На правах рукописи

Пиняев Сергей Иванович

ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА И СОСТОЯНИЯ ЛИПИДОВ, БЕЛКОВ И АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ ПРИ ВОЗБУЖДЕНИИ И ДЕЙСТВИИ РЕСВЕРАТРОЛА НА РЕГЕНЕРАЦИЮ ПОВРЕЖДЕННЫХ СОМАТИЧЕСКИХ НЕРВОВ

Специальность 03.01.02 – Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Воронеж-2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва» (ФГБОУ ВО «НИ МГУ им. Н. П. Огарёва»)

Научный руководитель:	доктор биологических наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ **Ревин Виктор Васильевич**
Официальные оппоненты:	**Сурин Александр Михайлович** доктор биологических наук, ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей», лаборатория нейробиологии и основ развития мозга, заведующий **Митрошина Елена Владимировна** кандидат биологических наук, ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского», кафедра нейротехнологий, старший преподаватель
Ведущая организация:	ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова»

Защита диссертации состоится «___» _____ 20___ года в _____на заседании диссертационного совета Д.212.038.03 при Воронежском государственном университете по адресу: 394018, 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 « » _____2020 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук Грабович Маргарита Юрьевна

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Процесс возникновения и распространения электрического импульса по нервным проводникам является универсальным процессом, лежащим в основе жизнедеятельности организмов, где ключевую роль играют не только перераспределение различных ионов, но и ряд физико-химических процессов, основными участниками которых являются белки и липиды.

Исследования в этой области проводятся в двух направлениях. Выявляют молекулярные механизмы управления работой ионных каналов (Вислобоков и др., 2007; Chang J. T. et al., 2018; del Rocío Cantero M. et al., 2018) и вопросы участия липидов и белков, двух основных компонентов соматических нервов в процессе проведения возбуждения по нервному волокну (Aguilella V. M. et al., 2014; Ревин В. В. и др. 2012). Малоизученным является вопрос о взаимосвязи изменений состояния и состава мембраны нервных проводников в условиях проведения возбуждения.

Еще одной из важнейших задач современной науки является изучение механизмов лежащих в основе патологических нарушений, возникающих при повреждении нервных волокон, а также стимуляции процессов регенерации соматических нервов (Иванов А.Н. и др., 2017; Шаницын И. Н. и др., 2017). В настоящее время для ускорения процессов восстановления функциональных характеристик нервных проводников используют различные подходы: электрическая стимуляция (Горшков Р. П. и др., 2007), применение кондуитов (Николаев С. И. и др., 2014), сшивание концов рассечённого нерва (Li R. et al., 2014) и применение фармакологических препаратов (Храпай Е. В. И др., 2010; Revin V. V. et al. 2015; Isakina M. V. et al., 2015)

В настоящее время одним из перспективных направлений является использование физиологически активных соединений в качестве фактора, стимулирующего регенерационные процессы, и одним из таких соединений является ресвератрол (РСВ). Эффекты ресвератрола были отнесены к его способности снижать последствия окислительного стресса. Биоактивные фенолы, такие как РСВ, могут инактивировать АФК и таким образом помогают избежать последствий окислительных повреждений (Kaindl et. al., 2008). РСВ, модулируя передачу клеточного сигнала, стимулирует образование новых белков: сигнальный путь PTEN/Akt усиливая работу антиоксидантных генов стимулирует образование супероксиддисмутаз (Inglés M. et al.,2014), сигнальный путь NF-kB транскрипцию каталаз и пероксидаз (Taguchi K. et. al., 2011).

Исходя из вышеизложенного, можно заключить, что для понимания механизмов проведения возбуждения и процессов, происходящих при повреждении нервных проводников необходимо провести комплексное исследование состава и состояния основных компонентов - липидов и белков. Также представляло интерес изучение регуляторной роли физиологически активных соединений на регенерационные процессы в соматических нервах, протекающие как в липидной фазе, так и в составе белкового компонента.

Цель и задачи исследования. Целью настоящего исследования было изучение состава и состояния липидов, белков и активности антиоксидантных ферментов при проведении возбуждения и повреждении соматических нервов, а также оценить влияние РСВ на регенерационные процессы в нерве. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Исследовать состав и состояние фосфолипидов в покое и при проведении возбуждения.
2. Изучить состав фосфолипидов и жирных кислот в проксимальном и дистальном участках соматических нервов при травме.
3. Изучить интенсивность протекания окислительных процессов и активность антиоксидантных ферментов при повреждении нерва.
4. Провести анализ фазовых состояний липидного компонента соматических нервов при повреждении.
5. Изучить количественный и качественный состав миелин-специфических белков в норме и при повреждении периферических нервов.

6. Исследовать влияние физиологически активного соединения ресвератрола на состав и состояние липидов, белков и интенсивность протекания процессов ПОЛ при повреждении соматических нервов и оценить его вклад в процесс восстановления нервных проводников.

Новизна и научно-практическая ценность исследования. В ходе данного исследования впервые проведен комплексный анализ по участию белков и липидов в регенерации поврежденных периферических нервов и влияния на эти процессы биологически активного вещества ресвератрола. Полученные результаты имеют теоретическую и практическую ценность в вопросах понимания фундаментальных процессов, лежащих в основе функционирования нервных проводников при проведении по ним возбуждения. Подробное изучение состава основных компонентов нервных проводников позволяет глубже понять процессы, которые происходят при повреждении соматических нервов и, особенно, в начальный период развития патологии. Полученные результаты могут быть использованы в практической медицине. Впервые показано, что использование ресвератрола способствует восстановлению отдельных фракций фосфолипидов и миелин-специфических белков в поврежденном периферическом нерве. Методами дифференциальной сканирующей калориметрии и спектроскопии комбинационного рассеяния показаны изменения физико-химического состояния бислоя липидов при проведении возбуждения и травме нерва. Ускорение процессов регенерации в поврежденном нервном стволе при влиянии РСВ вероятнее всего опосредовано функционированием антиоксидантных ферментов.

Апробация диссертации. Результаты диссертационного исследования были продемонстрированы для обсуждения на III Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы медико-биологических дисциплин» (Саранск, 22-23 мая 2014 г.), на всероссийской научной конференции «Перспективы развития химических и биологических технологий в 21-м веке» (Саранск, 23-25 сентября 2015 г.), на научной конференции XLIV Огаревские чтения (Саранск, 08-15 декабря 2015 г.), на XVIII, XX научных конференциях молодых ученых, аспирантов и студентов МГУ им. Н. П. Огарёва (Саранск, 2014, 2016 г.), на V, VI съезде биофизиков России (Ростов-на-Дону, 4-9 октября 2015 г., Сочи, 16-22 сентября 2019 г.), на V Съезде физиологов СНГ, V Съезде биохимиков России, Конференции ADFLIM (Сочи – Дагомыс, Россия 4–8 октября 2016г.), на Европейском биотехнологическом конгрессе EBTNA (Рига, Латвия 5–7 мая 2016 г., Афины, Греция 26-28 апреля 2018 г., Валенсия, Испания 11-13 апреля 2019 г.)

Публикации. Автором было опубликовано 16 публикаций, в том числе в журналах рекомендованных ВАК РФ – 1, в рецензируемых журналах, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования Web of Science и Scopus -5.

Положения, выносимые на защиту:

1) Проведение возбуждения приводит к изменению состава и состояния липидов седалищного нерва, а именно, снижается количество ФИ и ФЭА, а также происходит изменение температуры фазового перехода липидов.

2) При травме седалищного нерва крысы происходят количественные изменения во фракциях фосфолипидов, жирных кислот и миелин-специфических белков, как в проксимальном, так и в дистальном участках нерва.

3) В обоих концах поврежденного нерва крысы после его перерезки происходит изменение активности антиоксидантных ферментов и накопление первичных и вторичных продуктов перекисного окисления липидов.

4) Наиболее выраженные дегенерационные процессы происходят в дистальном отрезке поврежденного нерва, а ресвератрол свое стабилизирующее действие на восстановление содержания жирнокислотного состава липидного компонента и фракцию миелин-специфических белков в значительной степени проявляет в проксимальном конце соматического нерва по сравнению с его дистальным участком за счет сохранения там центральной иннервации.

5) Ресвератрол стимулирует процессы регенерации в поврежденных соматических нервах, что подтверждается данными о восстановлении упорядоченности липидного компонента мембраны и ее физико-химического состояния.

6) Одним из механизмов проявления мембрано- и нейропротекторных свойств ресвератрола является снижение окислительных процессов, как за счет инактивации свободных радикалов, так и на уровне регуляции активности антиоксидантных ферментов.

Объем и структура диссертации. Работа состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, выводы, списка использованной литературы. Работа изложена на 117 страницах машинописного текста. Библиографический указатель содержит 216 источников литературы.

Благодарность. Автор выражает искреннюю признательность и благодарность научному руководителю, доктору биологических наук, профессору Ревину Виктору Васильевичу за неоценимую помощь в работе, полезные советы и поддержку на протяжении всех этапов исследования, а также коллективу кафедры биотехнологии, биоинженерии и биохимии МГУ им. Н. П. Огарёва за ценные комментарии и замечания.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили белые крысы самцы линии *Wistar*, массой 250–300 г. Животные были получены из вивария ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарева». Материалом исследования были седалищные нервы.

Крысы содержались в условиях вивария в индивидуальных клетках на 12 ч. режиме день/ночь. Кормление осуществлялось *ad libitum*, в первой половине дня. Все животные были разделены на 6 экспериментальных групп. В 1-ой экспериментальной группе были животные без повреждения седалищного нерва (интактные), (n=10). Седалищные нервы 2-ой экспериментальной группы использовались для раздражения электрическими импульсами (n=10). У животных 3-ой экспериментальной группы осуществлялась перерезка (нейротмезис) седалищного нерва для создания модели патологического процесса, (n=30). Животным 4 (n=30), 5 (n=30) и 6-ой (n=30) экспериментальных групп, наряду с перерезкой седалищного нерва, ежедневно вводился в место повреждения в объеме 100 мкл ресвератрол (Shaanxi Honghao Bio-Tech Inc, Китай), а именно, в широкую медиальную мышцу бедра в концентрации 0,1 М, 1 мМ и 10 мкМ соответственно. Животные выводились из эксперимента через 1 ч. 7 и 30 суток.

Препарированные седалищные нервы крысы помещались в раствор Рингера для теплокровных животных с температурой 37°С и постоянным продуванием кислорода. Для дальнейшего исследования брались нервные волокна, которые давали четкие потенциалы действия при внеклеточном отведении со следующими параметрами стимуляции: амплитуда 1,5 В, длительность 0,3 мс, частота раздражения 100 имп/с (Ревин В. В., 1990). Стимуляцию осуществляли электрическими импульсами от стимулятора ЭСЛ-2. Потенциал действия наблюдали на экране осциллографа С1-83.

Экстракцию липидов из нервной ткани проводили по методу Блайя-Дайера (Bligh E. et. al., 1959). Для изучения фракции фосфолипидов (ФЛ) использовался метод ВЭТСХ в системе следующих растворителей: хлороформ/метанол/вода/аммиак (60/34/4/2) и хлороформ/метанол/ледяная уксусная кислота/вода (60/50/1/4). Идентификацию липидных фракций проводили с использованием специфических реагентов (Supelco, США). Количественное определение фосфолипидов осуществляли денситометрическим методом на автоматизированном комплексе CAMAG TLC Scanner 4 (Швейцария). Содержание ФЛ выражали отношением неорганического фосфора индивидуальных ФЛ фракций к суммарному неорганическому фосфору всех ФЛ фракций. Для анализа жирнокислотного состава отдельных липидных фракций проводили *метилирование жирных кислот (ЖК) по методу Моррисона и Смита* (Morrison et.al., 1964). Разделение метиловых эфиров ЖК проводили на газовом хроматографе SHIMADZU GC-2010Plus AF (Япония).

Определение температуры фазового перехода липидов проводили с помощью дифференциального сканирующего калориметра Модуль DSC822e (Швейцария).

Фракцию миелина получали методом Нортона и Подусло (Norton et. al., 1973) с помощью дифференциального центрифугирования в градиенте сахарозы.

Содержание общего белка и белка фракции миелин-специфических белков определяли по методу Лоури (Lowry et. al., 1951).

Электрофоретическое разделение белков (Laemmli, 1970) происходило с использованием 15% полиакриламидного геля. Для оценки молекулярной массы использовали маркеры Kaleidoscope Prestained Standards (199-15 кДа) фирмы Bio-Rad.

Активность супероксиддисмутазы (СОД) измеряли по снижению скорости восстановления n-нитротетразолиевого синего в ксантин-ксантиноксидазной системе при 550 нм (25°С). (Beauchamp et. al., 1971)

Содержание ТБК-активных продуктов (малоновый диальдегид) определяли по методу (Uchiyama et al., 1978), а *определение суммарной пероксидазной активности* осуществляли пероксидазным методом (Лукаш и др.,1996), *концентрацию ДК определяли спектрофотометрическим* методом. *Активность каталазы* определяли в реакции с перекисью водорода по снижению величины поглощения при 240 нм (Aebi H., 1984) Все измерения проводились на спектрофотометре UV -3600 фирмы SHIMADZU (Япония).

Исследование конформации молекул было проведено на спектрометре in Via Raman Microscope фирмы Renishaw (Англия). Оцифровка спектров, производилась в программе OriginPro7.0 (OriginLab Corporation, США) (Rodionova N. N. et al. 2014).

Статистическая обработка данных. Опыты проводили в минимум десятикратных биологических повторах, аналитическая повторность-трехкратная. Результаты анализировали с использованием t-критерия Стъюдента, Достоверно различающимися считали значения при $p \leq 0,05$.

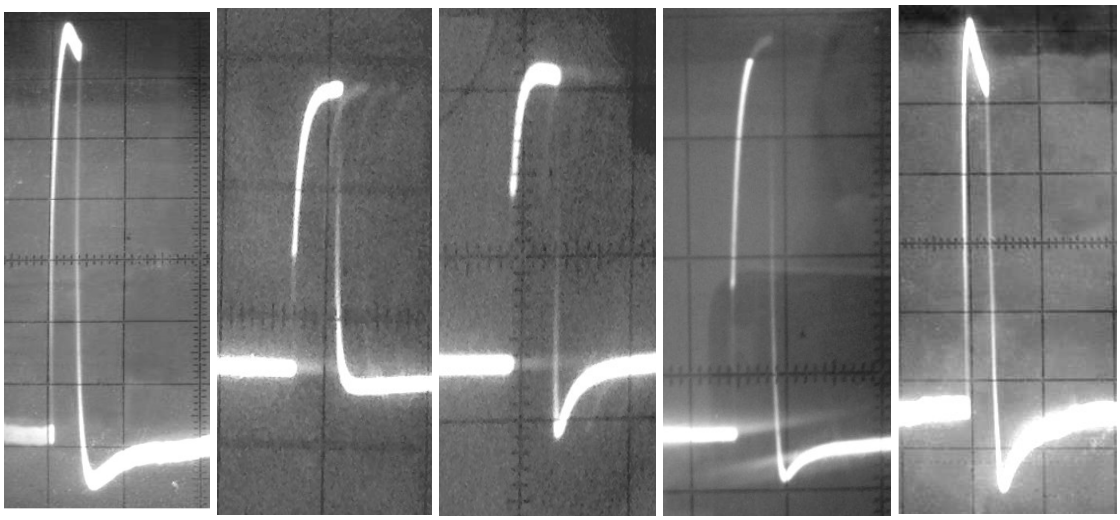
ИЗМЕНЕНИЕ ФОСФОЛИПИДНОГО СОСТАВА ПРОКСИМАЛЬНОГО И ДИСТАЛЬНОГО КОНЦОВ НЕРВА ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ВОЗБУЖДЕНИЯ, ПОСЛЕ ТРАВМЫ И ДЕЙСТВИЯ РЕСВЕРАТРОЛА

Основной оценкой функциональной активности соматических нервов является их способность проводить возбуждение. Для этого мы проводили регистрацию потенциала действия, как в контрольных сериях опыта, так и при перерезке нерва.

Нервные волокна не могут существовать вне связи с телом нейрона: механическая травма нерва ведет к гибели только тех волокон, которые оказались отделенными от тела клеток. У теплокровных животных уже через 2–3 суток после перерезки нерва дистальный его отросток полностью теряет способность к проведению нервных импульсов, а проксимальный отрезок восстанавливает способность проводить потенциал действия после 7 суток эксперимента и неполное восстановление проводимости происходит к 30 суткам эксперимента, что мы и продемонстрировали (рис. 1 а, б, г).

В серии опыта с РСВ в концентрации 0,1М мы наблюдали наиболее выраженное модулирующее действие препарата. Это подтверждается восстановлением функциональной активности нервного волокна на фоне влияния препарата в проксимальном конце на 7 сутки опыта (рис. 1 в), а к 30 суткам потенциал действия практически достигает контрольных значений (рис. 1 д).

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., 2006; Revin et. al., 2015). Исходя из этого, с помощью ВЭТСХ мы исследовали изменение липидного состава в нерве крысы при возбуждении, повреждении и действии РСВ.



а) б) в) г) д)

Интактный нерв (а); проксимальный конец нерва через 7 суток после перерезки (б); проксимальный конец нерва через 7 суток после перерезки и ведения ресвератрола в концентрации 0,1 М (в); проксимальный конец нерва через 30 суток после перерезки (г) проксимальный конец нерва через 30 суток после перерезки и введения ресвератрола в концентрации 0,1 М (д)

Рисунок 1 – Потенциал действия седалищного нерва крысы.

В ходе эксперимента в норме были обнаружены следующие индивидуальные фракции ФЛ: фосфатидилэтаноламин (ФЭА), фосфатидилхолин (ФХ), сфингомиелин (СМ), фосфатидилсерин (ФС), фосфоинозитиды (ФИ) (рис. 2).

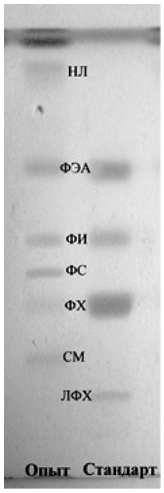
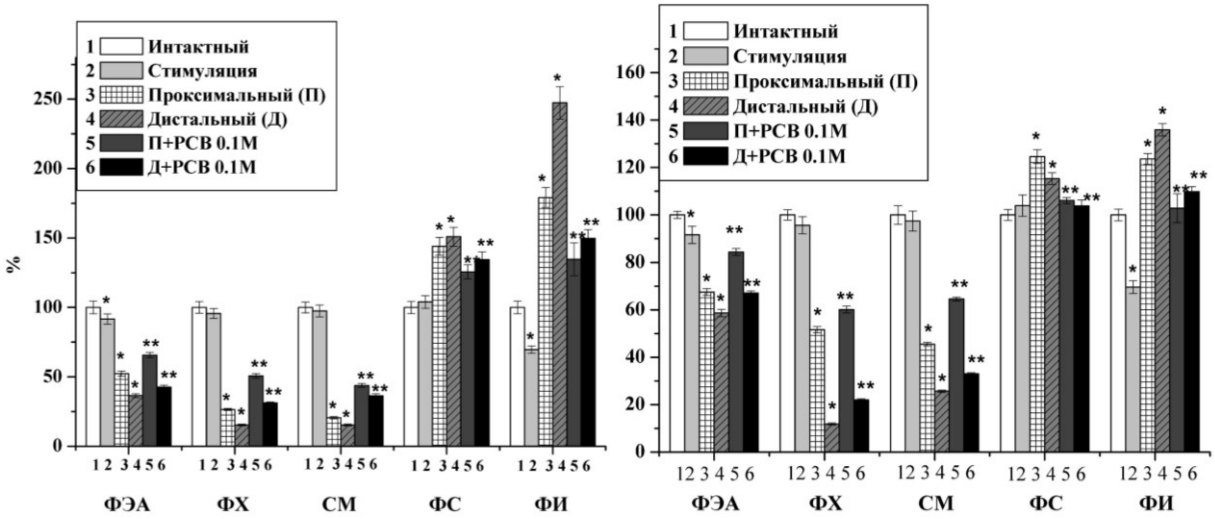


Рисунок 2 – Хроматограма фосфолипидов, выделенных из интактного нерва крысы

При количественном определении индивидуальных фосфолипидов установлено, что содержание фосфатидилэтаноламина (ФЭА) в интактном нерве 1-ой экспериментальной группы животных составило 222,3±2,5 мкг Р ФЭА /мг Р ФЛ, фосфатидилхолина (ФХ) – 107,4±2,4 мкг Р ФХ/мг Р ФЛ, фосфатидилсерина (ФС)– 121,1±3,3 мкг Р ФС/мг Р ФЛ, сфингомиелина (СМ)– 137,2±3,4 мкг Р СМ /мг Р ФЛ, фосфоинозитидов (ФИ) 56,5±1,1 мкг Р ФИ/мг Р ФЛ (рис. 3).

При электрической стимуляции нерва с частотой 100 имп/с длительностью 5 минут наблюдалось уменьшение содержания во фракциях ФИ и ФЭА на 30,3 и 8,4 % соответственно. В остальных изучаемых фракциях достоверных изменений не обнаружено.

В ходе дальнейшего проведения эксперимента нами получено, что в проксимальном участке наблюдается максимальное снижение содержания ФЛ во фракциях ФЭА, ФХ и СМ на 7 сутки на 43,7%, 58,2% и 79 % соответственно, по сравнению с интактной группой (рис. 3). В дистальном участке максимальное снижение так же наблюдалось на 7 сутки во фракциях ФЭА, ФХ и СМ на 61,9%, 81,3% и 84,2% соответственно, по сравнению с интактной группой. Травма седалищного нерва приводит к увеличению содержания ФС и ФИ на всем протяжении эксперимента, максимальное увеличение наблюдается на 7 сутки в дистальном отрезке на 51,2% и 89,7% соответственно, по сравнению с интактной группой (рис. 3 а).



а б

Рисунок 3 – Динамика изменения количества индивидуальных липидных фракций седалищного нерва крысы в проксимальном и дистальном участках после его повреждения и действия ресвератрола: а- 7 суток после травмы, б-30 суток после травмы (*– достоверность отличия по отношению к интактной группе, p <0,05; **– достоверность отличия по отношению к повреждению, p <0,05)

В следующей серии экспериментов нами было изучено действие РСВ на изменение липидного состава. Установлено, что с увеличением посттравматического периода до 7 суток и при действии РСВ в концентрации 0,1 М. наблюдается достоверное увеличение содержания липидов во фракциях ФЭА, ФХ и СМ в проксимальном конце нерва на 26 %, 56,5% и в 1,1 раз соответственно по сравнению с повреждением, но без действия препарата. В дистальном отрезке нервного проводника уровень ФЭА, ФХ и СМ возрастает на 20,9%, 98% и 63,3 % соответственно по сравнению с перерезкой. В этом варианте опыта содержание ФС и ФИ снижается на 12,8 и 22,7 % соответственно в проксимальном конце нерва по сравнению с повреждением. В дистальном отрезке седалищного нерва крысы при введении РСВ в концентрации 0,1 М содержание ФС и ФИ снижается на 11,2 и 16,9 % относительно серии опытов с повреждением (рис. 3 а). С увеличением послеоперационных сроков до 30 суток и при влиянии РСВ обнаружено увеличение концентрации липидов во фракциях ФЭА, ФХ и СМ в проксимальном конце нерва на 20,9 %, 16,1% и 42% соответственно по сравнению с повреждением. В дистальном конце нервного волокна уровень ФЭА, ФХ и СМ возрастает на 14,4%, 83% и 28,6 % соответственно по сравнению с перерезкой. Что касается количества ФС и ФИ, получено, что их содержание снижается на 14,8 и 16,9 % соответственно, в проксимальном конце нерва по сравнению с повреждением. В дистальном отрезке седалищного нерва крысы при введении РСВ в концентрации 0,1 М содержание ФС и ФИ снижается на 10 % и 19,2 % относительно серии опытов с повреждением, но без препарата (рис. 3 б).

Таким образом, проведенные нами исследования демонстрируют, что электрическое раздражение нерва приводит к изменению наиболее лабильных фракций фосфолипидного состава нерва ФИ и ФЭА, травма периферического нерва, а именно его перерезка, также сопутствует количественному изменению индивидуальных фракций ФЛ. В проксимальном отделе нерва наблюдается увеличение фракции ФС и ФИ и снижение ФЭА, ФХ и СМ, а в дистальном отделе показана аналогичная динамика, но с более выраженными изменениями, чем в проксимальном. Это свидетельствует о том, что исчезновение центральной иннервации, а также нарушение аксонального транспорта ускоряют скорость дегенерационных процессов в соматических нервах (Архипова С. С, и др., 2009).

ВЛИЯНИЕ РЕСВЕРАТРОЛА НА ИЗМЕНЕНИЕ ЖИРНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ФОСФОЛИПИДОВ ПОВРЕЖДЕННОГО НЕРВА

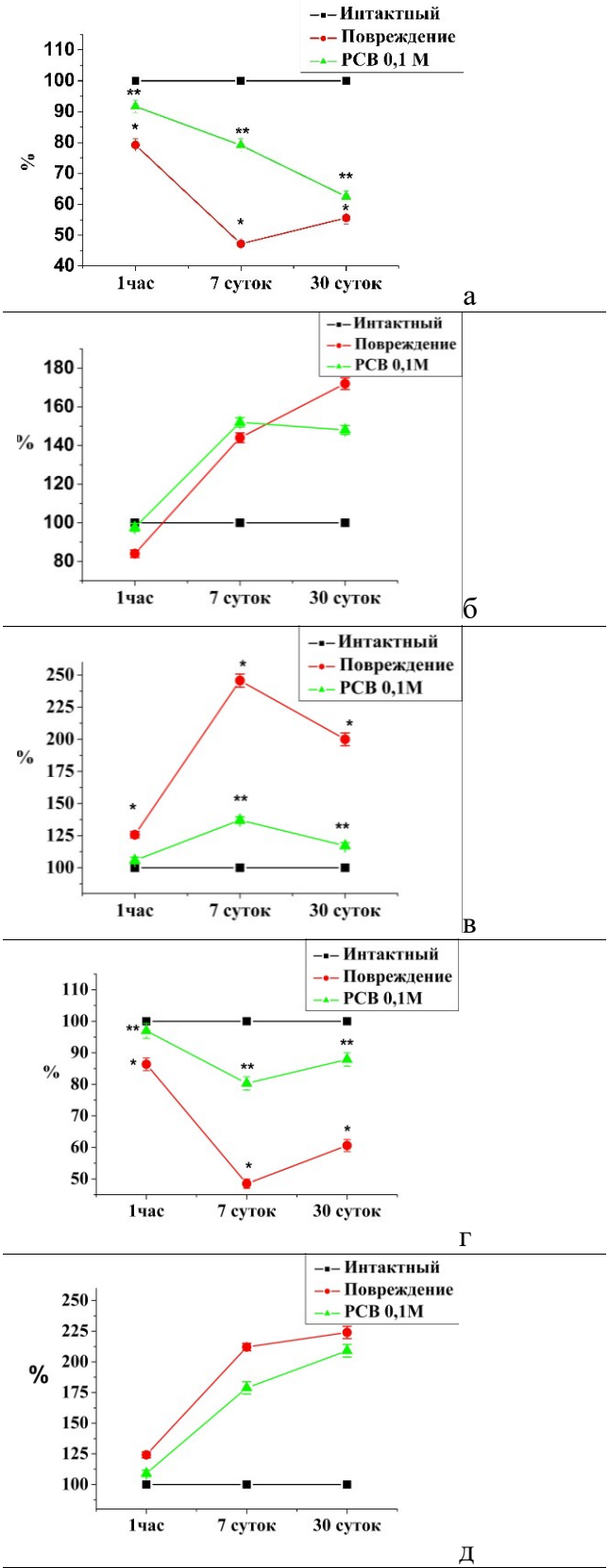


Рисунок 4 –Изменение коэффициента насыщенности ЖК в проксимальном конце после травмы нерва и действия ресвератрола: а-ФЭА; б-ФХ; в-ФС; г-СМ; д-ФИ (*– достоверность отличия по отношению к интактной группе, p<0,05; **– достоверность отличия по отношению к повреждению, p<0,05)

Известно, что характеристика жирнокислотного состава фосфолипидов нерва является одним из важнейших показателей его функционального состояния, определяет фазовые состояния липидного бислоя. В связи с этим, представляло определенный интерес изучить количественное распределение жирных кислот (ЖК), входящих в состав индивидуальных фосфолипидных фракций.

В составе фракций жирных кислот липидов были выделены и идентифицированы следующие ЖК: декановая (10:0), гендекановая (11:0), лауриновая (12:0), тридекановая (13:0), миристиновая (14:0), миристоолеиновая (14:1), пентадекановая (15:0), цис-10-пентадекановая (15:1), пальмитиновая (16:0), пальмитолеиновая (16:1), стеариновая (18:0), элаидиновая (18:1n9t), олеиновая (18:1n9c), линолевая (18:2n6c), линоленовая (18:3n3), арахиновая (20:0), цис-11,14-эйкозадиеновая (20:2), цис-8,11,14-эйкозатриеновая (20:3n3), арахидоновая (20:4n6), цис-13, 16-докозадиеновая (22:2), лигноцериновая (24:0) (рис. 3.4). Обнаруженные ЖК различным образом распределялись в липидах, формируя индивидуальные соотношения насыщенных и ненасыщенных ЖК.

Для оценки распределения и динамики жирных кислот в составе индивидуальных липидных фракций мы рассчитывали коэффициент насыщенности. ЖК состав после повреждения нерва в проксимальном конце подвергается существенным изменениям. Так на 7 сутки в проксимальном отрезке наблюдается снижение количества насыщенных ЖК и увеличение ненасыщенных во фракциях ФЭА и СМ, в результате этого снижается коэффициент насыщенности. Во фракциях ФИ, ФХ и ФС наблюдается противоположная тенденция, коэффициент насыщенности увеличивается, за счет увеличения количества насыщенных жирных кислот, таких как пальмитиновая и стеариновая (рис. 4 а-д).

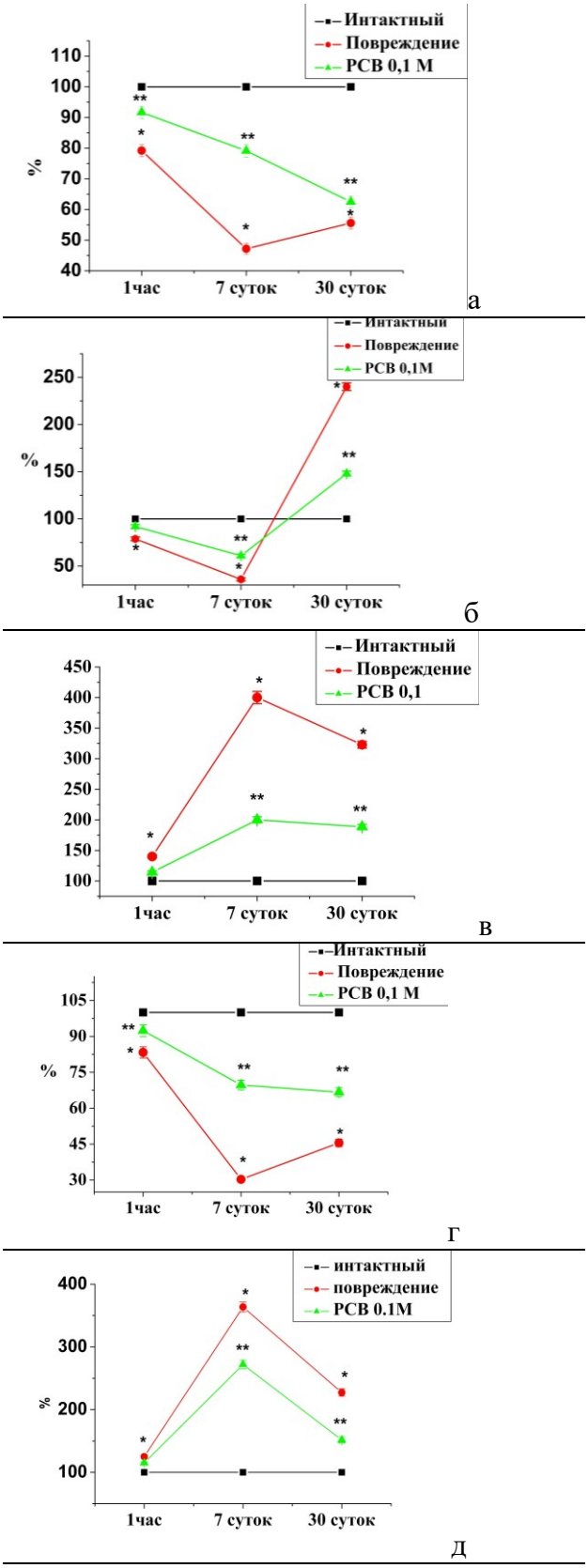


Рисунок 5 – Изменение коэффициента насыщенности ЖК нерва в дистальном участке после его травмы и действия ресвератрола: а-ФЭА; б-ФХ; в-ФС; г-СМ; д-ФИ (*– достоверность отличия по отношению к интактной группе, $p<0,05$; **– достоверность отличия по отношению к повреждению, $p<0,05$)

В дистальном отрезке уменьшается количество насыщенных ЖК во фракциях ФЭА, ФХ и ФС, при этих же условиях во фракциях ФС и ФИ наблюдается увеличение коэффициента насыщенности (рис. 5 а-д) за счет снижения количества ненасыщенных и увеличения насыщенных ЖК. Среди насыщенных ЖК наблюдается снижение таких как пальмитиновая и стеариновая, а уровень ненасыщенных – олеиновой, линоленовой и арахидоновой возрастает.

Исследование ЖК-состава проксимального участка фракций ФС, ФХ и ФИ на 30 сутки показало увеличение коэффициента насыщенности данных фракций в 2,0; 1,7; и 2,1 раза соответственно по сравнению с контролем (рис. 4 б,в,г). В дистальном конце нерва к 30-м суткам наблюдения коэффициент насыщенности снижается относительно контроля на 44%, 54,5% во фракциях ФЭА и СМ соответственно (рис. 5 а,д).

Введение РСВ в проксимальном конце нерва способствовало увеличению коэффициента насыщенности во фракциях ФЭА, СМ и ФИ в 1,2; 1,7; и 2,4 раза соответственно, по сравнению с повреждением (рис. 4), а также его снижению во фракции ФС в 1,8 раза относительно серии опытов с перерезкой. В дистальном конце нерва на фоне действия РСВ коэффициент насыщенности во фракциях ФЭА и СМ возрастает в 1,5 и 1,1 раз соответственно по сравнению с повреждением. В этих условиях коэффициент насыщенности во фракциях ФС и ФИ снижается в 1,6 и 1,3 раза соответственно по сравнению с перерезкой.

Исследования, проведенные с липосомальными мембранами, показали, что флавоноиды и изофлавоны могут быть локализованы в гидрофобной сердцевине мембраны, это может привести к значительному уменьшению текучести липидов в этой области мембраны (Arora A. et al., 2000). Это нарушение текучести мембраны может стерически препятствовать диффузии свободных радикалов и, таким образом, уменьшить кинетику реакций свободных радикалов.

Таким образом, перерезка нерва сопровождается перераспределением жирных кислот индивидуальных липидных фракций в каждом из отрезков нервного проводника, что свидетельствует об активных процессах, происходящих в гидрофобной части мембраны седалищного нерва крысы.

Введение РСВ способствует стабилизации ЖК состава липидов, тем самым ускоряя восстановление свойств мембран поврежденных нервных проводников. Изменение количественного содержания и ЖК состава отдельных липидных фракций может быть объяснено не только активацией липолитических ферментов, но и интенсификацией перекисного окисления липидов, поскольку наличие в составе фосфолипидов ненасыщенных жирных кислот, таких как олеиновая, линоленовая и арахидоновая, делает их наиболее восприимчивыми к окислению. В свою очередь образование продуктов ПОЛ может быть причиной как структурных, так и функциональных нарушений в живой системе (Riffel A.P., et.al., 2016). Образующиеся в качестве промежуточных продуктов гидроперекиси являются высоко гидрофильными, они эффективно разрушают бислой, увеличивая доступность гидрофобных доменов мембраны для молекул воды, а процесс гидратации мембраны приводит к модификации ее фазовых свойств

ИЗМЕНЕНИЕ ФАЗОВОГО СОСТОЯНИЯ ЛИПИДОВ СЕДАЛИЩНОГО НЕРВА ПРИ СТИМУЛЯЦИИ, ПОВРЕЖДЕНИИ И ВЛИЯНИИ РЕСВЕРТРОЛА

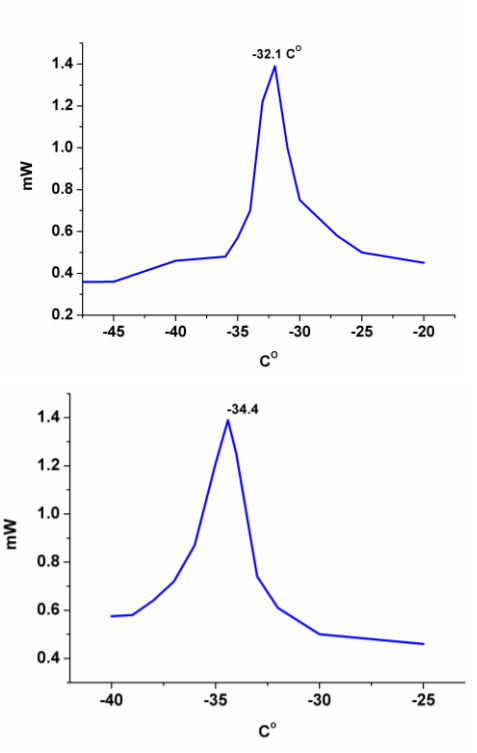


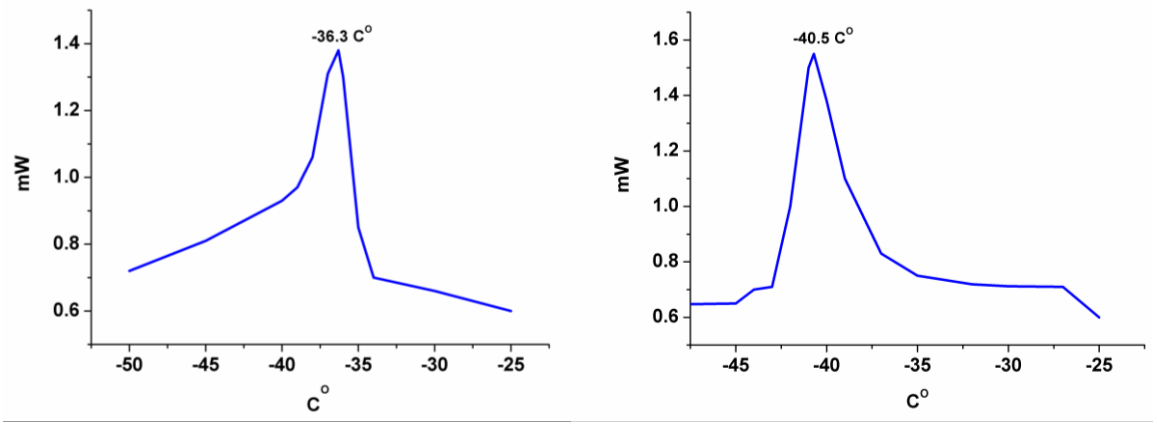
Рисунок 6 – Термограмма липидов, выделенных из седалищного нерва: верхний- состояние покоя, нижний- после стимуляции.

Известно, что функциональные характеристики мембран зависят от фазового состояния липидного бислоя. Обнаруженные нами изменения в ФЛ и ЖК составе должны привести к изменению фазового состояния липидов. Для того чтобы убедиться в этом, мы использовали метод дифференциальной сканирующей калориметрии, и установили, что в липидах, выделенных из интактного нерва (состояние покоя) зафиксирована температура фазового перехода липидов равная -32,1 С, стимуляция нерва сопровождается изменением температуры фазового перехода и составляет -34,4 ºС (рис.6 а и б).

По прошествии 7 суток после травмы происходит снижение температуры фазового перехода липидов до значений -36,3 ºС в проксимальном отрезке и до -40,5 ºС в дистальном отрезке (рис. 7 а и б). Следует отметить, что в связи с отсутствием центральной иннервации в дистальном конце нерва эти процессы носят более выраженный характер. Так же данный факт может объясняться более интенсивным накоплением ненасыщенных ЖК дистальнее травмы.

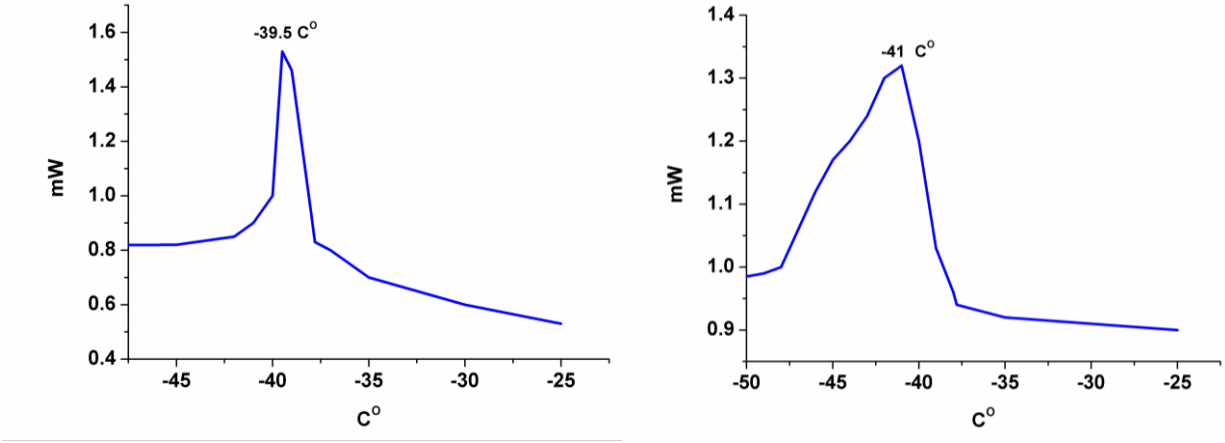
Использование РСВ в концентрации 0,1 М спустя 7 суток сопровождалось дальнейшим снижением температуры фазового перехода липидов, в проксимальном до -39,5 ºС, и в дистальном до -41 ºС. (рис. 8)

Увеличение послеоперационного периода до 30 суток демонстрирует снижение температуры фазового перехода липидов до -35,2 ºС в проксимальном конце, и до -33,5 ºС через тот же промежуток времени при использовании РСВ 0,1М концентрации (рис. 9). Увеличение температуры фазового перехода на 30 сутки относительно значения 7 суток предположительно можно объяснить тем, что травма нерва изменяет вязкость мембраны и упорядоченность ЖК хвостов, что улучшает проникновение РСВ в бислой и приводит к снижению температуры, к 30 суткам вышеуказанные свойства мембраны восстанавливаются и меньшее количество РСВ взаимодействует с мембраной.



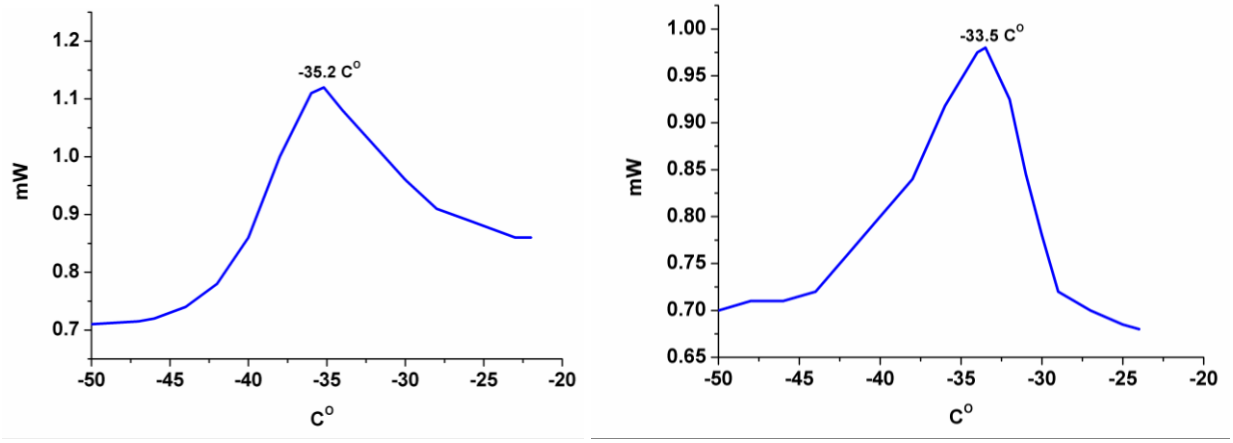
а) б)

Рисунок 7–Термограмма липидов выделенных а) из проксимального отрезка б) дистального отрезка поврежденного седалищного нерва спустя 7 суток



а) б)

Рисунок 8–Термограмма липидов выделенных а) из проксимального отрезка б) дистального отрезка поврежденного седалищного нерва спустя 7 суток при действии ресвератрола концентрации 0,1М



а б

Рисунок 9–Термограмма липидов выделенных а) из проксимального отрезка поврежденного нерва спустя 30 суток б) из проксимального отрезка поврежденного седалищного нерва спустя 30 суток при действии ресвератрола концентрации 0,1М

На основании собственных экспериментальных данных и данных из литературы, мы можем сказать, что возбуждение и травма нерва способствуют изменению физико-химического состояния бислоя, а именно, происходит снижение температуры фазового перехода липидов, использование РСВ сопровождается изменением температуры фазового перехода. Стильбены преимущественно взаимодействуют с полярными группами липидов, а некоторые из их производных, как сообщается, проникают и во внутренние области

мембраны (Sarpietro, et. al., 2007) При исследовании характера проникновения ресвератрола в мембраны, установлено, что он за счет полярных групп может взаимодействовать с заряженными группировками фосфолипидов на поверхности мембраны, однако большая его часть, более 90 %, проникает в пространство бислоя (Fabris et. al., 2008.) и взаимодействует с неполярными ацильными цепями (Tsuchiya et. al., 2001) и тем самым может влиять на фазовый переход липидов.

ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ МЕМБРАНЫ НЕРВНОГО ВОЛОКНА ПРИ ТРАВМЕ И ВЛИЯНИИ РЕСВЕРАТРОЛА

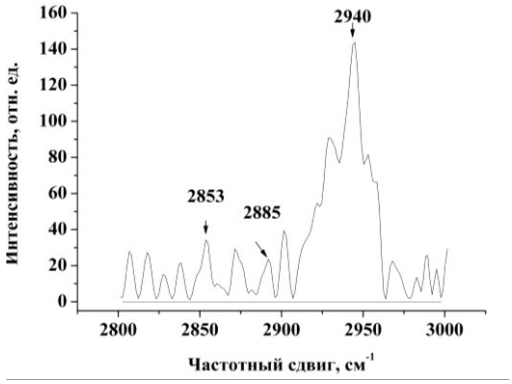
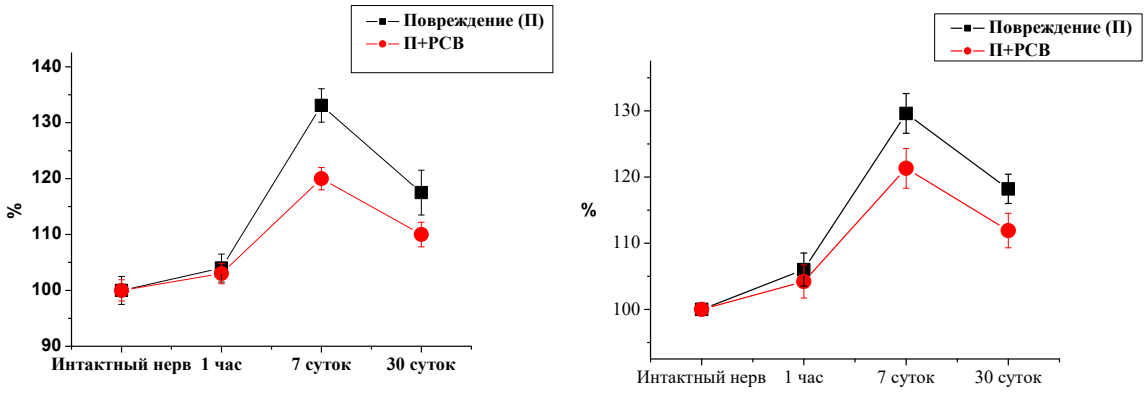


Рисунок 10 – Спектр комбинационного рассеяния миелинового нервного волокна

Особый интерес представляет изучение физико-химического состояния бислоя при различных условиях. Спектроскопия комбинационного рассеяния (СКР) дает возможность изучить процессы, происходящие в поврежденном периферическом нерве, и влияния РСВ на процессы дегенерации и регенерации. Нами были получены спектры комбинационного рассеяния в области от 2800-3000 см$^{-1}$ (рис. 10). Были взяты полосы интенсивности 2940- C–H_3 симметричные валентные колебания, 2885- C–H_2 асимметричный изгиб и 2853 см$^{-1}$ - C–H_2 симметричные растяжения (по данным Y. Fu, Sh. Morisaki и Г.В. Максимова)

Мы взяли следующие соотношения интенсивностей полос: 2940/2853 отражает содержание белкового компонента к липидному компоненту; 2940/2885 отражает увеличение межмолекулярного расстройства цепи (изменение степени упорядоченности липидов в мембране).

При анализе спектров нервного волокна мы получили, что соотношение I_{2940}/I_{2853} увеличивается на 7 и 30 сутки после повреждения на 33,1% и 17,5% соответственно, по сравнению с интактной группой (рис. 11, 1). Использование РСВ 0,1М концентрации демонстрирует, что соотношение белок/липид снижается на 7 сутки на 13,1% и на 30 сутки на 7,5%, по сравнению с перерезкой.



1 2

Рисунок 11– Изменение соотношения (1) I_{2940}/I_{2853} и (2) I_{2940}/I_{2885} спектра комбинационного рассеяния миелинового нервного волокна.

В нашем исследование мы наблюдали увеличение соотношения белок/липид на 7 сутки с последующим снижением на 30 сутки. Эти данные подтверждаются результатами, полученными Морисаки и др. Наблюдалось значительное увеличение коэффициента интенсивности полос (I_{2940} / I_{2853}) до 21 дня после травмы при повреждении, а затем снижение через 28 дней (Morisaki S. et al., 2013). Эти изменения согласуются с типичными изменениями при периферической дегенерации и регенерации. При развитии валлеровской дегенерации белки и липиды деградируют в дистальной части, поврежденной периферической нервной ткани (Gaudet et al., 2011). После дегенерации число аксонов увеличивается, и леммоциты начинают ремиелинизировать вокруг аксонов, что приводит к

увеличению содержания белка и накоплению липидов в периферической нервной ткани. Использование РСВ показало, что соотношение увеличивается с меньшими темпами, что говорит нам о положительном влиянии на процессы восстановления, хотя механизм этого влияния так и до конца не совсем ясен.

Как уже упоминалось выше, для миелина характерны полосы 2853 и 2885 $см^{-1}$. Пик 2885 мы можем использовать в качестве показателя текучести мембран. Bunow и Levin использовали соотношение I_{2940}/I_{2885} липидной группы для измерения степени упорядоченности липидов в мембране (Bunow et al.. 1977).

Анализируя спектр КР нервного волокна, мы получили, что соотношение I_{2940}/I_{2885} достоверно увеличивается на 7 сутки на 29,6% и на 30 сутки на 18,2%, по сравнению с 1 группой животных. Это говорит о том, что повреждение вызывает увеличение межмолекулярного расстройства цепи, т.е. изменяет степень упорядоченности липидов в мембране поврежденного нерва. При использовании РСВ соотношение так же было выше значений интактных животных на 21,3% и 11,9% соответственно, но достоверно снижалось по отношению к контрольной группе на 7 сутки на 8,3% и на 30 сутки на 6,3%. Полученные результаты свидетельствуют о возрастании степени неупорядоченности ЖК в липидах нервного волокна после повреждения и восстанавливающем действии РСВ на этот показатель.

Результаты собственных исследований согласуются с данными, полученными при изучении особенностей гидрофобного взаимодействия РСВ и жирных кислот фосфолипидов модельных мембран (Tsuchiya et al., 2002).

Предполагается, что обнаруженные эффекты РСВ многокомпонентные, и определяются, с одной стороны, его полифенольной природой, способностью связывать и нейтрализовать свободные радикалы, уменьшая концентрацию пероксида водорода, гидроксильных и супероксид анион-радикалов, снижая интенсивность процессов перекисного окисления липидов, усиливая действие антиоксидантных ферментов (Девина Е. А. и др., 2011), с другой стороны стабилизирующий эффект ресвератрола может быть опосредован инактивацией мембраносвязанных ферментов, таких как, фосфолипазы и протеинкиназа С (Momchilova et al., 2014). Вполне возможно, что ингибирование данных ферментов под действием РСВ сопровождается изменением внутримолекулярного порядка липидов. Не исключено прямое стереохимическое влияние РСВ на упорядоченность жирнокислотных цепей в фосфолипидах мембраны, и на снижение количества кинков в объеме липидного бислоя.

ИЗУЧЕНИЕ БЕЛКОВОГО СОСТАВА МИЕЛИНОВОГО НЕРВА В ПРОКСИМАЛЬНОМ И ДИСТАЛЬНОМ ОТДЕЛАХ ПОСЛЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ И ДЕЙСТВИЯ РЕСВЕРАТРОЛА

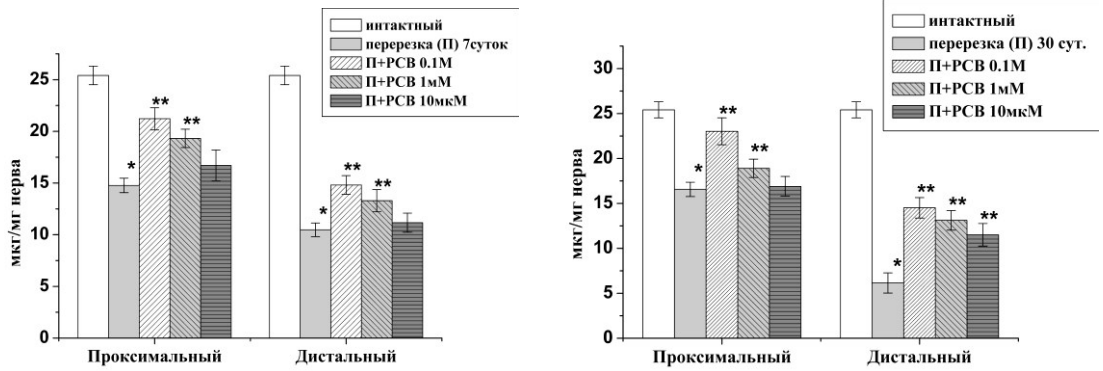
Важность миелиновой оболочки в нервной системе определяется не только её уникальной структурой, но и богатством заболеваний, связанных с ней, которые были охарактеризованы в организме человека. Такие заболевания часто связаны с миелин-специфическими белками, и могут быть либо аутоиммунного или унаследованного происхождения (Han H. et al., 2013) Исходя из этого мы решили изучить количественный и качественный состав миелин-специфических белков, а также их изменение при травме и влиянии РСВ.

При количественном изучении фракции миелин-специфических белков было получено, что в интактных нервах их концентрация равна 25,4 мкг/мг нерва. При повреждении через 1 час достоверных изменений не выявлено, спустя 7 и 30 суток в проксимальном конце нерва наблюдается снижение на 41,9 % и 34,8 % соответственно, по сравнению с интактной группой. Количество миелин-специфических белков в дистальном конце так же снижается через 7 и 30 суток на 58,8 % и 75,8 % соответственно, по сравнению с интактной группой (рис. 12).

Увеличение послеоперационных сроков до 7 суток с использованием РСВ показало увеличение уровня белков миелина. В проксимальном конце при использовании концентрации 0,1М на 43,9%, при 1мМ концентрации на 30,8% по сравнению с контролем. В дистальном конце при использовании РСВ 0,1М и 1мМ произошло увеличение

количества миелиновых белков на 41% и 26,9% соответственно, по сравнению с контролем (рис. 12)

Увеличение послеоперационного периода до 30 суток с использованием РСВ показало увеличение уровня белка миелина при использовании концентрации 0,1М, но значения не достигает показателя интактной группы, отличаясь на 9,4 %. В дистальном участке достоверные изменения наблюдаются при использовании всех трех концентраций. При концентрации 0,1М, 1мМ и 10 мкМ происходит увеличение на 135%, 113% и 87% соответственно, по сравнению с контролем (рис. 12).



1 2

Рисунок 12 – Изменение содержания фракции миелин-специфических белков в норме и после повреждения нерва, 1 -через 7 суток, 2 -через 30 суток (*– достоверность отличия по отношению к интактной группе, p <0,05; **– достоверность отличия по отношению к контрольной группе, p <0,01)

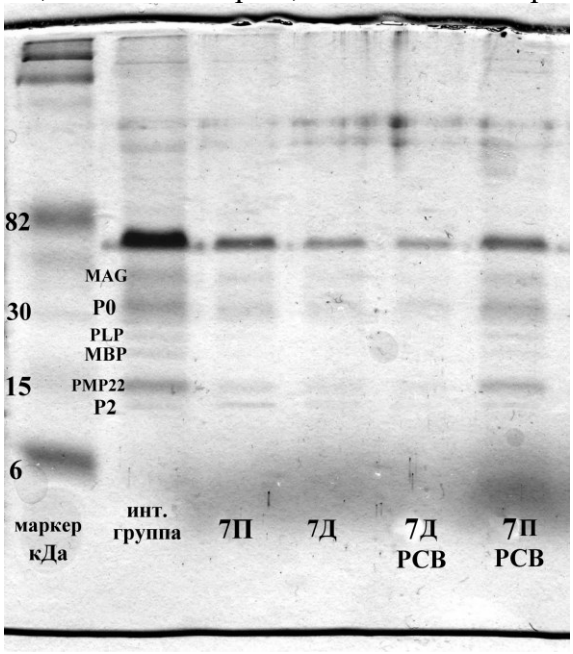
На следующем этапе осуществлялось электрофоретическое разделение миелин-специфических белков в ПААГе в присутствии додецилсульфата натрия. На электрофореграмме белков первой – интактной группы животных, предположительно выявлены следующие миелин-специфические белки: нулевой белок (P0), периферический миелиновый белок 22 (Pmp22), основной белок миелина (MBP), миелин-ассоциированный гликопротеин (MAG), протеолипидный белок (PLP) и белок P2 (рис. 13 1).

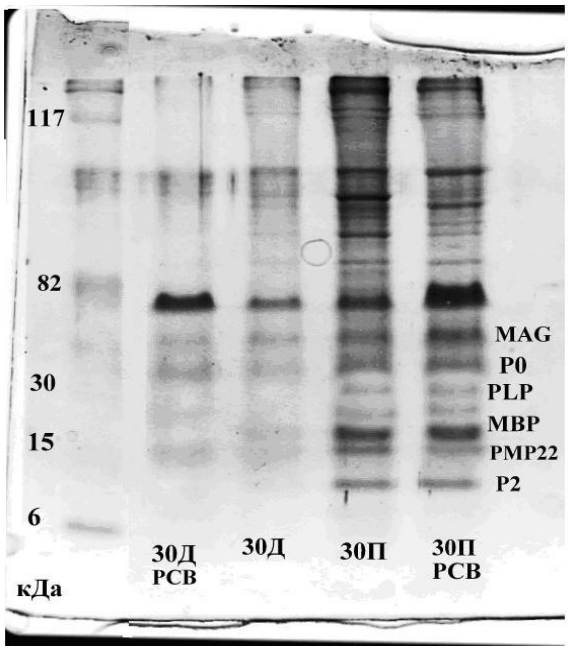
В проксимальном отрезке нерва через 7 суток на электрофореграмме обнаружены миелин-ассоциированный гликопротеин, нулевой белок, периферический миелиновый белок 2, белок 2 и следовые количества основного белка миелина и протеолипидного белка, в дистальном конце через 7 суток основной белок и протеолипидный белок отсутствуют (рис. 13 1). Интенсивность белковых полос на электрофореграмме уменьшается через 7 суток по сравнению с интактной группой, что подтверждается результатами, полученные методом определения белка по Лоури. При использовании РСВ 0,1М обнаруживаются те же самые белки, но интенсивность их окраски выше, чем в контроле, но ниже чем в интактной группе, причем полосы основного и протеолипидного белков показывают более интенсивную окраску, чем в контроле.

Через 30 суток интенсивность белковых полос, как в проксимальном, так и в дистальном концах продолжает снижаться, в дистальном отрезке наблюдается отсутствие полосы P2, и протеолипидного белка. Применение РСВ демонстрирует увеличение интенсивности окраски белковых полос в проксимальном конце, по сравнению с контролем, что говорит об увеличении уровня данных белков (рис. 13 2).

Полученные данные полностью согласуются с данными научной литературы, согласно Г. В. Пэрри, Ж. Сэджик и др. (Sedzik J. et. al., 2013) увеличение уровня миелин-ассоциированного гликопротеина на 30 сутки способствует улучшению регенерационных процессов после травм седалищных нервов крыс. Снижение уровня нулевого белка на 7 сутки после травмы нерва, а затем увеличение его уровня на 30 сутки подтверждает его важную роль в процессе восстановления поврежденного нерва, а именно, данный белок служит основным источником стабилизации и уплотнения внеклеточной и цитоплазматической поверхности миелина. Также при синтезе нулевого белка

шванновскими клетками происходит индукция генов, кодирующих другие миелиновые белки, такие как Pmp 22, а затем MBP и протеолипидный белок (Fasano A. 2008).





1 2

1-**7П**-7 суток после повреждения проксимальный конец; **7Д**-7 суток после повреждения дистальный конец; **7П РСВ**-7 суток после повреждения проксимальный конец и ресвератрол в концентрации 0,1М; **7Д РСВ**-7 суток после повреждения дистальный конец и ресвератрол в концентрации 0,1М

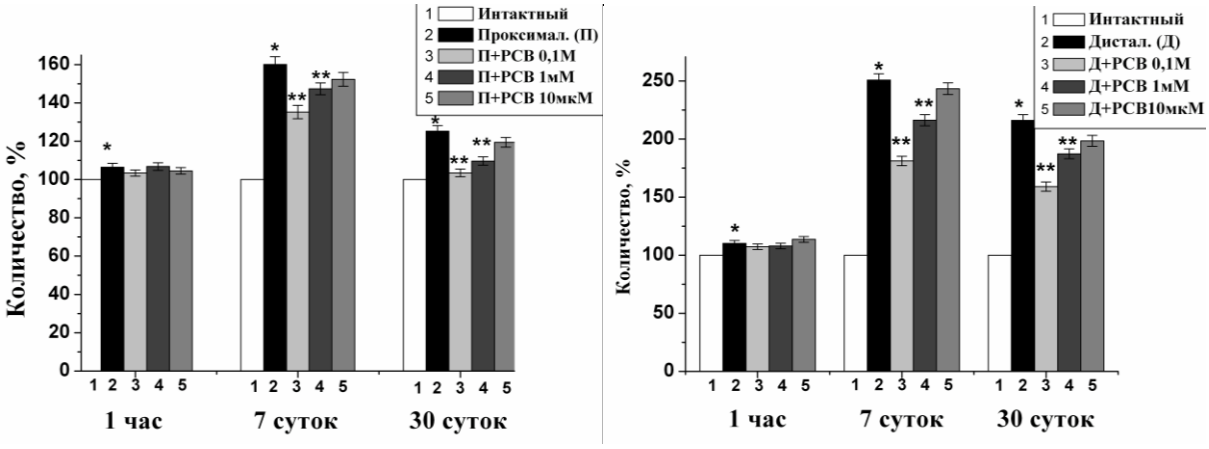
2-**30П**-30 суток после повреждения проксимальный конец; **30Д**-30 суток после повреждения дистальный конец; **30П РСВ**-30 суток после повреждения проксимальный конец и ресвератрол в концентрации 0,1М; **30Д РСВ**-30 суток после повреждения дистальный конец и ресвератрол в концентрации 0,1М

Рисунок 13–Электрофореграмма миелин-специфических белков, разделенных в 15% геле.

ВЛИЯНИЕ РЕСВЕРАТРОЛА НА ПРОЦЕССЫ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ НЕРВА

Основным показателем оценки наличия окислительного стресса является накопление первичных и вторичных метаболитов свободно- радикального окисления. В силу своей стабильности продукты перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот, включая диеновые конъюгаты (ДК) и основной продукт реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) – малоновый диальдегид (МДА) являются наиболее информативными показателями наличия окислительного стресса.

Нами определено что количество ДК в неповрежденном нерве равно 9,3±0,2 ммоль/ мг липидов. По содержанию ДК в седалищном нерве с увеличением посттравматического периода отмечаются значительные изменения, как в дистальном, так и в проксимальном отрезке. Так в проксимальном конце, наблюдается достоверная (до 60,1 % – через 7 дней и до 25,2 % – через 30 дней) тенденция к увеличению, а в дистальном конце (до 11% – через 1 час, до 150,8% – через 7 суток и до 116% – через 30 суток) по сравнению с интактной группой животных (рисунки 14 1 и 2). Использование РСВ приводит к снижению количества ДК во время всего периода эксперимента, причем наиболее эффективной концентрацией является 0,1 М

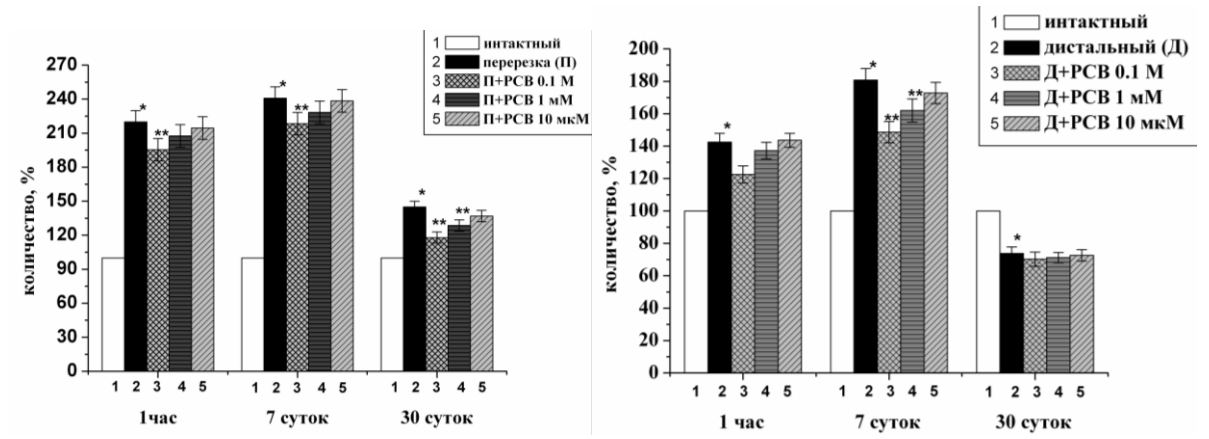


1 2

Рисунок 14– Изменение количества диеновых конъюгатов в проксимальном (1) и дистальном (2) концах поврежденного седалищного нерва и при действии ресвератрола разных концентраций (*– достоверность отличия по отношению к интактной группе, p<0,05; **– достоверность отличия по отношению к повреждению, p<0,05)

Нами был изучен уровень ТБК-активных продуктов в проксимальном и дистальном конце поврежденного нерва и при действии РСВ.

В контрольной группе животных, он составил 0,65 ммоль/мг белка. Через час после повреждения нерва количество МДА в проксимальном участке поврежденного нерва увеличилось почти в 1,2 раза, а в дистальном на 42,5 % по сравнению с контролем. В 3, 4 и 5 группах животных содержание МДА в проксимальном конце нерва снижается на 23,9 %, 11,6% и 5 % соответственно, по сравнению с группой с повреждением нерва, но без использования РСВ. В дистальном конце через час после повреждения достоверное снижение уровня МДА наблюдается у животных 3 группы. Здесь снижение происходит на 19,9 % по сравнению со 2 группой, без использования РСВ (рисунок 15 1 и 2).



1 2

Рисунок 15– Изменение содержания ТБК-активных продуктов в проксимальном (1) и дистальном (2) концах поврежденного седалищного нерва при действии ресвератрола разных концентраций (*– достоверность отличия по отношению к интактной группе, p<0,05; **– достоверность отличия по отношению к повреждению, p<0,05)

С увеличением послеоперационных сроков до 7 дней происходит увеличение содержания МДА как в проксимальном, так и в дистальном концах поврежденного нерва в 2,4 раза и на 80,8 % соответственно, по сравнению с контролем (рисунок 15 1 и 2). Достоверное снижение МДА наблюдается в проксимальном конце при использовании РСВ с концентрацией 0,1 М и 1мМ на 21,7 % и 11,6 % соответственно, по сравнению со 2-ой группой. В дистальном конце поврежденного нерва через 7 дней наблюдается снижение количества МДА в 3, 4 и 5 группах животных на 32,2 %, 18,8 % и 8 % соответственно, по сравнение со 2 группой.

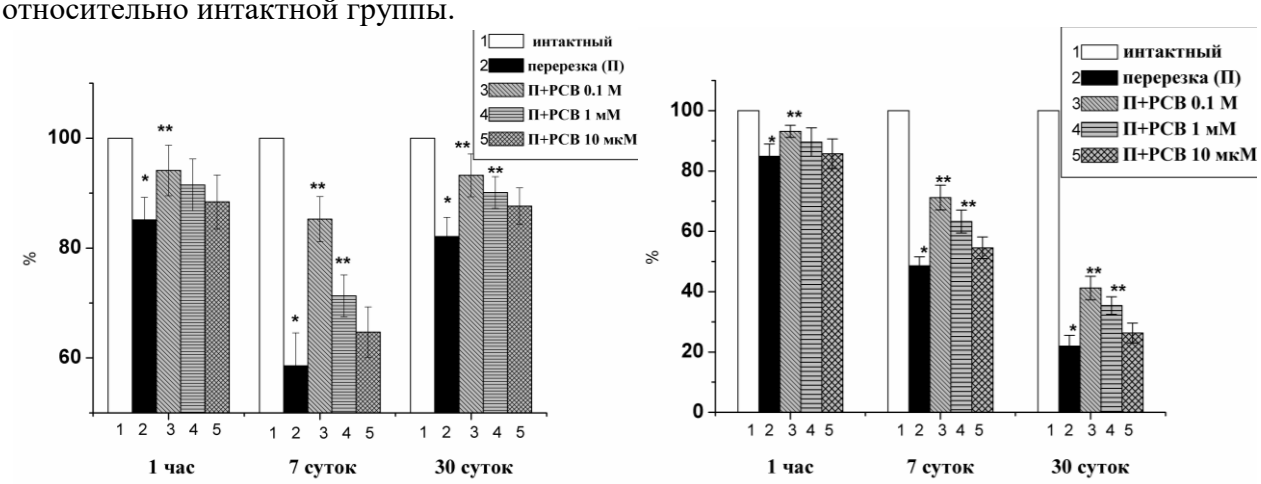
С увеличением посттравматического периода до 30 суток происходит увеличение количества МДА в проксимальном конце на 45%, и снижение в дистальном на 26,2 % (рисунок 15 1 и 2). В 3, 4 и 5 экспериментальных группах, в проксимальном конце происходит снижение уровня МДА на 27,1 %, 16,4 % и 8 % соответственно, по сравнению со 2 группой. В дистальном участке поврежденного нерва в 3, 4 и 5 группах достоверных изменений относительно 2-ой группы не выявлено.

Считается, что защита от окислительного повреждения играет существенную роль в нейропротекции, функционального восстановления и регенерации (Maher et al., 2006).

Супероксиддисмутаза (СОД) является ферментом, который катализирует дисмутации супероксида в H_2O_2 и O_2. В дальнейшем каталаза и пероксидазы катализируют разложение H_2O_2 в H_2O и O_2 (Khan et al., 2010). Эти реакции обеспечивают эффективную борьбу с окислительным стрессом, вызванным активными формами кислорода (АФК).

Нами была проанализирована активность СОД после травмы, а также на её фоне при действии разных концентраций РСВ, мы получили, что в интактной группе животных активность этого фермента составила 16,52 ± 0,4 ЕД/мг белка.

При использовании РСВ в концентрации 0,1М, 1мМ и 10мкМ через час после повреждения активность снижалась на 6%, 8,5% и 12,6% соответственно, по сравнению с интактной группой. В дистальном участке нерва через тот же промежуток времени при использовании РСВ наблюдается похожая динамика, активность фермента снижается относительно интактной группы.



1 2

Рисунок 16– Изменение активности супероксиддисмутазы в проксимальном конце поврежденного седалищного нерва при действии ресвератрола разных концентраций (*– достоверность отличия по отношению к интактной группе, p<0,05; **– достоверность отличия по отношению к повреждению, p<0,05)

Через 7 дней после повреждения нерва в проксимальном конце нерва наблюдается снижение активности СОД на 41,4 %, а в дистальном на 51,5 % по сравнению с интактной группой (рисунок 16 1 и 2). В опытных группах с введением РСВ наблюдается восстановление активности СОД, как в проксимальном, так и в дистальном участке нерва по сравнению со 2-ой экспериментальной группой без воздействия препарата. Причем наиболее действенной концентрацией РСВ является концентрация 0,1 М, при её использовании в проксимальном и дистальном конце нерва происходит увеличение активности СОД на 26,7 % и 22,6 % соответственно, по сравнению со 2-ой группой без препарата.

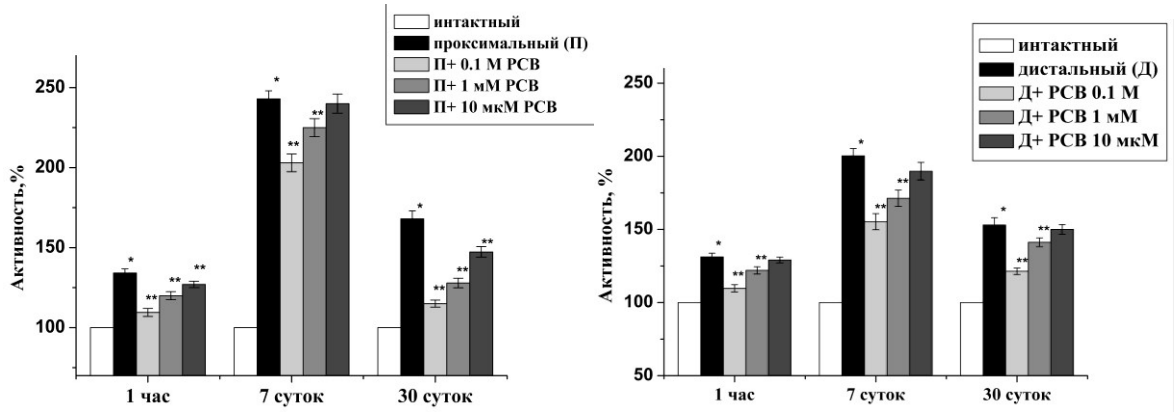
Спустя 30 суток после травмы нерва активность СОД снижается на 18% в проксимальном конце и на 78 % в дистальном конце, по сравнению с интактной группой (рисунок 16 1 и 2).

Активация антиоксидантных ферментов или использование синтетических антиоксидантов, представляет большой интерес в профилактике или лечении неврологических расстройств. Они облегчают удаление АФК и придают окислительную стрессоустойчивость. Было показано, что РСВ обладает антиоксидантными и

противовоспалительными свойствами и установлено, что он является нейропротектором против эксайтотоксичности (Fonseca-Kelly et al., 2012). Так как активность СОД представляет первую линию внутриклеточной защиты от повреждения клеток АФК и в нашем исследовании показано, что РСВ дозозависимо влияет на активность СОД, то полученные результаты можно интерпретировать как усиливающее действие РСВ на активность СОД.

Следующим этапом по изучению антиоксидантного действия РСВ стало изучение активности каталазы (КАТ) при повреждении седалищного нерва и на фоне действия РСВ. Мы получили, что активность КАТ в норме составила 11,5 ЕД/мг белка.

По прошествии 1 часа после повреждения нерва наблюдается увеличение активности КАТ в проксимальном и дистальном концах на 34 % и 31 % соответственно, по сравнению с интактной группой. При действии РСВ в концентрации 0,1 М, 1мМ и 10 мкМ в проксимальном отрезке происходит снижение активности на 24,7% 14,2% и 7,1 % соответственно, по сравнению с группой без использования РСВ. В дистальном отрезке нерва при действии РСВ в концентрации 0,1 М, 1мМ обнаружено снижение активности фермента на 21,6% 9,3% соответственно, по сравнению со второй группой (рисунки 17 1 и 2).



1 2

Рисунок 17 – Изменение активности каталазы в проксимальном (1) и дистальном (2) концах поврежденного периферического нерва при действии различных концентраций ресвератрола (*– достоверность отличия по отношению к интактной группе, p<0,05; **– достоверность отличия по отношению к повреждению, p<0,05)

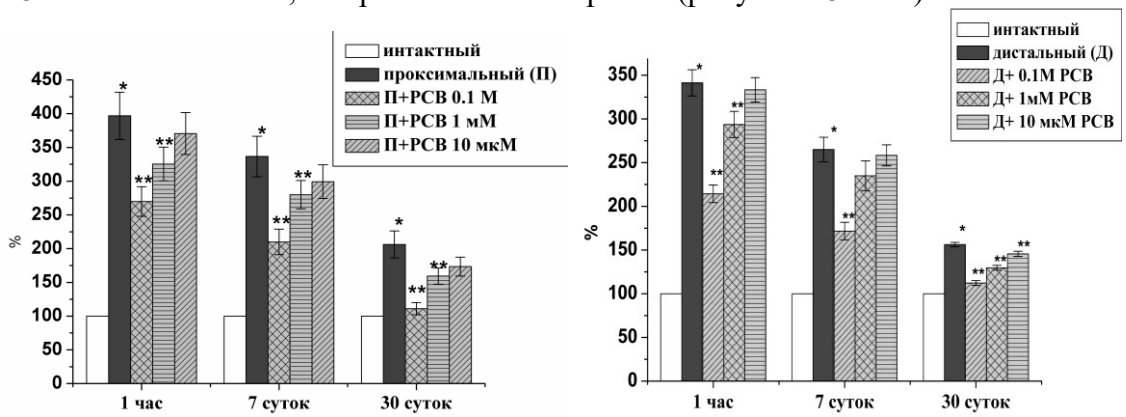
Через 7 суток после повреждения нерва показано увеличение активности КАТ и в проксимальном и в дистальном концах на 143% и 100% соответственно, по сравнению с интактной группой. При использовании РСВ в концентрации 0,1 М и 1мМ в проксимальном отрезке нерва наблюдается снижение активности на 40% и 18% соответственно, по сравнению со 2 экспериментальной группой, а в дистальном - на 45%, 29% и 10% соответственно, по сравнению с группой без введения РСВ (рисунок 17 1 и 2).

Спустя 30 суток после травмы нерва в проксимальном конце наблюдается увеличение активности КАТ на 68%, а дистальном на 53% по сравнению с 1-ой группой. Как показал эксперимент, при действии РСВ концентрациями 0,1 М, 1мМ и 10 мкМ в проксимальном участке поврежденного нерва обнаружено снижение активности фермента на 53%, 40% и 21% соответственно, по сравнению с группой без введения препарата. В дистальном участке нерва показано снижение на 32% при использовании РСВ концентрации 0,1М, на 12% при использовании концентрации 1мМ, при введении РСВ концентрации 10мкМ достоверных изменений активности КАТ не обнаружено, по сравнению со 2 группой.

Далее было изучение суммарной пероксидазной активности (СПА) в норме, при повреждении, а также при повреждении на фоне действия РСВ различной концентрации.

Исследование динамики СПА показало, что через 1 час после повреждения нерва в проксимальном конце СПА увеличивается почти в 4 раза, а в дистальном конце в 3,4 раза по сравнению с интактной группой. В 3, 4 и 5 группах животных, в проксимальном конце

нерва произошло снижение СПА на 127, 74 и 26,2 % соответственно, а в дистальном на 126, 47,6 и 8 % соответственно, по сравнению с контролем (рисунок 18 1 и 2).



1 2

Рисунок 18 – Изменение суммарной пероксидазной активности проксимального (1) и дистального (2) участков поврежденного седалищного нерва при действии ресвератрола различной концентрации (*– достоверность отличия по отношению к интактной группе, p<0,05; **– достоверность отличия по отношению к повреждению, p<0,05)

Выведение животных из эксперимента через 7 дней показало, что в контрольной группе, в проксимальном конце СПА увеличилась в 2,4 раза, а в дистальном в 1,65 раз по сравнению с интактной группой. В 3, 4 и 5 экспериментальных группах, в проксимальном конце СПА снизилось на 126, 56,3 и 43,4 % соответственно, а в дистальном в этот же период на 93,3, 30 и 6,7 % по сравнению с контрольной группой.

Далее исследование показало, что через 30 дней после повреждения нерва в контрольной группе, в проксимальном конце нерва СПА увеличилась в 2 раза, а в дистальном на 56 % по сравнению с интактной группой. При использовании РСВ в концентрации 0,1М, 1мМ установлено, что СПА в проксимальном участке снижается на 95,4, 46,9 , соответственно, по сравнению с контролем. Что касается дистального участка нерва, то через 30 дней наблюдаются снижение на 44%, 26,5% и 10,6 % соответственно, по сравнению с контролем. (рисунок 18 1 и 2).

Одним из механизмов действия РСВ является проявление его антиоксидантной способности, поскольку он является отличным акцептором гидроксила, супероксида и других радикалов и защищает клеточные мембраны от перекисного окисления липидов и повреждения ДНК, вызванные генерацией активных форм кислорода (Shakibaei M, et al., 2007; Kovacic P., et al., 2010) Использование природных или синтетических антиоксидантов, представляет большое значение в профилактике или лечение неврологических расстройств. Они облегчают удаление АФК и придают окислительную стрессоустойчивость. Так же в литературе имеются данные не только о прямом действии ресвератрола как антиоксиданта, но и о его опосредованном действии. Есть данные, которые показали, что ресвератрол может снизить уровень окислительного стресса в клетке, активируя гены, ответственные за синтез антиоксидантных ферментов оказывая влияние на фосфатазу PTEN (Wang Y. et al., 2010), а она в свою очередь увеличивает активность таких ферментов, как глутатионпероксидаза, СОД (Akca H. et al., 2013). Это говорит о том, что сигнальный путь PTEN / Akt задействован в антиоксидантном эффекте ресвератрола.

Как полифенол, ресвератрол представляет интерес своими полезными свойствами в различных патологических состояниях, в том числе нейродегенерации (Robb et al., 2008) и является достаточно эффективным средством для уменьшения последствий окислительного стресса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в ходе комплексного анализа данные показывают, что ритмическое возбуждение миелинового нерва теплокровного сопровождается изменением содержания ФИ и ФЭА, а также изменениями фазового состояния липидного бислоя мембран миелина.

Наблюдающиеся изменения не приводят к функциональным нарушениям и являются необходимыми для поддержания оптимального функционального состояния липидного бислоя мембраны и локализованных в ней ион-транспортирующих систем. Перерезка нерва приводит к перераспределению фосфолипидов и жирных кислот, интенсификации процессов перекисного окисления липидов, снижение активности СОД и увеличению КАТ и пероксидазной активностей. Изменение липидного состава при повреждении и продукты ПОЛ существенно изменяют температуру фазового состояния липидов, что свидетельствует о глубоких перестройках в липидном бислое соматических нервов, изменении ионного транспорта и активности многих мембраносвязанных ферментов.

Кроме липидного компонента наблюдаются изменения также и в белковой составляющей миелинового нерва. Травма нерва приводит к снижению, как общего количества белка, так и миелин-специфических белков. Это объясняется развитием процессов валлеровской дегенерации. Введение ресвератрола усиливает регенерационные процессы в травмированном нервном проводнике, способствуя восстановлению содержания фосфолипидов и миелиновых белков, снижению уровня продуктов ПОЛ, увеличению активности СОД и снижению КАТ и пероксидазной активности. Ключевым шагом в механизме его действия является прекращение распространения свободных радикалов путем образования резонансно-стабилизированного перекисного радикала. Он так же может снизить уровень АФК не только из-за своей фенольной структуры, но и из-за того, что он является отличным акцептором гидроксила, супероксида и других радикалов.

На основе данных представленных в литературе и собственных результатов мы предлагаем схему, показывающую изменения, происходящие в соматическом нерве при возбуждении, механической травме и действии РСВ на фоне травмы (рисунок 19).

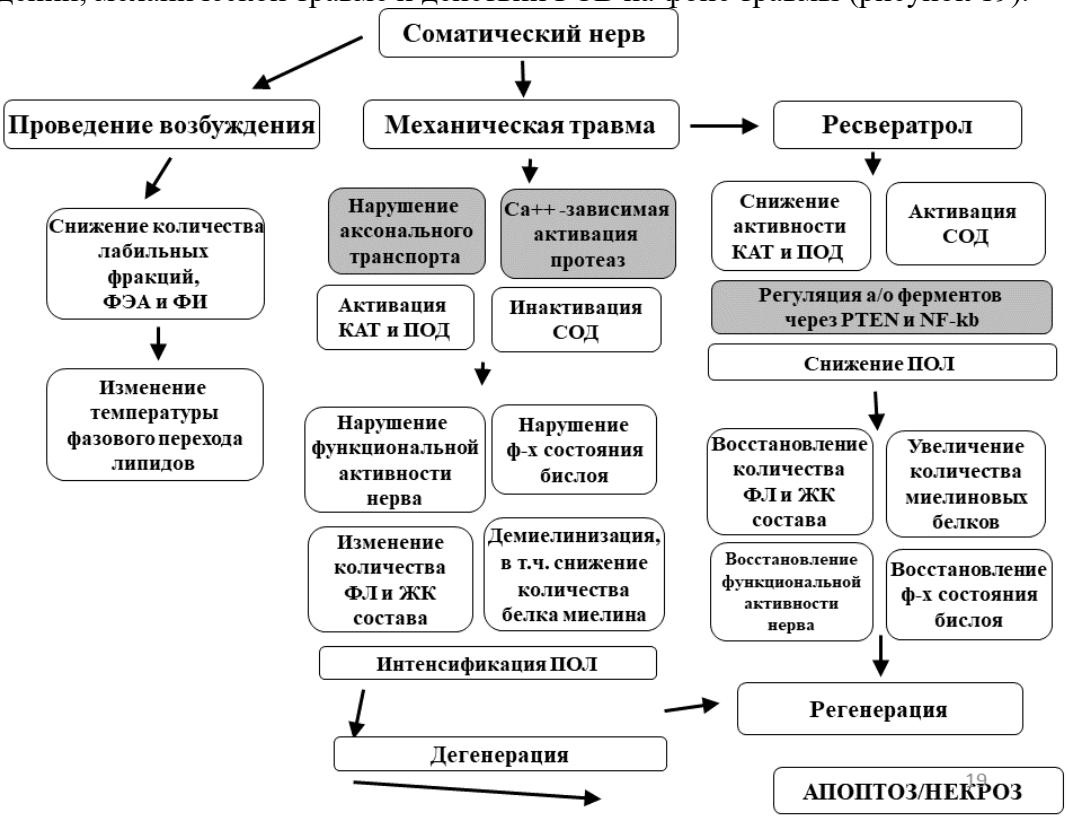


Рисунок 19- Изменения, происходящие в соматическом нерве при возбуждении, механической травме и действии РСВ на фоне травмы по данным литературы (серый фон) и результатам собственных исследований (белый фон)

ВЫВОДЫ

1. В состоянии покоя в соматических нервах крысы выявлено и идентифицировано пять основных фракций фосфолипидов-СМ, ФХ, ФС, ФИ и ФЭА, жирнокислотный состав представлен 21 кислотой: декановая (10:0), гендекановая (11:0), лауриновая (12:0), тридекановая (13:0), миристиновая (14:0), миристоолеиновая (14:1), пентадекановая (15:0), цис-10-пентадекановая (15:1), пальмитиновая (16:0), пальмитолеиновая (16:1), стеариновая

(18:0), элаидиновая (18:1n9t), олеиновая (18:1n9c), линолевая (18:2n6c), линоленовая (18:3n3), арахиновая (20:0), цис-11,14-эйкозадиеновая (20:2), цис-8,11,14-эйкозатриеновая (20:3n3), арахидоновая (20:4n6), цис-13, 16-докозадиеновая (22:2) и лигноцериновая (24:0).

2. Электрическая стимуляция седалищного нерва приводит к уменьшению содержания наиболее лабильных фракций, ФИ и ФЭА, в остальных изучаемых фракциях достоверных изменений не обнаружено.

3. При исследовании белкового состава миелина в контрольных нервах нами идентифицированы следующие миелин-специфические белки: нулевой белок миелина, периферический миелиновый белок 22, основной белок миелина, миелин-ассоциированный гликопротеин, протеолипидный белок, и белок Р2.

4. При повреждении соматических нервов в липидном компоненте нервного проводника происходит перераспределение количества ФЛ, а именно: снижается количество ФЭА, ФХ и СМ, увеличивается содержание ФС и ФИ. Причем в дистальном отрезке прослеживается динамика с наиболее выраженными изменениями. Так же изменения наблюдаются и в ЖК составе нерва. Травма нерва увеличивает содержание олеиновой, линоленовой и арахидоновой, а снижает количество пальмитиновой и стеариновой кислот.

5. Анализ состава белков при регенерации поврежденных нервов показал, что травма нерва способствует снижению количества миелиновых белков, а в случае дистального отрезка на 30 сутки отсутствует протеолипидный и белок Р2. Снижение уровня нулевого белка на 7 сутки после травмы нерва, а затем увеличение его уровня на 30 сутки подтверждает его важную роль процессе восстановления поврежденного нерва, а именно, данный белок служит основным источником стабилизации и уплотнения внеклеточной и цитоплазматической поверхности миелина.

6. При дегенерации нерва крысы, вызванной перерезкой, наблюдается значительное усиление процессов ПОЛ. При этом, интенсификация происходит как в проксимальном, так и дистальном отрезках нерва, о чем свидетельствует увеличение содержания продуктов ПОЛ - ДК и МДА. Использование ресвератрола в качестве природного антиоксиданта приводит к снижению содержания продуктов ПОЛ.

7. При перерезке нерва происходит снижение активности СОД как в проксимальном, так и в дистальном отрезке соматического нерва. В этих же условиях наблюдается увеличение активности пероксидаз и каталазы, а также наблюдается восстановление состава как в липидной, так и в белковой компонентах.

8. На основании анализа липидов, белков и активности антиоксидантных ферментов при проведении возбуждения и повреждении соматических нервов можно утверждать, что ресвератрол оказывает положительное влияние на процессы регенерации в нерве.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи из перечня журналов индексируемых Web of Science, Scopus, ВАК

1. The effect of resveratrol on the composition and state of lipids and the activity of phospholipase A_2 during the excitation and regeneration of somatic nerves / V.V. Revin, S.I. Pinyaev, M.V. Parchaykina, E.S. Revina, G.V. Maksimov, T.P. Kuzmenko // Front. Physiol. – 2019. -№10:384. (Импакт-фактор – 3,2)

2. Influence of resveratrol on oxidation processes and lipid phase characteristics in damaged somatic nerves / S.I. Pinyaev, T.P. Kuzmenko, N.V. Revina, M.V. Parchaykina, A.S. Pronin, I.V. Syusin, O.S. Novozhilova, V.V. Revin, E.V. Chudaikina, E.S. Revina // BioMed Research International.–2019.– vol. 2019, Article ID 2381907,– P.1-9. (Импакт-фактор – 2,197)

3. Влияние ресвератрола на конформационное состояние жирных кислот и уровень перекисного окисления липидов в поврежденных соматических нервах / С.И. Пиняев, Н.А. Мельникова, А.А. Морозова, Н.В. Ревина, Ю.П. Спирина, Е.А. Дуленова, В.В. Ревин // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2016. - №. 2. – С.78-85. (Импакт-фактор – 0,31)

Статьи в сборниках

4. Изучение содержания белка и липид-белкового соотношения в периферическом нерве крысы в норме и после травмы / Ю.П. Спирина, Н.В. Громова, Е.А. Дуленова,

Н.А. Мельникова, А.А. Морозова, С.И. Пиняев, В.В. Ревин // Огарёв-Online. - 2016. - № 24. - С. 8-13.

5. Использование спектроскопии комбинационного рассеяния для визуализации изменений, происходящих в соматическом нерве при повреждении / С.И. Пиняев // Материалы «XVIII научно-практической конференции молодых ученых, аспирантов и студентов Национального исследовательского Мордовского государственного университета им. Н.П. Огарёва», 25-31 октября 2014 г.: – Саранск, 2014. – С. 195-200.

6. Изменение белкового состава седалищного нерва крысы при его повреждении путем сдавливания / Ю.П. Спирина, Н.В. Громова, Н.А. Мельникова, С.И. Пиняев, А.А. Морозова // Материалы конференции «Перспективы развития химических и биологических технологий в 21-м веке», 23-25 сентября 2015г.: – Саранск, 2015. – С. 241-245.

7. Изучение морфологических особенностей поврежденного периферического нерва / Ю.П. Спирина, Н.А. Мельникова, С.И. Пиняев, К.В. Просникова // Материалы «XX научно-практической конференции молодых ученых, аспирантов и студентов Национального исследовательского Мордовского государственного университета им. Н.П. Огарёва», 16-23 мая 2016 г.: – Саранск, 2016. – С.125-128.

8. Особенности белкового состава миелиновой оболочки и осевых цилиндров аксонов периферического нерва в норме и при повреждении / А.А. Морозова, С.И. Пиняев, Э.С. Ревина // Материалы научной конференции «XLIV Огарёвские чтения», 8-15 декабря 2015 г.: – Саранск, 2015. - С.206-211.

Тезисы конференций

9. Potassium hyaluronate influence on the lipid composition and activity of phospholipase A_2 in the injured sciatic nerve / A.A. Morozova, V.V. Revin, M.V. Isakina, N.A. Mel'nikova, S.I. Pinyaev, J.P. Spirina, E.A. Dulenova // Journal of Biotechnology. – 2016. – №. 231. – P.37. (Импакт-фактор – 3,16)

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

11. Effect of resveratrol on regeneration processes in the lipid phase tested on rat's damaged somatic nerves/ V.V. Revin, , S.I. Pinyaev, M.V. Parchaykina, T.P. Zyuzina, E.V. Averkina, // Journal of Biotechnology. – 2018. – №. 280. – P.69. (Импакт-фактор – 3,16)

12. Изменение липидного состава мембран поврежденных периферических нервов при использовании пленок на основе бактериальной целлюлозы и ресвератрола / С.И. Пиняев, М.В. Исакина, А.А. Морозова, В.В. Ревин // Материалы докладов V съезда биофизиков России, 4-10 октября 2015г.: тез. докл. – Ростов-на-Дону, 2015. - С. 271.

13. Изучение влияния ресвератрола на процессы, происходящие в поврежденном периферическом нерве / С.И. Пиняев, В.В. Ревин // Сборник научных трудов III Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы медико-биологических дисциплин», 22-23 мая 2014 г.: тез. докл. – Саранск, 2014. – С. 28.

14. Изменение жирнокислотного состава поврежденного периферического нерва при использовании пленок бактериальной целлюлозы с добавлением ресвератрола / С.И. Пиняев, М.В. Исакина, В.В. Ревин, А.А. Морозова, Ю. П. Спирина, Е.А. Дуленова // Научные труды V Съезда физиологов СНГ, V Съезда биохимиков России, Конференции ADFLIM. — ACTA NATURAE, 4-8 октября 2016 г.: тез. докл. – Сочи, 2016. – С.160.

15. Влияние ресвератрола на состав и состояние липидов при возбуждении и регенерации соматических нервов / С.И. Пиняев, В.В. Ревин // Сборник научных трудов VI съезда биофизиков России: в 2 томах – Краснодар: Полиграф. объед. «Плехановец», 2019. – С.180.

16. Влияние ИФР-1 на фосфоинозитидный состав седалищного нерва крысы при регенерации / Е.В. Чудайкина, Э.С. Ревина, С.И. Пиняев // Сборник научных трудов VI съезда биофизиков России: в 2 томах – Краснодар: Полиграф. объед. «Плехановец», 2019. – С.198.