

На правах рукописи

МАНЖУЛО
ИГОРЬ ВИКТОРОВИЧ

**НЕЙРО-ГЛИАЛЬНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В МЕХАНИЗМАХ
РАЗВИТИЯ БОЛИ И ЛЕКАРСТВЕННОГО ОБЕЗБОЛИВАНИЯ У КРЫС**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Владивосток – 2013

Работа выполнена в лаборатории фармакологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук Дюйзен Инесса Валерьевна

Официальные оппоненты:

Вараксин Анатолий Алексеевич, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук, ведущий научный сотрудник лаборатории цитофизиологии

Калиниченко Сергей Георгиевич, доктор медицинских наук, профессор, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры гистологии

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» Северо-Западного отделения Российской академии медицинских наук

Защита состоится «24» декабря 2013 г. в 12 часов на заседании диссертационного совета Д 005.008.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук по адресу: 690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, д. 17. Телефон: 7 (423) 2310905, факс: 7 (423) 2310900.

e-mail: inmarbio@mail.primorye.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук (690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, д. 17).

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

Автореферат разослан «20» ноября 2013 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Ващенко

М.А. Ващенко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Классические представления о трофической и опорной роли нейроглии, благодаря совершенствованию методических и инструментальных подходов в нейробиологии, радикально пересматриваются. С точки зрения современных представлений астроциты и микроглиоциты являются неотъемлемой структурной, метаболической и функциональной частью любого синапса (Gao et al., 2010). Последние исследования подтверждают важную роль глии в развитии болевой патологии. Нейрональные сигналы ноцицептивной модальности неизменно сопровождаются изменением структурно-функциональных свойств всех типов глиоцитов (Feng et al., 2008). При этом отдельные глиальные механизмы на разных этапах болевого процесса могут иметь разное значение для выраженности и длительности болевого синдрома. Так, при развитии нейропатической боли секретлируемые астроцитами нейротрофические факторы и медиаторы воспаления (интерлейкины IL1, IL6 и фактор некроза опухоли) усиливают возбудимость нейронов и способствуют развитию патологических болевых феноменов (Guo et al., 2007). С другой стороны, астроглиоциты способны высвободить ряд противовоспалительных цитокинов (IL10 и IL4) и уменьшать выраженность воспалительного процесса в месте повреждения нервного ствола (Milligan, Watkins, 2009). Микроглиальные клетки в ходе развития нейропатологических процессов могут трансформироваться в провоспалительный и/или в нейропротективный фенотип, выполняя, таким образом, амбивалентную роль в нервной ткани (Коржевский и др., 2012; Kobayashi et al., 2013).

Учитывая значение глиальных клеток и секретлируемых ими нейротрофических и сигнальных молекул, перспективным направлением в нейрофармакологии боли является разработка методов глиотропной терапии. Препараты из группы полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), обладающие противовоспалительным и антиоксидантным действием (Fargoqui, 2007), представляют в этом отношении значительный интерес. Среди препаратов ПНЖК выраженными нейротропными эффектами обладает докозагексаеновая кислота (ДГК) – один из важнейших структурных липидов нервной ткани (Bazan, 2007; Nakamoto et al., 2010). В аспекте антиболевого действия ДГК наиболее полно изучены её периферические эффекты, приводящие к уменьшению инициирующего боль воспалительного процесса в тканях (Cunpane et al., 2009). Известно также, что ДГК в составе клеточных мембран способна модулировать метаболические, электрические и рецепторные свойства нейронов и глиальных клеток (Belayev et al., 2005). Эндогенный метаболит ДГК (нейропротектин D1) уменьшает выраженность некроза и апоптоза в клетках центральной и периферической нервной системы (Serhan et al., 2006; Mukherjee et al., 2007). Учитывая высокий противовоспалительный потенциал ДГК и ее роль в физиологии и патологии нервной ткани, вопрос о наличии у препарата антиболевого эффекта и

механизмах его реализации, является весьма актуальным для фундаментальной нейробиологии и практической медицины.

В целом, несмотря на значительный интерес исследователей, современные данные о роли нейроглии в механизмах развития боли имеют, зачастую, фрагментарный и противоречивый характер и нуждаются в дальнейшем, более детальном анализе пространственно-временной динамики отдельных типов глиальных клеток при развитии хронического болевого процесса и использовании традиционных и новых методов лекарственной терапии болевого синдрома.

Цель настоящего исследования: выявить особенности нейро-глиальных взаимодействий в динамике развития нейропатического болевого синдрома и при лекарственном обезболивании.

Задачи исследования:

1. У экспериментальных животных с моделью периферической нейротравмы провести визуальное и инструментальное тестирование выраженности болевого синдрома.

2. С помощью иммуногистохимических и морфологических методов изучить изменение активности астроцитов и микроглиоцитов в спинномозговых ганглиях и спинном мозге при развитии периферической нейропатии.

3. Охарактеризовать выраженность нейродегенеративного процесса в нейронных популяциях спинального уровня при экспериментальной нейропатической боли.

4. Выявить динамику активности нейротрансмиттерных систем спинного и продолговатого мозга при развитии нейропатического болевого синдрома.

5. Провести сравнительную оценку анальгетического и антинейропатического действия докозагексаеновой кислоты и препарата сравнения из группы нестероидных противовоспалительных средств.

6. Выявить нейротропные и глиотропные механизмы реализации антиболевого эффекта докозагексаеновой кислоты при развитии нейропатической боли.

Научная новизна работы. В настоящей работе впервые проведено комплексное динамическое исследование активности глиальных элементов и нейротрансмиттерных систем спинного и головного мозга при развитии нейрогенного болевого синдрома, вызванного лигатурой периферического нерва. Впервые установлено согласованное с выраженностью болевого синдрома изменение активности нейрональной NO-синтазы и OX-42-позитивной микроглии спинальных ганглиев и поверхностных пластин заднего рога спинного мозга. Зарегистрирована динамически согласованная активация GFAP-позитивной астроглии и увеличение активности SP-ергической трансмиссии в задних рогах спинного мозга в поздний период развития болевого синдрома. Установлено, что активация микроглии в спинальных ганглиях и передних рогах спинного мозга экспериментальных животных

сопровождается развитием дегенеративного процесса в мотонейронах спинного мозга и экспрессией проапоптотического белка p53 в нейронах спинальных ганглиев.

В настоящем исследовании впервые показано наличие дозо-зависимого антиболевого эффекта у докозагексаеновой кислоты при ее парентеральном введении животным с моделью нейропатического болевого синдрома. Впервые обнаружено, что антиболевым эффектом ДГК реализуется за счет угнетения астроцитоза в поверхностных пластинках задних рогов спинного мозга, снижения активности микроглии в спинномозговых ганглиях и передних рогах спинного мозга, обеспечения сохранности миелиновой оболочки поврежденного периферического нерва и угнетения активности основных нейротрансмиттерных систем боли – нитроксидергической и SP-ергической.

Теоретическая и практическая значимость работы. Данное исследование расширяет представление о фундаментальных клеточных механизмах развития хронического болевого синдрома. Выявленные в работе топографические и динамические особенности реакции макро- и микроглиоцитов мозга при периферической нейротравме обосновывают роль глиальных клеток в развитии структурных и пластических перестроек мозга при болевой патологии, что формирует вектор для направленного поиска новых биологически активных препаратов с антиболевым эффектом. Выявление особенностей и клеточных механизмов реализации анальгетического действия докозагексаеновой кислоты обеспечивает теоретическое обоснование использования данного препарата в лекарственной терапии хронического нейропатического болевого синдрома.

Апробация работы и публикации. Результаты работы были представлены на Международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине» (Санкт-Петербург, 2010); Всероссийской молодежной школо-конференции «По актуальным проблемам химии и биологии» (Владивосток, 2010); Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2012); Дальневосточном медицинском конгрессе «Человек и лекарство» (Владивосток, 2012); Международной научно-практической конференции «Возможности современной науки – 2013» (Прага, 2013).

По теме диссертации опубликовано 11 работ, включая 3 статьи в журналах, входящих в список, рекомендованный ВАК «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации на соискание ученой степени доктора и кандидата наук».

Личный вклад соискателя заключается в планировании, подготовке и проведении экспериментов, статистической обработке и анализе полученных результатов. Автором в полном объеме выполнена экспериментальная часть исследования: моделирование нейропатического болевого синдрома, физиологическое тестирование поведенческих проявлений нейрогенной боли,

постановка и реализация гистологических и иммуногистохимических методов исследования.

Финансовая поддержка работы. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (14.132.21.1344); грантов ДВО РАН (12-III-B-06-104; 12-III-A-06-090; 12-I-П7-02; 13-III-B-06-020; 13-III-B-06-035) и РФФИ (13-04-01664).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 115 страницах, иллюстрирована 36 рисунками и 17 таблицами. Список литературы содержит 209 наименований, из них 194 на английском языке.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика экспериментального материала. Исследование выполнено на самцах крыс средним весом 250 г., содержащихся в стандартных условиях вивария. Для моделирования нейропатического болевого синдрома под эфирным наркозом проводили наложение 3 лигатур на седалищный нерв правой задней лапы (Bennett, 1993). Животные были разделены на пять групп (по 7 животных в каждой): группа «контроль» – интактные животные, группа «боль» – животные с моделью нейропатической боли, группа «ДГК 45» – животные с травмой, получающие ДГК в дозе 45 мг/кг, группа «ДГК 4.5» – животные с травмой, получающие ДГК в дозе 4,5 мг/кг и группа «диклофенак» – животные с травмой, получающие 4 мг/кг диклофенака (Indus Pharma, Индия) в качестве препарата сравнения. Очищенный препарат докозагексаеновой кислоты, полученный по оригинальной методике, был предоставлен для исследования сотрудниками лаборатории фармакологии ИБМ ДВО РАН. Все препараты вводили подкожно в течение 2 недель после операции в объеме 150 мкл (1 раз в сутки, ежедневно).

Физиологические методы исследования. Мониторинг выраженности болевого синдрома осуществляли с использованием специализированного оборудования. Распределение нагрузки на задние конечности исследовали с помощью тестера инвалидности (Incapacitance tester, Columbus Instruments, США). Данный тест позволяет оценить выраженность болевого синдрома в поврежденной лапе по характеру распределения веса на задние конечности при неподвижном положении животного в камере наблюдения (Nakazato-Imasato, Kurebayashi, 2009). Данные о распределении веса на правую и левую конечности (в граммах) выражали в процентах от общего веса животного. У интактных животных вес тела распределен симметрично (50:50%), а развитие болевого синдрома сопровождается уменьшением нагрузки на поврежденную конечность.

Тест холодной пластины (Cold/Hot Plate Analgesia Meter, Columbus Instruments, США) использовали в настоящем исследовании для оценки холодовой аллодинии, неизменно сопровождающей развитие нейрогенного болевого синдрома (Bennett, 1993). Тест проводили в камере с акриловыми

стенами высотой 30 см на охлажденной до 0°C металлической пластине размером 30*30 см. Интактные животные в течение длительного времени способны выдерживать данную температуру, опираясь всеми конечностями на охлажденный пол. При развитии нейропатии время контакта конечности с холодной пластиной значительно сокращается. Для количественной оценки данного параметра регистрировалось время удержания конечности на весу в течение 1 мин пребывания животного в тест-камере. Все функциональные тесты проводились ежедневно после операции; каждое животное тестировалось трижды с интервалом в 5 мин между измерениями. Полученные данные обрабатывали с использованием пакета программ «Statistica 6.0». Достоверность различий (при $p < 0.05$) оценивали по *t* критерию Стьюдента.

Иммуногистохимические методы исследования. Данные, полученные при инструментальном тестировании болевого поведения, позволили выделить два периода развития нейропатического болевого синдрома – фазу инициации (1 неделя) и период поддержания (4 неделя) болевого процесса. Изъятие материала для последующего гистологического исследования осуществляли именно в этих временных точках. Для этого животных анестезировали путем внутривентрального введения тиопентала натрия (3%, 60 мг/кг), затем перфузировали 4% раствором параформальдегида приготовленном на 0,1М фосфатном буфере (рН 7,2). Для оценки медиаторного профиля нейронов и активности глиальных клеток спинномозговых ганглиев (L4-L6), спинного и продолговатого мозга, а также дистального фрагмента поврежденного седалищного нерва (на криостатных и парафиновых срезах толщиной 50 и 10 мкм, соответственно) мы использовали метод иммунопероксидазной реакции выявления ряда нейрональных и глиальных маркеров. Используемый в работе иммуногистохимический метод состоит из следующих этапов: фиксация кусочков ткани (4% параформальдегид, приготовленный на 0,1М фосфатном буфере, рН 7,2) в течение 12 ч и их последующая промывка; прединкубация в растворах, блокирующих эндогенную пероксидазную активность и неспецифическое связывание антител; обработка срезов в растворе первичных антител (4°C, 24 ч); обработка вторичными антителами и постановка иммунопероксидазной реакции. Данные об использованных первичных антителах приведены в таблице 1.

Вторичные антитела, меченные пероксидазой хрена (PI-1000 (anti-rabbit); PI-2000 (anti-mouse), США, 1:100), были получены от фирмы Vector Laboratories и использовались в соответствии с инструкциями фирмы-производителя. Для проведения иммунопероксидазной реакции использовали хромогены (Thermo scientific, AEC Substrate System, TA-060-SA; DAB Plus, TL-060-QND, США). Затем срезы тщательно отмывали 0,1М фосфатным буфером (рН 7,2), обезвоживали и заключали в бальзам по стандартной методике.

Таблица 1 – Характеристика первичных антител

Антитела	Характеристика маркера	Производитель	Разведение
GFAP	маркер астроцитов	Vector Labs G 805, США	1:100
OX-42	маркер микроглиоцитов	Santa Cruz sc-53086, США	1:50
TH	маркер тирозингидроксилазы	Vector Labs T 489, США	1:30
nNOS	маркер NO-синтазы	Abcam ab40662, США	1:2000
SP	маркер субстанции P	Abcam ab14184, США	1:2000
MBP	маркер основного белка миелина	Thermo Sci. RB-1460-A, США	1:200
P53	маркер белка P53	Thermo Sci. MS-182-P, США	1:50
AGMAT	маркер агматиназы	Sigma SAB1102156, США	1:500
NK1	маркер нейрокининовых рецепторов	Chemicon AB 5060, США	1:500

Для исследования солокализации некоторых маркеров использовали метод иммунофлуоресцентной реакции выявления TH, NK1 и окрашивания ядер DAPI на одном срезе. Полученные препараты просматривали в конфокальном микроскопе LSM 510 META (Carl Zeiss, Германия).

Гистологические методы исследования. Для общеморфологического анализа тканей и подсчета нейро-глиального индекса парафиновые срезы спинальных ганглиев толщиной 10 мкм депарафинировали и окрашивали толуидиновым синим (BioOptica, 05-B2300, Италия) по стандартной методике. Препараты просматривали в световом микроскопе AxioScope A1 (Carl Zeiss, Германия) и фотографировали при помощи цифрового фотоаппарата AxioCam ICc3 (Carl Zeiss, Германия).

Количественная обработка данных. Подсчет числа нейронов спинномозговых ганглиев, спинного и продолговатого мозга производили в каждом восьмом серийном срезе. Учитывали абсолютное количество иммунопозитивных клеток и высчитывали их долю от площади ядра. Определение удельной плотности распределения нейронов производили с использованием пакета программ ImageJ 1.41. Для определения нейро-глиального индекса в каждом десятом срезе спинномозговых ганглиев подсчитывали количество клеток-сателлитов вокруг больших (>50 мкм), средних (30–50 мкм) и малых (10–30 мкм) нейронов с видимым ядрышком.

Оценку площади иммуногистохимического окрашивания основного белка миелина в нервном стволе, глиальных элементов и иммунопозитивных волокон на срезах спинальных ганглиев, спинного и продолговатого мозга крысы проводили с использованием пакета программ Scion Image 4.0.3. После фотографирования все фотографии сохранялись в формате TIF и имели размер 1080x800 пикселей. Обработка каждой микрофотографии включала в себя следующие этапы: преобразование изображения в черно-белое; вычитание фона; усиление контрастности; бинаризация; уменьшение шума; измерение. В первичную обработку входит калибровка изображения (перевод пикселей в квадратные микрометры), а также первые три этапа, перечисленные выше.

Дальнейшая обработка производится не на всей площади фотографии, а на выделенном участке – области интереса. Областью интереса в нашем случае являлись поверхностные пластины задних рогов спинного мозга; ростральное вентро-медиальное ядро продолговатого мозга; вся площадь спинальных ганглиев и дистального фрагмента седалищного нерва. Для уменьшения фонового шума применяются стандартные морфологические фильтры Erode и Dilate. Далее следует блок измерений, в котором подсчитывается площадь объектов, попавших в область интереса. Полученные данные обрабатывали с использованием пакета программ «Statistica 6.0». Достоверность различий (при $p < 0.05$) оценивали по t критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе дана характеристика нейрональных и глиальных событий, которые возникают в нервной системе крыс при моделировании нейропатической боли, вызванной перевязкой седалищного нерва. Данная экспериментальная ситуация, как показано в настоящем исследовании, сопровождается развитием нейропатического болевого синдрома, активность которого может быть количественно охарактеризована с помощью инструментальных тестов. Дефицит в распределении веса на поврежденную конечность является типичным признаком экспериментального нейропатического болевого синдрома (Nakazato-Imasato, Kurebayashi, 2009) и может быть связан как с нарушением функционирования афферентов седалищного нерва, так и с деструкцией мотонейронов при повреждении их аксонов. Данный показатель в разные послеоперационные сроки имел достоверные отличия у животных всех экспериментальных групп (рис. 1А). Животные в группе «боль» с 4 по 7 сут после повреждения нерва $71,6 \pm 0,7\%$ веса удерживают интактной конечностью. В этот же период животные группы «ДГК 45» распределяют вес практически симметрично ($55,4 \pm 2\% : 44,6 \pm 2\%$), в группе «ДГК 4.5» этот показатель соответствует $66,9 \pm 1\% : 33,1 \pm 1\%$, а в группе «диклофенак» – $70,1 \pm 2\% : 29,9 \pm 2\%$ с предпочтительным использованием неповрежденной лапы. В дальнейшем у животных всех групп формируется тенденция к снижению доминирования упора на здоровую конечность. К концу наблюдения распределение веса у животных группы «боль» составляет $63 \pm 1\% : 37 \pm 1\%$, животные группы «ДГК 45» полностью восстанавливают баланс распределения веса, тогда как этот показатель в группе «ДГК 4.5» и «диклофенак» составляет $64,1 \pm 1\% : 35,9 \pm 1\%$ и $60 \pm 1\% : 40 \pm 1\%$ соответственно.

Развитие холодовой аллодинии характеризует наличие и степень выраженности нейрогенного болевого синдрома и основывается на феномене снижения порога возбуждения рецепторов на воздействие неболевых термических стимулов (Bennett, 1993). Результаты проведенного теста у животных группы «боль» демонстрируют появление данного синдрома уже на 4–7 сут после операции ($10,5 \pm 1,9$ с), его резкое нарастание к 8–15 сут (около 24 с); далее формируется тенденция к снижению данного показателя. У животных

группы «ДГК 45» начальные признаки развития холодовой аллодинии регистрируются позже – на 8–11 сут, имеют меньшую выраженность ($9 \pm 1,3$ с) и сохраняются на данном уровне вплоть до конца наблюдения, тогда как у животных группы «ДГК 4.5» аллодиния практически отсутствует. В группе «диклофенак» признаки аллодинии возникают уже на 4–7 сут и нарастают к 8–11 сут, к концу наблюдения холодовая аллодиния не наблюдалась (рис. 1Б).

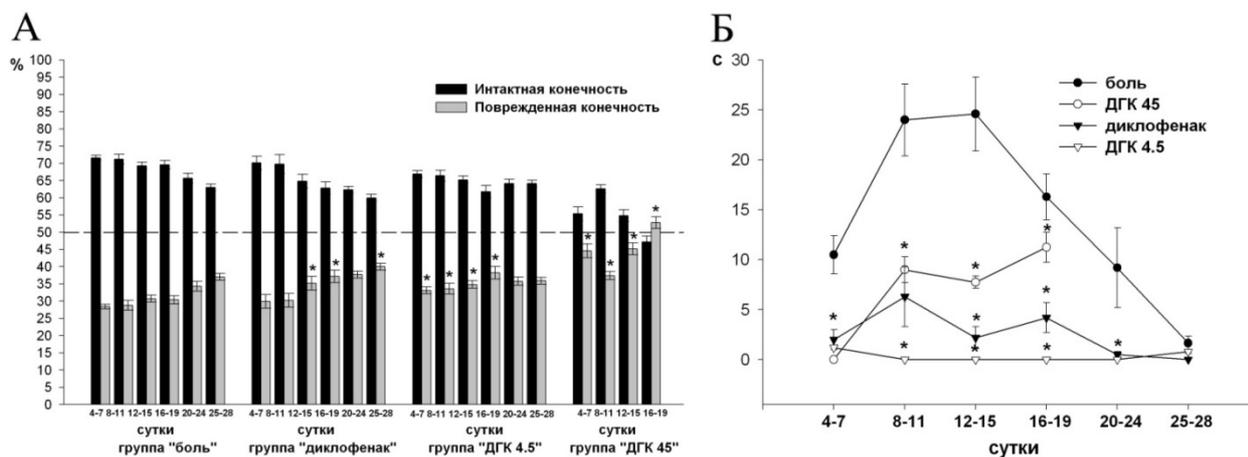


Рисунок 1 – Динамика распределения веса на задние конечности (пунктир – контроль) (А) и выраженность холодовой аллодинии (время отсутствия контакта поврежденной конечности с холодной пластиной) (Б) у животных с моделью нейропатической боли при использовании ДГК и диклофенака. *Достоверные различия с группой «боль» в сходных точках наблюдения (при $p \leq 0.05$).

У 60% крыс из группы «боль» за период наблюдения были выявлены признаки обширных трофических повреждений стопы и явление аутономии одного или нескольких пальцев частично денервированной конечности. У животных терапевтических групп описанных патологических изменений не наблюдалось.

Описанная динамика поведенческих признаков согласуется с данными литературы (Casals-Díaz et al., 2009); при этом отсутствие указанных признаков болевого синдрома спустя 4–6 недель после травмы нерва вовсе не означает угасание болевого синдрома, поскольку другие патологические проявления чувствительности (тактильная аллодиния, тепловая гипералгезия и др.) могут оставаться и даже прогрессировать спустя 8–10 недель (Malmberg, Basbaum, 1998).

В работе показано, что системное введение докозагексаеновой кислоты животным с повреждением периферического нерва дозо-зависимо (и в большей степени, чем препарат сравнения диклофенак) снижает активность и сроки реализации нейрогенного болевого синдрома, приводит к более ранней стабилизации распределения веса и препятствует развитию дистрофических изменений в тканях денервированной конечности. Использование препарата в разных дозах селективно улучшает показатели в отдельных поведенческих

тестах – ДГК в дозе 4,5 мг/кг полностью устраняет развитие холодовой аллодинии, в то время как большая доза (45 мг/кг) оказывается более эффективной в тесте распределения массы тела на задние конечности.

Изменение активности глиальных систем при развитии нейропатической боли и ее фармакологической коррекции

В данной модельной ситуации изучалась динамика активности некоторых нейрональных и глиальных маркеров для оценки морфологических, химических и сигнальных изменений, которые сопутствуют развитию болевого синдрома и реализации выявленных эффектов препарата ДГК. Иммуногистохимическая диагностика маркеров глиальной и нейрональной активности проводилась в нервных структурах, причастных к функционированию разных уровней системы болевого контроля. Периферическое, первично-чувствительное звено болевого анализатора представлено спинномозговыми ганглиями, получающими сенсорные проекции от поврежденного нервного ствола. Вторичное звено интегративной системы модуляции боли представлено соответствующими сегментами спинного мозга, где функционируют механизмы «воротного» болевого контроля (поверхностные пластины задних рогов) и формируются рефлекторные и системные моторные реакции на сенсорную стимуляцию (мотонейроны передних рогов). Третьим стратегически важным центром, причастным к работе системы модуляции боли, являются отделы ретикулярной формации продолговатого мозга (ростральное вентро-медиальное ядро), которое за счет нисходящих проекций влияет на функционирование спинальных «болевого ворот» и входит в состав динамической системы антиноцицепции-антианаглезии.

Важными событиями, сопровождающими развитие болевого синдрома, является изменение активности глиальных клеток (астроцитов и микроглиоцитов), наблюдаемое нами во всех исследованных регионах мозга на всем протяжении эксперимента.

В предыдущих исследованиях показана важная роль астроцитов в регуляции метаболизма и синаптических свойств глутамата (Hashimoto, 2011). Для функционирования нервных связей, участвующих в проведении болевого импульса, данный механизм весьма актуален, поскольку глутамат является важнейшим нейротрансмиттером ноцицептивных проекций. Используемый в нашей работе маркер астроцитов – глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) признается большинством исследователей адекватным и информативным признаком астроглиоза. В настоящем исследовании травма периферического нерва сопровождается динамическим изменением морфологии (рис. 2А,Б, вклейка) и числа астроцитов – в задних рогах спинного мозга увеличение экспрессии GFAP наблюдается к концу 4-й недели (в 1,3 раза по сравнению с интактными животными) (рис. 2Б). При использовании докозагексаеновой кислоты во все сроки наблюдения площадь окрашивания

GFAP-позитивных астроцитов в поверхностных пластинках спинного мозга не отличается от контрольной группы (рис. 2А).

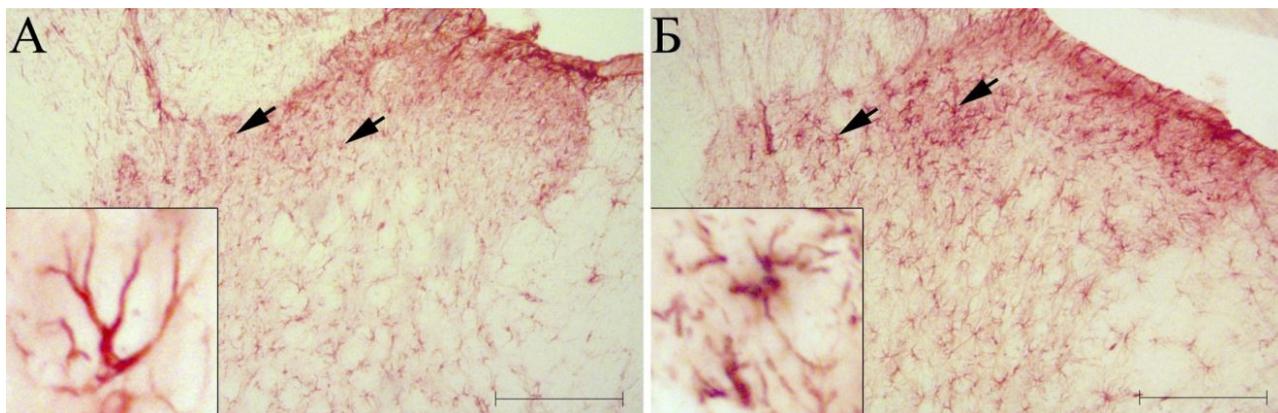


Рисунок 2 – Распределение GFAP-позитивных астроцитов (указаны стрелками) в задних рогах спинного мозга в норме (А) и при развитии нейрогенного болевого синдрома (Б). Масштабный отрезок 100 – мкм.

Такая отсроченная реакция астроцитарной глии может быть обусловлена воздействием специфических нейрональных и микроглиальных факторов, инициирующих астроглиоз – развитием трофических изменений в денервированных нейронах спинальных ганглиев и повышением чувствительности соответствующих рецепторов на астроцитах. В выявленной нами динамике астроцитарной активности отчетливо прослеживается связь данной популяции клеток с механизмами поддержания (но не инициации) центральных нейропластических феноменов, характерных для нейропатической боли.

Изменение активности микроглии, показанное в нашем исследовании, а также сопутствующие этому морфологические изменения сенсорных и моторных нейронов, напрямую свидетельствуют о причастности данных клеток к развитию патологических изменений при болевом синдроме. При этом динамика микроглиальной реакции в разных отделах ноцицептивной системы имеет специфический рисунок, что позволяет предполагать наличие селективных механизмов локальной регуляции данных клеток и их особую роль в реализации периферических и центральных механизмов боли. В нейронах спинномозговых ганглиев у животных группы «боль» активность микроглиальных клеток на всем протяжении эксперимента в 3–3,5 раза превышает уровень интактного контроля. Обращает на себя внимание не только изменение общего числа микроглиоцитов, но и их особое распределение (в виде плотных корзинок) вокруг чувствительных нейронов, многие из которых демонстрируют морфологические признаки необратимых изменений (рис. 3). В группе «ДГК 4.5» активация микроглии также наблюдается, хотя и имеет не столь выраженный характер. Нейроны, окруженные глиальными скоплениями, в большинстве случаев имеют сохранную морфологию – ровные границы клеточных тел, округлые ядра. В данной группе к концу 1-й недели

после операции площадь окрашивания микроглиоцитов спинальных ганглиев увеличивается в 1,8 раза, а к концу наблюдения их площадь достоверно не отличается от интактного уровня.

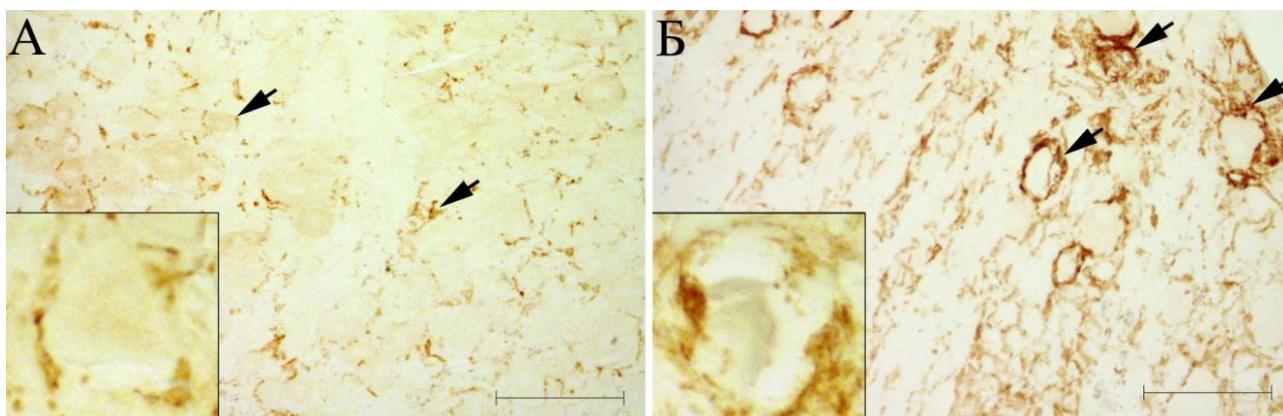


Рисунок 3 – Распределение ОХ-42-позитивной микроглии (указана стрелками) в спинномозговых ганглиях в норме (А) и при развитии нейрогенного болевого синдрома (Б). Масштабный отрезок 100 – мкм.

Не исключено, что именно микроглиоциты формируют при нейропатической боли значительную порцию сателлитной оболочки псевдоуниполярных, приводя, в конечном итоге к активации апоптоза в них. Как показано в нашей работе, количество клеток-сателлитов нейронов больших, средних и малых размеров возрастает соответственно в 1,4; 1,35 и 1,4 раза к концу 1-й недели. Это сопровождается выраженной экспрессией проапоптотического белка p53 в нейронах спинальных ганглиев, превышая уровень интактного контроля в 1,5 раза через 1 неделю и в 5 раз к концу 4-й недели. При этом все размерные популяции нервных клеток практически в равной степени вовлечены в данный патологический процесс. Применение препарата докозагексаеновой кислоты оказывает противоапоптотическое действие: к концу 1-й недели в группе «ДГК 4.5» не наблюдалось достоверного отличия количества p53-позитивных нейронов от интактного уровня, увеличение числа нейронов, вступивших на путь апоптоза (в 3 раза по сравнению с интактными животными) наблюдается лишь к концу 4-й недели.

В спинном мозге крыс всех экспериментальных групп регистрируется увеличение площади окрашивания ОХ-42-позитивных микроглиоцитов, наиболее выраженное на стороне повреждения; на контралатеральной стороне активация микроглии также выражена, хотя и менее отчетливо (рис. 4).

В поверхностных пластинках спинного мозга после перевязки седалищного нерва у животных группы «боль» наблюдается увеличение площади окрашивания ОХ-42-позитивной микроглии в 2,1 раза по сравнению с интактными животными через 1 неделю после операции, к концу 4-й недели формируется заметная тенденция к уменьшению активности, хотя и превышает уровень интактного контроля в 1,3 раза, что динамически соответствует уровню болевой реакции по тестируемым параметрам. Такое «поведение» микроглии

позволяет предполагать ее причастность к инициации (но не к поддержанию) основных нейропластических событий в задних рогах спинного мозга, сопровождающих болевой синдром. В группе «ДГК 4.5» активация микроглии имеет более выраженный характер в сравнении с группой «боль». В данной группе к концу 1-й и 4-й недели после операции площадь окрашивания ОХ-42-позитивной микроглии в поверхностных пластинах спинного мозга увеличивается в 2,3 и 1,9 раза, соответственно, по сравнению с контрольной группой.

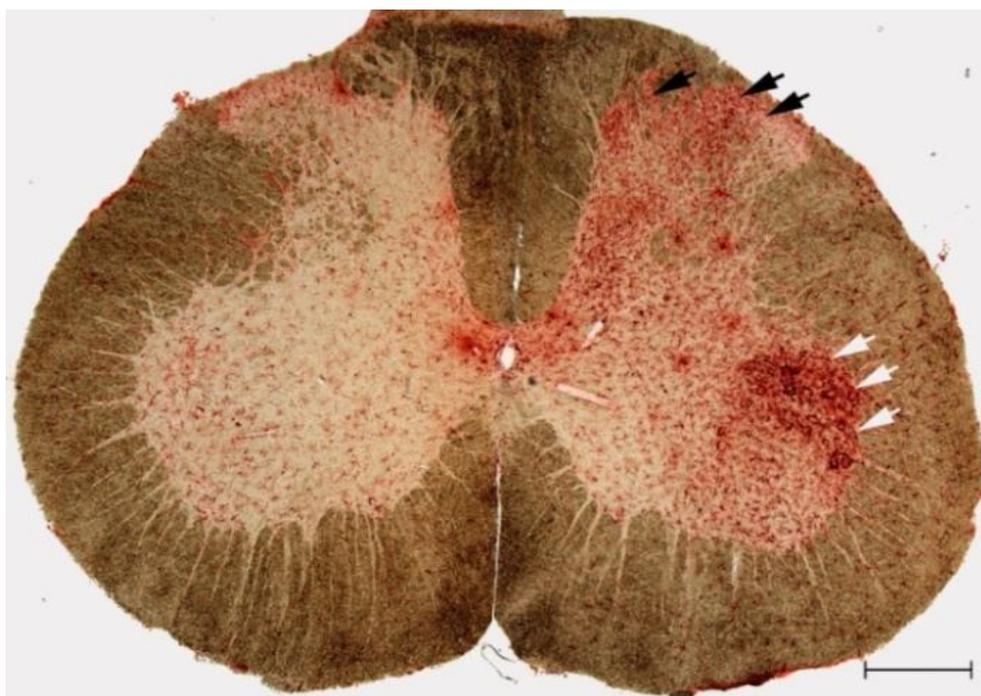


Рисунок 4 – Распределение ОХ-42-позитивной микроглии в задних (указана черными стрелками) и передних (указана белыми стрелками) рогах спинного мозга при развитии нейропатической боли. Масштабный отрезок – 200 мкм.

Морфометрические изменения сопровождаются видимыми изменениями в морфологии микроглиоцитов. В норме микроглиоциты имеют небольшие клеточные тела с узким ободком цитоплазмы и несколькими тонкими, длинными, маловетвистыми отростками (рис. 5А). Через 1 неделю после операции у животных всех групп отчетливо выражены признаки активации клеток (набухание тел, утолщение и ретракция отростков). Этот тип микроглии способен к активной миграции и секреции про- и противовоспалительных цитокинов и организует основные иммунологические перестройки в нервной ткани (рис. 5Б). В группе «боль» микроглиоциты к концу 4-й недели вновь приобретают морфологические признаки «покоящихся» (рис. 5А). В группе «ДГК 4.5», напротив, активированные микроглиоциты превращаются в так называемые реактивные глиальные клетки, их сома и отростки резко утолщены, имеются многочисленные варикозные расширения (рис. 5В). Считается, что

данный тип микроглии выполняет, помимо секреторной, еще и фагоцитарную функцию, освобождая нейрональное пространство от поврежденных элементов и способствуя восстановлению ткани.

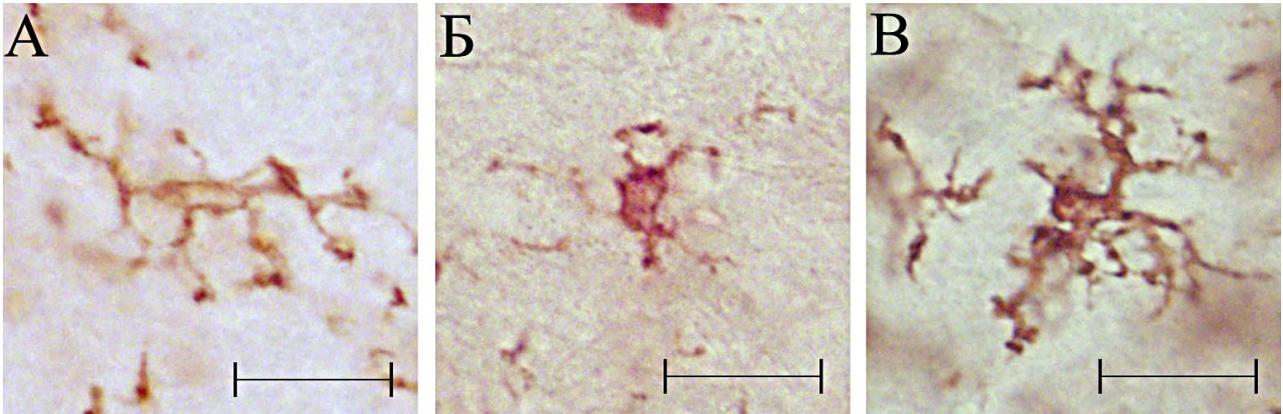


Рисунок 5 – Морфологические типы микроглиоцитов центральной нервной системы: I тип – покоящаяся микроглия (А); II тип – активированная микроглия (Б); III тип – реактивная микроглия (В). Масштабный отрезок – 50 мкм.

Важные изменения микроглиальной активности зарегистрированы нами в передних рогах спинного мозга в области расположения вентро-латерального моторного ядра. Здесь микроглиоциты собираются в крупные конгломераты, формирующие вокруг мотонейронов своеобразные корзинки (рис. 6).

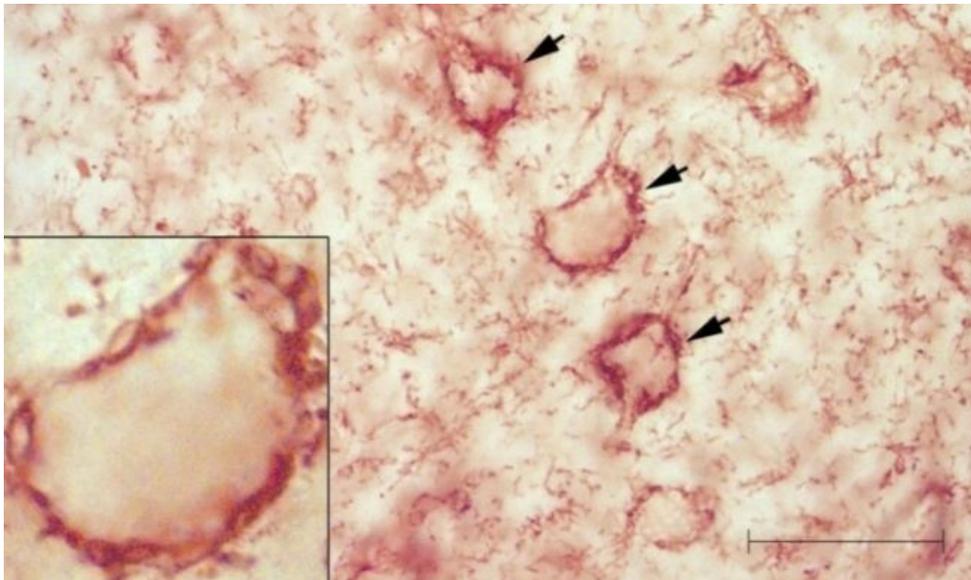


Рисунок 6 – Мотонейроны, окруженные ОХ-42-позитивной микроглией (указаны стрелками), в передних рогах спинного мозга при развитии нейропатической боли. Масштабный отрезок – 100 мкм.

Количество нервных клеток, окруженных глиальными муфтами остается неизменным на всем протяжении эксперимента, хотя общее число мотонейронов в данном ядре у крыс группы «боль» снижается на 13% относительно интактного контроля. Поэтому можно считать, что микроглиоциты в вентральных зонах спинного мозга вовлечены в процесс нейрофагии мотонейронов, потерявших связь с периферическими мишенями при повреждении нервного ствола. Применение ДГК существенно влияет на данный процесс и приводит к снижению количества очагов скопления микроглиоцитов вокруг мотонейронов и сохранности общего числа нейронов на уровне интактного контроля.

Основной белок миелина (МВР) является одним из важнейших структурных компонентов оболочки нервных волокон; от его сохранности зависит нормальное проведение нервного импульса по волокну, а также полнота и скорость регенераторных процессов при повреждении осевого цилиндра. Он также является одним из наиболее распространенных маркеров нейродегенеративных процессов и, основываясь на данных о его количественном содержании, возможно, прогнозировать успешность восстановления нервных волокон после травмы (Чехонин и др., 2000).

В отличие от интактных животных, в нервах которых МВР-позитивная миелиновая оболочка формирует четкий замкнутый контур вокруг осевых цилиндров, у животных с перевязкой седалищного нерва уже к концу 1-й недели наблюдаются признаки фрагментации и деградации миелина, за счет чего площадь окрашивания МВР уменьшается на 20%. К концу 4-й недели основное количество МВР-позитивных структур представлено в виде мягкотных шаров – глыбчатых скоплений конгломератов фрагментов миелина, беспорядочно расположенных в нервной ткани. В группах «боль» и «диклофенак» наблюдается практически полная деградация основного белка миелина, в то время, как использование препарата ДГК оставляет сохранными около 50% миелиновой оболочки аксонов.

Проведенные иммуногистохимические исследования позволяют обосновать некоторые глиотропные механизмы действия ДГК у животных с моделью нейропатической боли, реализуемые в нервной ткани спинного и головного мозга, а также в периферической нервной системе – спинномозговых ганглиях и поврежденном нервном стволе.

Во-первых, использование ДГК способствует стабилизации экспрессии глиального фибриллярного кислого белка (показателя астроцитарной реакции) на уровне интактного контроля. Возможным механизмом антиболевого действия ДГК в данном случае является направленное действие на ингибирование высвобождения астроцитами нейротрофических факторов и медиаторов воспаления (интерлейкины IL1, IL6 и фактор некроза опухоли), усиливающих возбудимость нервной ткани и способствующих развитию патологических болевых феноменов (Guo et al., 2007). Нельзя исключать также значение ДГК в секреции астроглией противовоспалительных цитокинов (IL10 и

П4), уменьшающих выраженность воспалительного процесса в месте повреждения нервного ствола (Milligan, Watkins, 2009).

Во-вторых, развитие антиболевого эффекта препарата протекает на фоне значительного уменьшения потери миелиновой оболочки в волокнах поврежденного периферического нерва. Позитивное влияние ДГК в поврежденном участке нерва можно напрямую связать с его прямым противовоспалительным, антиоксидантным и мембрано-стабилизирующим действием (Bazan, 2007; Cunnane et al., 2009).

В-третьих, ДГК значительно уменьшает активацию микроглиоцитов, сателлитную реакцию и выраженность апоптоза в спинальных ганглиях, получающих волокна от поврежденного нерва. Этот эффект может быть реализован за счет восходящей регуляции антиапоптотических белков Bcl-2 и Bcl-xL, а также ингибирования экспрессии проапоптотических белков Bax и Bad. Кроме того, нейропротектин D1 (основной метаболит ДГК в нервной ткани) осуществляет ингибирование активации каспазы 3, образовавшейся в результате окислительного стресса (Mukherjee et al., 2004).

В-четвертых, развитие выраженного антиболевого действия ДГК происходит с участием микроглиальных систем поверхностных пластин заднего рога спинного мозга. В данной области глиотропное действие препарата максимально выражено на поздних сроках наблюдения, когда происходит не только значительное нарастание общей площади ОХ-42-позитивной зоны, но и видимые изменения в морфологии глиоцитов.

Изменение нейротрансмиттерных систем спинного и головного мозга как фактор развития нейропатической боли и компонент антиболевого действия докозагексаеновой кислоты

Среди исследованных нами нейро- и глиомаркеров наиболее отчетливую характеристику ноцицептивных процессов, происходящих на спинальном и супраспинальном уровнях, демонстрирует нейрональная NO-синтаза. В нервных центрах, участвующих в передаче и модуляции болевого сигнала нитроксидергические нейроны занимают стратегически важные позиции – оксид азота (NO) синтезируют мелкие псевдоуниполярные-ноцицепторы, локальные и проекционные нейроны задних рогов спинного мозга, а также нервные клетки ядер головного мозга, обеспечивающие нисходящий антиболевой контроль. Развитие болевого процесса неизменно сопровождается прогрессивной активацией синтеза NO в спинальных центрах боли и динамическими изменениями в супраспинальных ядрах. Известно, что высвобождение NO при активации нейрональной формы NO-синтазы (nNOS) и экспрессии индуцибельного фермента лежит в основе развития таких патологических болевых феноменов, как холодовая аллодиния и термическая гипералгезия (Onal et al., 2003).

В настоящем исследовании развитие нейропатического болевого синдрома приводит к динамической и согласованной с выраженностью

болевого поведения активации nNOS в нейронах первичных переключательных станций – спинномозговых ганглиев и дорсальных рогов спинного мозга.

Спинномозговые ганглии интактных животных содержат nNOS-позитивные нейроны мелкого и среднего размера. При повреждении периферического нерва наблюдается увеличение количества nNOS-позитивных нейронов к концу 1-й недели в 2,4 раза, а к концу 4-й недели в 1,7 раза по сравнению с интактными животными. В сходных точках наблюдения в группе «ДГК 4.5» не наблюдается достоверного отличия количества nNOS-позитивных нейронов от интактного контроля.

В задних рогах спинного мозга повреждение седалищного нерва сопровождается увеличением количества nNOS-позитивных интернейронов в 1,5 раза по сравнению с интактными животными, в обеих экспериментальных точках. Применение препарата докозагексаеновой кислоты не оказывает существенного влияния на данный процесс, к концу 1-й недели количество nNOS-позитивных нейронов увеличивается в 1,5 раза, однако к концу 4-й недели количество нейронов экспрессирующих NO-синтазу возвращается к уровню интактного контроля.

Известно, что периферические афферентные волокна, передающие ноцицептивную информацию в задние рога спинного мозга, являются в основном, глутамат-ергическими нервными проводниками, котрансммитерами в которых выступают разнообразные нейропептиды и нейрокинины (субстанция P, SP) (Wu et al., 2005). Терминали, содержащие SP, локализуются, преимущественно в желатинозной субстанции задних рогов спинного мозга на нейронах, организующих «воротный» механизм болевого контроля. В нашем исследовании показано, что активность нейрокининовой системы в задних рогах спинного мозга при развитии нейропатического болевого синдрома имеет неравномерную динамику. В группе «боль» к концу 1-й недели после операции в волокнах задних рогов спинного мозга наблюдается незначительное уменьшение (в 1,1 раза) экспрессии SP, однако к концу 4-й недели этот показатель увеличивается в 1,2 раза по сравнению с интактными животными. В сходных точках наблюдения у животных группы «ДГК 4.5» в поверхностных пластинках спинного мозга площадь окрашивания SP сохраняется на уровне интактного контроля.

В выявленной нами динамике активности нейрокининовой системы (динамически согласованной с астроцитарной реакцией) отчетливо прослеживается связь данных сигнальных систем с механизмами поддержания (но не инициации) центральных нейропластических феноменов, характерных для нейропатической боли. Субстанция P как важный нейрокининовый медиатор сенсорных проекций напрямую связана с развитием центральной сенситизации и развитием нейропластических «триггеров», характерных для нейропатического болевого синдрома. В нашей работе не удалось зафиксировать прямую связь астроцитарной и нейрокининовой активности в задних рогах спинного мозга с выраженностью болевого поведения экспериментальных животных (по тестам на холодовую аллодинию и тесту

инвалидности). Отсроченная активация обоих маркеров может быть причастна к развитию другого патологического симптома (тактильной аллодинии), тестирование которого нуждается в наличии соответствующего оборудования. Однако другими исследователями было показано, что фармакологическая регуляция активности астроцитарной глии, а также угнетение SP-ергической нейротрансмиссии способно обеспечивать антиболевой эффект именно в отношении тактильных болевых расстройств (Karadag et al., 2003).

Отдельное внимание в нашем исследовании уделяется изменению активности нейрональных систем в ретикулярном ядре продолговатого мозга (ростральное вентро-медиальное ядро), которое в настоящее время активно исследуется в качестве важного модуляторного компонента болевой реакции. Известно, что нисходящие в спинной мозг проекции из данного отдела мозга обеспечивают динамический контроль пропускной способности «болевых ворот». В зависимости от длительности и интенсивности восходящей ноцицептивной трансмиссии одни и те же нейрохимические механизмы ядра могут быть причастны к эндогенной анальгезии и эндогенной антианальгезии (Urban, 1999; Millan, 2002). Популяция проекционных нейронов рострального вентро-медиального ядра (РВМЯ) нейрохимически разнородна. Среди них, как показано в нашей работе, встречаются моноаминергические ($17,5 \pm 1,5\%$), нитроксидергические ($16,9 \pm 0,5\%$), а также клетки, метаболизирующие новый нейротрансмиттерный амин – агматин. Все они характеризуются крупными размерами перикарионов, что позволяет отнести их к разряду проекционных. Проведение солокализационных методик позволило нам выяснить, что данные группы клеток являются отдельными нейрохимическими популяциями (Манжуло и др., 2013). Изменение их нейротрансмиттерной активности при инициации (1 неделя) и поддержании (4 неделя) болевого процесса демонстрирует фазную динамику. На 7-е сут (во время нарастания обоих тестируемых поведенческих признаков болевой активности) происходит снижение активности катехоламинергических нейронов в 1,25 раза, и увеличение активности nNOS- (в 1,3 раза) и агматиназа-позитивных (в 1,4 раза) клеточных популяций по сравнению с интактными животными. Через 4 недели после операции, когда полностью исчезает патологическая холодовая аллодиния, но сохраняется выраженная асимметрия в удержании веса и, очевидно, нарастает тактильная аллодиния (Karadag et al., 2003), нейротрансмиттерная активность ядра меняется. В этот период показатели катехоламинергической системы не отличаются от нормы, значительно снижается активность нитроксидергической нейрональной популяции (в 1,3 раза) и еще больше увеличивается активность агматиназа-позитивных нейронов (в 1,8 раза) по сравнению с интактными животными. Одним из нейрохимических механизмов, способствующих изменению активности ядра при боли, являются нейрокининовые сигналы, поскольку локализация NK1-рецепторов была выявлена нами на нейронах РВМЯ.

Без проведения дополнительных детальных исследований с локальным фармакологическим воздействием на зону данного ядра окончательные выводы

о его значении в болевом процессе делать рано. Вместе с тем в нашем предыдущем исследовании о нейротрансмиттерных модификациях РВМЯ при острой боли были получены данные, свидетельствующие о реципрокной динамике аминергических и нитроксидергических систем, протекающей на фоне выраженных изменений микро- и астроглиальной активности (Манжуло и др., 2013). В совокупности это позволяет предполагать, что:

1. NO-ергические и аминергические системы РВМЯ обладают взаимомодулирующим влиянием в разные периоды болевого процесса;
2. Сопряженные с болевым процессом изменения активности нейроглии в бульбарных центрах имеют транссинаптическую природу и могут принимать участие в модификации активности нейронов;
3. Нейропластические изменения в РВМЯ организованы при участии основного сенсорного нейромедиатора – субстанции P, рецепторы которой экспрессированы на телах моноаминергических нейронов.

Применение докозагексаеновой кислоты обеспечивает прямое и\или опосредованное нейротропное действие на активность трансмиссивных систем спинального или супраспинального уровня. На фоне применения препарата у животных с нейропатической болью в течение всего эксперимента не наблюдается активации NO в спинномозговых ганглиях, значительно сокращается активность нитроксидергической трасмиссии в задних рогах спинного мозга и стабилизируется динамика данной системы в ретикулярной формации продолговатого мозга. В ростральном вентро-медиальном ядре под влиянием ДГК значительно сокращается усиленный болевым процессом метаболизм агматина. Молекулярные механизмы данных нейрональных перестроек, происходящих на фоне использования препарата, нуждаются в проведении дополнительных исследований.

ВЫВОДЫ

1. Повреждение седалищного нерва у крыс сопровождается развитием холодовой аллодинии, спонтанного болевого поведения и формированием асимметрии в распределении веса; данные патологические болевые феномены возникают на 4 сут, регистрируются в течение 28 сут после операции и имеют тенденцию к постепенному уменьшению их выраженности.

2. Развитие нейропатической боли вызывает динамические изменения в нейротрансмиттерных и глиальных системах. Максимально согласованными с выраженностью болевого синдрома являются изменения активности нейрональной NO-синтазы и OX-42-позитивной микроглии спинальных ганглиев и поверхностных пластин заднего рога спинного мозга. Активация GFAP-позитивной астроглии и увеличение активности SP-ергической трансмиссии в задних рогах спинного мозга регистрируются в поздний период развития болевого синдрома.

3. Развитию нейрогенного болевого синдрома сопутствуют динамические изменения морфологии глиальных клеток. Активация астроцитов регистрируется в поздний период боли. Микроглия активируется в течение 1-й недели, а к концу 4-й недели приобретает морфологические признаки неактивной. Использование докозагексаеновой кислоты сопровождается формированием реактивного микроглиоза в задних рогах спинного мозга.

4. Активация микроглии сопровождается развитием дегенеративного процесса в мотонейронах спинного мозга и экспрессией проапоптотического белка p53 в нейронах спинальных ганглиев.

5. Системное введение докозагексаеновой кислоты животным с повреждением периферического нерва дозо-зависимо снижает интенсивность и сроки реализации нейрогенного болевого синдрома, приводит к более ранней стабилизации распределения веса и препятствует развитию дистрофических изменений в тканях денервированной конечности.

6. Антиболевой эффект докозагексаеновой кислоты реализуется за счет угнетения астроцитоза в поверхностных пластинах задних рогов спинного мозга, снижения активности микроглии в спинномозговых ганглиях и передних рогах спинного мозга и обеспечения сохранности миелиновой оболочки поврежденного периферического нерва.

7. Использование докозагексаеновой кислоты при периферической нейропатии препятствует нарастанию активности основных нейротрансмиттерных систем боли – нитроксидергической и SP-ергической.

8. Анальгетическое действие докозагексаеновой кислоты реализуется с участием нейронов супраспинальных центров эндогенной модуляции боли. В ростральном вентро-медиальном ядре препарат стабилизирует нитроксидергическую активность и снижает активацию агматиназы.

СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**Публикации в рецензируемых журналах из списка, рекомендованного ВАК:**

1. Манжуло И.В., Огурцова О.С., Дюйзен И.В., Ламаш Н.Е. Особенности реакции нейронов и глиальных клеток вентро-медиальной ретикулярной формации продолговатого мозга крысы на острую боль // *Нейрохимия*. 2013. Т. 30. С. 71–78.
2. Манжуло И.В., Дюйзен И.В., Огурцова О.С., Ламаш Н.Е., Латышев Н.А., Касьянов С.П., Тыртышная А.А. Дозо-зависимый антиболевой эффект докозагексаеновой кислоты при экспериментальной периферической нейропатии // *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2013. Т. 52. С. 31–33.
3. Дюйзен И.В., Манжуло И.В., Огурцова О.С., Ламаш Н.Е., Латышев Н.А., Касьянов С.П. Особенности реализации анальгетического эффекта докозагексаеновой кислоты у крыс с нейрогенным болевым синдромом // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2013. Т. 156. С. 647–649.

Публикации в материалах конференций:

1. Манжуло И.В. Морфо-химическая характеристика нейронов вентральных отделов ретикулярной формации продолговатого мозга крысы // *Материалы IX Региональной конференции студентов, аспирантов вузов и научных организаций Дальнего Востока России*. Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та, 2010. С. 132–135.
2. Манжуло И.В., Дюйзен И.В. Морфо-химическая характеристика нейронов вентральных отделов ретикулярной формации продолговатого мозга крысы в норме и при развитии болевой реакции // XII Всероссийская молодежная школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии. Владивосток: ДВО РАН, 2010. С. 41.
3. Манжуло И.В., Дюйзен И.В. Особенности реакции нейронов и глиальных клеток вентро-медиальной ретикулярной формации продолговатого мозга крысы на острую боль // *Сборник трудов Первой международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине»*. СПб.: Изд-во Политехнического университета, 2010. С. 168–169.
4. Манжуло И.В., Дюйзен И.В., Огурцова О.С. Антиболевая активность докозагексаеновой кислоты при моделировании нейропатического болевого синдрома у крыс // *Сборник трудов XIX Российского национального конгресса «Человек и лекарство»*. Москва, 2012. С. 372–373.
5. Манжуло И.В., Дюйзен И.В. Анальгетическое действие докозагексаеновой кислоты при формировании нейропатического болевого синдрома у крыс // XIV Всероссийская молодежная школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии. Владивосток: ДВО РАН, 2012. С. 32.
6. Манжуло И.В., Дюйзен И.В. Дозо-зависимые антинейропатические эффекты ДГК при повреждении периферического нерва у крыс // *Материалы IX*

Дальневосточного медицинского конгресса «Человек и лекарство». Владивосток: Изд-во Медицина ДВ, 2012. С. 55–56.

7. Мнацакян Л.А., Манжуло И.В., Балашова Т.В., Дюйзен И.В. Исследование роли агматина в модели острой боли у экспериментальных животных // Материалы IX Дальневосточного медицинского конгресса «Человек и лекарство». Владивосток: Изд-во Медицина ДВ, 2012. С. 133–134.

8. Манжуло И.В., Огурцова О.С., Дюйзен И.В. Аналгетический эффект докозагексаеновой кислоты у крыс с моделью нейрогенного болевого синдрома // Материалы IX Международной научно-практической конференции «Возможности современной науки – 2013». Прага, 2013. С. 23–28.

МАНЖУЛО
ИГОРЬ ВИКТОРОВИЧ

**НЕЙРО-ГЛИАЛЬНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В МЕХАНИЗМАХ
РАЗВИТИЯ БОЛИ И ЛЕКАРСТВЕННОГО ОБЕЗБОЛИВАНИЯ У КРЫС**

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Подписано в печать 18.11.2013 г.
Формат 60x84 1/16. Усл. п. л. 3,08.

Тираж 100 экз. Заказ 643

Отпечатано в Дирекции публикационной деятельности ДВФУ
690990, г. Владивосток, ул. Пушкинская, 10