

На правах рукописи



Исакина Марина Владимировна

**РОЛЬ ЛИПИДОВ В ПРОЦЕССАХ ПРОВЕДЕНИЯ ВОЗБУЖДЕНИЯ И
РЕГЕНЕРАЦИИ ПОВРЕЖДЕННЫХ СОМАТИЧЕСКИХ НЕРВОВ**

Специальность – 03.01.02 Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Воронеж – 2016

Работа выполнена на базе кафедры биотехнологии, биоинженерии и биохимии и научно-образовательного центра «Нанобиотехнологии» факультета биотехнологии и биологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва»

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Ревин Виктор Васильевич

Официальные оппоненты: **Ведунова Мария Валерьевна**
доктор биологических наук,
ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский
Нижегородский государственный университет
им. Н.И. Лобачевского»,
Институт биологии и биомедицины,
кафедра нейротехнологий,
старший научный сотрудник

Сафонова Ольга Анатольевна
кандидат биологических наук, доцент
ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»,
биолого-почвенный факультет, кафедра медицинской
биохимии и микробиологии, доцент

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова»

Защита состоится «9» июня 2016 г. в 13:30 на заседании диссертационного совета Д 212.038.03 при **Воронежском государственном университете** по адресу: 394006, г. Воронеж, Университетская пл. 1., ауд. 59.

Автореферат диссертации размещен на официальном сайте Минобрнауки Российской Федерации и на сайте Воронежского государственного университета <http://www.science.vsu.ru>

С диссертацией можно ознакомиться в зональной научной библиотеке Воронежского государственного университета

Автореферат разослан «6» апреля 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



Грабович Маргарита Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Известно, что возникновение и проведение возбуждения по нервам представляет собой сложный физико-химический процесс, связанный не только с перераспределением ионов между клеткой и внешней средой, но и с целым каскадом биохимических реакций, в которых активное участие принимает липидная фракция нервного волокна. В настоящее время накоплены многочисленные экспериментальные данные о роли липидов нервного волокна в проведении возбуждения. Установлено, что различные метаболиты липидной природы принимают активное участие в регуляции функционирования нервного волокна, транспорте Ca^{2+} и активности большинства связанных с мембранами ферментов. Механическая травма нерва, вызванная его перевязкой или перерезкой, приводит к изменению липидного состава мембран, уровня мембран-связанного Ca^{2+} , активности белков-ферментов, вязкости цитоплазмы, как в проксимальном, так и в дистальном отрезке нервного волокна (Ревин, 1996; Ревин *и др.*, 2006; Ревин *и др.*, 2012; Papadopoulos *et al.*, 2015; Neumann *et al.*, 2015). Изменения, возникающие в результате травмы должны иметь характерные различия в указанных участках нерва, поскольку центральная регуляция сохраняется только в проксимальном конце нервного волокна. Однако, до сих пор, эти различия не были выявлены. Кроме этого, до настоящего времени сохраняет свою актуальность проблема восстановления функций поврежденных периферических нервов в связи с недостаточной эффективностью различных подходов и методов их лечения (Масгутов *и др.*, 2011; Gu *et al.*, 2011; Knaing, 2012; Cinteza *et al.*, 2015). Принимая во внимание значимость данной проблемы, в последние десятилетия ведется активный поиск различных путей оптимизации аксональной регенерации. Весьма перспективным направлением для посттравматической регенерации нервных проводников является использование биологически активных веществ, в частности, гиалуроновой кислоты. Гиалуроновая кислота – отрицательно заряженный биополимер с молекулярной массой от 10^4 до 10^7 кДа, представляющий собой гликозаминогликан, состоящий из чередующихся остатков N-ацетил- β -D-глюкозамина и β -D-глюкуроновой кислоты, соединенных между собой β -1,3- и β -1,4-гликозидными связями соответственно. В литературе все чаще встречаются работы по использованию препаратов на ее основе (Севастьянов, 2009; Рахматуллин *и др.*, 2011; Lai, 2015; Fan *et al.*, 2015; Domingues *et al.*, 2015; Engel *et al.*, 2015; Reyes-Ortega *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015). Ускоряя регенеративные процессы, гиалуроновая кислота способствует восстановлению физико-химических свойств клеточных мембран, одним из основных компонентов которых являются липиды (Torigoe *et al.*, 2011). В связи с вышеизложенным, возникает необходимость проведения исследований, направленных на изучение механизмов, лежащих в основе проведения возбуждения по соматическим нервам и регенерации поврежденных нервных проводников.

Цель и задачи исследования

Целью работы было изучение роли липидов в процессах проведения возбуждения и регенерации поврежденных соматических нервов.

Для достижения цели работы были поставлены следующие **задачи**:

1. Исследовать липидный состав соматических нервов крысы в состоянии покоя и при проведении возбуждения.
2. Исследовать изменение количественного содержания и жирнокислотного состава фосфолипидов в проксимальном и дистальном концах седалищного нерва крысы после его перерезки.
3. Исследовать изменение содержания лизофосфолипидов, свободных жирных кислот и продуктов перекисного окисления липидов в проксимальном и дистальном концах поврежденного седалищного нерва крысы.
4. Провести сравнительный анализ действия гиалуроната калия на изменение липидного состава и содержание продуктов их перекисного окисления в проксимальном и дистальном концах поврежденного седалищного нерва крысы.
5. Изучить фазовое состояние липидов соматических нервов крысы при возбуждении, повреждении и введении гиалуроната калия.
6. Исследовать изменение активности фосфолипазы A_2 при повреждении соматических нервов крысы и оценить ее роль в регуляции регенерационных процессов при действии гиалуроната калия.

Научная новизна

Впервые проведен сравнительный анализ роли липидов в процессах проведения возбуждения и регенерации поврежденного нервного волокна крысы. Показано, что при проведении возбуждения

и повреждении нервного волокна изменения происходят не только в составе липидов, но и резко меняется вся динамика липидной фазы. Установлено, что использование гиалуроната калия способствует восстановлению количественного и жирнокислотного состава отдельных фосфолипидных фракций, а также снижению уровня лизофосфолипидов и свободных жирных кислот в травмированном нервном проводнике. С помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния и дифференциальной сканирующей калориметрии выявлено изменение физико-химического состояния липидного бислоя при возбуждении и повреждении соматических нервов крысы. При введении гиалуроната калия наблюдается восстановление микровязкости липидного компонента нервных волокон. Показано, что ускорение регенерационных процессов в поврежденном нервном проводнике при действии гиалуроната калия, вероятнее всего, опосредовано функционированием Ca^{2+} -зависимой фосфолипазы A_2 .

Научно-практическая значимость

Результаты проведенного исследования позволяют расширить и углубить представления о роли липидов в процессах проведения возбуждения по соматическим нервам и развития патологии нервного волокна при его повреждении, а также позволяют выявить возможный механизм действия гиалуроната калия в процессе восстановления функционирования нервных проводников. Полученные данные могут использоваться для повышения эффективности существующих и разработки новых методов стимуляции регенерации соматических нервов при повреждении.

Положения, выносимые на защиту:

1. Было показано, что при переходе седалищного нерва крысы из состояния покоя в состояние возбуждения происходит интенсификация метаболизма фосфоинозитидов, что сопровождается снижением уровня фосфатидилинозитола, свободных жирных кислот и накоплением диацилглицерина, а также перераспределением жирных кислот в составе данных липидных фракций.

2. Установлено, что перерезка седалищного нерва крысы сопровождается изменением количественного содержания и жирнокислотного состава фосфолипидов в его проксимальном и дистальном отрезках.

3. Показано, что в проксимальном и дистальном концах седалищного нерва крысы после его перерезки происходит накопление лизофосфолипидов, свободных жирных кислот и продуктов перекисного окисления липидов.

4. Установлено, что в дистальном конце нерва наблюдаются более выраженные дегенерационные процессы, и гиалуронат калия свое стабилизирующее действие на восстановление содержания и жирнокислотного состава липидного компонента оказывает в большей степени в проксимальном конце седалищного нерва крысы по сравнению с его дистальным отрезком.

5. Гиалуронат калия усиливает регенерационные процессы в поврежденном нервном проводнике, что выражается в восстановлении физико-химического состояния бислоя и микровязкости липидного компонента соматических нервов.

6. Одним из механизмов проявления мембранопротекторных свойств гиалуроната калия является регуляция активности Ca^{2+} -зависимой фосфолипазы A_2 .

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были представлены для обсуждения на Огарёвских чтениях в Мордовском государственном университете им. Н. П. Огарёва (Саранск, 2011–2014); на научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов Мордовского государственного университета им. Н. П. Огарёва (Саранск, 2011–2014); на Международной научной конференции «Достижения и перспективы развития биотехнологии» (Саранск, 2012), на IV съезде биофизиков России (Нижний Новгород, 2012), на Международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» (Минск, 2014).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 18 работ, в числе которых 1 статья в российском научном журнале, рекомендованном ВАК и 2 статьи в зарубежных журналах, индексируемых в базе данных Scopus.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из 7 разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение, выводы, список литературы, приложения. Работа изложена на 168 страницах машинописного текста, содержит 2 таблицы и 55 рисунков. Библиографический указатель содержит 225 источников литературы, в том числе 112 на иностранных языках.

Благодарность. Автор выражает особую благодарность и признательность научному руководителю – доктору биологических наук, профессору Ревину Виктору Васильевичу за неоценимую помощь и внимание на всех этапах работы над диссертацией, а также кандидату биологических наук, доценту Мельниковой Наталье Алексеевне и всему коллективу кафедры биотехнологии, биоинженерии и биохимии Мордовского государственного университета имени Н.П. Огарёва за поддержку при выполнении диссертационного исследования.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ВВЕДЕНИЕ

Во введении обоснована актуальность работы, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна и научно-практическая значимость полученных результатов.

Глава 1. Обзор литературы

В главе представлен обзор основных достижений в области исследования проведения возбуждения по нервам, а также развития дегенерационных и регенерационных процессов в поврежденной нервной ткани. Представлены данные о составе липидов нервной ткани и их роли в функционировании мембран. Дана классификация и биологическая роль ферментов группы фосфолипазы A_2 , участвующих в развитии дегенерационных и регенерационных процессов в нервном проводнике. Приведены современные методы стимуляции регенерации нервной ткани и данные об участии гиалуроновой кислоты в процессах репарации.

Глава 2. Материалы и методы исследования

Объектом исследования служили седалищные нервы белых беспородных крыс. В первой серии эксперимента опытные нервы раздражали с частотой 100 имп/с в течение 5 минут, после чего исследовали изменение липидного состава, интенсивности перекисного окисления липидов, активности фосфолипазы A_2 , фазового состояния липидов нервного волокна при проведении возбуждения. Контролем служили нераздраженные нервы. Во второй серии эксперимента для создания модели патологического процесса проводили перерезку седалищного нерва крысы. У животных первой опытной группы, наркотизированных диэтиловым эфиром, перерезали один из седалищных нервов, после чего рану зашивали. У животных второй опытной группы сразу после перерезки проводили интраоперационное введение гиалуроната калия (Hyaluronic acid potassium salt from human umbilical cord, Sigma) в концентрациях 2 мг/кг, 17 мг/кг и 30 мг/кг. Контролем служил неповрежденный седалищный нерв крысы. Проксимальный и дистальный концы седалищных нервов, а также контрольные нервы выделяли через 12 ч., 24 ч., 3 сут., 7 сут. и 30 сут. после повреждения. Эффективность регенерации оценивали по способности проводить потенциал действия, изменению липидного состава, фазового состояния и интенсивности перекисного окисления липидов в разных участках поврежденного нервного волокна. В третьей серии эксперимента для создания модели патологии на один из седалищных нервов крысы накладывали лигатуру. У животных первой опытной группы, наркотизированных диэтиловым эфиром, перевязывали один из седалищных нервов, после чего рану зашивали. У животных второй опытной группы сразу после перевязки проводили интраоперационное введение гиалуроната калия (Hyaluronic acid potassium salt from human umbilical cord, Sigma) в концентрациях 2 мг/кг, 17 мг/кг и 30 мг/кг. Контролем служил неповрежденный седалищный нерв крысы. Седалищные нервы извлекали через 12 ч., 24 ч., 3 сут., 7 сут. и 30 сут. после повреждения и определяли активность фосфолипазы A_2 , а также фазовое состояние липидов нервных волокон.

Экстракцию липидов из нервной ткани проводили по методу Блайя-Дайера (Bligh, 1959). Для анализа фосфолипидов (ФЛ) использовали одномерную хроматографию в системе растворителей: хлороформ/метанол/вода/аммиак (60/34/4/2) (Reich, 2004; Handloser, 2008) и хлороформ/метанол/ледяная уксусная кислота/вода (60/50/1/4) (Эванз *и др.*, 1990). Для разделения диацилглицерина (ДАГ) использовали систему гептан/диэтиловый эфир/ледяная уксусная кислота (60/40/2 по объему) (Эванз *и др.*, 1990). Отдельные фракции липидов идентифицировали с использованием значений R_f , специфических окрашивающих агентов и свидетелей (Supelco). Количественное определение липидов осуществляли денситометрическим методом на автоматизированном комплексе SAMAG TLC Scanner 4 (Швейцария). Содержание ФЛ выражали отношением неорганического фосфора индивидуальных ФЛ фракций к суммарному неорганическому фосфору всех ФЛ фракций. Метилирование жирных кислот (ЖК) проводили по

методу Моррисона и Смита (Morrison, 1964). Разделение метиловых эфиров ЖК проводили на газовом хроматографе SHIMADZU GC-2010Plus AF (Япония). Содержание диеновых конъюгатов (ДК) определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 233 нм; содержание малонового диальдегида (МДА) – спектрофотометрическим методом в реакции с тиобарбитуровой кислотой при длине волны 535 нм (Орехович, 1977). Изменение физико-химического состояния липидного бислоя нервного волокна регистрировали с помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния на рамановском спектрометре *in via Basis* фирмы Renishaw (Англия). Определение температуры фазового перехода липидов проводили с помощью дифференциального сканирующего калориметра Модуль DSC822e (Швейцария). Активность фосфолипазы A₂ (ФЛ A₂) в гомогенате нерва крысы определяли по накоплению свободных жирных кислот (СЖК) при расщеплении фосфатидилхолина методом газовой хроматографии. Фосфатидилхолин выделяли из яичного желтка и очищали хроматографическим методом с использованием системы хлороформ/метанол/ацетон/ледяная уксусная кислота/вода (40/13/15/12/8, по объему). Реакционная среда для определения активности Ca²⁺-зависимой фосфолипазы A₂ содержала 10 мМ Трис, 0,05 М NaCl, 5 мМ CaCl₂, 0,5 % детергента тритон X-100, pH 8. Реакционная среда для определения активности Ca²⁺-независимой фосфолипазы A₂ содержала 10 мМ Трис, 0,05 М NaCl, 1 мМ ЭГТА (этиленгликольтетрауксусная кислота), 0,5 % детергента тритон X-100, pH 8. (Владимиров, 1998; Юданов, 2005). Удельную активность ФЛ A₂ выражали в мкг ЖК, образованных за 1 ч. 1 мг белка. Содержание белка определяли по методу Лоури (Lowry, 1951). Биоэлектрическую активность регистрировали для изолированного нерва при его внеклеточном отведении со следующими параметрами стимуляции: амплитуда 1,5 В, длительность 0,3 мс, частота раздражения 100 имп/с. Стимуляцию осуществляли электрическими прямоугольными импульсами от стимулятора ЭСЛ-2. Потенциал действия наблюдали на экране осциллографа С1-83. Статистическая обработка данных выполнена с помощью пакетов прикладных программ Statistica 10. Анализ влияния категориальных факторов на количественные показатели проводился на основе многофакторного дисперсионного анализа MANOVA. Статистическая значимость была зафиксирована на уровне 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Глава 3. Исследование изменения липидного состава при возбуждении и регенерации поврежденных соматических нервов крысы

3.1 Исследование состава и фазового состояния липидов соматических нервов крысы при покое и возбуждении

Липиды принимают активное участие в функционировании мембран в связи с многообразием их индивидуального состава, высокой скоростью обмена, наличием в их составе различных жирных кислот, определяющих физическое состояние бислоя и способность к окислению (Ревин *и др.*, 2012; Rolyan *et al.*, 2015). Тем не менее, остается недостаточно изученным вопрос об отдельных метаболитах липидной природы, играющих важную роль в функционировании возбудимых образований. Исходя из этого, мы исследовали изменение липидного состава соматических нервов крысы в состоянии покоя и при проведении возбуждения.

Эксперимент показал, что в состоянии покоя в седалищном нерве крысы содержатся следующие липидные фракции: фосфатидилэтаноламин (ФЭА), фосфатидилхолин (ФХ), сфингомиелин (СМ), фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилинозитол (ФИ), лизофосфатидилхолин (ЛФХ), лизофосфатидилэтаноламин (ЛФЭА) (рисунок 3.1), диацилглицерин (ДАГ), свободные жирные кислоты (СЖК). Раздражение нервов с частотой 100 имп/с в течение 5 минут приводит к уменьшению содержания ФИ, ФЭА и СЖК на 30,3; 8,4 и 43,3 % ($p < 0,05$) соответственно по сравнению с контролем, а также увеличению ДАГ на 31,4 % ($p < 0,05$) относительно контроля. В остальных липидных фракциях достоверных изменений не обнаружено (таблица 3.1; 3.2).

Таблица 3.1 Изменение содержания индивидуальных фосфолипидов в седалищном нерве крысы при стимуляции (100 имп/с; 5 мин.), мкг Р ФЛ инд/мг Р ФЛ (мкг неорганического фосфора индивидуальных ФЛ фракций к мкг суммарного неорганического фосфора всех ФЛ фракций; $M \pm m$)

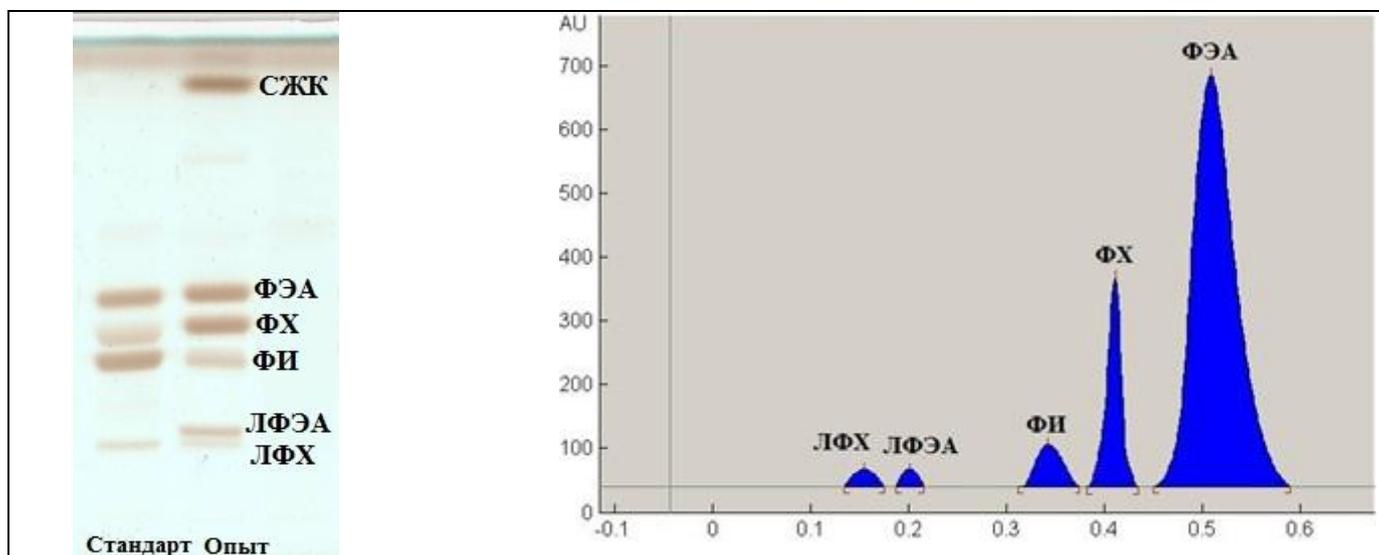
	ФЭА	ФХ	ФС	СМ	ФИ	ЛФХ	ЛФЭА
Покой	236,56±4,81	128,53±5,41	120,01±5,21	137,39±5,38	50,36±3,26	9,64±0,77	6,86±0,69
Стимуляция	216,77±4,22*	122,95±4,66	124,81±5,41	133,88±5,79	35,08±2,36*	9,9±0,48	6,58±0,68

* – достоверность отличия по отношению к покою, $p < 0,05$

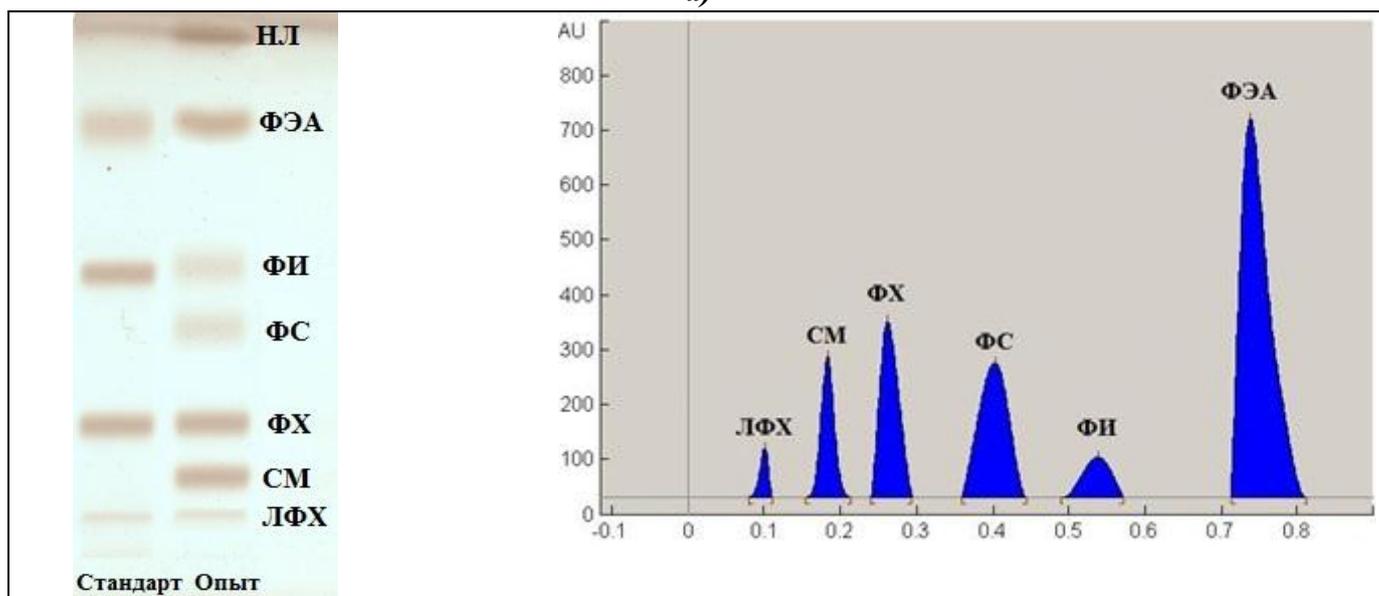
Таблица 3.2 Изменение содержания диацилглицерина и свободных жирных кислот в седалищном нерве крысы при стимуляции (100 имп/с; 5 мин.), мкг жирных кислот (ЖК)/мг общих липидов (ОЛ) ($M \pm m$)

	ДАГ	СЖК
Покой	14,25±0,54	22,39±0,82
Стимуляция	18,73±0,73*	12,7±0,82*

* – достоверность отличия по отношению к покою, $p < 0,05$



а)



б)

Рисунок 3.1 Хроматограммы (слева) и денситограммы (справа) фосфолипидов, выделенных из контрольного седалищного нерва крысы и разделенных в системе растворителей хлороформ/метанол/вода/аммиак (60/34/4/2) (а) и хлороформ/метанол/ледяная уксусная кислота/вода (60/50/1/4) (б): НЛ – нейтральные липиды

Изучение жирнокислотного состава (ЖК состава) отдельных фракций липидов (рисунок 3.2) показало снижение коэффициента насыщенности во фракции ФИ на 26,3 % ($p < 0,05$) и его увеличение во фракциях ДАГ и СЖК на 99,4 и 40,4 % ($p < 0,05$) соответственно по сравнению с контролем (рисунок 3.3). Согласно литературным данным, СЖК усиливают поглощение кальция, а ДАГ активирует протеинкиназу С, которая фосфорилирует белки Ca^{2+} -каналов. В этих условиях кальциевые каналы переходят в открытое состояние и Ca^{2+} поступает внутрь нервного волокна. Как известно, кальций является активатором ФЛ A_2 , которая гидролизует ДАГ, отщепляя СЖК (Chen *et al.*, 2014). Исходя из полученных данных можно предположить, что СЖК образуются в результате метаболизма ФИ, а также из продуктов их распада – из ДАГ в результате активации ФЛ A_2 . Также известно, что ферменты из семейства фосфолипазы A_2 выделяются в отдельные группы по ряду

параметров и свойств, одним из которых является зависимость от внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} (Купцова, 2001). Исходя из этого, мы провели серию экспериментов в среде с ЭГТА для связывания внутриклеточного кальция и определения активности Ca^{2+} -независимой фосфолипазы A_2 в нервном проводнике при возбуждении (Владимиров, 1998). Эксперимент показал, что раздражение нерва приводит к увеличению активности кальций-зависимой ФЛ A_2 на 26,2 % ($p < 0,05$) относительно контроля и не вызывает достоверных изменений фосфолипазной активности в среде с ЭГТА (рисунок 3.4).



Рисунок 3.2 Хроматограмма жирных кислот, выделенных из фракции ФХ (контроль)

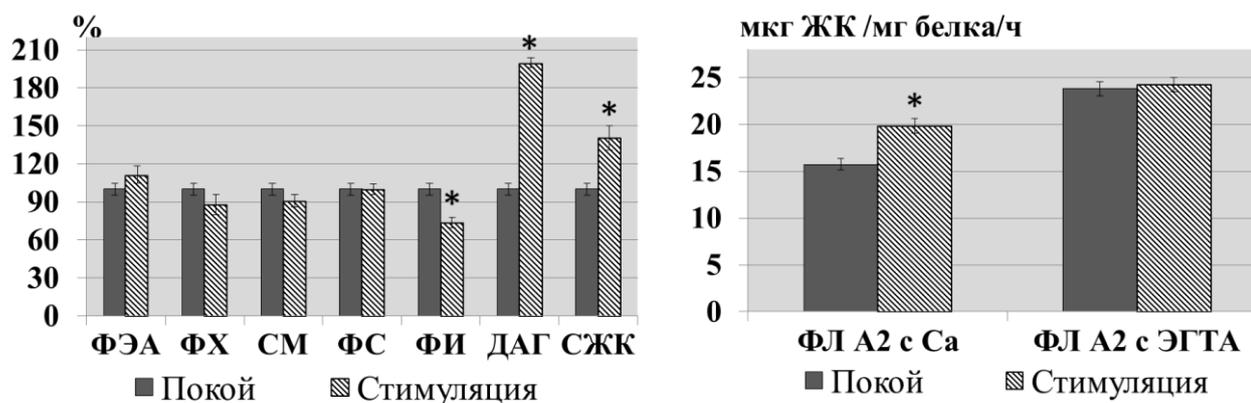


Рисунок 3.3 Изменение коэффициента насыщенности индивидуальных липидных фракций в седалищном нерве крысы при стимуляции (в % от контроля)

*— достоверность отличия по отношению к покою, $p < 0,05$

Рисунок 3.4 Динамика изменения активности фосфолипазы A_2 при инкубации седалищного нерва крысы в Ca^{2+} -содержащей среде и в среде с ЭГТА при стимуляции

*— достоверность отличия по отношению к покою, $p < 0,05$

Изменение содержания и ЖК состава отдельных липидных фракций объясняется не только активацией липолитических ферментов, но и интенсификацией перекисного окисления липидов (ПОЛ), поскольку наличие в составе ФЛ ненасыщенных ЖК делает их наиболее восприимчивыми к окислению. Было показано, что при возбуждении содержание продуктов ПОЛ в седалищном нерве крысы возрастает: уровень ДК и МДА превышает контрольное значение на 20,4 и 27,7 % ($p < 0,05$) соответственно (таблица 3.3).

Таблица 3.3 Динамика изменения концентрации диеновых конъюгатов и малонового диальдегида в седалищном нерве крысы при стимуляции ($M \pm m$)

	ДК, ммоль/мг липидов	МДА, ммоль/мг белка
Покой	10,08±0,43	0,47±0,03
Стимуляция (100 имп/с; 5 мин.)	12,14±0,52*	0,60±0,04*

*— достоверность отличия по отношению к покою, $p < 0,05$

Следовательно, процессы ПОЛ регистрируются не только в условиях возникновения патологии, но и при физиологических режимах функционирования нерва. Однако незначительное увеличение продуктов перекисного окисления, вероятнее всего, не приводит к инактивации ферментов и различным функциональным нарушениям, которые происходят при усиленном накоплении в клетках продуктов ПОЛ в случае развития патологических состояний.

Нарушение липидного и ЖК состава бислоя, структурные перестройки, возникающие в результате активации фосфолипаз, и соответствующее изменение физических свойств липидов сопровождаются изменением температуры фазового перехода липидов (Антонов 1992; Treuheit *et al.*, 2016). Исходя из этого, мы провели исследование изменения фазового состояния липидов при возбуждении с помощью метода дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Эксперимент показал, что в контроле фазовый переход липидов седалищного нерва крысы из геля в жидкокристаллическое состояние происходит при температуре $-31,6\text{ }^{\circ}\text{C}$. Стимуляция нерва сопровождается незначительным изменением температуры фазового перехода, которая составляет $-33,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ (рисунок 3.5).

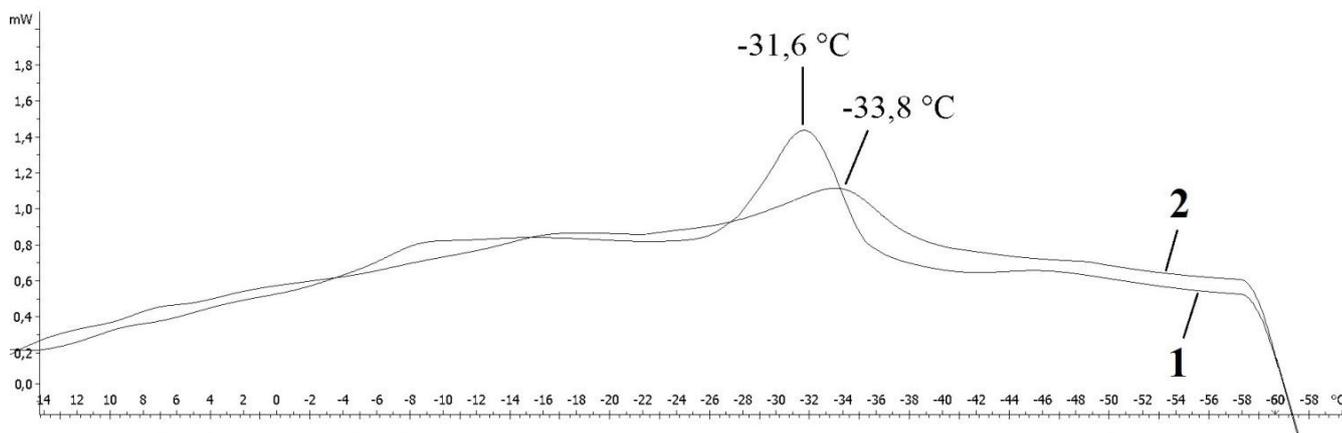


Рисунок 3.5 Кривая ДСК для липидов, выделенных из седалищного нерва крысы в состоянии покоя (1) и при возбуждении (2)

Таким образом, при переходе нерва из состояния покоя в состояние возбуждения наиболее существенные изменения в количественном содержании и ЖК составе происходят во фракциях ФИ, ДАГ и СЖК. Сходный набор жирных кислот во фракции СЖК и ФИ, а также динамика их перераспределения свидетельствует о том, что значительная часть СЖК может образовываться из ФИ в результате активации кальций-зависимой ФЛ A_2 . Следует отметить, что резкие изменения в количественном перераспределении свободных жирных кислот при возбуждении нерва указывает на их активное участие в функционировании нервного волокна. Полученные данные позволяют предположить, что при проведении возбуждения в нерве происходит интенсификация ФИ-цикла, который является полифункциональной системой, влияющей на функционирование мембранных структур за счет изменений состава липидов в полярной и гидрофобной областях бислоя.

3.2 Влияние гиалуроната калия на изменение количественного содержания и жирнокислотного состава индивидуальных фосфолипидов и диацилглицерина в проксимальном конце седалищного нерва крысы после его перерезки

Процессы дегенерации, наблюдающиеся при повреждении соматических нервов, приводят к изменениям в составе фосфолипидов и сопровождаются нарушениями микроструктуры, физико-химических свойств и функционирования мембран нервных проводников (Ревин, 1990; Moldovan, 2004; Rajapaksha *et al.*, 2015). В ходе проведенных исследований было установлено, что перерезка седалищного нерва крысы приводит к потере его способности проводить потенциал действия до 7 суток эксперимента и частичному восстановлению проводимости в проксимальном конце нерва к 30-м суткам наблюдения (рисунок 3.6 *а,б,в*). Введение гиалуроната калия (ГК) в концентрации 30 мг/кг сопровождается сокращением сроков восстановления функциональной активности, что выражается в существенном увеличении амплитуды потенциала действия к 7-м суткам наблюдения по сравнению с повреждением (рисунок 3.6 *г*). Спустя 30 суток после травмы потенциал действия в этом варианте опыта приближается к контрольным значениям (рисунок 3.6 *д*).

Нарушение функциональной активности нервных волокон сопровождается существенными изменениями липидного состава. Установлено, что перерезка седалищного нерва приводит к увеличению содержания фракций ФС и ФИ в его проксимальном конце. Максимальное накопление ФС отмечается на 3-и сутки наблюдения и превышает контрольное значение на 51,3 % ($p < 0,05$). Максимальное увеличение содержания ФИ наблюдается на 7-е сутки эксперимента и превышает контроль на 83,7 % ($p < 0,05$). Было показано, что при действии ГК в концентрации 30 мг/кг

содержание ФС к 3-м суткам наблюдения ниже на 23,9 % ($p < 0,05$), а содержание ФИ к 7-м суткам – на 31,5 % ($p < 0,05$) относительно серии опытов с повреждением. В этих же условиях уровень ФЭА снижается по отношению к контролю с минимальным содержанием на 3-и сутки наблюдения, а ФХ и СМ – на 7-е сутки эксперимента. Так, содержание ФЭА в указанный период времени уменьшается на 54,9 % ($p < 0,05$), ФХ – на 71,9 % ($p < 0,05$), а СМ – на 81,5 % ($p < 0,05$) относительно контроля. На фоне действия ГК наблюдается увеличение содержания ФЭА, ФХ и СМ на протяжении всего эксперимента по сравнению с травмированным нервом без введения ГК (рисунок 3.7).

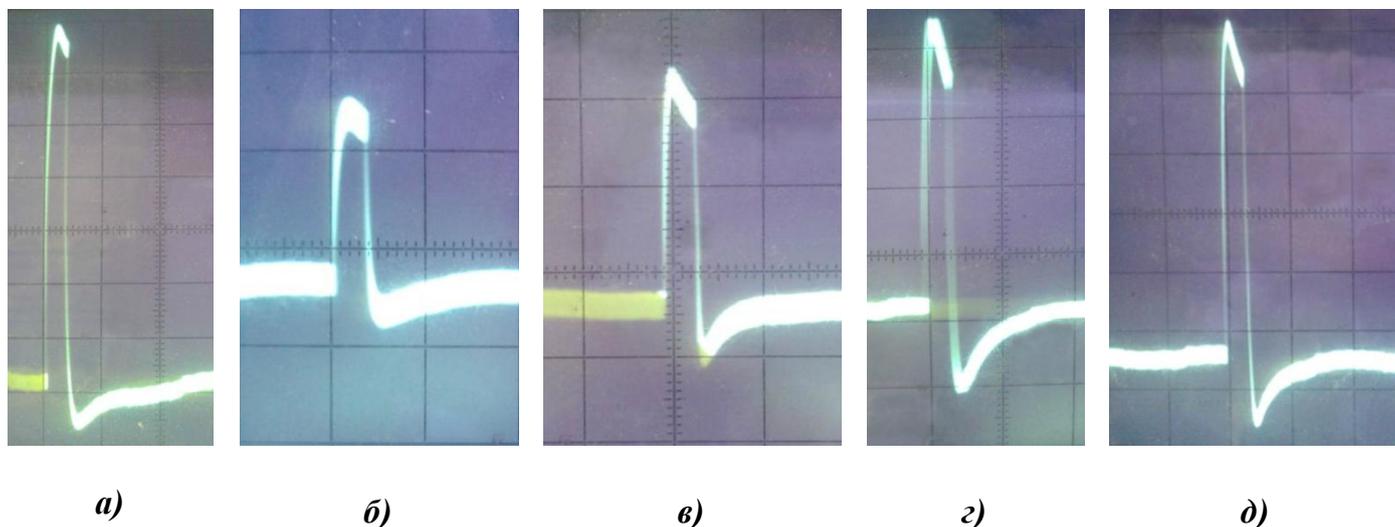


Рисунок 3.6 Потенциал действия седалищного нерва крысы: *а)* контрольный нерв; *б)* проксимальный конец нерва через 7 суток после повреждения; *в)* проксимальный конец нерва через 30 суток после повреждения; *з)* проксимальный конец нерва через 7 суток после повреждения и введения ГК в концентрации 30 мг/кг; *д)* проксимальный конец нерва через 30 суток после повреждения и введения ГК в концентрации 30 мг/кг.

Известно, что многие патологические состояния сопровождаются, прежде всего, изменением количества свободных жирных кислот и жирных кислот фосфолипидов (Ревин, 1990; Шнайдер, 2008). В связи с этим, представляло интерес исследовать жирнокислотный состав фосфолипидов в проксимальном конце нерва после его перерезки и действия гиалуроната калия. Исследование показало, что ЖК состав фосфолипидов в проксимальном конце нерва после повреждения претерпевает существенные изменения. Так, во фракциях ФЭА, ФХ и СМ на фоне травмы наблюдается увеличение содержания ненасыщенных и уменьшение концентрации насыщенных ЖК, в результате чего происходит снижение коэффициента насыщенности. В этих же условиях во фракциях ФС и ФИ коэффициент насыщенности увеличивается за счет снижения ненасыщенных и увеличения насыщенных жирных кислот. Максимальное значение исследуемого показателя наблюдается через 24 ч. после травмы во фракции ФС и на 3-и сутки эксперимента во фракции ФИ. Введение гиалуроната калия способствовало стабилизации ЖК состава вышеописанных фосфолипидных фракций. При этом, наиболее выраженный эффект препарата проявлялся в концентрации 30 мг/кг (рисунок 3.8).

Исследование показало, что перерезка нерва приводит к снижению уровня ДАГ на 63,7 % ($p < 0,05$) и уменьшению коэффициента насыщенности в 10,0 раз ($p < 0,05$) относительно контроля к 7 суткам наблюдения. Введение ГК в его максимальной концентрации приводит к увеличению коэффициента насыщенности в 3,0 раза ($p < 0,05$) по сравнению с повреждением, не вызывая достоверных изменений содержания ДАГ (рисунок 3.7).

С помощью метода ДСК было установлено, что изменение ЖК состава липидов в проксимальном конце нерва через 7 суток после его перерезки и введения ГК коррелирует с изменением температуры фазового перехода липидов в этих вариантах опытов. Эксперимент показал, что спустя 7 суток после перерезки нерва наблюдается снижение температуры фазового перехода липидов до $-38,5^{\circ}\text{C}$ в его проксимальном отрезке. Использование ГК в концентрации 30 мг/кг в этот период времени сопровождается увеличением температуры фазового перехода липидов, которая составляет $-34,0^{\circ}\text{C}$ (рисунок 3.9). Полученные данные, вероятнее всего, объясняются возрастанием суммарного содержания ненасыщенных ЖК в исследуемых липидных

фракциях при повреждении и уменьшением их количества на фоне действия препарата, поскольку ненасыщенные ЖК снижают температуру кристаллизации липидов.

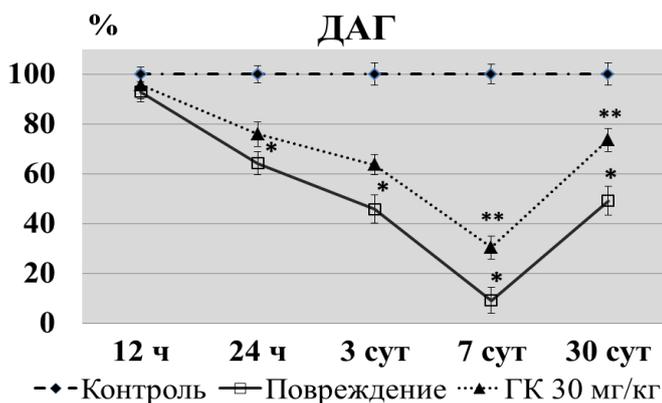
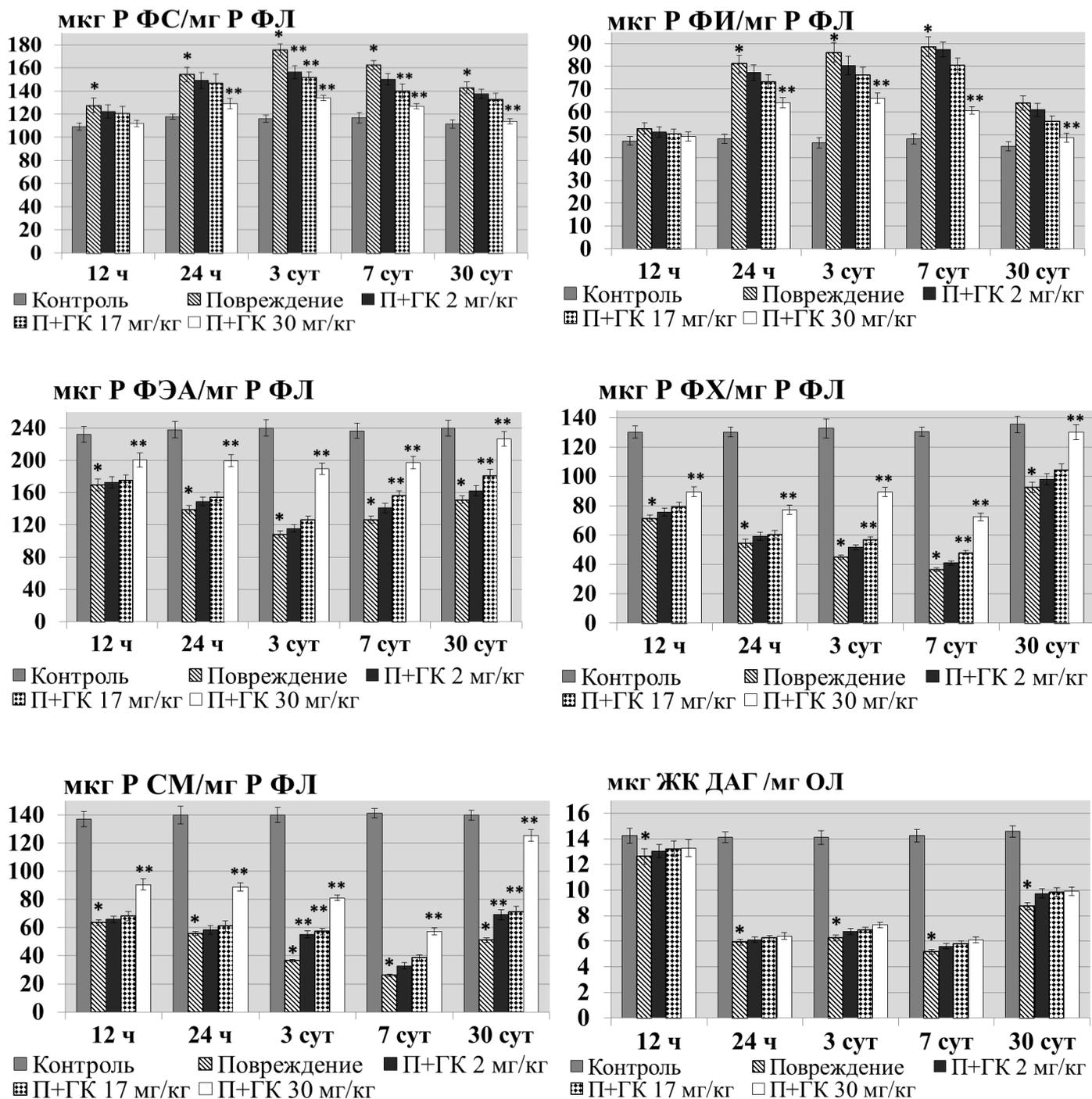


Рисунок 3.7 Динамика изменения концентрации индивидуальных липидных фракций и коэффициента насыщенности во фракции диацилглицерина (уровень контрольного показателя принят за 100 %) в проксимальном конце седалищного нерва крысы после его повреждения и действия гиалуроната калия (* – достоверность отличия по отношению к контролю, $p < 0,05$; ** – достоверность отличия по отношению к повреждению, $p < 0,05$)

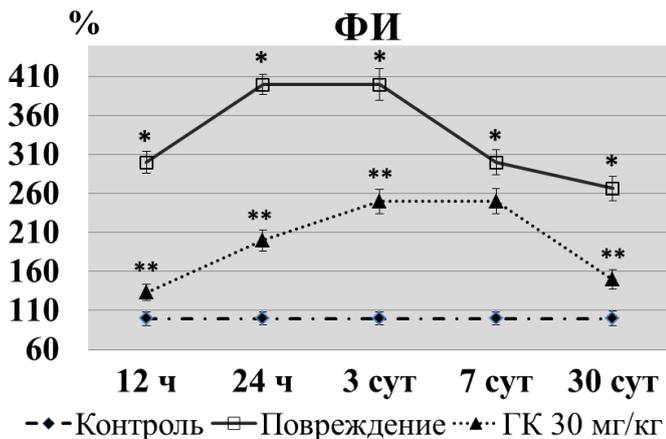
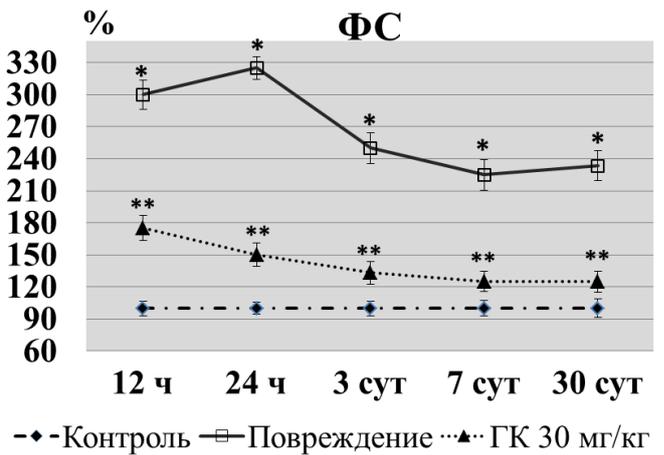
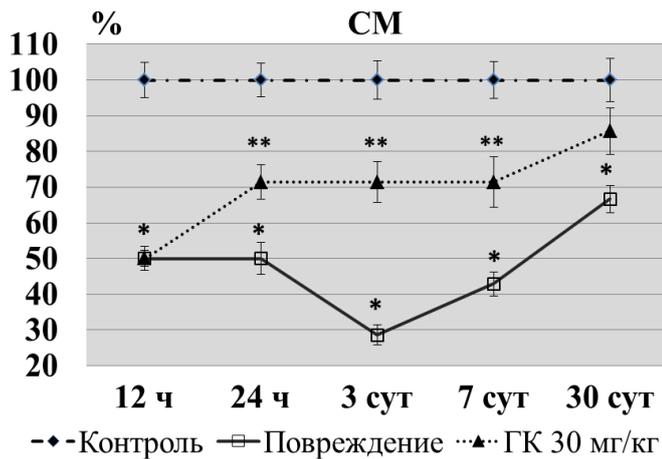
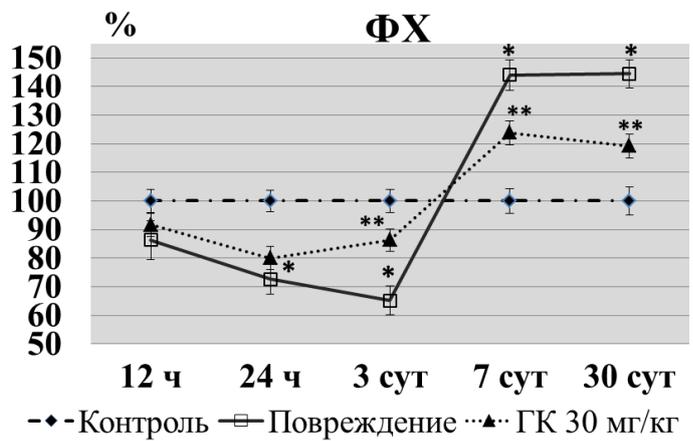
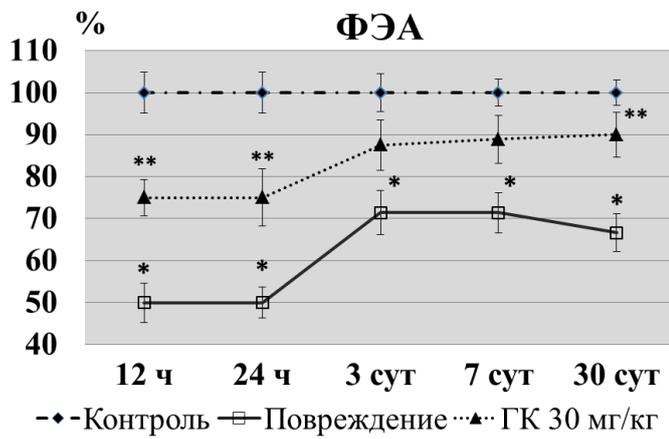


Рисунок 3.8 Влияние гиалуроната калия на изменение коэффициента насыщенности индивидуальных фосфолипидных фракций в проксимальном конце нерва после его перерезки (уровень контрольного показателя принят за 100%; *— достоверность отличия по отношению к контролю, $p < 0,05$; **— достоверность отличия по отношению к повреждению, $p < 0,05$)

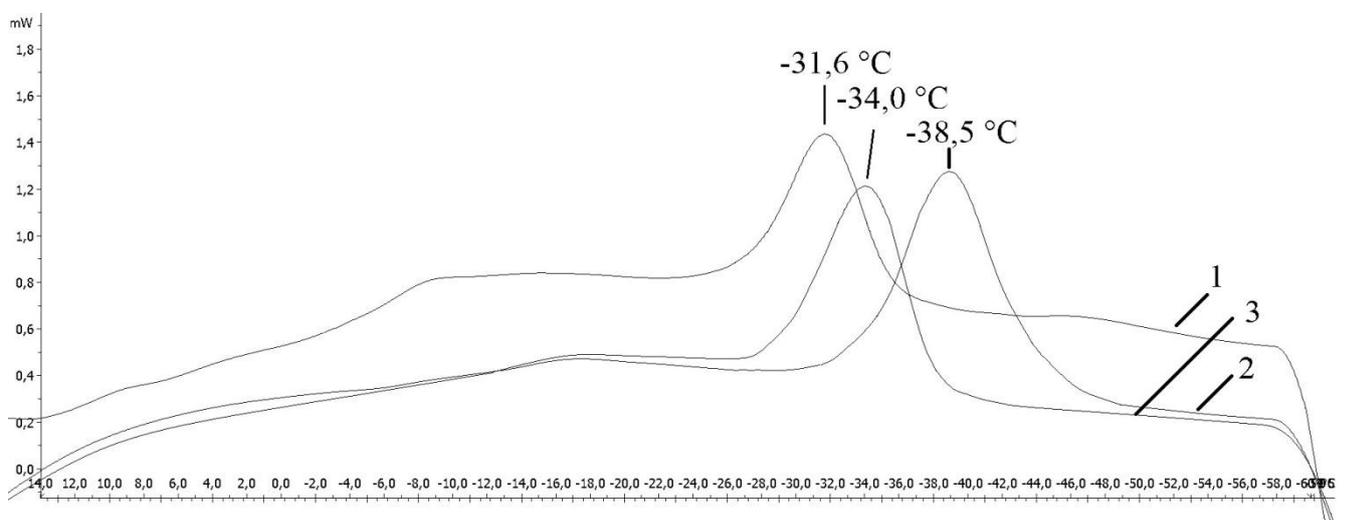


Рисунок 3.9 Кривая ДСК для липидов, выделенных из седалищного нерва крысы в контроле (1), при повреждении (2) и введении гиалуроната калия в концентрации 30 мг/кг (3) спустя 7 суток после перерезки нерва в его проксимальном отрезке

Таким образом, перерезка нерва сопровождается количественными изменениями фосфолипидных фракций и диацилглицерина, а также перераспределением жирных кислот в составе данных фракций в его проксимальном отрезке, что свидетельствует об активных процессах, происходящих в гидрофобной части мембраны. Введение гиалуроната калия в его максимальной концентрации приводит к стабилизации фосфолипидного и жирнокислотного состава, тем самым способствуя восстановлению свойств мембран поврежденных нервных волокон.

3.3. Влияние гиалуроната калия на изменение содержания лизофосфолипидов и свободных жирных кислот в проксимальном конце седалищного нерва крысы после его перерезки

Для оценки глубины развития дегенерационных процессов и влияния ГК на процессы регенерации, мы исследовали изменение содержания лизофосфолипидов (ЛФЛ) в проксимальном конце седалищного нерва после его перерезки. В ходе проведенных исследований было установлено, что в неповрежденных седалищных нервах крысы содержание ЛФХ и ЛФЭА составляет в среднем 8,4 мкг Рлфх/мг Рфл и 3,1 мкг Рлфэа/мг Рфл соответственно. Максимальное накопление ЛФЛ наблюдается на 3 сутки эксперимента: содержание ЛФХ и ЛФЭА превышает контрольные значения в 3,0 и 4,4 раза ($p < 0,05$) соответственно. Введение ГК способствует менее выраженному накоплению лизоформ фосфолипидов. Так, на 3-и сутки эксперимента в серии опытов с ГК в концентрации 30 мг/кг уровень ЛФХ и ЛФЭА снижается относительно повреждения на 34,8 и 45,3 % ($p < 0,05$) соответственно (рисунок 3.10 а, б).

По-видимому, накопление лизофосфолипидов при повреждении нерва объясняется увеличением активности фосфолипазы A_2 , которая катализирует гидролиз фосфолипидов в основном, в *sn*-2 положении, характерном для полиненасыщенных жирных кислот (Ревин и др., 2012). Для подтверждения наших предположений мы провели серию опытов, в которых было изучено изменение содержания СЖК – одного из конечных липидных метаболитов, образующихся под действием фосфолипазы A_2 . Согласно результатам проведенных исследований, в контрольных нервах содержание СЖК составляет в среднем 19 мкг ЖК/мг ОЛ. Максимальное накопление СЖК, как и в случае с ЛФЛ, наблюдается на 3-и сутки эксперимента и составляет $61,5 \pm 2,8$ мкг СЖК/мг ОЛ. Введение ГК способствует снижению уровня СЖК относительно повреждения. В наибольшей степени эти изменения проявляются на 7-е и 30-е сутки эксперимента при введении препарата в концентрации 30 мг/кг: количество СЖК снижается на 40,2 и 37,6 % ($p < 0,05$) по сравнению с повреждением и незначительно превышает контрольное значение (рисунок 3.11 а). Кроме этого, во фракции СЖК происходят не только количественные, но и качественные изменения состава. В седалищном нерве крысы была идентифицирована 21 ЖК, при этом наибольшая доля от всех обнаруженных ЖК принадлежит пальмитиновой и стеариновой – 46,8 и 27,0 % соответственно. На долю ненасыщенных ЖК приходится 15 %, а коэффициент насыщенности составляет 5,7. Минимальное значение коэффициента насыщенности в результате увеличения содержания ненасыщенных ЖК отмечается на 3-и сутки наблюдения и составляет 1,9. Введение ГК вызывает заметные изменения во фракции СЖК, способствуя стабилизации ЖК состава и снижению количества ненасыщенных жирных кислот, которые, как известно, являются основным субстратом процесса перекисного окисления липидов (рисунок 3.11 б).

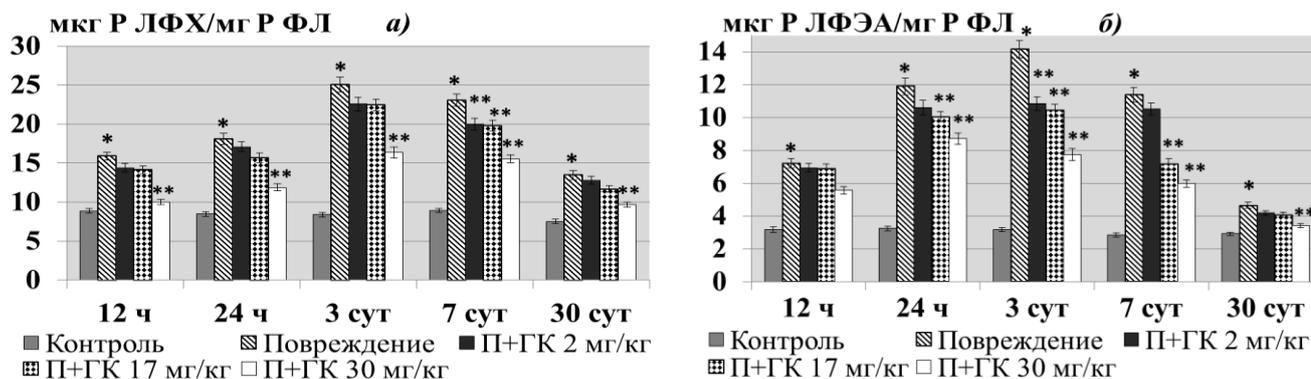


Рисунок 3.10 Влияние гиалуроната калия на содержание ЛФХ (а) и ЛФЭА (б) в проксимальном конце седалищного нерва крысы после его перерезки (* – достоверность отличия по отношению к контролю, $p < 0,05$; ** – достоверность отличия по отношению к повреждению, $p < 0,05$)

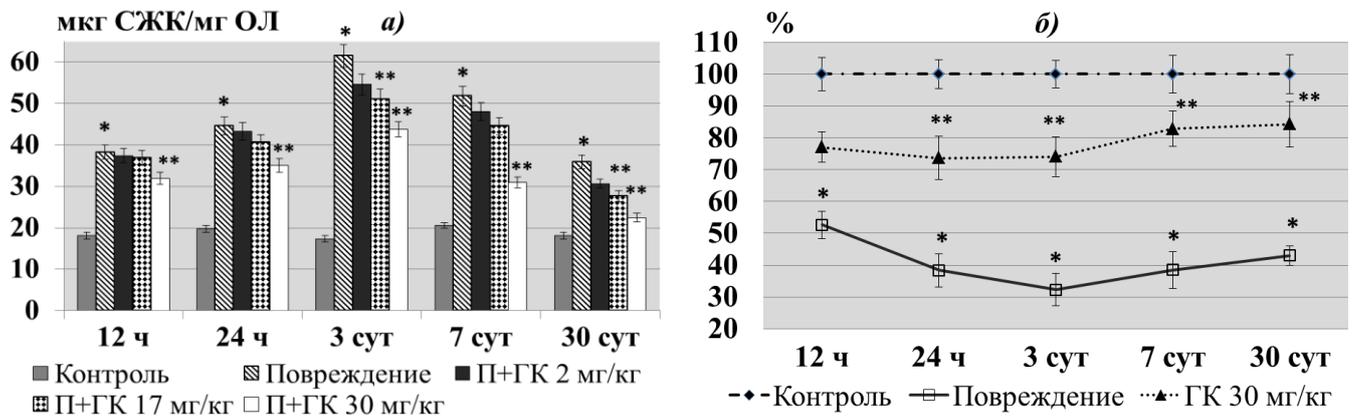


Рисунок 3.11 Влияние гиалуроната калия на изменение количественного содержания (а) и коэффициента насыщенности во фракции СЖК (б) в проксимальном конце седалищного нерва крысы: ОЛ – общие липиды (*– достоверность отличия по отношению к контролю, $p < 0,05$; **– достоверность отличия по отношению к повреждению, $p < 0,05$)

Таким образом, перерезка нерва приводит к накоплению лизоформ фосфолипидов и свободных жирных кислот, а также увеличению содержания ненасыщенных ЖК в составе фракции СЖК, вероятнее всего, в результате активации ФЛ А₂. Введение гиалуроната калия сопровождается достоверным снижением уровня ЛФЛ и СЖК и стабилизацией ЖК состава фракции СЖК. Вполне возможно, что данный эффект препарата осуществляется через регуляцию активности ФЛ А₂.

3.4. Влияние гиалуроната калия на изменение содержания продуктов перекисного окисления липидов в проксимальном конце седалищного нерва крысы после его перерезки

Из литературы известно, что при различных патологических состояниях происходит интенсификация процессов ПОЛ, что приводит к изменению физических свойств биологических мембран и ферментативных функций липопротеидных комплексов (Ревин, 1990; Luoma *et al.*, 2015). Исходя из этого, мы исследовали изменение содержания диеновых конъюгатов, а также одного из конечных продуктов перекисидации липидов – малонового диальдегида в проксимальном конце нерва после его перерезки и введения гиалуроната калия. Показано, что наиболее выраженное увеличение продуктов ПОЛ наблюдается на 3-и сутки эксперимента. В этом варианте опыта превышение содержания ДК и МДА над уровнем контроля составляет 40,0 и 207,0 % ($p < 0,05$) соответственно. При введении ГК наблюдается снижение уровня ДК и МДА по сравнению с повреждением, начиная с первых суток и в течение всего периода наблюдения (рисунок 3.12).

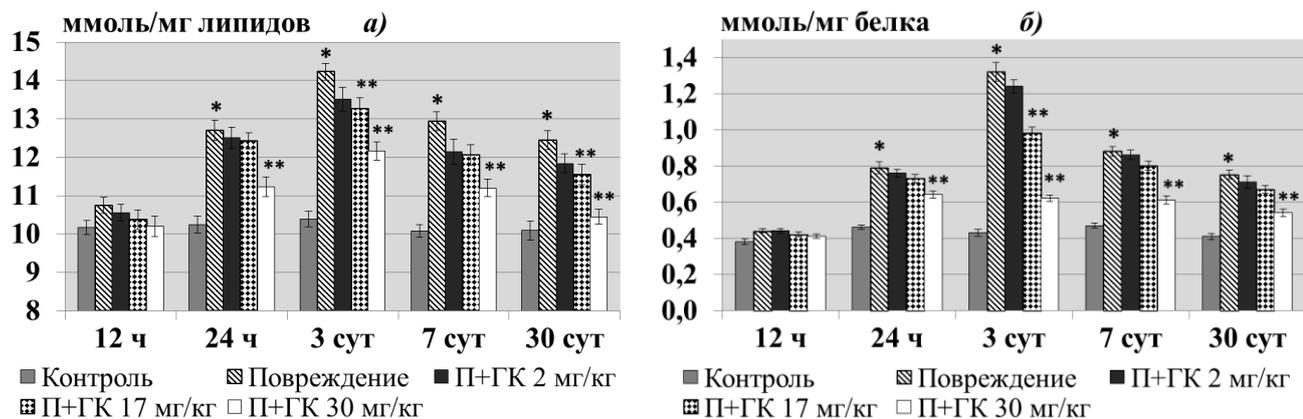


Рисунок 3.12 Динамика изменения концентрации диеновых конъюгатов (а) и малонового диальдегида (б) в проксимальном конце седалищного нерва крысы после его повреждения и действия гиалуроната калия (*– достоверность отличия по отношению к контролю, $p < 0,05$; **– достоверность отличия по отношению к повреждению, $p < 0,05$)

Полученные данные коррелируют с изменением содержания ЛФЛ и СЖК при повреждении седалищного нерва крысы и введении препарата, что, вероятнее всего, указывает на ФЛ А₂ – опосредованное действие гиалуроната калия.

3.5. Влияние гиалуроната калия на изменение количественного содержания и жирнокислотного состава индивидуальных фосфолипидов и диацилглицерина в дистальном конце седалищного нерва крысы после его перерезки

Следует отметить, что в дистальной части нервного проводника из-за исчезновения центральной регуляции происходит полная потеря способности проводить потенциал действия, а также наблюдается усиление скорости окислительных процессов в результате отсутствия регуляторных механизмов. Исходя из этого, мы провели сравнительный анализ изменения липидного состава в проксимальном и дистальном отрезках нерва при повреждении и действии гиалуроната калия.

Было установлено, что максимальный уровень ФС и ФИ отмечается на 3-и сутки наблюдения и превышает контрольные значения на 48,3 и 172,6 % ($p < 0,05$) соответственно. Минимальное содержание ФЭА, ФХ и СМ отмечается на 7 сутки наблюдения: содержание указанных фракций в этот период снижается относительно контроля на 58,2; 65,2 и 83,5 % ($p < 0,05$) соответственно (рисунок 3.13).

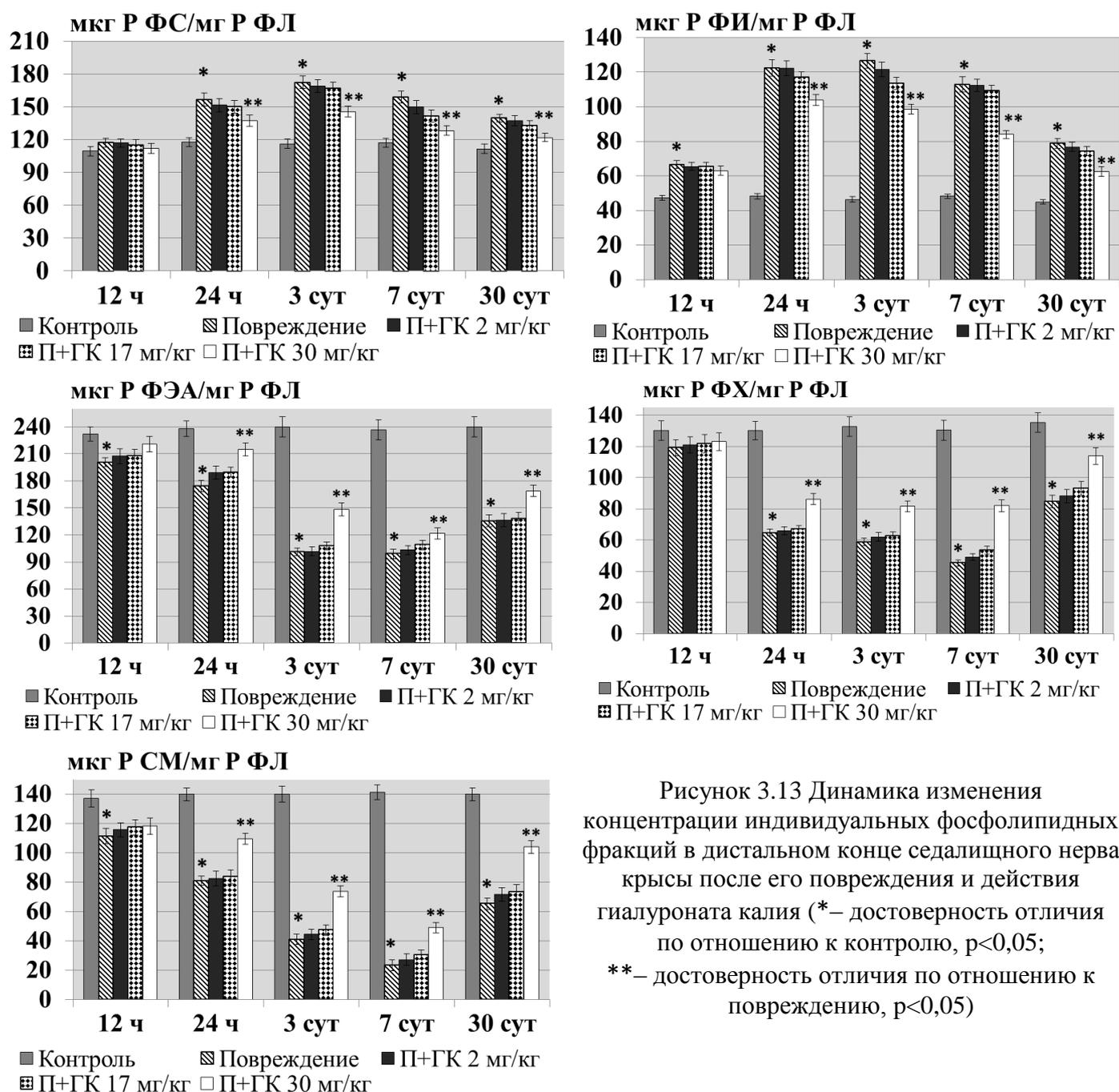


Рисунок 3.13 Динамика изменения концентрации индивидуальных фосфолипидных фракций в дистальном конце седалищного нерва крысы после его повреждения и действия гиалуроната калия (* – достоверность отличия по отношению к контролю, $p < 0,05$; ** – достоверность отличия по отношению к повреждению, $p < 0,05$)

Исследование ЖК-состава ФЭА, СМ и ФХ показало, что во фракции СМ коэффициент насыщенности снижается относительно контроля в 7,0 раз ($p < 0,05$) на 3-и сутки наблюдения, а во фракциях ФЭА и ФХ – в 9,0 и 2,9 раза ($p < 0,05$) соответственно на 7-е сутки эксперимента.

Максимальное его увеличение во фракциях ФС и ФИ наблюдается на 3-и сутки эксперимента и превышает контрольное значение в 4,8 и 6,0 раз ($p < 0,05$) соответственно (рисунок 3.14). Гиалуронат калия оказывает наиболее выраженный стабилизирующий эффект на восстановление уровня фосфолипидов и их ЖК-состава в дистальном конце нерва, как и в проксимальном отрезке в концентрации 30 мг/кг (рисунок 3.13, 3.14). Исследование показало, что в дистальном конце нерва наблюдаются аналогичные изменения содержания и ЖК состава ДАГ при повреждении. Однако введение ГК не вызывает достоверных изменений коэффициента насыщенности и уровня ДАГ по сравнению с перерезкой (рисунок 3.15).

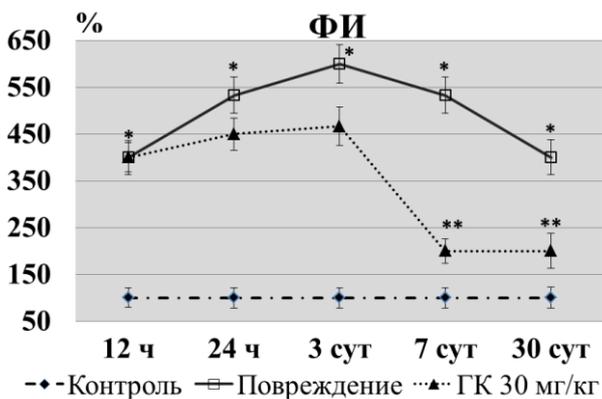
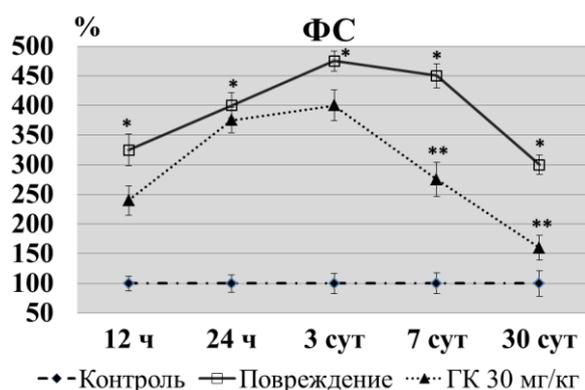
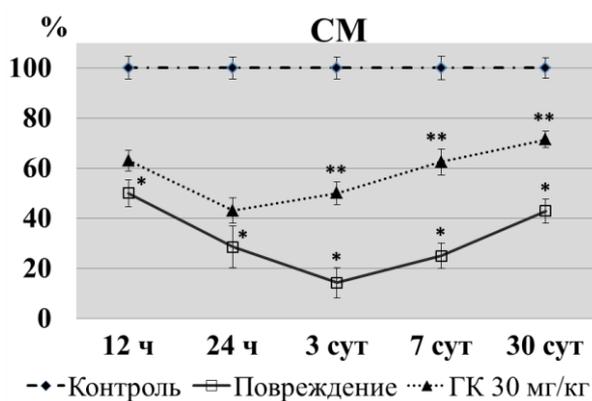
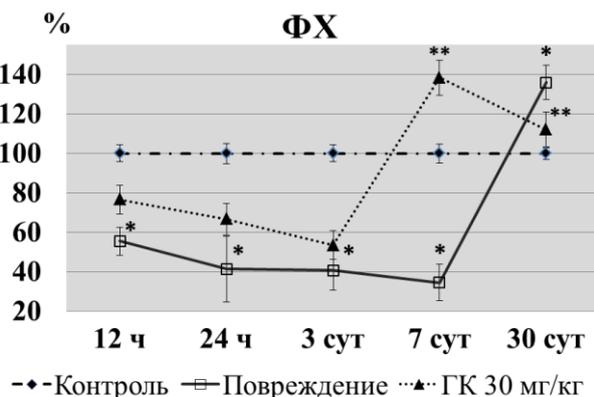
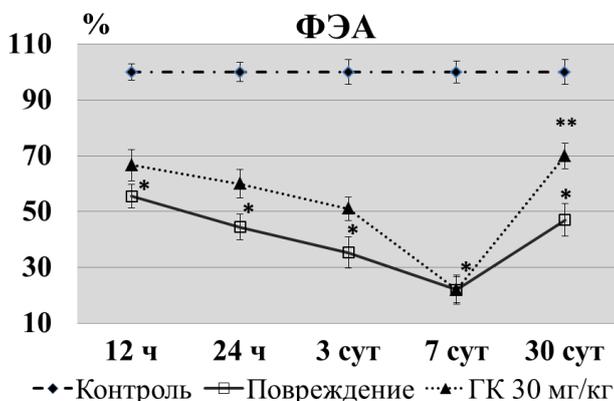


Рисунок 3.14 Влияние гиалуроната калия на изменение коэффициента насыщенности индивидуальных фосфолипидных фракций в дистальном конце нерва после его перерезки (уровень контрольного показателя принят за 100 %; * – достоверность отличия по отношению к контролю, $p < 0,05$; ** – достоверность отличия по отношению к повреждению, $p < 0,05$)

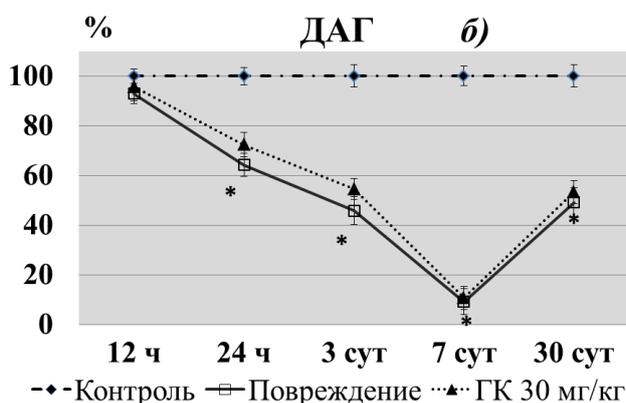
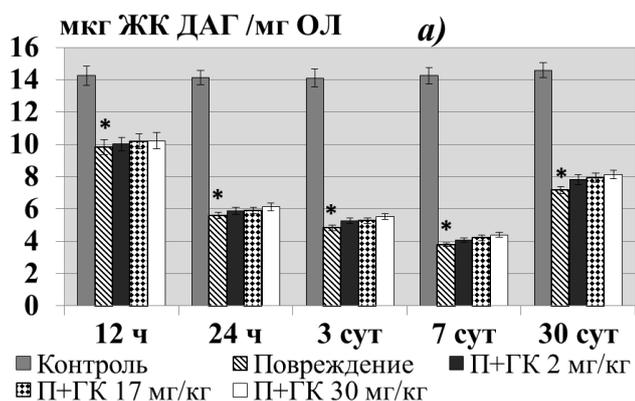


Рисунок 3.15 Влияние гиалуроната калия на изменение содержания (а) и коэффициента насыщенности (б) во фракции ДАГ в дистальном конце нерва после его перерезки (в % от контроля; * – достоверность отличия по отношению к контролю, $p < 0,05$)

С помощью метода ДСК было показано, что спустя 7 суток после перерезки нерва наблюдается снижение температуры фазового перехода липидов до $-41,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ в его дистальном отрезке. Использование гиалуроната калия в концентрации 30 мг/кг в этот период времени сопровождается повышением температуры фазового перехода липидов, которая составляет $-37,9\text{ }^{\circ}\text{C}$ (рисунок 3.16).

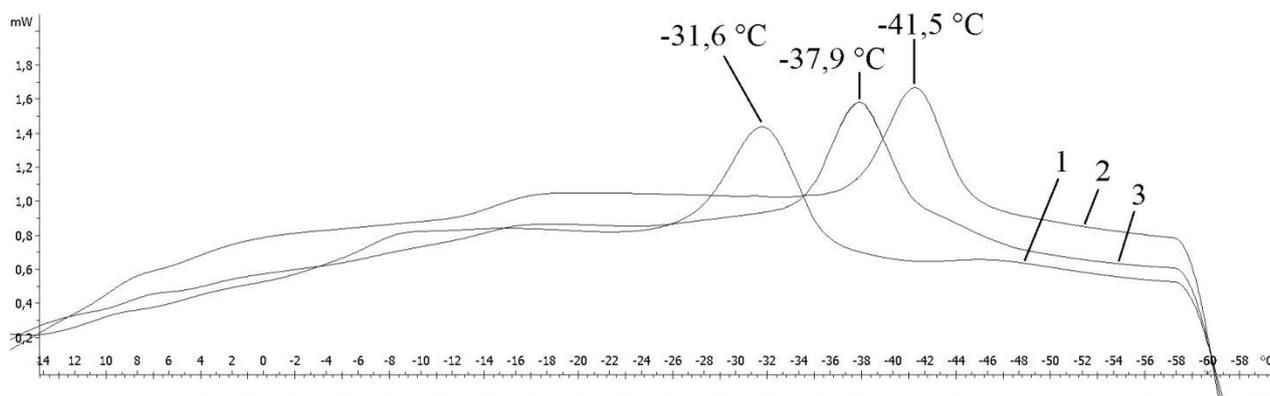


Рисунок 3.16 Кривая ДСК для липидов, выделенных из седалищного нерва крысы в контроле (1), при повреждении (2) и введении гиалуроната калия в концентрации 30 мг/кг (3) спустя 7 суток после перерезки нерва в его дистальном отрезке

Полученные данные свидетельствуют о том, что в дистальном конце нерва происходит интенсивное накопление ненасыщенных жирных кислот в исследуемых липидных фракциях, в результате чего отмечается более низкая температура фазового перехода липидов по сравнению с его проксимальным отрезком. Введение ГК подопытным животным вызывает повышение температуры фазового перехода липидов в дистальном конце нерва. Однако в его проксимальном отрезке стабилизирующее действие препарата на восстановление жирнокислотного состава липидов проявляется в большей степени, о чем свидетельствует более выраженное повышение температуры кристаллизации липидов в этом варианте опыта.

3.6. Влияние гиалуроната калия на изменение содержания лизофосфолипидов и свободных жирных кислот в дистальном конце седалищного нерва крысы после его перерезки

В следующей группе опытов, мы провели сравнительный анализ изменения липидного состава в проксимальном и дистальном отрезках нерва при повреждении и действии гиалуроната калия. Исследование показало, что максимальное накопление ЛФХ, ЛФЭА и СЖК в дистальном конце нерва наблюдается на 7-е сутки и составляет в среднем $35,9\text{ мкг Рлфх/мг Рфл}$; $15,0\text{ мкг Рлфэа/мг Рфл}$ и $169,5\text{ мкг ЖК/мг ОЛ}$ соответственно (рисунок 3.17 *а, б, в*). Как видно из рисунка 3.17, в серии опытов с введением ГК содержание ЛФХ, ЛФЭА и СЖК также увеличивалось, но в меньшей степени по сравнению с перерезкой нерва без использования препарата.

В дистальном конце нерва в составе фракции СЖК были идентифицированы те же жирные кислоты, что и в проксимальном отрезке нервного волокна. Минимальное значение коэффициента насыщенности отмечается на 3-и сутки после повреждения нерва. В этом варианте опыта коэффициент насыщенности снижается в 8,4 раза ($p < 0,05$) относительно контроля. В группе опытов с ГК содержание ненасыщенных жирных кислот существенно превышает контрольное значение через 12, 24 часа и 3 суток после повреждения. Однако, на 7-е сутки эксперимента введение препарата в концентрации 30 мг/кг способствует увеличению коэффициента насыщенности в 1,9 раза ($p < 0,05$) относительно повреждения, а к 30-м суткам наблюдения этот показатель снижен по сравнению с контролем только на 20,3 % ($p < 0,05$) (рисунок 3.17 *г*).

Таким образом, в дистальном конце нерва происходят более выраженные изменения в связи с развитием сильных дегенерационных процессов на всем его протяжении, в результате чего стабилизирующее действие гиалуроната калия на восстановление уровня лизофосфолипидов и свободных жирных кислот проявляется в меньшей степени по сравнению с проксимальным концом нерва после его перерезки.

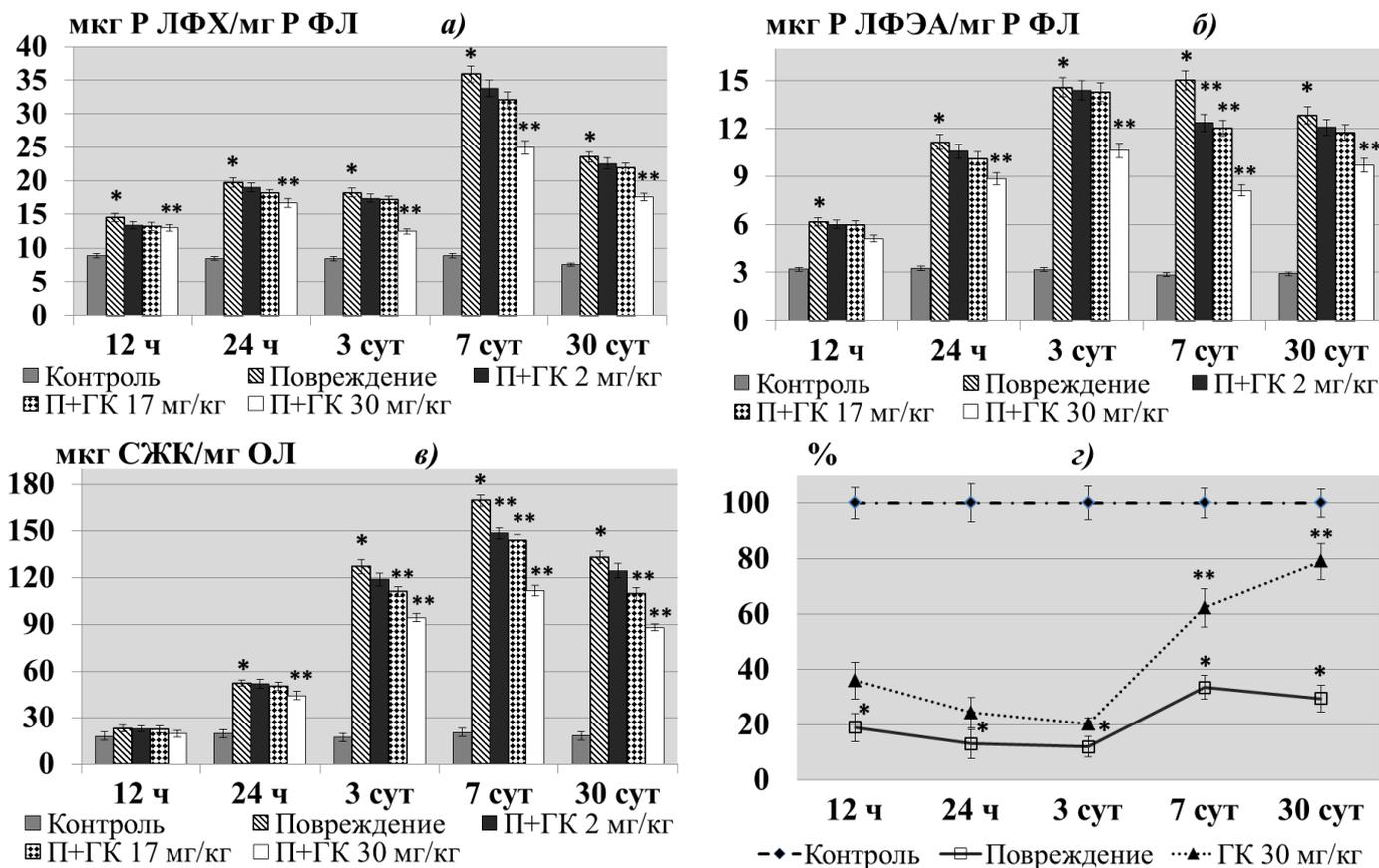


Рисунок 3.17 Влияние гиалуроната калия на изменение содержания лизофосфатидилхолина (а), лизофосфатидилэтанолamina (б), свободных жирных кислот (в) и коэффициента насыщенности во фракции СЖК (г) в дистальном конце седалищного нерва крысы

(*– достоверность отличия по отношению к контролю, $p < 0,05$; **– достоверность отличия по отношению к повреждению, $p < 0,05$)

3.7. Влияние гиалуроната калия на изменение содержания продуктов перекисного окисления липидов в дистальном конце седалищного нерва крысы после его перерезки

При исследовании изменения уровня ДК и МДА в дистальном конце нерва после его перерезки было выявлено увеличение их содержания с максимальным накоплением на 3-и сутки эксперимента. В этом варианте опыта уровень ДК и МДА превысил контрольное значение в 2,7 и 2,8 раза ($p < 0,05$) соответственно. При действии ГК наиболее заметные изменения происходят, начиная с 3-х суток эксперимента и в концентрации препарата 30 мг/кг (рисунок 3.18).

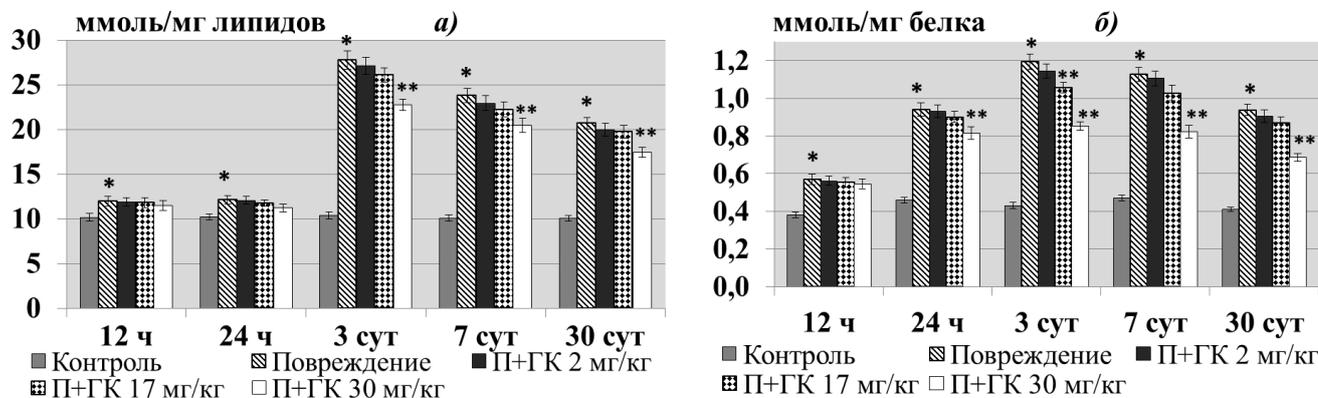


Рисунок 3.18 Динамика изменения концентрации диеновых конъюгатов (а) и малонового диальдегида (б) в дистальном конце седалищного нерва крысы после его повреждения и действия гиалуроната калия (*– достоверность отличия по отношению к контролю, $p < 0,05$;

**– достоверность отличия по отношению к повреждению, $p < 0,05$)

Таким образом, в результате отсутствия механизмов регуляции и контроля в дистальной части нервного проводника начинают протекать реакции цепного характера, что проявляется в накоплении ДАГ и МДА, уровень которых значительно превышает таковой в проксимальном

отрезке поврежденного нерва. Исходя из этого, в дистальном конце нерва из-за отсутствия центральной иннервации стабилизирующее действие гиалуроната калия проявляется в меньшей степени по сравнению с его проксимальным участком.

Глава 4. Исследование изменения физико-химического состояния липидного бислоя при повреждении седалищного нерва крысы и введении гиалуроната калия с помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния

В проведенных нами исследованиях было показано, что повреждение нервного проводника сопровождается изменением жирнокислотного состава и содержания отдельных фосфолипидных фракций, а также интенсификацией окислительных процессов, в результате чего происходит накопление лизофосфолипидов, свободных жирных кислот и продуктов перекисного окисления липидов. Особый интерес вызывает исследование физико-химического состояния липидного бислоя нервного волокна, которое мы оценивали по отношению интенсивностей полос I_{1060}/I_{1088} и I_{1650}/I_{1445} в спектрах, позволяющих судить о конформации и составе ЖК в мембранах нервных волокон (рисунок 4.1). Для создания модели патологии проводили перевязку седалищного нерва крысы.



Рисунок 4.1 Спектр комбинационного рассеяния седалищного нервного волокна крысы в контроле в области 1000 – 1800 см⁻¹

Известно, что отношение интенсивности полос I_{1060}/I_{1088} отражает отношение количества С–С связей жирных кислот в транс-конформации к количеству С–С связей жирных кислот в гош-конформации (Rooney, 1984). Установлено, что минимальное значение данного показателя отмечается к 3-м суткам эксперимента и снижается относительно контроля на 44,4 % ($p < 0,05$). Введение ГК в концентрации 30 мг/кг приводит к увеличению данного показателя на 35,0 % ($p < 0,05$) по сравнению с повреждением через 3 суток после травмы (рисунок 4.2 а). С помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния (КР-спектроскопия) также можно оценить микровязкость липидного бислоя по отношению интенсивностей при 1650 см⁻¹ и 1445 см⁻¹, которое показывает отношение количества С=C связей жирных кислот в цис-конформации к деформационным колебаниям связи С–СН₃ между углеродом полиеновой цепи и углеродом боковой метильной цепи соответственно (Fu *et al.*, 2011). Из рисунка 4.2 б видно, что повреждение нерва сопровождается увеличением исследуемого показателя с максимальным значением на 3-и сутки наблюдения, что свидетельствует о накоплении ненасыщенных ЖК. В этом варианте опыта данный показатель превышает контрольное значение на 67,5 % ($p < 0,05$). Введение ГК в концентрации 30 мг/кг сопровождается снижением исследуемого показателя спустя 3 суток после травмы на 17,8 % ($p < 0,05$) по сравнению с повреждением.

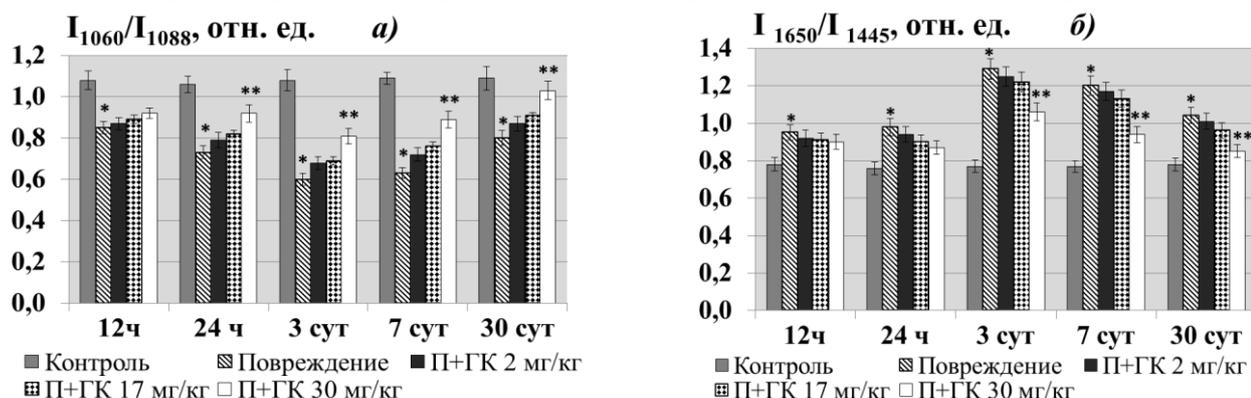


Рисунок 4.2 Изменение отношения интенсивности полос I_{1060}/I_{1088} (а) и I_{1650}/I_{1445} (б) КР-спектра нервного волокна после повреждения и действия ГК (*– достоверность отличия по отношению к контролю, $p < 0,05$; **– достоверность отличия по отношению к повреждению, $p < 0,05$)

Таким образом, с помощью метода КР-спектроскопии было показано, что при повреждении нерва происходит нарушение физико-химического состояния липидного бислоя нервного волокна.

Введение гиалуроната калия способствует восстановлению вязкости липидного компонента соматических нервов.

Глава 5. Изменение активности фосфолипазы A_2 при повреждении седалищного нерва крысы и действии гиалуроната калия

Известно, что изменение вязкости и состава жирных кислот фосфолипидов мембран может быть обусловлено инициацией процессов перекисного окисления липидов (Курашвили, 2003; Ельский и др., 2009; Ревин и др., 2012). Кроме этого, в результате активации ФЛ A_2 увеличивается содержание ненасыщенных жирных кислот, т.к. данный фермент катализирует гидролиз фосфолипидов в основном в *sn-2* положении, характерном для ненасыщенных ЖК (Шарыпова, 2004). Таким образом, учитывая литературные данные (Hornfelt, 1999; Iwanicki, 2010; Nardicchi *et al.*, 2014) и результаты собственных исследований, мы сделали предположение о том, что проявление мембранопротекторных свойств гиалуроната калия реализуется через регуляцию активности мембраносвязанной фосфолипазы A_2 .

В ходе проведенного исследования было установлено, что в контрольных нервах фосфолипазная активность составляет в среднем 19 мкг ЖК/мг белка/час. Максимальное увеличение активности ФЛ A_2 при перевязке седалищного нерва крысы наблюдается к 7-м суткам эксперимента. В этом варианте опыта фосфолипазная активность возрастает в 30,7 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Спустя 30 суток после травмы активность фосфолипазы A_2 снижается в 12,1 раза по сравнению с повреждением, но все еще превышает контрольное значение на 110,1 % ($p < 0,05$). В серии опытов с введением ГК фосфолипазная активность также увеличивалась, но в меньшей степени по сравнению с травмированным нервом без воздействия препарата. Так, на 3-и, 7-е и 30-е сутки эксперимента в серии опытов с ГК в концентрации 30 мг/кг активность ФЛ A_2 снижается относительно повреждения на 53,7; 58,4 и 36,6 % ($p < 0,05$) соответственно (рисунок 5 а).

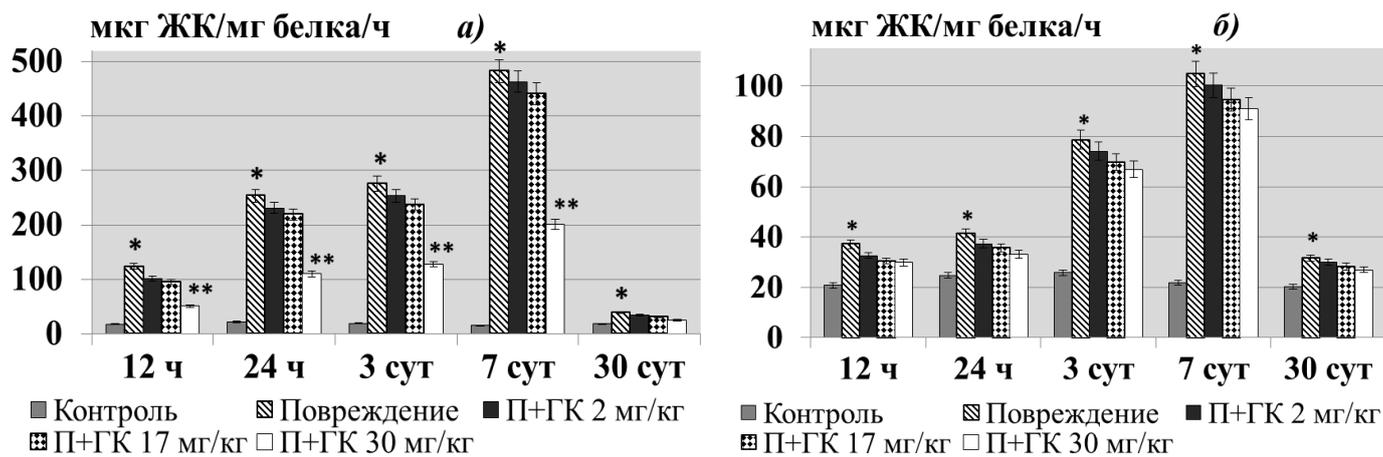


Рисунок 5. Динамика изменения активности фосфолипазы A_2 поврежденного седалищного нерва крысы при его инкубации в Ca^{2+} -содержащей среде (а) и в среде с добавлением ЭГТА (б) (*– достоверность отличия по отношению к контролю, $p < 0,05$; **– достоверность отличия по отношению к повреждению, $p < 0,05$)

Было установлено, что в среде с ЭГТА максимальная фосфолипазная активность в поврежденном седалищном нерве отмечается к 7 суткам наблюдения и составляет 105 мкг ЖК/мг белка/ч. Однако, с увеличением послеоперационных сроков до 30 суток фосфолипазная активность снижается, но все еще незначительно превышает контрольное значение. В группе животных с введением гиалуроната калия достоверного изменения фосфолипазной активности в среде с ЭГТА не наблюдается (рисунок 5 б). Следовательно, в серии опытов с повреждением нервного проводника наблюдается активация как Ca^{2+} -зависимой, так и Ca^{2+} -независимой фосфолипазы A_2 . Это может указывать на функционирование обеих форм фермента в ходе развития дегенерационных процессов. Тем не менее, в варианте опытов с ГК снижение фосфолипазной активности по сравнению с повреждением наблюдалось только в серии опытов с внесением в инкубационную среду ионов Ca^{2+} . В этих же условиях, но в присутствии хелатора ионов Ca^{2+} - ЭГТА, не было выявлено достоверных изменений фосфолипазной активности. Таким образом, результаты наших экспериментов указывают на то, что протекание дегенерационных процессов в нервном проводнике опосредовано функционированием обеих форм фосфолипазы A_2 . Однако, ускорение

регенерационных процессов в поврежденном седалищном нерве на фоне введения гиалуроната калия осуществляется, вероятнее всего, Ca^{2+} -зависимым образом.

Заключение

В представленной работе исследовали роль липидов в процессах проведения возбуждения и регенерации поврежденного нервного волокна крысы. В результате проведенных исследований было установлено, что при переходе нерва из состояния покоя в состояние функциональной активности происходит интенсификация метаболизма фосфоинозитидов, процессов перекисного окисления липидов и активация фосфолипазы A_2 . С помощью дифференциальной сканирующей калориметрии было показано, что изменение метаболизма липидов коррелирует с изменением физико-химического состояния липидного бислоя. Однако наблюдающиеся изменения липидного состава носят кратковременный характер и не приводят к развитию патологических процессов. Травма нерва, вызванная его перерезкой, сопровождается глубокими дегенерационными процессами, что выражается в существенном увеличении содержания ЛФХ, ЛФЭА и СЖК в результате активации фосфолипазы A_2 . Кроме этого, при повреждении седалищного нерва наблюдаются изменения фосфолипидного и ЖК состава, что выражается в увеличении содержания фракций ФС и ФИ и снижении уровня ФЭА, ФХ и СМ относительно контроля. В составе фракций ФС и ФИ происходит увеличение содержания насыщенных и снижение ненасыщенных жирных кислот, в результате чего коэффициент насыщенности возрастает. Во фракциях ФЭА, ФХ и СМ коэффициент насыщенности снижается за счет увеличения содержания ненасыщенных ЖК. Эксперимент показал, что ГК в малых концентрациях практически не влияет на изменение содержания и ЖК состава липидов, как в проксимальном, так и в дистальном отрезке нервного проводника. Существенное восстановление их уровня отмечается при использовании препарата в концентрации 30 мг/кг.

В дистальном конце нерва прослеживается аналогичная динамика, однако, в результате отсутствия центральной иннервации, дегенерационные процессы в этом отрезке нерва носят более выраженный характер, в результате чего стабилизирующий эффект гиалуроната калия в этом варианте опыта проявляется в меньшей степени.

Кроме исследования изменений в составе фосфолипидов и жирных кислот, с помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния и дифференциальной сканирующей калориметрии мы провели оценку физико-химического состояния липидного бислоя нервных волокон. В ходе проведенных экспериментов было показано, что повреждение сопровождается изменением конформации жирных кислот и увеличением суммарного содержания ненасыщенных ЖК, входящих в состав липидов. Как известно, увеличение количества ненасыщенных ЖК приводит к разжижению мембран соматических нервов. Учитывая литературные данные и результаты собственных исследований, мы сделали предположение о том, что проявление мембранопротекторных свойств ГК реализуется через регуляцию активности мембраносвязанной ФЛ A_2 . В результате проведенных экспериментов было установлено, что повреждение седалищного нерва сопровождается увеличением активности как Ca^{2+} -зависимой, так и Ca^{2+} -независимой ФЛ A_2 . Однако снижение фосфолипазной активности при введении ГК наблюдается только в серии опытов в Ca^{2+} -содержащей среде. Достоверного изменения активности Ca^{2+} -независимой фосфолипазы A_2 на фоне действия препарата не происходит. Отсутствие изменения активности Ca^{2+} -независимой фосфолипазы A_2 при введении препарата, вероятнее всего, указывает на то, что она не участвует в механизме регенерации нервной ткани. Таким образом, ускорение регенерационных процессов в поврежденном нервном проводнике при действии гиалуроната калия, вероятнее всего, опосредовано функционированием Ca^{2+} -зависимой ФЛ A_2 .

На основании собственных экспериментальных и литературных данных мы предлагаем схему участия липидов в процессах проведения возбуждения и регенерации поврежденных соматических нервов (рисунок б).

ВЫВОДЫ

1. В ходе проведенных нами экспериментов было установлено, что в липидном компоненте контрольных соматических нервов крысы содержатся ФЭА, ФХ, СМ, ФС, ФИ, ЛФХ, ЛФЭА и ДАГ. При переходе соматических нервов из состояния покоя в состояние функциональной активности интенсифицируется метаболизм фосфоинозитидов, что выражается в накоплении ДАГ и снижении уровня ФИ и СЖК. Изменения количественного содержания СЖК и жирнокислотного состава ФИ и ДАГ взаимосвязаны и коррелируют между собой. При проведении возбуждения возрастает

интенсивность протекания процессов перекисного окисления, что сопровождается накоплением ДК и МДА, а также активацией Ca^{2+} -зависимой фосфолипазы A_2 .

2. При повреждении седалищного нерва крысы наблюдаются изменения фосфолипидного и жирнокислотного состава нервных проводников во фракциях ФС, ФИ, ФЭА, ФХ, СМ и ДАГ. Во фракциях ФЭА, ФХ, СМ и ДАГ отмечается снижение коэффициента насыщенности за счет увеличения содержания ненасыщенных ЖК. Во фракциях ФС и ФИ происходит увеличение коэффициента насыщенности. При этом наблюдается снижение содержания ФЭА, ФХ, СМ и ДАГ и увеличение ФС и ФИ.

3. Показано, что при травме нерва, вызванной его перерезкой, происходит накопление ЛФЛ, СЖК и продуктов перекисного окисления липидов, как в проксимальном, так и в дистальном отрезке нервного проводника.

4. Установлено, что использование гиалуроната калия в концентрации 30 мг/кг подавляет накопление лизофосфолипидов и СЖК, стабилизирует фосфолипидный и ЖК-состав, а также снижает интенсивность образования продуктов ПОЛ, как в проксимальном, так и в дистальном отрезке нервного проводника. Сравнивая глубину изменений в исследуемых участках нерва, следует отметить, что в проксимальном конце нерва они менее выражены, и гиалуронат калия свое стабилизирующее действие на восстановление липидного и жирнокислотного состава оказывает в большей степени именно в этом варианте опыта.

5. С помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния и дифференциальной сканирующей калориметрии выявлено изменение физико-химического состояния бислоя при возбуждении и повреждении соматических нервов крысы. При введении гиалуроната калия наблюдается восстановление микровязкости липидного компонента соматических нервов.

6. Введение гиалуроната калия в концентрации 30 мг/кг приводит к снижению активности Ca^{2+} -зависимой фосфолипазы A_2 и не вызывает достоверных изменений активности Ca^{2+} -независимой фосфолипазы A_2 в седалищном нерве крысы при повреждении. Таким образом, ускорение регенерационных процессов в поврежденном нервном проводнике при действии гиалуроната калия, вероятнее всего, опосредовано функционированием Ca^{2+} -зависимой фосфолипазы A_2 .

7. Обобщая данные литературы и результаты собственных исследований, можно утверждать, что повреждение нерва сопровождается глубокими изменениями в липидном компоненте соматических нервов, и гиалуроновая кислота является одним из факторов, вызывающих восстановление состава и состояния липидов исследуемых возбудимых образований.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Исакина М.В. Исследование влияния гиалуронидазы на изменение липидного состава поврежденных периферических нервов / М.В. Исакина, Э.С. Ревина, В.А. Плисов, Н.В. Ревина // Вестник Воронежского государственного университета, Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2014. – №4. – С. 57–62.

2. 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. – Vol. 7, №2. – P. 1–4.

3. Revin V.V. Influence of potassium hyaluronate on the change of phospholipase activity and state of the membranes of damaged somatic nerves of rats / V.V. Revin, M.V. Isakina, S.I. Pinyaev, N.V. Revina, A.A. Morozova // *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. – 2015. – Vol. 6, №4. – P. 512–520.

4. Исакина М.В. Изучение фосфолипидного состава поврежденных периферических нервов крысы под действием гиалуронозой кислоты / М.В. Исакина, Л.А. Дерова, Ю.Р. Файзулова, А.А. Чиндяйкина, Н.В. Кочеткова, В.В. Ревин // Сборник трудов биологического факультета МГУ им. Н.П. Огарева. – Саранск: Типография ООО «Мордовия – Экспо», 2011. – С. 13–15.

5. Исакина М.В. Действие гиалуронозой кислоты на состав и перекисное окисление липидов при патологии периферических нервов / М.В. Исакина, Н.В. Кочеткова, В.В. Ревин // Актуальные научные вопросы: реальность и перспективы: сборник научных трудов по материалам Международной заочной научно-практической конференции 26 декабря 2011 г.: в 7 частях. Часть 6. – Тамбов: Изд-во ТРОО «Бизнес-Наука-Общество», 2012. – С. 65–66.

6. Исакина М.В. Исследование действия гиалуронозой кислоты на жирнокислотный состав липидов седалищного нерва крысы после его перерезки / М.В. Исакина, Н.В. Кочеткова,

А.Л. Потняева, Ю.А. Уханова, Д.В. Токарев, В.В. Ревин // Достижения и перспективы развития биотехнологии: Материалы международной научной конференции. – Саранск: Типография ООО «ЭМ-ПРИНТ», 2012. – С. 120–121.

7. **Исакина М.В.** Влияние гиалуроновой кислоты на состав и перекисное окисление липидов при перерезке седалищного нерва крысы / **М.В. Исакина**, Н.В. Кочеткова, А.Л. Потняева, Ю.А. Уханова, Д.В. Токарев, В.В. Ревин // Достижения и перспективы развития биотехнологии: Материалы международной научной конференции. – Саранск: Типография ООО «ЭМ-ПРИНТ», 2012. – С. 121–122.

8. **Исакина М.В.** Процессы дегенерации и посттравматической регенерации периферических нервов после фармакологической коррекции: современное состояние проблемы / **М.В. Исакина**, В.В. Ревин // XL Огарёвские чтения: материалы научной конференции: в 3 ч. Ч.2: Естественные науки. – Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2012. – С. 122–127.

9. **Исакина М.В.** Влияние гиалуроновой кислоты на липидный состав поврежденных соматических нервов крысы / **М.В. Исакина**, Н.В. Кочеткова, А.Л. Потняева, Ю.А. Уханова, Д.В. Токарев, В.В. Ревин // IV Съезд биофизиков России. Симпозиум II «Физические основы физиологических процессов». Материалы докладов. – Нижний Новгород, 2012. – С. 61.

10. **Исакина М.В.** Исследование липидного состава нерва при механическом повреждении / **М.В. Исакина**, Н.В. Орлова, А.Л. Потняева, В.В. Ревин // Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии. IV Международная научная Интернет-конференция. в 2 т. Т.1. – Казань: ИП Синяев Д.Н., 2013. – С. 102–103.

11. **Исакина М.В.** Действие гиалуроновой кислоты на регенерационные процессы поврежденных периферических нервов / **М.В. Исакина**, Н.В. Кочеткова, А.Л. Потняева, Ю.А. Уханова, Д.В. Токарев, В.В. Ревин // XLI Огарёвские чтения: материалы научной конференции: в 3 ч. ч.2: Естественные науки. – Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2013. – С. 213–216.

12. **Исакина М.В.** Влияние гиалуроната калия на регенерацию периферических нервов / **М.В. Исакина**, Н.В. Орлова, А.Л. Потняева, В.В. Ревин // Материалы XVII научно-практической конференции молодых ученых, аспирантов и студентов национального исследовательского мордовского государственного университета им. Н. П. Огарёва: в 3 ч. ч.1: Естественные науки. – Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2013. – С. 74–78.

13. **Исакина М.В.** Исследование действия гиалуроната калия на изменение содержания отдельных фосфолипидных фракций при повреждении соматических нервов / **М.В. Исакина**, В.В. Ревин // Материалы XVIII научно-практической конференции молодых учёных, аспирантов и студентов национального исследовательского мордовского государственного университета им. Н. П. Огарёва: в 3 ч. Ч.2: Естественные науки. – Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2014. – С. 53–57.

14. **Исакина М.В.** Изменение фосфолипидной активности и содержания лизофосфолипидов при повреждении соматических нервов крысы / **М.В. Исакина**, В.В. Ревин // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: Междунар. науч. конф. в 2 ч. Ч.1. – Минск: Изд. центр. БГУ, 2014. – С. 206–208.

15. **Исакина М.В.** Влияние гиалуроната калия на состав фосфолипидов в проксимальном конце нерва после его повреждения / **М.В. Исакина**, В.В. Ревин // Материалы всероссийской научной конференции с международным участием «Перспективы развития химических и биологических технологий в 21-м веке». – Саранск: Типография ООО «Референт», 2015. – С. 177–181.

16. **Исакина М.В.** Изменение фосфолипидного состава в дистальном конце нерва при введении гиалуроната калия / **М.В. Исакина**, В.В. Ревин // Материалы всероссийской научной конференции с международным участием «Перспективы развития химических и биологических технологий в 21-м веке». – Саранск: Типография ООО «Референт», 2015. – С. 178–185.

17. **Исакина М.В.** Влияние гиалуронидазы на изменение липидного состава и состояние мембран соматических нервов крысы при повреждении / **М.В. Исакина**, Э.С. Ревина, В.В. Ревин // V Съезд биофизиков России. Материалы докладов: в 2 т. – Ростов-на-Дону: Изд-во Южного федерального университета, 2015. – С. 355.

18. **Исакина М.В.** Влияние гиалуроната калия на изменение липидного состава в проксимальном и дистальном отрезках нервного проводника / **М.В. Исакина**, Н.В. Ревина, В.В. Ревин // V Съезд биофизиков России. – Ростов-на-Дону: Изд-во Южного федерального университета, 2015. – С. 356.

Статьи № 1, 2, 3 опубликованы в научных изданиях, состоящих в списке журналов, рекомендованных ВАК РФ и базе данных Scopus.

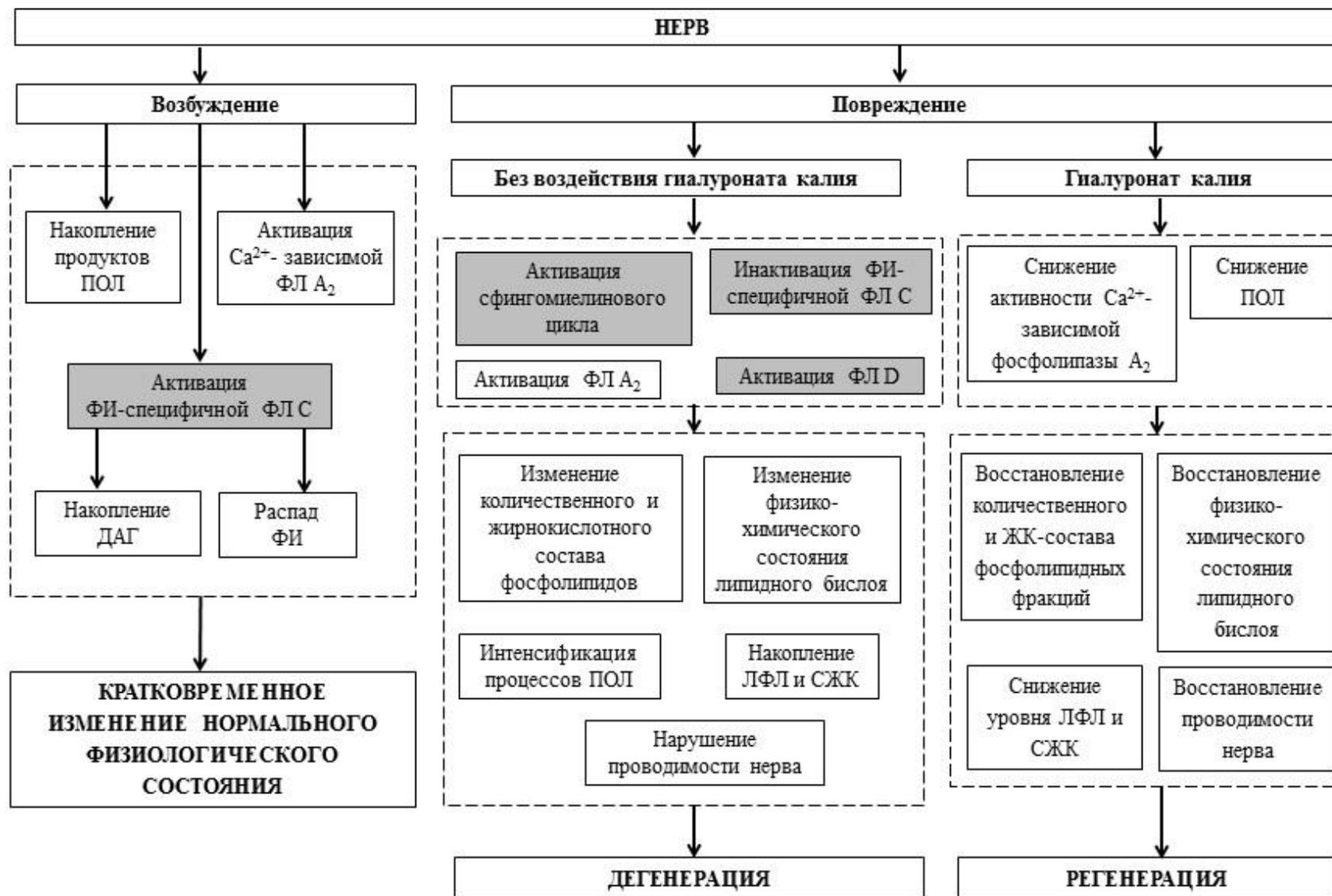


Рисунок 6. Схема участия липидов в процессах проведения возбуждения и регенерации поврежденных соматических нервов по данным литературы (серый фон) и результатам собственных исследований (белый фон): ДАГ – диацилглицерин; ЖК-состав – жирнокислотный состав; ЛФЛ – лизофосфолипиды; ПОЛ – перекисное окисление липидов; СЖК – свободные жирные кислоты; ФИ – фосфатидилинозитол; ФИ-специфичная ФЛ C – фосфоинозитид-специфичная фосфолипаза C; ФЛ D – фосфолипаза D; ФЛ A₂ – фосфолипаза A₂.