

ВЛИЯНИЕ НЕЙРОТРОФИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА СОСТАВ БЕЛКОВ ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ И РЕГЕНЕРАЦИИ СОМАТИЧЕСКИХ НЕРВОВ

© 2023 г. Т.П. Кузьменко^{*,#}, М.В. Парчайкина^{*}, Э.С. Ревина^{*},
М.Ю. Гладышева^{*}, В.В. Ревин^{*}

^{*}Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва,
Большевикская ул., 68, Саранск, 430005, Россия

[#]E-mail: zyuzina-tatjana@mail.ru

Поступила в редакцию 14.11.2022 г.

После доработки 28.11.2022 г.

Принята к публикации 07.12.2022 г.

Исследовано изменение содержания нейротрофических факторов и белкового состава мембран соматических нервов крысы при повреждении и выживании нервов на фоне действия клобетазола. Показано, что внутримышечное введение препарата по сравнению с его использованием в составе гидрогелевых систем, полученных из микробных полисахаридов, оказывает более выраженное действие на увеличение уровня нейротрофических факторов роста и структурных белков, ответственных за восстановительные процессы, а также стабилизирует содержание общей белковой фракции поврежденных соматических нервов. Меньшая деградация белков травмированного нервного проводника при внутримышечном введении клобетазола вероятно обусловлена большей доступностью препарата при инъекции, чем при его медленном высвобождении из гидрогелевого композита. Кроме этого, увеличение количества ДНК и отдельных белковых фракций указывает на способность клобетазола участвовать в активации генов, связанных с ремиелинизацией. Мы полагаем, что клобетазол активирует синтез нейротрофических факторов роста, запуская тем самым фосфатидилинозитол-3-киназный и митогенактивируемый протеинкиназный сигнальные пути, осуществляющие регуляцию процессов перестройки цитоскелета и аксонального роста, а также активацию синтеза структурных и аксональных белков, необходимых для восстановления функциональной активности травмированных нервных проводников.

Ключевые слова: соматические нервы, травма нерва, нейротрофические факторы роста, клобетазол, регенерация нерва, гидрогелевые системы.

DOI: 10.31857/S0006302923020138, EDN: CAZXGE

В зарубежной и отечественной литературе в настоящее время все большее внимание уделяется роли нейротрофических факторов в функционировании нервной системы. Известно, что нейротрофические факторы являются важнейшими регуляторами процессов пролиферации и дифференцировки нейронов, а также способствуют поддержанию их жизнеспособности за счет участия в контроле физиологического развития и сохранения структурной и функциональной целостности нейронов. Оказываемые данными факторами эффекты реализуются через взаимодействие с различными видами рецепторов семейства тирозинкиназы (Trk-рецепторами) и p75NTR-рецепторами из семейства рецепторов фактора некроза опухоли. Связывание нейротрофических факторов с рецепторами Trk и p75NTR активирует нисходящие сигнальные каскады, в

частности, фосфатидилинозитол-3-киназный (PIK3/Akt) и митогенактивируемый протеинкиназный (MAPK/ERK) сигнальные пути, что способствует дифференцировке и выживаемости нейронов [1, 2].

В настоящее время проблема регуляции различных сигнальных путей для повышения эффективности восстановления поврежденных периферических нервов представляет особый интерес. В связи с ростом количества травматических повреждений периферических нервов, а также из-за низкой эффективности восстановления их функциональной активности необходима разработка новых подходов и способов ускорения регенерационных процессов в травмированных нервных проводниках. Учитывая значимость данной проблемы, в последние годы возрастает интерес исследователей к поиску потенциальных терапевтических агентов — веществ, усиливаю-

Сокращение: NGF — фактор роста нервов.

щих нейропротекцию и стимуляцию регенерации [3–8].

Среди различных классов физиологически активных веществ представляют интерес растительные полифенолы [9], компоненты внеклеточного матрикса [10], но недавно появились сообщения, что глюкокортикоиды, в частности, клобетазол и миконазол [11], проявляют высокую эффективность в интенсификации процесса миелинизации в культурах мозжечковых срезов и *in vivo* у мышей. Системная доставка этих веществ значительно увеличивала количество новых олигодендроцитов и усиливала ремиелинизацию в экспериментальной модели очаговой демиелинизации. Исследования показали, что клобетазол способствует миелинизации в клетках предшественниках олигодендроцитов посредством связывания с глюкокортикоидным рецептором [12]. Кроме этого, клобетазол в значительно меньших концентрациях обладает более выраженным действием по сравнению с другими наружными кортикостероидами [13].

По данным ряда авторов, клобетазол может усиливать дифференцировку и пролиферацию нейрональных стволовых клеток за счет активации нейротрофических факторов, в частности, фактора роста нервов (NGF), нейротрофина-3 и мозгового нейротрофического фактора [14–16]. Помимо этого, клобетазол обладает способностью кортикостероидов подавлять воспалительный ответ в клетках, что может приводить к уменьшению образования глиальных рубцов, ограничивающих разрастание аксонов и регенерацию [16].

Несмотря на большое количество исследований, посвященных способности клобетозола стимулировать регенерационные механизмы в поврежденной нервной ткани, его роль в активации механизмов регенерации при патологии соматических нервов остается недостаточно изученной. Кроме того, все большее внимание исследователей привлекают гидрогели, способные аккумулировать активные вещества и тем самым поддерживать постоянный приток биологически активных веществ, в частности клобетазола в область повреждения [17, 18].

Исходя из вышесказанного, целью данной работы было изучение регуляторной роли нейротрофических факторов на количественное содержание ДНК и состав белков при действии клобетазола. Для достижения цели работы были поставлены следующие задачи:

— исследовать изменение содержания нейротрофических факторов, ДНК, общего белка и отдельных белковых фракций соматических нервов при дегенеративных и регенеративных процессах в соматических нервах на фоне действия клобетазола при его внутримышечном введении и ис-

пользовании в составе гидрогеля из микробных полисахаридов, обеспечивающего постоянный приток действующего вещества в процессе регенерации поврежденных соматических нервов;

— установить взаимосвязь между изменением уровня нейротрофинов и белковым составом травмированного нервного проводника на фоне использования клобетазола.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили седалищные нервы крыс породы *Wistar* со средней массой 250 ± 50 г. Для проведения эксперимента был использован клобетазол в гидрогелевых системах.

Подготовка гидрогеля. Для приготовления гидрогеля использовали 8%-й леван и 2%-й альгинат, которые смешивали в соотношении 1 : 1. Для полимеризации гидрогеля использовали 2%-й раствор CaCl_2 , участвующий в полимеризации геля и образующий ионные сшивки с полисахаридами.

Для определения цитотоксичности гидрогеля с помощью МТТ-теста на линии клеток легких эмбриона человека использовали растворы 0.8%-го левана и 0.2%-го альгината натрия, поскольку исходный раствор с 8%-м леваном и 2%-м альгинатом натрия обладает высокой вязкостью и затрудняет проведение данного теста. Линии клеток легких эмбриона человека культивируют в среде DMEM с добавлением 10% фетальной сыворотки теленка, пенициллина, стрептомицина, глутамина (все — «PanEco», Россия). Клетки снимали с планшетов 0.25%-м раствором трипсина-ЭДТА («PanEco», Россия) и рассаживали в 96-луночный планшет в концентрации 10000 кл/луночка. Затем к клеткам добавляли исследуемые вещества (гидрогель, состоящий из 0.2%-го раствора альгината, 0.8%-го раствора левана, клобетазола в концентрации 0.025 мг/мл, а также эти компоненты по отдельности) с шагом разведения 1 : 2. В качестве контроля к клеткам добавляли среду без препаратов. Цитотоксическое действие материала оценивали с помощью 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромида (МТТ, Sigma Aldrich, США) в концентрации 5 мг/мл согласно методике, описанной в работе [19].

Инкубировали 3.5 ч для образования фиолетовых кристаллов формазана. Затем кристаллы растворяли с помощью раствора диметилсульфоксида на планшетном шейкере 20 мин при температуре 37°C. Оптическую плотность измеряли на мультимодальном ридере Varioscan Lux (Thermo Scientific, США) при длине волны 570 нм против референсной 650 нм. Жизнеспособность оценивали как отношение оптической плотности образца к контролю и выражали в процентах.

Опытные группы. Все животные были разделены на пять групп. 1-я группа — животные без повреждения седалищного нерва (интактные) служила контролем. Животные 2-й опытной группы подвергались перерезке седалищного нерва. Животным 3-й опытной группы после перерезки седалищного нерва внутримышечно вводили клобетазол в концентрации 0.25 мг/кг объемом 100 мкл. У животных 4-й опытной группы после перерезки проксимальную часть нерва обволакивали гидрогелем (8%-й леван, 2%-й альгинат). Для 5-й опытной группы животных гидрогель готовили с добавлением клобетазола, конечная концентрация которого составила в гидрогеле 0.25 мг/мл. Седалищные нервы извлекали через 7, 14 и 30 суток и проводили количественную оценку содержания общего белка, отдельных белковых фракций, а также определяли количественную динамику NGF и нейротрофина-3.

Регистрация потенциалов действия. Отпрепарированные седалищные нервы крысы помещали в раствор Рингера с температурой 37°C, через который осуществляли постоянное продувание кислорода. Измерение осуществляли при следующих параметрах: амплитуда возбуждающего стимула 1.5 В, длительность 0.3 мс, частота раздражения 100 имп/с [20].

Гомогенизация. Седалищные нервы измельчали с помощью гомогенизатора POTTER S (Sartorius, Германия) в пробирке со стеклянным пестиком в 0.8 М сахарозе (весовое соотношение нервов и раствора сахарозы 1 : 2) при 4°C.

Определения количества факторов роста нервов и нейротрофина-3. Для определения количества факторов роста NGF и нейротрофина-3 использовали гомогенат нерва. Количественную оценку молекул проводили методом иммуноферментного анализа с использованием специальных коммерческих наборов (Cloud-Clone Corp., Китай). Опытные образцы, калибраторы и холостые образцы инкубировали в предварительно сенсibilизированных антителами планшетках в течение часа в соответствии с инструкциями производителя. После этого этапа инкубировали с детектирующим агентом А, проводили промывки для удаления несвязанных антител с последующей инкубацией в течение 1 часа с детектирующим агентом В. Наконец, 3,3',5,5'-тетраметилбензидин добавляли с целью взаимодействия его с ферментным конъюгатом и получения цвета раствора. После добавления стоп-реагента останавливали реакцию и незамедлительно приступали к измерению на спектрофотометре, в котором определяли оптическую плотность каждой лунки при поглощении 450 нм (BioTek, США). Результаты были получены из кривых серийного разведения с известными концентрациями, выраженными в пг/мл.

Электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле. При подготовке образцов для электрофоретического разделения белков образцы подвергали делипидизации в смеси хлороформ:метанол:вода (1:2:0,8). Центрифугировали при 10 000g 4°C в течение 10 минут. Затем ресуспендировали в дистиллированной воде, гомогенизировали, центрифугировали при 10 000g, 4°C в течение 10 минут (3 раза).

Концентрацию белка в полученных пробах измеряли методом Лоури, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин [21]. Оптическую плотность определяли на спектрофотометре (Shimadzu, Япония) при длине волны 650 нм.

Состав белков соматических нервов изучали методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия по методу Лэммли [22]. Расчет молекулярной массы исследуемого белка осуществляли по его электрофоретической подвижности, используя метод репрессиионного анализа.

После электрофоретического разделения белки переносили на поливинилиденфторидную мембрану методом электроблоттинга на оборудовании Trans-Blot Turbo (Bio-Rad, США) при напряжении 25 В в течение 7 мин. Контроль переноса белков осуществляли красителем Ponceau S (Bio-Rad, США).

Визуализацию, документацию и количественный анализ полученных белковых гелей осуществляли с помощью геля документирующей системы Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США). Обработку результатов проводили в программе ImageLab.

Иммунодетекцию белков проводили следующим образом. Мембрану с белками инкубировали в течение часа в блокирующем буфере — 5%-м растворе обезжиренного молока на основе фосфатно-солевого буфера с Твин-20. После этого мембрану инкубировали с первичными антителами к GAP-43 (разведение 1:5000) в течение ночи при 4°C в блокирующем буфере. Затем мембрану трижды отмывали в фосфатно-солевом буфере с Твин-20 и инкубировали со вторичными антителами в течение часа при комнатной температуре. Повторяли процедуру отмывки и затем проводили визуализацию. Белки визуализировали на приборе Gel Doc XR+ и обрабатывали с помощью программы ImageLab.

Определение концентрации ДНК. Седалищные нервы измельчали с помощью гомогенизатора POTTER S (Sartorius, Германия) в пробирке со стеклянным пестиком в буфере TE1 при 4°C. Выделение ДНК проводили по методу, описанному в работе [23]. Измерение концентрации проводили на спектрофотометре NanoPhotometer NP80 (Implen, США) при длине волны 260 нм.

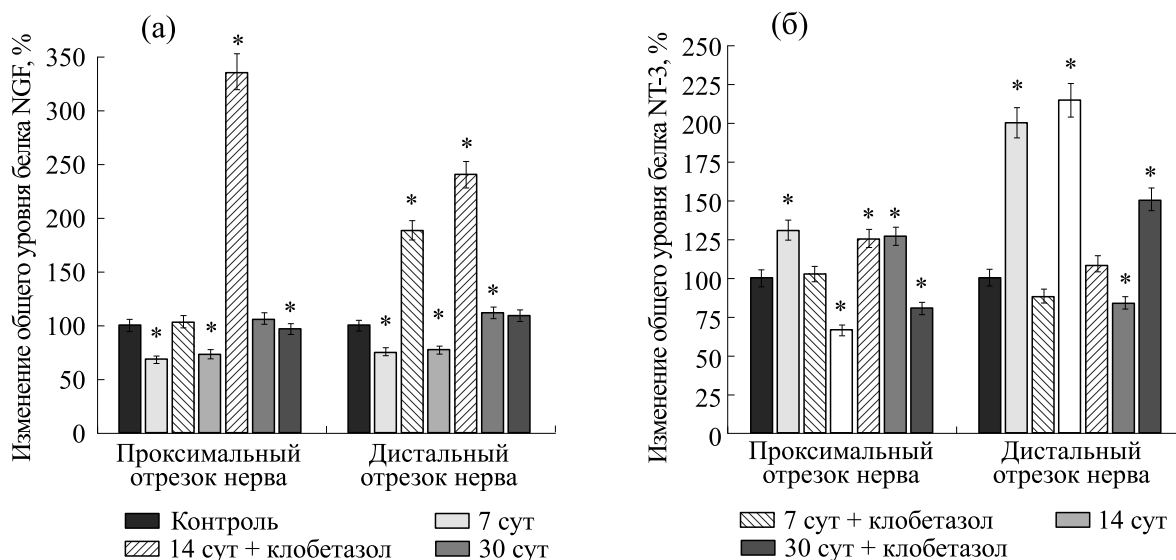


Рис. 1. Влияние клобетазола в концентрации 0.25 мг/кг на изменение общего уровня белка NGF (а) и нейротрофина-3 (б) в поврежденных соматических нервах; * — $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

Полученные экспериментальные данные подвергали статистической обработке с использованием электронных таблиц Microsoft Excel 2016. Сравнение вариантов опытов проводили при 5%-м уровне значимости по t -критерию Стьюдента. Данные представлены как среднее значение и стандартная ошибка ($M \pm m$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нами показано, что при повреждении соматических нервов активируются различные сигнальные пути, участвующие в регуляции процессов дегенерации и регенерации нервных проводников. Для более эффективного протекания регенерационных процессов в нервной клетке необходима активация различных механизмов, опосредуемая введением экзогенных веществ, в частности клобетазола. В основе действия секретруемых факторов роста, обладающих нейротрофическим действием, таких как фактор роста нервов, нейротрофин-3 и нейротрофин-4, лежит их взаимодействие с низкоаффинным рецептором p75NTR и различными изоформами рецепторов, которые относятся к семейству тирозинкиназных рецепторов. Связывание нейротрофических факторов с Trk-рецептором запускает PIK3/Akt и сигнальный путь митогенактивируемой протеинкиназы (MAPK/ERK), а также приводит к активации сигнального комплекса серинтреониновой протеинкиназы mTOR, в результате чего происходит синтез белков, необходимых для аксональной регенерации и наблюдается восстановление способности проводить потенциал дей-

ствия травмированными нервными проводниками [24].

Из литературных данных известно, что при повреждении нерва его центральный и периферический отрезки претерпевают различные изменения [25]. Поэтому представляется интересным исследование глубины развития дегенерационных процессов и влияния клобетазола на процессы регенерации в каждом из участков поврежденного нервного проводника.

Исходя из вышесказанного, на первом этапе эксперимента мы провели исследование уровня NGF в проксимальном и дистальном участках нерва после перерезки, а также внутримышечного введения клобетазола в концентрации 0.25 мг/кг и использования действующего вещества в составе гидрогеля из расчета 0.25 мг/мл.

В результате этого эксперимента выявлено снижение уровня NGF в проксимальном отделе нерва на 31.7 и 26.7% относительно контроля через 7 и 14 суток после повреждения соответственно. Количественное содержание NGF на 30-е сутки составило 106.4% по отношению к контролю (рис. 1а). В дистальном отделе нерва через 7 и 14 суток после повреждения происходило снижение уровня NGF на 24.4 и 22.7% относительно контроля. Количественное содержание NGF на 30-е сутки увеличилось на 11.8% по отношению к контролю.

На фоне введения клобетазола в концентрации 0,25 мг/кг в проксимальном отрезке нерва отмечается увеличение количественного содержания NGF в 3,36 раза по сравнению с контролем к 14-м суткам наблюдения. На 7-е и 30-е сутки достоверных изменений не наблюдалось. В серии

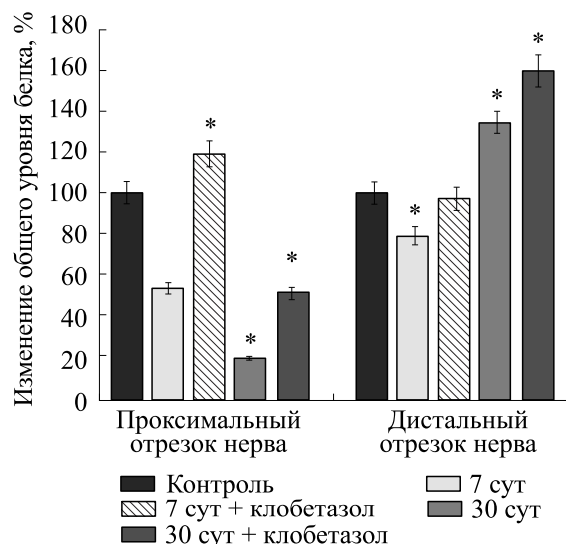


Рис. 2. Влияние гидрогеля на изменение общего уровня белка NGF в поврежденных соматических нервах; * — $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

опытов с использованием препарата в дистальном отделе нерва происходят следующие изменения: концентрация NGF увеличилась в 1.88 и 2.4 раза соответственно по отношению к контролю спустя 7 и 14 суток эксперимента. На 30-е сутки после повреждения наблюдалось увеличение содержания NGF на 9.1% выше уровня контроля.

Помимо изменения уровня NGF, в проксимальном отделе нерва после его перерезки происходит увеличение концентрации NT-3 к 7-м и 30-м суткам наблюдения на 30.7 и 27.2% соответственно по сравнению с контролем (рис. 1б). В дистальном его участке на 7-е сутки наблюдения концентрация нейротрофина превышает контроль в 2 раза, а на 14-е сутки — в 2.14 раза. Увеличение продолжительности воздействия травмы до 30-ти суток сопровождается снижением уровня нейротрофина-3 на 16.2% относительно контроля.

В варианте опыта с клобетазолом в концентрации 0.25 мг/кг в проксимальном отрезке нерва синтез NT-3 увеличился на 25.4% к 14-м суткам эксперимента, а к 30-м суткам его уровень снизился на 19.7% по сравнению с контролем.

В серии опытов с использованием препарата в дистальном отделе нерва происходят следующие изменения: спустя 7 суток после повреждения уровень нейротрофина снизился на 11.5% по отношению к контролю, однако на 14 и 30 сутки после повреждения данные показатели превышают контрольные значения на 9.0% и 50.8% соответственно.

В следующей серии опытов нами было проведено исследование уровня NGF в проксимальном

и дистальном участках нерва после перерезки и с участием гидрогеля с добавлением клобетазола и без него (рис. 2).

Было показано снижение уровня NGF в проксимальном отделе нерва при влиянии гидрогеля на 30-е сутки эксперимента на 80% по сравнению с контрольными значениями. Стоит отметить, что на 7-е сутки при использовании гидрогеля с клобетазолом синтез фактора роста превышал контрольные значения на 20%.

В дистальной части поврежденного нерва синтез NGF происходит наиболее интенсивно, и при наложении гидрогеля к 30-м суткам наблюдения содержание фактора роста увеличивалось на 34% относительно контроля. Добавление в гидрогель клобетазола способствовало увеличению концентрации фактора роста на 60% по сравнению с контрольным значением.

Из литературы известно, что активация Akt в процессе запуска фосфатидилинозитол-3-киназного сигнального пути сопровождается антиапоптотическим эффектом за счет экспрессии генов, участвующих в дифференцировке и выживаемости клеток. Таким образом, фосфатидилинозитол-3-киназа и серин-треониновая киназа Akt, активируемые при участии факторов роста, опосредуют рост аксонов. В этом сигнальном пути образование фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфата приводит к фосфорилированию Akt, которая, в свою очередь, вызывает фосфорилирование факторов транскрипции из семейства FOXO, киназы гликогенсинтазы-3 (GSK-3) и регуляторов комплекса 1 мишени рапамицина у млекопитающих (mTORC1), контролирующих синтез белков в клетке [26, 27]. С другой стороны, показано, что ERK1/2, один из участников MAP-киназного сигнального пути, также связан с активацией ветвления и аксонального роста нервных волокон за счет экспрессии антиапоптотических факторов транскрипции [28].

Учитывая вышеприведенные данные, на следующем этапе мы провели серию экспериментов по исследованию изменения концентрации ДНК, общего содержания белка и отдельных белковых фракций в дистальном и проксимальном отрезках поврежденного нервного проводника на фоне внутримышечного введения клобетазола.

Было показано, что к 14-м суткам наблюдения содержание ДНК в проксимальном отделе нерва после его перерезки снизилось на 15.3% относительно контроля, а на 30-е сутки эксперимента ее концентрация приблизилась к контрольным значениям (рис. 3а).

В дистальном отрезке нерва содержание ДНК спустя 7, 14 и 30 суток наблюдения уменьшилось на 18.8, 66.2 и 64.3% соответственно по сравнению с контролем. Было показано, что при действии клобетазола из расчета 0.25 мг/кг в прокси-

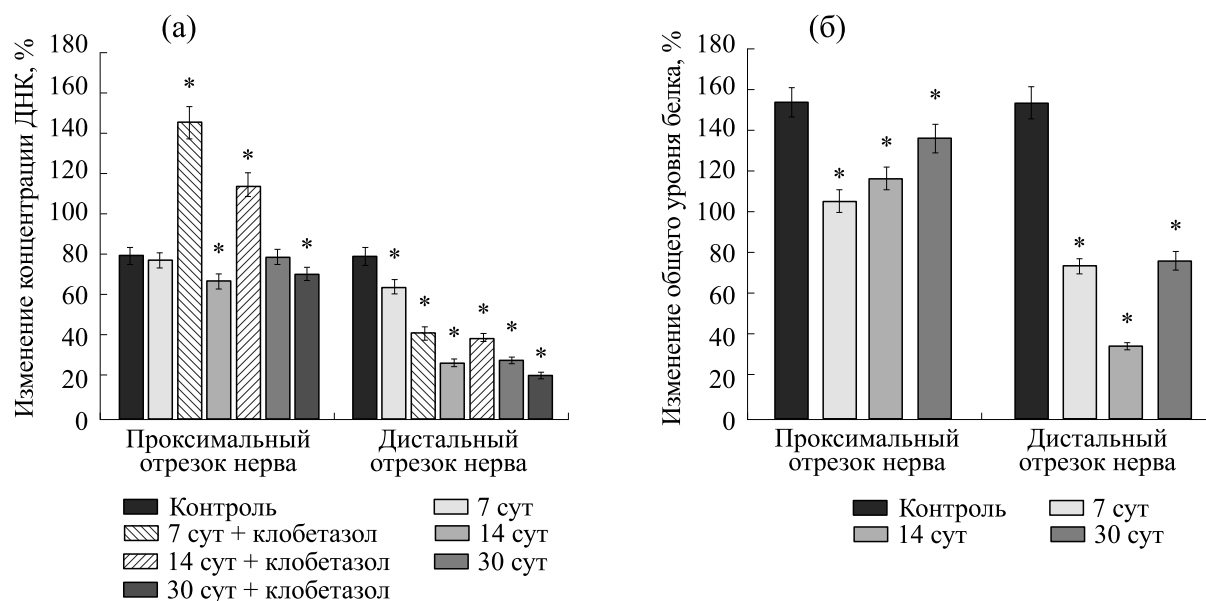


Рис. 3. Изменение концентрации ДНК (а) и общего содержания белка (б) в поврежденных соматических нервах в норме (контроль) и при перерезке нерва; * – $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

мальном отделе нерва после его травмы концентрация ДНК возрастала в 1.8 и 1.4 раза на 7-е и 14-е сутки относительно контрольных значений.

Наиболее ранние изменения белкового состава нерва обнаруживались уже в первые семь суток после повреждения нерва (рис. 3б). Это согласуется с литературными данными, указывающими на то, что дегенерационные процессы развиваются в течение пяти-семи суток после травмы нервного проводника [29].

Так, в проксимальной части нерва спустя семь суток после травмы содержание белка уменьшилось на 30,7% по отношению к контролю. К 30-м суткам его уровень в поврежденных соматических нервах остается ниже контрольного значения на 10.5%. В дистальном отделе наблюдалось существенное снижение содержания белка к 14-м суткам эксперимента более чем в четыре раза по отношению к контролю. К 30-м суткам наблюдения этот показатель по-прежнему остается ниже контрольного значения на 50%.

Таким образом, при перерезке нервного проводника в обоих его участках наблюдается снижение количества белка, но наиболее выраженные изменения происходят в его дистальном отрезке из-за исчезновения центральной регуляции и усиления дегенерационных процессов в результате отсутствия регуляторных механизмов.

Выживание нейронов также поддерживается с участием MAPK/ERK-зависимой внутриклеточной сигнализации. Из литературы известно, что нейрофиламенты нервной ткани, составляющие основу цитоскелета, участвуют в обеспечении

медленного аксонального транспорта [30]. В частности, тубулин входит в состав цитоплазматических микротрубочек, которые наряду с белками промежуточных филаментов играют важную роль в образовании внутриклеточного скелета. В росте аксонов под действием нейротрофинов принимает участие большое количество малых G-белков, которые преобразуют активный цитоскелет, MAP-киназы, опосредующие эти эффекты, а также белки семейства MAP, ассоциированные с микротрубочками и стабилизирующие тубулиновый цитоскелет. Среди многочисленных семейств малых G-белков выделяют два семейства, осуществляющих регуляцию роста аксона и связанных с ним перестройками актинового цитоскелета. Во-первых, это семейство малых G-белков Rho, активация которых приводит к изменению морфологии клетки, а именно Ras1 и Cdc42 в ГТФ-связанной форме взаимодействуют с p21-активируемой серин/треониновой киназой PAK1. После этого, PAK1 фосфорилирует различные мишени, среди которых имеются белки-регуляторы полимеризации актина, в частности Arp 2/3 и белок филамин А, отвечающие за ветвление актиновых фибрилл) и белки-регуляторы динамики тубулинового цитоскелета. Ко второй группе малых G-белков относятся белки из семейства Ras-белков. Так, G-белок Rit1 из этого семейства запускает ветвление и аксональный рост путем активации митоген-активируемой протеинкиназы ERK1/2 [31-33]. Кроме этого, для выявления регенерирующих аксонов чаще других в экспериментальных исследованиях используют белок GAP-43, который синтезируется

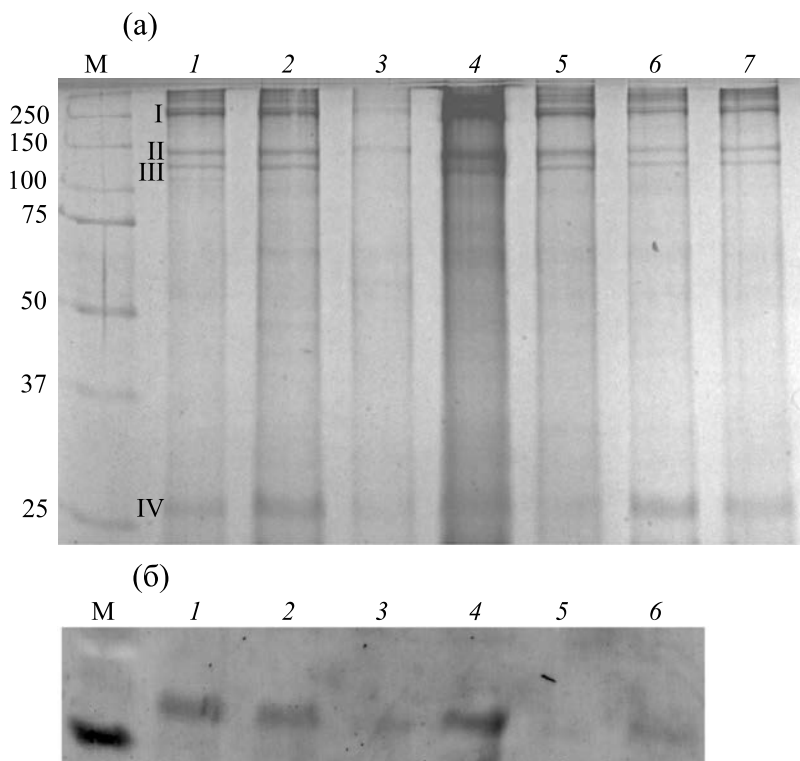


Рис. 4. Электрофореграмма белков (а) и вестерн-блот анализ уровня GAP-43 (б) поврежденных соматических нервов, выделенных через 7, 14 и 30 суток после перерезки: М — маркер; 1 — контроль; 2 — проксимальный участок, 7 суток; 3 — дистальный участок, 7 суток; 4 — проксимальный участок, 14 суток; 5 — дистальный участок, 14 суток; 6 — проксимальный участок, 30 суток; 7 — дистальный участок, 30 суток; I — нейрофиламенты-Н, II — нейрофиламенты-М, III — тубулин; IV — GAP-43.

во время роста аксонов при развитии нейронов и регенерации аксонов в периферической и центральной нервной системе [34].

Исходя из этого, на следующем этапе эксперимента методом электрофореза в полиакриламидном геле был изучен качественный состав белковой фракции исследуемых интактных и поврежденных нервов. В интактном нерве были выявлены белки нейрофиламентов-Н (190–200 кДа), нейрофиламентов-М (140–160 кДа), тубулина (110 кДа), GAP-43 (27 кДа) (рис. 4).

Согласно результатам проведенных исследований, в проксимальном отрезке нерва через 14 суток после травмы отмечалось снижение содержания нейрофиламента-Н и тубулина на 22.8 и 22.0% соответственно, а с увеличением послеоперационных сроков до 30 суток их уровень возрастал на 9.8 и 34.8% по сравнению с контрольными значениями. Содержание нейрофиламента-М спустя семь суток после перерезки снизилось на 12.2%, а к 30-м суткам возросло на 13.8% относительно контроля. Следует отметить, что уровень GAP-43 возрастает как на 7-е, так и на 30-е сутки эксперимента в 1.3 и в 2.3 раза соответственно по сравнению с неповрежденным нервом (рис. 5).

В дистальном отрезке нерва через семь суток после повреждения количественное содержание фракций NF-Н, NF-М и тубулина уменьшилось более чем в два раза относительно контроля (рис. 5).

Было показано, что содержание нейрофиламента-Н, нейрофиламента-М и тубулина на 30-е сутки возросло относительно контроля на 39.7, 26.0 и 14.5% соответственно. Интенсивность GAP-43 снизилась к 14 суткам наблюдения на 40.4%, однако с увеличением времени повреждающего воздействия до 30 суток отмечается увеличение данного показателя в 1.6 раза по сравнению с контрольным значением.

Известно, что после перерезки в нервном проводнике начинаются процессы демиелинизации в результате выработки оксида азота (NO), альфа-фактора некроза опухоли и протеаз, что сопровождается нарушением или полной потерей аксональной проводимости. В клетке происходит повышенная экспрессия натриевых каналов, приводящая к временному восстановлению аксональной проводимости, что вызывает усиленный приток ионов Ca^{2+} , который в конечном итоге активирует многочисленные ферментные каскады, включая аксональный кальпаин [35]. Вероятнее

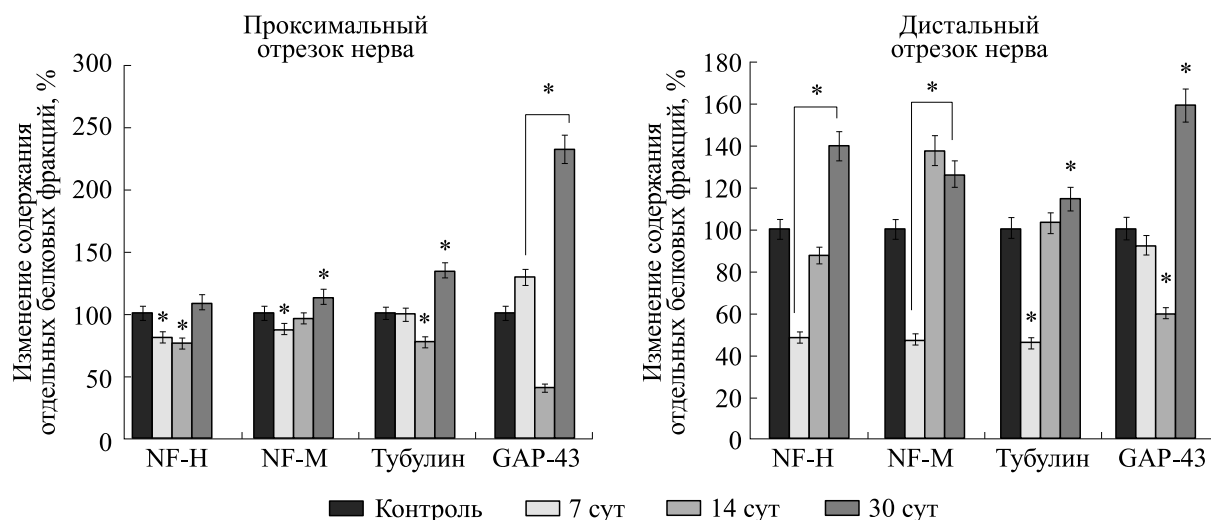


Рис. 5. Изменение содержания отдельных белковых фракций в поврежденных соматических нервах; * — $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

всего, кальпаин разрушает множество нейронных белков, с чем и связано снижение содержания белка как в проксимальном, так и в дистальном отделе на протяжении семи суток наблюдения. В то же время в ответ на повреждение клетка начинает синтезировать белки, участвующие в регенерации нерва. Так, с увеличением времени повреждающего воздействия до 30 суток в проксимальном отделе нерва начинается синтез структурных белков, в частности, NF-H, NF-M, тубулина, что свидетельствует о репаративной регенерации ми-

елиновых оболочек нервных волокон, которая активно протекает до 50-х суток эксперимента [36].

Как уже упоминалось нами выше, нейротрофические факторы способны запускать сигнальные пути, направленные на усиление метаболических и синтетических путей в нервной клетке, в частности активировать синтез белков. В этой связи, клобетазол может выступать в качестве эффективного биологически активного соединения, влияющего на регенерационные процессы [11] и нервную проводимость [16] за счет регуляции механизмов, опосредованных действием нейротрофических факторов.

Было показано, что при воздействии клобетазола в концентрации 0.25 мг/кг в проксимальном отделе нерва содержание белка снизилось на 59.6% по сравнению с контролем к 7-м суткам после травмы. В этой же серии опытов на 14-е сутки наблюдения уровень белка остается ниже контрольного значения на 45.6% (рис. 6), а спустя 30 суток после перерезки количественное содержание белка незначительно превышает контроль (на 5.3%).

На фоне действия препарата в дистальном отрезке нерва спустя 7 и 14 суток эксперимента наблюдается существенное снижение содержания белка на 40.0 и 72.6% соответственно по отношению к контролю. Увеличение времени повреждающего воздействия до 30 суток сопровождается небольшим возрастанием количества белка (до уровня 51% по отношению к интактному нерву).

Электрофоретический анализ белковой фракции поврежденных соматических нервов при введении клобетазола из расчета 0.25 мг/кг показал, что в проксимальном участке интенсивнее прояв-

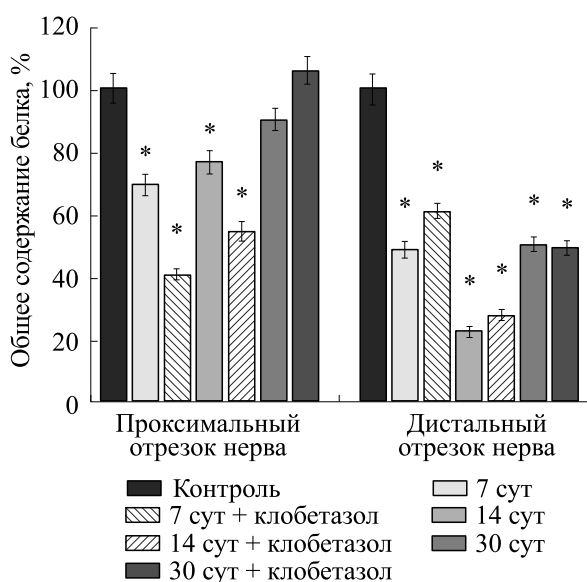


Рис. 6. Влияние клобетазола в концентрации 0,25 мг/кг на общее содержание белка в поврежденных соматических нервах крысы; * — $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

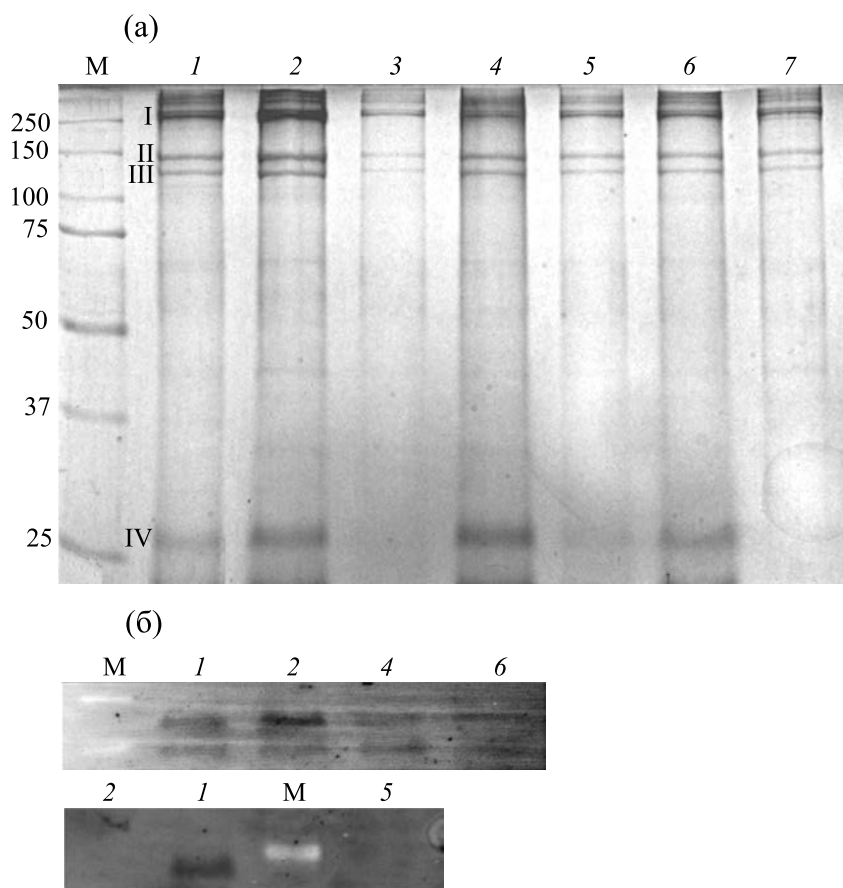


Рис. 7. Электрофореграмма белков (а) и вестерн-блотт анализ уровня GAP-43 (б) в поврежденных соматических нервов крысы при введении клобетазола в концентрации 0.25 мг/кг: М — маркер; 1 — контроль; 2 — проксимальный участок, 7 суток; 3 — дистальный участок, 7 суток; 4 — проксимальный участок, 14 суток; 5 — дистальный участок, 14 суток; 6 — проксимальный участок, 30 суток; 7 — дистальный участок, 30 суток; I — нейрофиламенты-Н, II — нейрофиламенты-М, III — тубулин; IV — GAP-43.

ляются белки цитоскелета на 30-е сутки по сравнению с контрольной пробой, а белки, связанные с аксональным ростом, — как на 14-е, так и на 30-е сутки после повреждения (рис. 7).

В проксимальной части поврежденного нерва при воздействии клобетазола из расчета 0,25 мг/кг произошло снижение содержания NF-Н и NF-М на 18.6 и 15.7% к 14-м суткам эксперимента, а к 30-м суткам данные показатели увеличились на 88.2 и 41.8% соответственно по сравнению с контролем. В серии опытов с введением препарата содержание тубулина также снизилось на 29.5% к 7-м суткам наблюдения, а к 30-м суткам его содержание возросло на 39.9% относительно контроля. Следует отметить, что уровень GAP-43 также меняется: к 7-м суткам его содержание уменьшается в 1.32 раза, а на 14-е и 30-е сутки превышает контроль в 1.8 и 2.7 раза соответственно (рис. 8).

Исследование белковой фракции дистального отрезка поврежденных нервных проводников в варианте опыта с введением препарата показало

увеличение содержания нейрофиламента-Н в 1.5 раза по сравнению с контролем к 30-м суткам эксперимента в серии опытов с введением клобетазола в концентрации 0.25 мг/кг. При этом содержание нейрофиламента-М снизилось на 26.9% к 7-м суткам наблюдения, а к 30-м суткам стало равным контролю. Содержание тубулина в течение 14 суток находилось в пределах погрешности контрольного значения, а к 30-м суткам увеличилось на 26% относительно уровня контроля. На 7-е и 30-е сутки интенсивность белковой фракции GAP-43 резко снизилась — на 88.2 и 44.9% соответственно по сравнению с контролем, а к 14-м суткам уровень GAP-43 превышал контрольные значения на 14.5% (рис. 8).

Электрофоретический анализ показал, что в варианте опыта с клобетазолом наблюдается снижение содержания нейрофиламента-М относительно контроля в проксимальном отделе нерва на протяжении 14-ти суток эксперимента. В дистальном же его отрезке происходит снижение белков цитоскелета.

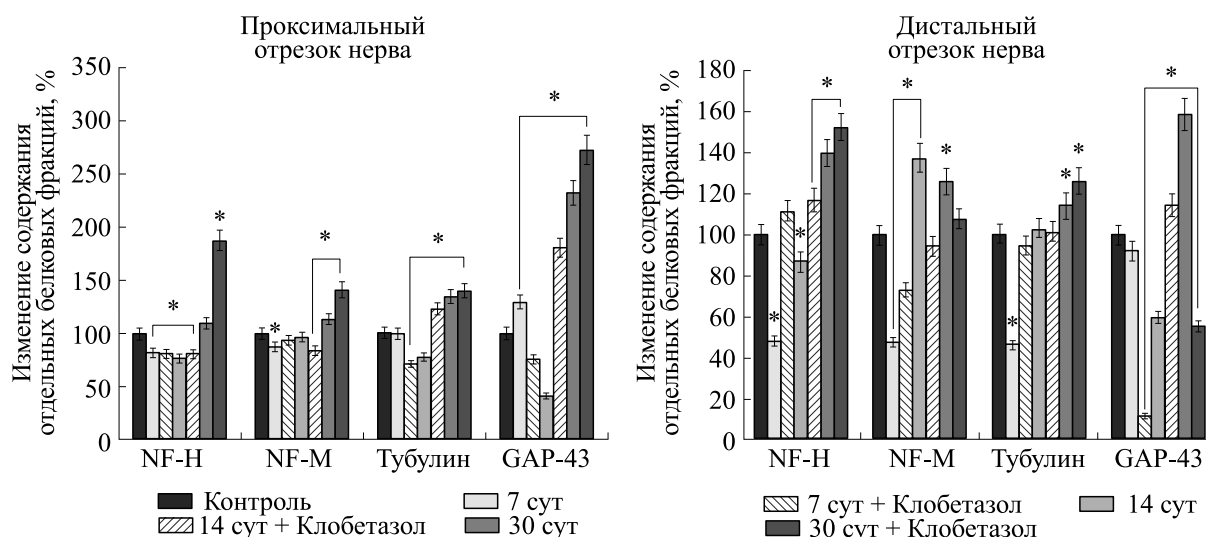


Рис. 8. Влияние клобетазола в концентрации 25 мг/кг на содержание отдельных белковых фракций в поврежденных соматических нервах крысы; * — $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

Следует отметить, что к 30-м суткам наиболее выраженные изменения белкового состава наблюдаются в проксимальном участке нерва при введении клобетазола в концентрации 0.25 мг/кг, что сопровождается увеличением общего белка на 15.8% по сравнению с поврежденным нервом без воздействия препарата. При этом отмечается увеличение содержания белковых полос NF-M и тубулина.

В литературе имеются сообщения, указывающие на способность клобетазола участвовать в стимуляции пролиферации шванновских клеток и активации генов, связанных с ремиелинизацией [37]. Важное значение шванновских клеток, как клеток, осуществляющих миелинизацию нервных волокон, обусловлено их способностью синтезировать нейротрофические факторы, в частности, фактор роста нервов и нейротрофин-3. Связывание факторов роста со своими рецепторами p75NTR и Trk включает сигнальную цепь от активированного Ras, в которой сигнал передается через фосфатидилинозитол-3-киназу (PI3K) на группу белков, играющих ключевую роль в контроле над организацией и динамикой цитоскелетных систем, актиновых микрофиламентов и микротрубочек [38]. Вероятнее всего, клобетазол способствует увеличению содержания факторов роста, играющих важную роль в стимуляции синтеза нейрофиламентов и тубулина. Об этом свидетельствуют полученные нами данные об увеличении количества ДНК в этих же условиях эксперимента, что однозначно свидетельствует об усилении регенерационных процессов в нерве.

В настоящее время в фармакологической индустрии широко применяются различные носители для доставки лекарственных препаратов. Данное направление имеет ряд преимуществ перед традиционными способами введения лекарственных препаратов: носители обеспечивают контроль над высвобождением, способствуют защите от ферментативного и химического разложения и повышают эффективность и/или снижают токсичность лекарств, а также сглаживают неравномерную скорость поступления активных веществ в область повреждения. Поэтому следующим этапом нашего исследования было изучение влияния клобетазола в составе гидрогеля на изменение концентрации ДНК в каждом из отрезков поврежденного нервного проводника. Проведение МТТ-теста выявило, что гидрогель, состоящий из 0.8%-го раствора левана, 0.2%-го раствора альгината и клобетазола в концентрации 0.025 мг/мл, оказывает статистически значимое цитотоксическое действие на клетки легких эмбриона человека (рис. 9). Наименьшее цитотоксическое действие наблюдается при разведении исходных компонентов в 128 раз, выживаемость клеток при этом составляет 72%.

Было установлено, что на 7-е сутки эксперимента при использовании гидрогеля в проксимальном отделе нерва отмечается снижение концентрации ДНК на 19.2% относительно контроля, но уже на 30-е сутки после перерезки концентрация ДНК становится равной контрольным значениям (рис. 10а). При добавлении в гидрогель клобетазола в конечной концентрации 0.25 мг/мл на 30-е сутки после перерезки нерва

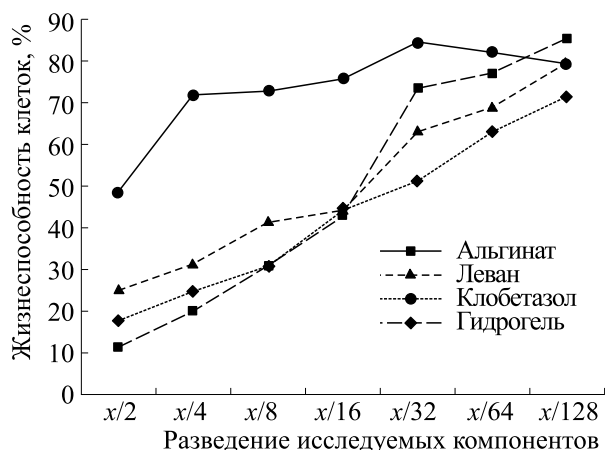


Рис. 9. Определение жизнеспособности клеток при влиянии гидрогеля и отдельных его компонентов.

концентрация ДНК значительно увеличивается — на 45.5% относительно контроля. Таким образом, увеличение содержания ДНК в проксимальном отрезке нерва свидетельствует об активации регенерационных процессов в нервном проводнике после травмы.

Согласно вышеприведенным литературным данным, активация генов, связанных с ремиелинизацией, сопровождается запуском сигнальных путей, осуществляющих регуляцию процессов перестройки цитоскелета и аксональных белков, в связи с чем необходимо было исследовать изменение содержания общего белка и отдельных белковых фракций в поврежденных соматических нервах на фоне использования клобетазола в со-

ставе гидрогеля. В ходе проведенного исследования было показано, что на 7-е и 30-е сутки после перерезки и использования гидрогеля без препарата содержание общего белка в проксимальном отделе нерва меньше на 31.2 и 27.4% по сравнению с контрольными значениями. При добавлении в гидрогель клобетазола в конечной концентрации 0.25 мг/мл на 30 сутки после перерезки нерва в его проксимальном отрезке содержание общего белка равно контрольным показателям (рис. 10б).

Анализ электрофореграммы поврежденных белков при добавлении гидрогеля, содержащего клобетазол в конечной концентрации 0.25 мг/мл, показал, что в проксимальном отделе интенсивнее проявляются белки цитоскелета на 30-е сутки по сравнению с аналогичной серией эксперимента без добавления клобетазола (рис. 11а,в).

В проксимальной части поврежденного нерва при наложении гидрогеля после перерезки нерва произошло снижение содержания белков цитоскелета: NF-H и NF-M на 68.3 и 79.9% соответственно, тубулина — на 74.7% к 7-м суткам эксперимента. К 30-м суткам данные показатели увеличились по сравнению с 7-ми сутками эксперимента, но были снижены на 31.0, 65.5 и 34.5% соответственно по сравнению с контролем (рис. 11б).

Содержание GAP-43 в течение 7 и 30 суток эксперимента было ниже контрольных значений — на 59.6 и 24.6% соответственно. В серии опытов с введением препарата в гидрогель содержание NF-H и тубулина к 30-м суткам наблюдения уве-

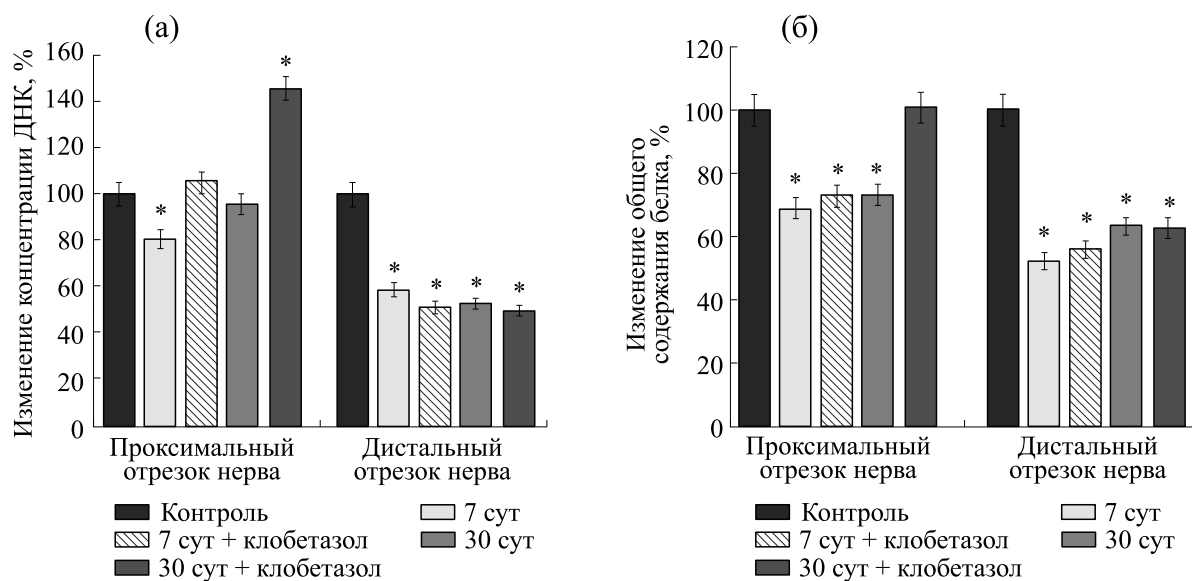


Рис. 10. Изменение концентрации ДНК (а) и общего содержания белка (б) в поврежденных соматических нервах через 7 и 30 суток после перерезки при влиянии гидрогеля.

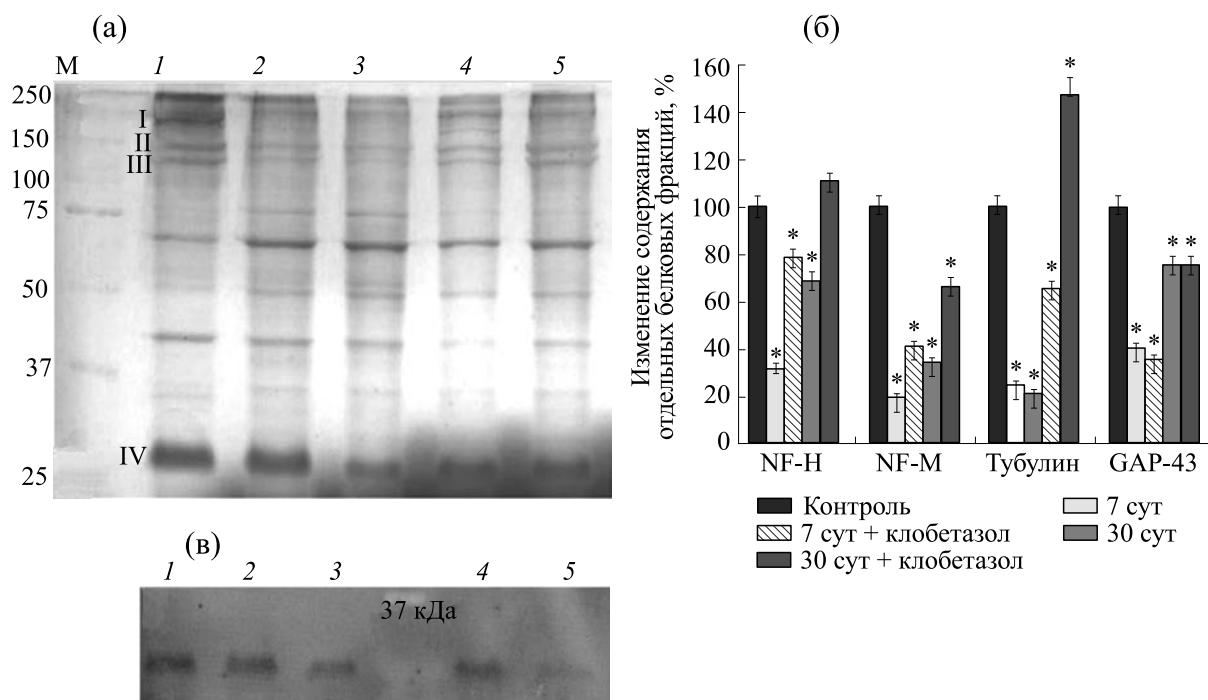


Рис. 11. Электрофореграмма белков (а), изменение отдельных белковых фракций поврежденных нервов (б) и вестерн-блот анализ уровня GAP-43 (в) при влиянии гидрогеля: М — маркер; 1 — контроль; 2 — 7 суток; 3 — 7 суток при добавлении клобетазола в гидрогель; 4 — 30 суток; 5 — 30 суток при добавлении клобетазола в гидрогель; I — нейрофиламенты-Н, II — нейрофиламенты-М, III — тубулин, IV — GAP-43; * — $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

личилось на 11.0 и 47.2% соответственно по сравнению с контролем.

Таким образом, постоянное присутствие и приток действующего вещества из гидрогеля способствует меньшей деградации белков поврежденного нерва в процессе дегенерации. Следует отметить, что на 30-е сутки наибольшее воздействие действующее вещество оказывает на синтез тубулина: его содержание увеличилось на 47.2% относительно контрольных значений. Однако при заданной постановке эксперимента введение клобетазола в составе гидрогеля негативно повлияло на синтез маркера аксонального роста — GAP-43.

Известно, что важнейшей характеристикой, отражающей эффективность протекания регенерационных процессов является способность нервных волокон проводить потенциал действия. В результате полученной травмы проводимость нерва заметно снижается в проксимальном его участке и полностью утрачивается в дистальном отрезке нервного проводника. С увеличением времени эксперимента восстановление способности проведения потенциала действия с небольшой амплитудой отмечается только в проксимальном отрезке нерва за счет сохранения центральной иннервации, благодаря которой осуществляется четкая регуляция и контроль над

функциональным состоянием нервных проводников. Было показано, что использование препарата в составе гидрогеля оказывает менее выраженное действие на восстановление проводимости нервных волокон по сравнению с увеличением амплитуды потенциалов действия до контрольных значений в серии опытов с внутримышечным введением клобетазола в концентрации 0.25 мг/кг (рис. 12). Таким образом, полученные нами данные по исследованию влияния клобетазола на содержание фактора роста нервов, ДНК и отдельных белковых фракций в проксимальном и дистальном отрезках травмированного нервного проводника коррелируют с восстановлением функциональной активности поврежденных соматических нервов.

ВЫВОДЫ

Исходя из полученных результатов, введение клобетазола усиливает восстановительные процессы в травмированном нерве: наблюдается увеличение уровня нейротрофических факторов роста (NGF и нейротрофин-3), нормализация содержания отдельных белковых фракций, синтез ДНК, структурных белков (нейрофиламенты-Н, нейрофиламенты-М, тубулин), а также ключевого маркера аксонального роста белка GAP-43 как

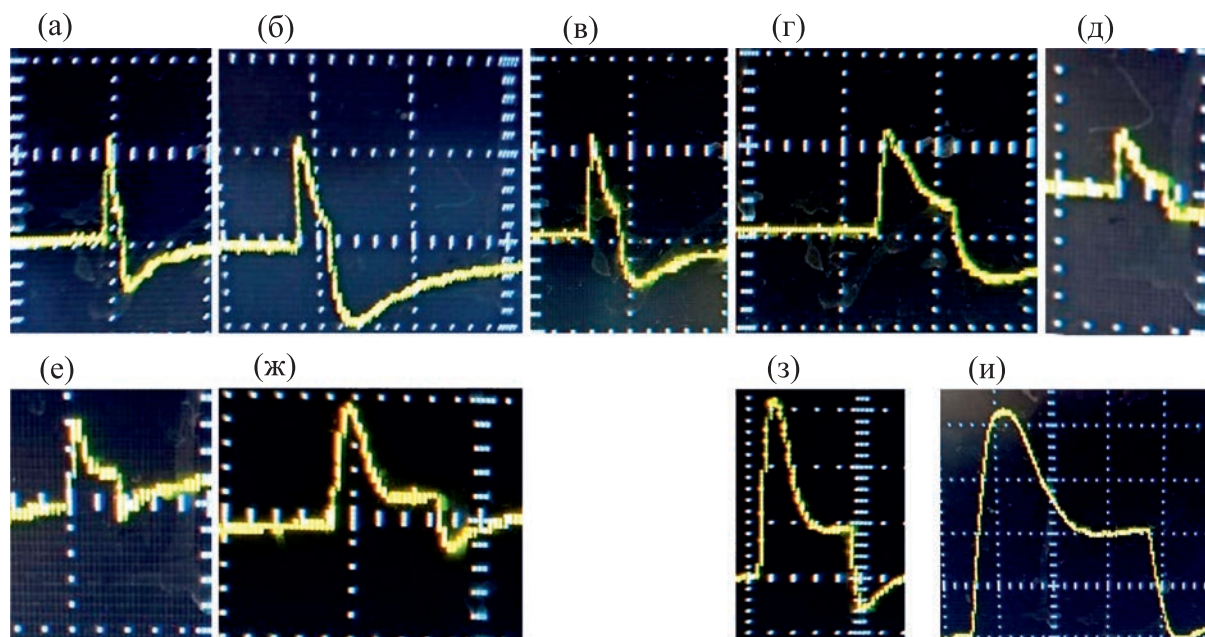


Рис. 12. Потенциал действия соматического нерва крысы: интактный нерв (а); инкубация в растворе Рингера 5 мин (б) и 20 мин (в); инкубация в растворе клобетазола 0.25 мг/мл 5 мин (г) и 20 мин (д); 24 сутки после повреждения (е) и при в/м введении клобетазола в концентрации 0.25 мг/кг (ж); 24 сутки после перерезки и наложения геля без вещества (з) и с клобетазолом в концентрации 0.25 мг/мл геля (и). Масштаб по шкале потенциала: (а)–(ж) – 100 мВ на клетку, (з)–(и) – 20 мВ на клетку; масштаб по времени: (а) – 0.5 мс, (б, в, д, е) – 0.25 мс, (г, ж, з) – 0.1 мс, (и) – 0.025 мс на клетку.

в проксимальном, так и в дистальном отрезках нервного проводника. Эти данные также согласуются с восстановлением способности соматических нервов проводить потенциал действия на фоне действия клобетазола, что свидетельствует об эффективном протекании регенерационных процессов в травмированных нервных проводниках. Проведя сравнительный анализ внутримышечного введения препарата и его использования в составе полимера из микробных полисахаридов, было показано, что внутримышечное использование клобетазола сопровождалось усиленным синтезом не только белков цитоскелета, но и белков, связанных с аксональным ростом, ответственных за восстановительные процессы в нервной ткани на протяжении всего периода эксперимента. Таким образом, внутримышечное введение клобетазола способствует более выраженному синтезу ДНК, нейротрофических факторов и белковых фракций по сравнению с использованием клобетазола в составе гидрогеля. В результате внутримышечного введения препарата стабилизация белкового состава поврежденных соматических нервов наблюдается на более ранних сроках после травмы, и стимуляция регенерационных механизмов за счет активации синтеза ДНК в поврежденной нервной ткани протекает наиболее эффективно. Менее выраженный эффект клобетазола в составе гелевого препарата,

по-видимому, объясняется более медленным его выходом из гелевого композита.

Таким образом, полученные нами результаты исследований согласуются с литературными данными, указывающими на способность клобетазола участвовать в активации синтеза нейротрофических факторов шванновскими клетками за счет связывания с глюкокортикоидными рецепторами нервных клеток. Вероятнее всего на фоне увеличения уровня нейротрофинов происходит активация фосфатидилинозитол-3-киназного пути, что сопровождается синтезом белков и возрастанием их количественного содержания, а также уровня нейрофиламентов и тубулина. Кроме этого, важная роль в аксональной регенерации отводится сигнальному пути митогенактивируемой протеинкиназы (MAPK/ERK), поскольку малые G-белки, являющиеся участниками этого сигнального пути, осуществляют регуляцию процессов перестройки цитоскелета и рост аксонов. Увеличение уровня ДНК и восстановление способности проводить потенциал действия поврежденными нервными проводниками указывает на активизацию процессов регенерации в соматических нервах после травмы. Таким образом, клобетазол опосредует синтез нейротрофических факторов, которые запускают PIK3/Akt и MAPK/ERK сигнальные пути, в результате чего повышается экспрессия различных факторов

транскрипции, контролирующих синтез отдельных белковых фракций, в том числе белков цитоскелета и белков аксонального роста, необходимых для восстановления функциональной активности поврежденных нервных волокон. Об этом же свидетельствует появление потенциала действия и способности нерва к его проведению.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках фундаментальной НИР № г/б 16-20 (ГЗ 01 10 0210059 611) «Поиск и выделение из природных источников продуцентов полисахаридов и их полногеномный анализ с целью увеличения продуктивности и создания функциональных материалов нового поколения с широким спектром применения, обладающих сверхнизкой теплопроводностью, плотностью, антибактериальными и регенерирующими свойствами».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с животными осуществляли в соответствии с «Правилами проведения работы с использованием экспериментальных животных» (Приказ Минвуза от 13.11.1984 г. № 742).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. X. Zhang, X. He, Q. Li, et al., *Stem Cell Rep.*, **9** (8), 1256 (2017).
2. K. Sánchez-Alegría, M. Flores-León, E. Avila-Muñoz, et al. *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 3725 (2018).
3. V. V. Revin, M. A. Yudanov, and G. V. Maksimov, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **142** (2), 191 (2006).
4. S. I. Pinyaev, T. P. Kuzmenko, N. V. Revina, et al., *BioMed Res. Int.*, **2019**, 1–9 (2019).
5. M. V. Isakina, N. V. Revina, and V. V. Revin, *Biol. Med.*, **7** (2), (2006).
6. Z. Du, O. Bondarenko, D. Wang, et al., *J. Cell Physiol.*, **231** (6), 1301 (2016).
7. O. Bota and L. Fodor, *Drug Metab. Rev.*, **51** (3), 266 (2019).
8. П. К. Мирошникова, А. В. Люндуп, Н. П. Бацаленко и др., *Вестн. РАМН*, **73** (6), 388 (2018).
9. V. V. Revin, S. I. Pinyaev, M. V. Parchaykina, et al., *Front. Physiol.*, **10**, 384 (2019).
10. F. Gonzalez-Perez, E. Udina, and X. Navarro, *Int. Rev. Neurobiol.*, **108**, 257 (2013).
11. F. J. Najm, M. Madhavan, A. Zaremba, et al., *Nature*, **522** (7555), 216 (2015).
12. S. Morisaki, M. Nishi, and H. Fujiwara, *Glia*, **58**, 954 (2010).
13. А. Н. Хлебникова, *Фармакотерапия в дерматоневрологии*, **5**, 124 (2010).
14. X. Fontana, M. Hristova, and C. Da Costa, *J. Cell Biol.*, **198**, 127 (2012).
15. T. M. Brushart, M. Aspalter, J. W. Griffin, et al., *Exp. Neurol.*, **247**, 272 (2013).
16. W. Shi, S. Bi, Ya. D. et al., *Exp. Ther. Med.*, **18** (2), 1258 (2019).
17. И. Я. Бозо, А. И. Билялов, М. О. Мавликеев и Р. В. Деев, *Гены и клетки*, **14** (1), 16 (2019).
18. D. Nunes, S. Andrade, M. J. Ramalho, et al. *Polymers (Basel)*, **14** (5), 1010 (2022).
19. T. Mosmann. *J. Immunol., Methods*, **65**, 55 (1983).
20. В. В. Ревин, Дис. ... д-ра биол. наук (Институт биологической физики АН СССР, Минск, 1990).
21. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, et al., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
22. U. K. Laemmli, *Nature*, **227**, 680 (1970).
23. L. L. Boodram, in *Protocol Online — Your Lab's Reference Book — online database of research protocols in a variety of life science fields* (2006). <http://www.protocolonline.org/prot/Protocols/Extraction-of-genomic-DNA-from-whole-blood-3171.html>.
24. F. Ahmed, E. Zapata-Mercado, S. Rahman, and K. Hristova. *Biophys J.*, **120** (1), 55 (2021).
25. А. И. Продан, Л. М. Бенгус и А. А. Сиренко, *Ортопедия, травматология и протезирование*, **3** (2), 66 (2010).
26. H. Querfurth and H. K. Lee, *Mol. Neurodegener.*, **16** (1), 44 (2021).
27. H. Huang, H. Liu, R. Yan, and M. Hu, *Neurochem. Res.*, **42** (12), 3515 (2017).
28. S. R. Hutton, J. M. Otis, E. M. Kim, et al., *J. Neurosci.*, **37** (34), 8102 (2017).
29. M. Caillaud, L. Richard, J.-M. Vallat, et al. *Neural Regen. Res.*, **14** (1), 24 (2019).
30. A. Yuan, M. V. Rao, Veeranna, and R.A. Nixon, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **9** (4), a018309 (2017).
31. C. Galindo-Romero, B. Vidal-Villegas, J. Asís-Martínez, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (19), 10896 (2021).
32. J. E. Kim, Y. H. Cho, and T. B. Seo, *J. Exerc. Rehabil.*, **16** (2), 141 (2020).
33. Q. Cai, G. Wu, M. Zhu, et al., *Life Sci.*, **248**, 117465 (2020).
34. D. Chung, A. Shum, and G. Caraveo, *Front. Cell Dev. Biol.*, **8**, 567537 (2020).
35. S. Y. Cheng, S. C. Wang, M. Lei, et al., *Neural Regen. Res.*, **13** (3), 556 (2018).
36. С. С. Архипова, И. С. Рагинов, А. Р. Мухитов и Ю. А. Чельшев, *Морфология*, **135** (3), 29 (2009).
37. L. Zhang, W. Yang, H. Xie, et al., *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **5** (3), 1426 (2019).
38. А. Е. Ковражкина, Л. В. Стаховская, О. Д. Разинская и А. В. Сердюк, *Журн. неврологии и психиатрии*, **5**, 143 (2018).

Influence of Neurotrophic Factors on Protein Composition during Somatic Nerve Injury and Regeneration

T.P. Kuzmenko*, M.V. Parchaikina*, E.S. Revina*, M.Yu. Gladysheva*, and V.V. Revin*

**National Research Ogarev Mordovia State University, Bol'shevistskaya ul. 68, Saransk, 430005 Russia*

The quantity of neurotrophic factors and the protein composition of somatic nerve membranes in rats during injury and survival of nerves under the action of clobetasol have been explored. It has been shown that the drug administered intramuscularly produces more pronounced effect on the increase in the level of neurotrophic growth factors and structural proteins responsible for recovery processes than the drug released from hydrogel derived from microbial polysaccharides as well as stabilizes the content of the total protein fraction of damaged somatic nerves. Proteins of the injured neural conductor are less degraded during intramuscular injection of clobetasol probably because of better availability of the drug administered by injection than availability of the drug administered (slow drug release) from hydrogel composite. In addition, an increase in the amount of DNA and some protein fractions indicates that clobetasol is able to participate in an activation of genes associated with remyelination. We suppose that clobetasol can stimulate synthesis of neurotrophic growth factors, thereby triggering phosphatidylinositol-3-kinase and mitogen-activated protein kinase signaling pathways that regulate the processes of cytoskeletal reorganization and axonal growth, as well as enhance the rate of synthesis of structural and axonal proteins necessary to restore the functional activity of injured nerve conductors.

Keywords: somatic nerves, nerve injury, neurotrophic growth factors, clobetasol, nerve regeneration, hydrogel systems