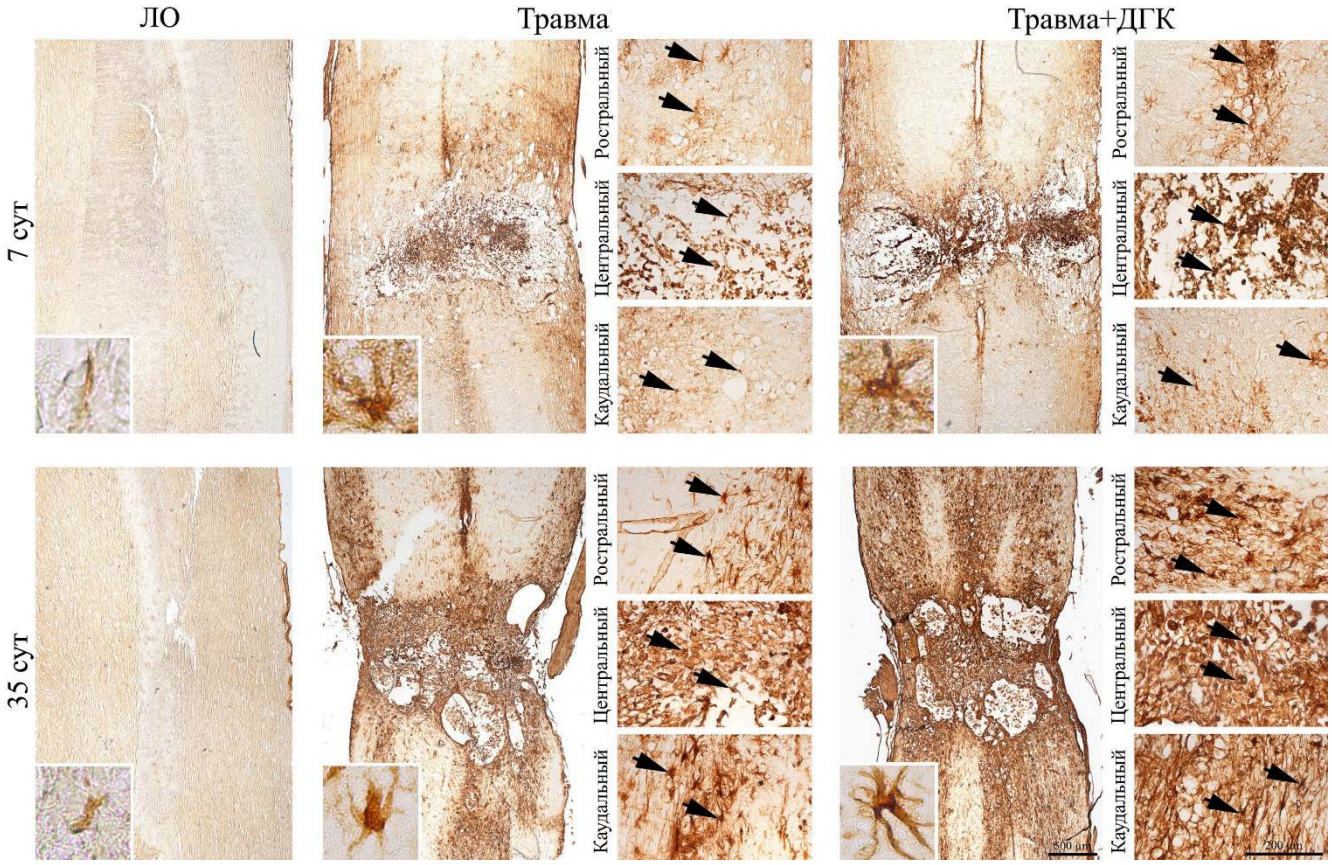

Рисунок 20 – Локализация виментина (стрелки, вклейки) в спинном мозге в норме, при ТСМ и терапии ДГК.

Через 7 сут после операции площадь окрашивания виментина у крыс с ТСМ была ниже (очаг повреждения (16,4±0,9%), ростральный (5,1±0,5%) и каудальный (3,6±0,4%) сегмент), чем в группе «Травма+ДГК» (очаг повреждения (21,7±1,2%), ростральный (12,2±1,7%) и каудальный (10,4±0,7%) сегмент). К 35 сут после травмы при введении ДГК наблюдалось усиление экспрессии виментина во всех исследуемых регионах спинного мозга (очаг повреждения (39±1,5%), ростральный (31,1±1,7%) и каудальный (28,8±1,7%) сегмент), по сравнению с группой «Травма» (очаг повреждения (30,6±1,8%), ростральный (19,3±1,1%) и каудальный (17,3±1%) сегмент). В группе «ЛО» на 7 и 35 сут после операции не наблюдалось изменений в площади окрашивания виментина (1,2±0,1%) (рис. 21).

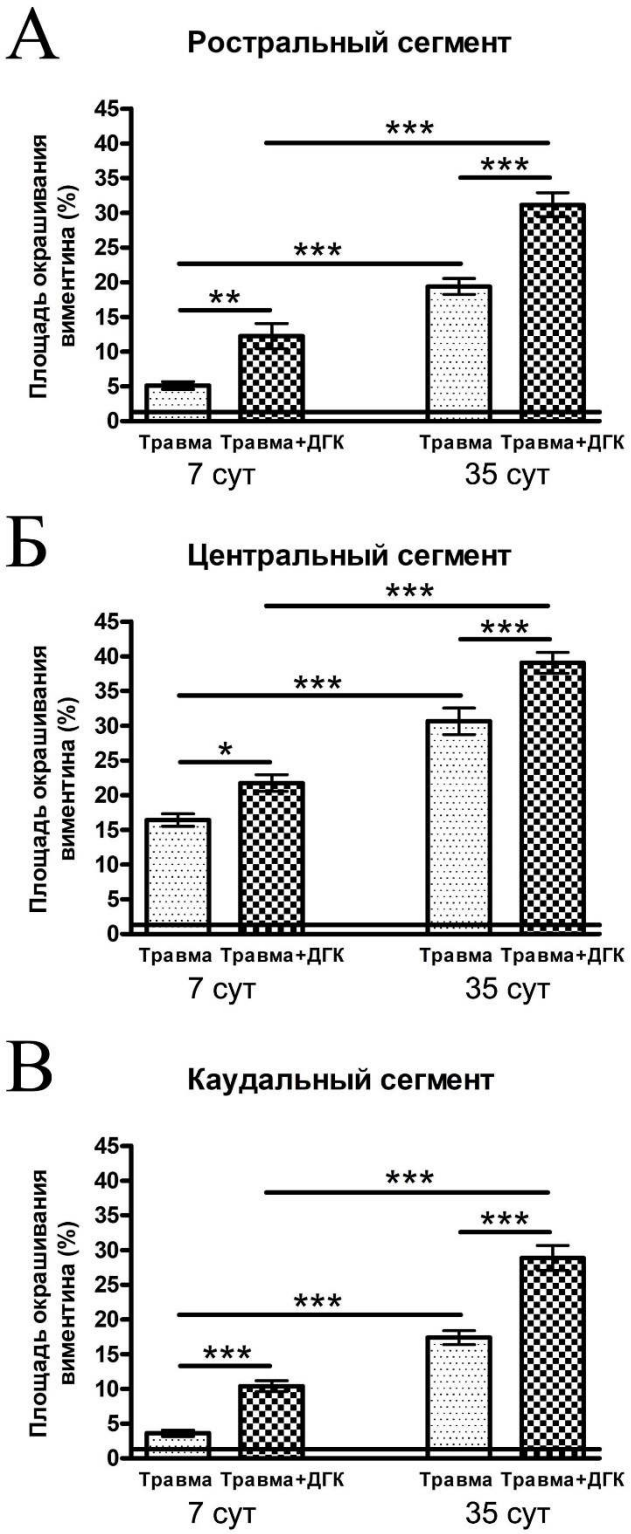

Рисунок 21 – Площадь виментин-позитивного окрашивания измеряли в трех участках спинного мозга: в очаге повреждения (Б), в ростральном (А) и каудальном сегменте (В) от центра травмы; линия – ложнооперированные животные. Данные представлены как среднее значение±SEM, **P<0.01, ***P<0.001, n=70 (количество срезов в каждой группе) (one-way ANOVA, тест Тьюки).

При культивировании микро- и астроглии с добавлением ДГК в концентрации 1 мкМ в течение 2 сут, с помощью метода ИФА выявлено достоверное увеличение внутриклеточного виментина в сравнении с интактными клетками (рис. 22).

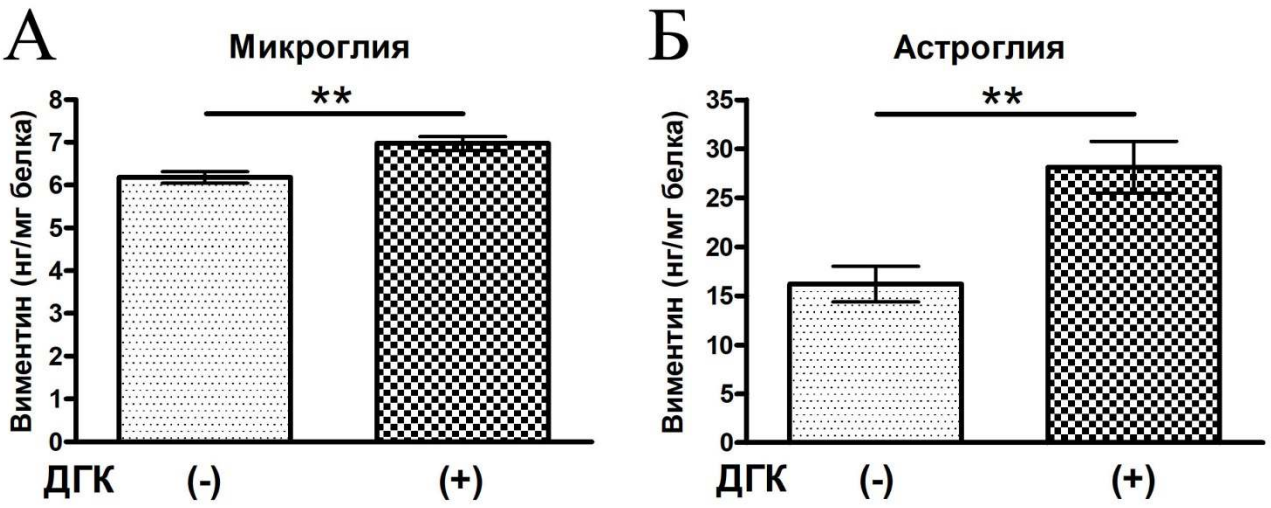

Рисунок 22 – Содержание виментина в культуре клеток микроглии (А) и астроглии (Б) с добавлением ДГК. Данные представлены как среднее значение±SEM, **P<0.01, n=9 (тест Манна-Уитни).

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 (Manzhulo et al., 2018). Ранее установлена связь между виментином и состоянием нейронов, показано, что усиление экспрессии виментина в клетках нейробластомы сопровождается увеличением количества аксонов (Dubey et al., 2004). Добавление виментина к первичной нейрональной культуре клеток индуцирует рост аксонов, причем данная активность сохраняется даже при культивировании с добавлением хондроитин сульфат протеогликана. Установлено, что виментин усиливает рост аксонов через взаимодействие с инсулиноподобным рецептором фактора роста 1, который является прямой

мишенью внеклеточного виментина в культивируемых нейронах (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). Hsu с коллегами показали, 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 другой группе исследований с использованием препарата деносомин, зарегистрировано увеличение экспрессии виментина астроцитами, который в данном случае функционирует как фактор роста аксонов. Усиление экспрессии виментина в конечном итоге приводит к росту 5-НТ-позитивных аксонов за пределы глиального шрама и восстановлению функций задних конечностей у мышей с ТСМ (Shigyo et al., 2016; Teshigawara et al., 2013). 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. Дальнейшее выяснение подробных механизмов, лежащих в основе функционирования виментина, будет иметь важное значение для разработки лекарств на основе виментина и/или генной терапии. В рамках настоящего 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). В данном случае возможным механизмом действия ДГК, усиливающим экспрессию виментина, является его направленное действие

на рецепторы семейства PPAR (Peroxisome Proliferator Activated Receptor), которые конститутивно экспрессируются на глиоцитах и нейронах. Ранее на модели ТСМ показано, что ДГК является эндогенным лигандом для рецептора PPAR-α (Paterniti et al., 2014), а нейропротектин D1 (метаболит ДГК) способен стимулировать активность рецептора PPAR-γ (Zhao et al., 2011). В то же время в другой группе экспериментов установлено, что стимулирование рецептора PPAR-α усиливает фосфорилирование виментина (Zhang et al., 2015). Поэтому усиление экспрессии виментина астроцитами при ТСМ и терапии ДГК, предположительно, осуществляется за счет стимулирования рецепторов семейства PPAR, однако точные сигнальные пути данных модификаций на сегодняшний день неизвестны и являются объектом дальнейших исследований.

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 антивоспалительного, нейропротекторного и регенеративного действия ДГК нуждаются в дополнительных детальных исследованиях, способных обеспечить его внедрение в клиническую практику для лечения посттравматической патологии центральной и периферической нервной системы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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.

Для характеристики механизмов повреждающего действия ТСМ в острый посттравматический период и на этапах реабилитации проведено иммуногистохимическое картирование основного белка миелина и катехоламинергических нервных волокон. Повреждение спинного мозга сопровождается процессами демиелинизации и дисмиелинизации, при этом введение ДГК индуцирует процессы ремиелинизации как в центре повреждения, так и в ростральном и каудальном сегментах спинного мозга и обеспечивает восстановление аксонов на всех этапах патофизиологического процесса. 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 составе 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. 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 за счет регуляции антиапоптотических белков Bcl-2 и Bcl-xL, а также путем ингибирования экспрессии проапоптотических белков Bax и Bad (Paterniti et al., 2014). Поэтому восстановление миелиновой оболочки центральных аксонов может считаться дополнительным нейропротективным ресурсом ДГК в условиях повреждения центральной нервной системы.

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. В острый период травмы микроглиальная реакция у животных обеих экспериментальных групп не демонстрирует достоверных отличий. Спустя 5 недель общий пул iba-1-позитивной микроглии заметно уменьшается во всех исследованных зонах, что свидетельствует о затихании воспалительного процесса. При этом темпы снижения микроглиоза в группе животных, получавших ДГК, заметно ниже, чем у животных группы «Травма». 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 М1, классический) и антивоспалительной (тип М2, альтернативный) функциями (Kobayashi et al., 2013; Lim et al., 2017). По нашим данным в острый период травмы активация провоспалительного (CD86-иммунопозитивного) типа микроглии происходит в обеих экспериментальных группах синхронно и не демонстрирует достоверных отличий. 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 М1-типа микроглии/макрофагов.

В то же время, микроглия/макрофаги типа М2 экспрессируют антивоспалительные 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 М2 (CD163-иммунопозитивных) макрофагов, что, очевидно, является решающим фактором в нормализации тканевого гомеостаза и создании предпосылок для восстановления двигательной активности животных. 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.

Скорость образования и мофологическое устройство рубцовой ткани, ограничивающей травмированную зону, является решающим фактором, обеспечивающим стабилизацию зоны травмы и препятствующим распространению некротических процессов на прилежащие участки мозга. В этом процессе инициирующая роль принадлежит астроцитам, которые на участке повреждения и вокруг него начинают активно пролиферировать, подвергаются морфологическим изменениям и усиливают экспрессию внеклеточных белков, в этот момент они являются основными компонентами глиального рубца (Fitch and Silver, 2008). Как показано в настоящей работе у животных группы «Травма» в острый период реактивный астроглиоз в окружающих тканях выражен довольно слабо - число астроцитов в ростральном 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. 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 (Liddelow 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).

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 культуре астро- и микроглиоцитов в нашем исследовании показано, что обработка клеток ДГК приводит к увеличению экспрессии внутриклеточного виментина практически в два раза. Ранее, Hsu с коллегами показали, что астроциты с усиленной экспрессией виментина индуцируют рост аксонов после повреждения спинного мозга у взрослых крыс (Hsu and Xu, 2005). Полученные в ходе нашего исследования данные впервые

демонстрируют, что ДГК индуцирует усиление экспрессии виментина, что вероятно способствует восстановлению локомоторной активности у крыс после повреждения спинного мозга.

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что ДГК обладает нейро- и глиотропной активностью, реализуемой в течение посттравматического процесса в центральной нервной системе, что свидетельствует о ее высоком терапевтическом потенциале. В то же время многие механизмы реализации нейропротективного и регенераторного действия ДГК нуждаются в дополнительных детальных исследованиях, способных обеспечить его внедрение в клиническую практику для лечения посттравматической патологии центральной и периферической 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 постравматический период с постепенным его снижением на этапах реабилитации. При введении ДГК реакция

микроглии/макрофагов обеспечивается за счет М2-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 реваскуляризации и реиннервации в травматическом очаге и прилежащих участках нервной ткани.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Горяйнов С.А., Процкий С.В., Охотин В.Е., Павлова Г.В., Ревищин А.В., Потапов А.А. О роли астроглии в головном мозге в норме и патологии // Анналы неврологии. 2013. Т. 7. С. 45–51.

2. Кармен Н.Б., Мороз В.В., Маевский Е.И. Механизмы вторичного повреждения нейронов при тяжелой черепно – мозговой травме (Часть 1) // Общая реаниматология. 2011. Т. 7. С. 56–59.

3. Куликов В.А., Гребенников И.Н. Резольвины, протектины и марезины – новые медиаторы воспаления // Вестник ВГМУ. 2012. Т. 11. С. 25–30.

4. 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.

5. Роскин Г.И., Левинсон Л.Б. Микроскопическая техника. М.: Советская наука, 1957. 469 с.

6. Сухарева Е.В., Калинина Т.С., Булыгина В.В., Дыгало Н.Н. Тирозингидроксилаза мозга и ее регуляция глюкокортикоидами // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016. Т. 20. С. 212–219.

7. Ahlborn P., Schachner M., Irintchev A. One hour electrical stimulation accelerates functional recovery after femoral nerve repair // Experimental Neurology. 2007. Vol. 208. P. 137–144.

8. Ahuja C.S., Fehlings M. Concise review: bridging the gap: novel neuroregenerative and neuroprotective strategies in spinal cord injury // Stem Cells Translational Medicine. 2016. Vol. 5. P. 914–924.

9. Aid S., Vancassel S., Poumes-Ballihaut C., Chalon S., Guesnet P., Lavialle M. Effect of a diet-induced n-3 PUFA depletion on cholinergic parameters in the rat hippocampus // Journal of Lipid Research. 2003. Vol. 44. P. 1545–1551.

10. Ajmone-Cat M., Lavinia Salvatori M., De Simone R., Mancini M., Biagioni S., Bernardo A., Cacci E., Minghetti L. Docosahexaenoic acid modulates

inflammatory and antineurogenic functions of activated microglial cells // Journal of Neuroscience Research. 2012. Vol. 90. P. 575–587.

11. Akbar M., Kim H.Y. Protective effects of docosahexaenoic acid in staurosporine-induced apoptosis: Involvement of phosphatidylinositol-3 kinase pathway // Journal of Neurochemistry. 2002. Vol. 82. P. 655–665.

12. Alizadeh A., Dyck S.M., Karimi-Abdolrezaee S. Myelin damage and repair in pathologic CNS: challenges and prospects // Frontiers in Molecular Neuroscience. 2015. Vol. 8. P. 1–27.

13. Almad A., Sahinkaya F.R., McTigue D.M. Oligodendrocyte fate after spinal cord injury // Neurotherapeutics. 2011. Vol. 8. P. 262–273.

14. Anderson M.A., Burda J.E., Ren Y., Ao Y., O'Shea T.M., Kawaguchi R., Coppola G., Khakh B.S., Deming T.J., Sofroniew M.V. Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration // Nature. 2016. Vol. 532. P. 195–200.

15. Ankeny D.P., Lucin K.M., Sanders V.M., McGaughy V.M., Popovich P.G. Spinal cord injury triggers systemic autoimmunity: evidence for chronic B lymphocyte activation and lupus-like autoantibody synthesis // Journal of Neurochemistry. 2006. Vol. 99. P. 1073–1087.

16. Azari M.F., Profyris C., Zang D.W., Petratos S., Cheema S.S. Induction of endogenous neural precursors in mouse models of spinal cord injury and disease // European Journal of Neurology. 2005. Vol. 12. P. 638–648.

17. Azbill R.D., Mu X., Bruce-Keller A.J., Mattson M.P., Springer J.E. Impaired mitochondrial function, oxidative stress and altered antioxidant enzyme activities following traumatic spinal cord injury // Brain Research. 1997. Vol. 765. P. 283–290.

18. Bains M., Hall E.D. Antioxidant therapies in traumatic brain and spinal cord injury // Biochimica et Biophysica Acta. 2012. Vol. 1822. P. 675–684.

19. Bareyre F.M., Kerschensteiner M., Misgeld T., Sanes J.R. Transgenic labeling of the corticospinal tract for monitoring axonal responses to spinal cord injury // Nature Medicine. 2005. Vol. 11. P. 1355–1360.

20. Bareyre F.M., Kerschensteiner M., Raineteau O., Mettenleiter T.C., Weinmann O., Schwab M.E. The injured spinal cord spontaneously forms a new intraspinal circuit in adult rats // Nature Neuroscience. 2004. Vol. 7. P. 269–277.

21. Barres B.A. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease // Neuron. 2008. Vol. 60. P. 430–440.

22. Basso D.M., Beattie M.S., Bresnahan J.C. A sensitive and reliable locomotors rating scale for open field testing in rats // Journal of Neurotrauma. 1995. Vol. 12. P. 1–21.

23. Bazan N.G. Cell survival matters: docosahexaenoic acid signaling, neuroprotection and photoreceptors // Trends in Neurosciences. 2006. Vol. 29. P. 263–271.

24. Becerir C., Kılıc I., Sahin O., Ozdemir O., Tokgun O., Ozdemir B., Akca H. The protective effect of docosahexaenoic acid on the bilirubin neurotoxicity // Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. 2013. Vol. 28. P. 801–807.

25. Beck K.D., Nguyen H.X., Galvan M.D., Salazar D.L., Woodruff T.M., Anderson A.J. Quantitative analysis of cellular inflammation after traumatic spinal cord injury: evidence for a multiphasic inflammatory response in the acute to chronic environment // Brain. 2010. Vol. 133. P. 433–447.

26. Belegu V., Oudega M., Gary D.S., McDonald J.W. Restoring function after spinal cord injury: promoting spontaneous regeneration with stem cells and activity-based therapies // Neurosurgery Clinics of North America. 2007. Vol. 18. P. 143–168.

27. Ben Haim L., Carrillo-de Sauvage M.A., Ceyzeriat K., Escartin C. Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases // Frontiers in Cellular Neuroscience. 2015. Vol. 9. P. 278.

28. Biernaskie J., Sparling J.S., Liu J., Shannon C.P., Plemel J.R., Xie Y., Miller F.D., Tetzlaff W. Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells that promote remyelination and functional recovery after contusion spinal cord injury // Journal of Neuroscience. 2007. Vol. 27. P. 9545–9559.

29. Biswas S.K., Chittezhath M., Shalova I.N., Lim J.Y. Macrophage polarization and plasticity in health and disease // Immunologic Research. 2012. Vol.53. P. 11–24.

30. Blesch A., Tuszynski M.H. Transient growth factor delivery sustains regenerated axons after spinal cord injury // Journal of Neuroscience. 2007. Vol. 27. P. 10535–10545.

31. Blight A.R. Macrophages and inflammatory damage in spinal cord injury // Journal of Neurotrauma. 1992. Vol. 1. P. 83–91.

32. Blondeau N., Widmann C., Lazdunski M., Heurteaux C. Polyunsaturated fatty acids induce ischemic and epileptic tolerance // Neuroscience. 2002. Vol. 109. P. 231–241.

33. Boehm E.M., Gildenberg M.S., Washington M.T. The many roles of PCNA in eukaryotic DNA replication // Enzymes. 2016. Vol. 39. P. 231–254.

34. Bourre J.M., Francois M., Youyou A., Dumont O., Piciotti M., Pascal G., Durand G. The effects of dietary a-linolenic acid on the composition of nerve membranes, enzymatic activity, amplitude of electrophysiological parameters, resistance to poisons and performance of learning tasks in rats // Journal of Nutrition. 1989. Vol. 119. P. 1880–1892.

35. Bradbury E.J., Moon L.D.F., Popat R.J., King V.R., Bennett G.S., Patel P.N., Fawcett J.W., McMahon S.B. Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury // Nature. 2002. Vol. 416. P. 636–640.

36. Bradke F., Fawcett J.W., Spira M.E. Assembly of a new growth cone after axotomy: the precursor to axon regeneration // Nature Reviews Neuroscience. 2012. Vol. 13. P. 183–193.

37. Broughton K.S., Wade J.W. Total fat and (n-3):(n-6) fat ratios influence eicosanoid production in mice // Journal of Nutrition. 2002. Vol. 132. P. 88–94.

38. Brus-Ramer M., Carmel J.B., Chakrabarty S., Martin J. H. Electrical stimulation of spared corticospinal axons augments connections with ipsilateral spinal motor circuits after injury // Journal of Neuroscience. 2007. Vol. 27. P. 13793–13801.

39. Bunge R.P., Puckett W.R., Becerra J.L., Marcillo A., Quencer R.M. Observations on the pathology of human spinal cord injury. A review and classification of 22 new cases with details from a case of chronic cord compression with extensive focal demyelination // Advances in Neurology. 1993. Vol. 59. P. 75–89.

40. Burda J.E., Sofroniew M.V. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease // Neuron. 2014. Vol. 81. P. 229–248.

41. Cafferty W.B.J., McGee A.W., Strittmatter S.M. Axonal growth therapeutics: regeneration or sprouting or plasticity? // Trends in Neurosciences. 2008. Vol. 31. P. 215–220.

42. Cao Q.L., Howard R.M., Dennison J.B., Whittemore S.R. Differentiation of engrafted neuronal-restricted precursor cells is inhibited in the traumatically injured spinal cord // Experimental Neurology. 2002. Vol. 177. P. 349–359.

43. Cao Q.L., Zhang Y.P., Howard R.M., Walters W.M., Tsoulfas P., Whittemore S.R. Pluripotent stem cells engrafted into the normal or lesioned adult rat spinal cord are restricted to a glial lineage // Experimental Neurology. 2001. Vol. 167. P. 48–58.

44. Caroni P., Schwab M.E. Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter // Neuron. 1988a. Vol. 1. P.85–96.

45. Caroni P., Schwab M.E. Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading // Journal of Cell Biology. 1988b. Vol. 106. P. 1281–1288.

46. Cassetta L., Cassol E., Poli G. Macrophage polarization in health and disease // The Scientific World Journal. 2011. Vol. 11. P. 2391–2402.

47. Chalon S., Delion-Vancassel S., Belzung C., Guilloteau D., Leguisquet A.M., Besnard J.C., Durand J. Dietary fish oil affects monoaminergic neurotransmission and behaviour in rats // Journal of Nutrition. 1998. Vol. 128. P. 2512–2519.

48. Chen S., Zhang H., Pu H., Wang G., Li W., Leak R.K., Chen J., Liou A.K., Hu X. n-3 PUFA supplementation benefits microglial responses to myelin pathology // Scientific Reports. 2014. Vol. 4. P. 7458.

49. Chong S.Y., Rosenberg S.S., Fancy S.P., Zhao C., Shen Y.A., Hahn A.T., Mc- Gee A.W., Xu X., Zheng B., Zhang L.I., Rowitch D.H., Franklin R.J., Lu Q.R., Chan J.R. Neurite outgrowth inhibitor Nogo-A establishes spatial segregation and extent of oligodendrocyte myelination // PNAS. 2012. Vol. 109. P. 1299–1304.

50. Christopherson K.S., Ullian E.M., Stokes C.C., Mullowney C.E., Hell J.W., Agah A., Lawler J., Mosher D.F., Bornstein P., Barres B.A. Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis // Cell. 2005. Vol. 120. P. 421–433.

51. Ciranna L. Serotonin as a modulator of glutamate- and GABA-mediated neurotransmission: implications in physiological functions and in pathology // Current Neuropharmacology. 2006. Vol. 4. P. 101–114.

52. Clarke L.E., Barres B.A. Emerging roles of astrocytes in neural circuit development // Nature Reviews Neuroscience. 2013. Vol. 14. P. 311–321.

53. Cregg J.M., DePaul M.A., Filous A.R., Lang B.T., Tran A., Silver J. Functional Regeneration beyond the glial scar // Experimental Neurology. 2014. Vol. 253. P. 197–207.

54. Csobonyeiova M., Polak S., Zamborsky R., Danisovic L. Recent progress in the regeneration of spinal cord injuries by induced pluripotent stem cells // International Journal of Molecular Sciences. 2019. Vol. 20. P. 3838.

55. D'Amour K.A., Gage F.H. Are somatic stem cells pluripotent or lineage-restricted? // Nature Medicine. 2002. Vol. 8. P. 213–214.

56. Daly J.J., Marsolais E.B., Mendell L.M., Rymer W.Z., Stefanovska A., Wolpaw J.R., Kantor C. Therapeutic neural effects of electrical stimulation // IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering. 1996. Vol. 4. P. 218–230.

57. David S., Kroner A. Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury // Nature Reviews Neuroscience. 2011. Vol. 12. P. 388–399.

58. de Abreu D.C., Cliquet A., Rondina J.M., Cendes F. Electrical stimulation during gait promotes increase of muscle cross-sectional area in quadriplegics: a

preliminary study // Clinical Orthopaedics and Related Research. 2009. Vol. 467. P. 553–557.

59. De Smedt-Peyrusse V., Sargueil F., Moranis A., Harizi H., Mongrand S., Layé, S. Docosahexaenoic acid prevents lipopolysaccharide-induced cytokine production in microglial cells by inhibiting lipopolysaccharide receptor presentation but not its membrane subdomain localization // Journal of Neurochemistry. 2008. Vol. 105. P. 296–307.

60. de Urquiza A.M., Liu S., Sjoberg M., Zetterstrom R.H., Griffiths W., Sjovall J., Perlmann T. Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain // Science. 2000. Vol. 290. P. 2140–2144.

61. Deng L.X., Deng P., Ruan Y., Xu Z. Ch., Liu N.,Wen X., Smith G. M., Xu X. A novel growth-promoting pathway formed by GDNF-overexpressing Schwann cells promotes propriospinal axonal regeneration, synapse formation, and partial recovery of function after spinal cord injury // Journal of Neuroscience. 2013. Vol. 33. P. 5655–5667.

62. DiSabato D., Quan N., Godbout J.P. Neuroinflammation: the devil is in the Details // Journal of Neurochemistry. 2016. Vol. 139. P. 136–153.

63. Domingues H.S., Portugal C.C., Socodato R., Relvas J.B. Oligodendrocyte, astrocyte, and microglia crosstalk in myelin development, damage, and repair // Frontiers in Neurology. 2016. Vol. 4. P. 71.

64. Donegan M., Kernisant M., Cua C., Jasmin L., Ohara P.T. Satellite glial cell proliferation in the trigeminal ganglia after chronic constriction injury of the infraorbital nerve // Glia. 2013. Vol. 61. P. 2000–2008.

65. Donnelly D.J., Popovich P.G. Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinalcord injury // Experimental Neurology. 2008. Vol. 209. P. 378–388.

66. Donovan P.J., Gearhart J. The end of the beginning for pluripotent stem cells // Nature. 2001. Vol. 414. P. 92–97.

67. Dubey M., Hoda S., Chan W.H., Pimenta A., Ortiz D.D., Shea T.B. Reexpression of vimentin in differentiated neuroblastoma cells enhances elongation of axonal neurites // Journal of Neuroscience Research. 2004. Vol. 78. P. 245–249.

68. Duncan I.D., Brower A., Kondo Y., Curlee J.F., Schultz R.D. Extensive remyelination of the CNS leads to functional recovery // PNAS. 2009. Vol. 106. P. 6832–6836.

69. Dyall S.C., Michael-Titus A.T. Neurological Benefits of Omega-3 Fatty Acids // Neuromolecular Medicine. 2008. Vol. 10. P. 219–235.

70. Eady T.N., Belayev L., Khoutorova L., Atkins K.D., Zhang Ch., Bazan N.G. Docosahexaenoic acid signaling modulates cell survival in experimental ischemic stroke penumbra and initiates long-term repair in young and aged rats // PLoS One. 2012. Vol. 7. P. 46151.

71. Echeverríaa F., Valenzuelaa R., Hernandez-Rodasa M.C., Valenzuela A. Docosahexaenoic acid (DHA), a fundamental fatty acid for the brain: New dietary sources // Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids. 2017. Vol. 124. P. 1–10.

72. Edwards T.J., Hammarlund M. Syndecan promotes axon regeneration by stabilizing growth cone migration // Cell Rep. 2014. Vol. 8. P. 272–283.

73. Enzmann G.U., Benton R.L., Talbott J.F., Cao Q., Whittemore S.R. Functional considerations of stem cell transplantation therapy for spinal cord repair // Journal of Neurotrauma. 2006. Vol. 23. P. 479–495.

74. Evaniew N., Noonan V.K., Fallah N., Kwon B.K., Rivers C.S., Ahn H., Bailey C.S., Christie S.D., Fourney D.R., Hurlbert R.J., Linassi A.G., Fehlings M.G., Dvorak M.F. Methylprednisolone for the treatment of patients with acute spinal cord injuries: a propensity score-matched cohort study from a canadian multi-center spinal cord injury registry // Journal of Neurotrauma. 2015. Vol. 32. P. 1674–1683.

75. Faghri P.D., Glaser R.M., Figoni S.F. Functional electrical stimulation leg cycle ergometer exercise: training effects on cardiorespiratory responses of spinal cord injured subjects at rest and during submaximal exercise // Archives of Physical Medicine and Rehabilitation. 1992. Vol. 73. P. 1085–1093.

76. Fan B., Wei Z., Yao X., Shi G., Cheng X., Zhou X., Zhou H., Ning G., Kong X., Feng S. Microenvironment Imbalance of Spinal Cord Injury // Cell Transplantation. 2018. Vol. 27. P. 853–866.

77. Farhy-Tselnicker I., Boisvert M.M., Allen N.J. The role of neuronal versus astrocyte-derived heparan sulfate proteoglycans in brain development and injury // Biochemical Society Transactions. 2014. Vol. 42. P. 1263–1269.

78. Farooqui A.A., Horrocks L.A., Farooqui T. Modulation of inflammation in brain: a matter of fat // Journal of Neurochemistry. 2007. Vol. 101. P. 577–599.

79. Fitch M.T., Silver J. CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure // Experimental Neurology. 2008. Vol. 209. P. 294–301.

80. Fitch M.T., Silver J. Glial cell extracellular matrix: boundaries for axon growth in development and regeneration // Cell Tissue Research. 1997. Vol. 290. P. 379–384.

81. Fleming J.C., Norenberg M.D., Ramsay D.A., Dekaban G.A., Marcillo A.E., Saenz A.D., Pasquale-Styles M., Dietrich W.D., Weaver L.C. The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury // Brain. 2006. Vol. 129. P. 3249–3269.

82. Frangogiannis N.G. The immune system and cardiac repair // Pharmacological Research. 2008. Vol. 58. P. 88–111.

83. Frotzler A., Coupaud S., Perret C., Kakebeeke T.H., Hunt K.J., Eser P. Effect of detraining on bone and muscle tissue in subjects with chronic spinal cord injury after a period of electrically-stimulated cycling: a small cohort study // Journal of Rehabilitation Medicine. 2009. Vol. 41. P. 282–285.

84. Galli R., Uckermann O., Winterhalder M.J., Sitoci-Ficici K.H., Geiger K.D., Koch E., Schackert G., Zumbusch A., Steiner G., Kirsch M. Vibrational spectroscopic imaging and multiphoton microscopy of spinal cord injury // Analytical Chemistry. 2012. Vol. 84. P. 8707–8714.

85. Garcia-Segura L.M., Melcangi R.C. Steroids and glial cell function // Glia. 2006. Vol. 54. P. 485–498.

86. Gargouri B., Yousif N.M., Bouchard M., Fetoui H., Fiebich B.L. Inflammatory and cytotoxic effects of bifenthrin in primary microglia and organotypic hippocampal slice cultures // Journal of Neuroinflammation. 2018. Vol. 24. P.159.

87. Garzetti L., Menon R., Finardi A., Bergami A., Sica A., Martino G., Comi G., Verderio C., Farina C., Furlan R. Activated macrophages release microvesicles containing polarized M1 or M2 mRNAs // Journal of Leukocyte Biology. 2014. Vol. 95. P. 817–825.

88. Gaudet A.D., Fonken L.K. Glial cells shape pathology and repair after spinal cord injury // Neurotherapeutics. 2018. Vol. 15. P. 554–577.

89. Gensert J.M., Goldman J.E. Endogenous progenitors remyelinate demyelinated axons in the adult CNS // Neuron. 1997 Vol. 19. P. 197–203.

90. Ginhoux F., Jung S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis // Nature Reviews Immunology. 2014. Vol. 14. P. 392–404.

91. Goldberg J.L. How does an axon grow? // Genes & Development. 2003. Vol. 17. P. 941–958.

92. Gomes-Osman J., Cortes M., Guest J., Pascual-Leone A. A systematic review of experimental strategies aimed at improving motor function after acute and chronic spinal cord injury // Journal of Neurotrauma. 2016. Vol. 33. P. 425–438.

93. Göritz C., Dias D.O., Tomilin N., Barbacid M., Shupliakov O., Frisen J. A pericyte origin of spinal cord scar tissue // Science. 2011. Vol. 333. P. 238–242.

94. Graeber M.B., Streit W.J., Kreutzberg G.W. Identity of ED2-positive perivascular cells in rat brain // Journal of Neuroscience Research. 1989. Vol. 22. P. 103–106.

95. Gurtner G.C., Werner S., Barrandon Y., Longaker M.T. Wound repair and regeneration // Nature. 2008. Vol. 453. P. 314–321.

96. Hackett A.R., Lee D.H., Dawood A., Rodriguez M., Funk L., Tsoulfas P., Lee J.K. STAT3 and SOCS3 regulate NG2 cell proliferation and differentiation after contusive spinal cord injury // Neurobiology of Disease. 2016. Vol. 89. P. 10–22.

97. Halassa M.M., Fellin T., Haydon P.G. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease // Trends in Molecular Medicine. 2007. Vol. 13. P. 54–63.

98. Hall E.D., Braughler J.M. Role of lipid peroxidation in post-traumatic spinal cord degeneration: a review // Central nervous system trauma: journal of the American Paralysis Association. 1986. Vol. 3. P. 281–294.

99. Hall E.D., Springer J.E. Neuroprotection and acute spinal cord injury: a reappraisal // NeuroRx. 2004. Vol. 1. P. 80–100.

100. Hamilton J., Greiner R.S., Salem N.Jr., Kim H.Y. n-3 Fatty acid deficiency decreases phosphatidylserine accumulation selectively in neuronal tissues // Lipids. 2000. Vol. 35. P. 863–869.

101. Han S.S., Kang D.Y., Mujtaba T., Rao M.S., Fischer I. Grafted lineage-restricted precursors differentiate exclusively into neurons in the adult spinal cord // Experimental Neurology. 2002. Vol. 177. P. 360–375.

102. Hashimoto M., Hossain S., Al Mamun A., Matsuzaki K., Arai H. Docosahexaenoic acid: one molecule diverse functions // Critical reviews in biotechnology. 2017. Vol. 37. P. 579–597.

103. Hasko G., Pacher P., Deitch E.A., Vizi E.S. Shaping of monocyte and macrophage function by adenosine receptors // Pharmacology & Therapeutics. 2007. Vol. 113. P. 264–275.

104. Heppner F.L., Ransohoff R.M., Becher B. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease // Nature Reviews Neuroscience. 2015. Vol. 16. P. 358–372.

105. Herrmann J.E. STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury // Journal of Neuroscience. 2008. Vol. 28. P. 7231–7243.

106. Hill R.A., Patel K.D., Medved J., Reiss A.M., Nishiyama A. NG2 cells in white matter but not gray matter proliferate in response to PDGF // Journal of Neuroscience. 2013. Vol. 33. P.14558-14566.

107. Hinz B., Phan S.H., Thannickal V.J., Prunotto M., Desmoulière A., Varga J., De Wever O., Mareel M., Gabbiani G. Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling // The American Journal of Pathology. 2012. Vol. 180. P. 1340–1355.

108. Hjorth E., Zhu M., Toro V.C., Vedin I., Palmblad J., Cederholm T., Freund-Levi Y., Faxen-Irving G., Wahlund L., Basun H., Eriksdotter M., Schultzberg M. Omega-3 fatty acids enhance phagocytosis of Alzheimer's disease-related amyloid-β42 by human microglia and decrease inflammatory markers // Journal of Alzheimer's Disease. 2013. Vol. 35. P. 697–713.

109. Hollis E.R. Axon guidance molecules and neural circuit remodeling after spinal cord injury // Neurotherapeutics. 2016. Vol. 13. P. 360–369.

110. Hong S., Gronert K., Devchand P.R., Moussignac R.L., Serhan C.N. Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti-inflammation // The Journal of Biological Chemistry. 2003. Vol. 278. P. 14677–14687.

111. Horky L.L., Galimi F., Gage F.H., Horner P.J. Fate of endogenous stem/progenitor cells following spinal cord injury // Journal of Comparative Neurology. 2006. Vol. 498. P. 525–538.

112. Horn K.P., Busch S.A., Hawthorne A.L., van Rooijen N., Silver J. Another barrier to regeneration in the CNS: activated macrophages induce extensive retraction of dystrophic axons through direct physical interactions // Journal of Neuroscience. 2008. Vol. 28. P. 9330–9341.

113. Horner P.J., Gage F.H. Regenerating the damaged central nervous system // Nature. 2000. Vol. 407. P. 963–970.

114. Hsu J.Y., Xu X.M. Early profiles of axonal growth and astroglial response after spinal cord hemisection and implantation of Schwann cell-seeded guidance channels in adult rats // Journal of Neuroscience Research. 2005. Vol. 82. P. 472–483.

115. Huang W.L., King V.R., Curran O.E., Dyall S.C., Ward R.E., Lal N., Priestley J.V., Michael-Titus A.T. A combination of intravenous and dietary

docosahexaenoic acid significantly improves outcome after spinal cord injury // Brain. 2007. Vol. 130. P. 3004–3019.

116. Hull M.A. Omega-3 polyunsaturated fatty acids // Best Practice & Research Clinical Gastroenterology. 2011. Vol. 25. P. 547–554.

117. Inman D.M., Steward O. 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 // Journal of Comparative Neurology. 2003. Vol. 462. P. 431–449.

118. Inoue K. The function of microglia through purinergic receptors: Neuropathic pain and cytokine release // Pharmacology & Therapeutics. 2006. Vol. 109. P. 210–226.

119. Ivaska J., Pallari H.M., Nevo J., Eriksson, J.E. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling // Experimental Cell Research. 2007. Vol. 313. P. 2050–2062.

120. Jetten N., Verbruggen S., Gijbels M.J., Post M.J., De Winther M.P., Donners M.M. Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo // Angiogenesis. 2014. Vol. 17. P. 109–118.

121. Jia Z., Zhu H., Vitto M.J., Misra B.R., Li Y., Misra H.P. Alpha-lipoic acid potently inhibits peroxynitrite-mediated DNA strand breakage and hydroxyl radical formation: implications for the neuroprotective effects of alpha-lipoic acid // Molecular and Cellular Biochemistry. 2009. Vol. 323. P. 131–138.

122. Jiang L.H., Yan S., Wang J., Liang Q.Y. Oral administration of docosahexaenoic acid activates the GDNF-MAPK-CERB pathway in hippocampus of natural aged rat // Pharmaceutical Biology. 2013. Vol. 51. P. 1188–1195.

123. Johnston T.E., Betz R.R., Smith B.T., Benda B.J., Mulcahey M.J., Davis R., Houdayer T.P., Pontari M.A., Barriskill A., Creasey G.H. Implantable FES system for upright mobility and bladder and bowel function for individuals with spinal cord injury // Spinal Cord. 2005. Vol. 43. P. 713–723.

124. Josephson A., Greitz D., Klason T., Olson L., Spenger C. A spinal thecal sac constriction model supports the theory that induced pressure gradients in the cord cause edema and cyst formation // Neurosurgery. 2001. Vol. 48. P. 636–645.

125. Jump D.B. Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription // Current Opinion in Lipidology. 2002. Vol. 13. P. 155–164.

126. Kandel E.R., Squire L.R. Neuroscience: breaking down scientific barriers to the study of brain and mind // Science. 2000. Vol. 290. P. 1113–1120.

127. Kasai H., Chung M.H., Jones D.S., Inoue H., Ishikawa H., Kamiya H., Ohtsuka E., Nishimura S. 8-Hydroxyguanine, a DNA adduct formed by oxygen radicals: Its implication on oxygen radical-involved mutagenesis/carcinogenesis // Journal of Toxicological Sciences. 1991. Vol. 16. P. 95–105.

128. Kawaja M.D., Gage F.H. Reactive astrocytes are substrates for the growth of adult CNS axons in the presence of elevated levels of nerve growth factor // Neuron. 1991. Vol. 7. P. 1019–1030.

129. Kigerl K.A., Gensel J.C., Ankeny D.P., Alexander J.K., Donnelly D.J., Popovich P.G. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord // Journal of Neuroscience. 2009. Vol. 29. P. 13435–13444.

130. Kim J.W., Ha K.Y., Molon J.N., Kim Y.H. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation for chronic spinal cord injury in rats: comparative study between intralesional and intravenous transplantation // Spine. 2013. Vol. 38. P. 1065–1074.

131. Kimelberg H.K., Norenberg M.D. Astrocytes // Scientific American. 1989. Vol. 260. P. 66–72.

132. 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 // Journal of Neuroscience. 2006. Vol. 26. P. 4672–4680.

133. Kjell J., Olson L. Rat models of spinal cord injury: from pathology to potential therapies // Disease Models and Mechanisms. 2016. Vol. 9. P. 1125–1137.

134. Klapka N., Muller H.W. Collagen matrix in spinal cord injury // Journal of Neurotrauma. 2006. Vol. 23. P. 422–435.

135. Kobayashi K., Imagama S., Ohgomori T., Hirano K., Uchimura K., Sakamoto K., Hirakawa A., Takeuchi H., Suzumura A., Ishiguro N., Kadomatsu K.

Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia // Cell Death Dis. 2013. Vol. 4. P. 525.

136. Kodas E., Galineau L., Bodard S., Vancassel S., Guilloteau D., Besnard J.C., Chalon S. Serotoninergic neurotransmission is affected by n-3 polyunsaturated fatty acids in the rat // Journal of Neurochemistry. 2004. Vol. 89. P. 695–702.

137. Kong W., Yen J., Vassiliou E., Adhikary S., Toscano M.G., Ganea D. Docosahexaenoic acid prevents dendritic cell maturation and in vitro and in vivo expression of the IL-12 cytokine family // Lipids in Health and Disease. 2010. Vol. 9. P. 12.

138. Kopen G.C., Prockop D.J., Phinney D.G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains // PNAS. 1999. Vol. 96. P. 10711–10716.

139. Kristiansen M., Graversen J.H., Jacobsen C., Sonne O., Hoffman H.J., Law S.K., Moestrup S.K. Identification of the haemoglobin scavenger receptor // Nature. 2001. Vol. 409. P. 198–201.

140. Kutzenberger J., Domurath B., Sauerwein D. Spastic bladder and spinal cord injury: seventeen years of experience with sacral deafferentation and implantation of an anterior root stimulator // Artificial Organs. 2005. Vol. 29. P. 239–241.

141. Lang-Lazdunski L., Blondeau N., Jarretou G., Lazdunski M., Heurteaux C. Linolenic acid prevents neuronal cell death and paraplegia after transient spinal cord ischemia in rats // Journal of Vascular Surgery. 2003. Vol. 38. P. 564–575.

142. Lappe-Siefke C., Goebbels S., Gravel M., Nicksch E., Lee J., Braun P.E., Griffiths I.R., Nave K.A. Disruption of Cnp1 uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination // Nature Genetics. 2003. Vol. 33.P. 366–374.

143. Lauritzen I., Blondeau N., Heurteaux C., Widmann C., Romey G., Lazdunski M. Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotectors // The EMBO Journal. 2000. Vol. 19. P. 1784–1793.

144. Lavrov I., Courtine G., Dy C.J., van den Brand R., Fong A.J., Gerasimenko Y., Zhong H., Roy R.R., Edgerton V.R. Facilitation of stepping with epidural

stimulation in spinal rats: role of sensory input // Journal of Neuroscience. 2008. Vol. 28. P. 7774–7780.

145. Lech M., Anders H.J. Macrophages and fibrosis: how resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair // Biochimica et Biophysica Acta. 2013. Vol. 1832. P. 989–997.

146. Lee J.K., Chow R., Xie F., Chow S.Y., Tolentino K.E., Zheng B. Combined genetic attenuation of myelin and semaphorin-mediated growth inhibition is insufficient to promote serotonergic axon regeneration // Journal of Neuroscience. 2010. Vol. 30. P. 10899–10904.

147. Lei X.G., Zhu J.H., Cheng W.H., Bao Y., Ho Y.S., Reddi A.R., Holmgren A., Arnér E.S. Paradoxical roles of antioxidant enzymes: basic mechanisms and health implications // Physiological Reviews. 2016. Vol. 96. P. 307–364.

148. Lengqvist J., Mata De Urquiza A., Bergman A.C., Willson T.M., Sjövall J., Perlmann T., Griffiths W.J. Polyunsaturated fatty acids including docosahexaenoic and arachidonic acid bind to the retinoid X receptor alpha ligand-binding domain // Molecular & Cellular Proteomics. 2004. Vol. 3. P. 692–703.

149. Li L., Baroja M.L., Majumdar A., Chadwick K., Rouleau A., Gallacher L., Ferber I., Lebkowski J., Martin T., Madrenas J., Bhatia M. Human embryonic stem cells possess immune-privileged properties // Stem Cells. 2004. Vol. 22. P. 448–456.

150. Liao H., Franck E., Fréret M., Adriouch S., Baba-Amer Y., Authier F.J., Boyer O., Gherardi R.K. Myoinjury transiently activates muscle antigen-specific CD8+ T cells in lymph nodes in a mouse model // Arthritis & Rheumatology. 2012. Vol. 64. P. 3441–3451.

151. Liddelow S.A., Barres B.A. Regeneration: Not everything is scary about a glial scar // Nature. 2016. Vol. 532. P. 182–183.

152. Liebkind R., Laatikainen T., Liesi P. Is the soluble KDI domain of gamma1 laminin a regeneration factor for the mammalian central nervous system? // Journal of Neuroscience Research. 2003. Vol. 73. P. 637–643.

153. Lim J.E., Chung E., Son Y. A neuropeptide, Substance-P, directly induces tissuerepairing M2 like macrophages by activating the PI3K/Akt/mTOR pathway even in the presence of IFNγ // Scientific Reports. 2017. Vol. 7. P. 9417.

154. Lin A.C., Holt C.E. Local translation and directional steering in axons // The EMBO Journal. 2007. Vol. 26. P. 3729–3736.

155. López-Dolado E., Lucas-Osma A.M., Collazos-Castro J.E. Dynamic motor compensations with permanent, focal loss of forelimb force after cervical spinal cord injury // Journal of Neurotrauma. 2013. Vol. 30. P. 191–210.

156. López-Vales R., Redensek A., Skinner T.A., Rathore K., Ghasemlou N., Wojewodka G., DeSanctis J., Radzioch D., David S. Fenretinide promotes functional recovery and tissue protection after spinal cord contusion injury in mice // Journal of Neuroscience. 2010. Vol. 30. P. 3220–3226.

157. Loy D.N., Crawford C.H., Darnall J.B., Burke D.A., Onifer S.M., Whittemore S. R. Temporal progression of angiogenesis and basal lamina deposition after contusive spinal cord injury in the adult rat // Journal of Comparative Neurology. 2002 Vol. 445. P. 308–324.

158. Lutz S.E., Zhao Y., Gulinello M., Lee S.C., Raine C.S., Brosnan C.F. Deletion of astrocyte connexins 43 and 30 leads to a dysmyelinating phenotype and hippocampal CA1 vacuolation // Journal of Neuroscience. 2009. Vol. 29. P. 7743–7752.

159. Ma M., Basso D.M., Walters P., Stokes B.T., Jakeman L.B. Behavioral and histological outcomes following graded spinal cord contusion injury in the C57Bl/6 mouse // Experimental Neurology. 2001. Vol. 169. P. 239–254.

160. Macias M., Nowicka D., Czupryn A., Sulejczak D., Skup M., Skangiel-Kramska J., Czarkowska-Bauch J. Exercise-induced motor improvement after complete spinal cord transection and its relation to expression of brain-derived neurotrophic factor and presynaptic markers // BMC Neuroscience. 2009. Vol. 10. P. 144.

161. Mantovani A., Biswas S.K., Galdiero M.R., Sica A., Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodeling // The Journal of Pathology. 2013. Vol. 229. P. 176–185.

162. Mantovani A., Locati M. Housekeeping by chemokine scavenging // Blood. 2008. Vol. 112. P. 215–216.

163. Mantovani A., Sica A., Sozzani S., Allavena P., Vecchi A., Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization // Trends in Immunology. 2004. Vol. 25. P. 677–686.

164. Manzhulo I.V., Ogurtsova O.S., Lamash N.E., Latyshev N.A., Kasyanov S.P., Dyuizen I.V. Analgetic effect of docosahexaenoic acid is mediated by modulating the microglia activity in the dorsal root ganglia in a rat model of neuropathic pain // Acta Histochemica. 2015. Vol. 117. P. 659–666.

165. Manzhulo I.V., Ogurtsova O.S., Kipryushina Y.O., Latyshev N.A., Kasyanov S.P., Dyuizen I.V., Tyrtyshnaia A.A. Neuron-astrocyte interactions in spinal cord dorsal horn in neuropathic pain development and docosahexaenoic acid therapy // Journal of Neuroimmunology. 2016. Vol. 298. P. 90–97.

166. Manzhulo O., Tyrtyshnaia A., Kipryushina Y., Dyuizen 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.

167. Manzhulo I., Tyrtyshnaia A., Kipryushina Y., Dyuizen 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.

168. Marcheselli V.L., Hong S., Lukiw W.J., Tian X.H., Gronert K., Musto A., Hardy M., Gimenez J.M., Chiang N., Serhan C.N., Bazan N.G. Novel docosanoids inhibit brain ischemia–reperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression // The Journal of Biological Chemistry. 2003. Vol. 273. P. 43807–43817.

169. Marquesa S.A., Garcez V.F., Del Bel E.A., Martinez A.M.B. A simple, inexpensive and easily reproducible model of spinal cord injury in mice: Morphological and functional assessment // Journal of Neuroscience Methods. 2009. Vol. 177. P. 183–193.

170. Martinez F.O., Sica A., Mantovani A., Locati M. Macrophage activation and polarization // Frontiers in Bioscience. 2008. Vol. 13. P. 453–461.

171. Masu M. Proteoglycans and axon guidance: a new relationship between old partners // Journal of Neurochemistry. 2016. Vol. 139. P. 58–75.

172. McDonald J.W. Repairing the damaged spinal cord // Scientific American. 1999. Vol. 281. P. 64–73.

173. McDonald J.W., Sadowsky C. Spinal cord injury // Lancet. 2002. Vol. 359. P. 417–425.

174. Melanie J.S., Derek W.G. Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution // Progress in Lipid Research. 2011. Vol. 50. P. 35–51.

175. Metz G.A.S., Curt A., Van De Meent H., Klusman I., Schwab M.E., Dietz V. Validation of the weight-drop contusion model in rats: a comparative study of human spinal cord injury // Journal of Neurotrauma. 2000. Vol. 17. P. 1–17.

176. Mirnikjoo B., Brown S.E., Kim F.S., Marangell L.B., Sweatt D.J., Weeber E.J. Protein kinase inhibition by omega-3 fatty acids // Journal of Biological Chemistry. 2001. Vol. 276. P. 10888–10896.

177. Mokalled M.H., Patra C., Dickson A.L., Endo T., Stainier D.Y., Poss K.D. Injury-induced ctgfa directs glial bridging and spinal cord regeneration in zebrafish // Science. 2016. Vol. 354. P. 630–634.

178. Mori T.A., Beilin L.J. Omega-3 fatty acids and inflammation // Current Atherosclerosis Reports. 2004. Vol. 6. P. 461–467.

179. Morshead C.M., Benveniste P., Iscove N.N., van der Kooy D. Hematopoietic competence is a rare property of neural stem cells that may depend on genetic and epigenetic alterations // Nature Medicine. 2002. Vol. 8. P. 268–273.

180. Moykkynen T., Liebkind R., Sjoberg J., Korpi E.R., Liesi P. The neuroprotective KDI domain of gamma 1-laminin is a universal and potent inhibitor of ionotropic glutamate receptors // Journal of Neuroscience Research. 2005. Vol. 81. P. 797–804.

181. Mukherjee P.K., Marcheselli V.L., Serhan C.N., Bazan N.G. Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress // PNAS. 2004. Vol. 101. P. 8491–8496.

182. Nakagawa T., Kaneko S. Spinal astrocytes as therapeutic targets for pathological pain // Journal of Pharmacological Sciences. 2010. Vol. 114. P. 347–353.

183. Nam D.H., Lee K.S., Kim S.H., Kim S.M., Jung S.Y., Chung S.H., Kim H.J., Kim N.D., Jin Ch., Lee Y.S. Design and synthesis of 4-quinolinone 2-carboxamides as calpain inhibitors // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2008. Vol. 18. P. 205–209.

184. Nathan C., Ding A. Nonresolving inflammation // Cell. 2010. Vol. 140. P. 871–882.

185. Nave K.A., Trapp B.D. Axon-glial signaling and the glial support of axon function // Annual Review of Neuroscience. 2008. Vol. 31. P. 535–561.

186. Nedergaard M., Ransom B., Goldman S.A. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain // Trends in Neuroscience. 2003. Vol. 26. P. 523–530.

187. Neumann S., Bradke F., Tessier-Lavigne M., Basbaum A.I. Regeneration of sensory axons within the injured spinal cord induced by intraganglionic cAMP elevation // Neuron. 2002. Vol. 34. P. 885–893.

188. Niu S.L., Mitchell D.C., Lim S.Y., Wen Z. M., Kim H.Y., Salem N.Jr., Litman B.J. Reduced G protein-coupled signaling efficiency in retinal rod outer segments in response to n-3 fatty acid deficiency // Journal of Biological Chemistry. 2004. Vol. 279. P. 31098–31104.

189. Novak M.L., Koh T.J. Macrophage phenotypes during tissue repair // Journal of Leukocyte Biology. 2013b. Vol. 93. P. 875–881.

190. Novak M.L., Koh T.J. Phenotypic transitions of macrophages orchestrate tissue repair // The American Journal of Pathology. 2013a. Vol. 183. P. 1352–1363.

191. O'Rourke M., Gasperini R., Young K.M. Adult myelination: wrapping up neuronal plasticity // Neural Regeneration Research. 2014. Vol. 9. P. 1261–1264.

192. O'Shea T.M., Burda J.E., Sofroniew M.V. Cell biology of spinal cord injury and repair // The Journal of Clinical Investigation. 2017. Vol. 127. P. 3259–3270.

193. Okadaa S., Haraa M., Kobayakawab K., Matsumotob Y., Nakashimab Y. Astrocyte reactivity and astrogliosis after spinal cord injury // Neuroscience Research. 2018. Vol. 126. P. 39–43.

194. Okutan O., Solaroglu I., Beskonakli E., Taskin Y. Recombinant human erythropoietin decreases myeloperoxidase and caspase-3 activity and improves early functional results after spinal cord injury in rats // Journal of Clinical Neuroscience. 2007. Vol. 14. P. 364–368.

195. Olby N. The pathogenesis and treatment of acute spinal cord injuries in dogs // Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. 2010. Vol. 40. P. 791–807.

196. Olson L. Combinatory treatments needed for spinal cord injury // Experimental Neurology. 2013. Vol. 248. P. 309–315.

197. Onose G., Anghelescu A., Muresanu D.F., Padure L., Haras M.A., Chendreanu C.O., Onose L.V., Mirea A., Ciurea A.V., El Masri W.S., von Wild K.R.H. A review of published reports on neuroprotection in spinal cord injury // Spinal Cord. 2009. Vol. 47. P. 716–726.

198. Ouali Alami N., Schurr C., Olde Heuvel F., Tang L., Li Q., Tasdogan A., Kimbara A., Nettekoven M., Ottaviani G., Raposo C., Röver S., Rogers-Evans M., Rothenhäusler B., Ullmer C., Fingerle J., Grether U., Knuesel I., Boeckers T.M., Ludolph A., Wirth T., Roselli F., Baumann B. NF-κB activation in astrocytes drives a stage-specific beneficial neuroimmunological response in ALS // The EMBO Journal. 2018. Vol. 37. P. 98697.

199. Pan J.Z., Ni L., Sodhi A., Aguanno A., Young W., Hart R.P. Cytokine activity contributes to induction of inflammatory cytokine mRNAs in spinal cord following contusion // Journal of Neuroscience Research. 2002. Vol. 68. P. 315–322.

200. Paterniti I., Impellizzeri D., Di Paola R., Esposito E., Gladman S., Yip P., Priestley J.V., Michael-Titus A.T., Cuzzocrea S. Docosahexaenoic acid attenuates the early inflammatory response following spinal cord injury in mice: in-vivo and in-vitro studies // Journal of Neuroinflammation. 2014. Vol. 11. P. 6.

201. Perea G., Navarrete M., Araque A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information // Trends in Neuroscience. 2009. Vol. 32. P. 421–431.

202. Pinhal-Enfield G., Ramanathan M., Hasko G., Vogel S.N., Salzman A.L., Boons G.J., Leibovich S.J. An angiogenic switch in macrophages involving synergy between Toll-like receptors 2, 4, 7, and 9 and adenosine A(2A) receptors // The American Journal of Pathology. 2003. Vol. 163. P. 711–721.

203. Plantman S., Patarroyo M., Fried K., Domogatskaya A., Tryggvason K., Hammarberg H., Cullheim S. Integrin-laminin interactions controlling neurite outgrowth from adult DRG neurons in vitro // Molecular and Cellular Neuroscience. 2008. Vol. 39. P. 50–62.

204. Plemel J.R., Keough M.B., Duncan G.J., Sparling J.S., Yong V.W., Stys P.K., Tetzlaff W. Remyelination after spinal cord injury: is it a target for repair? // Progress in Neurobiology. 2014. Vol. 117. P. 54–72.

205. Porta C., Riboldi E., Ippolito A., Sica A. Molecular and epigenetic basis of macrophage polarized activation // Seminars in Immunology. 2015. Vol. 27. P. 237–248.

206. Powell E.M., Geller H.M. Dissection of astrocyte-mediated cues in neuronal guidance and process extension // Glia. 1999. Vol. 26. P. 73–83.

207. Raff M.C., Miller R.H., Noble M. A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium // Nature. 1983. Vol. 303. P.390–396.

208. Reier P.J., Lane M.A., Hall E.D., Teng Y.D., Howland D.R. Translational spinal cord injury research: preclinical guidelines and challenges. // Handbook of Clinical Neurology. 2012. Vol. 109. P. 411–433.

209. Ren K. Emerging role of astroglia in pain hypersensitivity // Japanese Dental Science Review. 2010. Vol. 46. P. 86–92.

210. Ren Y., Young W. Managing inflammation after spinal cord injury through manipulation of macrophage function // Neural Plasticity. 2013. Vol. 2013. P. 945034.

211. Ridet J.L., Malhotra S.K., Privat A., Gage F.H. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function // Trends in Neuroscience. 1997. Vol. 20. P. 570–577.

212. Rolot M., Dewals B.G. Macrophage activation and functions during helminth infection: recent advances from the laboratory mouse // Journal of Immunology Research. 2018. Vol. 4. P. 1–17.

213. Romero-Sandoval A., Nutile-McMenemy N., DeLeo J.A. Spinal microglial and perivascular cell cannabinoid receptor type 2 activation reduces behavioral hypersensitivity without tolerance after peripheral nerve injury // Anesthesiology. 2008. Vol. 108. P. 722–734.

214. Salem Jr.N., Litman B., Kim H.Y., Gawrisch K. Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system // Lipids. 2001. Vol. 36. P. 945–959.

215. Saruhashi Y., Matsusue Y., Fujimiya M. The recovery of 5-HT transporter and 5-HT immunoreactivity in injured rat spinal cord // Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery. 2009. Vol. 129. P. 1279–1285.

216. Sasaki M., Honmou O., Akiyama Y., Uede T., Hashi K., Kocsis J.D. Transplantation of an acutely isolated bone marrow fraction repairs demyelinated adult rat spinal cord axons // Glia. 2001. Vol. 35. P. 26–34.

217. Satkunendrarajah K., Fehlings M.G. Do omega-3 polyunsaturated fatty acids ameliorate spinal cord injury? Commentary on: Lim et al., Improved outcome after spinal cord compression injury in mice treated with docosahexaeonic acid. Exp. Neurol. Jan; 239:13–27 // Experimental Neurology. 2013. Vol. 249. P. 104–110.

218. Schildge S., Bohrer C., Beck K., Schachtrup, C. Isolation and culture of mouse cortical astrocytes // Journal of Visualized Experiments. 2013. Vol. 71. P. 50079.

219. Schrage K., Koopmans G., Joosten E.A., Mey J. Macrophages and neurons are targets of retinoic acid signaling after spinal cord contusion injury // European Journal of Neuroscience. 2006. Vol. 23. P. 285–295.

220. Schwab M. Functions of Nogo proteins and their receptors in the nervous system // Nature Reviews Neuroscience. 2010. Vol. 11. P. 799–811.

221. Schwab M.E., Caroni P. Oligodendrocytes and CNS myelin are nonpermissive substrates for neurite growth and fibroblast spreading in vitro // Journal of Neuroscience. 1988. Vol. 8. P. 2381–2393.

222. Scremin A.M., Kurta L., Gentili A., Wiseman B., Perell K., Kunkel Ch., Scremin O.U. Increasing muscle mass in spinal cord injured persons with a functional electrical stimulation exercise program // Archives of Physical Medicine and Rehabilitation. 1999. Vol. 80. P. 1531–1536.

223. Serhan C.N., Arita M., Hong S., Gotlinger K. Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their endogenous aspirin-triggered epimers // Lipids. 2004. Vol. 39. P. 1125–1132.

224. Seung Kim H.F., Weeber E.J., Sweatt D.J., Stoll A.L., Marangell L.B. Inhibitory effects of omega-3 fatty acids on protein kinase C activity // Molecular Psychiatry. 2001. Vol. 6. P. 246–248.

225. Shechter R., Schwartz M. Harnessing monocyte-derived macrophages to control central nervous system pathologies: no longer ‘if’ but ‘how’ // The Journal of Pathology. 2012. Vol. 229. P. 332–346.

226. Shields L.B., Zhang Y.P., Burke D.A., Gray R., Shields C.B. Benefit of chondroitinase ABC on sensory axon regeneration in a laceration model of spinal cord injury in the rat // Surgical Neurology. 2008. Vol. 69. P. 568–577.

227. Shifman M.I., Yumul R.E., Laramore C., Selzer M.E. Expression of the repulsive guidance molecule RGM and its receptor neogenin after spinal cord injury in sea lamprey // Experimental Neurology. 2009. Vol. 217. P. 242–251.

228. Shigetomi E., Bowser D.N., Sofroniew M.V., Khakh B.S. Two forms of astrocyte calcium excitability have distinct effects on NMDA receptor-mediated slow inward currents in pyramidal neurons // Journal of Neuroscience. 2008. Vol. 28. P. 6659–6663.

229. Shigyo M., Tohda C. Extracellular vimentin is a novel axonal growth facilitator for functional recovery in spinal cordinjured mice // Scientific Reports. 2016. Vol. 6. P. 28293.

230. Shihabuddin L.S., Horner P.J., Ray J., Gage F.H. Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus // Journal of Neuroscience. 2000. Vol. 20. P. 8727–8735.

231. Silver J., Miller J.H. Regeneration beyond the glial scar // Nature Reviews Neuroscience. 2004. Vol. 5. P. 146–156.

232. Sindrilaru A., Peters T., Wieschalka S., Baican C., Baican A., Peter H., Hainzl A., Schatz S., Qi Y., Schlecht A., Weiss J.M., Wlaschek M., Sunderko¨tter C., Scharffetter-Kochanek K. An unrestrained pro-inflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice // The Journal of Clinical Investigation. 2011. Vol. 121. P. 985–997.

233. Sloan S.A., Barres B.A. Mechanisms of astrocyte development and their contributions to neurodevelopmental disorders // Current Opinion in Neurobiology. 2014. Vol. 27. P. 75–81.

234. Soderblom C., Luo X., Blumenthal E., Bray E., Lyapichev K., Ramos J., Krishnan V., Lai-Hsu C., Park K.K., Tsoulfas P. Perivascular fibroblasts form the fibrotic scar after contusive spinal cord injury // Journal of Neuroscience. 2013. Vol. 33. P. 13882–13887.

235. Sofroniew M.V. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation // Nature Reviews Neuroscience. 2015. Vol. 16. P. 249–263.

236. Sofroniew M.V., Vinters H.V. Astrocytes: biology and pathology // Acta Neuropathologica. 2010. Vol. 119. P. 7–35.

237. Sribnick E.A., Matzelle D.D., Banik N.L., Ray S.K. Direct evidence for calpain involvement in apoptotic death of neurons in spinal cord injury in rats and neuroprotection with calpain inhibitor // Neurochemical Research. 2007. Vol. 32. P. 2210–2216.

238. Sroga J.M., Jones T.B., Kigerl K.A., McGaughy V.M., Popovich P.G. Rats and mice exhibit distinct inflammatory reactions after spinal cord injury // Journal of Comparative Neurology. 2003. Vol. 462. P. 223–240.

239. Stellwagen D., Malenka R.C. Synaptic scaling mediated by glial TNF-alpha // Nature. 2006. Vol. 440. P. 1054–1059.

240. Stevens B., Allen N.J., Vazquez L.E., Howell G.R., Christopherson K.S., Nouri N., Micheva K.D., Mehalow A.K., Huberman A.D., Stafford B., Sher A., Litke A.M., Lambris J.D., Smith S.J., John S.W., Barres B.A. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination // Cell. 2007. Vol. 131. P. 1164–1178.

241. Stoll G., Schroeter M., Jander S., Siebert H., Wollrath A., Kleinschnitz C., Brück W. Lesion-associated expression of transforming growth factor-beta-2 in the rat nervous system: evidence for down-regulating the phagocytic activity of microglia and macrophages // Brain Pathology. 2004. Vol. 14. P. 51–58.

242. Stout R.D., Suttles J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments // Journal of Leukocyte Biology. 2004. Vol. 76. P. 509–513.

243. Syková E., Svoboda J., Simonová Z., Jendelová P. Role of astrocytes in ionic and volume homeostasis in spinal cord during development and injury // Progress in Brain Research. 1992. Vol. 94. P. 47–56.

244. Talamonti E., Pauter A.M., Asadi A., Fischer A.W., Chiurchiu V., Jacobsson A. Impairment of systemic DHA synthesis affects macrophage plasticity and polarization: implications for DHA supplementation during inflammation \\ Cellular and Molecular Life Sciences. 2017. Vol. 74. P. 2815–2826.

245. Tang S., Wan M., Huang W., Stanton R.C., Xu Y. Maresins: specialized proresolving lipid mediators and their potential role in inflammatory-related diseases // Mediators of Inflammation. 2018. Vol. 2018. P. 1–8.

246. Taoka Y., Okajima K., Uchiba M., Murakami K., Kushimoto S., Johno M., Naruo M., Okabe H., Takatsuki K. Gabexate mesilate, a synthetic protease inhibitor, prevents compression-induced spinal cord injury by inhibiting activation of leukocytes in rats // Critical Care Medicine. 1997. Vol. 25. P. 874–879.

247. Teshigawara K., Kuboyama T., Shigyo M., Nagata A., Sugimoto K., Matsuya Y., Tohda C. A novel compound, denosomin, ameliorates spinal cord injury via axonal growth associated with astrocyte-secreted vimentin // British Journal of Pharmacology. 2013. Vol. 168. P. 903–919.

248. Tessier-Lavigne M., Goodman C.S. The molecular biology of axon guidance // Science. 1996. Vol. 274. P. 1123–1133.

249. Thawer S.G., Mawhinney L., Chadwick K., de Chickera S.N., Weaver L.C., Brown A., Dekaban G.A. Temporal changes in monocyte and macrophage subsets and microglial macrophages following spinal cord injury in the lys-egfp-ki mouse model // Journal of Neuroimmunology. 2013. Vol. 261. P. 7–20.

250. Thompson C.D., Zurko J.C., Hanna B.F., Hellenbrand D.J., Hanna A. The therapeutic role of interleukin-10 after spinal cord injury // Journal of Neurotrauma. 2013. Vol. 30. P. 1311–1324.

251. Tom V.J., Steinmetz M.P., Miller J.H., Doller C.M., Silver J. Studies on the development and behavior of the dystrophic growth cone, the hallmark of regeneration failure, in an in vitro model of the glial scar and after spinal cord injury // Journal of Neuroscience. 2004. Vol. 24. P. 6531–6539.

252. Totoiu M.O., Keirstead H.S. Spinal cord injury is accompanied by chronic progressive demyelination // Journal of Comparative Neurology. 2005. Vol. 486. P. 373–383.

253. Tower D.B. A century of neuronal and neurological interactions, and their pathological implications: an overview // Progress in Brain Research. 1992. Vol. 94. P. 3–17.

254. Tripathi A., Parikh Z.S., Vora P., Frost E.E., Pillai P.P. pERK1/2 peripheral recruitment and filopodia protrusion augment oligodendrocyte progenitor cell migration: combined effects of PDGF-A and fibronectin // Cellular Molecular Neurobiology. 2016. Vol. 37. P. 183–194.

255. Tripathi R.B., McTigue D.M. Chronically increased ciliary neurotrophic factor and fibroblast growth factor-2 expression after spinal contusion in rats // Journal of Comparative Neurology. 2008. Vol. 510. P. 129–144

256. Tuszynski M.H., Wang Y., Graham L., McHale K., Gao M., Wu D., Brock J., Blesch A., Rosenzweig E.S., Havton L.A., Zheng B., Conner J.M., Marsala M., Lu P. Neural stem cells in models of spinal cord injury // Experimental Neurology. 2014. Vol. 261. P. 494–500.

257. Udina E., Furey M., Busch S., Silver J., Gordon T., Fouad K. Electrical stimulation of intact peripheral sensory axons in rats promotes outgrowth of their central projections // Experimental Neurology. 2008. Vol. 210. P. 238–247.

258. Van Middendorp J.J., Sanchez G.M., Burridge A.L. The Edwin Smith papyrus: a clinical reappraisal of the oldest known document on spinal injuries // European Spine Journal. 2010. Vol. 19. P. 1815–1823.

259. Vancassel S., Leman S., Hanonick L., Denis S., Roger J., Nollet M., Bodard S., Kousignian I., Belzung C., Chalon S. n-3 polyunsaturated fatty acids supplementation reverses stress-induced modifications on brain monoamine levels in mice // Journal of Lipid Research. 2008. Vol. 49. P. 340–348.

260. Vaughn J.E., Peters A. A third neuroglial cell type. An electron microscopic study // Journal of Comparative Neurology. 1968. Vol. 133. P. 269–288.

261. Vessal M., Aycock A., Garton M.T., Ciferri M., Darian-Smith C. Adult neuro-genesis in primate and rodent spinal cord: comparing a cervical dorsal rhizotomy with a dorsal column transection // European Journal of Neuroscience. 2007. Vol. 26. P. 2777–2794.

262. von Meyenburg J., Brosamle C., Metz G.A., Schwab M.E. Regeneration and sprouting of chronically injured corticospinal tract fibers in adult rats promoted by NT-3 and the mAb IN-1: which neutralizes myelin-associated neurite growth inhibitors // Experimental Neurology. 1998. Vol. 154. P. 583–594.

263. Vreugdenhil M., Bruehl C., Voskuyl R.A., Kang J.X., Leaf A., Wadman W.J. Polyunsaturated fatty acids modulate sodium and calcium currents in CA1 neurons // PNAS. 1996. Vol. 93. P. 12559–12563.

264. Vroemen M., Aigner L., Winkler J., Weidner N. Adult neural progenitor cell grafts survive after acute spinal cord injury and integrate along axonal pathways // European Journal of Neuroscience. 2003. Vol. 18. P. 743–751.

265. Wang H.F., Liu X.K., Li R., Zhang P., Chu Z., Wang C.L., Liu H.R., Qi J., Lv G.Y., Wang G.Y., Liu B., Li Y., Wang Y.Y. Effect of glial cells on remyelination after spinal cord injury // Neural Regeneration Research. 2017. Vol. 12. P. 1724–1732.

266. Wanner I.B. Glial scar borders are formed by newly proliferated, elongated astrocytes that interact to corral inflammatory and fibrotic cells via STAT3-dependent mechanisms after spinal cord injury // Journal of Neuroscience. 2013. Vol. 33. P. 12870–12886.

267. Ward R.E., Huang W., Curran O.E., Priestley J.V., Michael-Titus A.T. Docosahexaenoic acid prevents white matter damage after spinal cord injury // Journal of Neurotrauma. 2010. Vol. 27. P. 1769–1780.

268. Watzlawick R., Rind J., Sena E.S., Brommer B., Zhang T., Kopp M.A., Dirnag U., Macleod M.R., Howells D.W., Schwab, J.M. Olfactory ensheathing cell transplantation in experimental spinal cord injury: effect size and reporting bias of 62 experimental treatments: a systematic review and meta - analysis // PLoS Biology. 2016. Vol. 14. P. 1002468.

269. Waxman S.G. Axonal conduction and injury in multiple sclerosis: the role of sodium channels // Nature Reviews Neuroscience. 2006. Vol. 7. P. 932–941.

270. Werdin F., Tennenhaus M., Schaller H.E., Rennekampff H.O. Evidence-based management strategies for treatment of chronic wounds // Eplasty. 2009. Vol. 9. P. 19.

271. Williams K., Alvarez X., Lackner A.A. Central nervous system perivascular cells are immunoregulatory cells that connect the CNS with the peripheral immune system // Glia. 2001. Vol. 36. P. 156–164.

272. Wingrave J.M., Schaecher K.E., Sribnick E.A., Wilford G.G., Ray S.K., Hazen-Martin D.J., Hogan E.L., Banik N.L. Early induction of secondary injury factors causing activation of calpain and mitochondria-mediated neuronal apoptosis following spinal cord injury in rats // Journal of Neuroscience Research. 2003. Vol. 73. P. 95–104.

273. Witiw Ch.D., Fehlings M.G. Acute Spinal Cord Injury // Journal of spinal disorders and techniques. 2015. Vol. 28. P. 202–210.

274. Woodbury D., Schwarz E.J., Prockop D.J., Black I. B. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons // Journal of Neuroscience Research. 2000. Vol. 61. P. 364–370.

275. Woodcock T., Morganti-Kossmann M.C. The role of markers of inflammation in traumatic brain injury // Frontiers in Neurology. 2013. P. 4–18.

276. Wu D., Miyamoto O., Shibuya S., Okada M., Igawa H., Janjua N.A., Norimatsu H., Itano T. Different expression of macrophages and microglia in rat spinal cord contusion injury model at morphological and regional levels // Acta medica Okayama. 2005. Vol. 59. P. 121–127.

277. Wynn T.A., Chawla A., Pollard J.W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease // Nature. 2013. Vol. 496. P. 445–455.

278. Xu J., Drew P.D. 9-Cis-retinoic acid suppresses inflammatory responses of microglia and astrocytes // Journal of Neuroimmunology. 2006. Vol. 171. P. 135–144.

279. Xu W., Chi L., Xu R., Ke Y., Luo C., Cai J., Qiu M., Gozal D., Liu R. Increased production of reactive oxygen species contributes to motor neuron death in a compression mouse model of spinal cord injury // Spinal Cord. 2005. Vol. 43. P. 204–213.

280. Xu X., Zhang A., Zhu Y., He W., Di W., Fang Y., Shi X. MFG-E8 reverses microglial-induced neurotoxic astrocyte (A1) via NF-κB and PI3K-Akt pathways // Journal of Cellular Physiology. 2018. Vol. 234. P. 904–914.

281. Yang H., Lu P., McKay H.M., Bernot T., Keirstead H., Steward O., Gage F.H., Edgerton V.R., Tuszynski M.H. Endogenous neuro-genesis replaces oligodendrocytes and astrocytes after primate spinal cord injury // Journal of Neuroscience. 2006. Vol. 26. P. 2157–2166.

282. Young K.M., Psachoulia K., Tripathi R.B., Dunn S.J., Cossell L., Attwell D., Tohyama K., Richardson W.D. Oligodendrocyte dynamics in the healthy adult CNS: evidence for myelin remodeling // Neuron. 2013. Vol. 77. P. 873–885.

283. Yu O., Chuang D.M. Long-term GABA treatment elicits supersensitivity of quisqualate-preferring metabotropic glutamate receptor in cultured rat cerebellar neurons // Journal of Neurochemistry. 1993. Vol. 61. P. 430–435.

284. Zai L.J., Yoo S., Wrathall J.R. Increased growth factor expression and cell proliferation after contusive spinal cord injury // Brain Research. 2005. Vol. 1052. P. 147–155.

285. Zhang X., Wang X., Liu T., Mo M., Ao L., Liu J., Cao J., Cui Z. Smad2/3 upregulates the expression of vimentin and affects its distribution in DBP-exposed Sertoli cells // PPAR Research. 2015. P. 489314.

286. Zhang Y., Wang J., Liu L., Chang R., So K., Ju G. The effect of Lycium barbarum on spinal cord injury, particularly its relationship with M1 and M2 macrophage in rats // BMC Complementary and Alternative Medicine. 2013. Vol. 13, P. 67.

287. Zhao Y., Calon F., Julien C., Winkler J.W., Petasis N.A., Lukiw W.J., Bazan N.G. Docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin d1 induces neuronal survival via secretase- and PPARγ-mediated mechanisms in alzheimer's disease models // PLoS One. 2011. Vol. 6. P. 15816.

288. Zhu W., Ding Y., Kong W., Li T., Chen H. Docosahexaenoic acid (DHA) provides neuroprotection in traumatic brain injury models via activating Nrf2-ARE signaling // Inflammation. 2018. Vol. 41. P. 1182–1193.

289. Zimmer L., Delpal S., Guilloteau D., Aioun J., Durand G., Chalon S. Chronic n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency alters dopamine vesicle density in the rat frontal cortex // Neuroscience Letters. 2000. Vol. 284. P. 25–28.