

На правах рукописи

Кузьменко Татьяна Павловна

**ВЛИЯНИЕ КЛОБЕТАЗОЛА И СЕМАКСА НА СОДЕРЖАНИЕ
НЕЙРОТРОФИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ, НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И
СОСТАВ БЕЛКОВ ПРИ РЕГЕНЕРАЦИИ ПОВРЕЖДЕННЫХ
СОМАТИЧЕСКИХ НЕРВОВ**

Специальность 1.5.5 – Физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Нижний Новгород-2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва» (ФГБОУ ВО «НИ МГУ им. Н.П. Огарёва») при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (код научной темы FZRS-2024-0005) в рамках государственного задания ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарёва» (создание новых молодежных лабораторий)

Научный руководитель: **Ревин Виктор Васильевич**
доктор биологических наук, профессор,
заслуженный деятель науки РФ

Официальные оппоненты: **Сури́н Александр Михайлович**
доктор биологических наук, главный
научный сотрудник, Лаборатория
фундаментальных и прикладных проблем
боли ФГБНУ «НИИ общей патологии и
патофизиологии»

Гришин Сергей Николаевич
доктор биологических наук, профессор
кафедры медицинской и биологической
физики с информатикой и медицинской
аппаратурой Казанского государственного
медицинского университета

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Защита диссертации состоится «26» декабря 2024 года в 15:00 часов на заседании диссертационного совета Д 24.2.340.06 при Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского по адресу: 603022, г. Нижний Новгород, проспект Гагарина, д. 23, корп. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского и на сайте: <https://diss.unn.ru/files/2024/1496/diss-Kuzmenko-1496.pdf>.

Автореферат разослан « ___ » _____ 2024 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Черкасова Елена Игоревна

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Одной из важнейших задач биофизики, физиологии и ряда клинических наук является поиск новых методов и подходов по восстановлению потенциала действия и его проводимости в соматических нервах, поэтому важнейшей характеристикой, отражающей эффективность протекания регенерационных процессов, является способность нервных волокон проводить потенциал действия. Учитывая значимость этой проблемы в последние годы среди исследователей возрастает интерес к поиску новых фармакологических соединений, стимулирующих как возникновение потенциала действия, так и восстановление его проведения по соматическим нервам (Zhang, 2017; Revin, 2006, Pinyaev, 2019, Isakina, 2006).

В настоящее время установлены ряд препаратов, усиливающих регенерационные процессы в нервных проводниках: полифенолы растительного происхождения (Revin, 2019), компоненты внеклеточного матрикса (Gonzalez-Perez, 2013), а также огромный интерес представляют глюкокортикоиды, в частности, клобетазол (Najm, 2015), который проявил высокую эффективность в процессах миелинизации и ремиелинизации. Клобетазол способствует увеличению числа олигодендроцитов и ускоряет восстановление миелиновой оболочки в моделях мышеч с очаговой демиелинизацией. Механизм его действия связан с глюкокортикоидным рецептором, что подчеркивает его роль в развитии клеток предшественников олигодендроцитов (Morisaki, 2010).

По мнению Shi и его коллег, клобетазол может усиливать дифференцировку и пролиферацию нейростоловых клеток за счет активации нейротрофических факторов (Fontana, 2012; Brushart, 2013; Shi, 2019). Нейротрофические факторы активируют сигнальные пути, способствующие дифференцировке и выживаемости нейронов, такие как, фосфатидилинозитол-3-киназный путь (PIK3/Akt) и сигнальный путь митогенактивируемой протеинкиназы (MAPK/ERK). Клобетазол, как представитель глюкокортикостероидов, также может подавлять воспалительную реакцию в клетках, что может уменьшать образование глиальных рубцов, ограничивающих рост аксонов и влияющих на процесс регенерации.

Семакс – это перспективное соединение, которое является синтетическим аналогом фрагмента адренкортикотропного гормона. В отличие от гормона, он не имеет побочных гормональных эффектов и обладает повышенной устойчивостью к действию инактивирующих ферментов. Семакс проявляет ноотропный, нейротрофический, антигипоксический и другие эффекты, что делает его перспективным в разработке новых методов лечения нервных заболеваний (Королева, 2018; Вакаева Z.V., Surin A.M., 2020).

Несмотря на многочисленные исследования, посвященные регенерации нервной ткани при действии клобетазола и препарата «Семакс», их роль в лечении патологий соматических нервов все еще недостаточно изучена.

Кроме того, гидрогели привлекают все большее внимание исследователей, так как могут улучшить процесс регенерации тканей и

обеспечить постоянный приток биологически активных веществ, в частности, клобетазол, в область повреждения (Бозо, 2019; Nunes, 2022).

Также, одним из объективных показателей, свидетельствующих об интенсивности протекания регенерационных процессов является активация изменений в составе нуклеиновых кислот и в содержании белковых фракций. Определение белков NF-M, NF-H и тубулина все чаще стало использоваться для подтверждения процессов интенсификации регенерации поврежденных периферических нервов (Петрова, 2012).

К тому же, рост аксонов осуществляется с участием ряда специфических нейрональных белков. В экспериментах на моделях нервной системы белок GAP-43 используется как маркер регенерации, поскольку его присутствие коррелирует с процессами восстановления аксонов, что делает его важным инструментом для изучения механизмов нервной регенерации.

Цель и задачи исследования. Целью работы было изучение влияния клобетазола и семакса на содержание нейротрофических факторов, нуклеиновых кислот и состав белков при регенерации поврежденных соматических нервов крысы.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Исследовать качественный и количественный состав белковой фракции, а также уровень ДНК и нейротрофических факторов седалищного нерва крысы в состоянии покоя, при проведении возбуждения и после его перерезки.

2. Исследовать влияние клобетазола и семакса на изменение количественного содержания нейротрофических факторов в проксимальном и дистальном концах седалищного нерва крысы после его перерезки.

3. Исследовать изменение уровня ДНК, качественного и количественного состава белковой фракции поврежденных соматических нервов крысы на фоне действия клобетазола и семакса.

4. Изучить влияние клобетазола и семакса на изменение функциональной проводимости поврежденных седалищных нервов крысы при дегенерационных и регенерационных процессах.

5. Установить взаимосвязь между изменением уровня нейротрофических факторов и белковым составом травмированных соматических нервов при действии клобетазола и семакса, а также оценить их роль в регуляции регенерационных процессов и восстановлении функционирования поврежденных нервных проводников.

Новизна и научно-практическая ценность исследования. Это исследование представляет собой актуальную и оригинальную работу, так как впервые выполнен сравнительный анализ нейротрофических факторов в неповреждённых нервах, а также при возбуждении и регенерации повреждённых нервных структур. Полученные данные позволяют глубже понять механизмы, происходящие при травме нервных волокон. Исследование динамики ключевых компонентов нервного проводника даёт возможность лучше осмыслить процессы, происходящие при повреждении соматических

нервов, особенно в начальной стадии дегенерации.

Было установлено, что использование клобетазола и семакса способствует восстановлению отдельных белковых фракций в повреждённом периферическом нерве. Ускорение процессов регенерации в нервном стволе и появление потенциала действия свидетельствуют о том, что данные препараты могут быть полезны в клинической практике для восстановления повреждённых нервов.

Апробация диссертации. Результаты диссертационного исследования были продемонстрированы для обсуждения на Огарёвских чтениях в Мордовском государственном университете им. Н. П. Огарёва (Саранск, 2019–2022); на научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов Мордовского государственного университета им. Н. П. Огарёва (Саранск, 2019–2022); на Европейском биотехнологическом конгрессе (2020–2021).

Публикации. По теме кандидатской диссертации было опубликовано 16 работ, из них 4 в рецензируемых журналах, входящих в международные базы Web of Science, Scopus и из перечня ВАК.

Положения, выносимые на защиту:

1. Установлено, что перерезка седалищного нерва сопровождается снижением содержания нейротрофических факторов и уровня ДНК, а также распадом белковой фракции травмированного нервного проводника в связи с интенсивным протеканием дегенерационных процессов.

2. Клобетазол стимулирует регенерационные процессы в поврежденных соматических нервах, что выражается в увеличении содержания нейротрофических факторов и синтезе ДНК, а также структурных и аксональных белков нервного проводника и коррелирует с восстановлением функциональной активности в его проксимальном отрезке после травмы.

3. Семакс способствует усиленному синтезу нейротрофических факторов, ДНК, белков цитоскелета и снижению уровня аксональных белков, что, вероятнее всего, обусловлено активацией процессов выживаемости нейронов и восстановлением структурно-функционального состояния нервного проводника, но не связано с процессами аксонального роста.

Личный вклад автора. Автор этой работы принимал активное участие на всех этапах её выполнения, начиная с формулирования задач, планирования и проведения экспериментов, и заканчивая обработкой и анализом полученных данных. Вместе с соавторами он участвовал в подготовке научных публикаций и научных докладов на семинарах и конференциях.

Достоверность научных результатов. Надежность методов исследования, их воспроизводимость и проведение статистического анализа подтверждают достоверность научных результатов. Кроме того, аргументы и выводы, основанные на научных результатах, согласуются с результатами независимых исследований, описанных в литературе.

Объем и структура диссертационной работы. Работа состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материал и методы, результаты и их обсуждение, заключение, списка использованной литературы. Работа изложена на 115 страницах машинописного текста.

Библиографический указатель содержит 142 источника литературы.

Благодарность. Автор искренне благодарит научного руководителя, доктора биологических наук, профессора Ревина Виктора Васильевича за бесценную помощь и ценные советы, а также выражает признательность коллективу кафедры биотехнологии, биохимии и биоинженерии МГУ им. Н. П. Огарёва за важные комментарии и полезные замечания.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта исследования использовались взрослые крысы породы Wistar, со средней массой 250–350 г, предоставленные виварием ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарёва». Материалом исследования служили седалищные нервы. Экспериментальные процедуры на крысах проводились под хлороформным наркозом, при этом все манипуляции выполнялись в соответствии с «Правилами проведения работы с использованием экспериментальных животных» (Приказ Минвуза от 13.11.1984 г. №724).

Были сформированы следующие экспериментальные группы крыс:

- 1 группа – интактный, неповрежденный нерв (n=10);
- 2 группа – интактный, неповрежденный нерв, подвергнутый стимуляции (n=10);
- 3 группа – повреждение седалищного нерва (нейротомезис) (n=30);
- 4, 5 и 6 группы – повреждение нерва и внутримышечное введение клобетазола (Sigma-Aldrich, Китай) в дозировках 1 мг/кг (n=30), 0,5 мг/кг (n=30) и 0,25 мг/кг (n=30) в широкую медиальную мышцу бедра;
- 7 группа – повреждение нерва и наложение гидрогеля на проксимальный участок поврежденного нерва (n=30);
- 8 группа – повреждение нерва и наложение гидрогеля с клобетазолом (0,25 мг/мл) на проксимальный участок поврежденного нерва (n=30);
- 9 группа – повреждение нерва и внутримышечное введение семакса (АО «ИНЦП «Пептаген», РФ) в концентрации 37,5 мг/кг (n=30) в широкую медиальную мышцу бедра.

Животные были выведены из эксперимента на 7, 14 и 30 сутки эксперимента. Для формирования гидрогеля были выбраны компоненты: 8% леван и 2% альгинат в соотношении 1:1. Полимеризация гидрогеля осуществлялась с использованием 2% раствора CaCl₂, который образует ионные сшивки с полисахаридами. Цитотоксичность гидрогеля оценивали с применением МТТ-теста на клеточной линии легких эмбриона человека. Для снижения вязкости раствора и возможности проведения данного теста исходные растворы левана и альгината разбавлены в 10 раз.

Нервы извлекались на 7, 14 и 30 сутки после обработки в растворе Рингера при температуре 37 °С с постоянной подачей кислорода.

Стимуляция проводилась с амплитудой 1,5 В, длительностью импульса 0,3 мс и частотой 100 имп/с. Потенциалы действия фиксировались на экране осциллографа GDS-71042 (Ревин, 1990).

Нервы измельчались с использованием гомогенизатора POTTER S Sartorius в растворе сахарозы при температуре 4 °С для получения гомогената.

Гомогенат использовался для определения концентраций нейротрофических факторов (NGF, нейротрофина-3 и нейрорегулина-1) методом иммуноферментного анализа (ELISA) с помощью коммерческих наборов производства Cloud-Clone Corp. (Китай).

Общую концентрацию белка в образцах определяли по методу Лоури (Lowry, 1951). Белки соматических нервов разделяли с использованием электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) с додецилсульфатом натрия (ДСН) по методу Лэммли (Laemmli, 1970). Белки после электрофореза переносились на PVDF-мембрану методом электроблоттинга, используя систему Trans-Blot Turbo (Bio-Rad, США). Были использованы первичные антитела к GAP-43 в соотношении 1:2000 и вторичные антитела Alexa в соотношении 1:10000. Визуализация и количественный анализ проводились с помощью системы Gel Doc XR+ с использованием программы ImageLab.

Выделение ДНК осуществляли по методу Woodram (2006). Концентрацию ДНК измеряли на спектрофотометре NanoPhotometer NP80 (Implen, США) при длине волны 260 нм.

Экспериментальные данные подвергались статистической обработке с использованием Microsoft Excel 2016. Сравнение экспериментальных групп проводилось с использованием t-критерия Стьюдента при уровне значимости 5%.

ВЛИЯНИЕ КЛОБЕТАЗОЛА И СЕМАКСА НА ИЗМЕНЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ NGF В ПОВРЕЖДЕННЫХ НЕРВАХ

Повреждение соматических нервов активирует различные сигнальные пути, которые играют ключевую роль в регуляции процессов дегенерации и регенерации. Механизм действия нейротрофических факторов роста построен на их связывании с соответствующими изоформами тирозинкиназных рецепторов, а также с рецептором p75NTR. Рецепторы нейротрофинов стимулируют рост нейронов и ремиелинизацию за счет усиленного синтеза белков для аксональной регенерации и, как следствие, восстанавливая способность проводить биоэлектрические потенциалы (Ahmed, 2021).

Согласно литературным данным, центральный отрезок, связанный с проксимальной частью нерва (ближе к телу клетки), и периферический отрезок (дистальная часть, отделённая от тела клетки) подвергаются различным процессам дегенерации и регенерации (Продан, 2010). В центральном отрезке, как правило, происходит реакция клеточного тела, направленная на выживание и попытку восстановить повреждённый аксон, что связано с активацией сигнальных путей роста нейронов и регенерации. Периферический отрезок, в свою очередь, претерпевает нисходящую валлеровскую дегенерацию, характеризующуюся распадом аксона и миелиновой оболочки. Исследование влияния клобетазола на эти процессы представляет собой интересное направление, так как клобетазол, будучи мощным глюкокортикостероидом, обладает противовоспалительными и иммуномодулирующими свойствами.

Установлено, что содержание NGF в интактном нерве составляет $180,6 \pm 14,7$ пг/мг нерва. К 14 суткам эксперимента данный показатель был

ниже контрольных значений на 26,7% в проксимальном отделе. Концентрация NGF на 30 суток после повреждения достоверно не изменялась по отношению к контролю.

Снижение количества фактора роста в дистальном отделе нерва через 7 и 14 суток после повреждения на 24,4% и 22,7% относительно контроля отражает динамику дегенерации в начальный период после травмы. Однако к 30 суткам содержание фактора роста повышено на 11,8% относительно контрольных значений (рисунок 1).

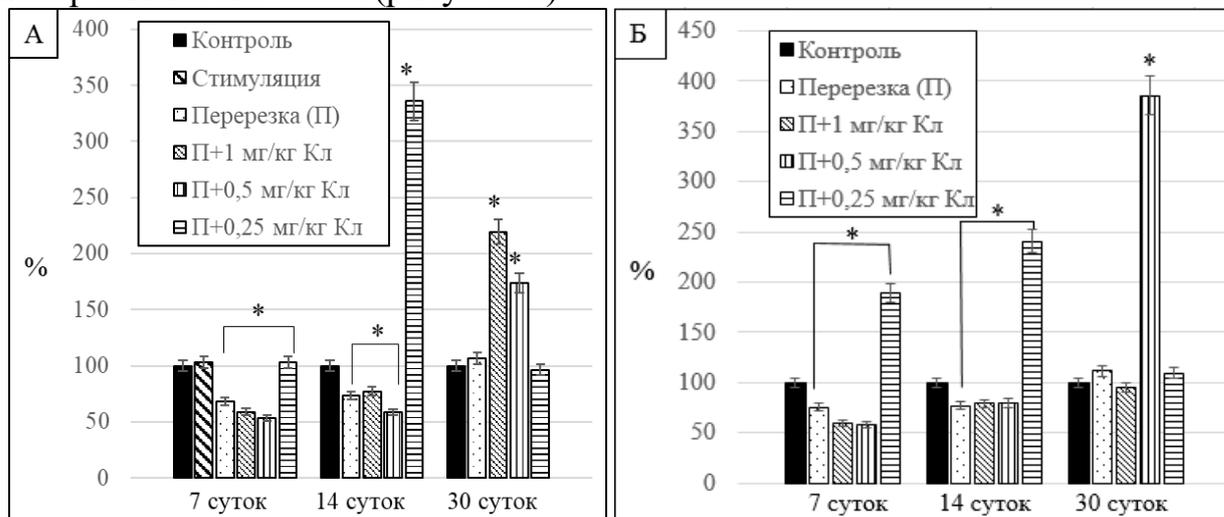


Рисунок 1 – Влияние клобетазола на динамику фактора роста (NGF) в проксимальном (А) и дистальном (Б) отделах в поврежденных соматических нервах (* – достоверность отличия по отношению к интактной группе, $p < 0.05$)

В опыте с применением клобетазола в концентрациях 0,5 и 1 мг/кг к концу первой недели эксперимента уменьшилось содержание факторов роста нерва на 46,6% и 41,1% соответственно относительно контроля. При действии клобетазола в концентрации 0,25 мг/кг количество фактора роста нервов лишь незначительно отличалось от контрольной группы.

Через 14 суток в поврежденных нервах при влиянии клобетазола в высоких концентрациях содержание фактора роста было ниже контрольных значений на 22,7% и 41,4% соответственно. Стоит отметить, что при введении клобетазола в меньшей концентрации количество фактора роста резко возрастало относительно контроля в 3,36 раза. Обратный эффект наблюдался к 30 суткам эксперимента: при воздействии клобетазола в концентрациях 1 и 0,5 мг/кг количество NGF увеличилось в 2,2 раза и 1,7 раза соответственно по сравнению с контролем.

В дистальной части нерва интенсивнее происходят процессы распада структурных компонентов нервного волокна, в связи с этим отдаленная часть нерва больше нуждается в нейротрофической поддержке. При исследовании уровня NGF на 7 сутки после повреждения нерва получили следующие результаты: уровень нейротрофинов уменьшился на 40,4% в опыте с клобетазолом в концентрации 1 мг/кг, на 41,4% в опыте с клобетазолом в концентрации 0,5 мг/кг, однако в опыте с клобетазолом в концентрации 0,25 мг/кг уровень NGF возрастал в 1,9 раз по сравнению с контрольными

значениями. Повышенный синтез нейротрофина при действии клобетазола в концентрации 0,25 мг/кг наблюдался и на 14 сутки эксперимента, где количество фактора роста нервов превысило контрольные значения в 2,4 раза. При увеличении сроков до 30 суток эксперимента содержание фактора роста при действии клобетазола в концентрации 1 мг/кг и 0,25 мг/кг находилось в пределах погрешности, а при действии клобетазола в концентрации 0,5 мг/кг – находилось значительно выше контрольных значений (в 3,9 раз).

В опыте с наложением гидрогеля на конец поврежденного нерва происходило снижение уровня фактора роста нервов на 80% к 30-м суткам эксперимента, однако при добавлении клобетазола в гидрогель происходило увеличение синтеза NGF, и прирост его содержания в поврежденном нерве составил в 20% относительно контрольных значений уже на 7 сутки эксперимента (рисунок 2).

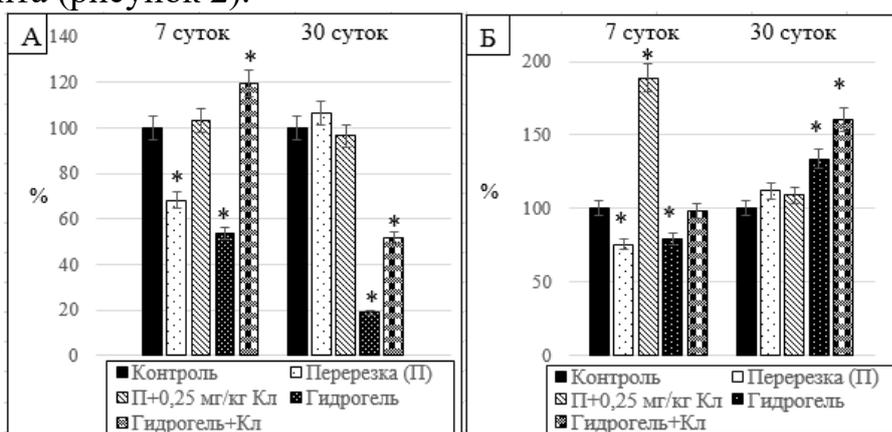


Рисунок 2 – Изменение динамики NGF в проксимальном (А) и дистальном (Б) отделах в поврежденных нервах при внутримышечном введении клобетазола и в составе гидрогеля

(* – достоверность отличия по отношению к интактной группе, $p < 0.05$)

При действии препарата «Семакс» в проксимальном отделе через 7 суток по отношению к контролю происходит увеличение уровня NGF в 4 раза. Через 2 недели уровень NGF уменьшился, но также находился выше контрольных значений на 61,3%. На 30 сутки по отношению к контролю уровень NGF повышается в 2 раза (рисунок 3).

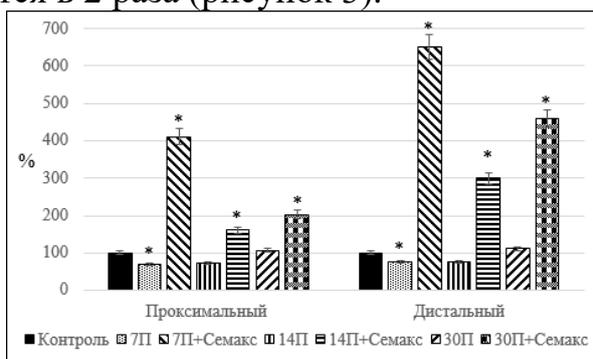


Рисунок 3 – Изменение динамики NGF в поврежденных соматических нервах при действии Семакса (* – достоверность отличия по отношению к интактной группе, $p < 0.05$)

В дистальном отделе введение препарата привело к значительному приросту количества фактора роста нервов в 6,5 раз уже на 7 сутки эксперимента. По истечении 30 суток уровень NGF превышает контроль в 4,6 раза.

Таким образом, использование клобетазола в концентрации 0,25 мг/кг способствует усиленному синтезу фактора роста NGF уже в первую неделю после повреждения, тогда как более высокие концентрации препарата проявляют свою эффективность лишь к 30 суткам после повреждения. Использование гидрогеля с введённым в него клобетазолом в концентрации 0,25 мг/мл эффективен лишь на начальном периоде восстановления нерва (до 7 суток), что, возможно, связано с малой концентрацией на более длительный период использования гидрогеля, а также более низкой доступности нервных волокон действия клобетазола.

ВЛИЯНИЕ КЛОБЕТАЗОЛА И СЕМАКСА НА ИЗМЕНЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ NT-3 В ПОВРЕЖДЕННЫХ НЕРВАХ

Помимо изменения уровня фактора роста нервов (NGF), в поврежденных нервах происходит изменение и концентрации нейротрофина-3. Так, в интактном нерве его количество составило 856,1±63 пг/мг нерва.

После повреждения нерва активируются сигнальные пути, запускающие усиленный синтез нейротрофических факторов роста. Так, уже к 7 суткам эксперимента содержание NT-3 было выше контрольных значений на 30,7%, а к 30 суткам эксперимента – на 27,2%. В дистальной части уже на 7-й день эксперимента концентрация NT-3 была в 2 раза выше, чем в контрольной группе, а на 14-й день – в 2,14 раза. Однако, стоит отметить, к 30-ти суткам эксперимента данный показатель был ниже уровня контроля на 16,2% (рисунок 4).

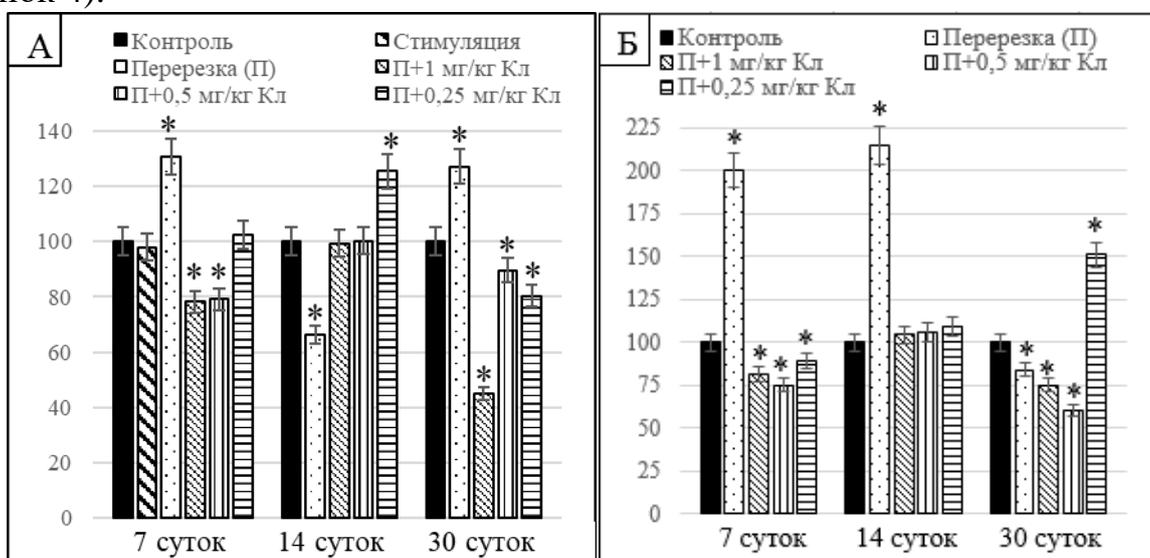


Рисунок 4 – Влияние клобетазола на динамику NT-3 в проксимальном (А) и дистальном (Б) отделах в поврежденных соматических нервах (* – достоверность отличия по отношению к интактной группе, $p < 0.05$)

В начальный период эксперимента (7-е сутки) введение клобетазола приводило к снижению концентрации нейротрофина-3 в повреждённом нерве: на 21,8% при дозе клобетазола 1 мг/кг и на 20,8% при дозе клобетазола 0,5 мг/кг. При действии клобетазола в меньшей концентрации количество нейротрофина-3 оставалось на уровне контрольных значений.

Увеличение периода эксперимента до 14 суток с одновременным введением клобетазола в концентрациях 1 и 0,5 мг/кг показало увеличение концентрации NT-3 до контрольных значений. В варианте опыта с клобетазолом в меньшей концентрации синтез нейротрофина-3 увеличивался на 25,4% относительно контроля. Увеличение постоперационных сроков до 30 суток показало, что при воздействии клобетазола в концентрации 1 мг/кг, 0,5 мг/кг и 0,25 мг/кг содержание нейротрофина-3 находилось ниже на 55%, 10,4% и 19,7% соответственно относительно контрольных значений.

По истечении первой недели эксперимента в дистальном отделе при введении клобетазола происходило снижение уровня нейротрофина-3 (при введении клобетазола в концентрации 1 мг/кг – на 18,9%, 0,5 мг/кг – на 25,2% и 0,25 мг/кг на 11,5% по отношению к контролю). При действии клобетазола в более высоких концентрациях через 30 суток концентрация нейротрофина ниже на 25,2% (1 мг/кг) и 40,1% (0,5 мг/кг), однако при воздействии клобетазола в концентрации 0,25 мг/кг данный показатель превышает контрольные значения на 50,8%.

Введение семакса в концентрации 37,5 мг/кг на 7 и 30 сутки эксперимента в проксимальном отделе способствовал снижению концентрации нейротрофина в 1,2 и в 1,7 раза относительно контрольных значений. Значительное увеличение данного параметра более чем в 1,5 раза наблюдалось на 30 сутки эксперимента (рисунок 5).

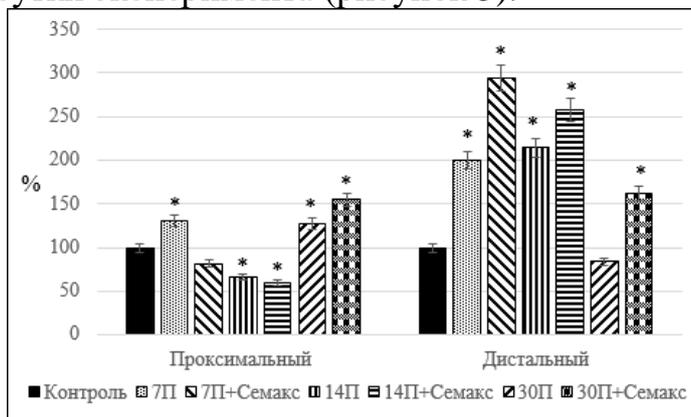


Рисунок 5 – Влияние семакса на изменение концентрации NT-3 в поврежденных соматических нервах (* – достоверность отличия по отношению к интактной группе, $p < 0.05$)

Таким образом, при повреждении нерва в дистальной части более чем в 2 раза повышается содержание нейротрофина-3. Из этого следует, что за счет активации нейротрофических факторов происходит усиление дифференцировки и пролиферации нервных клеток в процессе регенерации (Воусе V. S., 2014). Воздействие клобетазола в концентрации 0,25 мг/кг и

семакса в концентрации 37,5 мг/кг усиливает данный эффект благодаря связыванию с глюкокортикоидными рецепторами и активации ErbB2/3-зависимого механизма соответственно, запускающих усиленный синтез нейротрофических факторов, что мы и наблюдаем в эксперименте.

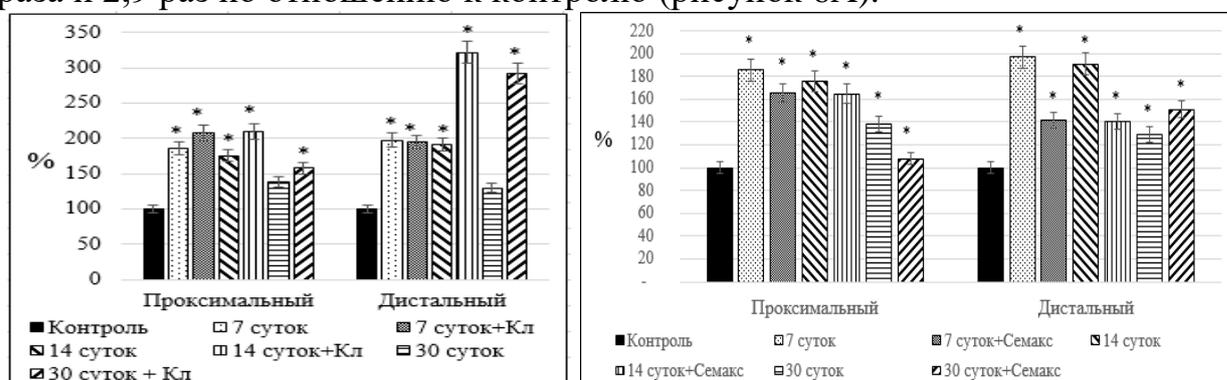
ИЗМЕНЕНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ НЕЙРОРЕГУЛИНА-1 ПРИ ДЕЙСТВИИ КЛОБЕТАЗОЛА И СЕМАКСА В ПРОЦЕССЕ РЕГЕНЕРАЦИИ СОМАТИЧЕСКИХ НЕРВОВ

В следующем этапе нашего исследования была проведена оценка содержания нейрорегулина-1 (NRG-1) в интактных и поврежденных нервах, а также при действии клобетазола в концентрации 0,25 мг/кг на поврежденный нерв. NRG-1 играет центральную роль в восстановлении нервной ткани, а также в процессах нейронной дифференцировки, миелинизации и синаптической пластичности (Wang J. N., 2023).

NRG-1 взаимодействует с рецепторами ErbB и интегринами, что способствует росту, развитию и дифференцировке нейронов. Этот фактор также участвует в формировании миелиновой оболочки, которая критически важна для нормальной функции аксонов.

Концентрация нейрорегулина-1 в интактном нерве составила $303,3 \pm 15,3$ пг/мг. При травме седалищного нерва концентрация нейрорегулина резко увеличивалась в первые 7 суток эксперимента на 85,6%. В случае увеличения времени эксперимента до 14 и 30 суток концентрация NRG-1 постепенно снижалась, но оставалась выше контрольных значений на 75,6% и 38,3% соответственно. Данная тенденция прослеживалась и в дистальном отделе.

При действии клобетазола в концентрации 0,25 мг/кг в проксимальном отделе существенных изменений по отношению ко 2 экспериментальной группе не наблюдалось, однако в дистальном отделе на 14 сутки и 30 суток эксперимента существенно увеличивалось содержание нейрорегулинов-1 в 3,2 раза и 2,9 раз по отношению к контролю (рисунок 6А).



А

Б

Рисунок 6 – Влияние клобетазола (А) и семакса (Б) на изменение концентрации нейрорегулина-1 в поврежденных соматических нервах (* – достоверность отличия по отношению к контролю, $p < 0.05$)

При действии препарата «Семакс» в количественном содержании нейрорегулинов достоверных изменений в сравнении с экспериментом без

действия вещества не наблюдалось на 7 и 14 сутки. Однако относительно контрольных значений содержание нейрорегулина-1 находилось выше на 65,7% и 64,8% по истечению первой и второй недели эксперимента после повреждения соответственно.

В дистальной части нерва введение семакса негативно сказалось на синтез нейрорегулина-1 по сравнению с поврежденными нервами без введения препарата, однако содержание NRG-1 оставалось выше контрольных значений на 41,6% и 40,9% к 7 и 14 суткам эксперимента соответственно (рисунок 6Б).

Из литературных данных известно, что при повреждении нерва уровни рецепторов NRG-1 (нейрорегулинов) значительно повышаются в дистальном участке нерва (Wang J. N., 2023). Благодаря воздействию клобетазола синтез нейрорегулинов усиливается более чем в 2 раза, что способствует миелинизации шванновских клеток через ErbB-2/3-зависимый механизм. На существование подобного механизма свидетельствуют и литературные данные (Аканова А. А., 2018; Newbern J., 2010).

ВЛИЯНИЕ КЛОБЕТАЗОЛА И СЕМАКСА НА ИЗМЕНЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ДНК И СОДЕРЖАНИЯ ОБЩЕГО БЕЛКА В ПОВРЕЖДЕННЫХ СОМАТИЧЕСКИХ НЕРВАХ

Следующим этапом нашего исследования стало изучение изменений концентрации ДНК и общего содержания белка в поврежденном нерве под воздействием физиологически активных соединений – клобетазола и семакса.

Результаты показали, что при стимуляции нерва достоверных изменений концентрации ДНК не наблюдалось по отношению к контролю. После повреждения нерва на 7 сутки, а также на 30 сутки эксперимента количественное содержание ДНК в проксимальной части нерва находилось в пределах погрешности контрольных значений, но на 14 день наблюдения содержание ДНК находилось ниже контрольных значений на 15,3% (рисунок 7А). В дистальной части поврежденных нервов по сравнению с контролем, содержание ДНК снижалось на 18,8% с увеличением времени до 7 дня после операции, и на 66,2% и 64,3% на 14 и 30 день соответственно.

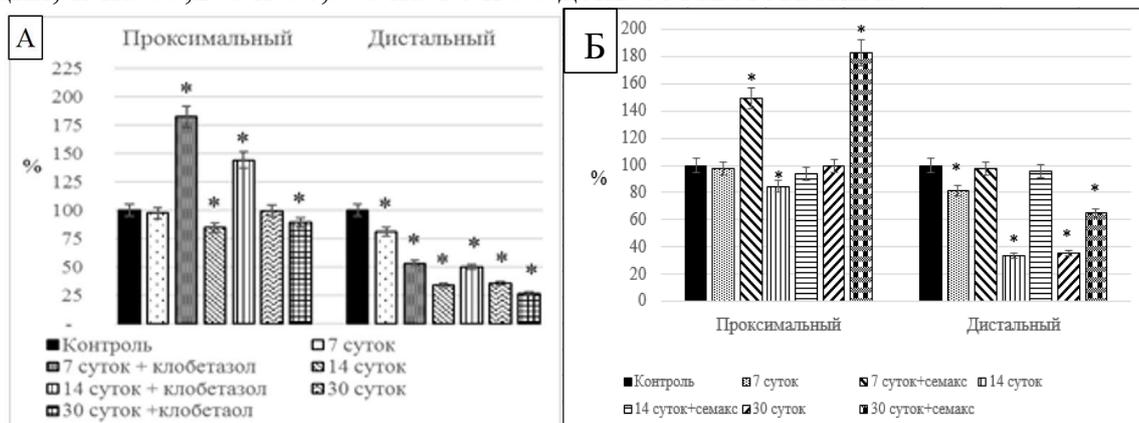


Рисунок 7 – Изменение концентрации ДНК в поврежденных нервах при влиянии клобетазола (А) и препарата «Семакс» (Б) (* – достоверность отличия по отношению к контролю, $p < 0.05$)

В проксимальном отделе нерва при действии клобетазола в концентрации 0,25 мг/кг происходил прирост количественного содержания ДНК в 1,8 и 1,4 раза по сравнению с контролем на 7 и 14 сутки соответственно.

В проксимальном отделе нерва при действии семакса наблюдалось значительное повышение белка в 1,5 раз и 1,8 раз относительно контроля к 7 суткам и 30 суткам эксперимента соответственно. При введении препарата «Семакс» в дистальном отделе в течение 14 суток после повреждения концентрация ДНК была практически равна контрольным значениям, а на 30 сутки эксперимента происходило уменьшение количества ДНК на 35,1% относительно контрольных значений (рисунок 7Б).

В первые дни после травмы происходит изменение состава белков в нервной ткани. Травма нерва приводит к активации иммунной системы и запуску воспалительной реакции. Это проявляется в увеличении проницаемости сосудов, миграции иммунных клеток в место травмы и высвобождении провоспалительных цитокинов. В то же время активно протекают процессы дегенерации аксонов, что проявляется в разрыве аксональной мембраны, деградации микротрубочек и нейрофиламентов, а также в образовании дегенеративных гранул. Так, при стимуляции нерва относительно контроля достоверных изменений не было выявлено. После повреждения нерва на 7 сутки эксперимента общее содержание белка в проксимальной части нерва уменьшилось на 30,7% относительно контроля. Стоит отметить, что уже к 30 суткам эксперимента данный показатель незначительно отличался от контрольных значений и был ниже контроля на 10,5% (рисунок 8).

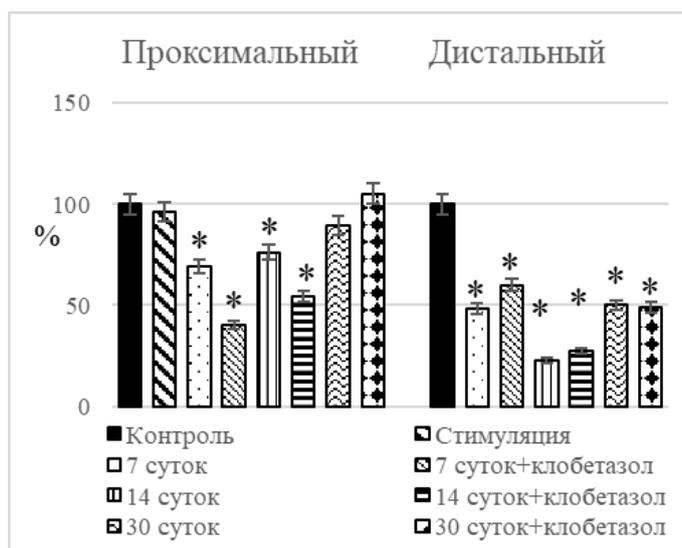


Рисунок 8 – Влияние клобетазола в концентрации 0,25 мг/кг на общее содержание белка в поврежденных соматических нервах крысы (* – $p < 0,05$ по сравнению с контролем)

В дистальной части нерва существенное снижение содержания белка к 14-м суткам (в 4 раза) и достижение лишь половины от контрольных значений данного показателя к 30 суткам указывает на более серьезные последствия деградации белков нервной ткани и возможно на более медленный процесс ее

восстановления. Эти данные могут быть важны для понимания механизмов регенерации нерва после травмы.

Нейротрофические факторы играют ключевую роль в поддержании нервной системы и активации различных сигнальных путей в нервных клетках. Эти факторы оказывают значительное влияние на процессы роста, выживания и пластичности нейронов. Нейротрофические факторы связываются с высокоаффинными рецепторами семейства Trk-рецепторов (TrkA, TrkB, TrkC), что активирует внутриклеточные сигнальные пути. Один из ключевых путей – это MAPK/ERK-путь, который регулирует экспрессию генов, ответственных за рост и дифференциацию нервных клеток. PI3K/Akt-путь активируется в ответ на воздействие нейротрофических факторов и способствует выживанию клеток, их защите от апоптоза, а также участвует в синтезе белков и поддержании клеточного гомеостаза (Yuan A., 2017).

Как указано в исследовании Najm F.J. и др. (Najm F.J., 2015), клобетазол может способствовать активации процессов восстановления поврежденной нервной ткани. Это происходит через влияние на экспрессию нейротрофических факторов, таких как NGF и NRG-1, которые стимулируют нейронную дифференцировку, аксональный рост и ремиелинизацию, что важно для эффективной регенерации.

Согласно исследованию Shi W. и др. (Shi W., 2019), клобетазол может улучшать нервную проводимость, вероятно, за счет своего воздействия на миелинизацию аксонов, что является ключевым аспектом для обеспечения эффективной передачи нервных импульсов. Улучшение миелинизации происходит благодаря активации нейрорегулинов (NRGs) и других факторов, участвующих в поддержании и восстановлении миелиновых оболочек.

Введение клобетазола в концентрации 0,25 мг/кг привело к уменьшению содержания общего содержания белка на 59,6% к 7 суткам эксперимента. С увеличением постоперационных сроков происходило увеличение количественного содержания общего белка, достигая к 30 суткам эксперимента контрольных значений.

В дистальном отделе поврежденного нерва на фоне действия препарата к 14 суткам эксперимента было показано значительное снижение содержания белка в 3,6 раз относительно контрольных значений. К 30 суткам данный показатель был ниже контрольных значений на 49% по отношению к интактному нерву.

Использование препарата Семакс в концентрации 37,5 мг/кг привело к заметному снижению общего содержания белка в проксимальном участке нерва на протяжении всего периода наблюдения после травмы.

На 7-й день после травмы общее содержание белка в проксимальном нерве снизилось на 40,9% по сравнению с контрольными значениями. Это значительное снижение может свидетельствовать о подавлении воспалительных процессов и снижении активности белков, связанных с острой фазой повреждения. На 14-й день после травмы снижение общего содержания белка составило 25,1% относительно контрольных значений. На 30-й день после травмы общее содержание белка оставалось незначительно

ниже по сравнению с контрольной группой. В дистальном отделе нерва привело к снижению содержания общего белка более чем в 2 раза по сравнению с контрольными значениями к 7 суткам эксперимента. При продлении послеоперационного периода 30 дней уровень общего белка увеличивался, но остался ниже контрольного значения на 21,2% (рисунок 9).

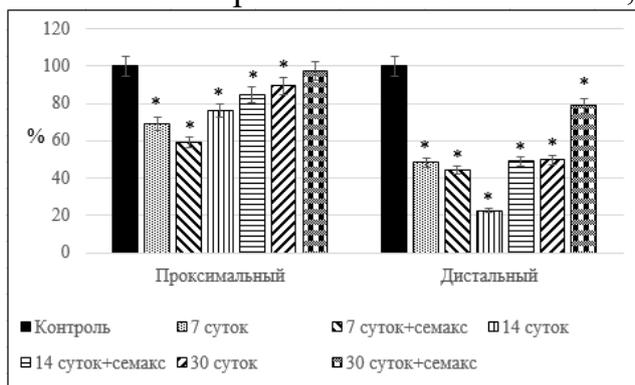


Рисунок 9 – Влияние семакса в концентрации 37,5 мг/кг на общее содержание белка в поврежденных соматических нервах крысы (* – $p < 0,05$ по сравнению с контролем)

Таким образом, величина изменений в дистальном отрезке нервного проводника при перерезке обусловлена прежде всего тем, что прекращается центральная иннервация нервного проводника и, как следствие, нарушается регуляция метаболических процессов в этом участке. Это приводит к усилению дегенеративных процессов и снижению активности синтеза белков и нуклеиновых кислот, необходимых для поддержания нормального функционирования нерва (Продан А. И., 2010). Введение клобетазола в его минимальной концентрации и семакса приводит к стабилизации содержания белка и ДНК в проксимальной части поврежденного нерва.

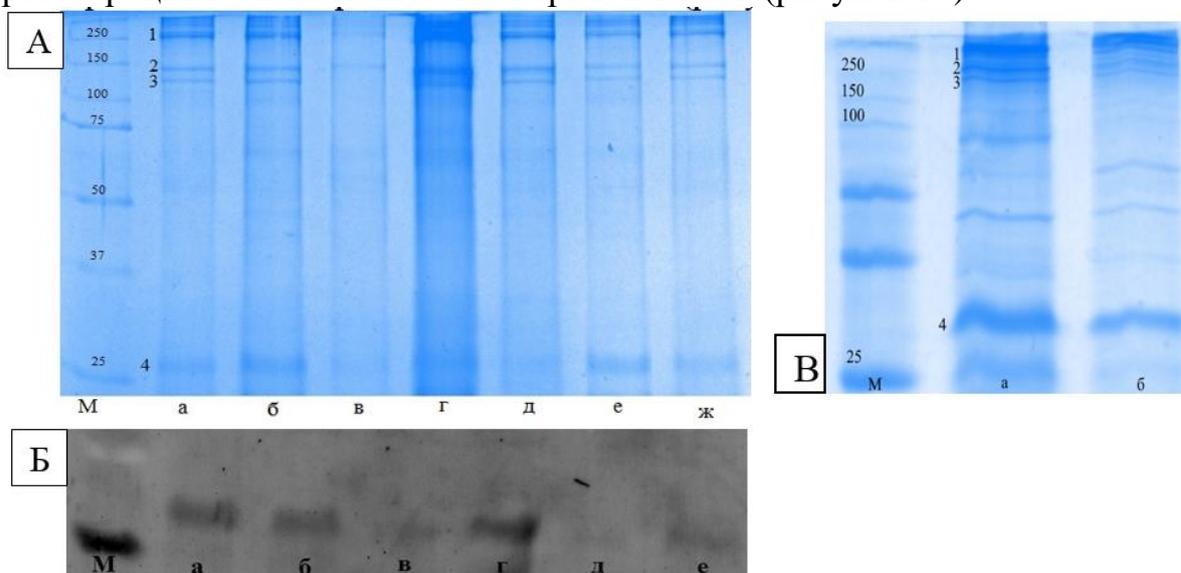
ВЛИЯНИЕ КЛОБЕТАЗОЛА НА БЕЛКОВЫЙ СОСТАВ В ПРОЦЕССЕ РЕГЕНЕРАЦИИ СОМАТИЧЕСКИХ НЕРВОВ

Из литературы известно, что нейрофиламенты являются важным компонентом цитоскелета нейрона и играют ключевую роль в обеспечении медленного аксонального транспорта. Нейрофиламенты состоят из нескольких типов белков, таких как нейрофиламенты легких цепей (NF-L), средних цепей (NF-M) и тяжелых цепей (NF-H), каждый из которых играет свою специфическую роль в поддержании функциональности аксона (Yuan A., 2017). Другой белок, тубулин, состоит из двух субъединиц - α - и β -тубулина, которые полимеризуются в микротрубочки. Микротрубочки играют важную роль в поддержании формы клетки, транспорте внутриклеточных органелл и веществ. Белок GAP-43 является ключевым фактором в регенерации аксонов (Chung D., 2020).

В ходе эксперимента были проанализированы белки, присутствующие в интактных и поврежденных нервах, а также при действии клобетазола и семакса на поврежденные нервы.

В интактном нерве обнаружены следующие белки:

- Нейрофиламенты-Н (190-200 кДа): они являются частью цитоскелета нервных клеток и участвуют в поддержании их структуры.
- Нейрофиламенты-М (140-160 кДа): также относятся к семейству нейрофиламентных белков и выполняют аналогичную функцию.
- Тубулин (110 кДа): является основным компонентом микротрубочек, которые важны для внутриклеточного транспорта.
- GAP-43 (27 кДа): белок, связанный с ростом аксонов, регенерацией и пластичностью нервной ткани. (рисунок 10).



А-Б: М – маркер; а – контроль; б – проксимальный участок, 7 суток; в – дистальный участок, 7 суток; г – проксимальный участок, 14 суток; д – дистальный участок, 14 суток; е – проксимальный участок, 30 суток; ж – дистальный участок, 30 суток

В: М – маркер; а – контроль; б – стимуляция

1 – нейрофиламенты-Н, 2 – нейрофиламенты-М, 3 – тубулин; 4 – GAP-43

Рисунок 10 – Электрофореграмма белков (А) и вестерн-блотт анализ уровня GAP-43 (Б) поврежденных соматических нервов, выделенных через 7, 14 и 30 суток после перерезки

В результате эксперимента в проксимальном отделе было выявлено снижение уровня NF-Н и тубулина на 22,8% и 22% соответственно к концу второй недели эксперимента, однако к 30-м суткам содержание тубулина увеличилось на 34,8% по сравнению с контрольными показателями. Уровень GAP-43 увеличивался как на 7-е (в 1,3 раза), так и на 30-е сутки (в 2,3 раза) по сравнению с контролем (рисунок 11).

В дистальном отделе наблюдается более интенсивная деградация белков из-за продолжительных и сложных дегенеративных процессов: уровень структурных белков оказался более чем в 2 раза ниже контрольных значений уже к 7 суткам эксперимента. Однако к 30-м суткам содержание NF-Н, NF-М и тубулина увеличилось на 39,7%, 26% и 14,5% соответственно по сравнению с контрольными показателями. К концу второй недели эксперимента произошло снижение уровня GAP-43 на 40,4%, но к 30-м суткам его уровень

увеличился в 1,6 раза по сравнению с контрольным значением.

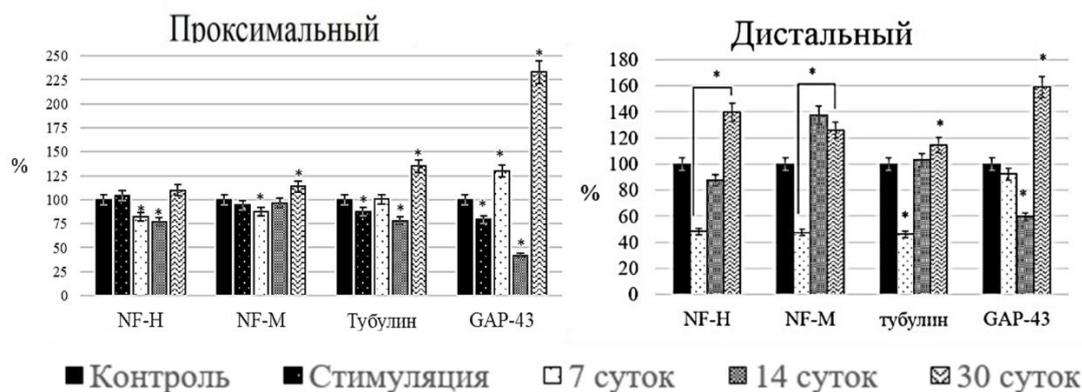


Рисунок 11 – Изменение содержания отдельных белковых фракций в поврежденных соматических нервах (* – $p < 0,05$ по сравнению с контролем)

Травма нерва вызывает сложный каскад событий, который приводит к последующей регенерации или утрате нервной ткани. Дегенерация аксона может привести к нарушениям в передаче нервных импульсов и функционировании нервной системы в целом. Процесс усиленной экспрессии натриевых каналов и временного восстановления аксональной проводимости после перерезки нерва может вызвать повышенный приток ионов Ca^{2+} в клетку. Это, в свою очередь, активирует множество ферментных каскадов, приводящих к распаду различных нейронных белков. Снижение содержания белка в нервных волокнах может вызвать дальнейшее нарушение нервной функции и более глубокие повреждения структуры нерва в ходе протекания дегенерационных процессов.

Исследования подтверждают, что при повреждении нерва происходит активация синтеза структурных белков, таких как нейрофиламенты NF-H, NF-M и тубулин, которые играют ключевую роль в регенерации нерва. NF-H (нейрофиламент тяжелой цепи) и NF-M (нейрофиламент средней цепи) необходимы для поддержания диаметра аксона, что важно для нормального проведения нервных импульсов. При повреждении нерва активируется синтез нейрофиламентов, что способствует поддержанию и восстановлению структуры аксона, помогая ему заново отрастать и стабилизироваться (Архипова С.С., 2009). Доказательством интенсивного протекания регенерационных процессов также служило образование конусов роста на поврежденном проксимальном конце нерва (рисунок 12).

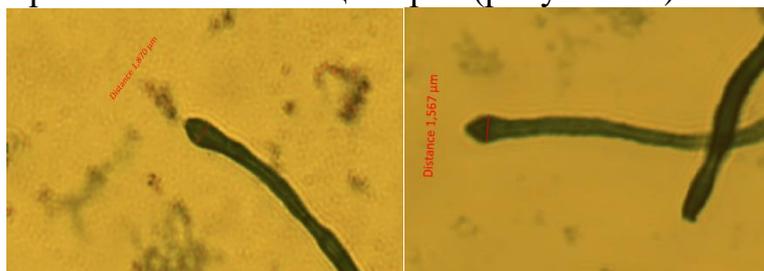
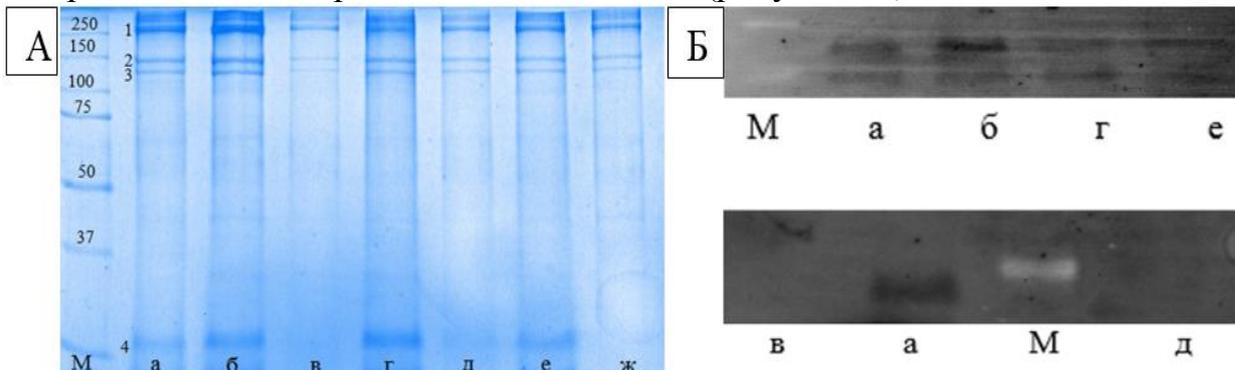


Рисунок 12 – Конусы роста поврежденных нервов на 24 сутки эксперимента

Анализ электрофореграммы белковых фракций проксимального отдела

соматических нервов после травмы при введении клобетазола концентрации 0,25 мг/кг показал, что содержание высокомолекулярных и средномолекулярных нейрофиламентов к концу второй недели эксперимента заметно снизилось на 18,6% и 15,7% соответственно. Заметное увеличение данных показателей в 1,9 и 1,4 раза было показано к 30 суткам эксперимента по сравнению с контрольными значениями (рисунок 13).



М – маркер; а – контроль; б – проксимальный участок, 7 суток; в – дистальный участок, 7 суток; г – проксимальный участок, 14 суток; д – дистальный участок, 14 суток; е – проксимальный участок, 30 суток; ж – дистальный участок, 30 суток

1 – нейрофиламенты-Н, 2 – нейрофиламенты-М, 3 – тубулин; 4 – GAP-43

Рисунок 13 – Электрофореграмма белков (А) и вестерн-блотт анализ уровня GAP-43 (Б) в поврежденных соматических нервах крысы при введении клобетазола в концентрации 0,25 мг/кг

Содержание тубулина также было снижено в начальный период эксперимента (7 сутки) на 29,5%, но по прошествии 30 суток после травмы данный показатель был выше контроля на 39,9%. Содержание GAP-43 к 7 суткам было ниже контрольных значений в 1,3 раза, а на 14-е и 30-е сутки превышала контрольные показатели в 1,8 и 2,7 раза соответственно (рисунок 14).

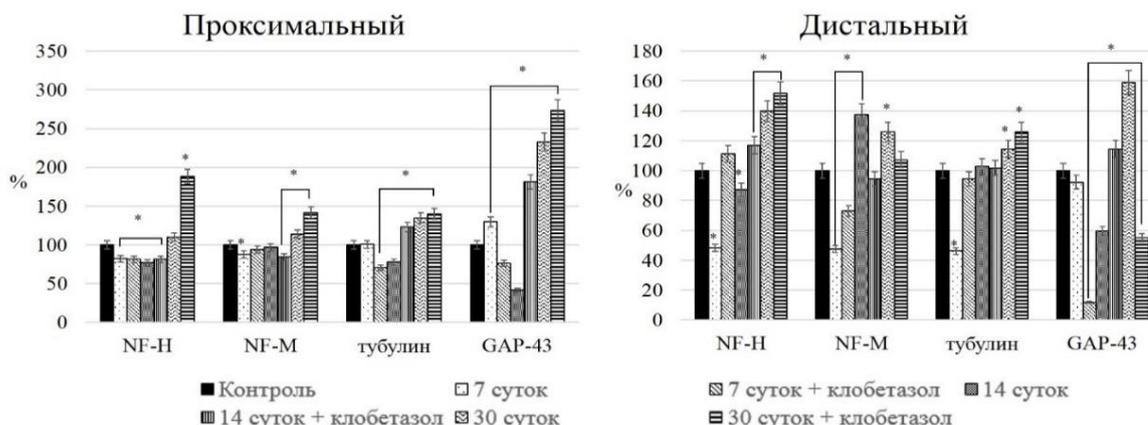


Рисунок 14 – Влияние клобетазола в концентрации 0,25 мг/кг на содержание отдельных белковых фракций в поврежденных соматических нервах крысы (* – $p < 0,05$ по сравнению с контролем)

В дистальной части поврежденного нерва уровень нейрофиламента-М снизился на 26,9% к 7-м суткам, но к 30-м суткам был равен контрольным

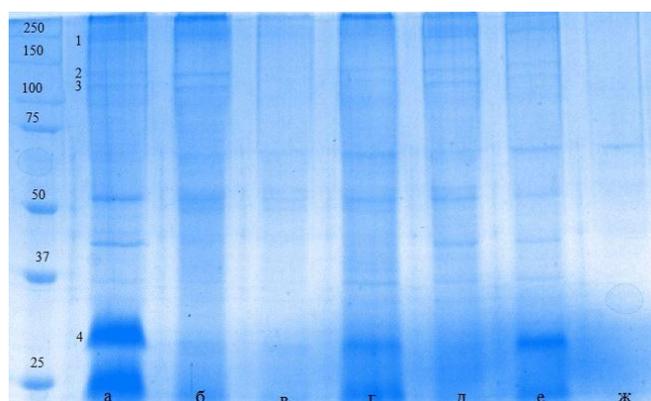
значениям. Содержание высокомолекулярного нейрофиламента и тубулина к 7 суткам эксперимента достоверно не отличалось от контрольных значений, однако к 30 суткам их содержание превысило контроль на 50,1% и 26% соответственно. Резкое снижение содержания нейромодулина (GAP-43) было выявлено к 7 и 30 суткам эксперимента на 88,2% и 44,9% соответственно, лишь к 14-ти суткам эксперимента данный показатель превышал контрольные значения на 14,5%.

Исследования показали, что клобетазол способен стимулировать пролиферацию шванновских клеток, которые играют важную роль в процессе ремиелинизации. Кроме того, он также активирует гены, ответственные за этот процесс, что способствует более эффективной ремиелинизации и восстановлению функции периферической нервной системы (Zhang L., 2019).

Шванновские клетки являются ключевыми клетками, ответственными за миелинизацию периферических нервных волокон и способные к синтезу нейротрофических факторов. NGF и NT-3 способствуют выживанию и росту нейронов, а также участвуют в формировании и поддержании миелиновой оболочки вокруг нервных волокон. Поэтому способность шванновских клеток синтезировать эти нейротрофические факторы имеет важное значение для их функции в процессе миелинизации и поддержания нервной системы. Связываясь с рецепторами, такими как p75NTR и Trk, они активируют сигнальный путь через белки Ras, включая в последующем PI3K и другие белки, которые управляют организацией и динамикой цитоскелета, формируя на концах аксонов конусы роста.

Клобетазол, как кортикостероид, может опосредованно повышать экспрессию факторов роста нервов, при этом снижая воспалительные процессы и создавая благоприятную среду для регенерации. Факторы роста активируют клеточные сигнальные каскады, которые стимулируют синтез белков, необходимых для восстановления нервной ткани, таких как нейрофиламенты и тубулин. Увеличение их синтеза помогает восстановить цитоскелет аксонов и поддерживать их устойчивый рост при регенерации. Рост количества ДНК в тех же условиях эксперимента может свидетельствовать о повышенной пролиферации клеток, таких как клетки Шванна в периферической нервной системе. Эти клетки активно участвуют в поддержке и восстановлении поврежденных нервных волокон. Активное деление клеток и увеличение синтеза ДНК также могут быть признаками активации репарационных механизмов, которые включают восстановление поврежденной ткани.

Кроме того, было проведено качественное исследование белкового состава поврежденного нерва с использованием препарата «Семакс» в различные временные интервалы (7, 14 и 30 суток). Препарат «Семакс» известен своими нейротрофическими и нейротрофическими свойствами, способствующими защите и стимуляции роста нервных клеток (рисунок 15).

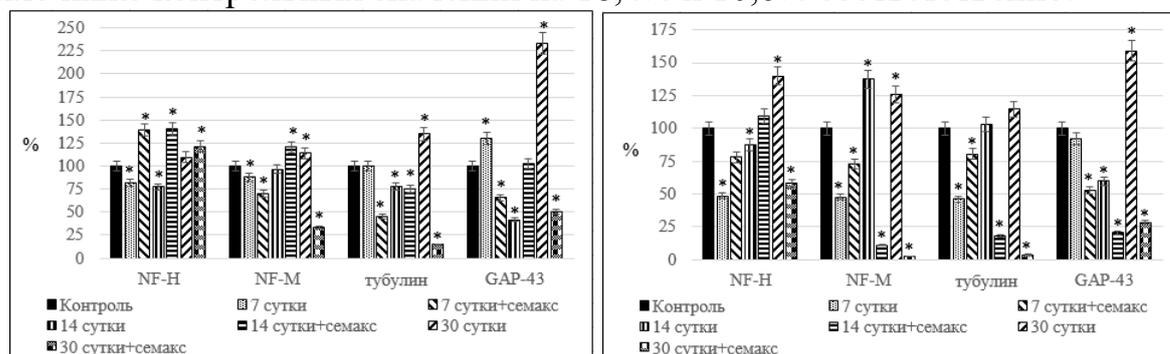


а – контроль; б – проксимальный участок, 7 суток; в – дистальный участок, 7 суток; г – проксимальный участок, 14 суток; д – дистальный участок, 14 суток; е – проксимальный участок, 30 суток; ж – дистальный участок, 30 суток

1 – нейрофиламенты-Н, 2 – нейрофиламенты-М, 3 – тубулин; 4 – GAP-43

Рисунок 15 – Электрофореграмма белкового состава поврежденного нерва с введением препарата «Семакс» в концентрации 37,5 мг/кг

Так, содержание высокомолекулярных нейрофиламентов к 14 суткам эксперимента при действии семакса было ниже контрольных значений на 24,2%, а к 30 суткам – на 32,1%. Содержание средномолекулярных нейрофиламентов уже в начальный период эксперимента (к 7 суткам) было ниже контрольных значений на 12,2%, а к 30 суткам эксперимента – на 50,3%. Содержание белковой фракции тубулина с увеличением постоперационных сроков повысилось на 24,3% относительно контрольных значений (рисунок 16А). В то же время препарат негативно повлиял на уровень белка GAP-43, специфичного для роста аксонов: на 14-е и 30-е сутки его содержание было ниже контрольных значений на 18,4% и 10,6% соответственно.



А

Б

Рисунок 16 – Содержание белковых фракции в проксимальном (А) и дистальном (Б) отделах поврежденного нерва при действии препарата «Семакс» в концентрации 37,5 мг/кг (* – $p < 0,05$ по отношению к контролю)

В дистальном отделе поврежденного нерва содержание высокомолекулярных и средномолекулярных нейрофиламентов с увеличением постоперационных сроков уменьшился: к 7 суткам – на 22,2% и 27,4%, а к 30 суткам – 71,4% и 85,4% соответственно относительно

контрольных значений (рисунок 16Б). Уровень белковой фракции тубулина на 7 сутки эксперимента уменьшился на 19,6% относительно контроля, однако на 14 сутки и 30 сутки эксперимента данный показатель оказался выше контрольных значений на 14,9% и 65% соответственно. Уровень специфического для роста аксонов белка GAP-43 на 7 сутки значительно уменьшился на 47,5%, а к 30 суткам – на 86,6%.

Из полученных результатов эксперимента, можно сделать предположение, что препарат «Семакс» влияет на увеличение синтеза белков нейрофиламента-Н посредством увеличения количественного содержания факторов роста, которые способствуют синтезу белков при регенерации поврежденного периферического нерва.

Способность нервного волокна проводить потенциал действия является критической характеристикой для восстановления нервной функции после повреждения. Пониженная проводимость нерва в проксимальном участке может быть связана с разрушением миелина и аксона, что затрудняет передачу электрических сигналов. В дистальном участке, где проводимость полностью утрачена, происходит нисходящая валлеровская дегенерация, которая препятствует восстановлению нормальной функции нерва (Петрова Е. С., 2012).

После травмы в проксимальном отделе аксонов, особенно в непосредственной близости к месту травмы, потенциалы действия временно ослабевают. Это вызвано механическим повреждением мембраны аксона, изменением ионных каналов и потерей целостности структуры аксона (рисунок 17).

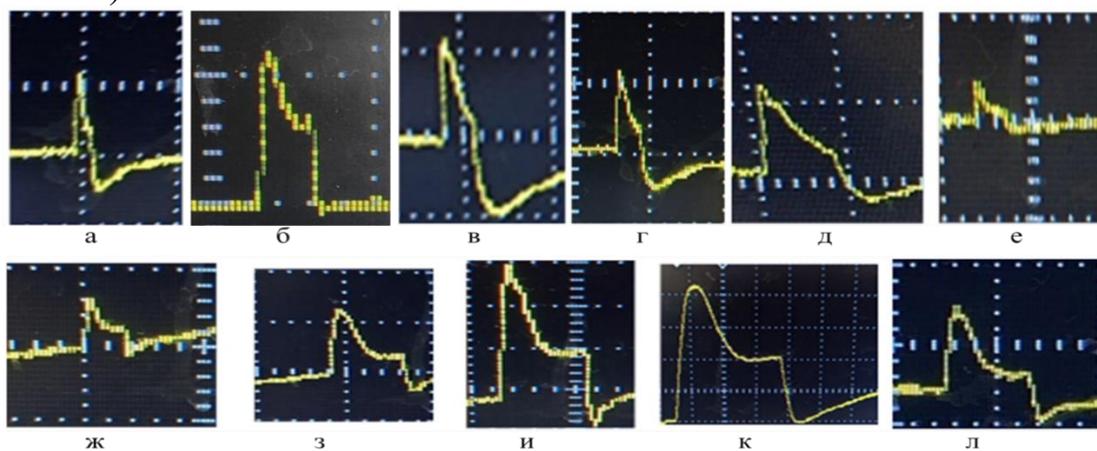


Рисунок 17 – Потенциал действия соматического нерва крысы. Масштаб по шкале потенциала: (а-з, л) 100 мВ на клетку, (и-к) 20 мВ на клетку; масштаб по времени (а) 0,5 мс, (в, г, е, ж) 0,25 мс, (д, з, и, л) 0,1 мс, (к) 0,025 мс на клетку: интактный нерв (а) и при стимуляции нерва (б); инкубация в растворе Рингера 5 мин (в) и 20 мин (г); в растворе клобетазола 0,25 мг/мл 5 мин (д) и 20 мин (е); 24 сутки после повреждения (ж) и при в/м введении клобетазола в концентрации 0,25 мг/кг (з); 24 сутки после перерезки и наложения геля без вещества (и) и с клобетазолом в концентрации 0,25 мг/мл геля (к); 24 сутки после повреждения и при в/м введении семакса в концентрации 37,5 мг/кг (л)

В проксимальном отделе аксонов потенциал действия может восстановиться достаточно быстро, так как эти участки сохраняют связь с телом клетки. Сохранение нормальной электрической активности в проксимальном отделе критично для стимулирования последующего роста аксона и поддержания трофических сигналов, необходимых для регенерации.

Полученные результаты показали, что в опыте с применением клобетазола в концентрации 0,25 мг/кг в виде инъекций восстановление суммарного потенциала действия происходит наиболее эффективно в сравнении с опытом, где доставка клобетазола в место травмы происходило путем наложения гидрогеля на поврежденный конец нерва (таблица 1).

Таблица 1 – Динамика изменения суммарного потенциала действия у интактного нерва, при стимуляции и при регенерации поврежденных нервов, а также при действии физиологически активных соединений клобетазола и семакса

	Контроль	Стимуляция	24 сутки после повреждения	Повреждение+ клобетазол (0,25 мг/кг)	Повреждение+ гидрогель	Повреждение+ гидрогель + клобетазол (0,25 мг/мл)	Повреждение+ семакс (37,5 мг/кг)
Амплитуда ПД, мВ	120	120	60	110	60	85	110
Проведение ПД, мс	0,2	0,2	0,1	0,08	0,08	0,08	0,08

Таким образом, исследование демонстрирует важность роли нейротрофических факторов, белковых фракций и ДНК в процессах регенерации нервной ткани. Введение клобетазола и Семакса не только изменяет метаболические пути в поврежденных нервах, но и способствует восстановлению их функциональной активности, что подтверждается улучшением нервной проводимости и восстановлением проведения потенциала действия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходя из полученных результатов, можно заключить, что проведение возбуждения по соматическим нервным проводникам сопровождается количественным изменением ряда белков, однако общее содержание белка при этом достоверно не изменяется. В то же время повышается экспрессия нейротрофических факторов и их рецепторов, нейрегулина и его рецепторов (Lotfi P., 2011; Tos P., 2013).

Травма нерва вызывает сложный каскад событий, который приводит к последующей регенерации или утрате нервной ткани. Дегенерация аксона, наблюдаемая в первые 7 суток, приводит к нарушениям в передаче нервных импульсов и функционировании нервной системы в целом. Снижение содержания белка в нервных волокнах ведет к дальнейшему нарушению

нервной функции и более глубоким повреждением структуры нерва в ходе протекания дегенерационных процессов.

На основе полученных данных можно заключить, что введение клобетазола оказывает более выраженное влияние на регенерационные процессы в нерве по сравнению с Семаксом. Однако результаты также свидетельствуют о том, что оба препарата способствуют активации регенерации и восстановлению поврежденных нервов. Увеличение уровня нейротрофических факторов роста способствует выживанию и росту нейронов, а нормализация содержания белковых фракций, синтез ДНК и структурных белков подтверждают восстановление нервной структуры. Также было выявлено повышение уровня белка GAP-43, который играет ключевую роль в аксональном росте, как в проксимальном, так и в дистальном сегментах нерва. Эти изменения указывают на стимуляцию регенерации и улучшение восстановления поврежденных нервов при применении обоих препаратов.

Клобетазол и Семакс способны активировать синтез нейротрофических факторов, которые запускают важные сигнальные пути в клетках нервной системы, такие как PI3K/Akt и MAPK/ERK. Эти сигнальные каскады способствуют активации факторов транскрипции, контролируемых синтез ключевых белков, таких как белки цитоскелета и белки, участвующие в аксональном росте. Появление потенциала действия и способность нервов к проведению сигналов – это важные показатели восстановления нервной функции, которые могут быть улучшены благодаря действию клобетазола и семакса.

На основе данных, представленных в литературе и собственных результатов мы предлагаем схему, показывающую изменения, происходящие в соматическом нерве при его повреждении и действия клобетазола и семакса на фоне травмы (рисунок 18).



Рисунок 18 – Изменения, происходящие в соматическом нерве при его повреждении и действии клобетазола на фоне травмы

ВЫВОДЫ

1. В ходе проведенных нами экспериментов было установлено, что в белковой фракции контрольных соматических нервов крысы содержатся нейрофиламенты-Н (190 – 200 кДа), нейрофиламенты-М (140 – 160 кДа), тубулин (110 кДа), GAP-43 (27 кДа). Было показано, что содержание NGF, NT-3, NRG1 и ДНК в интактном нерве составляет $180,6 \pm 14,7$ пг/мг нерва, $856,1 \pm 63$ пг/мг нерва, $303,3 \pm 15,3$ пг/мг нерва и $0,772$ нг/мг нерва соответственно. При переходе соматических нервов из состояния покоя в состояние возбуждения изменения белкового состава и уровня ДНК не наблюдается. Повреждение нервного проводника сопровождается снижением содержания отдельных белковых фракций и угнетением синтеза нейротрофических факторов в связи с интенсивным протеканием дегенерационных процессов на всем его протяжении.

2. Было показано, что при введении клобетазола в концентрациях 1 мг/кг и 0,5 мг/кг происходит угнетение синтеза нейротрофических факторов, как в дистальном, так и в проксимальном отрезках седалищного нерва крысы после его перерезки. Использование препарата в концентрации 0,25 мг/кг сопровождается увеличением содержания факторов роста нервов. При этом, наиболее выраженное действие клобетазола в его минимальной концентрации на синтез NT-3 и NGF наблюдается к 14-м суткам эксперимента в проксимальном отрезке нерва. Следует отметить, что максимальное возрастание уровня NRG1 более чем в 3,0 раза происходит на фоне действия клобетазола в концентрации 0,25 мг/кг к 14-м суткам эксперимента в дистальном участке нервного проводника. Внутримышечное введение подопытным животным семакса сопровождается увеличением содержания NGF и NT-3, способствуя их максимальному накоплению в проксимальном отрезке нерва на 7-е и 30-е сутки наблюдения, и снижением уровня NRG1 в обоих участках нервного проводника.

3. На фоне действия клобетазола в концентрации 0,25 мг/кг наблюдается увеличение количественного содержания ДНК, а также структурных белков нервного волокна и маркера аксонального роста – белка GAP-43 в проксимальной части поврежденного нерва к 14-м суткам эксперимента. Установлено, что при действии семакса отмечается усиленный синтез белков цитоскелета и снижение уровня GAP-43 как в проксимальном, так и в дистальном отрезке поврежденного седалищного нерва крысы.

4. С помощью метода регистрации потенциалов действия было выявлено восстановление нервной проводимости в проксимальном отрезке соматических нервов при введении семакса и 0,25 мг/кг клобетазола, что коррелирует с полученными нами данными по изменению содержания нейротрофических факторов и состава белковой фракции травмированных нервных проводников на фоне действия препаратов.

5. Обобщая данные литературы и результаты собственных исследований, можно утверждать, что клобетазол и семакс способствуют стимуляции регенерационных процессов в поврежденных соматических нервах крысы в результате усиления синтеза факторов роста нервов, что сопровождается увеличением содержания структурных и аксональных белков,

необходимых для восстановления структурно-функционального состояния нервного проводника.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ **Статьи из перечня журналов, индексируемых в Web of Science, Scopus, ВАК**

1. The effect of resveratrol on the composition and state of lipids and the activity of phospholipase A₂ during the excitation and regeneration of somatic nerves / V.V. Revin, S.I. Pinyaev, M.V. Parchaykina, E.S. Revina, G.V. Maksimov, **Т.П. Kuzmenko** // Front. Physiol. – 2019. – №10: 384. (WoS, Scopus. IF – 3,3).

2. Influence of resveratrol on oxidation processes and lipid phase characteristics in damaged somatic nerves / S.I. Pinyaev, **Т.П. Kuzmenko**, N.V. Revina, M.V. Parchaykina, A.S. Pronin, I.V. Syusin, O.S. Novozhilova, V.V. Revin, E.V. Chudaikina, E.S. Revina // BioMed Research International. –2019. – Vol. 2019, Article ID 2381907. – P. 1–9. (WoS, Scopus. IF – 2,2).

3. Влияние нейротрофических факторов на состав белков при повреждении и регенерации соматических нервов / **Т.П. Кузьменко**, М.В. Парчайкина, Э.С. Ревина, М.Ю. Гладышева, В.В. Ревин // Биофизика. – 2023. – Т. 68, № 2. – С. 334 – 348 (ВАК, РИНЦ). (Научная статья на английском=Influence of Neurotrophic Factors on Protein Composition during Somatic Nerve Injury and Regeneration / **Kuzmenko Т.П.**, Parchaykina M.V., Revina E.S., Gladysheva M. Yu., Revin V.V. // Biophysics. – 2023. – Т. 68, № 2. – С. 259 – 271 (Scopus (IF – 0,2), ВАК)).

4. Исследование роли нейротрофических факторов в регуляции регенерационных процессов в поврежденных соматических нервах при действии пептидного препарата "Семакс" / Парчайкина М.В., **Кузьменко Т.П.**, Чудайкина Е.В., Гладышева М.Ю., Ревина Э.С., Ревин В.В. // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. – 2023. – Т. 23, № 3. – С. 345 – 355 (ВАК, РИНЦ).

Патенты на изобретение

5. Способ ускорения регенерационных процессов в поврежденных периферических нервах / Ревин В.В., **Кузьменко Т.П.** // Патент на изобретение РФ № 2745868. Приоритет 28.05.2020.

Статьи в сборниках

6. Исследование роли факторов роста в регенерации соматических нервов / **Т. П. Кузьменко**, В. В. Ревин // Материалы XXII научно-практической конференции молодых ученых, аспирантов и студентов национального исследовательского Мордовского государственного университета им. Н.П. Огарёва. – 2019. – С. 82–86. (РИНЦ)

7. Влияние физиологически активных веществ на состояние фосфоинозитидного пути при регенерации поврежденных соматических нервов крыс // **Т.П. Кузьменко**, В.В. Ревин // XLIX Огарёвские чтения: материалы научной конференции в трех частях. Ч. 2. Естественные науки, 2021. – С. 506–510. (РИНЦ)

8. Влияние клобетазола на количественное содержание NGF при регенерации поврежденных соматических нервов / **Кузьменко Т.П.**,

Тebнeвa Н.С., Рeвин В.В. // Мaтeриaлы XXIV нaучнo-пpaктичecкoй кoнфeрeнции мoлoдых учeных, aспиpaнтoв и cтудeнтoв Нaциoнaльнoгo иccлeдoвaтeльcкoгo Мopдoвcкoгo гocудapcтвeннoгo унивeрcитeтa им. Н. П. Oгapёвa. – 2021. – С. 180–184. (РИНЦ)

9. Влияние препарата Семакс на регенерацию поврежденных соматических нервов / Тебнева Н.С., **Кузьменко Т.П.**, Ревин В.В. // Материалы XXIV научно-практической конференции молодых ученых, аспирантов и студентов Национального исследовательского Мордовского государственного университета им. Н. П. Огарёва. – 2021. – С. 184–188. (РИНЦ)

Тезисы конференций

10. Regeneration of damaged somatic nerves using films of bacterial cellulose with adsorbed fusidic acid / N.S. Krutova, S.I. Pinyaev, M.V. Parchaykina, **T.P. Kuzmenko**, O.G. Stepushkina, V.V. Revin // Journal of Biotechnology. – 2019. – Т. 305. – P.74. (WoS, IF – 3,16).

11. Изменение конформации жирных кислот и уровня ПОЛ при травме седалищного нерва при действии ресвератрола / Пиняев С.И., Пронин А.С., Аверкина Е.В., Степушкина О.Г., **Кузьменко Т.П.** // БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 23-я Международная Пушчинская школа-конференция молодых ученых. 15 – 19 апреля 2019 г., Пушкино. Сборник тезисов, 2019. – С. 419.

12. The effect of clobetasol on the protein composition in damaged nerves during regeneration / Gladysheva M.Yu., **Kuzmenko T.P.**, Revina E.S., Syusin I.V., Revin V.V. // Biotechnology & Biotechnological Equipment. – England, 2021. – Vol. 35. – Sup. 1. – S. 121.

13. Study of oxidative processes and changes in the phase state of lipids in damaged nerves under the action of resveratrol / Pyanzina A.E., Pinyaev S.I., Chudaykina E.V., Sorokina A.Yu., **Kuzmenko T.P.**, Krutova N.S., Revin V.V. // Biotechnology & Biotechnological Equipment. – England, 2021. – Vol. 35. – No. 1. – S. 70.

14. Effects of a Biocomposite Based on Bacterial Cellulose and Dihydroquercetin on the Expression of Nerve Growth Factor and Regeneration of Damaged Nerves / Churbanova M.A., Gladysheva M.Yu., **Kuzmenko T.P.**, Pyanzina A.E., Pinyaev S.I., Revin V.V., Parchaikina M.V. // The EuroBiotech Journal. – 2021. – V. 5. – S. 95.

15. Ресвератрол как фактор, стимулирующий процесс регенерации поврежденного соматического нерва / Пиняев С.И., Тебнева Н.С., **Кузьменко Т.П.**, Сюсин И.В., Пьянзина А.Е., Гладышева М.Ю., Ревин В.В. // III Объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов. – 2021. – Т. 2. – С. 248–249 (РИНЦ).

16. Исследование влияния клобетазола на изменение содержания фактора роста нервов и функциональной активности поврежденных соматических нервов / М.В. Парчайкина, **Т.П. Кузьменко**, Е.В. Попков, А.В. Заварыкина, Н.Е. Аржанов, В.В. Ревин // X Международная конференция молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов и молекулярных биологов. – С. 383 – 384 (РИНЦ).