

**Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Национальный исследовательский Мордовский государственный
университет имени Н. П. Огарёва»**

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
Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

**Научный руководитель
доктор биологических наук
профессор Ревин В.В.**

Саранск-2024

Содержание

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ДЕГЕНЕРАТИВНЫЕ И РЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ПОВРЕЖДЁННЫХ СОМАТИЧЕСКИХ НЕРВАХ И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ КЛОБЕТАЗОЛА И СЕМАКСА ПРИ ТРАВМАХ НЕРВОВ.....	10
1.1 Строение миелинизированного нервного волокна.....	10
1.2 Белковый состав нервного волокна.....	11
1.2.1 Белковый состав аксона	11
1.2.2 Белковый состав миелиновой оболочки.....	14
1.3 Факторы роста нервов и механизм их действия	18
1.4 Фосфоинозитидный путь	23
1.5 Регенерация нервного волокна	28
1.5.1 Состояние фосфоинозитидного пути при регенерации нерва	35
1.6 Влияние клобетазола и семакса на регенерацию соматических нервов	37
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	41
2.1 Материал исследования	41
2.2 Методы исследования	42
2.2.1 Подготовка и определение цитотоксичности гидрогеля.....	42
2.2.2 Регистрация потенциала действия нерва	43
2.2.3 Гомогенизация нервов.....	43
2.2.4 Определение содержания белка по методу Лоури	44
2.2.5 Определение концентрации ДНК.....	44
2.2.6 Определение факторов роста NGF и NT-3 в гомогенате ткани с помощью метода иммуноферментного анализа.....	45
2.2.7 Определение концентрации NRG-1 в гомогенате ткани с помощью метода иммуноферментного анализа.....	46
2.2.8 Электрофоретическое разделение белков в ПААГе и вестерн блотт	47
2.2.9 Статистическая обработка результатов.....	48
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	49

3.1 Влияние клобетазола и семакса на изменение концентрации NGF в поврежденных нервах	49
3.2 Влияние клобетазола и семакса на изменение концентрации NT-3 в поврежденных нервах	53
3.3 Изменение количественного содержания нейрорегулина-1 при действии клобетазола и семакса в процессе регенерации соматических нервов	56
3.4 Влияние клобетазола и семакса на изменение концентрации ДНК и содержания общего белка в поврежденных соматических нервах	58
3.5 Влияние клобетазола и семакса на белковый состав в процессе регенерации соматических нервов.....	69
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	86
ВЫВОДЫ	89
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	91

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. Поскольку важнейшей характеристикой, отражающей эффективность протекания регенерационных процессов, является способность нервных волокон проводить потенциал действия, 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 существует ряд агентов, которые могут усилить процесс регенерации нервной ткани. Особое внимание уделяется полифенолам растительного происхождения (Revin, 2019), компонентам внеклеточного матрикса (Gonzalez-Perez, 2013) и глюкокортикоидам, включая клобетазол (Najm, 2015), который доказал свою высокую эффективность в усилении миелинизации. Клобетазол способствует миелинизации клеток-предшественников олигодендроцитов путем связывания с глюкокортикоидными рецепторами (Morisaki, 2010).

По мнению Shi и его коллег, клобетазол может усиливать дифференцировку и пролиферацию нейростеволовых клеток за счет активации нейротрофических факторов (Fontana, 2012; Brushart, 2013; Shi, 2019). Эти факторы активируют сигнальные пути, способствующие дифференцировке и выживаемости нейронов, такие как PIK3/Akt и MAPK/ERK, связываясь с соответствующими рецепторами Trk и p75NTR. 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 адренокортикотропного 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; Bakaeva Z.V., Surin A.M., 2020).

Несмотря на многочисленные исследования, посвященные регенерации нервной ткани при действии клобетазола и препарата «Семакс», их роль в восстановлении поврежденных 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).

Функциональным проявлением активности нервной клетки является появление и проведение потенциала действия. Распространение возбуждения по нервным проводникам, а также изучение изменений молекулярных процессов при проведении возбуждения относится к основным и важнейшим задачам биофизики, физиологии и нейробиологии.

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. Для выявления регенерирующих аксонов в экспериментальных исследованиях наиболее часто используется белок GAP-43, который является нейроаксональным белком роста. Во время роста аксонов при развитии нейронов и регенерации аксонов в периферической и центральной нервной системе, синтез этого белка увеличивается.

1.2 Цели 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.

1.3 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.

1.4 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.

Материалы диссертационной работы представлены

Представление результатов диссертационного исследования для обсуждения происходило 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 и структура диссертационной работы

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.

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, содержит 49 рисунков.

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.

ГЛАВА 1. ДЕГЕНЕРАТИВНЫЕ И РЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ПОВРЕЖДЁННЫХ СОМАТИЧЕСКИХ НЕРВАХ И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ КЛОБЕТАЗОЛА И СЕМАКСА ПРИ ТРАВМАХ НЕРВОВ.

1.1 Строение миелинизированного нервного волокна

Седалищный нерв – крупнейший из стволов нервной системы позвоночных. Свое начало он берет в виде длинной ветви крестцового сплетения через подгрушевидное отверстие. Далее подразделяется на большеберцовый и общий малоберцовый нерв. Большеберцовый нерв отвечает за иннервацию задней группы мышц голени и мышц стопы. Общий малоберцовый нерв делится на два ветви: одна из них проникает глубоко, а другая располагается на поверхности (Царев А. А., 2008).

При анализе поперечного сечения миелинизированного нервного волокна седалищного нерва можно выделить следующие структурные компоненты: аксон, миелиновую оболочку, которая его окружает, и тело клетки Шванна, внутри которого находятся первые две структуры (рисунок 1) (Масгутов Р. Ф. 2015).

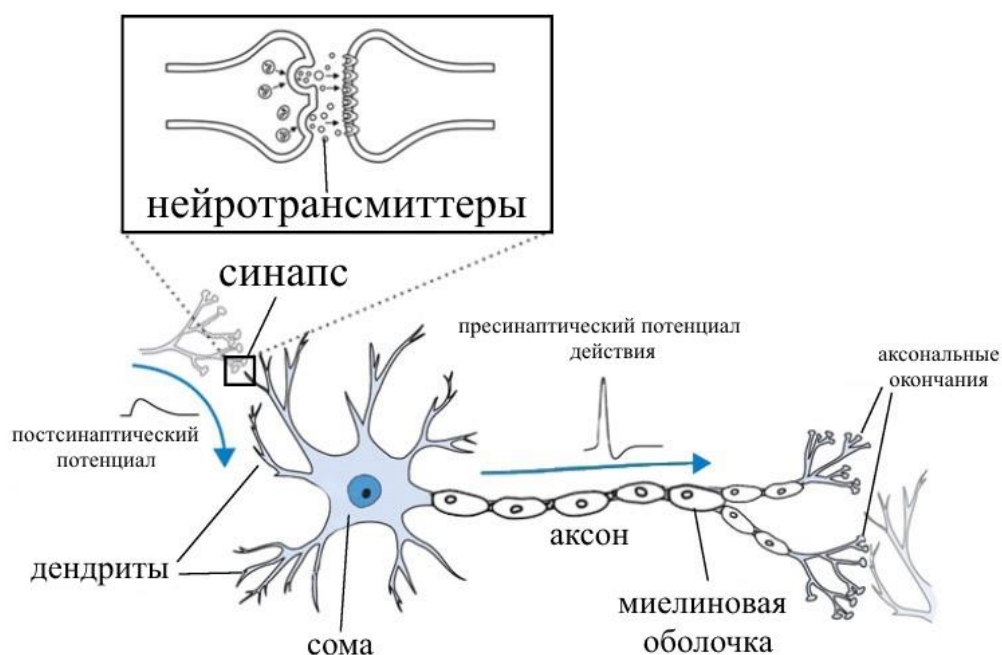


Рисунок 1 – Строение миелинизированного нервного волокна (Yamazaki K., 2022)

Функциональным субстратом, ответственным за проведение нервного импульса, является аксон или осевой цилиндр (Попель Л. С. 2016). Он является продолжением тела нейрона, расположенным в центре нервного волокна. Аксон не прерывается по всей длине и служит для передачи электрических импульсов от тела нейрона к другим клеткам или тканям. Длина аксона может варьировать в зависимости от его местоположения и функции в организме (Мухамедьяров М. А., 2012).

Диаметр аксона может изменяться на разных участках его длины. В точке выхода из тела нейрона, аксон обычно истончается, а затем утолщается в месте появления миелиновой оболочки. На уровне каждого перехвата он снова истончается примерно в половину. Нейрофибриллы представляют собой структуры внутри аксона, которые обеспечивают его структурную поддержку и транспорт молекул и структурных компонентов вдоль аксона. Перифибриллярное вещество, или аксоплазма, окружает нейрофибриллы и служит для поддержки и обеспечения необходимых метаболических процессов внутри аксона.

1.2 Белковый состав нервного волокна

1.2.1 Белковый состав аксона

Хотя изучение процесса восстановления нервных волокон началось несколько десятилетий назад, до сих пор не удалось решить проблему восстановления функций периферических нервов. Долгое время процессы разрушения и восстановления нервных волокон оценивали по изменениям их осевых цилиндров.

1) Белки нейрофиламентов.

Нейрофиламенты (NF) представляют собой важную структурную составляющую нейрона. Они относятся к классу промежуточных филаментов, которые играют ключевую роль в поддержании механической прочности и

структурной целостности клетки. Нейрофиламенты имеют диаметр около 8-10 нм и располагаются в цитоплазме нейрона, обеспечивая ему поддержку и форму.

Нейрофиламенты занимают место между микротрубочками и актиновыми филаментами по толщине и выполняют свои функции, включая участие в транспорте органических молекул, формирование и поддержание структуры аксона, а также в других процессах, связанных с функционированием нервных клеток. У нейрофиламентов также есть важное значение в поддержании длинных аксонов и обеспечении их функциональности за счет обеспечения эластичности и прочности нейронных процессов (Петрова Е. С., 2012.).

Нейрофиламенты представляют собой эластичные и волокнистые белки, представляющие механически устойчивые компоненты нейронального цитоскелета. Они считаются особенно стационарной и метаболически стабильной сетью (Yuan A., 2009), которая интегрирована в различные другие элементы цитоскелета, такие как микротрубочки и актиновые филаменты.

Нейрофиламенты составляют семейство из пяти промежуточных филаментов, которые различаются по их относительной кажущейся молекулярной массе на ДСН-полиакриламидных гелях. Самая большая из них – тяжёлая цепь нейрофиламента (NF-H), её молекулярная масса составляет 200 кДа. Далее по уменьшению молекулярной массы идут: средняя цепь (NF-M) – 145-160 килодальтон, лёгкая цепь (NF-L) – 67-69 килодальтон, α -интернексин (66 кДа) и периферин (57 кДа). Нейрофиламенты способствуют росту и стабильности аксонов как центральных, так и периферических нервов, а также поддержанию стабильности митохондрий и содержания микротрубочек (Коржевский Д. Э., 2010).

Поэтому одним из главных параметров при исследовании восстановительных процессов в травмированном нерве является анализ белков NF-M и NF-H, поскольку именно в длинных нервных волокнах периферической нервной системы содержится наибольшее количество белков NF-H, NF-M, NF-L (Петрова Е. С., 2012.).

2) Бета-тубулин III.

Бета-тубулин является одним из основных компонентов цитоплазматических микротрубочек и входит в семейство клеточных белков тубулинов. Микротрубочки, в свою очередь, состоят из димеров альфа- и бета-тубулина, которые образуют структуру цилиндрического вида и участвуют во многих жизненно важных процессах в клетке.

Бета-тубулин обладает свойствами полимеризации и деполимеризации, что позволяет микротрубочкам изменять свою длину и динамически организовывать клеточные структуры. Он также играет важную роль в транспорте внутриклеточных структур, включая органеллы, белки и РНК, а также участвует в клеточном делении и движении (Oakley B. R., 2006).

Бета-тубулин III – это белок, который встречается только в тканях нервных клеток. Он является одним из подтипов бета-тубулина, специфичных для нервной ткани, и играет важную роль в структуре и функционировании нейрональных аксонов. Одной из ключевых функций бета-тубулина III в нейронах является участие в реализации аксонального транспорта. Благодаря аксональному транспорту клетка способна обеспечивать поставку необходимых ресурсов и организовывать обмен информацией между аксоном и клеточным телом. Мутации или дефицит бета-тубулина III могут привести к нарушениям аксонального транспорта и, как следствие, к различным патологиям нервной системы (Svendsen C. N., 2007).

3) Белки, участвующие в росте аксонов

В экспериментальных исследованиях для выявления регенерирующих аксонов наиболее часто используется белок GAP-43 (нейромодулин, В-50). Этот мембранный фосфопротеин играет ключевую роль в процессе роста нейрональных аксонов. Белок, ассоциированный с ростом 43 (GAP-43), является исключительно нейрональным белком, связанным с развитием и регенерацией нервов, синаптической пластичностью, поиском аксональных путей и нейротрансмиссией. Экспрессия GAP-43 сильно повышена в конусах роста нейронов во время синаптогенеза, а после завершения процесса она снижается в большинстве

областей мозга, за исключением областей, участвующих в обучении и памяти, таких как неокортекс и гиппокамп в мозге взрослого человека. В нейронах GAP-43 преобладает в терминалях аксонов, обеспечивая модуляцию актинового цитоскелета.

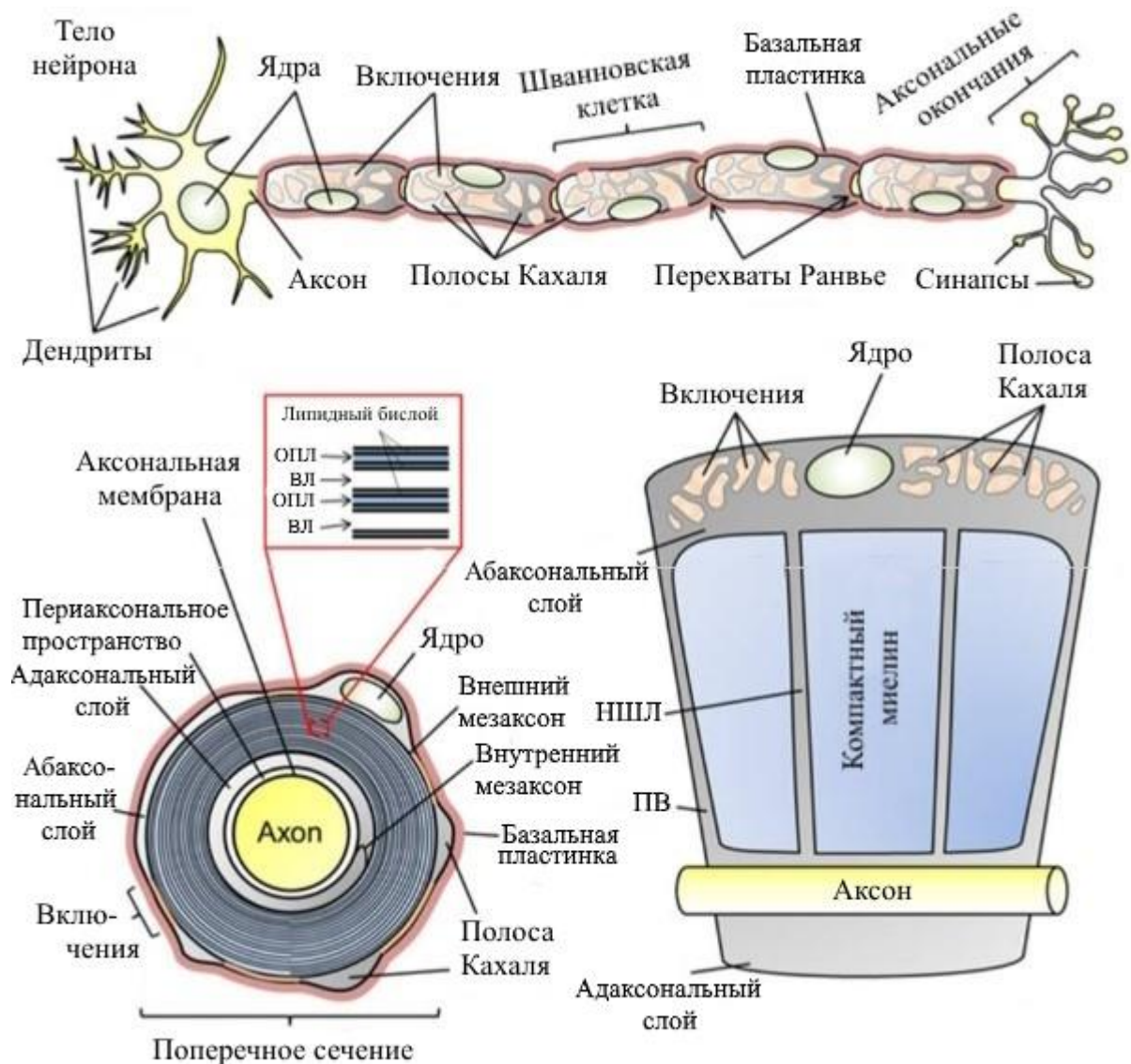
Белок GAP-43 в основном локализуется в конусе роста аксонов, а общие паттерны его экспрессии строго контролируются в процессе развития. Когда нервная система повреждена, уровень GAP-43 будет повышен. Прорастание аксонов, признак анатомической пластичности, может быть идентифицировано по повышенной экспрессии GAP-43 (McDonald D., 2006; Li Y., 2017).

Таким образом, увеличение синтеза GAP-43, а также тубулинов и нейрофиламентов, важных структурных белков, необходимых для роста и дифференциации нейронов, является ключевым аспектом регенерации поврежденного нерва.

1.2.2 Белковый состав миелиновой оболочки

Шванновские клетки покрывают миелином периферические аксоны и, в конечном счете, поддерживают выживание и функцию аксонов (Kim S., 2016). Подавляющее большинство миелиновой оболочки состоит из плотно уложенных многослойных протеолипидных мембран с низким содержанием воды, образующих компактный миелин (Aggarwal S., 2013). Компактность миелина характеризуется его изоляционными свойствами. Если миелин не является компактным, то он образует два слоя – абаксональный и адаксональный, которые находятся внутри и снаружи нервного волокна. К тому же, некомпактный миелин богат водой, а также содержит элементы цитоскелета и служит вспомогательным отделением в миелиновой оболочке (рисунок 2) (Fünfschilling U., 2012).

Узкое внеклеточное пространство между периодическими компактными миелиновыми мембранами называется внутримиелиновым компартментом. Богатая липидами миелиновая мембрана содержит большое количество холестерина, что очень важно для миелинизации.



ВЛ – внутрипериодная линия; НШЛ– надрезы Шмидта-Лантермана ОПЛ – внутрипериодная линия; ПВ – параноидальный воротник;

Рисунок 2 – Анатомия миелиновых оболочек (Raasakka A., 2020)

Миелиновая мембрана асимметрична: внеклеточный/интрамиелиновый монослой богат гликолипидами, тогда как цитоплазматический монослой преимущественно состоит из фосфолипидов и несет чистый отрицательный заряд. Этот заряд является одним из основных движущих факторов белково-липидных взаимодействий в миелине (Tuusa J., 2017; Raasakka A., 2017).

Упаковка компактного миелина настолько плотна, что исключает присутствие большинства белков. Белки миелина часто специфичны для миелиновой оболочки и многофункциональны.

1) Основной белок миелина

Основной белок миелина (ОБМ) играет важную роль в образовании миелиновой оболочки вокруг аксонов нервных клеток. Он является ключевым компонентом для строения и функционирования миелина, обеспечивая изоляцию аксонов и ускорение передачи нервных импульсов (Patzig J., 2011; Vassall K. A., 2015).

ОБМ проявляется в виде нескольких изоформ, возникающих в результате альтернативного сплайсинга. Они делятся на классические изоформы, которые в основном присутствуют в цитозоле, и изоформы Голли, которые подвергаются ядерной локализации и влияют на внутриклеточные уровни Ca^{2+} .

Все ОБМ являются основными белками из-за большого количества положительно заряженных остатков, что означает высокую изоэлектрическую точку (pI) и высокий положительный суммарный заряд при физиологическом pH.

ОБМ транслируется в цитоплазме, особенно во время уплотнения миелина, где его трансляция происходит локально, когда это необходимо (Torvund-Jensen J., 2014). Некоторые классические изоформы ОБМ, а также неклассические изоформы Голли локализуются в ядре, потенциально обладая ролью в дифференцировке олигодендроцитов.

ОБМ участвует в нескольких межбелковых взаимодействиях и, таким образом, действует как эффектор. ОБМ взаимодействует с Fyn-киназой (Smith G. S. T., 2012; De Avila M., 2014), элементами цитоскелета (Smith G. S. T., 2012; Boggs J. M., 2014) и кальмодулином, причем последнее взаимодействие зависит от Ca^{2+} . Взаимодействие с Fyn-киназой опосредуется через домен SH3, который ОБМ связывает через консервативный мотив PXXR. Взаимодействие потенциально влияет на дифференцировку олигодендроцитов, так как передача сигналов Fyn важна во время развития миелина.

Одной из основных функций ОБМ является способность образовывать устойчивые мембранные стопки при формировании компактного миелина. Этот процесс зависит от присутствия отрицательно заряженных липидов, особенно фосфатидилинозитолфосфатов, а также других липидов, таких как холестерин, сфингомиелин и фосфатидилэтаноламины (Widder K., 2020), а также от ионной силы, двухвалентных катионов. Отрицательный суммарный заряд фосфолипидной мембраны притягивает ОБМ, который связывается и частично складывается в процессе. Формируется промежуточное состояние до суммирования, которое отображает удлиненный ОБМ в качестве поверхности, которая может прилипнуть к мембране для нанесения (Snaidero N., 2017).

2) Миелин-ассоциированный гликопротеин

Гликопротеин, связанный с миелином (МАГ), является белком, который проявляет экспрессию как в центральной, так и в периферической нервной системе. МАГ производится в виде двух альтернативно сплайсированных изоформ, L- и S-МАГ. В ПНС S-МАГ доминирует по количеству, а делеция L-МАГ у мышей не приводит к демиелинизации ПНС (Myllykoski M., 2018).

S-МАГ локализуется гораздо более разнообразно в надрезах Шмидта – Лантермана, паранодальных петлях, адаксональной мембране, а также в виде кольцевых скоплений вокруг миелиновой оболочки в абаксональных и адаксональных мембранах. L-МАГ практически отсутствует у взрослых ПНС (Pronker M. F., 2016).

Оба цитоплазматических расширения МАГ взаимодействуют с Fyn-тирозинкиназой, которая абсолютно необходима для инициации нормальной миелинизации. Цитоплазматический домен S-МАГ является внутренне неупорядоченным и взаимодействует с Zn^{2+} и микротрубочками, что указывает на структурную роль некомпактного миелина (Myllykoski M., 2012; Raasakka A., 2020).

3) Периаксин

Периаксин (PRX) является наиболее распространенным некомпактным миелиновым белком ПНС, составляя 16% от общей массы белка (Guo T., 2020).

Существует две экспериментально подтвержденные изоформы PRX: короткая (S-PRX) и длинная (L-PRX) (Han H., 2014; Wang M. M., 2018). PDZ-домен обеспечивает как гетеро-, так и гомодимеризацию S- и L-PRX (Yang Y., 2017).

L-PRX – это ассемблер внутри абаксонального некомпактного миелина, связывающий дистрогликаны и интегрины вместе в мембранных включениях, образуя периаксиному. S-PRX образует гетеродимеры с L-PRX, что может позволить регулировать цитоплазматическую сборку, а также ядерный экспорт L-PRX. L-PRX в основном располагается в самом внешнем цитозольном компартменте миелинизированных Шванновских клеток (Kim J., 2016). При правильной местной ориентации L-PRX объединяет богатые структурные белковые комплексы мембран, связывая внеклеточную базальную пластинку с цитоплазматическими компонентами клеток Шванна (Raasakka A., 2020).

1.3 Факторы роста нервов и механизм их действия

В настоящее время существует более 50 известных факторов роста, которые направляют рост аксонов, формирование синапсов и обрезку аксонов и дендритов во время развития. У взрослых нейронов эти факторы способствуют их выживанию, аксональной пластичности и синаптической функции, включая доступность нейротрансмиттеров (Emanuelli C., 2014; Gibon J., 2017).

Факторы роста являются полифункциональными регуляторами и принадлежат классу цитокинов (Одинак М. М., 2005). Они играют ключевую роль в поддержании выживания и дифференцировки нейронов, а также участвуют в механизмах обучения и запоминания (Mohammad A. A., 2016).

Белки классического семейства нейротрофинов имеют схожую структуру. Пронейротрофины являются предшественниками нейротрофинов и состоят из двух частей: N-концевого продомена, содержащего сигнальный пептид, и C-концевого зрелого домена, который является активной формой нейротрофина. После синтеза пронейротрофины претерпевают посттрансляционные модификации, такие как

протеолитическое разделение N-концевого продомена, чтобы образовать зрелые нейротрофины (Rafieva L. M., 2016).

Активная форма нейротрофинов связывается с рецепторами A, B или C, связанными с тропомиозинкиназами (Trk), или с низкоаффинным рецептором паннейротрофина p75 (p75NTR). Рецептор TrkA демонстрирует высочайшее сродство к NGF (Düsedau H. P., 2019; Yamashita N., 2016). Основными цитозольно-эндосомальными путями, стимулируемыми TrkA, являются Ras-митоген-активируемая протеинкиназа (MAPK), внеклеточная сигнально-регулируемая киназа (ERK), фосфатидилинозитол-3-киназа (PI3K), Akt и фосфолипаза C (PLC)-γ. Связывание NGF с p75NTR запускает дополнительные сигнальные пути, которые в отсутствие коэкспрессируемого TrkA могут привести к апоптозу клетки. Известно, что NGF, образуемый нейронами гиппокампа и коры головного мозга, связывает TrkA и p75NTR и создает тримерный комплекс с NGF, что приводит к путям выживания нейронов (Capsoni S., 2013, Skaper S. D., 2012, Campagnolo L., 2014).

1) Фактор роста нервов.

В 1950-х годах Рита Леви-Монтальчини и Виктор Гамбург впервые обнаружили и изучили нейротрофин NGF (Hirose M., 2016). Связывание NGF с рецепторами p75NTR и TrkA, а также активация сигнальных путей, таких как MAPK/ERK и PI3K/Akt, регулируют процессы дифференциации и выживания нейронов, повышая их жизнеспособность (рисунок 3).

Регуляция этих сигнальных путей представляет собой ключевой механизм, благодаря которому NGF выполняет свои нейротрофные функции и оказывает влияние на различные аспекты развития нервной ткани (Cai Q., 2020; Galindo-Romero C., 2021; Kim J. E., 2020).

PI3K/Akt фосфорилирование нижестоящих белков модифицирует цитоскелет клетки во время подвижности и в конусе роста (Bradshaw R. A., 2015). Путь PLC-γ активируется, например, при связывании нейротрофного фактора роста с его рецептором TrkA. Это приводит к гидролизу фосфатидил-инозитол-4,5-бисфосфата (PIP2) в инозитолтрифосфат (IP3) и диацилглицерол (DAG).

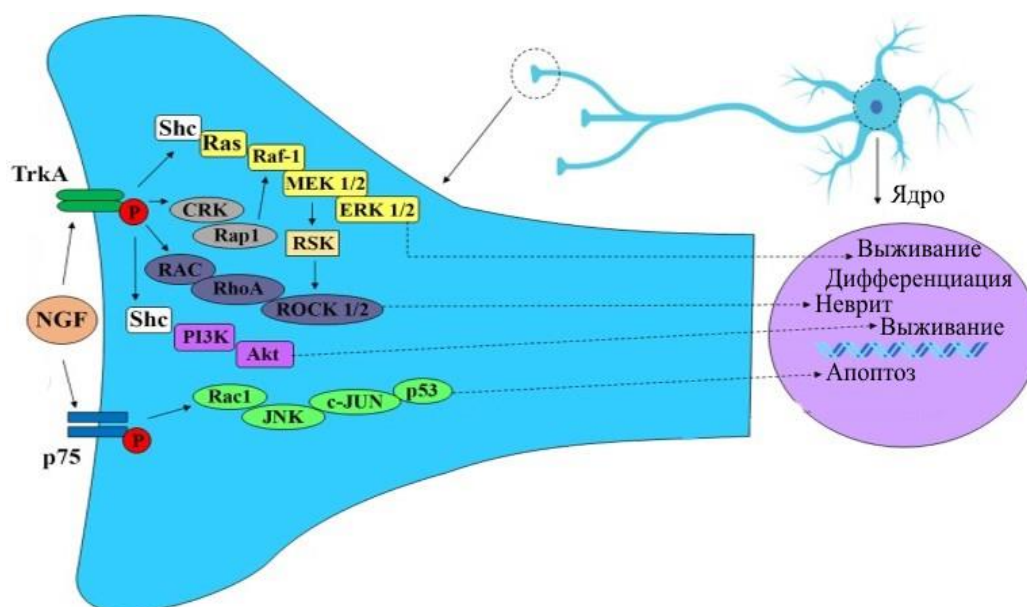


Рисунок 3 – Сигнальный путь NGF (Garraway S., 2016)

IP3 способствует высвобождению кальция из эндоплазматического ретикулума, что приводит к временному повышению уровня кальция в цитозоле, что приводит к активации различных целевых генов, ионных каналов и факторов транскрипции. Таким образом, путь PLC- γ является важным механизмом, регулирующим внутриклеточное содержание кальция и различные процессы, связанные с этими кальций-зависимыми белками и факторами (Fahnestock M., 2019).

2) Нейротрофический фактор, продуцируемый головным мозгом.

Мозговой нейротрофический фактор оказывает нейропротекторное и стимулирующее рост действие на множество популяций нейронов после травмы. Это особенно заметно в руброспинальном, ретикулоспинальном и вестибулоспинальном трактах, а также на проприоцептивных нейронах ядра Кларка в спинном сером веществе поясничного отдела (Lessmann V., 2009; Mitre M., 2017).

Нейропротекторные результаты, в частности, могут быть отнесены к последним эффектам передачи сигналов Trk B-рецептора. Молекулы, такие как GSK-3, Bad и JNK, которые способствуют клеточной смерти (апоптозу) и

регулируют баланс между выживанием и гибелью клеток, являются проапоптотическими молекулами. Ингибирование этих молекул через сигнальный путь TrkB-PI3K-Akt позволяет клеткам выживать в сложных условиях, таких как стресс или повреждение, обеспечивая им механизм защиты (рисунок 4) (Adachi N., 2014).

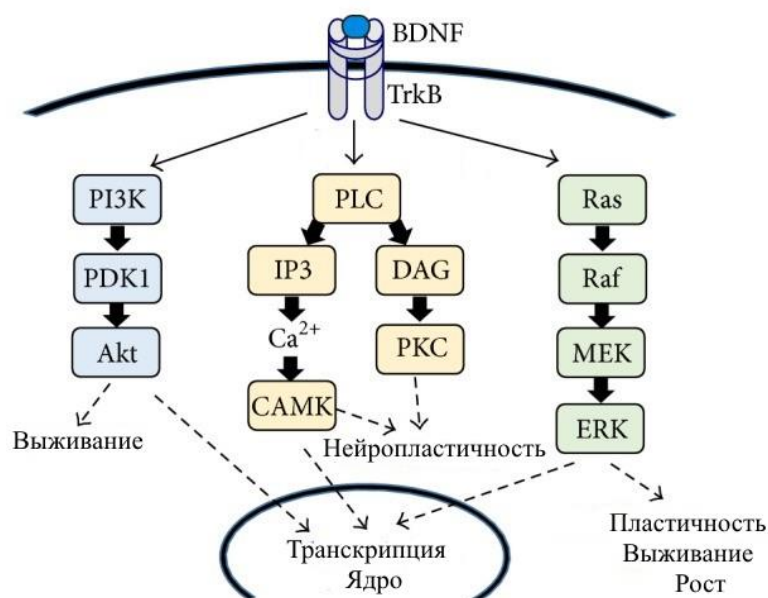


Рисунок 4 – Сигнальный путь BDNF (Garraway S., 2016)

BDNF особенно эффективен при защите нейронов руброспинального тракта, чьи клетки происходят из красного ядра. Во время использования BDNF было обнаружено значительное увеличение доли клеток, которые проявляют транскрипты мРНК, связанные с ростом белков, таких как GAP-43 и Та1-тубулин (Adachi N., 2014; Autry A. E., 2012). Взаимодействие BDNF и NT-4/5 с TrkB может способствовать выживанию и росту нейронов, а также улучшению функции поврежденных нервных волокон. Хотя стимуляция рецептора TrkB и повышение уровня нейротрофинов, таких как BDNF, может быть полезным для восстановления поврежденных нервов, она также может привести к нежелательным побочным эффектам. Например, увеличение пластичности и

возможные изменения в болевом восприятии могут быть негативными последствиями стимуляции TrkB.

Нейроны спинного рога являются ключевыми элементами в обработке болевых сигналов, так как они получают информацию от ноцицептивных афферентов, которые реагируют на травмы, повреждения тканей или другие вредные стимулы. Рецептор TrkB, который связывается с нейротрофином BDNF, выражается на нейронах спинного рога и играет важную роль в регуляции и модуляции болевых перцептивных процессов (Baliatti M., 2018).

3) Нейротрофин-3.

Нейротрофин-3 (NT-3) был обнаружен группой ученых в Институте Макса Планка в 1990 году. NT-3 был более сложным для выявления по сравнению с NGF и BDNF из-за его более низкого содержания белка, что затрудняло его изоляцию и изучение. Однако исследователи смогли использовать консервативные аминокислотные последовательности из NGF и BDNF для создания дегенеративных праймеров, которые позволили им выделить мРНК для белка с аналогичной структурой и последовательностью, которую позже назвали NT-3 (Ullal G. R., 2007).

NT-3, как член семейства нейротрофинов, играет важную роль в поддержании выживания нейронов в различных частях мозга и периферии (рисунок 5) (Keefe K. M., 2017). NT-3 способен связываться с рецепторами TrkA, TrkB и TrkC, а также с рецептором p75NTR. Это позволяет NT-3 оказывать влияние на различные типы нейронов и играть важную роль в их выживании и функционировании (Boyse V. S., 2014).

Еще одно важное преимущество NT-3 – отсутствие побочных эффектов, связанных с болями и спастичностью. Этот нейротрофин способен предотвращать дегенерацию периферических сенсорных аксонов и улучшать функциональные отклики в этих нейронах. Это делает NT-3 потенциально ценным инструментом для лечения различных неврологических заболеваний.

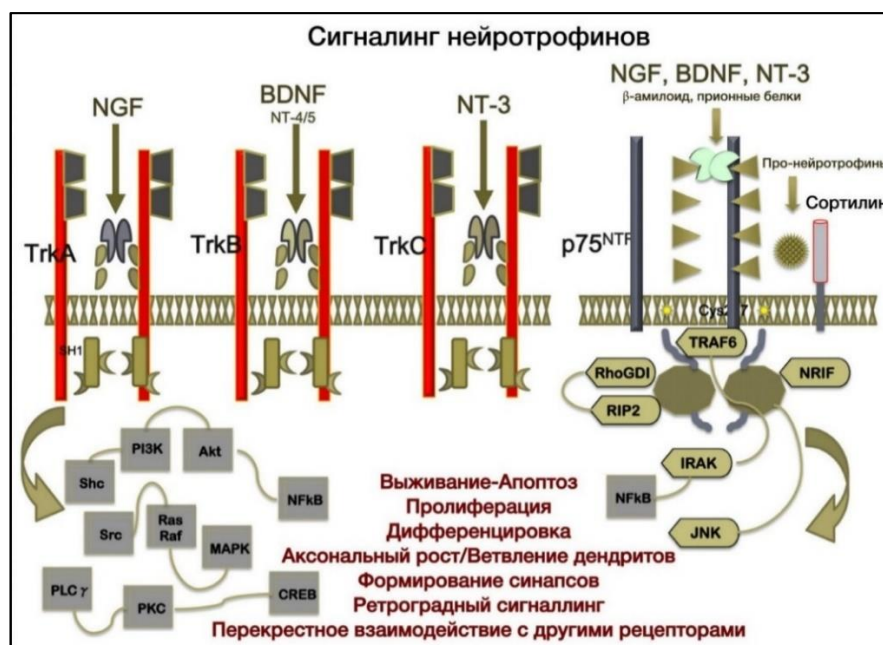


Рисунок 5 – Сигнальный путь NT-3 (Palioura S., 2013)

Таким образом, активация этих сигнальных каскадов является важным механизмом действия нейротрофинов и их рецепторов Trk в развитии и поддержании нервной системы (Deinhardt K., 2014; Lemmon M. A., 2010).

1.4 Фосфоинозитидный путь

В начале 1980-х годов начались интенсивные исследования по описанию передачи сигналов рецептора инсулина, которые привели к идентификации пути фосфоинозитид-3-киназа/протеинкиназа В (PI3K/Akt) и активации рецепторных тирозинкиназ (Trk). Эти открытия подчеркнули важность этих сигнальных каскадов в регулировании многих биологических процессов, включая рост, выживание и дифференциацию клеток (Hemmings B. A., 2012).

Как уникальное семейство внутриклеточных липидкиназ, PI3K содержат три класса (класс I, II и III). PI3K класса I представляют собой гетеродимеры, которые состоят из каталитической субъединицы (p110 α , β , γ или δ ,) и регуляторной субъединицы (p85 α , β или γ) (Ahmad A., 2013; Zhang J., 2015).

Akt, или протеинкиназа В (РКВ), является серин/треонинкиназой, которая играет ключевую роль в контроле выживания клеток и предотвращении апоптоза. Akt активируется различными факторами роста клеток через фосфорилирование своих сайтов активации. Активированный Akt затем фосфорилирует и инактивирует различные проапоптотические белки, такие как белки семейства Bcl-2, что способствует выживанию клеток и подавлению апоптоза (Dahlgard K., 2012).

С точки зрения структуры, Akt имеет сходство с другими членами этого семейства, такими как протеинкиназы А (РКА) и С (РКС). Akt, РКА и РКС имеют общую структурную организацию с киназным доменом, содержащим область каталитической активности, а также N- и С-концевые домены, важные для регуляции активности и межклеточного взаимодействия.

Akt содержит киназный домен, который сходен с протеинкиназами AGC. Он также имеет регуляторный остаток треонина Thr308. Фосфорилирование этого остатка и последующая активация Akt играют ключевую роль в сигнальном пути, который регулирует такие важные процессы, как клеточный рост, выживание, пролиферация и метаболизм. С-концевой домен Akt содержит 40 аминокислот и образует гидрофобную область, которая включает в себя регуляторный сериновый остаток Ser473. Фосфорилирование Ser473 также играет важную роль в активации Akt и его функционировании в клетке. Исследования показывают, что полностью активированный Akt, который фосфорилирован на обоих регуляторных остатках (Thr308 и Ser473), может эффективно регулировать клеточные процессы (Zhao G. X., 2015).

Каскад Akt может быть активирован различными сигналами, включая Trk, интегрины, рецепторы В- и Т-клеток, а также рецепторы цитокинов, которые используют PIP₃, продуцируемый PI3K. PIP₃ не активирует Akt напрямую, но изменяет его конфигурацию, перемещая его в плазматическую мембрану, где фосфоинозитид-зависимая киназа-1 (PDK1) фосфорилирует остаток Thr308 в киназном домене. Для полной активации Akt необходимо второе фосфорилирование на регуляторном Ser473 (рисунок 6) (Nitulescu G. M., 2018).

Активированная протеинкиназа В в свою очередь активирует различные белки, находящиеся в плазматической мембране, ядре или цитозоле, поддерживая рост и выживание клеток, а также другие клеточные процессы.

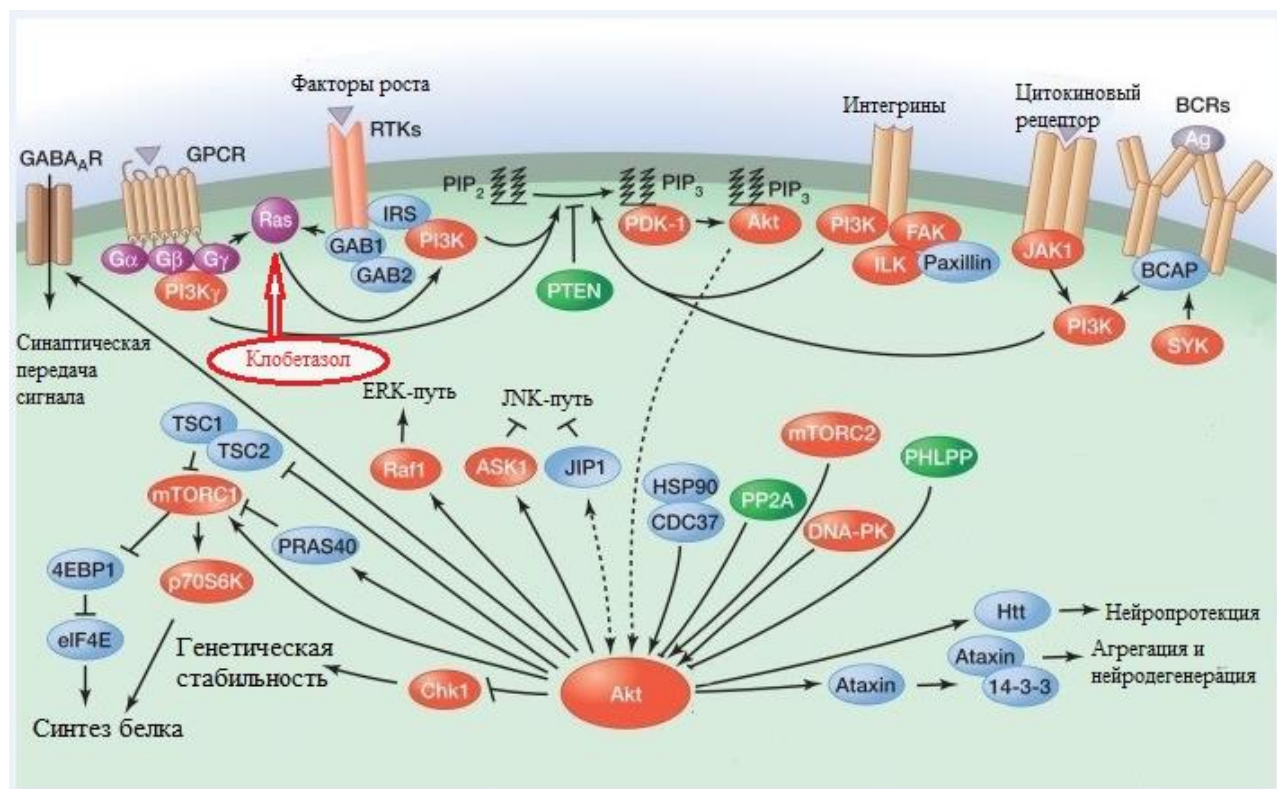


Рисунок 6 – Регуляция и последующие эффекты сигнального пути Akt

Akt фосфорилирует большое количество мишеней по консенсусным мотивам RxRxxS/T. Такими нижестоящими мишенями для фосфорилирования Akt являются PRAS40, компонент и регулятор комплексов mTOR, все они усиливают подвижность опухоли, инвазию и рост метастазирования (Hers I., 2011).

Серин/треонин протеинкиназа, известная как мишень рапамицина для млекопитающих (mTOR), является ключевым элементом сети Akt. mTOR регулирует рост и метаболизм клеток и является нижестоящим членом Akt. Он также активирует mTORC2, который фосфорилирует гидрофобный мотив Akt Ser473. Фосфорилирование Ser473 увеличивает активность киназы Akt и способствует фосфорилированию Thr308 с помощью PDK1 (Laplane M., 2012).

mTOR - это киназа, которая связывается с фосфатидилинозитол-3-киназой (PI3K) и играет важную роль в регуляции клеточного роста, пролиферации, метаболизма и выживания клеток (Wei X., 2019; Querfurth H., 2021). Akt может фосфорилировать и активировать mTOR, что в свою очередь приводит к образованию комплексов mTORC1 и mTORC2 (Huang H., 2017; Hutton S. R., 2017). mTORC1 отвечает за регуляцию белкового синтеза, клеточного роста и метаболизма, в то время как mTORC2 играет важную роль в регуляции цитоскелета и активации Akt на Ser473. Следовательно, взаимодействие между Akt и mTOR является ключевым фактором в координации клеточных процессов и поддержании гомеостаза в клетке (Jhanwar-Uniyal M., 2019; Murugan A. K., 2019; Kim J., 2019).

Нижестоящие эффекторы mTOR включают два сигнальных пути, а именно 4EBP1 и S6K. mTOR может фосфорилировать нижестоящие целевые белки-мишени 4EBPs, а eIF4E является субъединицей комплекса инициации эукариотической трансляции (Vander H. E., 2007). Поскольку гипофосфорилированные 4E-BP обладают высоким сродством к eIF4E, фосфорилированные 4E-BP могут быть отделены от eIF4E.

Белки S6Ks активируются и фосфорилируются mTOR и, в свою очередь, фосфорилируют свои субстраты, включая белок S6 и другие белки, которые регулируют трансляцию мРНК и клеточный рост (Domenech-Estevez E., 2016; Yaguchi M., 2019; Yu C., 2018).

Akt подавляет проапоптотические сигналы, такие как факторы транскрипции Bad и Forkhead box O (FOXO). Например, Akt фосфорилирует Bad, что приводит к его инактивации и предотвращает его способность ингибировать антиапоптотические белки семейства Bcl-2, что в итоге способствует выживанию клеток. С другой стороны, Akt также фосфорилирует и инактивирует FOXO, который регулирует экспрессию генов, связанных с апоптозом и другими клеточными процессами (Xing Y. Q., 2018; Cabrera-Ortega, 2017). Семейство транскрипционных факторов Forkhead в настоящее время разделено на 17 подсемейств (называемых FoxA-FoxQ), члены которых имеют широкий спектр биологических функций (Maiese K., 2017; Gurnari C., 2019). Среди этих

подсемейств наиболее полно изучено семейство Forkhead box O (FoxO). Четырьмя гомологичными генами FoxO у людей являются FoxO1, FoxO2, FoxO3a и FoxO4 (Wang J., 2019).

FOXO играют важную роль в поддержании клеточной гомеостаза, регулируя различные процессы, такие как остановке клеточного цикла, гибель клеток, ответ на окислительный стресс и метаболическая стабильность. Их активация может быть ключевым механизмом защиты клетки от стрессовых условий и поддержания здоровой функции организма.

Akt фосфорилирует и инактивирует факторы транскрипции FOXO, приводя их к деградации в цитоплазме, тем самым способствуя выживанию клеток. Снижение активности FOXO блокирует ингибиторы транскрипции циклинзависимой киназы (CDK) p27 и p21, что приводит к прогрессированию клеточного цикла. Он также ингибирует внешний апоптотический путь, опосредованный транскрипцией проапоптотических факторов, таких как лиганд Fas (FasL) и связанный с лигандом фактора некроза опухоли, индуцирующий апоптоз (TRAIL) (Nitulescu G. M., 2018).

GSK-3, расположенная ниже АКТ, представляет собой серин/треониновую протеазу и играет ключевую роль в регуляции множества биологических процессов, таких как клеточный метаболизм, пролиферация клеток и апоптоз. Он участвует в сигнальном пути Wnt/ β -катенина, который регулирует развитие и гомеостазис тканей, а также играет роль в патогенезе рака и других заболеваний (Arioka, 2019; Liu X., 2018).

Есть несколько систем, отвечающих за отключение Akt (Banerji U., 2015). Akt дефосфорилируется с помощью протеинфосфатазы 2A (PP2A). PP2A предпочтительно дефосфорилирует Akt в остатке Thr308, но при определенных условиях он также может дефосфорилировать остаток Ser473. Хотя PHLPP1 и PHLPP2 оба дефосфорилируют остаток Ser473, они дифференциально останавливают передачу сигналов путем регуляции различных изоформ Akt; PHLPP1 специфически модулирует фосфорилирование HDM2 и

гликогенсинтазинкиназы (GSK)-3 α с помощью Akt2, тогда как PHLPP2 регулирует фосфорилирование p27 с помощью Akt3.

Фосфатаза и гомолог тензина (PTEN) являются наиболее важным негативным регулятором функции Akt и ее метаболических эффектов. Фосфатазная активность PTEN действует как антагонист PI3K, дефосфорилируя PIP3 в положении 3' с образованием PIP2 (Amit A., 2007). Мутации, приводящие к амплификации генов в пути рецептор-PI3K, а также к потере функции PTEN, часто обнаруживаются в раковых тканях, что приводит к патологически усиленной передаче сигналов PI3K и потере контроля роста клеток за счет снижения апоптоза (Ouyang Z. H., 2017).

1.5 Регенерация нервного волокна

Идея о возможности регенерации нервов впервые была высказана в 1776 году С. Срюйкханком. После травмы периферического нерва поступает сигнал в виде частых импульсов потенциала действия, что приводит к активации кальциевых каналов. Как следствие, происходит запуск каскада реакций, приводящих либо к активации процессов регенерации нейрона, либо к апоптозу нервного волокна (Reid A. J., 2009).

Травма нерва вызывает две основные реакции. Во-первых, происходит изменение дифференцировки миелина. Активность генов, кодирующих ключевой миелиновый транскрипционный фактор Egr2 (Krox20), ферментов синтеза холестерина, структурных белков, таких как P0 и основной белок миелина (ОБМ), а также мембранных ассоциированных белков, таких как миелин-ассоциированный гликопротеин (МАГ) и периаксин, значительно снижается. С другой стороны, молекулы, характерные для премиелинизирующих клеток Шванна в развивающихся нервах, включая L1, молекулу адгезии нервных клеток (NCAM), рецептор нейротрофина p75 (p75NTR) и глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), увеличиваются в активности.

Вторая и жизненно важная составляющая реакции на повреждение включает в себя новое появление ряда фенотипов, которые не активны в клетках Шванна в нормальных зрелых или в развивающихся нервах. Нейротрофические факторы, такие как GDNF, artemin, BDNF, NT-3, NGF, VEGF, эритропоэтин, плеiotрофин, играют важную роль в регуляции аксонального роста, выживания нейронов и ремоделирования сетчатки, а также поддержании нейронной функции. Эти факторы могут активировать ряд сигнальных путей, включая Trk-рецепторы и p75NTR (нейротрофический рецептор с низким аффинитетом), что способствует удлинению аксонов и выживанию нейронов (Акшулаков С. К., 2015; Brushart T. M., 2013; Fontana X., 2012).

N-кадгерин, в свою очередь, является клеточным адгезивным молекулярным белком, который участвует в регуляции клеточной адгезии и миграции. В нервной системе он играет важную роль в нейронном развитии, адгезии и росте аксонов, а также в пластичности синапсов.

Стоит также отметить, что цитокины играют важную роль в активации врожденного иммунного ответа, который является первичным защитным механизмом организма. Фактор некроза опухоли α (TNF α), интерлейкин-1 α (IL-1 α), IL-1 β , фактор, ингибирующий лейкемию (LIF) и хемотаксический белок моноцитов 1 (MCP-1) участвуют в привлечении и активации различных клеток иммунной системы, усиливают воспалительные процессы и способствуют уничтожению патогенов в дистальном отделе (Rotshenker S., 2011). Это позволяет репаративным клеткам Шванна взаимодействовать с иммунными клетками и, тем самым, вовлекая макрофаги в нерв. Цитокины, такие как интерлейкин-6 (IL-6) и фактор, ингибирующий лейкемию (LIF), могут играть важную роль в процессе регенерации нервов. Они не только привлекают макрофаги к поврежденным нервам для удаления мертвых клеток и стимуляции роста нервных клеток, но также могут напрямую воздействовать на нейроны, способствуя регенерации аксонов, улучшая их выживаемость и способность к росту. Эти процессы играют решающую роль в восстановлении функции нервной системы после травмы. Кроме того, макрофаги, которые проникают в нервы и ганглии, обеспечивают дополнительный устойчивый источник цитокинов,

стимулируют васкуляризацию дистального нерва (Cattin A. L., 2015; Niemi J. P., 2013) и сотрудничают с Шванновскими клетками для разрушения миелиновых сегментов, которые могут ингибировать рост аксонов во время второй фазы очистки миелина.

В-третьих, травма побуждает формировать пути регенерации, чтобы помочь росту аксонов. Шванновские клетки, участвующие в реконструкции осевых цилиндров, принимают вытянутую биполярную форму и выравниваются в колонках (полосы Бюнгнера). Эта структура обеспечивает необходимые субстратные и навигационные сигналы, позволяющие регенерирующим аксонам воссоединяться с тканями-мишенями. К тому же, активация аутофагии для разрушения миелина может быть очень важным компонентом программы восстановления после повреждения нервов.

При повреждении нерва клетки Шванна могут активироваться и начать процессы репарации, а также перераспределения своих функций для поддержания и стимуляции регенерации нерва. Эти клетки обволакивают аксоны и превращаются обратно в миелиновые оболочки в восстановленных нервах. Таким образом, репаративная клетка Шванна является переходным состоянием клетки, которое отвечает особым требованиям, которые возникают в поврежденной ткани.

Восстановление нерва после травмы может происходить по трем механизмам:

1) Ремиелинизация: при травме нерва могут быть повреждены миелиновые оболочки аксонов. Процесс ремиелинизации заключается в восстановлении миелиновой оболочки вокруг поврежденных аксонов. Этот процесс способствует быстрому восстановлению проводимости нерва.

2) Коллатеральный спрутинг: когда часть нерва повреждена, некоторые интактные аксоны могут начать рост в новые области, что называется коллатеральным спрутингом. Этот процесс позволяет сохранить связь между нервными клетками и обеспечить частичное восстановление функции нерва.

3) Регенерация от места повреждения: при травме нерва аксоны могут начать регенерацию от места повреждения. Этот процесс включает в себя рост

новых нервных волокон вдоль выделенного пути, чтобы восстановить передачу нервных импульсов.

Когда менее 20-30% аксонов повреждены, восстановление может происходить за счет коллатерального спрутинга, когда соседние нервные волокна начинают расширяться и формировать новые связи для компенсации утраченных функций. Этот процесс обычно занимает от 2 до 6 месяцев.

Однако, когда более 90% аксонов повреждены, регенерация от места повреждения становится основным механизмом восстановления. Этот процесс может быть более сложным и требовать более длительного времени и более интенсивного лечения для успешного восстановления нервной функции.

В течение первых 48 часов после травмы нерва происходит фрагментация аксонов, затрагивающая весь нерв. Этот процесс начинается с отека и дистрофии аксона, после чего аксон распадается на отдельные части. Затем макрофаги мигрируют к месту повреждения нерва, чтобы удалить мертвые фрагменты клетки. Этот процесс чистки создает благоприятные условия для регенерации аксонов и восстановления функций нерва. В течение следующих 2-6 недель шванновские клетки и макрофаги активно фагоцитируют весь миелин и клеточный детрит, образовавшиеся в результате повреждения нерва (Tos P., 2013).

Вместе с этим процессом происходит активация глиальных клеток, которые начинают активно размножаться и секретировать факторы роста для восстановления нерва. Во время процесса ремиелинизации глиальные клетки начинают создавать новую миелиновую оболочку вокруг аксонов.

Шванновские клетки, как правило, начинают процесс дедифференцировки практически сразу после повреждения аксона. Пик активности приходится на 3-й день после травмы, после чего активность процесса пролиферации уменьшается. Во время регенерации нерва происходит вторая фаза пролиферации шванновских клеток, которые выстраиваются в ряды, образуя так называемые бюнгнеровские ленты. Эти ленты служат дополнительной опорой для роста аксонов в процессе восстановления (Щаницын И. Н., 2017).

Во время дедифференциации шванновские клетки меняют свою форму и функцию, чтобы создать благоприятную среду для роста новых аксонов. Экспрессия белков миелина, таких как нулевой белок и миелин-ассоциированный гликопротеин, резко снижается. Одновременно повышается экспрессия генов, связанных с регенерацией, таких как GAP-43, нейротрофических факторов и их рецепторов, нейрегулина и его рецепторов. Кроме того, шванновские клетки, лишенные нервных волокон, секретируют фибронектин, ламинин, тенасцин и другие протеогликаны, образуя субстрат для роста аксонов. Как только шванновские клетки снова вступают в контакт с аксонами, они восстанавливают свою дифференцировку (Lotfi P., 2011; Tos P., 2013).

Однако, не всегда восстановление нерва происходит успешно. Восстановление аксонов может быть осложнено образованием рубца или нарушением соединения между регенерирующими аксонами и миелином. Кроме того, возможно образование невромы – нового опухолевидного образования из регенерирующих аксонов, которое может мешать нормальной функции нерва.

Скорость восстановления нервов зависит от активности конуса роста на конце каждого растущего аксона и от сопротивления травмированных тканей. Конус роста – это специальная структура в конце аксона, которая помогает ему ориентироваться и прорасти в правильном направлении к своей цели.

Регенерация нервов происходит путем роста аксонов из неповрежденного участка, проникновения через собственные оболочки и преодоления щелей в соединительной ткани, чтобы достичь поврежденного участка. Шванновские клетки играют решающую роль в поддержке и помощи в этом процессе (Tos P., 2013).

Изменения в органе-мишени, таком как поврежденный нерв, могут включать в себя изменения в кровоснабжении, структуре ткани, эластичности и функции мышц. Эти изменения могут как способствовать, так и мешать регенерации нерва, в зависимости от того, обеспечивают ли они благоприятные условия для восстановления. Кроме того, изменения в органе-мишени могут привести к снижению эффективности регенерации нерва и образованию рубцов или атрофии

мышц. Поэтому для достижения хороших результатов в реконструкции нерва необходимо учитывать состояние органа-мишени и предпринимать меры по его оптимизации.

Фактические сроки и процессы реабилитации после травмы могут варьироваться в зависимости от степени и характера повреждений. Следует помнить, что фиброзные изменения в мышцах могут начаться всего через несколько недель после травмы, и, если реиннервация не происходит в течение длительного времени, мышечная ткань может быть замещена соединительной тканью.

Реиннервация, то есть процесс восстановления нервных связей, играет важную роль в восстановлении функции мышцы после травмы. Поэтому реабилитационные мероприятия, которые способствуют реиннервации и восстановлению мышечной функции, имеют критическое значение для получения хорошего функционального результата. Для достижения хорошего функционального результата реиннервация должна произойти в течение 12-18 месяцев (рисунок 7) (Продан А. И., 2010; Campbell W. W., 2008).

Шванновские клетки, окружающие поврежденные аксоны, активно участвуют в процессе регенерации, образуя специфические структуры, называемые лентами Бюнгнера. Регенерирующий аксон растет в дистальном направлении со скоростью 3-4 мм/день вдоль лент Бюнгнера. Эти структуры служат опорой и направлением для роста нового аксона в дистальном направлении. Кроме того, шванновские клетки образуют новую миелиновую оболочку вокруг регенерирующих аксонов, обеспечивая электрическую изоляцию и ускоряя передачу нервного импульса. Этот процесс позволяет восстановить функцию поврежденного нерва и восстановить связь между нервными клетками на периферии (Масгутов Р. Ф., 2015). Поврежденные аксоны проксимального отрезка периферического нерва утолщаются, появляются выросты аксоплазмы, которые имеют различное направление.

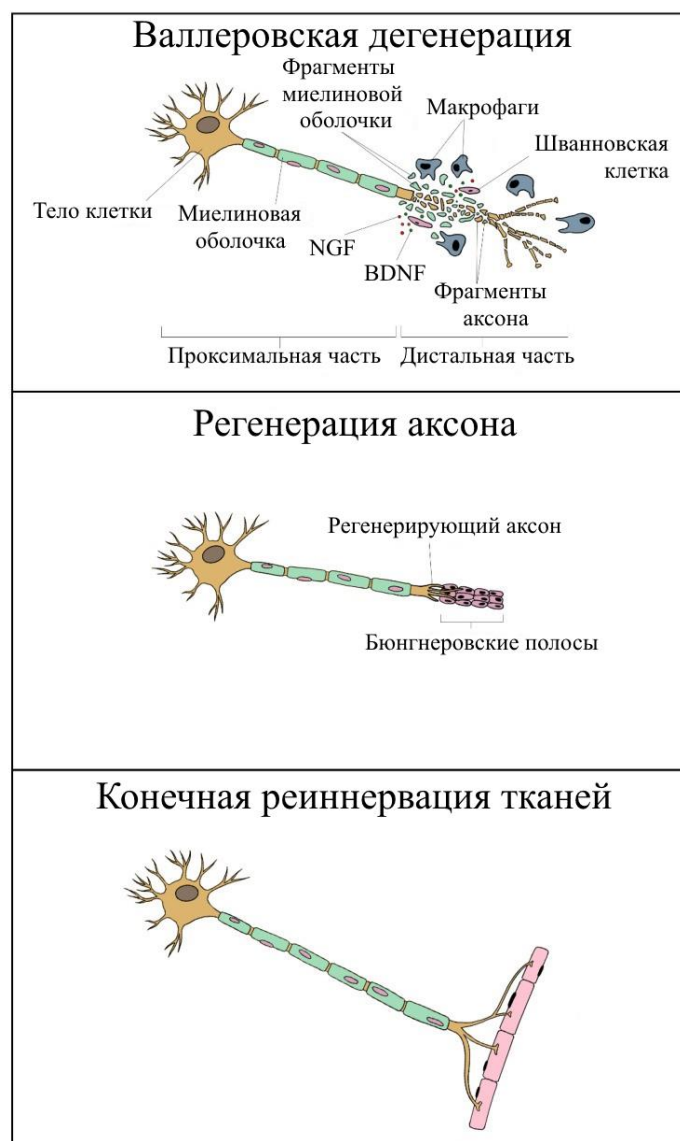


Рисунок 7 – Регенерация нервного волокна после перерезки (Yow Y. Y., 2021)

Аксональные отростки, которые не смогли проникнуть в ленты Бюнгнера и достичь просвета периферического конца, обычно рассасываются или поглощаются другими клетками. Тем временем, те отростки, которые успешно интегрируются в ленту Бюнгнера и достигают периферического конца, остаются жизнеспособными и продолжают активно участвовать в регенерации. Коллатерали и терминали аксона, которые достигают периферического конца, начинают восстанавливать свою структуру, образуя новые контакты и восстанавливая связи с целевыми клетками. Этот процесс регенерации может занимать несколько

месяцев, в зависимости от многих факторов, таких как тип повреждения, наличие других патологий и др. (Продан А. И., 2010).

Нервные клетки не могут дифференцироваться и восстановить потерянные структуры при наличии невромы, поэтому процесс регенерации прерывается. Для успешной регенерации нервов необходимо обеспечить условия для роста и наращивания аксона, а также устранить преграды на его пути.

1.5.1 Состояние фосфоинозитидного пути при регенерации нерва

Некоторые нейротрофические факторы, такие как NGF и GDNF, резко повышаются в дистальном периферическом нерве после травмы. Тем не менее, литература по нейротрофинам и регенерации весьма противоречива: многие исследования сообщают об улучшении регенерации, а некоторые исследования сообщают об ингибировании регенерации.

После повреждения седалищного нерва экспрессия рецептора NGF увеличилась в моторных нейронах на уровне спинного мозга L4-L6, где она достигла максимального уровня между 1 и 7 днями, и нормализовалась до исходного уровня к 30 дню. NGF увеличивается при повреждении дистального нерва и, вероятно, защищает нейроны DRG взрослых крыс от ретроградной клеточной атрофии и смерти после аксотомии (Duraikannu A., 2019).

PTEN - это опухолевый супрессор, который превращает PIP3 в PIP2. При инактивации PTEN PIP3 накапливается, что приводит к активации фосфорилирования Akt, а затем ингибированию GSK3 β , которое является ингибитором роста аксонов. Нокдаун PTEN и активация пути PIP3/Akt тесно связаны с пролиферацией клеток, их выживанием, увеличением размера и полярностью эпителиальных клеток (Broderick D. K., 2004). Инактивация одного аллеля PTEN увеличивает пролиферацию клеток и выживаемость клеток и снижает апоптоз (Adler C. E., 2006). Нокдаун PTEN посредством повышенной активности mTOR увеличивал выживаемость и регенерацию аксонов, тогда как рапамицин блокировал активность mTOR и ослаблял регенерацию.

PI3K является ключевым игроком в регуляции многих сигнальных путей в нейрональных клетках, в том числе в регуляции белков цитоскелета. Например, PI3K активирует малые GTPазы Rac и Cdc42, которые участвуют в реорганизации цитоскелета, контролируя процессы миграции, морфогенеза и синаптической пластичности. Активация Akt и ILK также может сигнализировать в направлении регуляции цитоскелета через различные пути. GSK-3 является важным связующим звеном между сигнальными путями и регуляцией цитоскелета. Все эти молекулы взаимодействуют в сложной сети сигналов, регулирующих структуру и функцию цитоскелета в нейрональных клетках (рисунок 8) (Zhou F. Q., 2006).

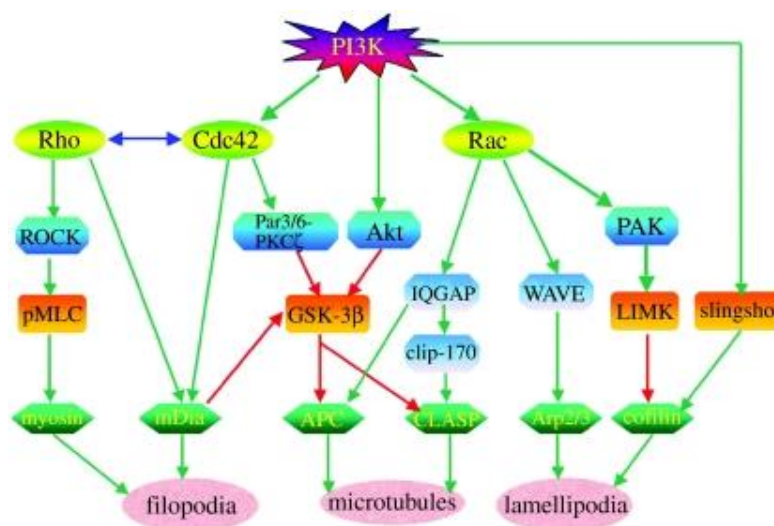


Рисунок 8 – Регуляция цитоскелета аксона с помощью передачи сигналов PI3K (Zhou F. Q., 2006)

Важно отметить, что многочисленные недавние исследования показали, что PI3K активируется на переднем крае конуса роста, совместно локализуясь с полимеризующимися актиновыми филаментами, что позволяет предположить, что PI3K играет ключевую роль в регуляции выпячивания конуса роста (Zhou F. Q., 2006).

1.6 Влияние клобетазола и семакса на регенерацию соматических нервов

При некоторых заболеваниях (например, рассеянный склероз), в основе которого происходят аутоиммунные процессы, можно наблюдать повреждение миелиновой составляющей нервных волокон (демиелинизация). Чаще всего заболевания имеют устойчиво прогрессирующее, чаще волнообразное течение. Для предотвращения дегенерации нервов необходимо стимулировать ремиелинизацию с помощью новых олигодендроцитов, которые образуют миелиновую оболочку вокруг аксонов. Они формируют точки контакта с аксоном, в двустороннем порядке происходит обмен химическими сигналами и начинается образование вокруг него миелиновой оболочки. Но при том, что аксон будет покрыт миелиновой оболочкой, изоляции вокруг аксона нервной клетки в основном не будет образовываться, если аксон не был электрически активным (Najm F. J., 2015).

Клобетазол вместе со своим аналогом – преднизалоном, является производным гидрокортизона с молекулярной массой 467 и химической формулой $C_{22}H_{28}ClFO_4$ (рисунок 9).

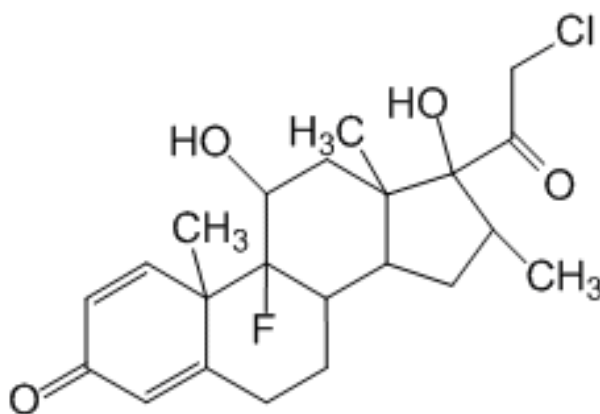


Рисунок 9 – Структурная формула клобетазола (Хлебникова А. Н., 2010)

Клобетазол является синтетическим глюкокортикостероидом, при создании которого были внесены ряд модификаций молекулы, что привело к увеличению его активности и эффективности.

Эти модификации включают введение фтора в положение С9, метилирование в положении С16 и этерификацию в положении С17. Такие химические изменения способствуют улучшению фармакокинетических и фармакодинамических свойств клобетазола, что делает его более эффективным в лечении воспалительных и аллергических заболеваний (Хлебникова А. Н., 2010). По глюкокортикоидной активности клобетазол в несколько раз сильнее гидрокортизона, а по минералокортикоидной активности уступает ему.

Глюкокортикостероиды, такие как клобетазол, обладают широким спектром фармакологических действий, включая противовоспалительное, иммуносупрессивное и антимитотическое действие.

1) Противовоспалительное действие: Глюкокортикоиды тормозят развитие воспалительной реакции за счёт блокирования синтеза простагландинов, цитокинов и других медиаторов воспаления, а также подавляют активность фосфолипазы А2. Это приводит к уменьшению отёчности, покраснения, боли и других симптомов воспаления.

2) Иммуносупрессивное действие: Глюкокортикоиды подавляют иммунный ответ организма, включая снижение активности лимфоцитов, угнетение выработки антител и блокирование цитокинов. Это используется, например, для подавления иммунного ответа при аутоиммунных и аллергических заболеваниях, а также для предотвращения отторжения трансплантированных органов.

3) Антимитотическое действие: Глюкокортикоиды могут оказывать противомитотическое (противораковое) действие путём остановки деления и роста определённых клеток, что может быть полезно в лечении некоторых видов рака и других патологических состояний.

Эти характеристики клобетазола и других глюкокортикостероидов делают их важными препаратами для лечения широкого спектра заболеваний, связанных с

воспалением, иммунологическими нарушениями и другими патологиями (Батыршина С. В., 2014).

Проникновение в цитоплазму происходит в результате диффузии через клеточную мембрану. Действие клобетазола на клетки-мишени осуществляется посредством особых биоспецифических белков – глюкокортикоидных (ГР) и минералкортикоидных рецепторов (МР) (Komobuchi H., 2010).

Повреждение нерва способствует увеличению продукции двух изоформ рецепторов, при этом они перемещаются в составе ретроградного транспорта и аккумулируются в регенерирующих нервных волокнах. Взаимодействие глюкокортикостероидов с этими рецепторами способствует пролиферации шванновских клеток и экспрессии миелиновых белков, влияющих на миелинизацию нервных волокон. Это позволяет организму активно участвовать в ремоделировании и восстановлении нервных структур после повреждения. МР экспрессируются в нейронах, в то время как ГР – как в нервных, так и в глиальных клетках.

После связывания с соответствующим лигандом они образуют олигомерный белковый комплекс, который далее активируется. Диссоциация белков теплового шока и иммунофилина важна для активации этого процесса, поскольку освобождаются активированные рецепторы, готовые к взаимодействию с чувствительным элементом ДНК расположенного в промоторном фрагменте стероид-отвечающего гена и включению в регуляцию транскрипции генов и синтез белков (Хлебникова А. Н., 2010; Komobuchi H., 2010).

Также стоит отметить, что клобетазол может действовать на нервные клетки через активацию сигнальных путей, таких как Ras-Raf-MAPK/ERK. При связывании клобетазола с рецепторами на поверхности клеток запускается цепь сигналов, в результате чего активируются молекулы семейства Ras. Активированный Ras запускает каскад фосфорилирования промежуточных белков, в том числе белков Raf-киназы. Это, в свою очередь, приводит к активации MAPK/ERK, сигнального пути, который регулирует множество клеточных процессов, таких как пролиферация и дифференцировка клеток (Napoli I., 2012; Zhang L., 2019).

Одним из многообещающих соединений, не имеющих гормональных побочных эффектов и обладающих повышенной устойчивостью к действию инактивирующих ферментов, является нейропептид с аминокислотной последовательностью Met–Glu–His–Phe–Pro–Gly–Pro, известный как "Семакс". Нейропротекторное действие семакса установлено *in vitro* и на животных моделях ишемии головного мозга, а также в клинических условиях (Deigin V. I., 2022; Bakaeva Z.V., Surin A.M., 2020).

Пептид семакс обладает ноотропным, нейропротекторным и иммуномодулирующим действием. Также был показан защитный эффект семакса на модели инсульта благодаря его противовоспалительному действию. Это исследование выявило компенсаторные эффекты пептида семакс на генетические реакции, связанные с воспалением и нейротрансмиттерами, что может объяснить нейропротекторный эффект семакса при ишемии-реперфузии и предположить важную особенность семакса как способствовать нормализации ишемии (Dergunova L. V., 2021). Важным фармакодинамическим свойством семакса является его низкая токсичность и безопасность (Filippenkov I. B., 2020).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материал исследования

Для исследования были использованы половозрелые крысы породы Wistar со средней массой 250-350 грамм, предоставленные вивариумом ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарёва». Объектом исследования служили седалищные нервы. Для проведения экспериментов на животных были предоставлены следующие условия содержания: крысы находились в индивидуальных клетках и имели свободный доступ к корму *ad libitum* до полудня.

Все эксперименты на животных были проведены под хлороформным наркозом. Все манипуляции с животными осуществлялись в соответствии с «Правилами проведения работы с использованием экспериментальных животных» (Приказ Минвуза от 13.11.1984 г. №724).

В ходе исследования были выделены следующие экспериментальные группы крыс:

- 1 группа – интактный, неповрежденный нерв (n=10);
- 2 группа – интактный неповрежденный нерв, подвергшийся стимуляции (n=10);
- 3 группа – выполнено повреждение седалищного нерва (нейротомезис) (n=30);
- 4, 5 и 6 группы – проведено повреждение нерва с внутримышечным введением клобетазола (Sigma-Aldrich, Китай) в дозах 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 – выполнено повреждение нерва и наложение гидрогеля на проксимальный участок поврежденного нерва (n=30);
- 8 группа – после повреждения нерва на проксимальный участок нанесён гидрогель с клобетазолом в концентрации 0,25 мг/мл (n=30);
- 9 группа – после повреждения нерва внутримышечно введен Семакс (ИНЦП "Пептаген", РФ) в концентрации 37,5 мг/кг в широкую медиальную мышцу бедра (n=10).

Животные были выведены из эксперимента на 7, 14 и 30 сутки эксперимента. Эксперимент проводили по следующей схеме (рисунок 10).



Рисунок 10 – Схема эксперимента по изменению содержания белка

2.2 Методы исследования

2.2.1 Подготовка и определение цитотоксичности гидрогеля

Компоненты гидрогеля:

- 1) Леван, 8%-й раствор;
- 2) Альгинат натрия, 2%-й раствор.

Соотношение компонентов составило 1:1. Полимеризацию вызывали путем добавления раствора CaCl_2 .

Цитотоксичность гидрогеля и его компонентов оценивали с помощью МТТ-теста на клеточной линии легких эмбриона человека. Клетки выращивали в среде DMEM с добавлением 10% фетальной сыворотки телят, пенициллина, стрептомицина и glutаминa (PanEco, Россия).

Клетки засевали в 96-луночный планшет с концентрацией 10 000 клеток на лунку. К клеткам после чего добавляли следующие компоненты с шагом разведения 1:2:

- 1) Леван, 8%-й раствор;
- 2) Альгинат натрия, 2%-й раствор;
- 3) Клобетазол, 0,025 мг/мл;
- 4) Гидрогель.

Контролем служила среда без препаратов.

Цитотоксичность материала определяли с использованием МТТ-реактива (МТТ, Sigma Aldrich, США), который добавляли к клеткам в концентрации 5 мг/мл (Mosmann T., 1983). После инкубации в течение 3,5 часов для образования фиолетовых кристаллов формазана их растворяли раствором ДМСО на планшетном шейкере в течение 20 минут при 37°C. Оптическую плотность измеряли на мультимодальном ридере Varioscan Lux при длине волны 570 нм, используя 650 нм как референс.

2.2.2 Регистрация потенциала действия нерва

Для эксперимента изолированные седалищные нервы крысы помещали в раствор Рингера, поддерживаемый при температуре 37°C с постоянной аэрацией кислородом. Стимуляция нерва проводилась с параметрами: амплитуда 1,5 В, длительность импульса 0,3 мс, частота 100 имп/с. Потенциалы действия регистрировались с помощью осциллографа GDS-71042 (Ревин В.В., 1990).

2.2.3 Гомогенизация нервов

Гомогенизацию нерва проводили с помощью гомогенизатор POTTER S (Германия) в пробирке со стеклянным пестиком. Нервы были помещены в пробирку с раствором 0,8 М сахарозы в соотношении 1:2 при температуре 4°C и затем гомогенизированы.

2.2.4 Определение содержания белка по методу Лоури

Метод основан на взаимодействии ароматических аминокислот с реактивом Фолина, а также на биуретовой реакции, которая выявляет пептидные связи. Он обладает высокой чувствительностью, позволяющей обнаруживать от 10 до 100 мкг белка в пробе. Интенсивность окраски образованного комплекса прямо пропорциональна содержанию белка в образце и определяется спектрофотометрически (Lowry O. H., 1951).

В пробирки, содержащие 10 мкл пробы, добавляли 190 мкл 1 н NaOH, перемешивали. К растворенной в щелочи пробе добавляли 2 мл реактива С (готовят путем смешивания 50 мл реактива А (4 %-й раствор Na_2CO_3 в 0,2 н растворе NaOH) и 1 мл реактива В (1 %-й раствор $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ в 2%-м цитрате натрия)) и оставляли на 30 минут. Затем добавляли 200 мкл 1 н раствора Фолина-Чокальтеу (Folin & Ciocalteu's phenol reagent, 2 M. Sigma – Aldrich, USA) и через 10 минут измеряли оптическую плотность раствора на спектрофотометре UVmini-1240 (Япония) при 650 нм в 1 см кювете.

Для калибровки метода использовалась «холостая» проба, содержащая только дистиллированную воду, а также пробы с известным количеством белка, в диапазоне от 0,01 до 10 мг/мл.

2.2.5 Определение концентрации ДНК

Седалищные нервы измельчали с помощью гомогенизатора POTTER S Sartorius (Германия) в пробирке со стеклянным пестиком в буфере TE1 при 4°C. Выделение ДНК проводили по методу Woodram (Woodram L. L., 2006).

Лизис ядер осуществляли путем добавления 300 мкл буфера TE2, 10% раствора SDS и 10 мкл протеинкиназы К. Инкубировали 30 мин при 60 °C. Остужали 1 мин во льду. После добавляли 250 мкл 5,3 М раствора NaCl. Перемешивали содержимое пробирки до появления хлопьев. Центрифугировали при 11 000 об/мин в течение 10 мин, супернатант переносили в чистые пробирки.

Для осаждения ДНК добавляли 700 мкл изопропанола, затем осторожно переворачивали 10-12 раз и центрифугировали при 13 000 об/мин в течение 2 минут. Удаляли супернатант.

Промывку ДНК осуществляли путем добавления 70% раствора этанола до 1,5 мл. Вortexировали, а затем центрифугировали при 13 000 об/мин в течение 2 мин. После удаления супернатанта, содержимое пробирок подсушивали на воздухе до испарения спирта.

Растворение ДНК производили в 300-400 мкл 0,1 М Трис-НСl. Инкубировали в течение 5 мин при 65 °С и оставляли на ночь до полного растворения. Измерение концентрации проводили на спектрофотометре NanoPhotometer NP80 (Implen, США) при длине волны 260 нм.

2.2.6 Определение факторов роста NGF и NT-3 в гомогенате ткани с помощью метода иммуноферментного анализа

Сэндвич-ELISA является качественным методом для количественного определения растворимого белка. Он использует два антитела, специфичных к одному и тому же антигену, что позволяет увеличить специфичность и чувствительность метода. Один из этих антител наносится на поверхность пластины, а затем на эту поверхность добавляется образец, содержащий искомый белок. Если белок присутствует в образце, он связывается с первым антителом. Затем на поверхность пластины добавляют второе антитело, которое также специфично к данному белку и различает его от других белков. Второе антитело связывается с белком, образуя сэндвич, который можно обнаружить с помощью различных методов, например, с использованием ферментного конъюгата. Количество образовавшегося сэндвича пропорционально количеству искомого белка в образце, что позволяет количественно определить его концентрацию (Schuurs A. H. W. M., 1980).

Изолированные нервы были помещены в пробирку со стеклянным пестиком и подвергнуты гомогенизации с помощью гомогенизатора POTTER S (США) в

лизис-буфере в соотношении 1 мл лизис-буфера на 20-50 мг нерва. После гомогенизации образец был центрифугирован 5 минут при 10 000g для удаления мелких остатков ткани. Собирали супернатант и немедленно приступали к анализу

Добавляли 100 мкл каждого из разведений стандарта, бланка и опытных образцов в соответствующие лунки. Инкубацию проводили при температуре 37 °C в течение 1 часа. После этого жидкость из лунок удаляли и добавляли по 100 мкл рабочего раствора детектирующего реагента А в каждую. Затем инкубацию повторяли ещё на 1 час при той же температуре.

Далее с помощью промывочного раствора удаляли несвязанный реагент А. Процедуру повторяли 3 раза. После аспирации жидкости добавляли 100 мкл рабочего раствора детектирующего реагента В в каждую лунку, инкубировали 30 мин при 37°C.

Далее с помощью промывочного раствора удаляли несвязанный реагент В. Процедуру повторяли 5 раз. После аспирации жидкости добавляли по 90 мкл раствора ТМБ в каждую лунку. Инкубировали 10 - 20 минут при 37 °C. Раствор в лунках приобретал синий цвет. Реакцию останавливали при добавлении 50 мкл стоп-раствора. Немедленно проводили измерение при 450 нм.

2.2.7 Определение концентрации NRG-1 в гомогенате ткани с помощью метода иммуноферментного анализа

Препарированные нервы были промыты в растворе фосфатно-солевого буфера (ФСБ), чтобы удалить кровь перед гомогенизацией. Затем были прогомогенизированы с помощью гомогенизатора ROTTER S (США) в пробирке со стеклянным пестиком в лизис-буфере в соотношении 1 мл лизис-буфера на 20-50 мг нерва. Полученную суспензию центрифугировали 5 минут при 10 000g. Собирали супернатант и немедленно приступали к анализу.

Добавляли 50 мкл каждого из разведений стандарта, бланка и 10 мкл опытных образцов в соответствующие лунки. В лунки с опытными пробами добавляли 40 мкл растворителя для образцов.

Далее вовсе используемые лунки добавляли по 100 мкл реагента HPR-конъюгата. Инкубировали 1 час при 37 °С. После инкубации с помощью промывочного раствора удаляли несвязанный реагент. Процедуру повторяли 5 раз. После аспирации жидкости добавляли 50 мкл раствора хромогена А и 50 мкл раствора хромогена В в каждую лунку, инкубировали 15 мин при 37°С.

Реакцию останавливали добавлением 50 мкл стоп-раствора. Немедленно приступали к измерению оптической плотности при 450 нм с помощью ридера FaxStat 4300.

2.2.8 Электрофоретическое разделение белков в ПААГе и вестерн блотт

Электрофорез белков в полиакриламидном геле является методом разделения смеси белков на основе их электрофоретической подвижности, которая зависит от длины полипептидной цепи. Этот метод основан на принципе, что белки, заряженные в растворе, будут двигаться в электрическом поле в направлении, обратном к заряду. Полиакриламидный гель представляет собой матрицу, в которой белки разделяются на основе их размера и заряда. Белки, имеющие большой размер и/или заряд, будут медленнее двигаться через гель, чем белки меньшего размера и/или заряда. В результате получается разделение белков на отдельные полосы, которые можно визуализировать с помощью окраски или иммунофиксации (Laemmli U. K., 1970).

Для анализа белкового состава нерва использовался 12% полиакриламидный гель. Пробы готовили путем смешивания 10 мкл образца с 12 мкл 4X SDS буфера для нанесения, который содержит глицерин, 10% раствор SDS, 0,5 М Трис-НСl буфер рН 6,8, β-меркаптоэтанол и 0,005% раствор бромфенолового синего в качестве красителя. Далее пробы помещались в термостат при 99 °С в течение 10 минут, после чего осаждали пробы путем центрифугирования при 12 тыс об./мин.

Смесь объемом 20 мкл помещали в лунки и подвергали разгонке при напряжении 60 и 120 V/см на установке Mini-PROTEAN® Tetra фирмы Bio-Rad

(США). Для оценки молекулярной массы белков использовали стандартный раствор белков Precision Plus Protein™ Standards (250-10 кДа) фирмы Bio-Rad.

После проведения электрофореза, гель окрашивали методом Д. Канг с использованием Кумасси G-250 (0,25 г сульфата меди (II) 5-водного, 50 мл этанола, 40 мл воды и 10 мл уксусной кислоты). Затем окрашенный гель промывали водой и отмывали от красителя в растворе уксусной кислоты, этанола и воды. После этого гель снова промывали дистиллированной водой и определяли молекулярную массу белков относительно маркеров.

Подсчет количественного содержания белка отдельных фракций проводили с помощью гель-документирующей системы Gel Doc XR+ (BioRad) и программного обеспечения Image Lab.

Для проведения иммунодетекции белков мембрану с белками инкубировали в блокирующем буфере, который состоял из 5% раствора обезжиренного молока на основе PBS-T, в течение 1 часа. Затем мембрану инкубировали с первичными антителами к GAP-43 (разведение 1:5000) в течение ночи при 4°C в блокирующем буфере. После этого мембрану трижды отмывали в буфере PBS-T и инкубировали со вторичными антителами в течение 1 часа при комнатной температуре. После повторной процедуры отмывки проводили визуализацию белков на приборе Gel Doc XR+ и обрабатывали с помощью программы ImageLab.

2.2.9 Статистическая обработка результатов

Экспериментальные данные анализировались с использованием статистических методов в Microsoft Excel 2016. Результаты опытов сравнивались при уровне значимости 5% с использованием t-критерия Стьюдента.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Влияние клобетазола и семакса на изменение концентрации NGF в поврежденных нервах

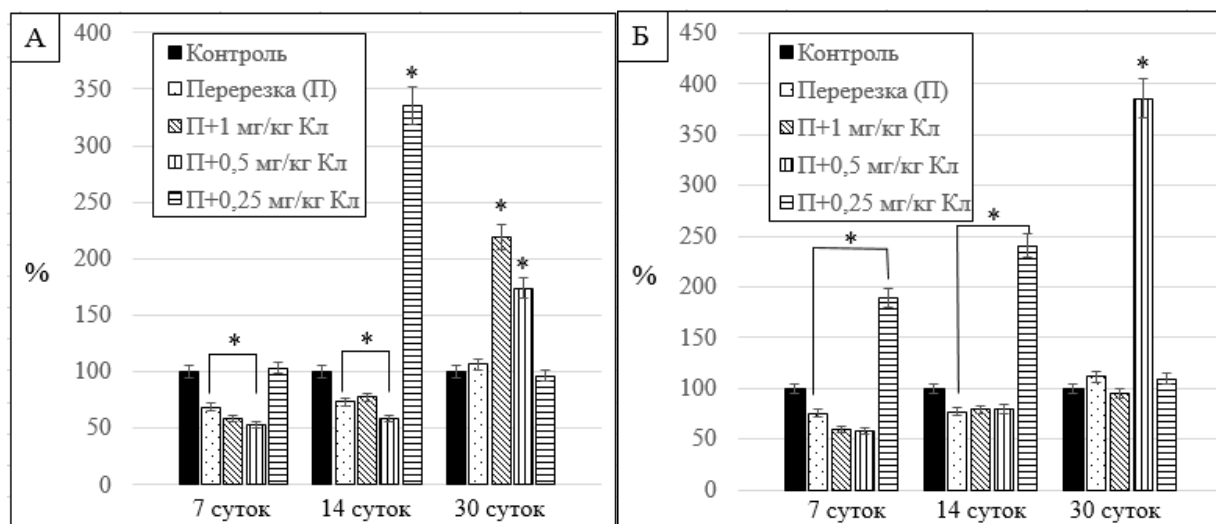
Механизм действия нейротрофических факторов роста построен на их связывании с соответствующими изоформами тирозинкиназных рецепторов, а также с рецептором p75NTR. Активация данных рецепторов приводит к усиленному синтезу белков для аксональной регенерации и, как следствие, к восстановлению способности проводить биоэлектрические потенциалы (Ahmed F., 2021).

Таким образом, представляется целесообразным изучить динамику уровня NGF в интактном и поврежденном нервах при внутримышечном введении клобетазола или семакса, а также при использовании клобетазола в составе гидрогеля из расчета 0,25 мг/мл.

Установлено, что содержание NGF в интактном нерве составляло $180,6 \pm 14,7$ пг/мг нерва. В проксимальном участке поврежденного нерва на 7 сутки уровень фактора роста нервов был снижен на 31,7%, а на 14 сутки после повреждения – на 26,7% относительно контроля. Концентрация NGF на 30 сутки после повреждения достоверно не изменялась по отношению к контролю.

В дистальном отделе содержание фактора роста уменьшалось в течение двух недель после повреждения на 22,7% по отношению к контролю. К 30 суткам эксперимента наблюдалось заметное увеличение концентрации фактора роста нервов на 11,8% (рисунок 11).

К концу первой недели эксперимента при действии клобетазола в концентрации 0,5 мг/кг и 1 мг/кг наблюдалось уменьшение содержания факторов роста нерва на 46,6% и 41,1% соответственно по сравнению с контролем. При действии клобетазола в концентрации 0,25 мг/кг количество фактора роста нервов лишь незначительно отличалось от контрольной группы.



А – проксимальный отдел, Б – дистальный отдел

Рисунок 11 – Изменение содержания фактора роста нервов (NGF) при действии клобетазола на поврежденные нервы (* – достоверность отличия по отношению к интактной группе, $p < 0.05$)

На 14-й день эксперимента воздействие клобетазола в концентрациях 1 мг/кг и 0,5 мг/кг привело к уменьшению количества фактора роста на 22,7% и 41,4% соответственно относительно контрольных значений. 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, однако введение клобетазола в концентрации 0,25 мг/кг привело к снижению уровня NGF до контрольных значений.

В дистальной части нерва интенсивнее происходят процессы распада структурных компонентов нервного волокна, в связи с этим отдаленная часть нерва больше нуждается в нейротрофической поддержке (Масгутов Р. Ф., 2015). 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

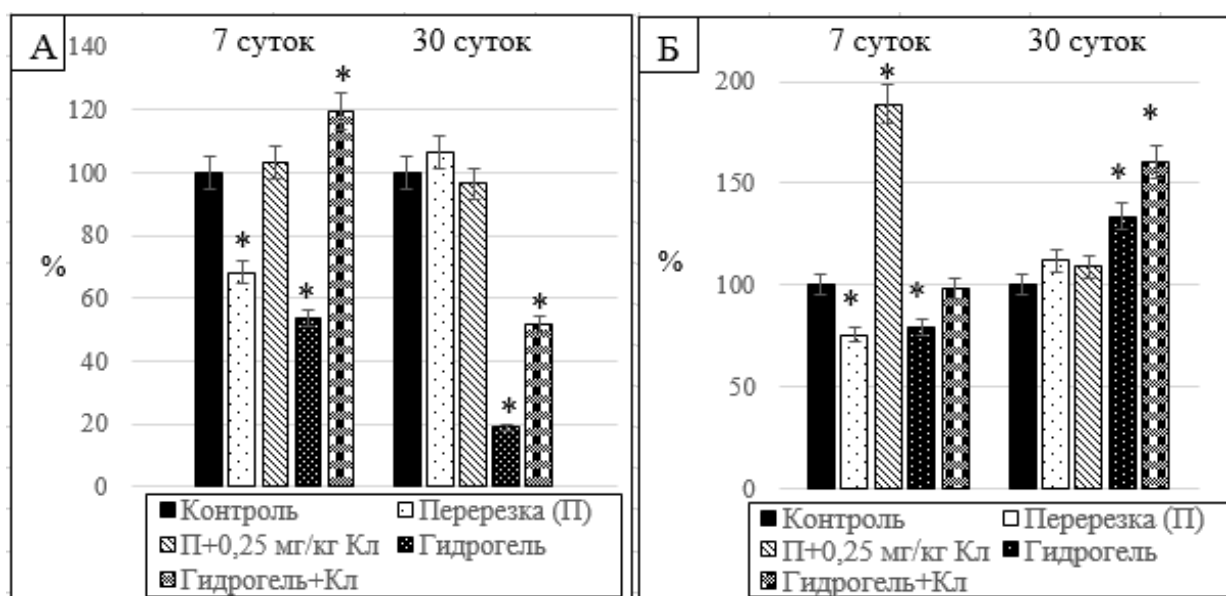
уровень NGF возрастал в 1,9 раз по сравнению с контрольными значениями. Повышенный синтез нейротрофина при действии клобетазола в концентрации 0,25 мг/кг наблюдался и на 14 сутки эксперимента, где количество фактора роста нервов превысило контрольные значения в 2,4 раза. При увеличении сроков до 30 суток 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 3,85 раз).

В опыте с наложением гидрогеля на концы поврежденного нерва происходило снижение уровня NGF на 80% относительно контроля в проксимальной части на 30 сутки 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.

В дистальной части повреждённого нерва наложение гидрогеля без препарата привело к увеличению содержания NGF на 34% к 30-м суткам эксперимента, в то время как наложение гидрогеля с клобетазолом вызвало рост уровня NGF на 60% по сравнению с контрольными показателями (рисунок 12).

В проксимальном отделе нерва при введении семакса наблюдалось значительное повышение фактора роста нервов в 4 раза уже к 7-м суткам эксперимента. Через 2 недели эксперимента уровень NGF уменьшился, но также находился выше контрольных значений на 61,3%. На 30 сутки по отношению к контролю уровень NGF повысился в 2 раза (рисунок 13).

В дистальном отделе, как и в проксимальном, введение семакса привело к значительному приросту количества фактора роста нервов в 6,5 раз уже на 7 сутки эксперимента. Повышенный синтез NGF наблюдался на всем промежутке эксперимента: на 14 сутки его концентрация превышала контрольные значения в 3 раза, а на 30 сутки эксперимента – в 4,6 раза.



А – проксимальный отдел, Б – дистальный отдел

Рисунок 12 – Изменение содержания фактора роста нервов (NGF) при введении клобетазола внутримышечно и путем наложения в составе гидрогеля на поврежденные нервы (* – достоверность отличия по отношению к интактной группе, $p<0.05$)

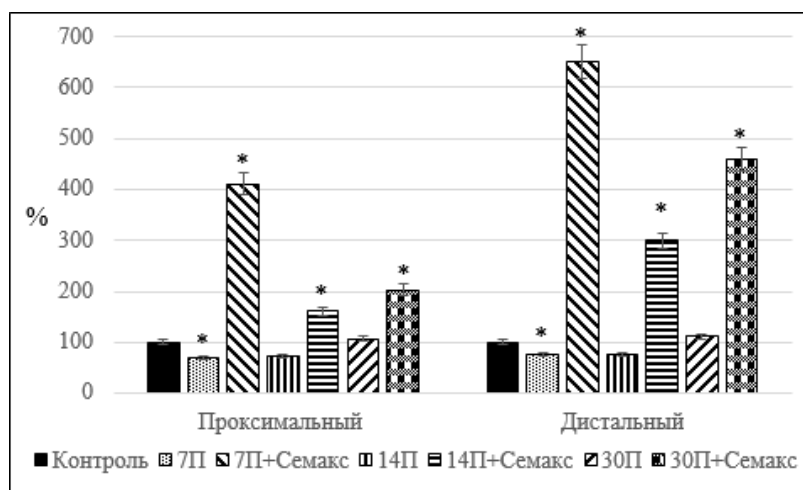


Рисунок 13 – Изменение содержания фактора роста нервов (NGF) при действии семакса на поврежденные нервы (* – достоверность отличия по отношению к интактной группе, $p<0.05$)

Таким образом, наши исследования показали, что клобетазол в малой дозировке (0,25 мг/кг) способствует усиленному синтезу нейротрофических факторов уже на первой неделе после травмы, тогда как более высокие дозировки препарата (1 и 0,5 мг/кг) проявляют свою эффективность лишь к 30-м 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.

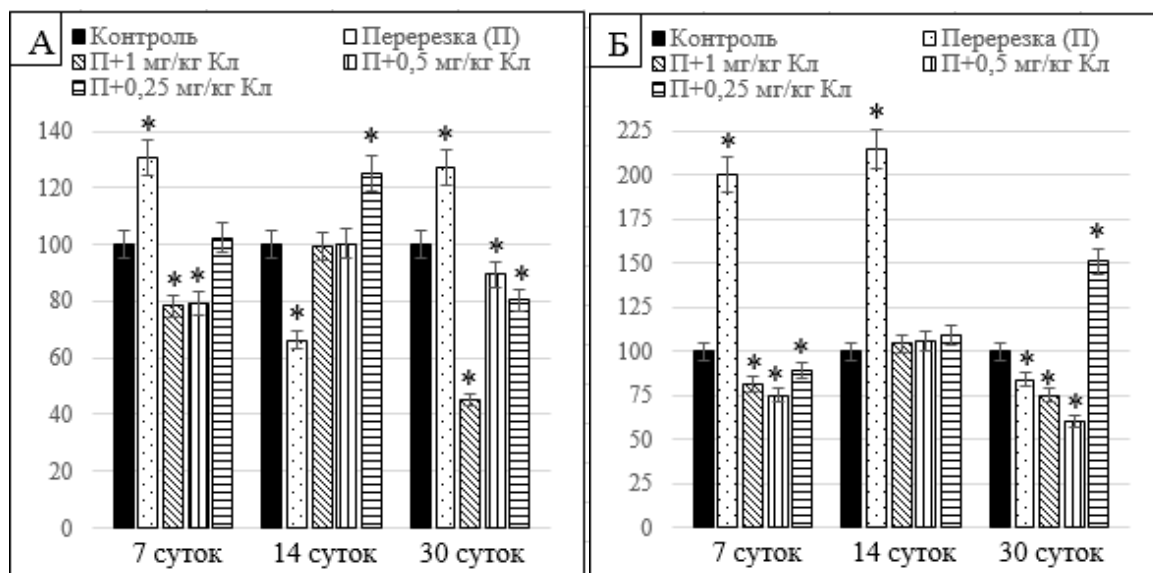
3.2 Влияние клобетазола и семакса на изменение концентрации NT-3 в поврежденных нервах

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

После повреждения нерва активируются сигнальные пути, запускающие усиленный синтез нейротрофических факторов роста (Duraikannu A., 2019). 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 14).

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.



А – проксимальный отдел, Б – дистальный отдел

Рисунок 14 – Динамика концентрации нейротрофина-3 при действии клобетазола на поврежденные нервы (* – достоверность отличия по отношению к интактной группе, $p < 0.05$)

В опыте с применением клобетазола в дозировке 0,25 мг/кг на 14 сутки эксперимента выросло количество нейротрофина-3 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 после травмы 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%.

Внутримышечное введение семакса привело к следующим результатам: в проксимальном отделе на 7 и 14 сутки эксперимента происходило снижение в 1,2 и в 1,7 раза содержания NT-3 относительно контрольных значений. Значительное увеличение данного параметра более чем в 1,5 раза наблюдалось на 30 сутки эксперимента (рисунок 15).

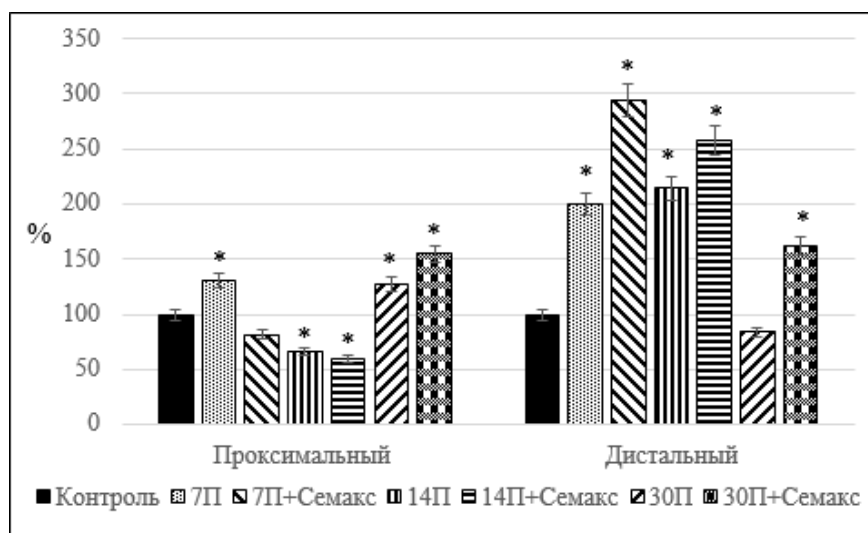


Рисунок 15 – Динамика концентрации нейротрофина-3 при действии семакса на поврежденные нервы (* – достоверность отличия по отношению к интактной группе, $p < 0.05$)

Стоит отметить, что именно в дистальном отделе уже на 7 сутки эксперимента при введении семакса резко повысился уровень нейротрофина-3 в 3 раза относительно контрольных значений. При увеличении постоперационных сроков до 14 и 30 суток концентрация NT-3 снижалась, но оставалась выше контрольных значений в 2,6 раза и 1,6 раза соответственно.

Таким образом, при повреждении нерва в дистальной части более чем в 2 раза повышается содержание нейротрофина-3. Активация нейротрофических факторов стимулирует дифференцировку и пролиферацию нервных клеток во время регенерации (Bouse V. S., 2014). Введение клобетазола в дозе 0,25 мг/кг и Семакса в дозе 37,5 мг/кг усиливает этот эффект, связываясь с глюкокортикоидными

рецепторами и активируя механизм, зависимый от ErbB2/3, соответственно. Это приводит к усиленному синтезу нейротрофических факторов, который мы наблюдаем в эксперименте.

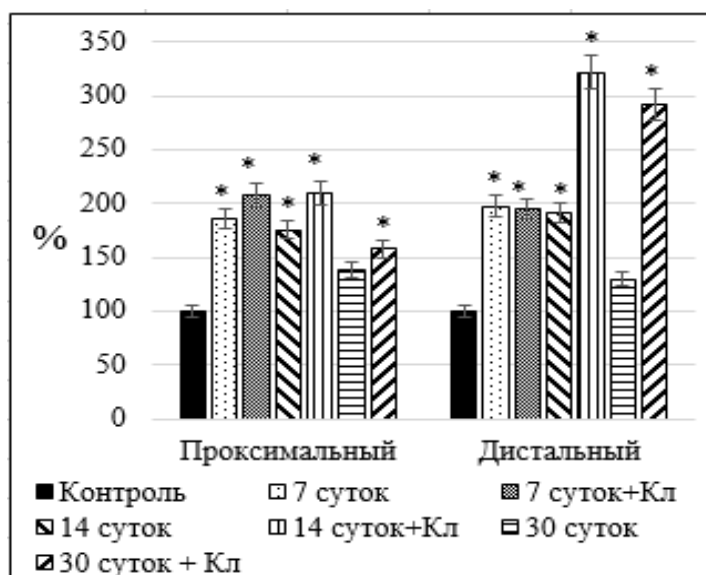
3.3 Изменение количественного содержания нейрорегулина-1 при действии клобетазола и семакса в процессе регенерации соматических нервов

Нейрорегулины (NRGs) - это семейство нейротрофических факторов, которые могут связываться с рецепторами ErbB и интегрин. Они играют ключевую роль в развитии, опосредуя нейронную дифференцировку, миелинизацию и формирование синапсов. Кроме того, они являются важными элементами систем, регулирующих нейронную возбудимость, нейротрансмиссию и синаптическую пластичность во взрослом мозге (Wang J. N., 2023).

Концентрация нейрорегулина-1 в интактном нерве составила $303,3 \pm 15,3$ пг/мл. 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 к 3 экспериментальной группе не наблюдалось, однако в дистальном отделе на 14 сутки и 30 сутки эксперимента существенно увеличивалось содержание нейрорегулинов-1 в 3,2 раза и 2,9 раз по отношению к контролю (рисунок 16).

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.

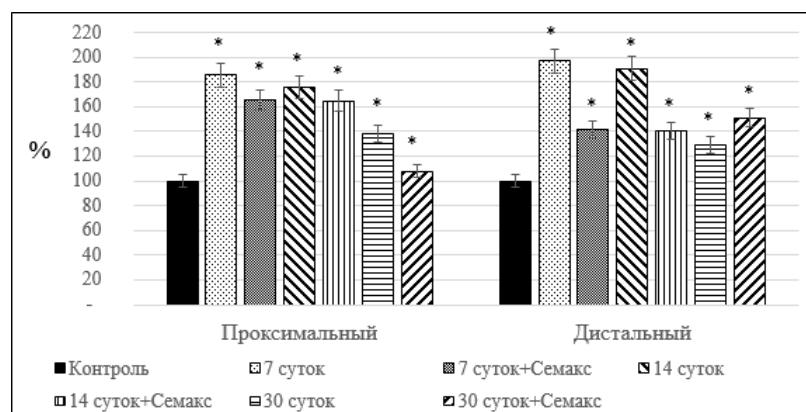


А – проксимальный отдел, Б – дистальный отдел

Рисунок 16 – Динамика концентрации нейрорегулина-1 при действии клобетазола на поврежденные нервы (* – достоверность отличия по отношению к контролю, $p < 0.05$)

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 17).

Из литературных данных известно, что при повреждении нерва уровни рецепторов NRG-1 (нейрорегулинов) значительно повышаются в дистальном участке нерва (Wang J. N., 2023). Клобетазол усиливает синтез нейрорегулинов более чем в 2 раза. Усиление синтеза нейрорегулинов под действием клобетазола происходит через ErbB-2/3-зависимый механизм. Активация рецепторов данного механизма может запускать сигнальные пути, стимулирующие пролиферацию, дифференцировку и выживание клеток (Shi W., 2019).



А – проксимальный отдел, Б – дистальный отдел

Рисунок 17 – Динамика концентрации нейрорегулина-1 при действии семакса на поврежденные нервы (* – достоверность отличия по отношению к контролю, $p < 0.05$)

3.4 Влияние клобетазола и семакса на изменение концентрации ДНК и содержания общего белка в поврежденных соматических нервах

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 (Pinyaev S. I. , 2019).

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.

Проведенные эксперименты с внутримышечным введением клобетазола в дозировке 0,25 мг/кг показали более выраженный эффект на восстановление проводимости нервных волокон по сравнению с использованием препарата в составе гидрогеля (рисунок 18, таблица 1).

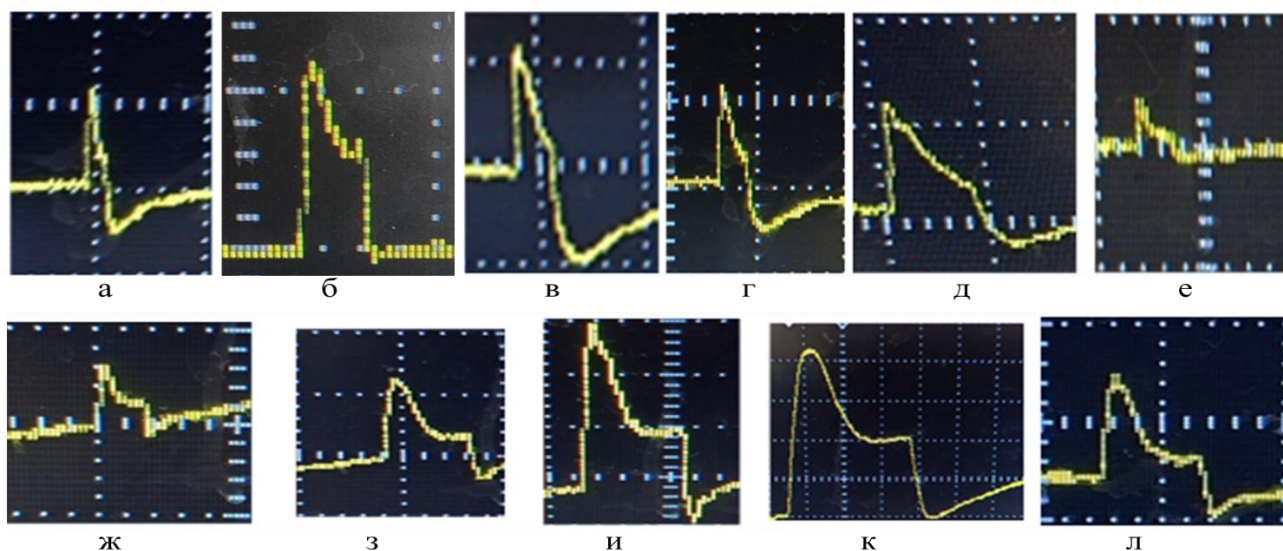


Рисунок 18 – Потенциал действия соматического нерва крысы. Масштаб по шкале потенциала: (а-з, л) 100 мВ на клетку, (и-к) 20 мВ на клетку; масштаб по времени (а) 0,5 мс, (в, г, е, ж) 0,25 мс, (д, з, и, л) 0,1 мс, (к) 0,025 мс на клетку: интактный нерв (а) и при стимуляции нерва (б); инкубация в растворе 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)

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

На следующем этапе нами было исследовано изменение концентрации ДНК и общего содержания белка в поврежденном нерве при воздействии 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%.

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 19).

В проксимальном отделе поврежденного нерва количество ДНК к 14 суткам эксперимента под действием клобетазола в концентрации 1 мг/кг уменьшилось на 12,6%, однако к 30 суткам эксперимента его содержание превышало контрольные значения в 1,5 раза.

В дистальном отделе нерва содержание ДНК с увеличением времени проведения эксперимента было ниже контрольных значений (рисунок 19).

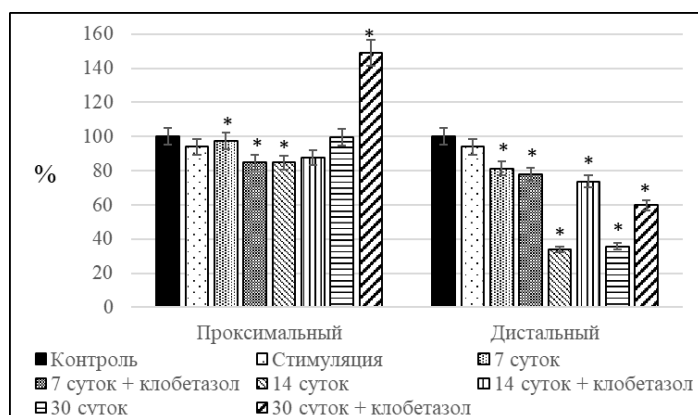


Рисунок 19 – Влияние клобетазола в концентрации 1 мг/кг на изменение концентрации ДНК поврежденных нервов (* – достоверность отличия по отношению к контролю, $p < 0.05$)

При введении клобетазола в средней концентрации (0,5 мг/кг) количество ДНК находилось выше контрольных значений на 28,5% и 10,6% к 7 и 30 суткам эксперимента. В дистальном отделе на 14-е сутки содержание нуклеиновой кислоты превысило контрольные значения на 15,7% (рисунок 20).

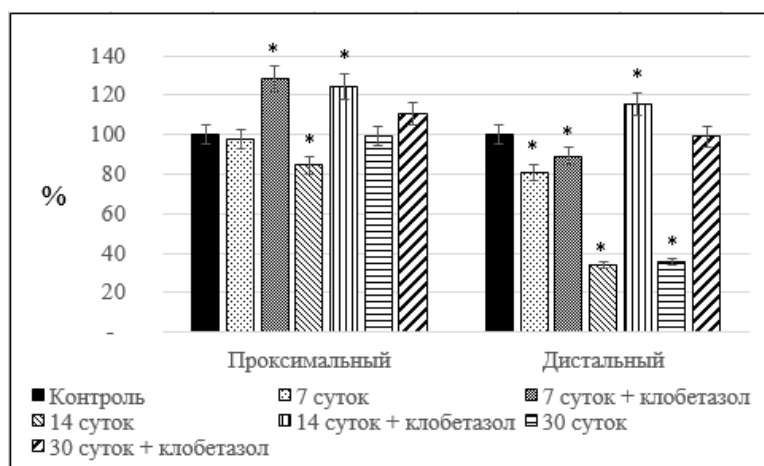


Рисунок 20 – Влияние клобетазола в концентрации 0,5 мг/кг на изменение концентрации ДНК поврежденных нервов (* – достоверность отличия по отношению к контролю, $p < 0.05$)

В опыте с клобетазолом в концентрации 0,25 мг/кг в проксимальном отделе нерва происходило увеличение концентрации ДНК в 1,8 и 1,4 раза по сравнению с контролем через 7 и 14 дней соответственно (рисунок 21).

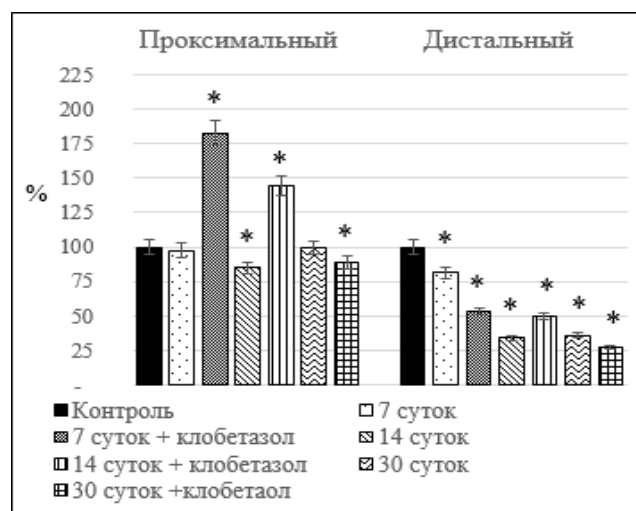


Рисунок 21 – Влияние клобетазола в концентрации 0,25 мг/кг на изменение концентрации ДНК поврежденных нервов (* – достоверность отличия по отношению к контролю, $p < 0.05$)

В ходе эксперимента было установлено, что наименьшим цитотоксическим действием обладает гидрогель, разведенный в 128 раз, что обеспечивает выживаемость клеток на уровне 72%. Это означает, что при данной концентрации гидрогель имеет минимальное негативное влияние на клетки (рисунок 22).

При наложении гидрогеля на концы поврежденного нерва к 7 суткам эксперимента наблюдалось уменьшение содержания ДНК, однако к 30 суткам эксперимента данный показатель находился в пределах погрешности контрольных значений (рисунок 23). Добавление клобетазола в гидрогель в конечной концентрации приводило к значительному увеличению концентрации ДНК на 45,5% к 30-м суткам после перерезки нерва.

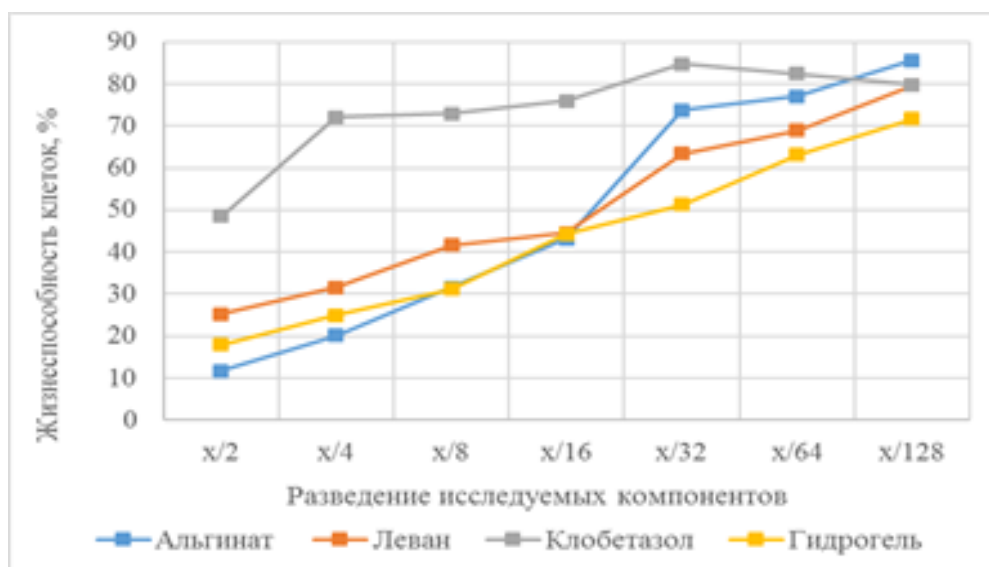


Рисунок 22 – Определение жизнеспособности клеток при влиянии гидрогеля и отдельных его компонентов

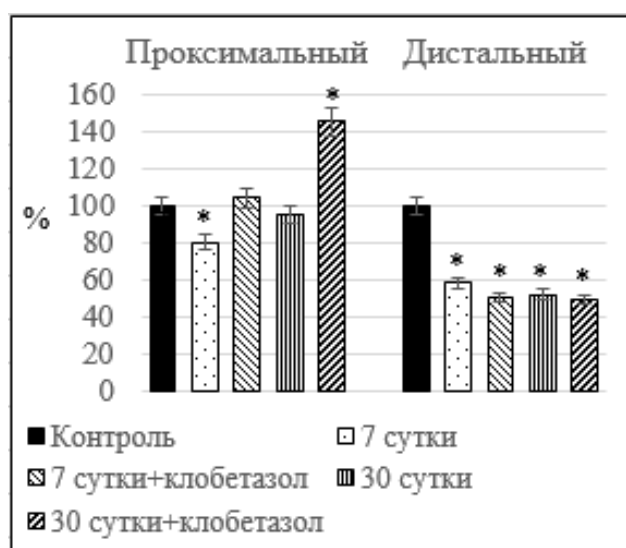


Рисунок 23 – Влияние клобетазола в составе гидрогеля на изменение концентрации ДНК поврежденных нервов (* – достоверность отличия по отношению к контролю, $p < 0.05$)

В проксимальном отделе нерва при действии семакса наблюдалось значительное повышение белка в 1,49 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 24).

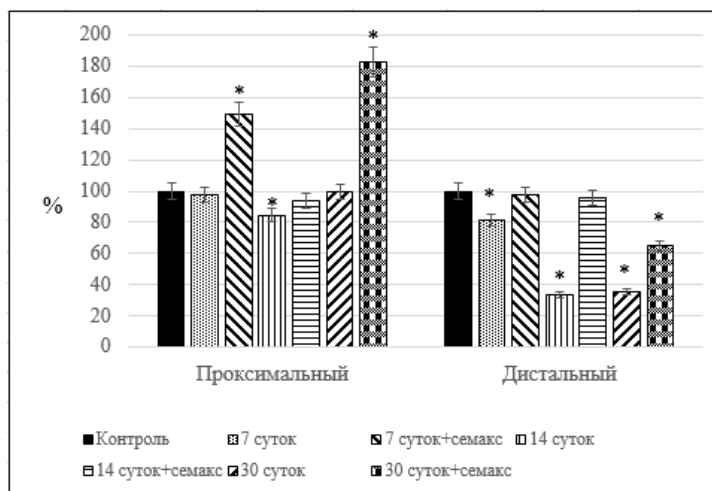


Рисунок 24 – Влияние семакса в концентрации 37,5 мг/кг на изменение концентрации ДНК поврежденных нервов (* – достоверность отличия по отношению к контролю, $p < 0.05$)

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, дегенерации микротрубочек и нейрофиламентов, а также в образовании дегенеративных гранул (Алексеева Е.Б., 2013; Продан А.И., 2010).

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. С увеличением сроков эксперимента данный показатель

увеличивался, и к 30-му дню его уровень в поврежденном соматическом нерве был на 10,5% ниже контрольного значения (рисунок 25).

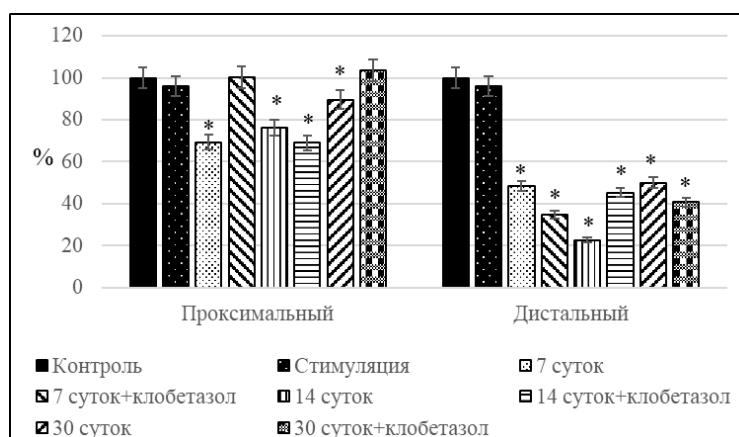


Рисунок 25 – Влияние клобетазола в концентрации 1 мг/кг на изменение общего содержания белка поврежденных нервов (* – $p < 0,05$ по сравнению с контролем)

В дистальном отделе поврежденного нерва к 14-му дню эксперимента зафиксировано резкое уменьшение содержания белка, более чем в четыре раза по сравнению с контрольной группой. Через 30 суток после травмы общее содержание составило $\frac{1}{2}$ от контрольных значений.

При воздействии клобетазола в концентрации 1 мг/кг к 14 суткам общее содержание белка снизилось на 31,3% относительно интактной группы. Тем не менее, к 30-му дню содержание белка восстановилось до уровня контроля.

В дистальном отделе нерва наблюдалось резкое уменьшение содержания белка в 2,9 раз по сравнению с контрольной группой в течение первой недели. К 30 суткам эксперимента данный показатель все еще находился ниже контрольных значений на 59,3% (рисунок 25).

Применение клобетазола в концентрации 0,5 мг/кг в первую неделю эксперимента происходило снижение уровня общего белка на 25,3% относительно контроля. При увеличении сроков эксперимента до 14 и 30 суток концентрация общего белка возросло на 59,2% и 44,5% относительно контрольных значений (рисунок 26).

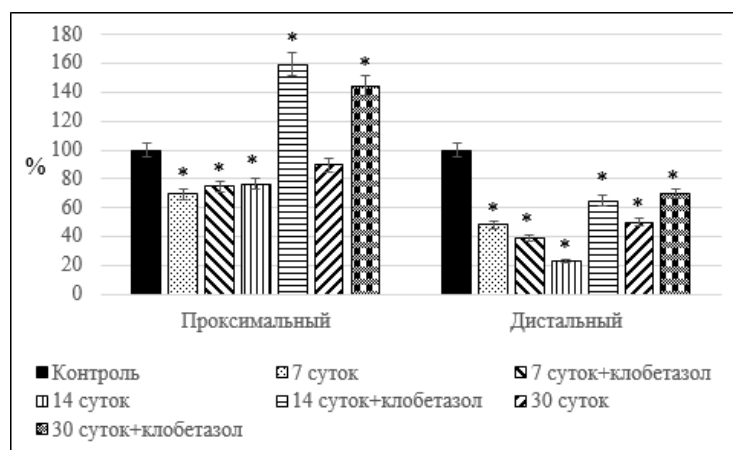


Рисунок 26 – Влияние клобетазола в концентрации 0,5 мг/кг на изменение общего содержания белка поврежденных нервов (* – $p < 0,05$ по сравнению с контролем)

В дистальном отделе поврежденного нерва общее содержание белка к 7 суткам после травмы снизилось на 61,2% по отношению к контрольной группе.

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 (рисунок 27).

Наложение гидрогеля на поврежденные концы соматического нерва привело к снижению на 7-й и 30-й день эксперимента общего содержания белка в проксимальном отделе нерва на 31,2% и 27,4% соответственно. При добавлении в гидрогель клобетазола в конечной концентрации 0,25 мг/мл на 30-й день после перерезки нерва общее содержание белка в проксимальном нерве было сопоставимо с контрольными значениями (рисунок 28).



Рисунок 27 – Влияние клобетазола в концентрации 0,25 мг/кг на изменение общего содержания белка поврежденных нервов (* – $p < 0,05$ по сравнению с контролем)



Рисунок 28 – Влияние клобетазола в составе гидрогеля на изменение общего содержания белка поврежденных нервов

При использовании препарата Семакс в концентрации 37,5 мг/кг общее содержание белка в проксимальном нерве снизилось на 40,9% и 25,1% по сравнению с контрольными значениями на 7-й и 14-й дни после травмы. На 30-й день после травмы этот показатель был значительно ниже контрольного значения.

Действие препарата «Семакс» привело к снижению содержания общего белка на 55,5% по сравнению с контрольными значениями на 7-й день эксперимента. При продлении послеоперационного периода до 14 и 30 дней содержание общего белка увеличивается, но остается ниже контрольного значения на 50,9% и 21,2% соответственно (рисунок 29).

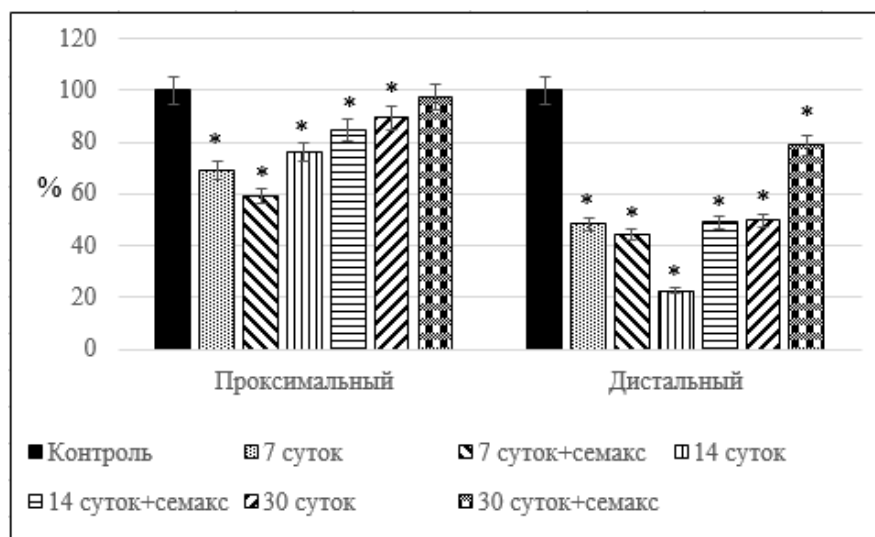


Рисунок 29 – Влияние семакса в концентрации 37,5 мг/кг на изменение общего содержания белка поврежденных нервов (* – $p < 0,05$ по сравнению с контролем)

Таким образом можно заключить, что 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. Через 3-6 недель происходит частичное восстановление функций нейрона, начинают отрастать конусы роста, с чем связан рост уровня общего белка (Продан А. И., 2010).

Введение клобетазола в его минимальной концентрации приводит к стабилизации содержания белка и ДНК в проксимальной части поврежденного

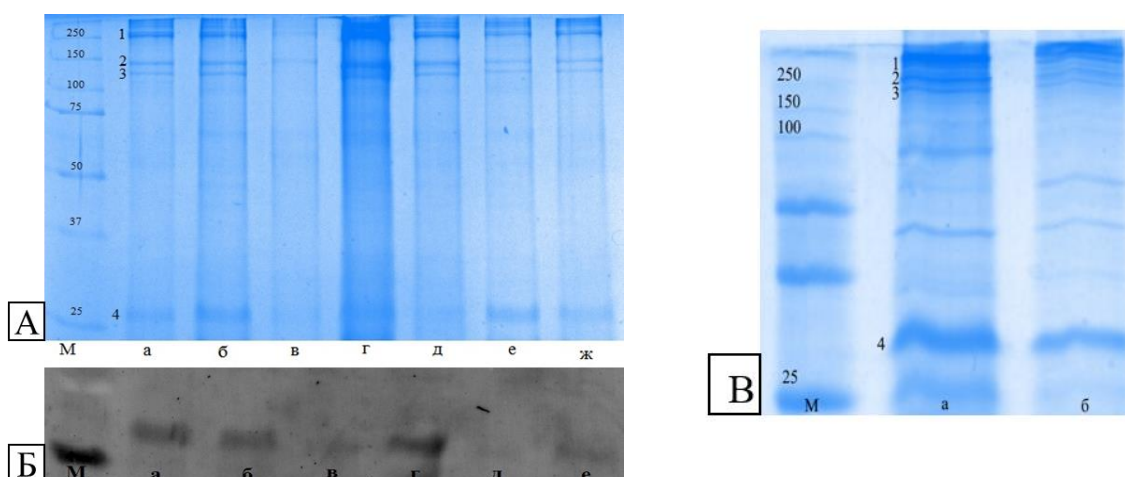
нерва. При введении препарата «Семакс» происходит увеличение содержания уровня общего белка, особенно выраженные изменения происходят на 30 сутки.

3.5 Влияние клобетазола и семакса 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. Также для выявления регенерирующих волокон используют маркер – GAP-43, который является мембранным белком, а его высокие уровни проявляются в нервных клетках с высокой способностью к росту и пластичности (Ковражкина А. Е., 2018; Chung D., 2020). Белок GAP-43 является ключевым фактором в регенерации аксонов.

Исходя из этого, на следующем этапе эксперимента методом электрофореза на ПААГ был изучен качественный состав белковой фракции исследуемых интактных и поврежденных нервов. В интактном нерве были выявлены белки нейрофиламентов-Н (190-200 кДа), нейрофиламентов-М (140 - 160 кДа), тубулина (110 кДа), GAP-43 (27 кДа) (рисунок 30).

В результате эксперимента было выявлено снижение уровня NF-H и тубулина на 22,8% и 22% соответственно в проксимальном сегменте на 14-е сутки наблюдения, однако к 30-м суткам их концентрация увеличилась на 9,8% и 34,8% по сравнению с контрольными показателями. При этом уровень GAP-43 увеличивался как на 7-е, так и на 30-е сутки эксперимента в 1,3 и 2,3 раза соответственно по сравнению с неповрежденным нервом (рисунок 31А).

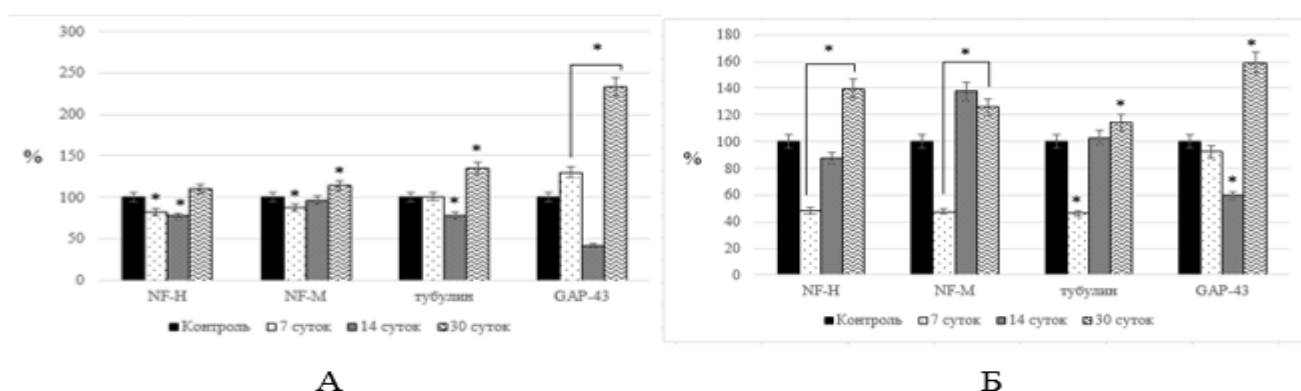


А–Б: М – маркер; а – контроль; б – проксимальный участок, 7 суток;
в – дистальный участок, 7 суток; г – проксимальный участок, 14 суток;
д – дистальный участок, 14 суток; е – проксимальный участок, 30 суток;
ж – дистальный участок, 30 суток

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

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

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



* – $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Рисунок 31 – Изменение содержания отдельных белковых фракций в проксимальном (А) и дистальных (Б) отрезках поврежденных соматических нервов

В дистальном отделе наблюдается более интенсивная деградация белков из-за продолжительных и сложных дегенеративных процессов: уже через 7 суток после травмы уровень структурных белков оказался более чем в 2 раза ниже контрольных значений (рисунок 31Б). Однако к 30-м суткам содержание нейрофиламента-Н, нейрофиламента-М и тубулина увеличилось на 39,7%, 26% и 14,5% соответственно по сравнению с контрольными показателями.

На 14-е сутки 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.

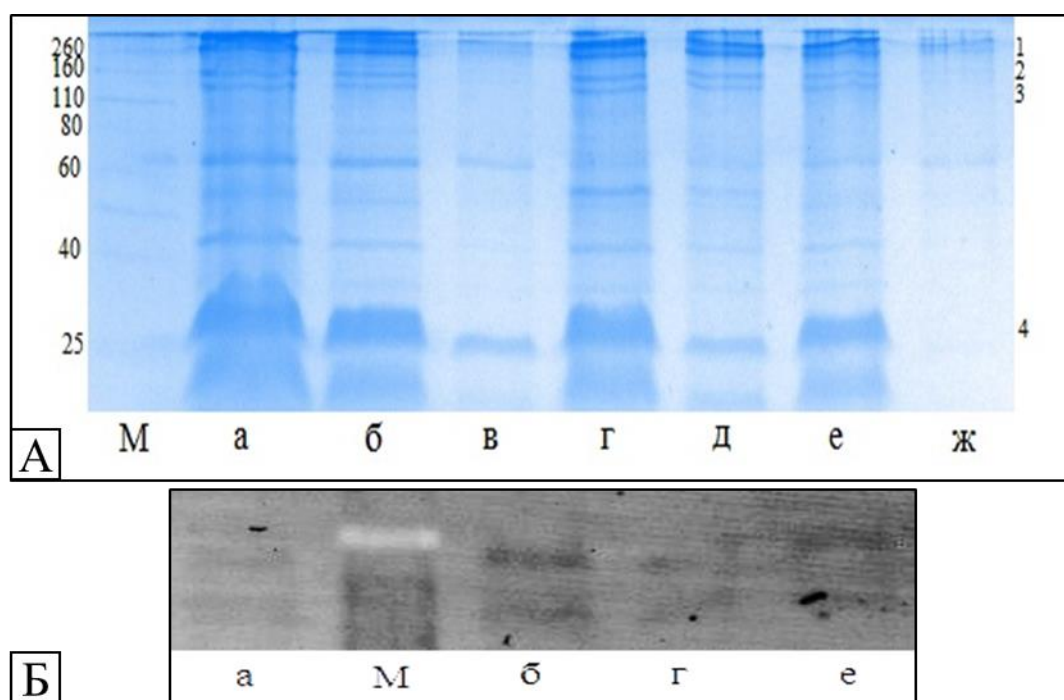
Травма нерва вызывает сложный каскад событий, который приводит к последующей регенерации или утрате нервной ткани. Дегенерация аксона может привести к нарушениям в передаче нервных импульсов и функционировании нервной системы в целом. Процесс усиленной экспрессии натриевых каналов и временного восстановления 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 (Isakina M. V., 2015).

Исследования подтверждают, что при повреждении нерва происходит активация синтеза структурных белков, таких как нейрофиламенты NF-Н, NF-М и тубулин, которые играют ключевую роль в регенерации нерва. NF-Н (нейрофиламент тяжелой цепи) и NF-М (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).

При анализе электрофореграммы белковых полос проксимального участка поврежденных нервов выявили, что при воздействии клобетазола в высокой дозе интенсивность белковой полосы нейрофиламента-Н на 7 и 14 сутки уменьшилось

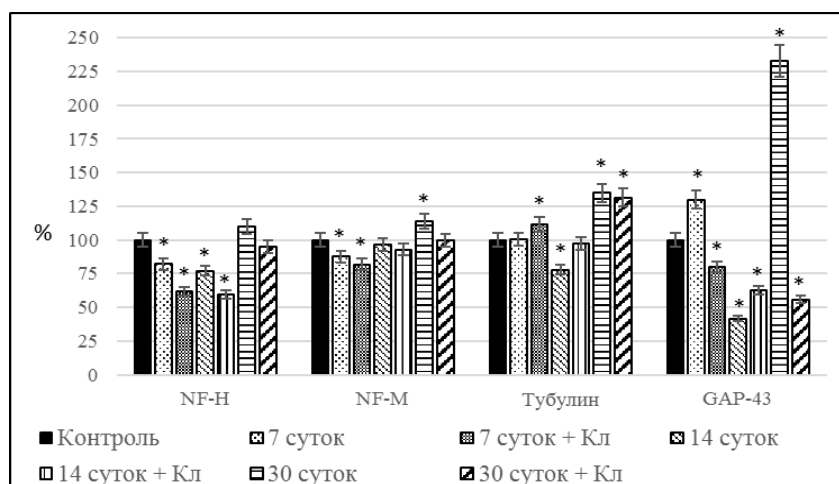
на 37,8% и 40,4%, а к 30 суткам после травмы данный показатель был практически равен контролю.

Следует отметить, что интенсивность белковой полосы тубулина достоверно увеличивалась на 7 и 30 сутки по отношению к контролю на 11,8% и 31,4% соответственно. Интенсивность белковой полосы GAP-43 с увеличением послеоперационных сроков достоверно уменьшалась и на 30 сутки была ниже контрольных значений на 44,4% (рисунок 32, 33).



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 – NF-H, 2 – NF-M, 3 – тубулин, 4 – GAP-43

Рисунок 32 – Электрофореграмма белков (А) и вестерн-блотт анализ уровня GAP-43 (Б) поврежденных соматических нервов при действии клобетазола в концентрации 1 мг/кг



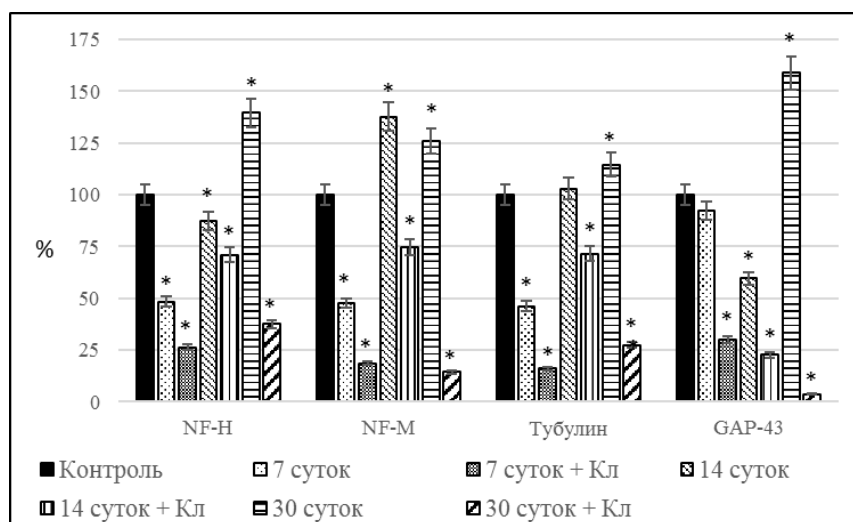
* – $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Рисунок 33 – Изменение содержания отдельных белковых фракций в проксимальной части поврежденных соматических нервов через 7, 14 и 30 суток после перерезки при действии клобетазола в концентрации 1 мг/кг

В дистальной части при воздействии клобетазола в концентрации 1 мг/кг на 7-е сутки значительно снижается интенсивность всех исследуемых структурных белков: NF-H на 73,7% и NF-M на 81,3%, тубулина на 83,9% по отношению к контролю.

К концу второй недели эксперимента наблюдалось заметное увеличение содержания структурных белков, но их уровень оставался ниже контрольных значений: у NF-H – на 28,9%, у NF-M – на 25,4% и тубулина на 28,4%. К 30 суткам вновь наблюдалось значительное уменьшение белковых полос NF-H, NF-M и тубулина на 62,3%, 85,6 и 72,6 % соответственно относительно контрольных значений.

Стоит отметить, что в дистальном отделе интенсивность белковой полосы GAP-43 уменьшилась на 70%, а к 30 суткам после повреждения и вовсе наблюдалась в следовых количествах (рисунок 34).

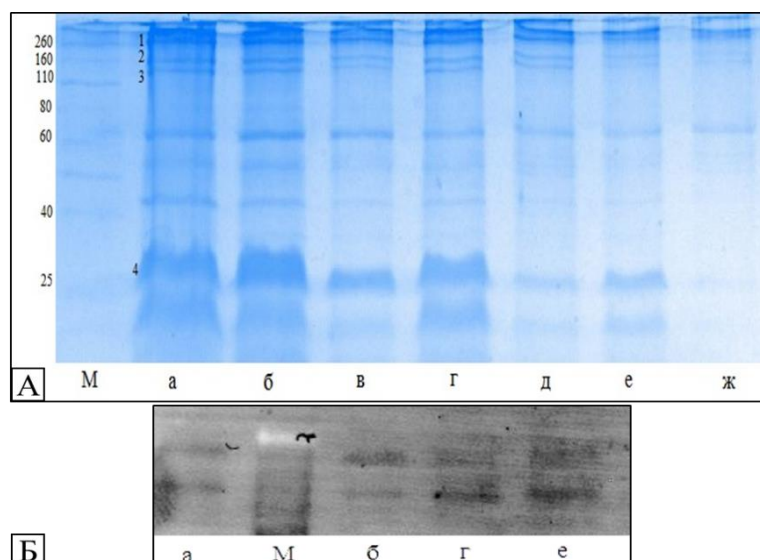


* – $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Рисунок 34 – Изменение содержания отдельных белковых фракций в дистальной части поврежденных соматических нервов через 7, 14 и 30 суток после перерезки при действии клобетазола в концентрации 1 мг/кг

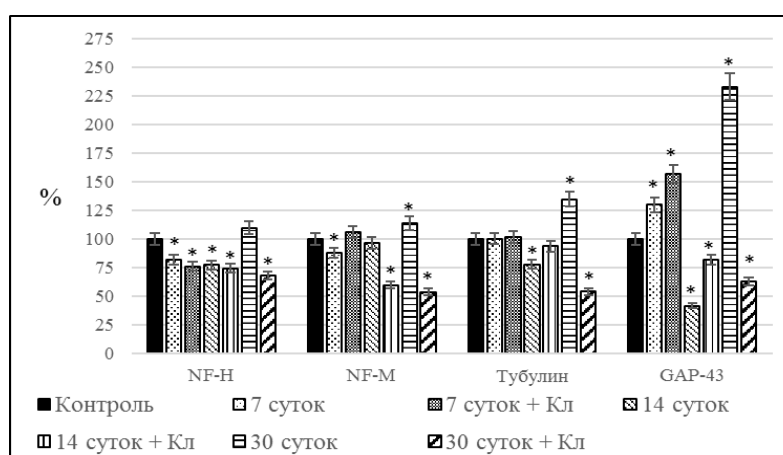
Таким образом, введение клобетазола в концентрации 1 мг/кг приводит к дестабилизации белкового состава нерва, что значительно проявляется в дистальном отделе. Стоит отметить, что клобетазол в данной концентрации негативно влияет и на синтез белка GAP-43, являющегося специфическим белком для аксонального роста.

При анализе электрофореграммы белковых фракций проксимального отдела соматических нервов после травмы при действии клобетазола в средней концентрации (0,5 мг/кг) выявили следующее: количественное содержание высокомолекулярного нейрофиламента к 14 и 30 суткам эксперимента заметно снижено на 25,6% и 31,9% соответственно относительно контроля. Содержание специфического для роста аксонов белка GAP-43 в начальный период эксперимента был выше контроля в 1,6 раз, однако к 30-м суткам его уровень снизился на 37,1% относительно контрольных значений (рисунок 35, 36).



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 – NF-H, 2 – NF-M, 3 – тубулин, 4 – GAP-43

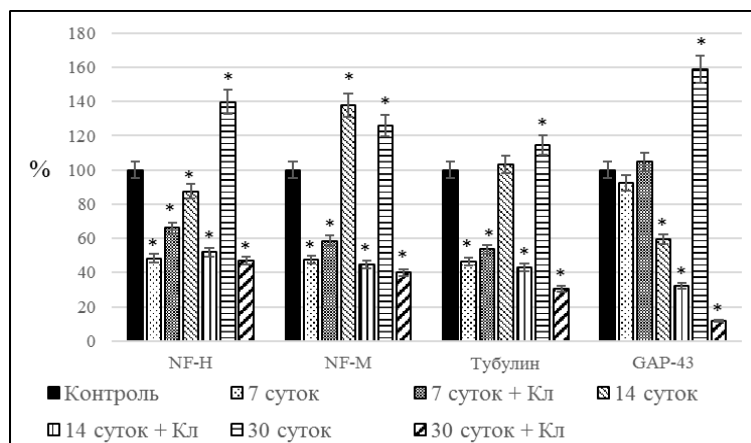
Рисунок 35 – Электрофореграмма белков (А) и вестерн-блотт анализ уровня GAP-43 (Б) поврежденных соматических нервов при действии клобетазола в концентрации 0,5 мг/кг



* – $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Рисунок 36 – Изменение содержания белковых фракций в проксимальной части поврежденных нервов при действии клобетазола в концентрации 0,5 мг/кг

В дистальной части при воздействии клобетазола в концентрации 0,5 мг/кг на 7-е сутки снижается интенсивность цитоскелетных белковых полос: NF-H на 34%, NF-M на 41,4% и тубулина на 46,5% по отношению к контролю. К 30 суткам эксперимента наблюдалось дальнейшее разрушение и распад цитоскелетных белков: NF-H на 53,1%, NF-M на 59,9%, тубулина на 69,5% относительно контроля (рисунок 37).



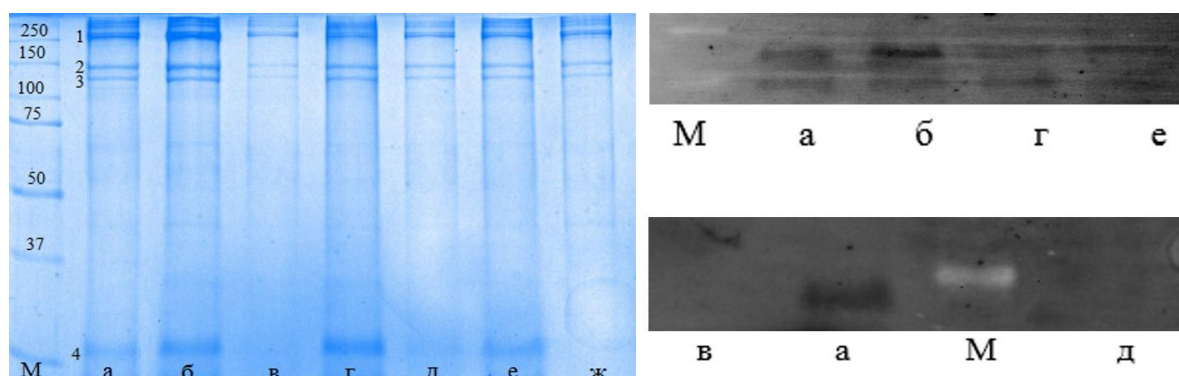
* – $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Рисунок 37 – Изменение содержания отдельных белковых фракций в дистальной части поврежденных соматических нервов через 7, 14 и 30 суток после перерезки при действии клобетазола в концентрации 0,5 мг/кг

Анализ электрофореграммы белковых фракций проксимального отдела соматических нервов после травмы при введении клобетазола в низкой 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.

Содержание тубулина также было снижено в начальный период эксперимента (7 суток) 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

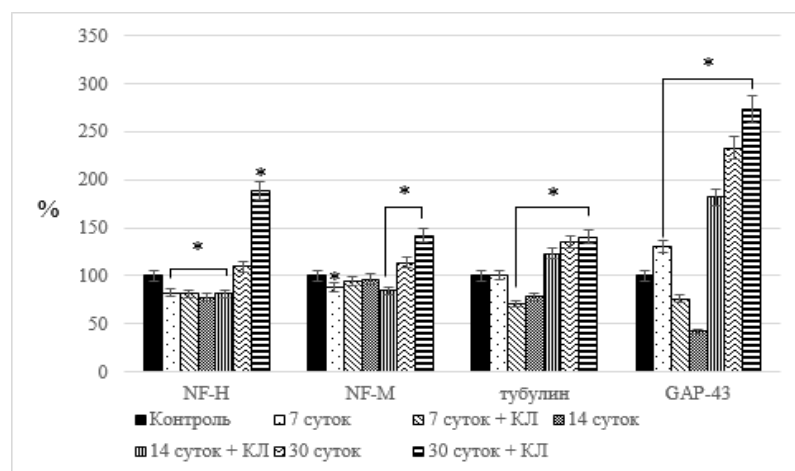
значений в 1,3 раза, а на 14-е и 30-е сутки превышала контрольные показатели в 1,8 и 2,7 раза соответственно (рисунок 38, 39).



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

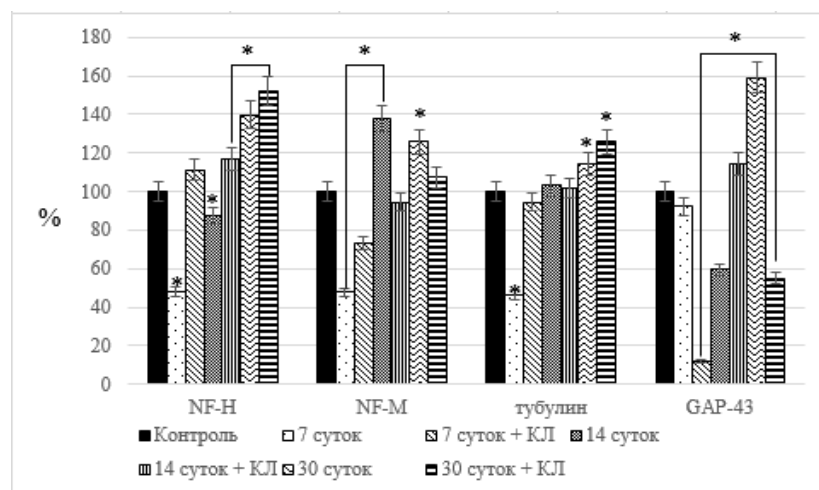
Рисунок 38 – Электрофореграмма белков (А) и вестерн-блотт анализ уровня GAP-43 (Б) в поврежденных соматических нервах крысы при введении клобетазола в концентрации 0,25 мг/кг

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% (рисунок 40).



* – $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Рисунок 39 – Влияние клобетазола в концентрации 0,25 мг/кг на содержание отдельных белковых фракций в проксимальной части поврежденных соматических нервов крысы



* – $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Рисунок 40 – Влияние клобетазола в концентрации 0,25 мг/кг на содержание отдельных белковых фракций в дистальной части поврежденных соматических нервов

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, таких как фактор роста нервов (NGF) и нейротрофин-3 (NT-3). 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 (рисунок 41) (Ковражкина А.Е., 2018).

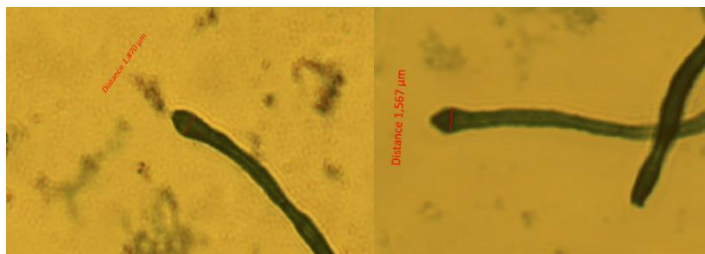
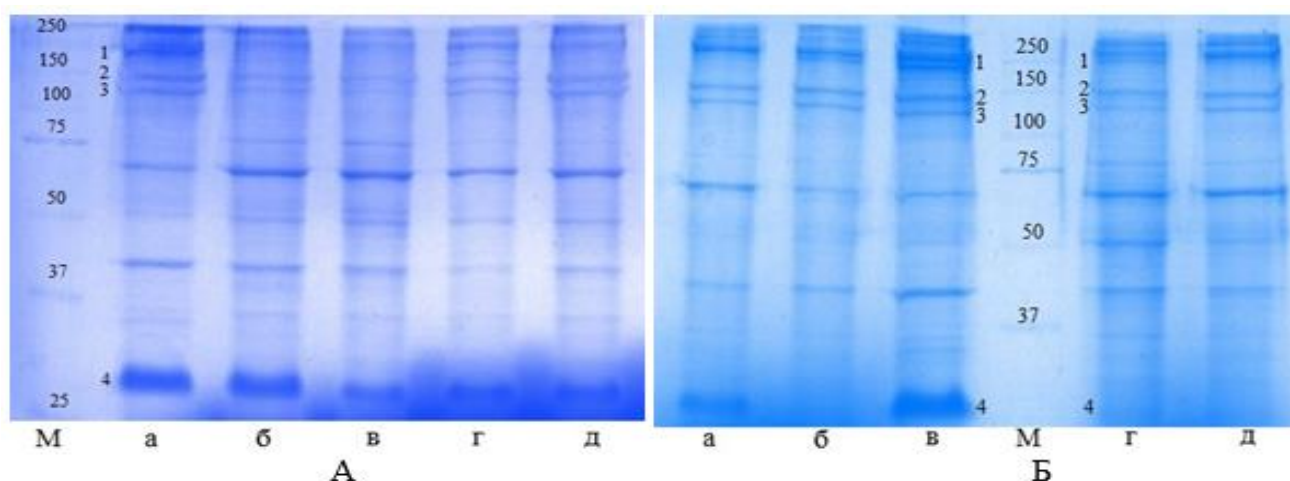


Рисунок 41 – Конусы роста поврежденных нервов на 24 сутки эксперимента

Клобетазол, как кортикостероид, может опосредованно повышать экспрессию факторов роста нервов, при этом снижая воспалительные процессы и создавая благоприятную среду для регенерации (Shi W., 2019). Факторы роста активируют клеточные сигнальные каскады, которые стимулируют синтез белков, необходимых для восстановления нервной ткани, таких как нейрофиламенты и тубулин (Zhou F. Q., 2006). 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 (Щаницын И. Н., 2017).

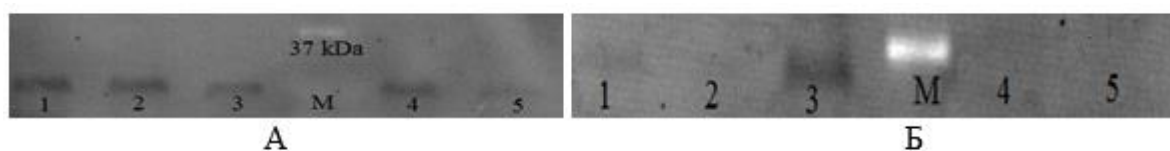
Анализ электрофореграммы проксимального отдела поврежденных нервов при наложении гидрогеля показал, что уровни высокомолекулярных и средномолекулярных нейрофиламентов были ниже контрольных значений на 68,3% и 79,9% соответственно. К 30 суткам эксперимента данные показатели увеличились, но оставались ниже контрольных значений на 31% и 65,5% соответственно. Содержание тубулина также было ниже контрольных значений как к 7 суткам эксперимента на 74,7%, так и к 30 суткам – на 34,5%. Уровень GAP-43 в течение 7 и 30 суток был ниже контрольных значений на 59,6% и 24,6% (рисунки 42-44).



А – проксимальный участок: М – маркер; а – контроль; б – 7 суток; в – 7 суток при добавлении клобетазола в гидрогель; г – 30 суток; д – 30 суток при добавлении клобетазола в гидрогель; Б – дистальный участок: а – 7 суток; б – 7 суток при добавлении клобетазола в гидрогель; в – контроль; М – маркер; г – 30 суток; д – 30 суток при добавлении клобетазола в гидрогель

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

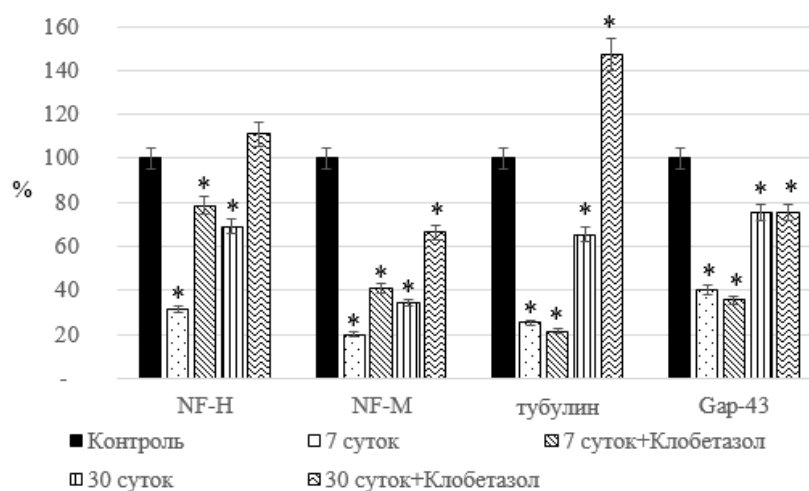
Рисунок 42 – Электрофореграмма поврежденных соматических нервов крысы при влиянии гидрогеля



А – проксимальный отдел: 1 – контроль; 2 – 7 суток; 3 – 7 суток при добавлении клобетазола в гидрогель; М – маркер; 4 – 30 суток; 5 – 30 суток при добавлении клобетазола в гидрогель; М – маркер

Б – дистальный отдел: 1 – 7 суток; 2 – 7 суток при добавлении клобетазола в гидрогель; 3 – контроль; М – маркер; 4 – 30 суток; 5 – 30 суток при добавлении клобетазола в гидрогель

Рисунок 43 – Вестерн-блот анализ уровня GAP-43 поврежденных нервов при влиянии гидрогеля

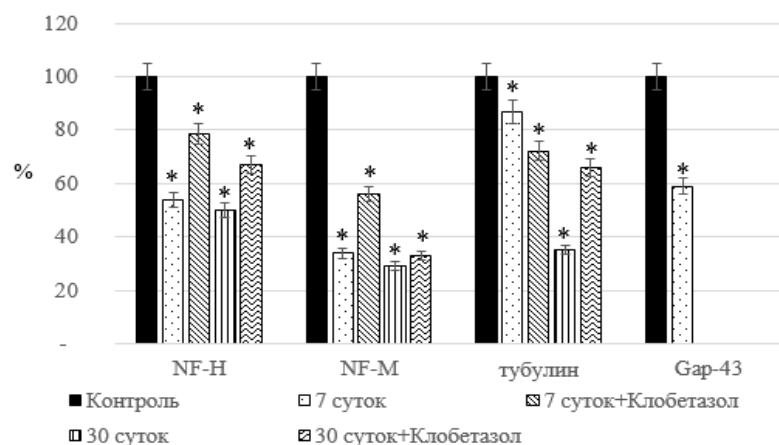


* – $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Рисунок 44 – Влияние гидрогеля на содержание отдельных белковых фракций в проксимальной части поврежденных соматических нервов крысы

В экспериментах с введением препарата через наложение гидрогеля на поврежденный конец нерва было показано меньшее снижение содержания фракций структурных белков в сравнении с гидрогелем, не содержащего клобетазол. Так, к 7 суткам эксперимента содержание высокомолекулярных и средномолекулярных

нейрофиламентов было ниже контрольных значений на 21,4% и 58,9%, а тубулина – на 78,6% относительно контрольных значений. К 30-м суткам содержание NF-H и тубулина увеличилось на 11% и 47,2% соответственно по сравнению с контролем (рисунок 45).



* – $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Рисунок 45 – Влияние гидрогеля на содержание отдельных белковых фракций в дистальной части поврежденных соматических нервов крысы

На 7-е сутки интенсивность белковой фракции GAP-43 резко снизилась на 41% по сравнению с контролем, а в последующих сериях эксперимента на 7 и 30 сутки при добавлении в гидрогель клобетазола в конечной концентрации 0,25 мг/мл исчезли на электрофореграмме. Добавление в гидрогель действующего вещества способствует меньшей деградации белковых полос цитоскелета.

Таким образом, в опыте с наложением гидрогеля на поврежденный конец периферического нерва наиболее значительно происходил распад структурных белков по сравнению с внутримышечным введением клобетазола. Это может быть связано с токсичностью его компонентов, воспалительной реакцией или нарушением регенерационных процессов.

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

нейропротекторными и нейротрофическими свойствами, способствующими защите и стимуляции роста нервных клеток (рисунок 46).

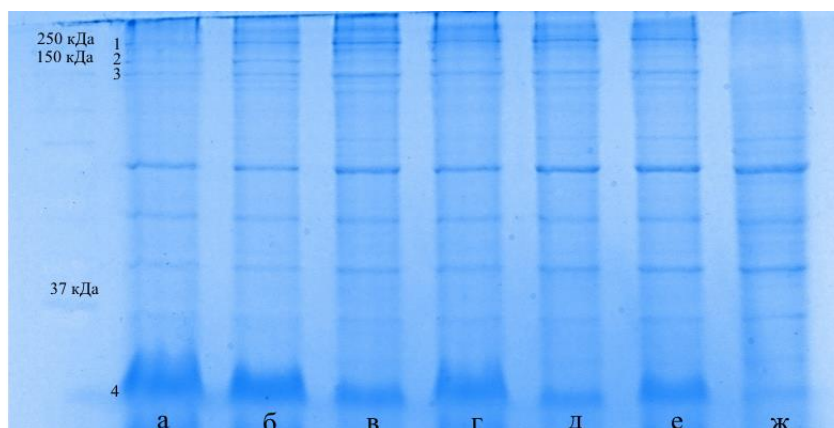


Рисунок 46 – Электрофореграмма белкового состава поврежденного нерва с введением препарата «Семакс 0,1%» в концентрации 37,5 мг/кг

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 47).

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 (рисунок 47).

В дистальном отделе поврежденного нерва содержание высокомолекулярных нейрофиламентов с увеличением постоперационных сроков уменьшается: к 7 суткам – на 22,2%, а к 30 суткам – 71,4% относительно контрольных значений. Количественное содержание средномолекулярных нейрофиламентов также имеет тенденцию уменьшения с увеличением сроков

эксперимента: к 7 суткам – на 27,4%, а к 30 суткам – на 85,4% относительно контроля.

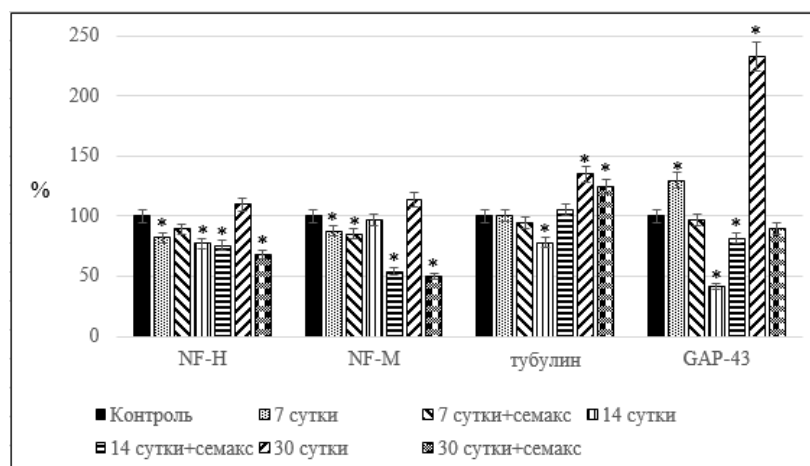


Рисунок 47 – Содержание белковых фракции в проксимальном отделе поврежденного нерва при действии препарата «Семакс» в концентрации

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.

В дистальной части поврежденного нерва на 7 сутки значительно уменьшается количественное содержание GAP-43 на 47,5% относительно контроля, а к 30 суткам – на 86,6% (рисунок 48).

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

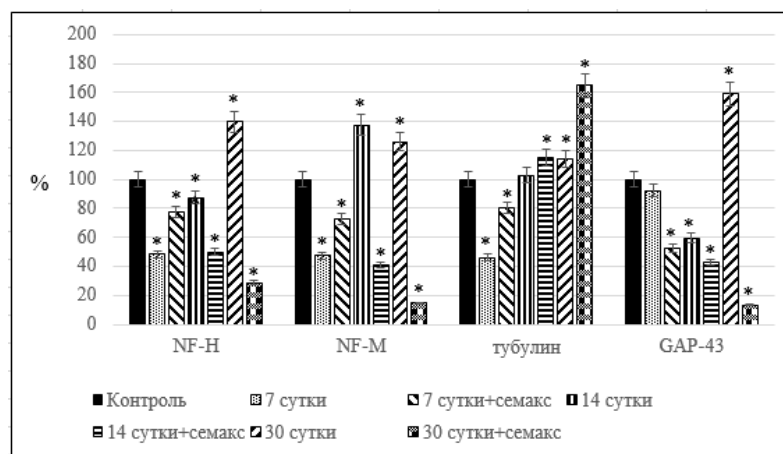


Рисунок 48 – Содержание белковых фракции в дистальном отделе поврежденного нерва при действии препарата «Семакс 0,1%» в концентрации 37,5 мг/кг (* – $p < 0,05$ по отношению к контролю)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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.

Следует отметить, что ключевую роль в аксональной регенерации играет сигнальный путь митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK/ERK). Он является одним из основных механизмов, обеспечивающих выживание, рост аксонов и их регенерацию после повреждения. Помимо этого, в процессе аксональной регенерации значительную роль играют и другие сигнальные пути, такие как активация протеинкиназы C (PKC), фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K)/протеинкиназы B (PKB/Akt), а также механизмы, регулирующие ростовые конусы аксона (Hemmings B. A., 2012; Zhao G. X., 2015).

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, контролирующих синтез ключевых белков, таких как белки цитоскелета и белки, участвующие в аксональном росте (Zhou F. Q., 2006). Эти белки необходимы для восстановления функциональной активности поврежденных нервных волокон. 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 49).

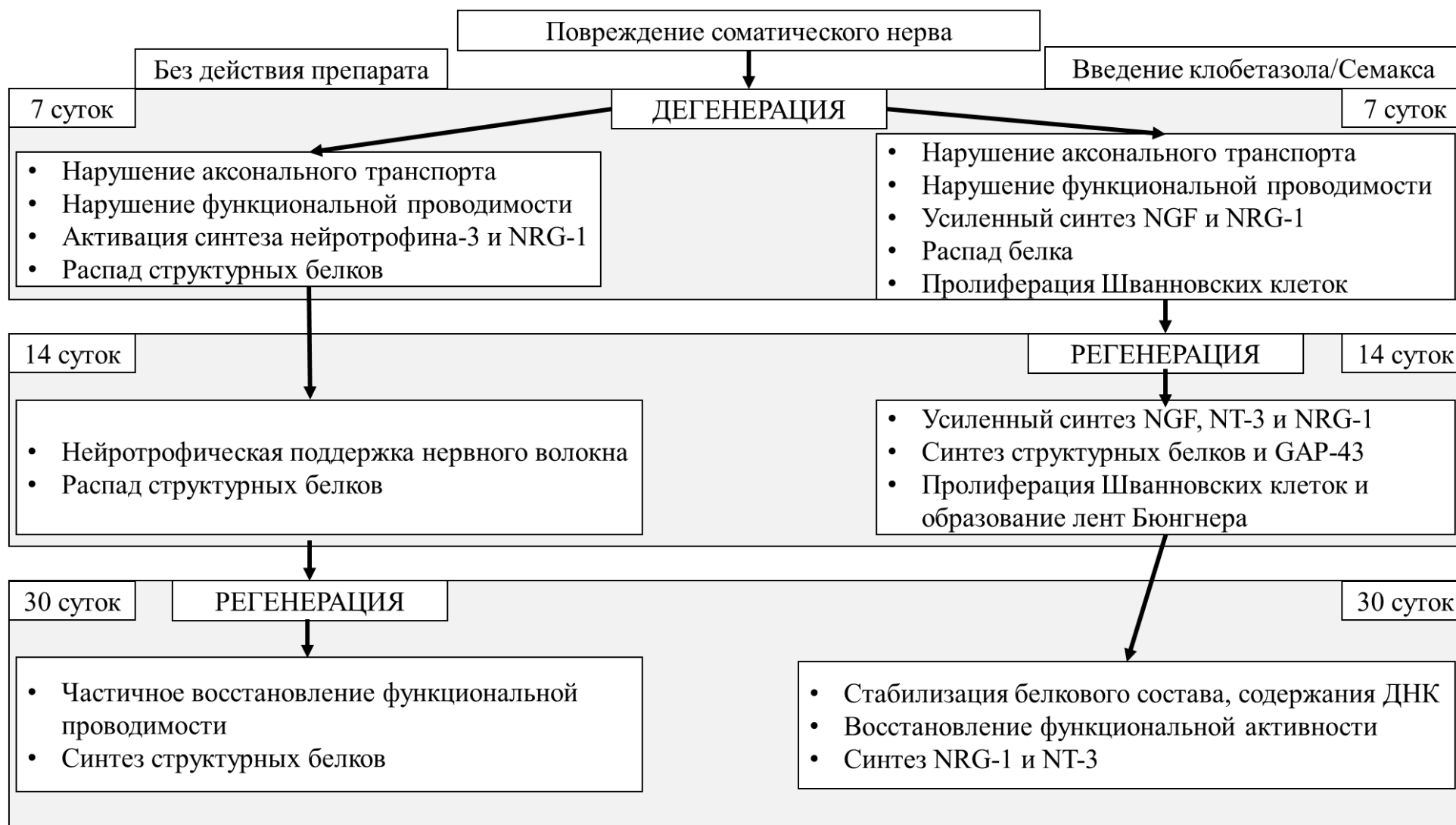


Рисунок 49 – Изменения, происходящие в соматическом нерве при его повреждении и действия клобетазола на фоне травмы

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 ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1 Акшулаков, С. К. Обзор методов восстановления проводимости травмированного участка спинного мозга сочетанием комбинированных путей восстановления поврежденного участка и стимуляции регенерации аксонов / С. К. Акшулаков, Т. Т. Керимбаев, В. Г. Алейников. – Текст : электронный // Нейрохирургия и неврология Казахстана. – 2015. – № 3. – С. 40–44. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/obzor-metodov-vosstanovleniya-provodimosti-travmirovannogo-uchastka-spinnogo-mozga-sochetaniem-kombinirovannyh-putey> (дата обращения: 18.02.2020).

2 Алексеева, Е. Б. Регенерация седалищного нерва крысы после кратковременного дозированного вытяжения его центрального отрезка : специальность 03.00.25 «Гистология, цитология и клеточная биология» : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Алексеева Елена Борисовна ; Казанский государственный медицинский институт. – Казань, 2013. – 92 с. – Текст : непосредственный.

3 Батыршина, С. В. Глюкокортикостероиды для местного применения в современной стратегии терапии воспалительных дерматозов в педиатрической практике / С. В. Батыршина. – Текст : электронный // Практическая медицина. – 2014. – № 9. – С. 94–102. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/glyukokortikosteroidy-dlya-mestnogo-primeneniya-v-sovremennoy-strategii-terapii-vospalitelnyh-dermatozov-v-pediatricheskoj-praktike> (дата обращения: 08.02.2021).

4 Бозо, И. Я. Ген-активированные гидрогели в регенеративной медицине / И. Я. Бозо, А. И. Билялов, М. О. Мавликеев, Р. В. Деев. – DOI 10.23868/201903001. – Текст : электронный // Гены & Клетки. – 2019. – Т. 14, № 1. – С. 16–21. – URL: https://www.researchgate.net/publication/334333346_Gene-activated_hydrogels_in_regenerative_medicine (дата обращения: 29.02.2022).

5 Ковражкина, А. Е. Ингибиторы регенерации центральной нервной системы, их физиологическая роль и участие в патогенезе заболеваний /

А. Е. Ковражкина, Л. В. Стаховская, О. Д. Разинская, А. В. Сердюк. – DOI 10.17116/jnevgo201811851143. – Текст : электронный // Журнал неврологии и психиатрии. – 2018. – Т. 118, № 5. – С. 143–149. – URL: <https://www.mediasphera.ru/issues/zhurnal-nevrologii-i-psikhiatrii-im-s-s-korsakova/2018/5/1199772982018051143?lang=ru> (дата обращения: 18.02.2020).

6 Коржевский, Д. Э. Нейральные маркеры, используемые при изучении дифференцировки стволовых клеток / Д. Э. Коржевский, Е. С. Петрова, О. В. Кирик. – Текст : электронный // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. 5, № 3. – С. 57–62. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/neyrалnye-markery-ispolzuemye-pri-izuchenii-differentsirovki-stvolovyh-kletok> (дата обращения: 18.02.2020).

7 Масгутов, Р. Ф. Стимуляция посттравматической регенерации седалищного нерва крысы при ксенотрансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани / Р. Ф. Масгутов, Г. А. Масгутова, И. И. Салафутдинов [и др.]. // Гены & клетки. – 2015. – Т. 1, № 1. – С. 98–102. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/stimulyatsiya-posttravmaticheskoy-regeneratsii-sedalischnogo-nerva-krysy-pri-ksenotransplantatsii-multipotentnyh-mezenhimalnyh> (дата обращения: 18.02.2020).

8 Мухамедьяров, М. А. Механизмы влияния β -амилоидного пептида на ретроградный аксонный транспорт / М. А. Мухамедьяров, З. З. Сафиуллов, Р. П. Утяшева. – Текст : электронный // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – Т. 7, № 3. – С. 135–137. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/mehanizmy-vliyaniya-amiloidnogo-peptida-na-retrogradnyy-aksonnyy-transport> (дата обращения: 18.02.2020).

9 Одинак, М. М. Факторы роста нервной ткани в центральной нервной системе / М. М. Одинак, Н. В. Цыган. – Санкт-Петербург : Наука, 2005. – 157 с. – ISBN: 5-02-026253-6. – Текст : непосредственный.

10 Петрова, Е. С. Современные морфологические подходы к изучению регенерации периферических нервных проводников / Е. С. Петрова, Н. В. Павлова, Д. Э. Коржевский. – Текст : электронный // Медицинский академический журнал.

– 2012. – Т. 12, № 3. – С. 15–29. – URL: <http://elib.fesmu.ru/elib/Article.aspx?id=270609> (дата обращения: 16.07.2022). – Режим доступа: для зарегистрир. читателей ДВГМУ.

11 Попель, Л. С. Структурный и морфометрический анализ нервных волокон седалищного нерва крыс разного возраста в норме / С. Л. Попель, Б. М. Мыцкан. – Текст : электронный // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2016. – № 1 (53). – С. 60–66. – URL: <http://journal-grsmu.by/index.php/ojs/article/view/1902> (дата обращения: 18.02.2020).

12 Продан, А. И. Морфология седалищного нерва после локального криовоздействия / А. И. Продан, Л. М. Бенгус, А. А. Сиренко. – Текст : электронный // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2010. – Т. 3, № 2. – С. 66–72. – URL: <http://otp-journal.com.ua/article/view/14952/12731> (дата обращения: 16.07.2022).

13 Ревин, В. В. Роль липидов в процессе проведения возбуждения по соматическим нервам : специальность 03.00.02 «Биофизика» : диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук / Ревин Виктор Васильевич ; Ин-т фотобиологии АН БССР. – Минск, 1990. – 362 с. – Текст : непосредственный.

14 Хлебникова, А. Н. Клобетазола пропионат (Дермовейт) – новые возможности в терапии дерматозов / А. Н. Хлебникова. – Текст : электронный // Фармакотерапия в дерматовенерологии. – 2010. – № 5. – С. 124–134. – URL: <https://vestnikdv.ru/jour/article/view/991/920> (дата обращения: 18.02.2020).

15 Царев, А. А. Топографо – анатомические особенности ветвления нервов задних конечностей крыс / А. А. Царев. – Текст : электронный // Морфология. – 2008. – Т. 2, № 3. – С. 81–83. – URL: http://irbis-nbuv.gov.ua/cgi-bin/irbis_nbuv/Morphology_2008_2_3_15.pdf (дата обращения: 16.07.2022).

16 Щаницын, И. Н. Стимуляция регенерации периферического нерва: современное состояние, проблемы и перспективы / И. Н. Щаницын, А. Н. Иванов, С. П. Бажанов [и др.]. – Текст : электронный // Успехи физиологических наук. – 2017. – Т. 48, № 3. – С. 92–112. – URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=29679003> (дата обращения: 16.06.2021).

17 Adachi, N. New insight in expression, transport, and secretion of brain-derived neurotrophic factor: Implications in brain-related diseases / N. Adachi, T. Numakawa, M. Richards. – DOI 10.4331/wjbc.v5.i4.409. – Text : electronic // World J Biol Chem. – 2014. – V. 5, I. 4. – P. 409–428. – URL: <https://www.wjgnet.com/1949-8454/full/v5/i4/409.htm> (дата обращения: 16.07.2022).

18 Adler, C. E. UNC-6/Netrin induces neuronal asymmetry and defines the site of axon formation / C. E. Adler, R. D. Fetter, C. I. Bargmann. – DOI 10.1038/nn1666. – Text : electronic // Nat. Neurosci. – 2006. – V. 9. – P. 511–518. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16520734/> (дата обращения: 01.07.2021).

19 Aggarwal, S. Myelin membrane assembly is driven by a phase transition of myelin basic proteins into a cohesive protein meshwork / S. Aggarwal, N. Snaidero, G. Paehler, [et al.]. – DOI 10.1371/journal.pbio.1001577. – Text : electronic // PLoS Biol. – 2013. – V. 11. – P. e1001577. – URL: <https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.1001577> (дата обращения: 17.07.2022).

20 Ahmad, A. Targeted regulation of PI3K/Akt/mTOR/NF- κ B signaling by indole compounds and their derivatives: mechanistic details and biological implications for cancer therapy / A. Ahmad, B. Biersack, Y. Li [et al.]. – DOI 10.2174/18715206113139990078. – Text : electronic // Anticancer Agents Med Chem. – 2013. – V. 13. – P. 1002–1013. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23272910/> (дата обращения: 18.07.2022).

21 Ahmed, F. The Biased Ligands NGF and NT-3 Differentially Stabilize Trk-A Dimers / F. Ahmed, E. Zapata-Mercado, S. Rahman, K. Hristova. – DOI 10.1016/j.bpj.2020.11.2262. – Text : electronic // Biophys J. – 2021. – V. 120, I. 1. – P. 55–63. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349520331702?via%3Dihub> (дата обращения: 16.07.2022).

22 Amit, I. A module of negative feedback regulators defines growth factor signaling / I. Amit, A. Citri, T. Shay [et al.]. – DOI 10.1038/ng1987. – Text : electronic // Nat Genet. – 2007. – V. 39, I. 4. – P. 503–512. – URL: <https://www.nature.com/articles/ng1987> (дата обращения: 15.03.2022).

23 Arioka, M. Glycogen synthase kinase-3 inhibitor as a multi-targeting anti-rheumatoid drug. – DOI 10.1016/j.bcp.2019.02.020. – Text : electronic // Biochem Pharmacol. – 2019. – V. 165. – P. 207–213. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295219300589?via%3Dihub> (дата обращения: 19.01.2020).

24 Autry, A. E. Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neuropsychiatric Disorders / A. E. Autry, L. M. Monteggia. – DOI 10.1124/pr.111.005108. – Text : electronic // Pharmacol Rev. – 2012. – V. 64, I. 2. – P. 238–258. – URL: <https://pharmrev.aspetjournals.org/content/64/2/238> (дата обращения: 16.07.2022).

25 Bakaeva Z. V. Neuroprotective Potential of Peptides HFRWP GP (ACTH6-9PGP), KKRRPGP, and PyrRP in Cultured Cortical Neurons at Glutamate Excitotoxicity / Z. V. Bakaeva, A. M. Surin, N. V. Lizunova [et al.]. – DOI 10.1134/S1607672920020040. – Text : electronic // Dokl Biochem Biophys. – 2020. – Vol. 491 (1). – P. 62 – 66. – URL: <https://link.springer.com/article/10.1134/S1607672920020040> (дата обращения: 11.09.2022).

26 Baliatti, M. Peripheral Blood Brain-Derived Neurotrophic Factor as a Biomarker of Alzheimer's Disease: Are There Methodological Biases? / M. Baliatti, C. Giuli, F. Conti. – DOI 10.1007/s12035-017-0866-y. – Text : electronic // Mol Neurobiol. – 2018. – V. 55, I. 8. – P. 6661–6672. – URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12035-017-0866-y> (дата обращения: 16.07.2022).

27 Banerji, U. A pharmacokinetically (PK) and pharmacodynamically (PD) driven phase I trial of the pan-AKT inhibitor AZD5363 with expansion cohorts in PIK3CA mutant breast and gynecological cancers (Abstract) / U. Banerji, E. J. Dean, J. A. Perez-Fidalgo [et al.]. – DOI 10.1200/jco.2015.33.15_suppl.2500. – Text : electronic // J Clin Oncol. – 2015. – I. 33. – S. 2500. – URL: https://ascopubs.org/doi/10.1200/jco.2015.33.15_suppl.2500 (дата обращения: 16.07.2022).

28 Boggs, J. M. Interaction of myelin basic protein with cytoskeletal and signaling proteins in cultured primary oligodendrocytes and N19 oligodendroglial cells / J. M. Boggs, L. Homchaudhuri, G. Ranagaraj [et al.]. – DOI 10.1186/1756-0500-7-387. – Text : electronic // BMC Res. Notes. – 2014. – V. 7. – P. 387. – URL: <https://link.springer.com/article/10.1186/1756-0500-7-387> (дата обращения: 08.10.2019).

29 Boodram, L. L. Extraction of genomic DNA from whole blood / Protocol Online - Your Lab's Reference Book – online database of research protocols in a variety of life science fields. – 2006. – URL: <http://www.protocolonline.org/protocols/Extraction-of-genomic-DNA-from-whole-blood-3171.html> (дата обращения: 16.07.2022).

30 Boyce, V. S. Neurotrophins and spinal circuit function / V. S. Boyce, L. M. Mendell. – DOI 10.3389/fncir.2014.00059. – Text : electronic // Front Neural Circuits. – 2014. – V. 5, I. 8. – P. 59. – URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncir.2014.00059/full> (дата обращения: 11.07.2021).

31 Bradshaw, R. A. NGF and ProNGF: Regulation of neuronal and neoplastic responses through receptor signaling / R. A. Bradshaw, J. Pundavela, J. Biarc – DOI 10.1016/j.jbior.2014.11.003. – Text : electronic // Adv Biol Regul. – 2015. – V. 58. – P. 16–27. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212492614000621?via%3Dihub> (дата обращения: 11.07.2020).

32 Brennan, K. M. Absence of Dystrophin Related Protein-2 disrupts Cajal bands in a patient with Charcot-Marie-Tooth disease / K. M. Brennan, Y. Bai, C. Pisciotta [et al.]. – DOI 10.1016/j.nmd.2015.07.001. – Text : electronic // Neuromusc. Disord. 2015. – V. 25, I. 10. – P. 786–793. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960896615006598> (дата обращения: 13.07.2020).

33 Broderick, D. K. Mutations of PIK3CA in anaplastic oligodendrogliomas, high-grade astrocytomas and medulloblastomas / D. K. Broderick, C. Di, T. J. Parrett, [et al.]. – DOI 10.1158/0008-5472.CAN-04-1170. – Text : electronic // Cancer Res. – 2004. – V. 64, I. 15. – P. 5048–5050. – URL:

<https://aacrjournals.org/cancerres/article/64/15/5048/511619/Mutations-of-PIK3CA-in-Anaplastic> (дата обращения: 16.07.2022).

34 Brushart, T. M. Schwann cell phenotype is regulated by axon modality and central-peripheral location, and persists in vitro / T. M. Brushart, M. Aspalter, J. W. Griffin [et al.]. – DOI 10.1016/j.expneurol.2013.05.007. – Text : electronic // Exp Neurol. – 2013. – V. 247. – P. 272–281. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014488613001532?via%3Dihub> (дата обращения: 16.01.2022).

35 Cabrera-Ortega, A. A. The Role of Forkhead Box 1 (FOXO1) in the Immune System: Dendritic Cells, T Cells, B Cells, and Hematopoietic Stem Cells / A. A. Cabrera-Ortega, D. Feinberg, Y. Liang [et al.]. – DOI 10.1615/CritRevImmunol.2017019636. – Text : electronic // Crit Rev Immunol. – 2017. – V. 37, I. 1. – P. 1–13. – URL: <https://www.dl.begellhouse.com/journals/2ff21abf44b19838,7906ba2402487331,47ccff676f37159b.html> (дата обращения: 16.07.2022).

36 Cai, Q. FGF6 enhances muscle regeneration after nerve injury by relying on ERK1/2 mechanism / Q. Cai, G. Wu, M. Zhu [et al.]. – DOI 10.1016/j.lfs.2020.117465. – Text : electronic // Life Sci. – 2020. – V. 248. – P. 117465. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0024320520302137?via%3Dihub> (дата обращения: 11.02.2022).

37 Caillaud, M. Peripheral nerve regeneration and intraneural revascularization / M. Caillaud, L. Richard, J.-M. Vallat [et al.]. – DOI 10.4103/1673-5374.243699. – Text : electronic // Neural Regen Res. – 2019. – V. 14, I. 1. – P. 24. – URL: https://www.researchgate.net/publication/330055663_Peripheral_nerve_regeneration_and_intraneural_revascularization (дата обращения: 16.07.2022).

38 Campagnolo, L. Sortilin expression is essential for pro-nerve growth factor-induced apoptosis of rat vascular smooth muscle cells / L. Campagnolo, G. Costanza, A. Francesconi [et al.]. – DOI 10.1371/journal.pone.0084969. – Text : electronic // PLoS One. – 2014. – V. 9, I. 1. – P. e84969. – URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0084969> (дата обращения: 16.07.2022).

39 Campbell, W. W. Evaluation and management of peripheral nerve injury / W. W. Campbell. – DOI 10.1016/j.clinph.2008.03.018. – Text : electronic // Clin. Neurophysiol. – 2008. – V. 119, № 9. – P. 1951–1965. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1388245708002058?via%3Dihub> (дата обращения: 15.07.2022).

40 Capsoni, S. Dissecting the role of sortilin receptor signaling in neurodegeneration induced by NGF deprivation / S. Capsoni, G. Amato, D. Vignone [et al.]. – DOI 10.1016/j.bbrc.2013.01.007. – Text : electronic // Biochemical and biophysical research communications. – 2013. – V. 431. – P. 579–585. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X13000430> (дата обращения: 15.07.2022).

41 Cattin, A. L. Macrophage-induced blood vessels guide schwann cell-mediated regeneration of peripheral nerves / A. L. Cattin, J. J. Burden, L. Van Emmenis [et al.]. – DOI 10.1016/j.cell.2015.07.021. – Text : electronic // Cell. – 2015. – V. 162. – P. 1127–1139. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X13000430> (дата обращения: 13.07.2021).

42 Chen, F. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 is required for maintaining the structure and function of the neuromuscular junction / F. Chen, Y. Sugiura, K. G. Myers [et al.]. – DOI 10.1073/pnas.0911516107. – Text : electronic // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 2010. – V. 107, № 4. – P. 1636–1641. – URL: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0911516107> (дата обращения: 11.07.2021).

43 Chung, D. GAP-43 and BASP1 in Axon Regeneration: Implications for the Treatment of Neurodegenerative Diseases / D. Chung, A. Shum, G. Caraveo. – DOI 10.3389/fcell.2020.567537. – Text : electronic // Front Cell Dev Biol. – 2020. – V. 8. – P. 567537. – URL: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.neuro.30.051606.094337> (дата обращения: 16.10.2022).

44 Dahlgaard, K. Neurofibromatosis-like phenotype in Drosophila caused by lack of glucosylceramide extension / K. Dahlgaard, A. Jung, K. Qvortrup [et al.]. – DOI 10.1073/pnas.1115453109. – Text : electronic // Developmental Biology. – 2012. –

V. 109, I. 18. – P. 6987–6992. – URL: <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.1115453109> (дата обращения: 16.10.2022).

45 De Avila, M. The proline-rich region of 18.5 kDa myelin basic protein binds to the SH3-domain of Fyn tyrosine kinase with the aid of an upstream segment to form a dynamic complex in vitro / M. De Avila, K. A. Vassall, G. S. T. Smith [et al.]. – DOI 10.1042/BSR20140149. – Text : electronic // Biosci. Rep. – 2014. – V. 34. – P. 775–788. – URL: https://www.researchgate.net/publication/267744452_The_proline-rich_region_of_185_kDa_myelin_basic_protein_binds_to_the_SH3-domain_of_Fyn_tyrosine_kinase_with_the_aid_of_an_upstream_segment_to_form_a_dynamic_complex_in_vitro (дата обращения: 16.10.2022).

46 Deigin, V. I. Development of Peptide Biopharmaceuticals in Russia / V. I. Deigin, E. A. Poluektova, A. G. Beniashvili [et al.]. – DOI 10.3390/pharmaceutics14040716. – Text : electronic // Pharmaceutics. – 2022. – Vol. 14, Iss. 4. – P. 716. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9030433/> (дата обращения: 11.09.2022).

47 Deinhardt, K. Trk receptors / K. Deinhardt, M. V. Chao. – DOI 10.1007/978-3-642-45106-5_5. – Text : electronic // Handb Exp Pharmacol. – 2014. – V. 220. – P. 103–119. – URL: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-45106-5_5 (дата обращения: 13.01.2022).

48 Dergunova, L. V. The Peptide Drug ACTH(4-7)PGP (Semax) Suppresses mRNA Transcripts Encoding Proinflammatory Mediators Induced by Reversible Ischemia of the Rat Brain / L. V. Dergunova, V. G. Dmitrieva, I. B. Filippenkov [et al.]. – DOI 10.31857/S0026898421010043. – Text : electronic // Molekuliarnaia biologii. – 2021. – Vol. 55, Iss. 3. – P. 402–411. – URL: <https://doi.org/10.31857/S0026898421010043> (дата обращения: 16.09.2022).

49 Domenech-Estévez, E. Akt Regulates Axon Wrapping and Myelin Sheath Thickness in the PNS / E. Domènech-Estévez, H. Baloui, X. Meng [et al.]. – DOI 10.1523/JNEUROSCI.3521-15.2016. – Text : electronic // J Neurosci. – 2016. – V. 36, I. 16. – P. 4506–4521. – URL: <https://www.jneurosci.org/content/36/16/4506> (дата обращения: 16.06.2021).

50 Duraikannu, A. Beyond Trophic Factors: Exploiting the Intrinsic Regenerative Properties of Adult Neurons / A. Duraikannu, A. Krishnan, A. Chandrasekhar, D. W. Zochodne. – DOI 10.3389/fncel.2019.00128. – Text : electronic // Front Cell Neurosci. – 2019. – V. 13. – P. 128. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6460947/> (дата обращения: 11.01.2020).

51 Düsedau, H. P. p75NTR regulates brain mononuclear cell function and neuronal structure in Toxoplasma infection-induced neuroinflammation / H. P. Düsedau, J. Kleveman, C. A. Figueiredo [et al.]. – DOI 10.1002/glia.23553. – Text : electronic // Glia. – 2019. – V. 67, I. 1. – P. 193–211. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/glia.23553> (дата обращения: 16.07.2022).

52 Emanuelli, C. The biology of neurotrophins: cardiovascular function / C. Emanuelli, M. Meloni, W. Hasan – DOI 10.1007/978-3-642-45106-5_12. – Text : electronic // Handb Exp Pharmacol. – 2014. – V. 220. – P. 309–328. – URL: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-45106-5_12 (дата обращения: 16.07.2022).

53 Fahnstock, M. ProNGF and Neurodegeneration in Alzheimer's Disease / M. Fahnstock, A. Shekari – DOI 10.3389/fnins.2019.00129. – Text : electronic // Front Neurosci. – 2019. – V. 13. – P. 129. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30853882> (дата обращения: 13.05.2022).

54 Filippenkov, I. B. Novel Insights into the Protective Properties of ACTH(4-7)PGP (Semax) Peptide at the Transcriptome Level Following Cerebral Ischaemia-Reperfusion in Rats / I. B. Filippenkov, V. V. Stavchansky, A. E. Denisova [et al.]. – DOI 10.3390/genes11060681. – Text : electronic // Genes. – 2020. – Vol. 11, Iss. 6. – P. 681. – URL: <https://doi.org/10.3390/genes11060681> (дата обращения: 11.09.2022).

55 Fontana, X. c-Jun in Schwann cells promotes axonal regeneration and motoneuron survival via paracrine signaling / X. Fontana, M. Hristova, C. Da Costa [et al.]. – DOI 10.1083/jcb.201205025. – Text : electronic // J Cell Biol. – 2012. – V. 198. – P. 127–141. – URL: <https://rupress.org/jcb/article/198/1/127/36752/c-Jun-in-Schwann-cells-promotes-axonal> (дата обращения: 01.12.2020).

56 Fünfschilling, U. Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity / U. Fünfschilling, L. M. Supplie, D. Mahad [et al.]. – DOI 10.1038/nature11007. – Text : electronic // Nature. – 2012. – V. 485, I. 7399. – P. 517–521. – URL: <https://www.nature.com/articles/nature11007> (дата обращения: 16.07.2022).

57 Galindo-Romero, C. 7,8-Dihydroxiflavone Protects Adult Rat Axotomized Retinal Ganglion Cells through MAPK/ERK and PI3K/AKT Activation / C. Galindo-Romero, B. Vidal-Villegas, J. Asís-Martínez [et al.]. – DOI 10.3390/ijms221910896. – Text : electronic // Int J Mol Sci. – 2021. – V. 22, I. 19. – P. 10896. – URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/19/10896> (дата обращения: 16.07.2022).

58 Garraway, S. Spinal Plasticity and Behavior: BDNF-Induced Neuromodulation in Uninjured and Injured Spinal Cord / S. Garraway, J. G. Huie. – DOI 10.1155/2016/9857201. – Text : electronic // Neural Plasticity. – 2016. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5046018/> (дата обращения: 15.04.2022).

59 Gibon, J. Neurotrophins and Proneurotrophins: Focus on Synaptic Activity and Plasticity in the Brain / J. Gibon, P. A. Barker – DOI 10.1177/1073858417697037. – Text : electronic // Neuroscientist. – 2017. – V. 23, I. 6. – P. 587–604. – URL: https://www.researchgate.net/publication/315343323_Neurotrophins_and_Proneurotrophins_Focus_on_Synaptic_Activity_and_Plasticity_in_the_Brain (дата обращения: 16.07.2022).

60 Gonzalez-Perez, F. Extracellular matrix components in peripheral nerve regeneration / F. Gonzalez-Perez, E. Udina, X. Navarro. – DOI 10.1016/B978-0-12-410499-0.00010-1. – Text : electronic // Int Rev Neurobiol. – 2013. – V. 108. – P. 257–275. – URL: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-45106-5_5 (дата обращения: 16.07.2022).

61 Guo, T. Ezrin interacts with L-periaxin by the “head to head and tail to tail” mode and influences the location of L-periaxin in Schwann cell RSC96 / T. Guo, L. Zhang, H. Xiao [et al.]. – DOI 10.1016/j.bbagen.2020.129520. – Text : electronic // Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj. – 2020. – V. 1864, I. 4. – P. 129520. – URL:

https://www.researchgate.net/publication/338524616_Ezrin_interacts_with_L-periaxin_by_the_head_to_head_and_tail_to_tail_mode_and_influences_the_location_of_L-periaxin_in_Schwann_cell_RSC96 (дата обращения: 13.12.2021).

62 Gurnari, C. The role of forkhead box proteins in acute myeloid leukemia / C. Gurnari, G. Falconi, E. De Bellis [et al.]. – DOI 10.3390/cancers11060865. – Text : electronic // Cancers (Basel). – 2019. – V. 11. – P. E865. – URL: <https://www.mdpi.com/2072-6694/11/6/865> (дата обращения: 16.07.2022).

63 Han, H. Periaxin and AHNAK Nucleoprotein 2 Form Intertwined Homodimers through Domain Swapping / H. Han, P. Kursula. – DOI 10.1074/jbc.M114.554816. – Text : electronic // J. Biol. Chem. – 2014. – V. 289. – P. 14121–14131. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24675079/> (дата обращения: 17.09.2020).

64 Hemmings, B. A. PI3K-PKB/Akt Pathway / B. A. Hemmings, D. F. Restuccia – DOI 10.1101/cshperspect.a011189. – Text : electronic // Cold Spring Harb Perspect Biol. – 2012. – V. 4, I. 9. – P. a011189. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3428770/> (дата обращения: 15.04.2021).

65 Hers, I. Akt signalling in health and disease / I. Hers, E. E. Vincent, J. M. Tavaré. – DOI 10.1016/j.cellsig.2011.05.004. – Text : electronic // Cell Signal. – 2011. – V. 23. – P. 1515–1527. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0898656811001410> (дата обращения: 16.07.2022).

66 Hirose, M. NGF/TrkA Signaling as a Therapeutic Target for Pain / M. Hirose, Y. Kuroda, E. Murata. – DOI 10.1111/papr.12342. – Text : electronic // Pain Pract. – 2016. – V. 16, I. 2. – P. 175–182. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/papr.12342> (дата обращения: 01.02.2020).

67 Huang, H. PI3K/Akt and ERK/MAPK Signaling Promote Different Aspects of Neuron Survival and Axonal Regrowth Following Rat Facial Nerve Axotomy / H. Huang, H. Liu, R. Yan, M. Hu. – DOI 10.1007/s11064-017-2399-1. – Text : electronic // Neurochem Res. – 2017. – V. 42, I. 12. – P. 3515–3524. – URL:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s11064-017-2399-1> (дата обращения: 16.07.2022).

68 Hutton, S. R. ERK/MAPK Signaling Is Required for Pathway-Specific Striatal Motor Functions / S. R. Hutton, J. M. Otis, E. M. Kim [et al.]. – DOI 10.1523/JNEUROSCI.0473-17.2017. – Text : electronic // J Neurosci. – 2017. – V. 37, I. 34. – P. 8102–8115. – URL: <https://www.jneurosci.org/content/37/34/8102> (дата обращения: 16.07.2022).

69 Isakina, M. V. Influence of potassium hyaluronate on the content of lysophospholipids and free fatty acids in damaged somatic nerves of rat / M. V. Isakina, N. V. Revina, V. V. Revin // Biology and Medicine. – 2015. – V. 7, № 2. – URL: <https://search.proquest.com/openview/8523a5eb7d07c2c361104ce614ef108e/1.pdf?pq-origsite=gscholar&cbl=2029165> (дата обращения: 15.06.2022).

70 Jhanwar-Uniyal, M. Diverse signaling mechanisms of mTOR complexes: mTORC1 and mTORC2 in forming a formidable relationship / M. Jhanwar-Uniyal, J. V. Wainwright, A. L. Mohan [et al.]. – DOI 10.1016/j.jbior.2019.03.003. – Text : electronic // Adv Biol Regul. – 2019. – V. 72. – P. 51–62. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212492619300259> (дата обращения: 15.04.2021).

71 Keefe, K. M. Targeting Neurotrophins to Specific Populations of Neurons: NGF, BDNF, and NT–3 and Their Relevance for Treatment of Spinal Cord Injury / K. M. Keefe, I. S. Sheikh, G. M. Smith. – DOI 10.3390/ijms18030548. – Text : electronic // Int J Mol Sci. – 2017. – V. 18, I. 3. – P. 548. – URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/18/3/548> (дата обращения: 16.07.2022).

72 Kim, J. E. Treadmill exercise activates ATF3 and ERK1/2 downstream molecules to facilitate axonal regrowth after sciatic nerve injury / J. E. Kim, Y. H. Cho, T. B. Seo. – DOI 10.12965/jer.2040188.094. – Text : electronic // J Exerc Rehabil. – 2020. – V. 16. – P. 141–147. – URL: <https://www.e-jer.org/journal/view.php?doi=10.12965/jer.2040188.094> (дата обращения: 14.03.2022).

73 Kim, J. mTOR as a central hub of nutrient signalling and cell growth / J. Kim, K. L. Guan. – DOI 10.1038/s41556-018-0205-1. – Text : electronic // Nat Cell Biol.

– 2019. – V. 21. – P. 63–71. – URL: <https://www.nature.com/articles/s41556-018-0205-1> (дата обращения: 17.05.2020).

74 Kim, S. Schwann Cell O-GlcNAc Glycosylation Is Required for Myelin Maintenance and Axon Integrity / S. Kim, J. C. Maynard, Y. Sasaki [et al.]. – DOI 10.1523/JNEUROSCI.1235-16.2016. – Text : electronic // J. Neurosci. – 2016. – V. 36. – P. 9633–9646. – URL: https://digitalcommons.wustl.edu/cgi/viewcontent.cgi?referer=&httpsredir=1&article=7150&context=open_access_pubs (дата обращения: 14.02.2021).

75 Komobuchi, H. Basic fibroblast growth factor combined with biodegradable hydrogel promotes healing of facial nerve after compression injury: an experimental study / H. Komobuchi, N. Hato, M. Teraoka. – DOI 10.3109/00016480902896139. – Text : electronic // Acta Otolaryngol. – 2010. – V. 130, № 1. – P. 173–178. – URL: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/00016480902896139> (дата обращения: 13.05.2022).

76 Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 / U. K. Laemmli. – DOI 10.1038/227680a0. – Text : electronic // Nature. – 1970. – V. 227. – P. 680–685. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5432063/> (дата обращения: 16.04.2020).

77 Laplante, M. mTOR signaling in growth control and disease / M. Laplante, D. M. Sabatini. – DOI 10.1016/j.cell.2012.03.017. – Text : electronic // Cell. – 2012. – V. 149, I. 2. – P. 274–293. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867412003510> (дата обращения: 11.01.2022).

78 Lemmon, M. A. Cell signaling by receptor-tyrosine kinases / M.A. Lemmon, J. Schlessinger. – DOI 10.1016/j.cell.2010.06.011. – Text : electronic // Cell. – 2010. – V. 141, I. 7. – P. 1117–1134. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20602996/> (дата обращения: 13.09.2021).

79 Lessmann, V. Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: an update / V. Lessmann, T. Brigadski. – DOI 10.1016/j.neures.2009.06.004. – Text : electronic // Neurosci Res. – 2009. – V. 65, I. 1. – P. 11–22. – URL:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168010209001849> (дата обращения: 18.06.2021).

80 Li, Y. Retinoic acid protects from experimental cerebral infarction by upregulating GAP-43 expression / Y. Li, X. Gao, Q. Wang [et al.]. – DOI 10.1590/1414-431X20175561. – Text : electronic // Braz J Med Biol Res. – 2017. – V. 50, I. 4. – URL: <https://www.scielo.br/j/bjmbr/a/bwy3YhPchsMSDBVGY54LnwH/?lang=en&format=html> (дата обращения: 14.05.2022).

81 Liu, X. Glycogen synthase kinase-3 and alternative splicing / X. Liu, P. S. Klein. – DOI 10.1002/wrna.1501. – Text : electronic // Wiley Interdiscip Rev RNA. – 2018. – V. 9. – P. :e1501. – URL: <https://wires.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/wrna.1501> (дата обращения: .02.02.2020).

82 Lotfi, P. Control of neural interfacing in peripheral nerves through regenerative molecular guidance / P. Lotfi, M. I. Romero-Ortega. – DOI 10.1109/IEMBS.2011.6091147. – Text : electronic // Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc. – 2011. – V. 201. – P. 4633–4636. – URL: <https://ieeexplore.ieee.org/abstract/document/6091147/> (дата обращения: 16.07.2022).

83 Lowry, O. H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr [et al.]. – Text : electronic // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193. – P. 265–275. – URL: <http://www.garfield.library.upenn.edu/classics1977/A1977DM02300001.pdf> (дата обращения: 16.07.2022).

84 Maiese, K. Forkhead transcription factors: formulating a FOXO target for cognitive loss. – DOI 10.2174/1567202614666171116102911. – Text : electronic // Curr Neurovasc Res. – 2017. – V. 14. – P. 415–420. – URL: <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cnr/2017/00000014/00000004/art00014> (дата обращения: 16.07.2022).

85 McDonald, D. Early events of peripheral nerve regeneration / D. McDonald, C. Cheng, Y. Chen, D. Zochodne. – DOI 10.1017/S1740925X05000347. – Text : electronic // Neuron Glia Biol. – 2006. – V. 2, № 2. – P. 139–147. – URL: <https://www.cambridge.org/core/journals/neuron-glia-biology/article/abs/early-events->

of-peripheral-nerve-regeneration/C391094E45B10D2196F514996124ACF2 (дата обращения: 13.07.2022).

86 Mitre, M. Neurotrophin signalling: novel insights into mechanisms and pathophysiology / M. Mitre, A. Mariga, M. V. Chao. – DOI 10.1042/CS20160044. – Text : electronic // Clin Sci (Lond). – 2017. – V. 131, I. 1. – P. 13–23. – URL: <https://portlandpress.com/clinsci/article-abstract/131/1/13/71583/Neurotrophin-signalling-novel-insights-into> (дата обращения: 16.08.2022).

87 Mohammad, A. A. Mechanisms and regulation of neurotrophin synthesis and secretion Neurosciences / A. A. Mohammad, A. Al-Dwairi. – DOI 10.17712/nsj.2016.4.20160080. – Text : electronic // Riyadh. – 2016. – V. 21, I. 4. – P. 306–313. – URL: <https://nsj.org.sa/content/21/4/306.short> (дата обращения: 14.09.2022).

88 Morisaki, S. Endogenous glucocorticoids improve myelination via Schwann cells after peripheral nerve injury: An in vivo study using a crush injury model / S. Morisaki, M. Nishi, H. Fujiwara. – DOI 10.1002/glia.20977. – Text : electronic // Glia. – 2010. – V. 58, I. 8. – P. 954–963. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/glia.20977> (дата обращения: 16.07.2022).

89 Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays / T. Mosmann. – DOI 10.1016/0022-1759(83)90303-4. – Text : electronic // Journal of immunological methods. – 1983. – V. 65, I. 1–2. – P. 55–63. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0022175983903034> (дата обращения: 16.11.2022).

90 Murugan, A. K. mTOR: role in cancer, metastasis and drug resistance. – DOI 10.1016/j.semcancer.2019.07.003. – Text : electronic // Semin Cancer Biol. – 2019. – V. 9. – P. 92–111. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044579X18301354> (дата обращения: 04.11.2022).

91 Myllykoski, M. High-affinity heterotetramer formation between the large myelin-associated glycoprotein and the dynein light chain DYNLL1 / M. Myllykoski, M. A. Eichel, R. B. Jung, [et al.]. – DOI 10.1111/jnc.14598. – Text : electronic // J.

Neurochem. – 2018. – V. 147. – P. 764–783. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jnc.14598> (дата обращения: 09.09.2022).

92 Myllykoski, M. The N-terminal domain of the myelin enzyme 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase: Direct molecular interaction with the calcium sensor calmodulin / M. Myllykoski, K. Itoh, S. Kangas [et al.]. – DOI 10.1111/jnc.14598. – Text : electronic // J. Neurochem. – 2012. – V. 123. – P. 515–524. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jnc.14598> (дата обращения: 13.06.2020).

93 Najm, F. J. Drug-based modulation of endogenous stem cells promotes functional remyelination in vivo / F. J. Najm, M. Madhavan, A. Zaremba. – DOI 10.1038/nature14335. – Text : electronic // Nature. – 2015. – V. 522, I. 7555. – P. 216–220. – URL: <https://www.nature.com/articles/nature14335#citeas> (дата обращения: 16.07.2022).

94 Napoli, I. A central role for the ERK-signaling pathway in controlling Schwann cell plasticity and peripheral nerve regeneration in vivo / I. Napoli, L. A. Noon, S. Ribeiro [et al.]. – DOI 10.1016/j.neuron.2011.11.031. – Text : electronic // Neuron. – 2012. – V. 73, I. 4. – P. 729–742. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627312000359> (дата обращения: 16.07.2022).

95 Niemi, J. P. A critical role for macrophages near axotomized neuronal cell bodies in stimulating nerve regeneration / J. P. Niemi, A. DeFrancesco-Lisowitz, L. Roldán-Hernández L [et al.]. – DOI 10.1523/JNEUROSCI.3319-12.2013. – Text : electronic // J Neurosci. – 2013. – V. 33. – P. 16236–16248. – URL: <https://www.jneurosci.org/content/33/41/16236.short> (дата обращения: 09.11.2019).

96 Nitulescu, G. M. The Akt pathway in oncology therapy and beyond / G. M. Nitulescu, M. V. Venter, G. Nitulescu [et al.]. – DOI 10.3892/ijo.2018.4597. – Text : electronic // Int J Oncol. – 2018. – V. 53, I. 6. – P. 2319–2331. – URL: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2018.4597> (дата обращения: 16.07.2022).

97 Nunes, D. Polymeric Nanoparticles-Loaded Hydrogels for Biomedical Applications: A Systematic Review on In Vivo Findings / D. Nunes, S. Andrade, M. J. Ramalho [et al.]. – DOI 10.3390/polym14051010. – Text : electronic // Polymers (Basel). – 2022. – V. 14, I. 5. – P. 1010. – URL: <https://www.mdpi.com/2073-4360/14/5/1010> (дата обращения: 21.12.2022).

98 Oakley, B. R. An abundance of tubulins / B. R. Oakley. – DOI 10.1016/S0962-8924(00)01857-2. – Text : electronic // Trends in Cell Biology. – 2006. – V. 10, I. 12. – P. 537–542. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0962892400018572> (дата обращения: 11.02.2021).

99 Ouyang, Z. H. The PI3K/Akt pathway: A critical player in intervertebral disc degeneration / Z. H. Ouyang, W. J. Wang, Y. G. Yan [et al.]. – DOI 10.18632/oncotarget.18628. – Text : electronic // Oncotarget. – 2017. – V. 8. – P. 57870–57881. – URL: <https://www.oncotarget.com/article/18628/text/> (дата обращения: 16.07.2022).

100 Palioura, S. Neuroprotection in Glaucoma / S. Palioura, D. G. Vavvas. – DOI 10.5772/45915. – Text : electronic // Glaucoma – Basic and Clinical Aspects. – IntechOpen, 2013. – URL: <https://www.intechopen.com/books/3261> (дата обращения: 16.07.2022).

101 Patzig, J. Quantitative and integrative proteome analysis of peripheral nerve myelin identifies novel myelin proteins and candidate neuropathy loci / J. Patzig, O. Jahn, S. Tenzer [et al.]. – DOI 10.1523/JNEUROSCI.4016-11.2011. – Text : electronic // J Neurosci. – 2011. – V. 31, I. 45. – P. 16369–16386. – URL: <https://www.jneurosci.org/content/31/45/16369.short> (дата обращения: 12.01.2021).

102 Pinyaev, S.I. Influence of Resveratrol on Oxidation Processes and Lipid Phase Characteristics in Damaged Somatic Nerves / S. I. Pinyaev, T. P. Kuzmenko, N. V. Revina [et al.]. – DOI 10.1155/2019/2381907. – Text : electronic // BioMed Research International. – 2019. – V. 2019. – P. 1-9. – URL: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2019/2381907/> (дата обращения: 16.09.2022).

103 Pronker, M. F. Structural basis of myelin-associated glycoprotein adhesion and signaling / M. F. Pronker, S. Lemstra, J. Snijder [et al.]. – DOI

10.1038/ncomms13584. – Text : electronic // Nat. Commun. – 2016. – V. 7. – P. 13584. – URL: <https://www.nature.com/articles/ncomms13584> (дата обращения: 11.05.2022).

104 Querfurth, H. Mammalian/mechanistic target of rapamycin (mTOR) complexes in neurodegeneration / H. Querfurth, H. K. Lee. – DOI 10.1186/s13024-021-00428-5. – Text : electronic // Mol Neurodegener. – 2021. – V. 16, I. 44. – URL: <https://link.springer.com/article/10.1186/s13024-021-00428-5> (дата обращения: 11.05.2022).

105 Raasakka, A. Flexible Players within the Sheaths: The Intrinsically Disordered Proteins of Myelin in Health and Disease / A. Raasakka, P. Kursula. – DOI 10.3390/cells9020470. – Text : electronic // Cells. – 2020. – V. 9, I. 2. – P. 470. – URL: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/2/470> (дата обращения: 18.04.2022).

106 Raasakka, A. Membrane Association Landscape of Myelin Basic Protein Portrays Formation of the Myelin Major Dense Line / A. Raasakka, S. Ruskamo, J. Kowal and et al. – DOI 10.1038/s41598-017-05364-3. – Text : electronic // Sci. Rep. – 2017. – V. 7. – P. 49–74. – URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-05364-3#citeas> (дата обращения: 16.07.2022).

107 Rafieva, L. M. Neurotrophin Propeptides: Biological Functions and Molecular Mechanisms / L. M. Rafieva, E. V. Gasanov. – DOI 10.2174/1389203716666150623104145. – Text : electronic // Curr Protein Pept Sci. – 2016. – V. 17, I. 4. – P. 298–305. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26100281/> (дата обращения: 16.07.2022).

108 Reid, A. J. N-acetylcysteine alters apoptotic gene expression in axotomised primary sensory afferent subpopulations / A. J. Reid, S. G. Shawcross, A. E. Hamilton [et al.]. – DOI 10.1016/j.neures.2009.06.008. – Text : electronic // Neurosci. Res. – 2009. – V. 65, I. 2. – P. 148–155. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168010209002004> (дата обращения: 13.02.2021).

109 Revin, V. V. Lipid composition of rat somatic nerves under the effect of damaging factors / V. V. Revin, M. A. Yudanov, G. V. Maksimov. – DOI 10.1007/s10517-006-0325-7. – Text : electronic // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2006. – V. 142, I. 2. – P. 191–193. – URL:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s10517-006-0325-7#citeas> (дата обращения: 16.07.2022).

110 Revin, V.V. 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 [et al.]. – DOI 10.3389/fphys.2019.00384. – Text : electronic // *Frontiers in Physiology*. – 2019. – V. 10. – P. 384. – URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2019.00384/full> (дата обращения: 16.07.2022).

111 Rotshenker, S. Wallerian degeneration: the innate-immune response to traumatic nerve injury / S. Rotshenker. – DOI 10.1186/1742-2094-8-109. – Text : electronic // *J Neuroinflammation*. – 2011. – V. 8. – P. 109. – URL: <https://link.springer.com/article/10.1186/1742-2094-8-109> (дата обращения: 11.05.2021).

112 Schuurs, A. H. W. M. Enzyme-Immunoassay: A Powerful Analytical Tool / A. H. W. M. Schuurs, B. K. Van Weemen. – DOI 10.1080/01971528008055786. – Text : electronic // *Journal of Immunoassay*. – 1980. – V. 1, I. 2. – P. 229–249. – URL: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01971528008055786> (дата обращения: 01.03.2022).

113 Shi, W. Clobetasol propionate enhances neural stem cell and oligodendrocyte differentiation / W. Shi, S. Bi, Ya. D. [et al.]. – DOI 10.3892/etm.2019.7692. – Text : electronic // *Exp Ther Med*. – 2019. – V. 18, I. 2. – P. 1258–1266. – URL: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2019.7692> (дата обращения: 16.07.2022).

114 Shi, Y. Nuclear Export of L-Periaxin, Mediated by Its Nuclear Export Signal in the PDZ Domain / Y. Shi, L. Zhang, T. Yang. – DOI 10.1371/journal.pone.0091953. – Text : electronic // *PLoS ONE*. – 2014. – V. 9. – P. e91953. – URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0091953> (дата обращения: 16.07.2022).

115 Skaper, S. D. The neurotrophin family of neurotrophic factors: an overview / S. D. Skaper – DOI 10.1007/978-1-61779-536-7_1. – Text : electronic // *Methods Mol*

Biol. – 2012. – V. 846. – P. 1–12. – URL: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-61779-536-7_1 (дата обращения: 01.03.2022).

116 Smith, G. S. T. Classic 18.5-and 21.5-kDa myelin basic protein isoforms associate with cytoskeletal and SH3-domain proteins in the immortalized N19-oligodendroglial cell line stimulated by phorbol ester and IGF-1 / G. S. T. Smith, L. Homchaudhuri, J. M. Boggs [et al.]. – DOI 10.1007/s11064-011-0700-2. – Text : electronic // *Neurochem. Res.* – 2012. – Vol. 37. – P. 1277–1295. – URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11064-011-0700-2> (дата обращения: 16.04.2021).

117 Snaidero, N. Antagonistic functions of MBP and CNP establish cytosolic channels in CNS myelin / N. Snaidero, C. Velte, M. Myllykoski [et al.]. – DOI 10.1016/j.celrep.2016.12.053. – Text : electronic // *Cell Rep.* – 2017. – V. 18, I. 2. – P. 314–323. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211124716317600> (дата обращения: 16.04.2021).

118 Svendsen, C. N. Neurons from stem cells: preventing an identity crisis / C. N. Svendsen, A. Bhattacharyya, Y. T. Tai. – DOI 10.1038/35097581. – Text : electronic // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2007. – V. 2, I. 11. – P. 831–834. – URL: <https://www.nature.com/articles/35097581> (дата обращения: 11.01.2022).

119 Torvund-Jensen, J. Transport and translation of MBP mRNA is regulated differently by distinct hnRNP proteins / J. Torvund-Jensen, J. Steengaard, L. Reimer [et al.]. – DOI 10.1242/jcs.140855. – Text : electronic // *J. Cell. Sci.* – 2014. – V. 127. – P. 1550–1564. – URL: <https://journals.biologists.com/jcs/article/127/7/1550/54938/Transport-and-translation-of-MBP-mRNA-is-regulated> (дата обращения: 11.04.2020).

120 Tos, P. Future perspectives in nerve repair and regeneration / P. Tos, G. Ronchi, S. Geuna [et al.]. – DOI 10.1016/B978-0-12-420045-6.00008-0. – Text : electronic // *Int. Rev. Neurobiol.* – 2013. – V. 109. – P. 165–192. – URL: 10.1016/B978-0-12-420045-6.00008-0 (дата обращения: 16.07.2022).

121 Tuusa, J. Myelin-derived and putative molecular mimic peptides share structural properties in aqueous and membrane-like environments / J. Tuusa, A. Raasakka, S. Ruskamo [et al.]. – DOI 10.1186/s40893-017-0021-7. – Text : electronic

// Mult. Scler. Demyelinating Disord. – 2017. – V. 2. – P. 4. – URL: <https://link.springer.com/article/10.1186/s40893-017-0021-7#citeas> (дата обращения: 16.07.2022).

122 Ullal, G. R. NT-3 modulates BDNF and proBDNF levels in naïve and kindled rat hippocampus / G. R. Ullal, B. Michalski, B. Xu [et al.]. – DOI 10.1016/j.neuint.2007.02.009. – Text : electronic // Neurochem Int. – 2007. – V. 50, I. 6. – P. 866–871. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0197018607000599> (дата обращения: 13.04.2021).

123 Vander, H. E. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40 / H. E. Vander, S. I. Lee, S. Bandhakavi [et al.]. – DOI 10.1038/ncb1547. – Text : electronic // Nat Cell Biol. – 2007. – V. 9, I. 3. – P. 316–323. – URL: <https://www.nature.com/articles/ncb1547#citeas> (дата обращения: 16.07.2022).

124 Vassall, K. A. MyelStones: The executive roles of myelin basic protein in myelin assembly and destabilization in multiple sclerosis / K. A. Vassall, V. V. Bamm, G. Harauz – DOI 10.1016/B978-0-12-420045-6.00008-0. – Text : electronic // Biochem. J. – 2015. – Vol. 472. – P. 17–32. – URL: 10.1016/B978-0-12-420045-6.00008-0 (дата обращения: 16.07.2022).

125 Wang, J. N. Type III NRG-1 plays a regulatory role in the regeneration process of nerves from the beginning of transplantation / J. N. Wang, S. He, W. X. Yang [et al.]. – DOI 10.1186/s13018-023-04191-9. – Text : electronic // J Orthop Surg Res. – 2023. – Vol. 18, Iss. 1. – P. 707. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10512478/> (дата обращения: 11.12.2023).

126 Wang, J. Atrasentan alleviates high glucose-induced podocyte injury by the microRNA-21/forkhead box O1 axis / J. Wang, L. Shen, H. Hong [et al.]. – DOI 10.1016/j.ejphar.2019.03.013. – Text : electronic // Eur J Pharmacol. – 2019. – V. 852. – P. 142–150. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299919301682> (дата обращения: 12.02.2022).

127 Wang, M. M. Expression of periaxin (PRX) specifically in the human cerebrovascular system: PDZ domain-mediated strengthening of endothelial barrier

function / M. M. Wang, X. Zhang, S. J. Lee [et al.]. – DOI 10.1038/s41598-018-28190-7. – Text : electronic // Sci. Rep. – 2018. – V. 8. – P. 10042. – URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-28190-7> (дата обращения: 12.04.2022).

128 Wei, X. Roles of mTOR signaling in tissue regeneration / X. Wei, L. Luo, J. Chen. – DOI 10.3390/cells8091075. – Text : electronic // Cells. – 2019. – V. 8. – P. E1075. – URL: <https://www.mdpi.com/2073-4409/8/9/1075> (дата обращения: 16.07.2022).

129 Widder, K. Myelin basic protein (MBP) charge variants show different sphingomyelin-mediated interactions with myelin-like lipid monolayers / K. Widder, G. Harauz, D. Hinderberger. – DOI 10.1016/j.bbammem.2019.183077. – Text : electronic // Biochim. Biophys. Acta Biomembr. – 2020. – V. 1862, I. 2. – P. 183077. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273619302238> (дата обращения: 16.07.2022).

130 Xing, Y. Q. The regulation of FOXO1 and its role in disease progression / Y. Q. Xing, A. Li, Y. Yang [et al.]. – DOI 10.1016/j.lfs.2017.11.030. – Text : electronic // Life Sci. – 2018. – V. 193. – P. 124–131. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320517306070> (дата обращения: 13.09.2020).

131 Yaguchi, M. The activation mechanism of plant S6 kinase (S6K), a substrate of TOR kinase, is different from that of mammalian S6K / M. Yaguchi, S. Ikeya, A. Kozaki. – DOI 10.1002/1873-3468.13661. – Text : electronic // FEBS Lett. – 2019. – URL: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/1873-3468.13661> (дата обращения: 11.06.2020).

132 Yamashita, N. Neurotrophin signaling endosomes: biogenesis, regulation, and functions / N. Yamashita, R. Kuruvilla. – DOI 10.1016/j.conb.2016.06.004. – Text : electronic // Curr Opin Neurobiol. – 2016. – V. 39. – P. 139–145. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095943881630068X> (дата обращения: 11.06.2020).

133 Yamazaki, K. Spiking Neural Networks and Their Applications: A Review / K. Yamazaki, V. K. Vo-Ho, D. Bulsara, N. Le. – DOI 10.3390/brainsci12070863. – Text

: electronic // Brain Sci. – 2022. – V. 12, I. 7. – P. 863. – URL: <https://www.mdpi.com/2076-3425/12/7/863> (дата обращения: 04.04.2020).

134 Yang, Y. Retraction: Self-association of L-periaxin occurs via its acidic domain and NLS2/NLS3, and affects its trafficking in RSC96 cells / Y. Yang, M. Liang, Y. Shi. – DOI 10.1039/D1RA90105B. – Text : electronic // RSC Adv. – 2017. – V. 7. – P. 44112–44123. – URL: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2021/ra/d1ra90105b> (дата обращения: 11.01.2020).

135 Yow, Y. Y. Therapeutic Potential of Complementary and Alternative Medicines in Peripheral Nerve Regeneration: A Systematic Review / Y. Y. Yow, T. K. Goh, K. Y. Nyiew [et al.]. – DOI 10.3390/cells10092194. – Text : electronic // Cells. – 2021. – V. 10, I. 9. – P. 2194. – URL: <https://www.mdpi.com/2073-4409/10/9/2194> (дата обращения: 16.07.2022).

136 Yu, C. Autophagy: Novel applications of nonsteroidal anti-inflammatory drugs for primary cancer / C. Yu, W. B. Li, J. B. Liu [et al.]. – DOI 10.1002/cam4.1287. – Text : electronic // Cancer Med. – 2018. – V. 7. – P. 471–484. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cam4.1287> (дата обращения: 16.07.2022).

137 Yuan, A. Neurofilaments form a highly stable stationary cytoskeleton after reaching a critical level in axons / A. Yuan, T. Sasaki, M. V. Rao [et al.]. – DOI 10.1523/JNEUROSCI.1942-09.2009. – Text : electronic // J Neurosci. – 2009. – V. 29. – P. 11316–11329. – URL: <https://www.jneurosci.org/content/29/36/11316.short> (дата обращения: 03.03.2021).

138 Zhang, J. PI3K/Akt signaling in osteosarcoma / J. Zhang, X. H. Yu, Y. G. Yan [et al.]. – DOI 10.1016/j.cca.2014.12.041. – Text : electronic // Clin Chim Acta. – 2015. – V. 444. – P. 182–192. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898115001059> (дата обращения: 16.02.2022).

139 Zhang, L. Sericin Nerve Guidance Conduit Delivering Therapeutically Repurposed Clobetasol for Functional and Structural Regeneration of Transected Peripheral Nerves / L. Zhang, W. Yang, H. Xie [et al.]. – DOI

10.1021/acsbiomaterials.8b01297. – Text : electronic // ACS Biomater. Sci. Eng. – 2019. – V. 5, I. 3. – P. 1426–1439. – URL: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acsbiomaterials.8b01297> (дата обращения: 11.07.2022).

140 Zhang, X. PI3K/AKT/mTOR Signaling Mediates Valproic Acid-Induced Neuronal Differentiation of Neural Stem Cells through Epigenetic Modifications / X. Zhang, X. He, Q. Li [et al.]. – DOI 10.1016/j.stemcr.2017.04.006. – Text : electronic // Stem Cell Reports. – 2017. – V. 9, I. 8. – P. 1256–1269. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213671117301601> (дата обращения: 16.12.2019).

141 Zhao, G. X. The critical molecular interconnections in regulating apoptosis and autophagy / G. X. Zhao, H. Pan, D. Y. Ouyang [et al.]. – DOI 10.3109/07853890.2015.1040831. – Text : electronic // Ann Med. – 2015. – V. 47. – P. 305–315. – URL: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/07853890.2015.1040831> (дата обращения: 18.03.2020).

142 Zhou, F. Q. Intracellular control of developmental and regenerative axon growth / F. Q. Zhou, W. D. Snider. – DOI 10.1098/rstb.2006.1882. – Text : electronic // Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. – 2006. – V. 361, I. 1473. – P. 1575–1592. – URL: <https://royalsocietypublishing.org/doi/full/10.1098/rstb.2006.1882> (дата обращения: 24.07.2022).