

ФАРМАКОЛОГИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

DOI: 10.30906/0869-2092-2021-84-9-24-28

ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТОРМОЖЕНИЯ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В СПИННОМ МОЗГЕ КРЫС АНТИОКСИДАНТАМИ В СРЕДАХ, СОДЕРЖАЩИХ КАРБОКСИМЕТИЛЦЕЛЛЮЛОЗУ И ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИД

М. В. Стогов, Т. А. Силантьева, Е. А. Киреева¹

В экспериментах *in vitro* изучали изменения концентрации продуктов перекисного окисления липидов (малоновый диальдегид, диеновые конъюгаты) в ткани изолированного спинного мозга крыс до и после 20-часовой его инкубации в различных средах, содержащих комплекс антиоксидантов (АО) — альфа-токоферола и аскорбиновой кислоты, натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ), диметилсульфоксид (ДМСО). Концентрация продуктов перекисного окисления в изолированном спинном мозге крыс после инкубации снижалась, относительно исходных значений, в ряду сред следующих составов: [0,05 % АО] > [2 % Na-КМЦ] > [2 % Na-КМЦ + 1 % ДМСО + 0,05 % АО] > [2 % Na-КМЦ + 0,05 % АО] > [2 % NaКМЦ + 1 % ДМСО]. Таким образом, максимальное снижение уровня продуктов перекисного окисления отмечено при использовании среды, содержащей 2 % Na-КМЦ и 1 % ДМСО. Предполагается, что местное применение комплекса этих двух веществ возможно для повышения эффективности лекарственного лечения последствий травм и повреждений спинного мозга.

Ключевые слова: карбоксиметилцеллюлозы натриевая соль; диметилсульфоксид; альфа-токоферол; аскорбиновая кислота; перекисное окисление; повреждение спинного мозга; крысы.

ВВЕДЕНИЕ

Лекарственное лечение последствий травм и повреждений спинного мозга (СМ) является сложной медико-социальной проблемой [1, 3, 4]. Исходя из патогенеза травматической болезни СМ, основным механизмом вторичного повреждения которого считается активация перекисного окисления (ПОЛ), снижение уровня окислительного стресса признано эффективной стратегией лекарственного вмешательства [9]. Перспективы её реализации предполагают использование лекарственных средств (ЛС) с выраженной антиоксидантной активностью [6].

В настоящее время разрабатываются технологии локальной доставки активных веществ в зону повреждения, имеющие целью повышение эффективности лекарственной коррекции последствий травм и повреждений СМ. Для повышения биодоступности ЛС используют вещества-носители, способствующие поступлению ЛС в ткани СМ при местном способе применения. Среди современных публикаций имеются сведения об использовании в качестве таких носителей

производных карбоксиметилцеллюлозы и диметилсульфоксида [5, 7].

В связи с этим целью настоящего исследования явилось изучение эффективности торможения реакций ПОЛ в СМ крыс с применением антиоксидантов в средах, содержащих карбоксиметилцеллюлозу и диметилсульфоксид.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для тестирования влияния изучаемых веществ на СМ при их трансдуральном применении нами была модифицирована методика роллерного органотипического культивирования ткани СМ [2]. Выбор данной модели за основу для *in vitro* исследования обусловлен тем, что ее преимуществами явились максимальная стандартизация условий и сокращенная продолжительность эксперимента.

Суть модифицированной методики в следующем. СМ экспериментальных животных (крысы-самцы линии Вистар в возрасте 10 – 12 мес) на протяжении позвонков С1–L6 выделяли вместе с оболочками после декапитации животного и вскрытия позвоночного канала. Затем образец отмывали в охлажденном изотоническом растворе NaCl при температуре 4° С и поперечно делили на две части. Каудальную часть СМ на уровне позвонков L1 – L6 просушивали фильтровальной бумагой, взвешивали и выполняли биохимические

¹ ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени академика Г. А. Илизарова” Минздрава РФ, Россия, 640014, Курган, ул. М. Ульяновой, 6.

Таблица 1. Состав сред для инкубирования спинного мозга в органотипической роллерной культуре

Название серии	Состав инкубационной среды
0	АЦЖ
1 АО	АЦЖ + смесь АО (0,05 % альфа-токоферол + 0,05 % аскорбиновая кислота)
2 Na-КМЦ	АЦЖ + 2 % NaКМЦ
3 Na-КМЦ + АО	АЦЖ + 2 % NaКМЦ и смесь АО
4 ДМСО	АЦЖ + 1 % ДМСО
5 ДМСО + АО	АЦЖ + 1 % ДМСО и смесь АО
6 Na-КМЦ + ДМСО	АЦЖ + 2 % NaКМЦ + 1 % ДМСО
7 Na-КМЦ + ДМСО + АО	АЦЖ + 2 % NaКМЦ + 1 % ДМСО и смесь АО

Примечание: АЦЖ — артефициальная цереброспинальная жидкость; АО — антиоксиданты; Na-КМЦ — натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы; ДМСО — диметилсульфоксид.

Таблица 2. Концентрация продуктов перекисного окисления липидов до и после культивирования спинного мозга в средах с Na-КМЦ, медиана (1 – 3 квартиль)

Серия	ДК, мкмоль/г ткани		МДА, мкмоль/г ткани	
	До	После	До	После
0	6,36 (5,90 – 6,78)	6,84 (6,43 – 7,14)	1,42 (1,28 – 1,52)	1,28 (1,15 – 1,58)
1 АО	6,20 (5,91 – 7,31)	6,62 (6,28 – 6,95)	1,52 (1,32 – 1,62)	1,10 (0,99 – 1,13)* ⁰
2 Na-КМЦ	6,41 (6,27 – 6,65)	6,22 (6,12 – 6,36)	1,49 (1,32 – 1,63)	1,08 (1,03 – 1,10)* ⁰
3 Na-КМЦ + АО	6,40 (6,13 – 6,62)	6,12 (6,06 – 6,70)	1,47 (1,31 – 1,59)	1,03 (1,00 – 1,12)* ⁰

Примечания: * значимые отличия от срока до культивирования при $p < 0,05$; верхний индекс — значимые отличия от указанной серии при $p < 0,05$.

исследования (определяли исходное содержание в органе продуктов ПОЛ). Концы оболочек оставшейся части спинного мозга перевязывали шовным материалом для его изоляции от инкубационной среды.

Среды для инкубации образцов готовили на основе артефициальной цереброспинальной жидкости (АЦЖ) следующего состава (ммоль/л): 129 NaCl, 3,35 KCl, 1,26 CaCl₂, 1,15 MgCl₂, 21,0 NaHCO₃, 0,58 NaH₂PO₄, 30,0 глюкозы. Для стандартизации газового состава сред готовые растворы выдерживали 2 ч в CO₂-инкубаторе Sanyo (Panasonic, Япония) при концентрации CO₂ 5 %. Тестируемые образцы СМ помещали в заполненные инкубационным раствором лабораторные пробирки из инертного пластика объемом 14 мл и герметично закрывали для предотвращения контакта с атмосферным кислородом. Инкубацию производили в термостате “Heratherm” (Thermo Fisher Scientific, США) при 37 °С в течение 20 ч с использованием ро-

тационного смесителя Ротамикс RM-1 (ELMI, Латвия) в режиме горизонтального вращения 5 об/мин.

Всего было выполнено 8 серий опытов *in vitro*, в каждой из которых исследовали 6 образцов СМ, полученных от разных животных. Состав инкубационных сред в различных сериях эксперимента приведен в табл. 1.

В эксперименте использовали реактивы производства Sigma-Aldrich (Германия). Качество альфа-токоферола, аскорбиновой кислоты, Na-КМЦ и ДМСО соответствовало классу USP (USP Reference Standard).

По окончании культивирования опытные образцы визуально оценивали, отмывали изотоническим раствором NaCl, просушивали фильтровальной бумагой, взвешивали и направляли на биохимическое исследование. При макроскопическом исследовании твердая мозговая оболочка инкубированных образцов была бледной (серовато-белой), гладкой, пластичной, сосудистый рисунок не просматривался. На поперечном

Таблица 3. Концентрация продуктов перекисного окисления липидов до и после культивирования спинного мозга в средах с ДМСО, медиана (1 – 3 квартиль)

Серия	ДК, мкмоль/г ткани		МДА, мкмоль/г ткани	
	До	После	До	После
0	6,36 (5,90 – 6,78)	6,84 (6,43 – 7,14)	1,42 (1,28 – 1,52)	1,28 (1,15 – 1,58)
1 АО	6,20 (5,91 – 7,31)	6,62 (6,28 – 6,95)	1,52 (1,32 – 1,62)	1,10* ⁰ (0,99 – 1,13)
4 ДМСО	6,35 (5,96 – 6,57)	7,26** (7,20 – 7,57)	1,46 (1,20 – 1,77)	1,59 (1,35 – 1,73)
5 ДМСО + АО	6,24 (5,94 – 6,31)	12,58** (12,47 – 12,61)	1,49 (1,47 – 1,56)	1,37* (1,29 – 1,43)

Примечания: * значимые отличия от срока до культивирования при $p < 0,05$; ** значимые отличия от срока до культивирования при $p < 0,01$; верхний индекс — значимые отличия от указанной серии при $p < 0,05$.

разрезах четко различали белое вещество и серую фигуру “бабочки”.

В образцах СМ определяли концентрацию продуктов ПОЛ — диеновых конъюгатов (ДК) и малонового диальдегида (МДА). Определение концентрации ДК проводили спектрофотометрически при длине волны 232 нм, после их экстрагирования из ткани гептан/изопропаноловой смесью (1:1). Концентрацию МДА определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой спектрофотометрически при длине волны 532 нм. Дополнительно рассчитывали произведение ДК · МДА — показатель, позволяющий суммарно оценивать содержание продуктов ПОЛ в ткани.

Статистическая оценка результатов включала в себя: определение нормальности распределения данных в выборке, расчет средних значений, определение статистической значимости различий. Оценка на нормальность распределения показала, что часть выборок не является нормально распределенными, на основании чего нами для сравнения значимости отличий между двумя выборками выбран непараметрический Т-критерий Манна — Уитни, для сравнения нескольких групп — Н-критерий Крускала — Уоллиса. Данные в таблицах представлены в виде медианы, 1-го и 3-го квартиля.

На проведение исследования получено одобрение комитета по этике при ФГБУ “НМИЦ ТО имени академика Г. А. Илизарова” Минздрава России.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты биохимического исследования образцов СМ до и после культивирования в средах с использованием в качестве носителя Na-КМЦ (серии 2, 3) представлены в табл. 2. Обнаружено, что концентрация ДК в СМ после культивирования в средах всех серий статистически значимо не отличалась относительно значений до культивирования. Уровень МДА в сериях 1–3 был достоверно ниже относительно значений, как до культивирования, так и значений серии “0”.

Результаты культивирования СМ в средах с использованием в качестве носителя ДМСО (серии 4, 5) представлены в табл. 3. Обнаружено статистически значимое увеличение содержания ДК в СМ после его культивирования в среде ДМСО и ДМСО + АО, при этом в среде ДМСО + АО обнаружено снижение уровня МДА.

Результаты культивирования СМ в смешанных средах Na-КМЦ и ДМСО (серия 6, 7) представлены в табл. 4. Обнаружено увеличение содержания ДК в СМ после его культивирования в среде 6 и 7, при этом выявлено достоверно снижение уровня МДА в этих сре-

Таблица 4. Концентрация продуктов перекисного окисления липидов до и после культивирования спинного мозга в смешанной среде, медиана (1 – 3 квартиль)

Серия	ДК, мкмоль/г ткани		МДА, мкмоль/г ткани	
	До	После	До	После
0	6,36 (5,90 – 6,78)	6,84 (6,43 – 7,14)	1,42 (1,28 – 1,52)	1,28 (1,15 – 1,58)
1 АО	6,20 (5,91 – 7,31)	6,62 (6,28 – 6,95)	1,52 (1,32 – 1,62)	1,10 ^{*0} (0,99 – 1,13)
6 Na-КМЦ + ДМСО	6,18 (6,04 – 6,43)	6,71 [*] (6,65 – 7,29)	1,51 (1,27 – 1,57)	0,80 ^{**0,1} (0,74 – 0,88)
7 Na-КМЦ + ДМСО + АО	6,21 (6,15 – 6,26)	7,97 ^{*0,1,6} (7,85 – 8,15)	1,45 (1,35 – 1,55)	0,82 ^{*0,1} (0,76 – 0,88)

Примечания: * значимые отличия от срока до культивирования при $p < 0,05$; ** значимые отличия от срока до культивирования при $p < 0,01$; верхний индекс — значимые отличия от указанной серии при $p < 0,05$.

Таблица 5. Произведение ДК · МДА до и после культивирования спинного мозга в разных средах, медиана (1 – 3 квартиль)

Серия	До инкубации	После инкубации	+/- (%) [#]
6 (Na-КМЦ + ДМСО)	9,42 (7,75 – 9,61)	5,51 ^{**} (5,09 – 5,89)	– 41,5 ^{**}
3 (Na-КМЦ + АО)	8,72 (8,24 – 9,19)	6,07 ^{**} (5,77 – 6,20)	– 30,4 ^{**}
7 (Na-КМЦ + ДМСО + АО)	9,01 (8,33 – 9,69)	6,55 [*] (6,03 – 7,08)	– 27,3 [*]
2 (Na-КМЦ)	8,64 (8,32 – 9,11)	6,73 [*] (6,20 – 6,86)	– 22,1 [*]
1 (АО)	8,85 (8,62 – 9,26)	7,78 [*] (7,41 – 8,10)	– 12,1 [*]
0	8,79 (8,19 – 9,80)	8,61 (7,84 – 9,12)	– 2,0
4 (ДМСО)	9,09 (7,66 – 9,83)	11,80 [*] (11,03 – 12,23)	+ 29,8 [*]
5 (ДМСО + АО)	9,54 (8,28 – 9,81)	16,94 ^{**} (16,06 – 17,84)	+ 77,6 ^{**}

Примечание: * значимые отличия от срока до культивирования при $p < 0,05$; [#] прирост/убыль (+/-) продуктов ПОЛ относительно срока до инкубации.

дах, как относительно до инкубирования, так и относительно серии 0 и 1.

Для объективизации полученных результатов нами было рассчитано произведение ДК · МДА (показатель, характеризующий суммарное содержание продуктов ПОЛ), результаты изменения которого после инкубирования в разных средах приведены в табл. 5. В таблице все серии ранжированы в порядке возрастания суммарного уровня продуктов ПОЛ после инкубирования. Согласно полученным данным, во всех экспериментах после инкубации отмечалось статистически значимое изменение суммарного содержания продуктов ПОЛ. Наибольшим ингибирующим эффектом обладали среды с применением Na-КМЦ. ДМСО был эффективен только в сочетании с Na-КМЦ.

Результаты проведенного исследования показали, что применение Na-КМЦ и ДМСО в качестве носителей для повышения биодоступности витаминов-антиоксидантов при местном применении для ингибирования процессов ПОЛ в СМ, не приводило к максимально возможному метаболическому эффекту. Данное наблюдение соответствует результатам некоторых исследований, в которых отмечается, что эффективность применения витаминов-антиоксидантов после травмы СМ с целью подавления реакций ПОЛ достаточна и без использования дополнительных переносчиков [6]. Тем не менее, нами обнаружено, что применение витаминов-антиоксидантов в средах, содержащих Na-КМЦ (серия 3) и смесь Na-КМЦ + ДМСО (серия 7), позволяет повысить эффективность ингибирования реакций ПОЛ (примерно на 15 – 18 %) в тканях СМ относительно серии с применением только АО (серия 1).

Существенным результатом нашего исследования оказалось то, что достаточно высокий эффект ингибирования ПОЛ наблюдался при использовании среды содержащий только Na-КМЦ и ДМСО без АО-смеси. Данные других исследователей подтверждают, что Na-КМЦ и ДМСО по отдельности проявляют антиоксидантную активность в составе ЛС или медицинских изделий, применяемых при различного рода тканевых повреждениях [12, 13]. Однако, согласно полученным нами результатам, комплекс этих двух носителей обладал выраженным синергичным эффектом в отношении ингибирования процесса ПОЛ в СМ, по сравнению с их применением по отдельности или в сочетании с витаминами-антиоксидантами.

Данное наблюдение позволяет уточнить характеристики изученных нами соединений. На данный момент они рекомендованы лишь в качестве вспомогательных веществ, способствующих проникновению метаболически активных ЛС в структуры поврежденного СМ [10, 14], либо обеспечивающих противоспаечные характеристики медицинских изделий [8]. Согласно результатам нашего исследования, носители Na-КМЦ и ДМСО при совместном применении обладают наиболее выраженным антиоксидантным эффек-

том. При этом очевидно, что при индивидуальном использовании наибольшей эффективностью в отношении ПОЛ обладает Na-КМЦ. Сочетание Na-КМЦ и АО также способствует повышению эффективности ингибирования ПОЛ.

Можно предположить, что использование Na-КМЦ и ДМСО имеет перспективы для локального применения для лечения последствий травм и повреждений СМ, поскольку их сочетание обеспечивает как метаболические, так и не метаболические (противоспаечные) эффекты. Дополнительным аргументом в пользу этого заключения является выполнение других исследований по разработке вариантов совместного применения этих веществ [11, 15].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что применение сред, содержащих карбоксиметилцеллюлозу и диметилсульфоксид, способствует торможению реакций ПОЛ в органотипической роллерной культуре СМ крыс. Смесь Na-КМЦ + ДМСО позволяет повысить эффективность ингибирования реакций ПОЛ (примерно на 15 – 18 %, $p \leq 0,05$) в тканях спинного мозга относительно серии с применением только антиоксидантов.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. А. Бывальцев, А. А. Калинин, С. О. Рябых и др., *Гений оптопедии*, **26**(2), 275 – 281 (2020); doi: 10.18019 / 1028-4427-2020-26-2-275-281.
2. В. М. Востриков, Н. С. Коломеец, О. П. Александрова и др., *Морфология*, № 4, 41 – 47 (2003).
3. В. В. Краснов, Н. В. Кубрак, А. Ю. Кирсанова, *Гений оптопедии*, **23**(2), 134 – 139 (2017); doi: 10.18019 / 1028-4427-2017-23-2-134-139.
4. И. Н. Нестерова, О. Г. Прудникова, *Гений оптопедии*, **23**(4), 439 – 443 (2017); doi: 10.18019 / 1028-4427-2017-23-4-439-443.
5. H. Y. Chen, T. C. Lin, C. Y. Chiang, et al., *Polymers (Basel)*, **13**(13), 2129 (2021); doi: 10.3390 / polym13132129.
6. C. Chen, Q. Yang, X. Ma, *3 Biotech.*, **10**(2), 50 (2020); doi: 10.1007 / s13205-019-2032-x.
7. H. Erdoğan, M. Tunçdemir, B. Kelten, et al., *J. Korean Neurosurg. Soc.*, **57**(6), 445 – 454 (2015); doi: 10.3340 / jkns.2015.57.6.445.
8. V. Kanikireddy, K. Varaprasad, T. Jayaramudu, et al., *Int. J. Biol. Macromol.*, **164**, 963 – 975 (2020); doi: 10.1016 / j.ijbiomac.2020.07.160.
9. B. H. Lee, J. Kang, H. Y. Kim, Y. S. Gwak, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**(5), 2672 (2021); doi: 10.3390 / ijms22052672.
10. J. Liu, R. Li, Z. Huang, et al., *Front. Mol. Neurosci.*, **13**, 574041 (2021); doi: 10.3389 / fnmol.2020.574041.
11. M. Matias, S. Silvestre, A. Falcão, G. Alves, *J. Pharm. Pharm. Sci.*, **21**(1), 110 – 118 (2018); doi: 10.18433 / jpps29656.
12. M. Mohammad Pour, G. H. Farjah, M. Karimpour, et al., *Iran J. Basic. Med. Sci.*, **22**(4), 412 – 417 (2019); doi: 10.22038 / ijbm.2018.30039.7239.
13. R. Moseley, M. Walker, R. J. Waddington, W. Y. Chen, *Biomaterials*, **24**(9), 1549 – 1557 (2003); doi: 10.1016 / s0142-9612(02)00540-9.
14. D. R. Ormond, H. Peng, R. Zeman, et al., *J. Neurosurg. Spine*, **16**(5), 497 – 503 (2012); doi: 10.3171 / 2012.1.SPINE11769.

15. J. Tao, S. F. Chow, Y. Zheng, *Acta Pharm. Sin. B.*, 9(1), 4 – 18 (2019); doi: 10.1016 / j.apsb.2018.11.001.

Поступила 27.07.21

STUDYING THE EFFECTIVENESS OF LIPID PEROXIDATION INHIBITION IN THE SPINAL CORD OF RATS BY ANTIOXIDANTS IN SOLUTIONS CONTAINING CARBOXYMETHYL CELLULOSE AND DIMETHYL SULFOXIDE

M. V. Stogov¹, T. A. Silant'eva¹, and E. A. Kireeva¹

¹ G. A. Ilizarov National Medical Research Centre for Traumatology and Orthopedics ul. M. Ulyanova 6, Kurgan, 640014 Russia

A series of *in vitro* experiments have been carried out to study changes in the concentrations of peroxidation products (malondialdehyde, diene conjugates) in the isolated spinal cord of rats as measured before and after 20 h incubation in various media containing a complex of antioxidants alpha-tocopherol and ascorbic acid (AO), sodium carboxymethyl cellulose salt (NaCMC), and dimethyl sulfoxide (DMSO). The concentration of peroxidation products in the isolated spinal cord of rats after incubation decreased relative to the initial values. In the series of media studied, these changes can be rated as decreased in the following order: [0.05% AO] [2% NaCMC] [2% NaCMC + 1% DMSO + 0.05% AO] [2% NaCMC + 0.05% AO] [2% NaCMC + 1% DMSO]. Therefore, the maximum decrease in the level of peroxidation products was observed for a solution containing 2% NaCMC and 1% DMSO. It is believed that topical application of the complex of these two substances is possible to improve the efficiency of pharmacotherapy in the treatment of traumas and spinal cord injuries.

Keywords: carboxymethyl cellulose sodium salt; dimethyl sulfoxide; alpha tocopherol; ascorbic acid; peroxidation products; spinal cord injury; rats.