

УДК 612.44.018:616.893-053.8-092.9

Изучение нейропротекторной эффективности нуклео ЦМФ и тимьяна ползучего при раздавливании седалищного нерва

**Л. Р. Геворгян, В. А. Чавушян, А. А. Саваян,
М. А. Даниелян**

*Институт физиологии им. Л.А. Орбели НАН РА
0028, Ереван, ул. Бр. Орбели, 22*

Ключевые слова: нуклео ЦМФ, тимьян ползучий, седалищный нерв, нейропротекция

Поиск оптимальных терапевтических стратегий при травматических повреждениях периферического нерва (ПН) остается актуальным, поскольку, по эпидемиологическим данным, в структуре временной нетрудоспособности заболевания периферической нервной системы составляют 7-10%. Дегенерация ПН, индуцированная травмой, – мультифакторная патология, при которой клеточная сигнализация, апоптоз, оксидативный стресс и воспаление становятся неконтролируемыми. Экспериментальные исследования продемонстрировали отчетливое повышение потребности в пиримидиновых нуклеотидах при поражениях ПН [12]. Изменение метаболизма фосфатидилхолина было признано в качестве одного из механизмов, запускающих сигнальный каскад апоптоза [8]. Терапевтический эффект пиримидиновых нуклеотидов обусловлен их способностью повышать синтез фосфатидилхолина – главного компонента нейрональных мембран; активизировать синтез мембранных фосфолипидов, ведущих к регенерации аксонов и синапсов; предотвращать генерацию свободных радикалов и инициацию событий провоспалительного каскада [15]. В свою очередь, натуральные продукты также имеют значительный вклад в лечебные мультимишенные стратегии нейродегенеративных заболеваний [9].

Препараты, ускоряющие и/или увеличивающие синтез структурных фосфолипидов мембран и оказывающие защитное и репаративное действие, широко исследуются в головном мозге [16], однако мало изучены относительно ПН [13, 14, 17]. В то же время тимьян ползучий (*Thymus serpyllum*) проявляет антиоксидантную и антихолинэстеразную активность [20] и осуществляет иммунорегуляторные функции на уровне рецепторов и сигнальных путей иммунокомпетентных клеток [11]. Интересно, что индуцированная травмой активация брадикинина и эндогенных липидов

вызывает сенситизацию полимодальных ноцицепторных нейронов [6], в десенситизации которых критическая роль отводится транзиторным ванилоидным каналам (TRPV1), активатором которых выступает тимол [22].

Целью данного исследования явилось изучение динамики функциональных показателей моторной реиннервации и степени морфологического восстановления поврежденного седалищного нерва (СН) в плацебо-контроле и в условиях системного применения нуклео ЦМФ и водного экстракта тимьяна ползучего.

Материал и методы

Эксперименты проведены на крысах-самцах альбино (250 ± 30 г) в трех группах: подверженные раздавливанию СН (контроль, $n=5$), таковых в условиях применения нуклео ЦМФ ($n=6$) и тимьяна ползучего ($n=6$). Под нембуталовым наркозом (40 мг/кг в/б) посредством сжатия кровоостанавливающим зажимом в положении первого зубца в течение 30 сек производили одностороннее раздавливание СН в верхней трети бедра (4 мм выше трифуркации) с последующим наложением швов на мышечные / кожные ткани и подкожным введением бицилина 3. Препарат нуклео ЦМФ (Ferrer Internacional) (0,94 мг/кг) вводили в/м ежедневно со следующего дня после операции в течение шести дней, а водный раствор спиртового экстракта тимьяна ползучего (14 мг/кг) – в течение трех недель.

Спиртовой экстракт тимьяна ползучего (предоставлен Галстян А.М., кафедра фармакогнозии ЕГМУ им. М. Гераци) растворяли в стерильной дистиллированной воде. Нуклео ЦМФ содержит нуклеотиды: цитидина монофосфат (ЦМФ), уридина трифосфат (УТФ), которые широко используют для лечения заболеваний ЦНС. ЦМФ принимает участие в синтезе комплекса липидов, которые формируют нейрональную мембрану, главным образом сфингомиелин – основной компонент миелиновой оболочки. ЦМФ также является предшественником нуклеиновых кислот (ДНК и РНК), которые, в свою очередь, являются основными элементами клеточного метаболизма (например, в белковом синтезе) [1].

В данном изучении проведен сравнительный анализ динамики восстановления моторной функции – статический седалищный индекс (Static sciatic index – SSI) с 1-го по 30-й дни после одностороннего раздавливания СН. После ежедневных съемок на цифровой фотокамере снимки переводили на платформу компьютерной графической программы (Adobe Photoshop) и с помощью инструмента «линейка» измеряли параметры лап крысы: размах I-V пальцев (toe-spread – TS) и размах II-IV пальцев (intermediate toe-spread – ITS) здоровой и пораженной сторон (рис. 1, схема лапы) с последующим вычислением средних арифметических каждого параметра для каждой стороны (здоровая конечность служила внутренним контролем). Далее по

специально выработанной формуле (по Bervar M., 2000) вычисляли SSI: SSI = 0 – полноценная моторная функция, SSI = -100 – полное отсутствие двигательной функции.

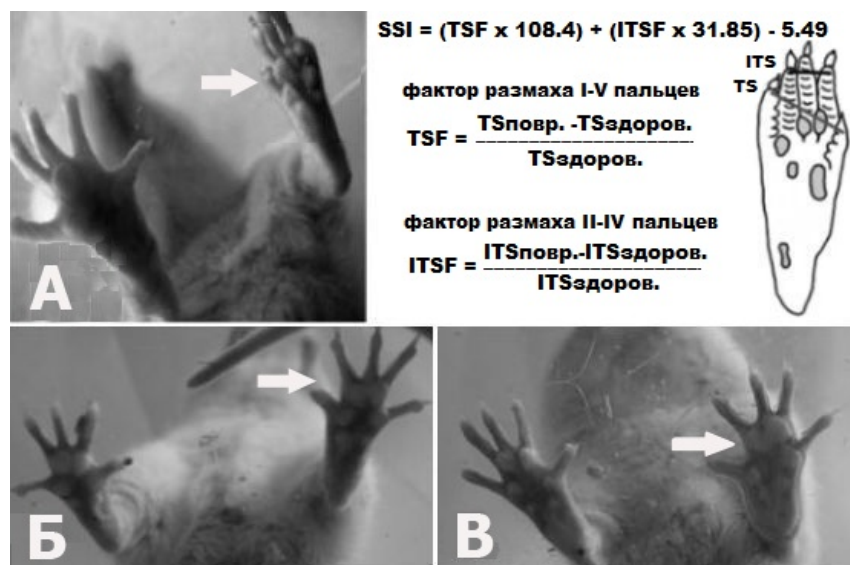


Рис. 1. Показатели статического садиличного индекса задних лап крыс в контроле (А), в группах тимьяна ползучего (Б) и нуклео ЦМФ (В) на 30-й день после раздавливания нерва

По истечении 30 дней в глубоком наркотическом сне (нембутал 50 мг/кг) СН на поврежденной стороне удаляли и помещали в 10% раствор нейтрального формалина на 3-7 дней для последующего проведения морфогистохимического исследования по методу определения активности Ca^{2+} -зависимой кислой фосфатазы (КФ) [2]. Замороженные продольные срезы толщиной 30-40 мкм погружались в свежеприготовленную инкубационную среду, предназначенную для определения активности КФ, содержащую 20 мл 0,40% раствора уксуснокислого свинца, 5мл 1М ацетатного буфера (pH=5.6) и 5мл 1% раствора β -глицерофосфата натрия. Смесь доводили 3% раствором хлористого кальция до 100 мл. Инкубацию проводили в термостате при 37°C в течение трех-четырех часов. После промывки срезы проявляли в 3% растворе сульфида натрия и помещали в бальзам.

Результаты и обсуждение

В наших экспериментах результаты SSI в динамике от 1 до 30 дней после раздавливания свидетельствуют о тенденции к выравниванию двигательной функции на обеих сторонах во всех экспериментальных

группах (рис. 2). На степень реиннервации и восстановления полноценной моторной функции указывают величины SSI, которые к 30-му дню у крыс контрольной группы в среднем составляли -80, в группе тимьяна ползучего +7, в группе нуклео ЦМФ - 4 ($p < 0.05$) (рис. 2). О более полноценном восстановлении в группах тимьяна ползучего и нуклео ЦМФ по сравнению с контролем указывают и снимки, представленные на рис. 1 (А-В).

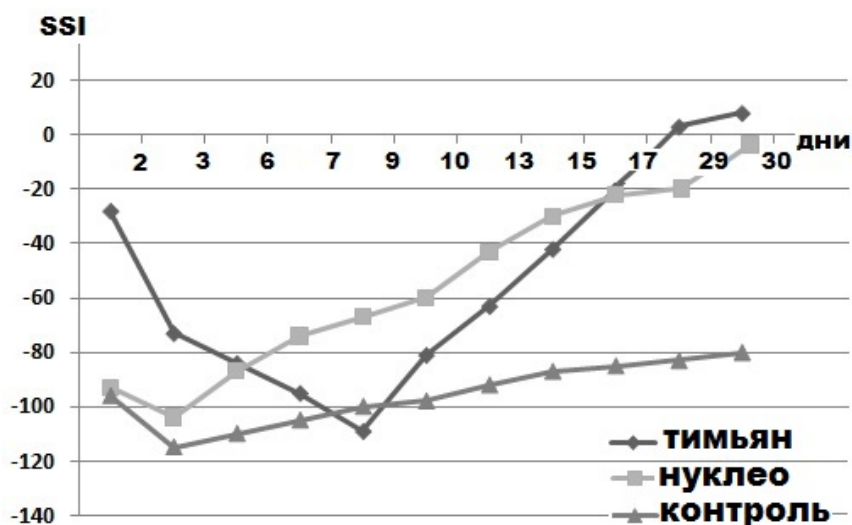


Рис. 2. Показатели статического сидельного индекса задних лап крыс в контроле (А), в группах тимьяна ползучего (Б) и нуклео ЦМФ (В) в динамике от 1 до 30 дней после раздавливания нерва

Согласно результатам морфогистохимических исследований, через 30 дней после раздавливания СН в срединном отделе травмы из проксимального участка исходят обособленные нервные волокна, входящие в участок раздавливания, где интенсивность окрашиваемости нерва (зависящая от активности КФ) частично восстановлена (рис. 3 Б). На срезах нерва животных группы тимьяна ползучего в участке травмы видны светлые расширенные трубочки разного калибра, для которых характерна волнообразность (рис. 3 В, Г), но тонкие нервные волокна имеют прерывистые участки. В отдаленных от места травмы участках сохранена характерная для нерва волнообразная слоистость, хотя местами видны расслоенные участки (рис. 3 В), где прослеживаются пустые разного калибра Шванновские трубки с низкой активностью КФ (рис. 3 В, Г), что свидетельствует об отсутствии соединительной ткани между пучками. На срезах нерва животных группы нуклео ЦМФ (рис. 3 Д, Е) в участке травмы наблюдается тенденция морфологического восстановления: пустых

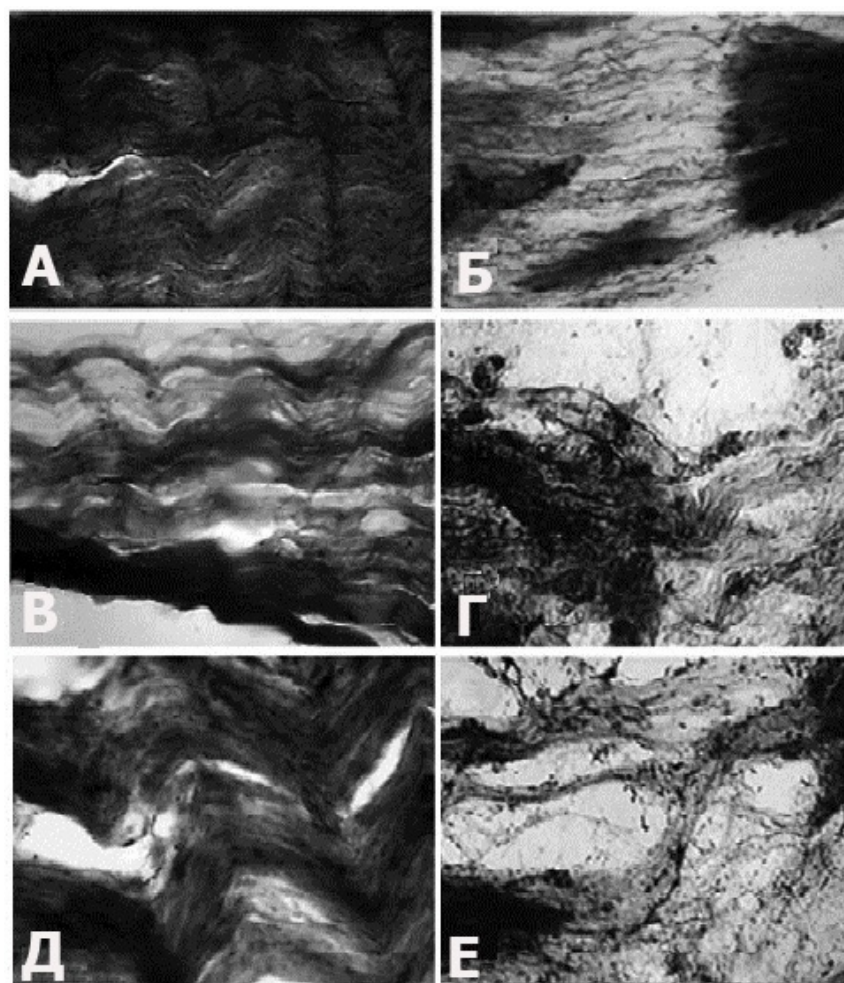


Рис. 3. Продольные срезы седалищного нерва крыс в норме (А) и в участке раздавливания у животных в группах: контроль (Б), тимьяна ползучего (В, Г) и нуклео ЦМФ (Д, Е). Увеличение: 100 (А, В, Д), 160 (Б), 400 (Г, Е)

Шванновских трубок не видно, прослеживаются тонкие миелинизированные волокна, связывающие дистальные и проксимальные отделы травмы, среди которых расположены непрерывно идущие волокна со слабой ферментной активностью (рис. 3 Е); из проксимального отдела отходят миелинизированные нервные волокна, заполняющие участок сдавления (рис. 3 Е). Из дистального отдела также прослеживаются миелинизированные пучки. В отдаленных от места травмы участках сохранена характерная для нерва волнообразная слоистость, хотя местами видны расслоенные набухшие нервные волокна, с разной ферментной активностью (рис. 3 Д). В отличие от интактных животных, у которых волнообразный

слоистый пучок нервных волокон подчеркивается уплощенными ядрами Шванновских клеток (ШК), в серии нуклео ядра ШК округлые (рис.3 Е). Методом выявления активности Ca^{2+} -зависимой КФ показано, что через 35 дней после раздавливания СН отмечается восстановление ферментной активности в экстензорном пучке волокон, а во флексорном пучке – картина умеренной пролиферации ШК и клеток эндоневрия, и даже через 70 дней после раздавливания обнаружены широкие соединительнотканые прослойки между поперечными коллатеральными пучками нервных волокон [10].

Хроническое раздавливание ПН сопровождается Уоллеровской дегенерацией, которая рассматривается как воспалительный ответ на повреждение со специфическими для нервной системы свойствами: аксональная дегенерация, отторжение миелина мембранами ШК и их же пролиферация, фагоцитирование и деградация миелина активированными макрофагами и ШК. Известно, что для улучшения регенерации ПН необходима пролиферация и дифференциация ШК и предполагается, что для обеспечения этих условий необходима фармакологическая протекция в начальной стадии аксонной регенерации. Небольшой обзор современных достижений нейропротекторной терапии обосновывает полученные в данном исследовании данные. Так, показано, что цитиколин (содержит нуклеотиды) восстанавливает моторную функцию пирамидной системы и ее афферентных путей [23]; оказывает благотворное воздействие у пациентов с ишемической зрительной нейропатией [14]; предотвращает снижение активности Mg^{2+} -зависимой АТФ-азы в митохондриальной и синапсомембранных, возникающее при травматических повреждениях спинного мозга [4]. В исследованиях с оценкой эффектов цитиколина при травматических повреждениях спинного мозга было показано достоверное снижение перекисного окисления липидов и улучшение моторной функции [3]. Цитиколин предотвращает повреждение тканей в острой фазе сдавления спинного мозга [5], а в модели ишемического повреждения спинного мозга – обеспечивает защиту за счет подавления каспазного пути и увеличения уровней антиапоптозных белков [21]. Благоприятные эффекты цитиколина также наблюдались в экспериментальных моделях частичного раздавливания зрительного нерва у крыс [17] и регенерации ПН после хирургической операции [13]. Лишь в единичном изучении показано, что применение пиримидиновых нуклеотидов влияет на синтез нуклеиновой кислоты и миелиновых оболочек СН [18]. В данном изучении нуклео ЦМФ, благодаря интенсивной метаболической активности комплексного воздействия ЦМФ и УТФ, согласно морфогистохимическим данным, очевидно, способствует регенерации миелиновой оболочки, регулируя демиелинизацию при Уоллеровской дегенерации. Для тимьяна ползучего описана антиоксидантная активность метанольной фракции [24], а при острой и хронической боли показан опосредованный опиоидными рецепторами

модуляторный эффект гидроэтанольного экстракта [19]. Ранее нами показано восстановление вызванной активности мотонейронов спинного мозга при стимуляции дистального участка сдавленного СН после применения тимьяна обыкновенного (*Thymus vulgaris*), указывающее на восстановление проведения через участок повреждения и нормальный нейромедиаторный статус аксотомированных мотонейронов [7], а также отсутствие таковых на той же модели без фармакологического воздействия [10].

Поступила 14.02.13

Նուկլեո ՅՄՖ-ի և սողացող ուրցի նյարդապաշտպան արդյունավետության ուսումնասիրությունը նստանյարդի վնասման դեպքում

Լ.Ռ. Գևորգյան, Վ.Ա. Չավուշյան, Ա.Ա. Սավայան, Մ.Հ. Դանիելյան

Ֆոսֆոլիպիդների նյութափոխանակության փոփոխությունը հանդիսանում է ապոպտոզի ազդանշանային կասկադը հարուցող մեխանիզմներից մեկը: Նուկլեոտիդային թերապիայի արդյունավետությունը նստանյարդի (ՆՆ) վրա բավականաչափ ուսումնասիրված չէ: Միննույն ժամանակ, սողացող ուրցի (*Thymus serpyllum*) էքստրակտը՝ հանդիսանալով ազատ ռադիկալների ակցեպտոր, ցուցաբերում է իմունակարգավորիչ ֆունկցիա՝ ազդելով իմունային բջիջների ազդանշանային ուղիների վրա: Բացի այդ, բրադիկինինի և էնդոգեն լիպիդների ակտիվացումը՝ վնասվածքով հարուցված, առաջացնում է պոլիմոդալ նոցիցեպտորային նեյրոնների սենսիտիզացիա: Ենթադրվում է սողացող ուրցի նյարդապաշտպան ազդեցությունը ՆՆ դեգեներացիայի ժամանակ: Հետազոտության նպատակն է հանդիսացել նուկլեո ՅՄՖ-ի (պարունակում է նուկլեոտիդներ) և սողացող ուրցի էքստրակտի նյարդապաշտպան ազդեցության համեմատությունը ՆՆ վնասման դեպքում: Փորձերը կատարվել են ալբինո տեսակի արու առնետների վրա ՆՆ ճգման ենթարկված (հսկիչ), ՆՆ ճգմումից հետո միջմկանային ներարկմամբ նուկլեո ՅՄՖ և սողացող ուրց ստացած խմբերում: Ի տարբերություն հսկիչի՝ նուկլեո ՅՄՖ-ի և սողացող ուրցի խմբերում ստացվել են վնասված և ինտակտ վերջույթների շարժողական ֆունկցիայի նույնացման դինամիկայի մասին տվյալներ ՆՆ վնասումից հետո 30 օրում՝ համաձայն ՆՆ ստատիկ ինդեքսի համեմատական վերլուծության: Մորֆոհիստոքիմիական նմուշների վրա նկատելի են բարակ միելինիզացված թելիկներ, որոնք կապում են վնասվածքի ՆՆ հեռադիր և մոտադիր հատվածները: Նուկլեո ՅՄՖ-ի առա-

վել արտահայտված վերականգնող ազդեցությունը պայմանավորված է կառուցվածքային ֆոսֆոլիպիդների սինթեզի ակտիվացմամբ, մինչդեռ սողացող ուրցի էքստրակտը, ըստ երևույթի, կարգավորում է բորբոքման կասկադի գործընթացների հարուցումը:

The study of neuroprotective effectiveness of Nucleo CMF and *Thymus serpyllum* in case of the sciatic nerve injury

L.R. Gevorgyan, V.A. Chavushyan, A.A. Savayan, M.H. Danielyan

One of the mechanisms that initiate signaling cascade of apoptosis is changes of the phospholipids metabolism. There are few studies of the nucleotide therapy effectiveness in treating sciatic nerve (SN). *Thymus serpyllum* (thyme) is a scavenger of free radicals and exerts immunoregulatory functions influencing receptors and signaling pathways of immune cells. Moreover, the injury-induced activation of bradykinin and endogenous lipids causes sensitization of polymodal nociceptor neurons through V channels, which are activated by thymol. It is assumed that *Thymus serpyllum* has a protective effect in case of peripheral nerve degeneration.

The aim of the study was to estimate comparative neuroprotective effectiveness of Nucleo CMF (which contains nucleotides cytidine monophosphate and uridine triphosphate) and extract of *Thymus serpyllum* in compression of the SN. Experiments were carried out on male albino rats in the following groups: subjected to compression SN (control) and those in conditions of injecting Nucleo CMF (0.94 mg/kg) and *Thymus serpyllum* (14 mg/kg), i/m, daily, from the day after injury during six days (Nucleo) and three weeks (*Thymus serpyllum*). A comparative analysis of the dynamics of recovery motor function (static sciatic index) was carried out. Data on the alignment of motor function of damaged and intact limbs in the groups of Nucleo and *Thymus serpyllum* were obtained in contrast to the control during 30 days after SN compression. Thin myelinated fibers, which were traced on morphohistochemical slices, bind distal and proximal parts of injury. Nucleo CMF is more effective therapeutically. This effect is due to its ability to activate the synthesis of membrane phospholipids, while *Thymus serpyllum* prevents the generation of free radicals and regulates initiation of processes of proinflammatory cascade.

Литература

1. Дэвидсон Дж. Биохимия нуклеиновых кислот, пер. с англ. Д.Мещер, М., 1976.
2. Меликсетян И.Б. Гистохимическое выявление нервных волокон периферической нервной системы. Материалы научной конференции, посвященной 60-летию Института физиологии им.Л.А.Орбели, 2003, с. 112-115.

3. *Cakir E., Usul H., Peksoylu B., et al.* Effects of citicoline on experimental spinal cord injury. *J. Clin. Neurosci.*, 2005, Vol.12, p. 924-7.
4. *Clendenon N.R., Palayoor S.T., Gordon W.A.* Influence of CDP-choline on ATPase activity in acute experimental spinal cord trauma. In: Zappia V., Kennedy E.P., Nilsson B.I., Galletti P., eds. *Novel biochemical, pharmacological and clinical aspects of cytidinediphosphocholine*. Elsevier Science Publishing, 1985, p. 275-84.
5. *Coskun C., Avci B., Ocak N. et al.* Effect of repeatedly given CDP-choline on cardiovascular and tissue injury in spinal shock conditions: investigation of the acute phase. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2010, Vol. 62, p.497-506.
6. *Di Marzo V., Blumberg P. M., Szallasi A.* Endovanilloid signaling in pain. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 2002, Vol.12, p. 372-379.
7. *Gevorgyan L.R., Chavushyan V.A., Sargsyan E.D.* The study of neuroprotective effectiveness of *Thymus vulgaris* in compression of the sciatic nerve. «Physiological Mechanisms of Organisms' Functional Regulation» International Jubilee Conference devoted to 130th anniversary of acad. Levon Orbeli, 2012, p. 121-131.
8. *Joo J.H., Jetten A.M.* Molecular mechanisms involved in farnesol-induced apoptosis. *Cancer Lett.*, 2010, Vol.287, p.123-35.
9. *Joyner P. M., Cichewicz R. H.* Bringing natural products into the fold - exploring the therapeutic lead potential of secondary metabolites for the treatment of protein-misfolding-related neurodegenerative diseases. *Nat. Prod. Rep.*, 2011, Vol. 28, p. 26-47.
10. *Minasyan A.L., Aznauryan A.V., Meliksetyan I.B. et al.* Electrophysiological and morpho-histochemical study of the dynamics of degenerative and regenerative processes in flexor and extensor branches of sciatic nerve after the crush. *New Armenian Medical Journal*, 2011, Vol. 5, 2, p.69-78.
11. *Ming-Hua Jiang, Liang Zhu, Jian-Guo Jiang.* Immunoregulatory actions of polysaccharides from Chinese herbal medicine. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2010, Vol. 14, 12, p. 1367-1402.
12. *Moses E.K., Langford C.J., Austin L.* Small molecular weight RNAs altered metabolism in regenerating nerve. *Biochem. Int.*, 1982, vol. 5, p.177-184.
13. *Ozay R., Bekar A., Kocaeli H., et al.* Citicoline improves functional recovery, promotes nerve regeneration, and postoperative scarring after peripheral nerve surgery in rats. *Surg. Neurol.*, 2007, vol.68, p.615-22.
14. *Parisi V., Coppola G., Ziccardi L. et al.* Cytidine-5'-diphospho-choline (Citicoline): a pilot study in patients with non-arteritic ischaemic optic neuropathy. *Eur. J. Neurol.*, 2008, Vol.15, 5, p. 465-474.
15. *Qureshi I., Endres J. R.* Citicoline: A Novel Therapeutic Agent with Neuroprotective, Neuromodulatory, and Neuroregenerative Properties. *Natural Medicine Journal*, 2010, Vol. 2, 6, p. 11-25.
16. *Saver J.L.* Targeting the brain: neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke. *Pharmacotherapy*, 2010, Vol. 30, p. 62-9.
17. *Schuettauf F., Rejdak R., Thaler S. et al.* Citicoline and lithiumrescue retinal ganglion cells following partialoptic nerve crush in the rat. *Exp. Eye. Res.*, 2006, Vol. 83, p.1128-34.
18. *Sjoberg J., Kanje M.* Incorporation of 32P phosphate into nucleotides of the dorsal root ganglia of regenerating rat sciatic nerve. *Brain. Res.*, 1987, Vol. 415, p. 270-274.
19. *Taherian A.A., Babaei M., Vafaei A.A. et al.* Antinociceptive effects of hydroalcoholic extract of *Thymus vulgaris*. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 2009, Vol. 22, 1, p.83-89.
20. *Tavares L., Fortalezas S., Tyagi M., Barata D. et al.* Bioactive compounds from endemic plants of Southwest Portugal: Inhibition of acetylcholinesterase and radical scavenging activities. *Pharmaceutical Biology*, 2011, p. 1-8.
21. *Turkkan A., Alkan T., Goren B. et al.* Citicoline and postconditioning provides neuroprotection in a rat model of ischemic spinal cord injury. *Acta Neurochir.*, 2010, Vol. 152, p.1033-1042.
22. *Vogt-Eisele A.K., Weber K., Sherkheli M. A. et al.* Monoterpenoid agonists of TRPV3. *Br. J. Pharmacol.*, 2007, Vol.151, p.530-540.

23. *Yasuhara M., Naito H., Tachibana Y. et al.* An electrophysiological study on the effects of CDP-choline in the central nervous system. In: Novel biochemical, pharmacological and clinical aspects of cytidinediphosphocholine. Amsterdam: Elsevier Science Publishing, 1985, p.259-274.
24. *Zaha A. E., Shakya A. K., Khalaf N.A., Al-Haroon M.* Comparative Antioxidant Activity of Some Edible Plants. Turk. J. Biol., 2008, Vol. 32, p.193-196.