

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Донской государственный технический университет»

На правах рукописи



РОДЬКИН СТАНИСЛАВ ВЛАДИМИРОВИЧ

**Роль монооксида азота и белков клеточной смерти в нервной ткани
при повреждении нерва и фотоокислительном воздействии у животных**

1.5.4 — Биохимия

**Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Научный руководитель:

д.б.н. Кириченко Евгения Юрьевна.

Научный консультант:

д.б.н., профессор

Ермаков Алексей Михайлович.

Ростов-на-Дону 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1. NO как сигнальная молекула в нервной ткани	15
1.2. NO-синтазы.....	18
1.3. Фотодинамическая терапия	25
1.4. Роль NO при фотодинамическом воздействии	33
1.5. Ядерный фактор-κB и его роль при фотодинамическом воздействии.....	37
1.6. Ионы кальция и их роль при фотодинамическом воздействии	41
1.7. Нейротравма	44
1.8. Белок p53 и его роль при аксотомии.....	46
1.9. NO-зависимые механизмы регулирования белка p53	50
1.10. Белок E2F1 и его роль в регуляции p53	52
1.11. Белок APP и его роль при аксотомии.....	54
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	59
2.1. Объекты исследования	59
2.1.1 Рецептор растяжения рака <i>Astacus leptodactylus</i>	59
2.1.2 Дорзальные ганглии крысы.....	60
2.2. Изолирование механорецепторного нейрона рака: модели аксотомии и фотодинамического воздействия.....	62
2.3. Аксотомия седалищного нерва крысы.....	65
2.4. Фотоокислительный стресс.....	66
2.5. Ингибиторно-активаторный анализ	67
2.6. Исследование фотоиндуцированной генерации NO с помощью флуоресцентного зонда DAF-2DA	69

2.7. Иммунофлуоресцентная регистрация локализации p53, E2F1 и APP в рецепторе растяжения рака и дорзальных ганглиях крысы	70
2.7.1 Иммунофлуоресцентная регистрация локализации p53, E2F1 и APP в рецепторе растяжения рака	70
2.7.2 Иммунофлуоресцентная регистрация локализации p53, E2F1 и APP в дорзальных ганглиях крысы	71
2.8. Визуализация апоптоза на срезах дорзальных ганглиев крысы методом TUNEL.....	72
2.9. Вестерн-блот анализ белков p53, APP в дорзальных ганглиях крысы.....	73
2.10. Обработка изображений и статистический анализ.....	74
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	78
3.1. Динамика генерации NO при изменении внеклеточной концентрации Ca^{2+} во время ФДТ.....	78
3.2. Динамика генерации NO под действием Ca^{2+} -ионофора во время ФДТ	82
3.3. Динамика генерации NO под действием блокатора Ca^{2+} -каналов плазматической мембраны во время ФДТ	84
3.4. Динамика генерации NO под действием блокатора Ca^{2+} -каналов L-типа во время ФДТ	86
3.5. Динамика генерации NO под действием блокатора SERCA во время ФДТ	88
3.6. Динамика генерации NO под действием ингибитора и активатора NF- κ B во время ФДТ.....	90
3.7. Динамика генерации NO под действием ингибитора iNOS и ингибитора iNOS с активатором NF- κ B во время ФДТ.....	94
3.8. Динамика генерации NO под действием ингибитора и активатора растворимой гуанилатциклазы во время ФДТ	98

3.9. Развитие апоптоза нейронов и глиальных клеток в дорзальных ганглиях крысы после перерезки седалищного нерва под действием донора NO и ингибитора iNOS	101
3.10. Локализация и экспрессия p53 в механорецепторных нейронах и глиальных клетках при аксотомии	104
3.11. Экспрессия и локализация p53 в нейронах дорзальных ганглиев крысы под действием донора NO и ингибитора индуцибельной NO-синтазы	107
3.12. Экспрессия и локализация E2F1 в нейронах дорзальных ганглиев крыс .	113
3.13. Экспрессия и локализация E2F1 в механорецепторных нейронах рака. ..	117
3.14. Экспрессия APP в дорзальных ганглиях крысы	118
3.15. Экспрессия и локализация белка APP в рецепторе растяжения рака.....	122
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ	127
4.1. Ca ²⁺ -зависимые механизмы в фотоиндуцированной генерации NO	127
4.2. NF-κB-зависимые механизмы в фотоиндуцированной генерации NO	130
4.3. sGC-зависимые механизмы в фотоиндуцированной генерации NO	134
4.4. Роль NO в выживании и гибели нейронов и глиальных клеток дорзальных ганглиев крысы при перерезке седалищного нерва	135
4.5. Роль p53 в нейронах и глиальных клетках беспозвоночных животных при аксотомии.....	139
4.6. NO-зависимые механизмы экспрессии p53 в нейронах и глиальных клетках дорзальных ганглиев крысы.....	142
4.7. Роль E2F1 в нейронах позвоночных и беспозвоночных животных при аксотомии.....	146
4.8. Роль APP в нейронах позвоночных и беспозвоночных животных при аксотомии.....	150
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	156

ВЫВОДЫ.....	160
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	162
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	164

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности. На сегодняшний день в мире насчитывается около 400 миллионов домашних животных. Россия занимает одну из лидирующих позиций по количеству домашних питомцев. Число домашних животных в российских семьях неуклонно растет: так с 2017 по 2020 оно выросло на 12 миллионов, достигнув рекордной отметки в 63,5 миллиона, увеличившись за три года на 23% (Сапрыгина Ю., 2021). При этом подавляющее большинство домашних животных в России – это кошки и собаки, которые очень часто становятся пациентами ветеринарных клиник в результате различных болезней, включая онкологию (Lucroy et al., 2003; McCaw et al., 2000), а также травм нервной системы – нейротравм (Finnie et al., 2001; DiFazio et al., 2013; Park et al., 2012; Eminaga et al., 2011; Vali et al., 201). При этом сельскохозяйственные животные, такие как коровы, свиньи, лошади, являются уязвимым звеном ветеринарной индустрии: даже в условиях современных фермерских хозяйств, цехов, баз они становятся жертвами различных травм, часть из которых приходится на травмы нервной системы, включая периферические нервы (Finnie., 2014; Finnie., 2012; Cerro et al., 2021), а также не застрахованы они и от онкологии центральной и периферической нервной системы (Dammann et al., 2020). А раннее выведение животного из хозяйственного цикла – большой экономический урон. Кроме этого в условиях роста браконьерства жертвами силков и капканов становятся дикие животные, включая редкие виды. Часто полученные ими травмы носят характер нейротравм с повреждением центральных и периферических отделов нервной системы. Такие животные нуждаются в ветеринарной помощи и эффективных нейропротекторных препаратах, способных защитить поврежденные нейроны. Поэтому на сегодняшнем этапе развития ветеринарной науки важно понять биохимические механизмы выживания и гибели нейронов и глиальных клеток при повреждении нервов, а также фотодинамической терапии (ФДТ), характеризующейся мощным фотоокислительным стрессом.

ФДТ основана на смерти клеток, окрашенных фотосенсибилизирующим красителем, под действием света в присутствии кислорода. В прошлом ФДТ редко использовалась в ветеринарии для лечения рака. Сейчас ФДТ активно используется для лечения различных типов рака у лошадей (Giuliano et al., 2008; Martens et al., 2000; Giuliano et al., 2017), кошек (Lucroy et al., 2003), собак (McCaw et al., 2000), рептилий (Roberts et al., 1991) и так далее и является перспективным неинвазивным методом борьбы с онкопатологиями в ветеринарной практике (Buchholz and Walt., 2013). ФДТ давно применяется для лечения рака головного мозга у человека (Stylli et al., 2006; Whelan 2012; Quirk et al., 2015) и относительно недавно этот опыт был экстраполирован и на животных (Hicks et al., 2017). Однако при этой терапии повреждаются нормальные нервные и глиальные клетки. Было показано, что монооксид азота (NO) играет важную роль в выживании и гибели нейронов и глии при ФДТ (Kovaleva, Uzdensky, 2016; Kovaleva et al., 2013). Однако роль NO и биохимические механизмы, контролирующие его генерацию, при фотоокислительном стрессе, остаются неясными (Reeves et al., 2009). В некоторых случаях NO защищает клетки от фотоповреждения (Bhowmick, Girotti, 2011; Fahey, Girotti, 2017), тогда как в других стимулирует апоптоз (Korbelik et al., 1998; Rapozzi et al., 2013).

Фотоиндуцированная генерация NO в нейронах и глиальных клетках может стимулироваться ионами кальция (Ca^{2+}) путем активации нейрональной NO-синтазы (nNOS). Известно, что ФДТ увеличивает внутриклеточный уровень Ca^{2+} в разных клеточных линиях (Wu et al., 2015; Li et al., 2015). Ca^{2+} может опосредовать эффекты ФДТ на клетки (Uzdensky, 2008; Hoorelbeke et al., 2018). Пути ФДТ-индуцированного проникновения Ca^{2+} в нейроны и глию, и их роль в вызванной ФДТ генерации NO точно не определены.

Важной молекулярной мишенью при ФДТ является NF-κB (ядерный фактор- κарраB) (Piette, 2015). NF-κB является транскрипционным фактором для индуцибельной NO-синтазы (iNOS) (Kleinert et al., 2003; Singh et al., 2016). Высокий уровень NO, генерируемый iNOS, влияет на петлю NF-κB / Snail / YY1 / RKIP, которая является важным сигнальным механизмом, связанным с

выживанием клеток (Rapozzi et al., 2015). NF-κB-зависимые механизмы генерации NO в условиях фотоокислительного стресса ранее не изучались.

Малоизученным аспектом остаются механизмы обратной связи между NOS и гуанилатциклазой (sGC). На сегодняшний день достоверно известно, что основной внутриклеточной мишенью NO является sGC. Активированный под действием NO этот фермент катализирует биосинтез циклического 3,5-гуанозинмонофосфата (сGMP) из гуанозинтрифосфата (GTP). сGMP является вторичным мессенджером, осуществляющим множество внутриклеточных функций (Derbyshire, 2012). В ряде исследований было продемонстрировано, что существуют механизмы обратной связи между NOS и сGMP (Inoue et al, 1995; Dawson et al, 1993). Но до сих пор вопрос о механизмах регуляции между NOS и sGC при ФДТ остается открытым.

Другим стрессовым фактором для нейронов является нейротравма. Травмы центральной нервной системы, включая черепно-мозговую и спинно-мозговую травмы, представляют серьезную проблему в ветеринарии и часто являются причиной смерти и инвалидности животных (Finnie et al., 2001; DiFazio et al., 2013; Park et al., 2012; Eminaga et al., 2011; Vali et al., 201). Также большую опасность представляют травмы периферической нервной системы, например, травмы периферических нервов, которые часто приводят к ухудшению качества жизни вплоть до тяжелой инвалидности (Welch et al., 1996; Forterre et al., 2007). Одним из видов механического повреждения является аксотомия, т.е. полная перерезка нервов, инициирующая каскад молекулярных и клеточных событий, приводящих к гибели нейронов (Povlishock, Christman, 1995; Martin et al., 1998; Barron, 2004). Известно, что в процессах выживания и гибели нейронов участвует NO (Kovaleva et al., 2013), а также проапоптотические белки p53 (Di Giovanni et al., 2006; Ma et al., 2017), E2F1 (Engelmann, Puttzer, 2010; Meng, Gosh, 2014) и APP (DeGiorgio et al., 2002; Liu et al., 2018). NO может регулировать уровень этих белков при различных патологических процессах, особенно p53 – ключевого проапоптотического белка (Wang et al., 2003). Однако NO-зависимые механизмы регулирования их при аксотомии практически не изучены. Также крайне слабо

исследована локализация и экспрессия p53, APP, E2F1 в нейронах и глиальных клетках при повреждении нерва.

Данные проблемы удобно исследовать на нейронах и глиальных клетках механорецептора растяжения речного рака, который является простым, но информативным модельным объектом (Kovaleva et al., 2013) и дорзальных ганглиях корешков спинного мозга крысы, которые являются классическим объектом травм периферической нервной системы (Savastano et al., 2014).

Объект: сигнальные пути выживания и гибели нейронов и глиальных клеток при аксотомии и фотоокислительном стрессе.

Предмет: фотоиндуцированная генерация монооксида азота и NO- и HDACs-зависимые механизмы регулирования экспрессии и локализации проапоптотических белков при аксотомии в нейронах и глиальных клетках.

Рабочая гипотеза базируется на том, что входящий ток Ca^{2+} через Ca^{2+} -каналы цитоплазматической мембраны и ингибирование Ca^{2+} -АТФазы эндоплазматического ретикула приводят к активации нейрональной NO-синтазы при ФД-воздействии, а растворимая гуанилатциклаза существует в петле обратной связи с NO и может влиять на генерацию NO при фотоокислительном стрессе. Также NF-κB-зависимые механизмы генерации NO при ФД-воздействии реализуются через активацию индуцибельной NO-синтазы. Помимо этого, NO модулирует уровень проапоптотического белка p53 и влияет на уровень выживания и гибели нейронов и глиальных клеток в условиях аксонального стресса. Белки E2F1 и APP также участвуют в проапоптотическом сигналинге при аксотомии. APP реализует свои проапоптотические эффекты в нейронах через ядерно-нацеленный продукт протеолиза своего С-конца – AICD, а белки гистондеацетилазы (HDACs) в свою очередь моделируют уровень APP при аксотомии.

Цель работы: исследовать роль монооксида азота и проапоптотических белков p53, E2F1, APP в нейронах и глиальных клетках при повреждении нерва и фотоокислительном воздействии на моделях позвоночных и беспозвоночных животных.

Для реализации цели необходимо решить следующие задачи:

1. Изучить Ca^{2+} -, sGC-, NF- κ B-зависимую генерацию NO при фотоокислительном стрессе в нейронах и глиальных клетках рецептора растяжения рака.
2. Изучить влияние донора NO и ингибитора индуцибельной NO-синтазы на экспрессию и локализацию p53, а также клеточную гибель в дорзальных ганглиях крысы после перерезки седалищного нерва.
3. Изучить локализацию и экспрессию p53 в нейронах и глиальных клетках рецептора растяжения рака после аксотомии.
4. Изучить экспрессию E2F1 и APP в нейронах речевого рака и дорзальных ганглиях крыс, оценив вклад HDACs в регулирование уровня APP, при аксотомии.

Научная новизна результатов исследования. Впервые показана роль внеклеточного Ca^{2+} , Ca^{2+} -каналов плазматической мембраны и Ca^{2+} -каналов L-типа, Ca^{2+} -ионофора, Ca^{2+} -АТФазы эндоплазматического ретикулума в генерации NO в нейронах и глиальных клетках при фотоокислительном стрессе. Впервые исследован NF- κ B в регулировании NO в нейронах и глиальных клетках в условиях фотоокислительного стресса с помощью ингибиторов и активаторов NF- κ B. Был показан вклад iNOS в фотоиндуцированную генерацию NO в нейронах и глиальных клетках с помощью селективного ингибитора iNOS. Впервые исследована регуляция растворимой гуанилатциклазой фотоиндуцированной продукции NO в нейронах и глиальных клетках с помощью флуоресцентного зонда DAF-2DA. Изучена экспрессия и локализация p53 при аксотомии в нейронах и глиальных клетках с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии и вестерн-блот анализа. Впервые изучена NO-зависимая генерация p53 в нейронах и глиальных клетках дорзальных ганглиев крысы в ранние сроки после перерезки седалищного нерва. Была оценена роль NO-сигнальных путей с помощью донора NO и селективного ингибитора iNOS в выживании и гибели нейронов и глиальных клеток в дорзальных ганглиях крысы при аксотомии с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии и метода TUNEL. Показана

локализация и экспрессия p53, E2F1 и APP, а также роль HDACs в регулировании APP, в рецепторе растяжения рака и аксотомированных ганглиях крысы.

Теоретическая и практическая значимость. В нашем исследовании показано, что в фотоиндуцированной генерации NO в нейронах и глиальных клетках участвуют Ca^{2+} -, sGC- и NF- κ B-сигнальные пути. Их модуляция при фотодинамической терапии представляет собой потенциальный способ регулирования активности nNOS и iNOS, которые участвуют в выживании и гибели нейронов и глиальных клеток. Так было показано, что Nifedipine, блокируя Ca^{2+} -каналы L-типа, эффективно снижает фотоиндуцированную генерацию NO в нейронах и глиальных клетках, что может позволить использовать его для нейропротекции здоровой нервной ткани при фотодинамической терапии. При блокировании Ca^{2+} -каналов плазматической мембраны неселективным ингибитором хлоридом кадмия было показана уменьшение генерации NO при ФД-воздействии, что указывает на важную роль Ca^{2+} -каналов плазматической мембраны в модулировании уровня NO при ФДТ. Наряду с Ca^{2+} -каналами в регуляции уровня NO при ФДТ принимает участие Ca^{2+} -АТФаза эндоплазматического ретикулума: исследование с применением блокатора SERCA подтверждают это. Использование активатора ядерного фактора- κ B (Prostratin) и его ингибитора (Parthenolide) доказывает роль NF- κ B в генерации NO при ФД-воздействии. А использование их медицинских аналогов поможет снизить риск повреждения нервных и глиальных клеток при ФДТ. Применение селективного блокатора индуцибельной NO-синтазы SMT доказало роль iNOS в генерации NO в нейронах и глиальных клетках при ФД-воздействии. Также было показано, что растворимая гуанилатциклаза не только мишень для NO, но и важный модулятор уровня NO при ФД-воздействии. Эти результаты помогут в разработке селективных методов защиты здоровой ткани при ФДТ опухолей головного мозга.

Наряду с этим в нашей работе была исследована NO-зависимая генерация p53 в нейронах и глиальных клетках дорзальных ганглиев крысы при перерезке седалищного нерва. Было показано, что NO является мощным модулятором

экспрессии p53 в условиях аксонального стресса в нейронах и окружающих их глиальных клетках. Применяемый нами донор NO вызывал в ранние сроки после аксотомии ядерное депонирование p53, а также увеличение цитоплазматического уровня этого белка в нейронах и глиальных клетках. А применяемый селективный ингибитор iNOS вызывал снижение его экспрессии в нейронах, но не в глиальных клетках, что может свидетельствовать о частично-конститутивном типе экспрессии iNOS в нейрональных клетках, которая, возможно, модулирует уровень p53.

Рассматривая роль NO в клеточной гибели, мы показали, что NO усиливает апоптотическую гибель, как нейронов, так и глиальных клеток в аксотомированных ганглиях. Эти данные вносят существенный вклад в фундаментальное понимание тонких механизмов NO-опосредованных сигнальных путей, модулирующих уровень важнейшего белка выживания и гибели нервных и глиальных клеток, в условиях аксонального стресса.

Также иммуногистохимическое исследование p53 при аксотомии показало ключевую роль ядрышка в регуляции уровня p53 при данном виде нейротравмы. При этом исследование экспрессии и локализации этого белка на моделях позвоночных и беспозвоночных животных показывает эволюционную составляющую апоптотической сигнализации, реализующуюся через сигнальный путь p53, при травме периферической нервной системы. Это доказывает различная динамика экспрессии p53 в механорецепторных нейронах, где p53 увеличивался больше в ядре, чем в цитоплазме и в дорзальных ганглиях крысы, где происходило перераспределение p53 из ядра в цитоплазму.

Исследование E2F1, как фактора транскрипции p53, а также мишени для NO, показало увеличение его экспрессии в нейронах и глиальных клетках, как позвоночных, так и беспозвоночных животных. Наряду с этим был рассмотрен белок APP и показана его проапоптотическая активность, реализующаяся через продукт протеолиза его С-конца – AICD, имеющий ядерную локализацию.

Таким образом, эти данные помогут лучше понять механизмы выживания нейронов и глиальных клеток при фотоокислительном стрессе и аксотомии, а

применяемые ингибиторы и активаторы в нашем исследовании могут лечь в основу разработки эффективных нейропротекторных препаратов.

Методология и методы исследования. Методологической основой научно-исследовательской работы явился анализ литературных данных, который формирует проблему о механизмах NO-зависимых сигнальных путей, а также проапоптотических белков p53, E2F1 и APP в выживании и гибели нейронов и глиальных клеток при фотоокислительном стрессе и повреждении нерва. Исследования проведены на моделях позвоночных и беспозвоночных животных с помощью следующих методов: иммунофлуоресцентная микроскопия, ингибиторно-активаторный анализ, вестерн-блот, микроскопия с использованием флуоресцентного зонда, визуализация апоптоза с помощью TUNEL, фотодинамическое воздействие, аксотомия.

Положения, выносимые на защиту:

1. Повышенный внеклеточный Ca^{2+} , Ca^{2+} -ток через цитоплазматическую мембрану, Ca^{2+} -АТФаза эндоплазматического ретикулума, растворимая гуанилатциклаза и индуцибельная NO-синтаза модулируют фотоиндуцированную генерацию NO в нейронах и глиальных клетках беспозвоночных животных.
2. NO влияет на экспрессию и локализацию p53 в нейронах и нейроглии, а также на апоптотическую гибель этих клеток при аксотомии позвоночных животных.
3. Аксотомия вызывает ядерно-цитоплазматическое перераспределение p53 в нейронах дорзальных ганглиях крысы и увеличивает экспрессию p53 в нейронах и глиальных клетках речного рака.
4. Аксотомия индуцирует экспрессию E2F1 и APP в нейронах речного рака и дорзальных ганглиях крысы, а HDACs регулируют уровень APP.

Степень достоверности. Достоверность полученных результатов обусловлена проведением методов в строгом соответствии с международными протоколами, лицензированным высокотехнологическим оборудованием, репрезентативной выборкой животных, детальным анализом полученных данных с помощью сертифицированного программного обеспечения. Исследования были получены при поддержке следующих грантов: Проект № БЧ0110 - 11/2017 - 22

«Сигнальные механизмы регуляции выживания и смерти сенсорных нейронов и глиальных клеток беспозвоночных и млекопитающих животных при повреждении нервов», Гос. Задание №0852/2020 - 0028 "Биохимические и молекулярно – генетические исследования механизмов патологических процессов, ассоциированных с социально – значимыми заболеваниями".

Апробация работы. Полученные результаты были апробированы на ряде конференций и семинаров: 3rd School on Advanced Fluorescence Imaging Methods (ADFLIM) (г. Саратов, 2018), International Conference Biomembranes'18 (г.Долгопрудный, 2018), VI Съезд биофизиков России (г.Сочи, 2019), 13th European Meeting on Glial Cells in Health and Disease (г. Эдинбург, Шотландия), II Объединенный научный форум: Съезда физиологов СНГ, VI Съезда биохимиков России и IX Российского симпозиума «Белки и пептиды (г. Сочи-Дагомыс, 2019), Рецепторы и внутриклеточная сигнализация (г.Пушино, 2019), XVIII Международная конференция «Обмен веществ при адаптации и повреждении – дни клинической лабораторной диагностики на Дону» (г. Ростов-на-Дону, 2019), XXI Зимней молодежной школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии (поселок Рощино, 2019), Материалы XXI Зимней молодежной школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии (поселок Репино, 2020), Рецепторы внутриклеточной сигнализации (г.Пушино, 2021)

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 25 печатных работ в отечественных и зарубежных изданиях, из которых 5 статей – в изданиях, рекомендованных ВАК РФ для публикации материалов диссертационного исследования, 7 публикаций входят в базы цитирования Web of Science и Scopus.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 206 страницах, содержит 48 рисунков. Работа состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов исследования, полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы, состоящего из 387 отечественных и зарубежных источников.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. NO как сигнальная молекула в нервной ткани

Монооксид азота выполняет функции универсального мессенджера, ответственного за такие физиологические процессы, как расслабление гладких мышц сосудов, нейтрализацию патогенных агентов, нейротрансмиссию, противоопухолевую активность и др. Многочисленные типы клеток продуцируют NO, включая эндотелиоциты, макрофаги, гепатоциты, клетки гладких мышц, хондроциты, миоциты сердца, а также нейроны и глиальные клетки (Reeves et al, 2009; Lee et al, 2017; Kovaleva, Uzdensky, 2016).

NO-экспрессирующие нейроны широко представлены в центральной нервной системе (ЦНС) в таких отделах головного мозга, как мозжечок, гиппокамп, скорлупа, миндалина, хвостатое и септальное ядра и диагональная полоса Брока. Активность nNOS в корковом слое мозга и полосатом теле обнаружена лишь в отдельных нейрональных клетках (Сапай, Рецкий, 2003; Zhou et al, 2018). NO также является основным мессенджером, используемым периферической нервной системой (ПНС) (Vincent, 2000). Функции NO в нервной системе разнообразны: ноцицепторная чувствительность, терморегуляция, обоняние, визуальное восприятие, координация движений, процессы памяти и обучения (Vincent, 2010). В зависимости от локализации nNOS в том или ином отделе головного мозга различается функциональный профиль экспрессируемого NO.

Кора мозжечка содержит очень высокий уровень NO-синтазы, и продукция NO, по-видимому, регулирует функциональную гиперемия (Yang et al., 1999). NO-синтаза экспрессируется локальными звездчатыми, корзинчатыми и гранулярными клетками, но не клетками Пуркинье (Vincent, Kimura, 1992). Стимуляция NMDA (N-метил-D-аспартат)-рецепторов или прямая деполяризация звездчатых клеток вызывает высвобождение NO и местную вазодилатацию (Rancillac et al., 2006). Высокочастотная стимуляция моховидных

волокон, синапсы которых есть на гранулярных клетках, приводила к значительному выделению NO в гранулярном слое, что зависело от активации NMDA-рецепторов (Maffei et al., 2003). Однако предыдущие исследования показали, что на продукцию NO в мозжечке путем стимуляции белого вещества не влияли антагонисты NMDA-рецепторов или другие глутаматные рецепторы (Kimura et al., 1998), но она резко снижалась из-за блокады кальциевых каналов P/Q (Shibuki, Kimura, 1997).

Холинергические нейроны латеродорсальных и педункулопонтинных сегментарных ядер экспрессируют очень высокие уровни NO-синтазы и проецируются на таламусе (Vincent, 2000). Холинергические нейроны в латеродорсальном сегментарном ядре возбуждаются глутаматом через рецепторы NMDA (Sanchez, Leonard, 1996) и через кальциевые каналы R-типа, которые также могут играть роль в регуляции NO (Kohlmeier, Leonard, 2006). Локальная инфузия NMDA в латеродорсальное вегетативное ядро вызывает продукцию NO и cGMP, что в свою очередь, модулирует высвобождение норадреналина из церулеуса (Kodama, Koyama, 2006). В таламусе образование NO зависит от потенциала действия, генерируемого в латеродорсальном вегетативном ядре (Miyazaki et al., 1996). Таламические нейроны экспрессируют очень высокий уровень cGMP-зависимой протеинкиназы II типа (Vincent, 2000) и IRAG (Geiselhoring et al., 2004). NO, вероятней всего, регулирует активность cGMP-зависимой протеинкиназы (El-Husseini et al., 1998).

Другой областью, в которой NO-экспрессирующим нейронам уделяют большое внимание, является передний мозг. Популяции NO-продуцирующих нейронов присутствуют в полосатом теле и во всей коре головного мозга (Сапай, Рецкий, 2003; Zhou et al, 2018). Области переднего мозга экспрессируют высокий уровень cGMP- стимулированной фосфодиэстеразы (Van Staveren et al., 2003). Было обнаружено, что срединные колючие стриатонигральные нейроны продуцируют этот фермент, и он, по-видимому, обеспечивает механизм, посредством которого NO из аспинового интернейрона, действуя через cGMP,

может регулировать дофамин-стимулированную выработку циклического аденозинмонофосфата (сАМР) (Lin et al., 2009).

На периферии многие гладкомышечные ткани иннервируются нитрергическими нервами, содержащими nNOS. NO, генерируемый nNOS в этих нервах, можно рассматривать как необычный нейротрансмиттер, который стимулирует NO-чувствительную гуанилатциклазу в эффекторных клетках, тем самым снижая тонус различных типов гладких мышц, включая кровеносные сосуды (Förstermann, Sessa., 2012).

Нейроконтроллерные механизмы NO обеспечиваются ионотропным NMDA-рецепторным комплексом, ассоциированным с nNOS. Глутамат, связываясь с NMDA-рецептором постсинаптической мембраны, вызывает в нем конформационные изменения, приводящие к открытию Ca^{2+} -канала, что вызывает активацию nNOS и синтез NO, который выполняет роль нейротрансмиттера, диффундирующего в близлежащие клетки. Основной молекулярной мишенью для него является растворимая гуанилатциклаза (sGC), состоящая из двух субъединиц (α и β), N-терминальные части которых имеют домен с Fe^{2+} -гемовой группой. NO связываясь с гемами sGC приводит к её активации. Продуктом катализа sGC является сGMP, который активирует сGMP-зависимую протеинкиназу (PKG), фосфорилирующую потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы на пресинаптической мембране, замыкая глутамат-NMDA-рецептор-NO каскад, так как деполяризация пресинаптической мембраны вызывает усиление выхода глутамата в межсинаптическое пространство. Этот процесс лежит в основе долговременной синаптической деполяризации (Garthwaite, 2018). Этот процесс может носить нейротоксический характер при таких патологиях, как инсульт, онкологические болезни головного мозга и др., когда происходит неконтролируемое накопление глутамата во внеклеточном пространстве, ведущее к эксайтотоксичной Ca^{2+} -перегрузке клеток и как следствие их гибели (Bano, Ankarcona, 2017). Аномальная передача сигналов NO вносит также вклад в различные нейродегенеративные патологии: рассеянный склероз, болезнь Альцгеймера и Паркинсона (Steinert et al, 2010; Zhou et al, 2018).

NO и его производные по разному влияют на гибель нейронов. Высокий уровень NO индуцирует некроз путем истощения энергии вследствие ингибирования митохондриального дыхания и гликолиза, Ca^{2+} -эксайтотоксичности, увеличения митохондриальной проницаемости, гиперактивации поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP). В качестве альтернативы, если уровень энергии поддерживается, NO может вызвать апоптоз посредством окислительной активации p53, p38 MAPK (митоген-активируемые протеинкиназные) пути или стресса эндоплазматического ретикулума. Низкий уровень NO может блокировать гибель клеток с помощью cGMP-опосредованной вазодилатации, активации Akt и блокирования увеличения проницаемости мембраны (Brown, 2010).

Таким образом, оксид азот остается важной, но загадочной сигнальной молекулой в нервной системе. Механизмы генерации NO изучены хорошо при нормальных состояниях, но при патологических остаются спорными. Роль различных изоформ NO-синтазы при фотодинамической терапии, применяемой в частности при разрушении опухолей нервной системы, остается открытым вопросом.

1.2. NO-синтазы

Биосинтез оксида азота происходит путем окисления гуанидиновой группы L-аргинина. Реакцию катализирует фермент NO-синтаза (NOS). Конечными продуктами этого процесса является NO и L-цитруллин. В биогенерации NO принимают участие 5 электронов. Тип реакции – монооксигеназный: один атом кислорода связывается с молекулой субстрата, образуя промежуточный продукт N-гидрокси-L-аргинин. В активном состоянии NOS – гомодимерный комплекс, включающий в себя Ca^{2+} -связывающий белок кальмодулин (CaM), кофакторы и простетические группы: никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ), флавин-аденин-динуклеотид (ФАД), флавин-моноклеотид (ФМН), CaM, гем с пентакоординированным Fe^{2+} , Zn^{2+} и (6R-)5,6,7,8-тетрагидробиоптерин (BH4). Мономерная архитектура NOS представляет собой бидоменную организацию,

состоящую из оксигеназного домена на N-терминале и редуктазного на C-терминале полипептидной цепи. Функция редуктазного домена заключается в переносе электронов от НАДФН к трехвалентному железу гема через ФАД и ФМН. В оксигеназном домене локализуются сайты для связывания L-аргинина, ВН4 и молекулярного кислорода. Здесь протекает процесс восстановления и активации кислорода и окисления гуанидинового азота аргинина, ведущего к образованию NO и цитруллина. Между доменами локализован сайт для связывания CaM, который необходим для активации NOS. Роль ВН4 заключается в формировании нативной структуры NOS, а также сближения гемового железа, кислорода и гуанидиновой группы аргинина. Zn^{2+} выполняет гомодимеробразующую функцию (Рис. 1) (Förstermann, Sessa, 2012).

На сегодняшний день известно три основных типа NOS, которые классифицируются в зависимости от локализации, кофактора и механизма активации: эндотелиальная и нейрональная NOS (eNOS/NOS3, nNOS/NOS1), относящиеся к конститутивным (кальций-зависимым), и индуцибельная NOS (iNOS/NOS2, кальций-независимая), активирующаяся цитокинами, липополисахаридами в течение нескольких часов (Eroglu et al, 2017; Förstermann, Sessa, 2012; Qian, Fulton, 2013). Также была обнаружена митохондриальная изоформа NOS, но её структурно – функциональный профиль пока чётко не идентифицирован (Kone, 2001). Для каталитической активации конститутивным формам NOS необходим Ca^{2+} из-за способности кальмодулин-связывающего сайта доменов присоединять Ca^{2+} -CaM в то время, как iNOS обладает высоким сродством к CaM даже при отсутствии Ca^{2+} (Förstermann, Sessa, 2012). Изоформы NOS являются продуктами экспрессии разных генов и выполняют разные функции (Shinkai et al., 2002). Нейрональная и эндотелиальная NOS получили свое название от клеток, в которых их первоначально идентифицировали, но, несмотря на это, они присутствуют также и в других тканях, включая мозг, желудок, надпочечники, скелетные мышцы. Индуцибельная NO-синтаза была обнаружена в макрофагах, нейтрофилах, эндотелии, клетках Купфера,

гепатоцитах (Reeves et al., 2009), в нейронах и глиальных клетках (Shang et al., 2017; Brown, Vilalta, 2015).

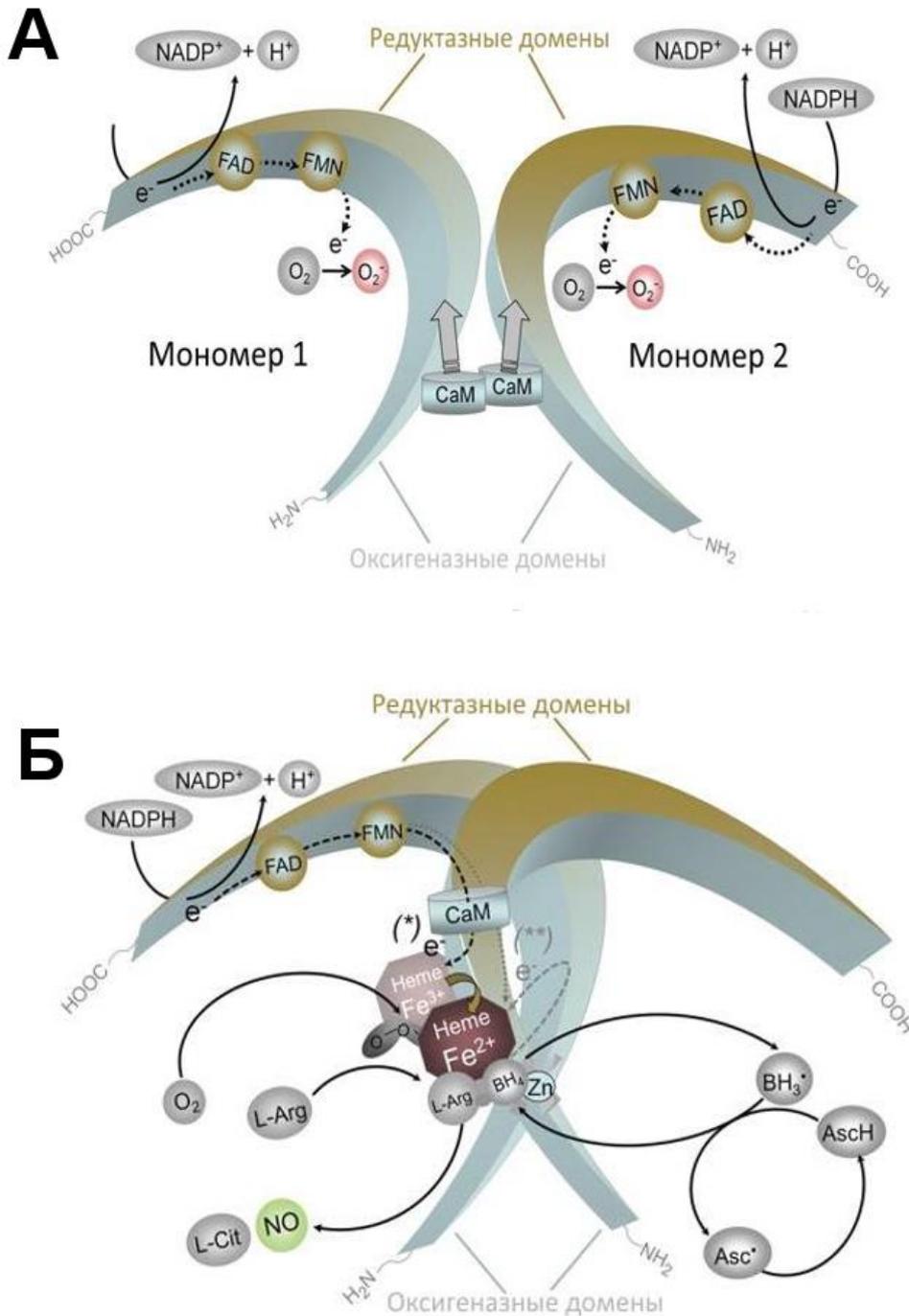


Рисунок 1. Структура NOS. А – мономеры NOS; Б – гомодимер NOS [По Förstermann, Sessa., 2012]

В организме nNOS выполняет множество функций, особого внимания заслуживает ее роль в нервной системе, где экспрессия этой изоформы NOS

определяет такие процессы, как память, обучение, зрительное восприятие, координационный баланс и др (Vincent, 2010; Zhou et al., 2018). Тройной комплекс NMDAR / PSD-95 / nNOS занимает одно из центральных мест в этих нейропроцессах. Повышенная цитозольная концентрация Ca^{2+} необходима для взаимодействия CaM с nNOS. Активная форма nNOS прикрепляется к плазматической мембране через адапторные белки, такие как PSD-95, создавая дисперсную форму nNOS с более высокой вероятностью активации CaM по сравнению с растворимой nNOS в цитоплазме. Однако взаимодействие между nNOS и CaM блокируется кальмодулин-протеинкиназой (CaMKII) посредством фосфолирования nNOS. Локализованная на мембране nNOS далее связывается с другим адапторным белком, называемым CAPON, связанным с DexRas 1, чтобы регулировать нитрозилирование DexRas 1, активируя каскад MAP-киназы и модулируя ядерную транскрипцию белка CREB, сопряженного с цАМФ-сигналингом, белка протоонкогена N-мус (N-Мус), NF- κ B, белка p53 и гистондеацетилазы 2 (HDAC2) (Zhou et al., 2018). Функции nNOS главным образом опосредуются через NO-активацию сигнального пути sGC- cGMP- PKG, который влияет на возбудимость постсинаптических нейронов посредством регуляции проводимости ионных каналов нескольких типов: натриевых, потенциал-зависимых кальциевых, кальций-активируемых, АТФ-чувствительных калиевых и управляемых циклическими нуклеотидами (Calabrese et al., 2007). NO также диффундирует в пресинаптическую область и регулирует высвобождение нейротрансмиттеров. Однако избыточное количество NO, образующееся при патологических состояниях, связано с окислительным стрессом и ведет к возникновению пероксинитрита (Pacher et al., 2007). Эффект нитрозилирования относительно различных молекулярных мишеней отличается. Так в случае натриевых каналов и NMDA-рецепторов нитрозилирование ведет к их инактивации, тогда как Ca^{2+} -каналы L-типа, рецепторы GABA-A, кальций-активируемые калиевые каналы наоборот активируются (Choi et al., 2000). В частности, nNOS может представлять собой центральный компонент, который регулирует синаптическую и межклеточную передачу сигналов посредством

негативного регулирования NMDA-рецепторов с помощью S-нитрозилирования (Kim et al., 2000). Имеются доказательства, что nNOS участвует в таких патологических состояниях, как болезнь Паркинсона, Хантингтона, Альцгеймера, рассеянный склероз, инсульт (Steinert et al., 2010; Zhou et al., 2018), опухолевые процессы (Yang et al., 2013). В целом, каталитическая активность, межбелковое взаимодействие и субклеточная локализация nNOS является ключевым фактором его сигнальной трансдукции.

Идентификация eNOS связана с открытием эндотелиального фактора релаксации сосудов, который, как впоследствии выяснилось, оказался NO. Это произвело революцию в понимании местной вазомоторной регуляции и сердечно-сосудистого гомеостаза. Эндотелиальная NO-синтаза в основном экспрессируется эндотелием, однако она была обнаружена и в других тканях (Daiber et al., 2019, Förstermann, 2000). В отличие от других изоформ NOS, eNOS преимущественно связана с мембраной из-за аминоконцевого ацилирования миристиновой и пальмитиновой кислотами. Двойное ацилирование позволяет eNOS встраиваться не только в цитоплазматическую мембрану, но в мембранный комплекс Гольджи и плазмалеммальные кавеолы. Надлежащая внутриклеточная локализация eNOS обеспечивает оптимальное регулирование её активности с помощью механических сил (градиента давления и напряжение сдвига), ионных кальция и киназ. Следовательно, любой агонист, который мобилизует внутриклеточный кальций или изменяет сигнальные пути, приводящие к усилению связывания CaM и уменьшению его диссоциации, могут способствовать активности eNOS и высвобождению NO. В условиях истощения BH4 и дефицита L-аргинина eNOS может генерировать свободные радикалы, полученные из кислорода (Garcia, Sessa, 2019). Эндотелиальная NO-синтаза синтезирует NO пульсирующим образом, при этом активность eNOS заметно возрастает при повышении внутриклеточного Ca^{2+} , который, как известно, индуцирует связывание CaM с ферментом. Например, белок теплового шока 90 (hsp90) может связываться с eNOS и выполнять функции аллостерического модулятора, активирующего фермент. Фракция eNOS, локализованная в кавеолах, может взаимодействовать с

белком оболочки кавеол, кавеолином-1, выступающим в качестве ингибитора eNOS (Förstermann, Sessa, 2012). Также регулирование активности eNOS достигается путем фосфорилирования по сериновым (Ser), треониновым (Thr) и тирозиновым (Tyr) остаткам. Фосфорилирование Ser1177 стимулирует поток электронов в редуктазный домен, повышая чувствительность фермента к Ca^{2+} и представляет дополнительный механизм активации eNOS (Garcia, Sessa, 2019; Fleming, Busse, 2003). Протеинкиназы цАМФ-зависимая (PKA), 5'АМФ-активируемая (AMPK) и В (Akt) фосфорилируют S615 и S633, усиливая активность фермента (Fulton, 2016). Также eNOS может участвовать в различных патофизиологических процессах: сердечно-сосудистые заболевания (Karbach et al., 2014; Daiber et al., 2019; Förstermann, Sessa, 2012), канцерогенез (Gao et al., 2019).

Индукцибельная NO-синтаза представляет собой Ca^{2+} -независимый фермент, генерирующий высокий уровень NO, в отличие от конститутивных форм NOS. Активность iNOS была обнаружена во многих клетках: макрофаги, гепатоциты, нейтрофилы, хондроциты (Lechner et al., 2005), нейроны, глиальные клетки (Arias-Salvatierra et al., 2011). Экспрессия iNOS индуцируется цитокинами и другими агентами. После индукции iNOS непрерывно продуцирует NO до тех пор, пока фермент не распадается (Kleinert et al., 2003), поэтому регуляция iNOS происходит на уровне транскрипции, трансляции и протеолиза (Lechner et al., 2005). Имеются некоторые исследования, описывающие регуляцию активности iNOS путем белковых взаимодействий, заключающихся в модуляции концентрации L-аргинина и необходимого кофактора ВН4. Было продемонстрировано, что индукция экспрессии iNOS может происходить через различные сигнальные пути. Однако в целом, по-видимому, активация и ингибирование киназ/сигнального пути и активатора транскрипции (JAK / STAT) или NF-κB являются центральными механизмами, лежащими в основе регулирования экспрессии iNOS. Например, было показано, что липополисахариды (LPS), интерлейкин 1β (IL- 1β), фактор некроза опухоли- α (TNF- α) и окислительный стресс индуцируют экспрессию iNOS в клетках разных

типов путем активации NF-κB, а глюкокортикоиды, трансформирующий фактор роста-β1 (TGF-β1), антиоксиданты и ингибиторы фосфодилхолин-специфической фосфолипазы (PC-PLC) показывают обратный эффект, опосредованный через ингибирование NF-κB. Важная роль сайтов связывания NF-κB в промоторной области гена, кодирующего iNOS, была показана на мышях, крысах и клетках человека (Kleinert et al., 2003; Singh et al., 2016). Регуляция экспрессии iNOS сопряжена со стабильностью мРНК этой изоформы фермента. Эксперименты с мышинными макрофагами показали, что TGF-β1 снижал продукцию iNOS через снижение стабильности мРНК iNOS (Kleinert et al., 2003). Физиологическая функция iNOS в основном заключается в нейтрализации патогенных агентов путем высвобождения большого количества NO, который может ингибировать ключевые ферменты, содержащие железо в своих каталитических центрах, вызывать разрывы и фрагментацию цепей ДНК. Высокий уровень NO, генерируемый iNOS, может быть токсичным не только для микробов, паразитов или опухолевых клеток, но может нанести вред и здоровым клеткам. Повреждение здоровых тканей может быть связано с самим радикалом NO или пероксинитритом (ONOO⁻), образующимся при взаимодействии NO с супероксидным анионом (O₂⁻). Подавляющее большинство воспалительных и аутоиммунных поражений характеризуется обилием активированных макрофагов и нейтрофилов. Эти клетки секретируют значительное количество NO, что приводит к повреждению окружающей ткани. Неадекватная экспрессия iNOS лежит в основе воспалительной нейродегенерации, приводящей к ряду патологий головного мозга. Механизмы, с помощью которых активированные микроглиальные и астроцитарные клетки убивают нейроны, были идентифицированы в клеточных культурах. Эти механизмы включают активацию фагоцитарной NADPH-оксидазы в микроглии и экспрессию iNOS в глии, что приводит к апоптозу через ONOO⁻. Также NO, продуцируемый iNOS, вызывает гибель нейронов путем блокирования цитохромоксидазы (Förstermann, Sessa, 2012).

Таким образом, все три изоформы NOS играют важную роль в нормальной работе организма, выполняя множество различных функций. Сбой в работе этих ферментов может приводить к патологическим процессам. Несмотря на мультиполярность биологических эффектов, строение NO-синтаз довольно консервативно. В основе экспрессии и регуляции этих ферментов лежат сложные сигнальные механизмы, часть из которых еще предстоит выяснить.

1.3. Фотодинамическая терапия

Фотодинамическая терапия (ФДТ) – это метод повреждения патологически измененной ткани, протекающий при взаимодействии фотосенсибилизатора, света и кислорода. Фотосенсибилизатор возбуждается при локальном воздействии света и вызывает селективное разрушение патологической ткани (Узденский, 2010; Li et al., 2018).

Фотодинамический эффект был открыт в конце девятнадцатого века в Мюнхенском Фармакологическом институте Оскаром Раабом, студентом профессора Херманна фон Таппайнера, на парамеции. Рааб наблюдал быструю гибель простейшего *Paramecium caudatum* после воздействия света в присутствии акридинового красителя (Узденский, 2010). Наличие света, который модифицировал действие красителя, привело к идентификации фотосенсибилизатора (ФС). Впоследствии профессор фон Таппайнер продолжал проводить эксперименты и обнаружил, что присутствие кислорода было необходимо для протекания реакции – на основе этого был сформулирован термин ФДТ. В 1907 году Таппайнер и Йодльбауэр опубликовали учебник по этой терапии, которую они назвали кислородно-зависимым фотосенсибилизирующим процессом для лечения опухолей кожи и разрушения инфекционных частиц. В своих опытах они применяли 5% эозин и искусственный свет для лечения рака кожи. К сожалению, это важное исследование не привлекло внимание, которого оно заслуживало (Taub, 2004).

ФДТ основана на использовании ФС, который эффективно переходит в триплетное возбужденное состояние при взаимодействии с видимым и ближним

инфракрасным излучением. Триплетное состояние ФС ($^3\text{ФС}^*$) может продуцировать токсические активные формы кислорода (АФК), такие как синглетный кислород ($^1\text{O}_2$) и другие свободные радикалы. $^3\text{ФС}^*$ может реагировать с молекулами, образуя промежуточные свободные радикалы, которые в свою очередь генерируют АФК (фотореакция 1 типа). Альтернативно, он может напрямую взаимодействовать с молекулярным кислородом с образованием цитотоксического $^1\text{O}_2$ in situ посредством передачи энергии (фотореакция 2 типа). Последний процесс является наиболее релевантным механизмом при ФДТ в клетках, потому что большинство ФС являются эффективными продуцентами $^1\text{O}_2$ (Рис. 2) (Mehraban, Freeman, 2015; Maggioni et al., 2015).

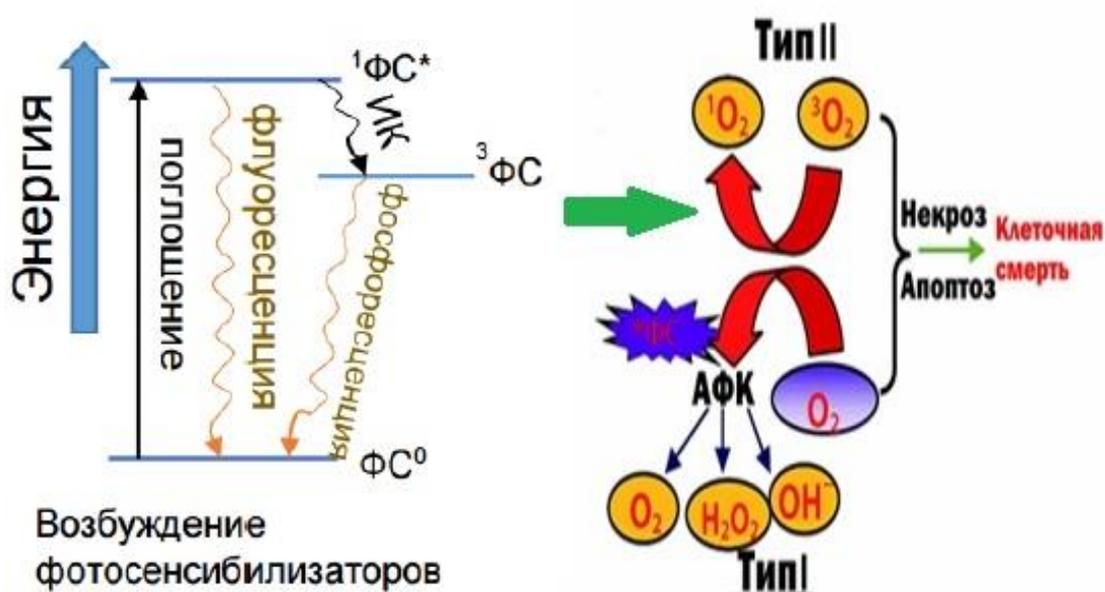


Рисунок 2. Схема процессов, протекающих при ФДТ, включая диаграмму Яблонского: ИК - интеркомбинационная конверсия; ФС_0 - основное синглетное состояние ФС; $^1\text{ФС}^*$ - возбужденное синглетное состояние ФС; $^3\text{ФС}$ - триплетное состояние ФС

Вначале 1960 был синтезирован препарат на основе гематопорфирина (Hr) - HрD. Аминолевулиновая кислота (ALA) и метиловый эфир (MAL) стали наиболее популярными фотосенсибилизаторами, используемыми при ФДТ. Скорость транспорта ALA через плазматическую мембрану является единственным ограничением накопления флуоресцентных порфиринов в обработанных клетках.

Этот процесс требует энергии, зависит от pH и температуры, является насыщаемым и медленным, будучи лишь немного быстрее в опухолевых клетках. MAL является этерифицированным производным ALA. Он липофильный, и его селективность в отношении опухолевых клеток выше, чем у ALA. Высокая липофильность MAL может повышать его фототоксический эффект. MAL транспортируется активными механизмами, а также пассивной диффузией через мембрану. Этот последний механизм не требует энергии, будучи эффективным, главным образом, в опухолевых клетках. Вскоре после проникновения в клетку MAL деметируется до ALA. ALA является производным протопорфирина IX. Также были разработаны некоторые синтетические сенсibiliзирующие препараты второго поколения (Issa, Manela-Azulay, 2010). Например, можно выделить хлорин NРe6, связывающийся с лизосомами, производные бензопорфирина (BPD), нацеленные на митохондрии, как и м-тетрагидроксифенилхлорин (mTHPC) и т.д. (Agostinis et al., 2011). Преимущества использования фотосенсибилизаторов – это их химическая безвредность в темновых условиях, способность накапливаться в опухолевой ткани, короткий период полураспада, быстрое выведение из нормальной ткани, активация на длинных волнах и способность продуцировать большое количество цитотоксических продуктов (Issa, Manela-Azulay, 2010).

Образующиеся при фотодинамическом воздействии в клетке АФК способны вызвать необратимые повреждения, особенно внутри специфических субклеточных органелл, таких как митохондрии, аппарат Гольджи и т.д. (Maggioni et al., 2015). Синглетный кислород является одной из самых интересных и универсальных молекул в семействе АФК. До сих пор его потенциал в контроле онкогенеза и терапевтических противоопухолевых подходах существенно недооценен (Ogilby, 2010; Bauer, 2016). $^1\text{O}_2$ образуется путем изменения спина одного из электронов, локализующихся на π^* -орбиталях в молекуле кислорода. Этот свободнорадикальный интермедиат является высокоактивным видом кислорода из-за его высокой электрофильности и энергии в возбужденном состоянии. Наиболее важно то, что состояние $^1\text{O}_2$ допускает реакции с

разрешенным вращением, что позволяет участвовать во многих процессах оксигенации. Высокая реакционная способность связана со многими биологическими процессами. Было установлено, что $^1\text{O}_2$ играет ключевую роль во многих деструктивных механизмах и сигнальных путях, связанных с апоптозом. Исследования с модельными соединениями показали, что белки, аминокислоты и нуклеиновые кислоты являются биологическим субстратом $^1\text{O}_2$ (You, 2018). $^1\text{O}_2$ имеет радиус повреждения, измеряемый в нанометрах (10-60 нм) и короткое время жизни (10-320 нс), поэтому фотодинамическое повреждение будет происходить очень близко к внутриклеточному расположению ФС (Agostinis et al., 2011).

Было показано, что $^1\text{O}_2$ инактивирует каталазу посредством его реакции с гистидином в активном центре фермента, нивелируя антиоксидантную активность одной из центральных молекул опухолевых клеток. Модельные эксперименты показали, что низкие концентрации внеклеточного $^1\text{O}_2$, генерируемого при освещении фотосенсибилизатора фотофрина, вызывает локальную инактивацию нескольких молекул каталаз в защитном поясе мембраносвязанных каталаз опухолевых клеток (Riethmüller et al., 2015). В результате в непосредственной близости от инактивируемой каталазы перекись (H_2O_2) и пероксинитрит, которые постоянно генерируются снаружи раковых клеток, больше не разлагаются. Благодаря протонным насосам в мембране, пероксинитрит протонируется и образуется пероксинитриновая кислота, генерирующая NO_2 и гидроксильные радикалы. Взаимодействие H_2O_2 с гидроксильными радикалами приводит к образованию гидропероксидных радикалов, которые, по-видимому, реагируют с супероксид-анионами, полученными из НАДФН-оксидазы 1 (NOX1), приводя к генерации $^1\text{O}_2$ (Bauer, 2016).

«Вторичный синглетный кислород», который образуется после инактивации каталазы, может либо ингибировать больше молекул каталаз, либо активировать рецептор FAS (FASR), семейство рецепторов фактора некроза опухолей, лиганд-независимым способом. В результате активации FASR активность NOX1 увеличивается и индуцируется экспрессия NO-синтазы. Это приводит к

локальному увеличению супероксидных анионов, H_2O_2 , NO и пероксинитрита, которые могут вызвать межклеточную АФК/АФА-опосредованную передачу апоптоз-индуцирующих сигналов (Riethmüller et al., 2015). Скорее всего, не только ингибирование каталазы 1O_2 вызывает генерацию вторичного 1O_2 , но и локальное увеличение свободного NO во время этого процесса может вызвать обратимую инактивацию каталазы с последующим образованием вторичного 1O_2 (Bauer, 2016; Bauer, 2017).

Несмотря на то, что локализация ФС в клетке зависит от многих факторов, ФДТ может вызвать гибель клеток путем некроза и апоптоза (Mehraban, Freeman, 2015). Некроз – это незапрограммированная гибель клеток, вызванная химическими и физическими повреждениями. Это быстрый процесс клеточной деградации, характеризующийся набуханием цитоплазмы, распадом органелл и разрушением цитоплазматической мембраны. В результате некроза внутриклеточное содержимое выделяется во внеклеточное пространство, вызывая воспалительные реакции (Li et al., 2018). Некроз чаще встречается при использовании высоких доз света (Mehraban, Freeman, 2015).

Апоптоз - это запрограммированная гибель клетки, которая морфологически характеризуется конденсацией хроматина, расщеплением хромосомной ДНК на межнуклеосомные фрагменты, блеббингом мембраны и образованием апоптотических тел без разрушения плазматической мембраны. На сегодняшний день известно два основных пути апоптоза: внешний путь или рецепторный и внутренний или митохондриальный. В обоих путях принимают участие протеолитические ферменты, расщепляющие белки по остаткам аспарагиновой кислоты – каспазы, которые подразделяются на инициаторные (каспаза -2, -8, -9, -10), эффекторные (каспаза -3, -6, -7) и воспалительные (каспаза -1, -4, -5). Внешний сигнальный путь индуцируется взаимодействием рецепторов смерти, таких как Fas / CD95 и TNFR, с лигандами, что приводит к активации каспаз 8 и 10 путем формирования сигнального комплекса DISC. Внутренний сигнальный путь индуцируется окислительным стрессом, повреждением ДНК, гипоксией, стрессом ER и т.д., что приводит к потере трансмембранного

митохондриального потенциала, открытию высокопроводимых пор и высвобождению двух групп проапоптотических белков из межмембранного пространства в цитозоль. Первая группа включает цитохром с, второй митохондриальный активатор каспазы / прямой IAP-связывающий белок с низким pI (Smac / DIABLO) и сериновые протеазы HtrA2 / Omi, активирующие каспазозависимый путь апоптоза. Вторая группа включает апоптоз-индуцирующий фактор (AIF), эндонуклеазы G и CAD, которые перемещаются в ядро и вызывают фрагментацию ДНК (Elmore, 2007; Узденский, 2010).

Цитохром с, высвобождаясь из митохондрий в цитоплазматическое пространство, взаимодействует с адапторным белком Araf-1 и рекрутирует прокаспазу-9 в присутствии АТФ и dАТФ. Активированная каспаза-9 далее активирует каспазу-3, что приводит к развитию апоптоза по внутреннему митохондриальному пути (Zhang et al., 2017). В этом же процессе участвуют наряду с цитохромом с Smac / DIABLO, которые стимулируют апоптоз путем ослабления ингибирующего действия IAPs на каспазы. Каспазы регулируются некоторыми молекулами во время апоптоза. Например, IAPs представляют собой семейство белков, которые ингибируют активность каспазы-3 и каспазы-9, тем самым осуществляя негативное регулирование апоптоза. Напротив, этот ингибирующий эффект может быть устранен молекулами, называемыми IAP-связывающими белками, такими как Smac / DIABLOs, Grim, Hid и т. д. Обычно, они локализуются в митохондриях и высвобождаются в цитоплазму в виде активной димерной формы, когда клетка получает апоптотические сигналы (Рис. 3) (Li et al., 2018).

Апоптоз является одним из способов гибели клеток при ФДТ (Agostinis et al., 2011). ФС, ассоциированный с мембранами митохондрий, может приводить к фотоповреждению мембран, стрессу эндоплазматического ретикулума (ER), перекисному окислению липидов (ПОЛ) (Kessel, Castelli, 2001; Xue et al., 2001; Usuda et al., 2003; Slomp, Peperzak, 2018), повышая проницаемость наружной мембраны митохондрий (MOMP) и приводя к высвобождению активаторов каспаз, таких как цитохром с и Smac / DIABLO, или других проапоптотических

молекул, включая AIF (Buytaert et al., 2007). Разрыв лизосомальной мембраны и высвобождение катепсинов из фотоокисленных лизосом вызывает деградацию Bid и MOMP (Reiners et al., 2002).

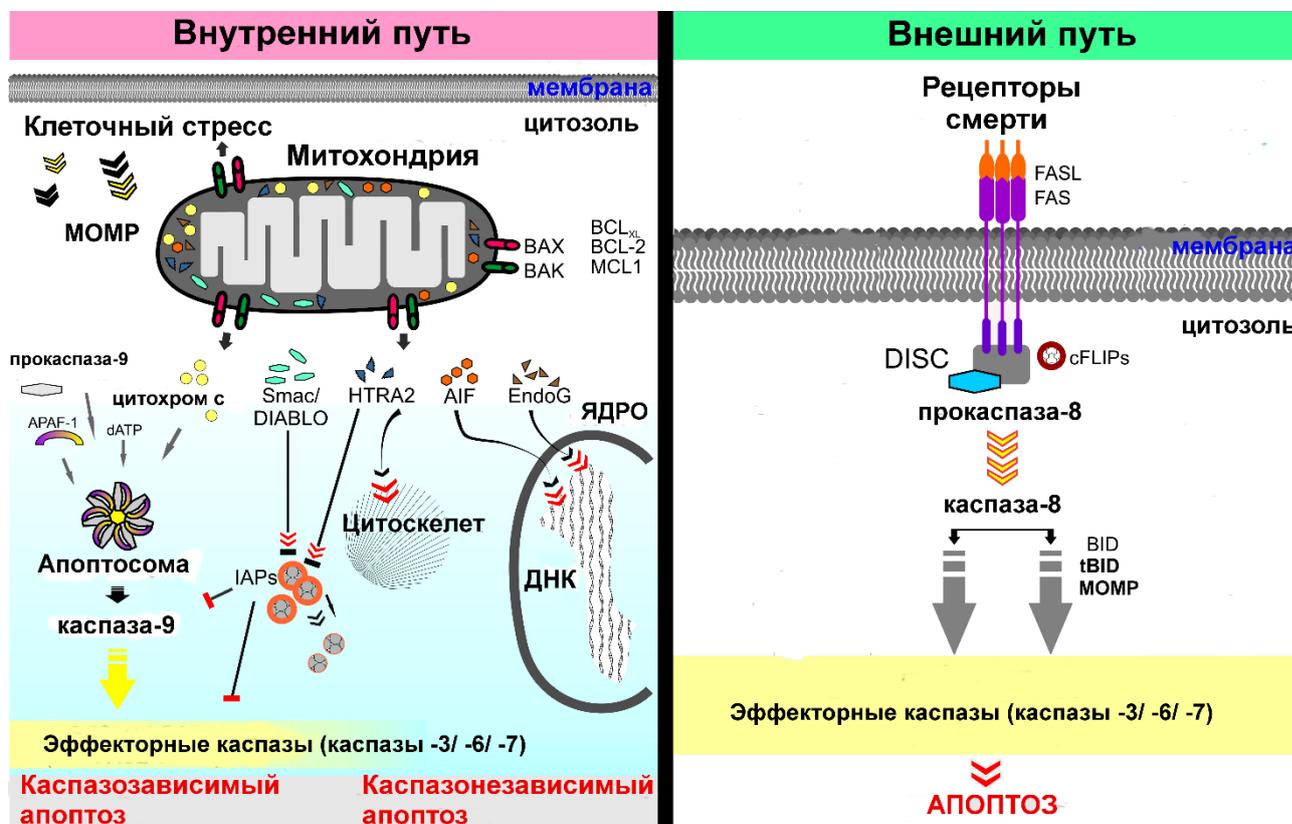


Рисунок 3. Схема внутреннего и внешнего путей апоптоза

Однако фототоксичность реализуется не только через активацию каспаз, но и через другие протеазы, такие как кальпаины, а также и неапоптотическими путями (Agostinis et al., 2011). Кальпаины – это семейство Ca^{2+} -активируемых внутриклеточных цистеиновых протеаз. Они могут приводить к гибели клетки по пути апоптоза посредством расщепления белка p53 до p25, что приводит к активации p25 / Cdk5 (Zhang et al., 2017).

Ингибирование или генетический дефицит каспаз только замедляют фототоксичность или приводят к некротической гибели клеток (Agostinis et al., 2011). В недавних исследованиях было показано, что некроз может быть вызван сигнальными путями. Молекулярные механизмы, лежащие в основе запрограммированного некроза, до конца неясны. Некроптоз может быть вызван связыванием лиганда с рецепторами семейства факторов некроза опухоли (TNF),

повреждением ДНК, стрессом эндоплазматического ретикулума, избыточной генерацией АФК и т.д. Основные молекулярные сигнальные события некроптоза включают в себя активацию мультипротеинового комплекса, называемого некросомой, содержащую киназы RIP1, RIP3 и MLKL. RIP1 рекрутирует RIP3, способствуя его активации. Активированный RIP3 фосфорилирует MLKL, вызывая его олигомеризацию и транслокацию в клеточные мембраны, что приводит к фатальной проницаемости мембраны (Florea et al., 2019; Yang et al., 2016). Митохондриальный АФК рассматривают как важный компонент индукции некроптоза, и многие исследования подтверждают эту точку зрения. В ряде исследований было показано, что нарушение в работе митохондрий, ведущее к накоплению АФК, приводит к RIP1-зависимому некроптозу, который ингибировался акцепторами АФК (Ye et al., 2012; Shindo et al., 2013).

Фотоповреждение клетки также может приводить к стимуляции аутофагии. Аутофагия – это процесс, при котором часть поврежденных органелл и цитоплазмы клетки заключаются в аутофагосому с двойной мембраной. Слияние аутофагосомы с лизосомой вызывает деградацию аномальных белков и органелл. Функции ФДТ-индуцированной аутофагии до конца неясны. Этот процесс может выполнять как цитопротекторную, так и цитотоксическую роль при фотодинамическом воздействии на раковые клетки (Ouyang et al., 2018). Так нокаут связанного с аутофагией гена усиливал цитотоксичность ФС Verteporfin в клетках гепатомы (Andrzejak et al., 2011), однако обратный эффект наблюдался при ФДТ на основе ФС NPe6 / WST11 (Kessel et al., 2012).

Таким образом, ФДТ по-прежнему считается новой и многообещающей противоопухолевой стратегией. Её полный потенциал еще до конца не продемонстрирован. Диапазон применения ФДТ в отдельности или в сочетании с другими противоопухолевыми методами определенно не исчерпан. Преимущества ФДТ по сравнению с хирургическим вмешательством, химиотерапией и лучевой заключается в минимальном количестве побочных эффектов, что ускоряет процесс реабилитации. Из-за отсутствия естественных механизмов утилизации $^1\text{O}_2$ и уникальных механизмов цитотоксичности ФДТ

является перспективным методом лечения рака. Исследование различных сигнальных путей, реализующихся при фотодинамическом воздействии, являются залогом дальнейшего развития ФДТ. Перспективным направлением в этой области выступает NO, роль которого при ФДТ остается спорной.

1.4. Роль NO при фотодинамическом воздействии

В настоящее время достоверно известно, что NO вовлечен в опухолевые процессы и является важным фактором, определяющим эффективность лечения рака, в частности такими методами, которые опосредованы повышенным образованием АФК, как ФДТ (Rapozzi et al., 2015; Reeves et al., 2009).

ФДТ вызывает сильный окислительный стресс в дополнение к васкулярно-опосредованным реакциям, сопровождающимся рекрутированием нейтрофилов. Все эти процессы чувствительны к NO. Поэтому было высказано предположение, что внутренний уровень NO в опухолевых клетках может быть определяющим фактором при ФДТ. В опухолях, продуцирующих высокие концентрации NO, сосудистые события, включая вазоконстрикцию, ишемию, гипоксию, в дополнение к воспалительным реакциям могут быть уменьшены при фотодинамическом воздействии. Однако высокий уровень NO, поддерживающий расширение сосудов при ФДТ, может увеличивать оксигенацию опухоли, тем самым усиливая фототоксическое повреждение, зависимое от кислорода (Reeves et al., 2009). Правда этот вопрос остается спорным. Так часть исследований показали, что высокий уровень продукции NO опухолевыми клетками коррелирует с их повышенной резистентностью к цитотоксическим эффектам ФДТ, и введение ингибиторов активности NOS после облучения увеличивает вероятность излечения. Основным механизмом NO-зависимой цитопротекции рака при ФДТ связывают с сосудорасширяющим эффектом NO, поддерживающим опухолевый рост (Girotti, 2018). Другие научные труды указывают, что доноры NO увеличивают ФДТ-индуцированную противоопухолевую активность (Carneiro et al., 2011; Kumari et al., 2014; Rapozzi et al., 2015).

Опубликованные исследования доказывают, что высокий уровень NO приводит к интерференции дисрегулированной петли NF-κB / Snail / YY1 / RKIP в опухолях (Rapozzi et al., 2015). В раковых клетках этот сигнальный механизм нарушен и тесно связан с выживанием, метастазированием и устойчивостью к цитотоксическим агентам. Опухолевые клетки проявляют конститутивную гиперактивацию NF-κB, регулирующего пролиферацию, антиапоптотические сигналы, метастазирование и резистентность. NF-κB контролирует транскрипцию Snail (транскрипционный фактор метастазирования и резистентности), ингибирующего RKIP, а также регулирует YY1 (транскрипционный фактор лекарственно-иммунной резистентности), который в свою очередь моделирует экспрессию Snail. При этом образование RKIP (белок-ингибитор Raf-киназы), подавляющего метастазирование и регулирующего апоптоз, в опухолевых клетках недостаточно (Bonavida, 2015; Bonavida, 2014). Высокий уровень ФДТ-индуцированного NO может приводить к ингибированию активности NF-κB путем S-нитрозилирования p50 и p65 и последующей инактивации Snail, что детерминирует депрессию RKIP, который блокирует активность NF-κB (Rapozzi et al., 2015). Однако низкие концентрации NO активируют NF-κB, Snail, YY1 и ингибируют RKIP (Rapozzi et al., 2013; Rapozzi et al., 2015; Della Pietra et al., 2015).

Цитопротекторная роль NO при ФДТ может заключаться в ингибировании перекисного окисления липидов в мембране. Фотодинамически генерируемый $^1\text{O}_2$ реагирует с ненасыщенными мембранными фосфолипидами и холестерином с образованием первичных гидропероксидов липидов (LOOH). Эти LOOH подвергаются каталитическому восстановлению ионами металлов до свободнорадикальных интермедиатов ($\text{LO}\cdot/\text{OLOO}\cdot$ и $\text{LOO}\cdot$), которые индуцируют ПОЛ, приводя к повреждению мембраны и гибели клетки. NO может перехватывать свободные радикалы типа $\text{LO}\cdot/\text{OLOO}\cdot$ и $\text{LOO}\cdot$, выполняя функции мембранопротектора (Girotti, 2018). Опосредованное влияние на устойчивость раковых клеток к ФДТ могут оказывать макрофаги, продуцируя NO, который, диффундируя в опухоль, может подавлять свободные радикалы, образующиеся из липидов мембран (Niziolek et al., 2003). NO может вызывать устойчивость к

фотоокислению путем индукции экспрессии гемоксигеназы-1 (ОН-1) с помощью сGMP-независимого пути или ферритина. Повышенная активность ферритина приводит к крупномасштабной секвестрации свободного железа и защите клетки от некротического фотобийства. ОН-1 способна блокировать апоптоз (Yun et al., 2013), связывая внутриклеточное железо, разлагая потенциально опасный прооксидантный гем. Косвенным эффектом активности ОН-1 может выступать индукция ферритина железом, выделяющимся при деградации гема, что будет ограничивать участие свободного железа в реакции Фентона (Bouton, Demple, 2000). Исследования показали, что NO ингибирует активацию митоген-активируемых (MAPKs) JNK и p38 α , а также дезактивацию антиапоптотических p38 β и ERK1 / 2 (Bhowmick, Girotti, 2009). Кроме того, умеренные концентрации NO ингибируют каспазы путем S-нитрозилирования (Li, Wogan, 2005), подавляют проапоптотический Bax и усиливают антиапоптотический Bcl-xL (Bhowmick, Girotti, 2010). Однако, NO может образовывать ONOO $^-$, обладающий высоким окислительным потенциалом, который в зависимости от концентрации может вызывать ПОЛ и гибель клетки (Rapozzi et al., 2013).

Повышенный уровень NO в сосудистой сети опухоли во время ФДТ может подавлять генерацию воспалительных нейтрофилов и ингибировать экспрессию молекул адгезии лейкоцитов, что приводит к снижению адгезии и экстравазации лейкоцитов. Предполагается, что усиление адгезии лейкоцитов способствует перитуморальному воспалительному ответу и микрососудистой обструкции, наблюдаемой при ФДТ, потенцируя разрушение опухоли. Одним из центральных событий при воспалении сосудов является активация эндотелиальных клеток и молекул адгезии, которые облегчают прикрепление лейкоцитов и эмиграцию из сосудов. При воспалительных состояниях сосудистые стенки и макрофаги генерируют высокую концентрацию iNOS, которая действует как ингибитор ауторегуляторной обратной связи воспалительного процесса. Поэтому ингибирование NO может поддерживать и усиливать воспалительный процесс сосудов (Reeves et al., 2009).

Ко всему выше изложенному, стоит добавить вопрос, какая изоформа NO-синтазы играет ведущую роль в выживании или гибели раковых клеток при ФДТ? Так клетки молочной железы COH-BR1 экспрессируют iNOS в ответ на фотодинамическое воздействие. Другие изоформы NOS, nNOS и eNOS, либо не обнаруживались в этих клетках, либо не увеличивались выше базального уровня. Конкурентный ингибитор iNOS усиливал апоптоз COH-BR1 (Bhowmick, Girotti, 2011). Недавние исследования продемонстрировали, что две клеточные линии карциномы предстательной железы, PC3 и DU145, могут также использовать генерируемый iNOS NO для устойчивости к цитотоксическим эффектам ФДТ (Bhowmick, Girotti, 2014; Fahey, Girotti, 2015). Показана ключевая стимулирующая роль iNOS/NO в устойчивости глиобластомы к фотокиллингу и в агрессивности выживших клеток. Человеческие глиомы экспрессируют значительный уровень iNOS и NO, продуцируемый этой NOS, активно участвует в прогрессировании опухоли (Fahey et al., 2016). Однако другие исследования сообщают, что эндогенный iNOS/NO может модулировать фотокиллинг клеток меланомы в зависимости от интенсивности ФДТ. Низкий уровень NO, индуцированный слабым фотодинамическим воздействием, выполнял цитопротекторные функции через активацию NF-κB и Snail и депрессию RKIP. Напротив, высокий уровень NO, индуцированный сильным фотодинамическим воздействием, приводил к ингибированию NF-κB и Snail и активации RKIP, ведущей к апоптозу (Rapozzi et al., 2013; Rapozzi et al., 2015; Della Pietra et al., 2015).

Однако литературные источники демонстрируют, что eNOS участвует в опухолевых процессах, таких как ангиогенез, метастазирование и инвазия (Ying, Hofseth, 2007; Lim et al., 2008). Кроме того eNOS модулирует неопластические процессы не только через эндотелиальную продукцию NO (Fukumura et al., 2006), но и непосредственно через свою экспрессию в опухолевых клетках (Jadeski et al., 2000; Lim et al., 2008). Не последнюю роль в канцерогенезе играет nNOS, которая может участвовать в дифференцировке нейробластомы, в росте её нейритов (Evangelopoulos et al., 2010), в пролиферации и метастазировании меланоцитов

(Yang et al., 2013), в регуляции NO-сигнальных путей в глиомах (Tanriover et al., 2008).

Таким образом, NO выполняет как цитопротекторные, так и цитотоксические функции при ФДТ, что во многом зависит от уровня NO в опухолевых клетках и дозы ФДТ. Механизмы, лежащие в основе этих эффектов, до конца не изучены, хотя идентифицирован ряд NO-зависимых сигнальных путей, ответственных за выживание и гибель раковых клеток. Основную роль в ФДТ-индуцированной генерации NO в опухолях выполняет iNOS. Однако роль в этом процессе eNOS и nNOS еще предстоит выяснить.

1.5. Ядерный фактор-κВ и его роль при фотодинамическом воздействии

Фактор транскрипции NF-κB был открыт в 1986 году как ядерный фактор, связывающий энхансерные элементы легкой цепи иммуноглобулина каппа, выделенного из активированных В-клеток (поэтому называется после аббревиатуры: NF-κB). Семейство NF-κB состоит из транскрипционных факторов, которые играют сложную роль в иммунитете, воспалении, вирусной репликации, инициации и прогрессии рака. У млекопитающих было идентифицировано пять белков семейства NF-κB: p65 (RelA), RelB, c-Rel, NF-κB1 (p105/p50) и NF-κB2 (p100/p52). В отличие от других представителей NF-κB NF-κB1 и NF-κB2 синтезируются как проформы (p105 и p100), а затем протеолитически модифицируются до p50 и p52 (Tilborghs et al., 2017).

Белки NF-κB функционируют как гомо- или гетеродимеры, которые состоят из мономеров двух подсемейств, содержащих домен гомологии Rel подсемейства p50 и p52 (субъединицы типа I) и подсемейство RelA, RelB и C-Rel (субъединицы типа II) (Wong et al., 2011; Faria et al., 2017). Rel-домен представляет собой высоко консервативную N-концевую последовательность, содержащую 300 аминокислотных остатков (Hunter et al., 2016), и предназначен для димеризации, связывания с генными мишенями и белками IκB, ингибирующими NF-κB (Faria et al., 2017; Hoesel, Schmid, 2013). Белки семейства IκB характеризуются анкириновыми повторами, которые ассоциируются с ДНК-связывающими

доменами NF-κB, делая их транскрипционно неактивными и обеспечивая их цитоплазматическую локализацию (Hoesel, Schmid, 2013). Субъединицы типа I не имеют трансактивирующего домена и могут активировать транскрипцию только как гетеродимеры с субъединицей типа II или как гомодимеры в комплексе с кофакторами, такими, как BCL3, IκBZ и т. д. В данном гетеродимере субъединица типа II обладает активирующей транскрипцию способностью. Все белки NF-κB подвергаются фосфорилированию и другим посттрансляционным трансформациям, которые необходимы для их активации и транслокации в ядро, где они индуцируют экспрессию различных генов (Wong et al., 2011).

NF-κB активируется различными внеклеточными стимулами, такие как цитокины (Das et al., 2018), факторы роста (Ji et al., 2018), гормоны (Kim et al., 2015), радиация, стресс, патогенные агенты (Hinz, Scheidereit, 2014) а также NO (Rapozzi et al., 2013; Rapozzi et al., 2015; Della Pietra et al., 2015). В покоящихся клетках NF-κB находится в цитоплазме в неактивном состоянии под действием IκB. После стимуляции IκBs фосфорилируется с помощью комплекса IκB-киназы (IKK), который вызывает его быструю деградацию и высвобождение NF-κB для ядерной транслокации и последующего контроля транскрипции генов. Бета-субъединица IκB (IKKβ) является одной из трех киназ в каталитическом комплексе IKK, которая является точкой конвергенции для многих сигнальных путей, регулирующих активность NF-κB (Bloom et al., 2019). Этот тип активации, именуемый, как канонический, опосредуется через Toll-подобные рецепторы (TLR), рецепторы фактора некроза опухоли (TNFR), антигенные рецепторы и рецепторы интерлейкина-1 (IL-R). Также существует альтернативный путь активации NF-κB, неканонический или нетипичный путь, который не зависит от IKK2 и NEMO (регуляторный неферментативный каркасный белок). Важные рецепторы, активирующие этот путь: B-клеточный фактор активации (BAFFR), CD40 и рецептор активатор лиганда NF-κB (RANKL). Активация NF-κB альтернативным путем реализуется с помощью NF-κB-индуцирующей киназы (NIK), которая фосфорилирует и активирует преимущественно IKK1, что приводит к убиквитинированию и частичной деградации p100 до p52 (Tilborghs et al., 2017).

Оба пути активации NF-κB участвуют в онкологических процессах. Канонический путь, как правило, ведет к антиапоптотическим эффектам, защищая опухоль от гибели (Kina et al., 2018). Альтернативный путь иногда подавляет раковый рост, облегчая апоптоз (Ventires, 2001).

NF-κB играет двойную роль в выживании клеток. Так часть исследований показала высокую степень экспрессии NF-κB в новообразованиях, которая коррелировала с негативным прогнозом. Напротив, другая продемонстрировала, что NF-κB трансаktivировал экспрессию генов проапоптоза, включая Fas и рецепторы смерти, и выступал в качестве супрессора опухолей, облегчающего гибель раковых клеток (Gu et al., 2018). Активация NF-κB может увеличивать выживаемость клеток, ингибируя запрограммированную гибель клетки путем стимуляции транскрипции антиапоптотических генов. NF-κB также может регулировать экспрессию генов пролиферации, VEGF-зависимый ангиогенез и бессмертие клеток через теломеразы (Tilborghs et al., 2017). NF-κB может способствовать развитию рака путем индукции экспрессии белков семейства AID/APOBEC, вызывающих геномные повреждения из-за их ДНК-дезаминирующей активности (Rebhandl et al., 2015). Так, например, недавние исследования продемонстрировали, что NF-κB контролирует транскрипцию APOBEC3B (A3B) в клетках рака молочной железы и клеточных линиях лимфомы (Miyayama et al., 2016). Немаловажным фактором в развитии онкологических процессов является фактор сигнальной трансдукции и активации транскрипции 3 (STAT3), регулирующий пролиферацию, дифференцировку, метаболизм, рост, гибель клеток. STAT3 может выступать как супрессор опухолевого роста, так и его синергист в зависимости от множества факторов. Цитокины, экспрессия которых индуцируется в ответ на NF-κB в иммунных клетках микроокружения опухоли, приводят к активации STAT3 в раковых клетках. Другое взаимодействие между NF-κB и STAT3 включает физическое взаимодействие между ними, кооперацию этих факторов в промоторах/энхансерах генов, NF-κB-зависимую экспрессию ингибиторов активации STAT3 и STAT3-негативную регуляцию NF-κB (Grivennikov, Karin,

2009). Также NF-κB является транскрипционным фактором для iNOS (Kleinert et al., 2003; Singh et al., 2016), которая играет одну из ключевых ролей в опухолевом генезисе (Rapozzi et al., 2015; Reeves et al., 2009). Высокий уровень NO, генерируемый iNOS, влияет на дисрегулированную петлю NF-κB/Snail/YY1/RKIP в опухолях, которая является важным сигнальным механизмом, связанным с выживанием, метастазированием и устойчивостью к цитотоксическим агентам, в раковых клетках (Rapozzi et al., 2015).

NF-κB является важной молекулярной мишенью при ФДТ, индуцирующей активацию этого ядерного фактора. Первые исследования, продемонстрировавшие активацию NF-κB при ФДТ, были представлены Ryter и Gomer в 1993, показавшими 10-кратное увеличение активности NF-κB в ядре клеток лейкемии мыши L1210, опосредованной фотофриновой фотосенсибилизацией (Ryter, Gomer, 1993). После публикаций этих данных быстро последовала волна исследований, посвященных теме NF-κB в раковых клетках при фотодинамическом воздействии. NF-κB ответственен за провоспалительные эффекты при ФДТ. Многие провоспалительные цитокины, такие как IL-1, TNFα, IL-6, хемокин (IL-8, MCP-1 и MIP-1α) и молекулы адгезии (ICAM-1, VCAM и селектины), находятся под контролем NF-κB. Было показано, что провоспалительные цитокины продуцируются опухолевыми клетками после ФДТ как *in vitro*, так и *in vivo* и оказывают различные эффекты на течение онкологического процесса. Помимо генов, кодирующих провоспалительные цитокины и хемокины, NF-κB индуцирует экспрессию антиапоптотических белков Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1 и сурвивин, ответственных за выживание опухоли. Ингибирование NF-κB при ФДТ часто приводит к апоптозу раковых клеток (Piette, 2015).

Таким образом, NF-κB является важным ядерным фактором транскрипции, опосредующим множество биологических эффектов, как в норме, так и при патологических состояниях. NF-κB занимает особое место при неопластических процессах, выполняя в зависимости от условий либо проонкогенные, либо антионкогенные функции. ФДТ сопряжено с увеличением активности NF-κB,

ингибирование которого повышает цитотоксический эффект фотосенсибилизации. Сигнальные процессы, связанные с выживаемостью и гибелью клеток посредством NF-κB, до конца не изучены и являются перспективным направлением исследования.

1.6. Ионы кальция и их роль при фотодинамическом воздействии

Ион кальция (Ca^{2+}) является вторичным мессенджером, участвующим в различных клеточных процессах, включая пролиферацию, дифференцировку, метаболизм, сокращение мышц, нейрональную пластичность и транскрипцию генов (Maklad et al., 2019). В дополнение к его различным физиологическим функциям Ca^{2+} участвует и при патологических состояниях таких как рак (Maklad et al., 2019), инсульт (Rakers et al., 2017), диабет (Ahn et al., 2017), болезнь Паркинсона (Duda et al., 2016) и т.д.

Внутриклеточные кальциевые сигналы, генерируемые клетками, специфичны по величине, времени и местоположению и включают в себя различные компоненты передачи Ca^{2+} -сигналов: каналы, насосы, транспортеры, белки и их зависимые эффекторы. Изменения в передаче Ca^{2+} -сигналов могут вызвать изменения в клеточной физиологии, поэтому концентрация Ca^{2+} в клетках находится под жестким контролем (Maklad et al., 2019; Carafoli, 2004; Clapham, 2007). В условиях покоя в цитоплазме клетки поддерживается низкая концентрация Ca^{2+} в пределах 50-200 нМ, тогда как во внеклеточной среде она примерно равна 3 мМ. Этот концентрационный градиент поддерживается путем активного транспорта Ca^{2+} , реализующийся главным образом через Ca^{2+} -насосы: Ca^{2+} -АТФаза плазматической мембраны (PMCA), Ca^{2+} -АТФаза саркоплазматического/эндоплазматического ретикулума (SERCA) и $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -АТФаза сетевого секреторного пути Гольджи (SPCA) (Varga et al., 2018). Приток Ca^{2+} осуществляется каналами плазматической мембраны, включающими в себя каналы с транзисторным рецепторным потенциалом (TRP), потенциал-управляемые кальциевые каналы (VGCC), лиганд-управляемые ионотропные P2X-рецепторы, механочувствительные пьезоканалы, депо-управляемые каналы

кальциевого входа (Deliot, Constantin, 2015). Ca^{2+} каналы эндоплазматического ретикулума (ER) включают рианодиновый рецептор (RYR) и инозитол 1,4,5-трифосфатный (IP3) рецептор (IP3R). Двухпористые каналы (TPC) регулируют высвобождение Ca^{2+} из эндолизосомной системы. Уровни митохондриального Ca^{2+} контролируются комплексом митохондриального кальциевого унипортера (MCU) и митохондриальным $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ -обменником (NCLX) (Maklad et al., 2019; Kawamoto et al., 2012; Lam, Galione, 2013).

В поддержании кальциевого гомеостаза и Ca^{2+} -сигналикации принимают участие Ca^{2+} -связывающие растворимые белки цитоплазмы, часть из которых выполняет исключительно функции буфера Ca^{2+} , а другая участвуют в передаче сигнала. К последней группе белков, получивших название Ca^{2+} -сенсоров, относятся такие ее представители, как аннексины, связывающие фосфолипиды, гельсолин и белки, содержащие специфические домены C-2 и EF-рука (Yanez et al., 2012).

Ca^{2+} генерируют сигналы в виде волн и пиков. Пики активируют локальные клеточные процессы, в то время как волны Ca^{2+} генерируют глобальные сигналы, приводящие к активации межклеточных и внутриклеточных функций. Сигналы Ca^{2+} в течение длительных периодов передаются через повторяющиеся импульсы Ca^{2+} , известные как колебания. Оба типа кальциевых сигнатур, волны и пики, могут генерировать колебательные сигналы, запускающие различные процессы в зависимости от их длительности (Han et al., 2017).

Перегрузка Ca^{2+} клетки вызывает различные цитотоксические эффекты. Так происходит массовая активация протеаз и фосфолипаз, осаждение фосфатов Ca^{2+} , набухание митохондрий и т.д. Классические представления о токсической роли Ca^{2+} изначально были ассоциированы с некрозом, то есть с катастрофическим нарушением целостности клеток и их функций после воздействия различных повреждающих факторов, приводящих к активации Ca^{2+} -активируемых гидролизующих ферментов. Типичным примером является гибель клеток, вызванная комплементом и эксайтотоксичность, при которой

глутамат-зависимая гиперстимуляция приводит нейроны к некротической смерти (Pinton et al., 2008)

Более поздние исследования показали, что Ca^{2+} также регулирует другие типы гибели клеток. Неконтролируемое увеличение концентрации Ca^{2+} в цитозоле может вызывать апоптоз. Митохондриальная Ca^{2+} -перегрузка вызывает набухание митохондрий и разрыв наружной мембраны, что приводит к выбросу митохондриальных апоптотических факторов в цитозоль. Межмембранное пространство этого клеточного компартмента содержит множество проапоптотических агентов, таких как цитохром с, фактор, индуцирующий апоптоз (AIF), прокаспаза-9, Smac / DIABLO, а также эндонуклеаза G. Их высвобождение, опосредованное избытком Ca^{2+} , приводит к активации внутреннего пути апоптоза (Takata et al., 2017; Giorgi et al., 2012).

Изучение кальциевой сигнализации важно в контексте ФДТ. Было показано, что при ФДТ происходит значительное увеличение внутриклеточного Ca^{2+} главным образом за счёт поступления его из внеклеточной среды (Wu et al., 2015). Также увеличение Ca^{2+} в клетке после фотоиндуцированного повреждения может реализовываться через мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных хранилищ, например, эндоплазматического ретикулума (ER) (Li et al., 2015). ФДТ-индуцированный Ca^{2+} -отток из ER и поглощение высвобожденного Ca^{2+} митохондриями может активировать внутренний путь апоптоза. Также Ca^{2+} при ФДТ способствует активации кальпаинов, Ca^{2+} -зависимых цистеиновых протеаз, индуцирующих как альтернативные механизмы каспазезависимого апоптоза, так и канонические каспаззависимые пути. Мобилизация внутриклеточных запасов Ca^{2+} стимулирует активацию прокаспазы-12, мембранно-локализованного фермента ER, являющегося посредником в процессе апоптоза. Активированный Ca^{2+} кальпаин участвует в процессинге AIF (Mosserova, Kralova, 2012), запускающего конденсацию хроматина и фрагментацию ДНК (Bano, Prehn, 2018). Ca^{2+} также активирует конститутивные NOS, генерирующих NO (Förstermann, Sessa, 2012). NO участвует в гибели фотосенсибилизированных клеток (Kovaleva, Uzdensky, 2016).

Ca^{2+} может выполнять цитопротекторную функцию при ФДТ. Так было продемонстрировано, что кальциевая сигнализация в линии клеток рака толстой кишки SW480, фотосенсибилизированных ALA, запускает защитные от апоптоза механизмы путем активации пути ERK (Ras-ERK, MAPK/ERK) (Zheng et al., 2006).

Таким образом, Ca^{2+} является важнейшим сигнальным посредником, выполняющим разнообразные физиологические функции. Также Ca^{2+} принимает участие в патологических процессах, в частности, онкологических. Внутриклеточная концентрация Ca^{2+} поддерживается в жестких рамках и регулируется множеством молекулярных систем, обеспечивающими Ca^{2+} - гомеостаз и сигнальную трансдукцию. Роль Ca^{2+} при ФДТ неоднозначна и нуждается в дальнейших исследованиях.

1.7. Нейротравма

Травмы центральной нервной системы, включая черепно-мозговую и спинно-мозговую травмы, представляют серьезную проблему в ветеринарии и часто являются причиной смерти и инвалидности животных (Finnie et al., 2001; DiFazio et al., 2013; Park et al., 2012; Eminaga et al., 2011; Vali et al., 2011). Также большую опасность представляют травмы периферической нервной системы, например, травмы периферических нервов, которые часто приводят к ухудшению качества жизни вплоть до тяжелой инвалидности (Welch et al., 1996; Forterre et al., 2007). При механических повреждениях в нервной ткани развиваются различные патологические процессы, приводящие к гибели нейронов, варьирующейся в зависимости от степени тяжести травмы, лечения и компенсаторных возможностей организма. Одним из видов механического повреждения является аксотомия, т.е. полная перерезка нервов, инициирующая каскад молекулярных и клеточных событий, приводящих к гибели нейронов (Povlishock, Christman, 1995; Martin et al., 1998; Barron, 2004).

При аксотомии развиваются три основных процесса: валлерова дегенерация отрезанного аксона, смерть перерезанного нейрона или его регенерация с

отрастанием аксона и восстановлением нервных связей. В периферической нервной системе регенерирующие аксоны могут в конечном счете снова соединяться с мишенями для восстановления функции (Navarro, 2007). Регенерация аксона включает в себя передачу молекулярных сигналов от места повреждения к телу клетки, к ядру, запуск экспрессии ряда генов, перенос синтезированных белков к поврежденному участку, формирование конуса роста аксона, его рост и, в итоге, формирование новых синаптических контактов (Navarro et al., 2007; Liu et al., 2011; Rishal, Fainzilber, 2014).

Важным условием выживания нейронов при аксотомии является межклеточное взаимодействие с глиальными клетками. Известно, что нервные и глиальные клетки обмениваются молекулярными сигналами, в частности, факторами роста, которые поддерживают взаимное выживание. Повреждение нервов вызывает гибель окружающих клеток Шванна. В свою очередь, повреждение глии подавляет функции нейронов и вызывает их гибель. Нейрон-глиальные взаимодействия играют важную роль в поддержании выживания и регенерации нейронов после повреждения аксонов (Berezhnaya et al., 2017).

Выживание и гибель клеток при аксотомии контролируется рядом сигнальных путей, такими как путь киназы MAP 3, включая ERK, JNK и p38; путь PI3-киназы/протеинкиназа В (Akt)/CSK-3; путь цАМФ/протеинкиназы А; путь NO/протеинкиназы G; Ca²⁺-зависимые пути, в том числе протеинкиназы С и кальмодулин-зависимых киназ; путь AMPK/mTOR и др (Berezhnaya et al., 2017). Также p53-зависимые сигнальные пути играют важную роль в смерти и выживании нейронов после аксотомии (Di Giovanni et al., 2006; Ma et al., 2017).

Множество сигнальных путей регулируют рост аксона посредством контроля цитоскелета, синтеза и транспорта белка. Они запускаются молекулами адгезии, рецепторами факторов роста, механотрансдукцией. Здесь задействованы многие сигнальные пути, включая пути АКТ и JAK/STAT. Передача сигналов через киназы также необходима для эффективной регенерации, при этом требуется активность как DLK, так и JNK. В последние годы особое внимание уделялось передаче сигналов от PIP3. Этот фосфолипид генерируется PI3-киназами,

активирующимися рецепторами клеточной мембраны. Уровень PIP3 находится под строгим контролем уровня активности PI3K и посредством дефосфорилирования PTEN и SHIP. PIP3 передает сигналы через путь АКТ/mTOR, а также через ряд других сигнальных путей (Fawcett, Verhaagen, 2017).

Таким образом, нейротравма является серьезной проблемой в медицине и включает в себя различные типы повреждения нервной системы, одним из которых является аксотомия. В выживании или гибели нервных клеток, а также в регенерации аксонов после аксотомии играют роль различные сигнальные пути, многие механизмы которых до сих пор остаются нераскрытыми.

1.8. Белок p53 и его роль при аксотомии

Белок p53, известен как опухолевый супрессор и «страж генома». Он является регулятором важных функций клетки, включая репарацию ДНК, клеточный цикл, метаболизм и апоптоз (Nicolai et al., 2015; Aubrey et al., 2018; Beyfuss, Hood, 2018; Marceletal, 2018; Simabuco et al., 2018). В качестве фактора транскрипции p53 контролирует экспрессию множества генов, которые принимают участие в вышеперечисленных процессах. По последним данным, число генов, контролируемых этим фактором транскрипции, превышает 3000, хотя по более строгим оценкам число генов ограничено несколькими сотнями (Fisher, 2017; Sullivan et al., 2018). Наряду с транскрипционно-зависимым путем регуляции, он принимает участие и в транскрипционно-независимых процессах, таких как регуляция функций митохондрий, запуск апоптозной сигнализации в клетках с митохондриальной недостаточностью (Wang et al, 2014; Dai et al., 2016).

Белок p53 имеет модульную доменную структуру, состоящую из ДНК-связывающих и тетрамеризационных доменов, которые включают в себя неупорядоченные участки на С- и N-концах (Рис. 4). В активном состоянии p53 является тетрамером.

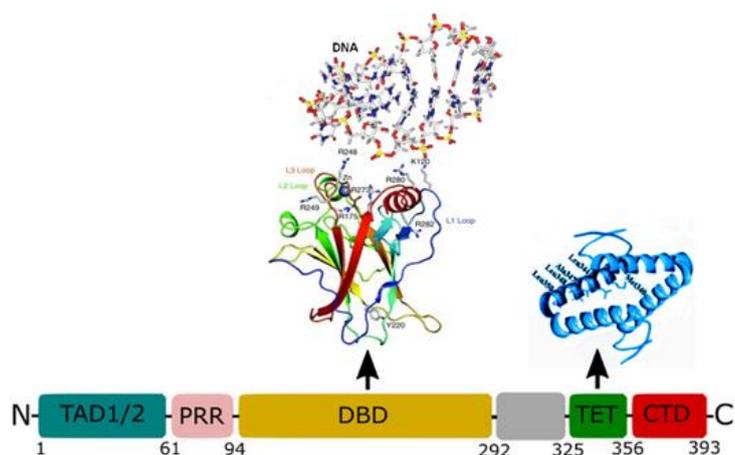


Рисунок 4. Схема строения p53. Структура p53 включает в себя трансактивационный домен, состоящий из двух субдоменов TAD1 и TAD2, за которыми располагается область, насыщенная пролином (PRR), ДНК-связывающего центрального домена, образованного иммуноглобулин-подобным β -сэндвич-каркасом и расположенной на его конце ДНК-связывающей поверхностью, а также домена тетрамеризации и С-концевого домена CTD, регулирующим активность p53 [Родькин и др., 2021].

Каждый его мономер включает домены с различной молекулярной стабильностью: свернутый ДНК-связывающий домен (DNA-binding domain, DBD) и домен тетрамеризации (tetramerization domain, TET), трансактивирующий домен (transactivation domain, TAD) с внутренне неупорядоченной структурой и С-концевой домен (C-terminal domain, CTD) (Рис. 4) (Fadda and Nixon., 2017).

Основной домен DBD ответственен за связывание с ДНК и состоит из центрального иммуноглобулин-подобного β -сэндвича, а также ДНК-связывающего сайта, локализованном на его конце. Находящаяся на низком уровне термодинамическая и кинетическая стабильность DBD обеспечивает быстрый реверс конформации p53 из свернутого в развернутое состояние и обратно, делая структуру p53 пластичной и предопределяя его эффективное связывания с различными белками (Brandt et al., 2012).

Домен TAD, состоящий из двух N-концевых субдоменов TAD1 и TAD2, обеспечивает проапоптотическую транскрипцию множества генов, однако рядом исследователей были показана его роль в процессах репарации ДНК (Wawryk-

Gawda et al., 2014). Другой домен ТЕТ, располагающийся на С-конце p53 между 311-м и 363-м аминокислотными остатками, представляет собой димер димера и ответственен за тетрамеризацию p53 (Raj and Attardi., 2017). И завершает структуру p53 домен СТD, являющийся внутренне неупорядоченной областью и обладающий функциями молекулярного распознавания (Kannappan et al., 2018).

Экспрессия p53 в клетке в нормальных условиях находится на довольно низком уровне, что достигается за счет его протеосомной деградации в результате убиквитинирования ферментом убиквитин-протеинлигазой E3 (MDM2). Дополнительными механизмами регулирования уровня p53 является фосфорилирование, ацетилирование, метилирование, гликозилирование, а также взаимодействие p53 с другими белками (Zhao et al., 2020; Kong et al., 2020; Schneiderhan et al., 2003).

E3-убиквитин-протеиновая лигаза MDM2 является главным отрицательным регулятором p53, осуществляя перенос активированного убиквитина с фермента группы E2 на белок p53. Однако ген MDM2 является мишенью p53, который осуществляет его транскрипцию. Таким образом, MDM2-зависимая регуляция p53 постоянно находится в петле обратной связи (Karakostis et al., 2020). Другим регулятором p53 является MDMX (MDM4), связывающийся с N-концевой областью p53 и подавляя его транскрипционную активность, но не приводя к его деградации (Chao., 2015)

Повреждение ДНК или клеточный стресс приводит к активации p53 через множество механизмов посттрансляционных модификаций, таких как фосфорилирование, ацетилирование, метилирование или гликозилирование, а также присоединение остатков убиквитина и убиквитин-схожих белков SUMO и NEDD8 (Simabuco et al., 2018). На сегодняшний день описано более 20 сайтов в молекуле p53, располагающихся главным образом в областях его N- и С-концов, служащих мишенями для разнообразных белков, осуществляющих ковалентные модификации структуры p53 (Brooks and Gu., 2010).

Белок p53 выполняет разнообразные функции в организме, которые не ограничиваются только транскрипционно-зависимым путем регуляции жизненно

важных процессов, но также осуществляет регуляцию митохондриального статуса, инициируя апоптоз в клетках с митохондриальной дисфункцией. Так было продемонстрировано, что p53 в стрессовых условиях проникает в митохондрии и активирует экспрессию проапоптотических генов Puma, Bax, Araf-1, Noxa, а также ингибирует экспрессию антиапоптотических генов семейства Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-X, Bcl-in, Mcl-1). Эти проапоптотические белки вместе с p53 транспортируются в митохондрии, где они вызывают увеличение проницаемости мембран митохондрий, ведущее к высвобождению цитохрома c и других апоптотических белков (Wawryk-Gawda et al., 2013).

Белок p53 играет важную роль в нейрпатологических процессах, обусловленных ишемией, радиацией, окислительным стрессом, эксайтотоксичностью, а также при развитии инсульта и нейродегенеративных болезней Альцгеймера, Паркинсона и т.п. (Bonini et al., 2004; Checkler, Alvesda Costa, 2014; Culmsee, Mattson, 2005; Richardson et al., 2009; Yu, Zhang, 2005).

Кроме того, в последние годы появилась информация о роли p53 в дифференцировке и пролиферации нервных стволовых клеток, а также в регуляции роста и регенерации аксонов. Ингибирование p53 блокирует NGF-зависимый рост аксонов. В клетках, подвергшихся NGF, был обнаружен рост уровня p53 (Di Giovanni et al., 2006) и снижение экспрессии MDM2, убиквитин-лигазы, которая маркирует p53 для деградации протеасомой (Coutts et al., 2009). Киназы ERK1 и 2 (внеклеточные сигнальные киназы), p38MAPK, JNK1-2 (с-Jun N-терминальные киназы 1-2) и ацетилтрансферазы P / CAF, активированные либо NGF, индуцируют посттрансляционную модификацию p53, усиливая его транскрипционную активность. Было показано, что p53 активирует транскрипцию ряда генов, ответственных за ремоделирование цитоскелета. В корковых нейронах и в нейронах дорзальных ганглиев, p53 транскрипционно активирует экспрессию cGMP-зависимой киназы cGKI, противодействующей коллапсу конуса роста, вызванному Sema3A. У мышей с нулевым уровнем p53 наблюдается нарушение регенерации аксонов после травмы лицевого нерва. Ряд других факторов транскрипции, которые важны для регенерации аксонов, могут

потенциально пересекаться с p53-зависимыми сигнальными путями, включая NF-kB (Di Giovanni, Rathore, 2012). Однако, роль p53 в гибели глиальных клеток после аксотомии недостаточно ясна и нуждается в дальнейших исследованиях (Ma et al., 2017).

1.9. NO-зависимые механизмы регулирования белка p53

Оксид азота и его продукты могут модулировать уровень различных белков, включая p53. Было показано, что NO может вызывать накопление проапоптотических белков p53 и Bax в мезаглиальных клетках и приводить к их гибели (Sandau et al., 1997). Способность NO стимулировать p53-клеточный ответ было продемонстрировано на мышах и человеке в клетках различных тканей (Wang et al., 2003). При этом была обнаружена обратная связь p53-зависимого регулирования NO, которая заключалась в подавлении экспрессии iNOS. Многочисленные исследования подтвердили, что NO-стабилизированный p53 влияет на прогрессирование клеточного цикла и апоптоз (Schneiderhan et al., 2003).

Известно, что в нормальных условиях p53 демонстрирует чрезвычайно короткий период полужизни, а его количество поддерживается на низком, часто неопределенном уровне. Под воздействие стресса p53 стабилизируется преимущественно за счет посттрансляционной модификации, такой как фосфорилирование (Zhao et al., 2020), ацетилирование (Kong et al., 2020) или гликозилирование (Liu., 2011). Фосфорилирование p53 по сериновым аминокислотным остаткам отвечает за взаимодействия p53/Mdm2, регулируя его протеосомную деградацию (Schneiderhan et al., 2003).

NO обладает выраженным ингибирующим пролиферативным эффектом, обратимо подавляя синтез ДНК и деление клеток. Так антипролиферативная активность NO в фибробластах опосредуется p53 и/или p53-зависимыми генами, а сам NO индуцирует повышение уровня p53 через связывание с сайтами фосфорилирования молекулы p53, нарушая его взаимодействие с Mdm2. Обнаружено, что отсутствие гена p53 препятствует способности p53 вызывать

остановку клеточного цикла эмбриональных фибробластов мыши (Nakaya et al., 2000).

В многочисленных работах было показано, что p53 стабилизируется с помощью посттрансляционных модификаций в ответ на разнообразные типы клеточного стресса, такие как, например, повреждение ДНК, гипоксия и истощение запаса нуклеотидов, что приводит к остановке клеточного цикла и к апоптотической гибели клетки (Kang et al., 2019). Доноры NO эффективно активируют p53 и вызывают быстрый апоптоз в RAW-клетках макрофагов (Kim et al., 2019). NO действует, как мощный индуктор накопления p53, а доноры NO вызывают сильную экспрессию p53 сравнимую с вызванной гамма- и УФ-облучением, а также адриамицином (Nakaya et al., 2000, Wang et al., 2003).

Поскольку NO может модифицировать и повреждать ДНК в высоких концентрациях, например, когда индуцируется iNOS при различных стрессах или путем высвобождения из NO-содержащих соединений, он может активировать сигнальные пути, которые приводят к активации p53, как после гамма- или УФ-облучения, химиопрепаратами, нарушающими целостность ДНК. Однако, возможно, клеточный ответ на NO может быть просто эквивалентным ответу, вызванному на повреждение ДНК облучением и лекарствами (Schneiderhan et al., 2003., Nakaya et al., 2000).

Хорошо известно, что p53 обладает сигналами ядерной локализации (NLS) и сигналами ядерного экспорта (NES), что позволяет ему эффективно перемещаться между ядром и цитоплазмой (Deuker et al., 2020). NO может влиять на ядерно-цитоплазматическое перемещение p53, вызывая значительное ингибирование ядерного экспорта p53, зависящего от серин/треониновой протеинкиназы (ATR). ATR, фосфорилируя Ser15, инактивирует NES, расположенный в N-концевом домене p53, тем самым способствуя удерживанию p53 в ядре и, вероятно, также к активации p53. Ингибирование киназы ATR с помощью кофеина приводила к уменьшению NO-индуцированного депонирования p53. На ранних сроках доноры NO приводят к уменьшению уровня Mdm2, снижая убиквитинирование и последующую протеосомную

деградацию p53. Правда потом уровень Mdm2 восстанавливается, но p53 становится не чувствительным к эффектам Mdm2, что приводит к блокированию Mdm2-управляемого ядерного экспорта p53. Было показано, что NO-зависимая мобилизация p53 в ядре усиливает апоптоз клеток нейробластомы (Wang et al., 2003).

Интересно, что NO-индуцированное накопление p53 имеет петлю обратной связи, проявляющейся в ингибировании p53 промоторного участка гена iNOS. Этот тонкий молекулярно-генетический механизм может лежать в основе как в регуляции апоптоза, так и в подавлении генерации цитотоксического количества NO (Ambs et al., 1998).

Исследований, посвященных NO-зависимому регулированию p53 в нервной системе при травме, практически нет. Так известно, что NGF индуцирует производство NO. Образующийся NO действует, как вторичный посредник, активируя промотор p21^{WAF1} и индуцируя экспрессию циклинзависимого ингибитора киназы p21^{WAF1} по p53-зависимому и p53-независимым механизмам. Блокирование продукции NO с помощью ингибиторов NOS снижает накопление p53, активацию промотора p21^{WAF1}, а также экспрессию нейрональных маркеров и расширение нейритов (Poluha et al., 1997). В исследовании по дегенерации мотонейронов при односторонней перерезке седалищного нерва было показано, что инициированное аксотомией повышение продукции NO и в дальнейшем образование ONOO⁻ может приводить к однонитевым и двухцепочечным разрывам ДНК, усиливая индукцию p53 и запуская апоптоз (Martin et al., 2005).

1.10. Белок E2F1 и его роль в регуляции p53

Фактор транскрипции E2F1 – ключевой белок, определяющий судьбу клеток. E2F1 относится к семейству факторов транскрипции E2F, насчитывающих восемь белков, названных в порядке их открытия E2F1- E2F8. Эти белки играют решающую роль в регуляции клеточного цикла, репарации и репликации ДНК, а также апоптоза (Fang et al., 2020; Ertosun et al., 2016; Folch et al., 2012). E2F1 состоит из 437 аминокислотных остатков. Этот фактор транскрипции содержит

ряд консервативных доменов и сайтов, включая циклин А-связывающий домен, сигнал ядерной локализации (NLE), ДНК-связывающий домен типа «петля-спираль-петля», гептадный повтор, ответственный за гомо/гетеродимеризацию, домен трансактивации, в пределах которого локализованы ТВР- и MDM2-связывающие домены, а также pRb-связывающий домен (Cao et al., 2011).

Активность E2F1 регулируется белком ретинобластомы Rb (pRb). Когда pRB не находится в гиперфосфорилированном состоянии, то он рекрутирует E2F1 и ингибирует его специфичную ДНК-связывающую последовательность, тем самым блокируя транскрипционную активность E2F1. При фосфорилировании pRb E2F1 высвобождается из ингибиторного комплекса pRb/E2F1 и димеризуется с помощью связывания с белками DP1 или DP2 (Luo et al., 2020). Гетеродимер E2F1/DP1 связывается с промоторами генов-мишеней и индуцирует транскрипцию. В транскрипционные мишени E2F1 входят белки клеточного цикла, такие как CDC2, CDC25A, Cyclin D1 и Cyclin E и необходимые белки для репликации ДНК и/или репарации ДНК, такие как DHFR, ДНК-полимераза α , RCF3 и Rad52 (Ertosun et al., 2016). Экспрессия E2F1 также, в свою очередь, контролируется MAP-киназой p38 и фактором транскрипции c-Myc (Bretones et al., 2015). Кроме того, в регуляции экспрессии E2F1 может играть роль NO. На мышинных моделях было показано, что NO индуцирует гиперфосфорилирование и инактивацию pRb, что приводит к повышенной экспрессии E2F1. NO-управляемое гиперфосфорилирование происходит посредством передачи сигналов растворимой гуанилатциклазы и зависит от митоген-активируемой протеинкиназы, внеклеточной сигнал-регулируемой киназы, киназ MEK/ERK и путей фосфатидилинозитол-3-киназы/АКТ (Ying et al., 2007). Также исследователями были показаны, что NO, активируя p38 MAPK, увеличивает связывание E2F1 с генами-мишенями. Другое воздействие NO на этот фактор транскрипции происходит через ингибирование циклина А, что приводит к уменьшению ДНК-связывающей способности E2F1 (Cui et al., 2005).

Помимо функций регуляций клеточного цикла E2F1 играет важную роль в апоптотических процессах. В 1994 году два независимых исследования показали

роль E2F1 в индукции апоптоза. Способность E2F1 вызывать апоптоз во многом зависит от индукции транскрипции p53 и p14ARF, а также в подавлении экспрессии Mdm2. Кроме этого E2F1 контролирует экспрессию ATM, которая фосфорилирует и активирует киназу Chk2, которая, в свою очередь, фосфорилирует и стабилизирует p53. Увеличение экспрессии и накопление p53, как известно, индуцирует транскрипцию нескольких проапоптотических генов, включая Bax, Puma, Noxa и, следовательно, направляют клетку по пути апоптоза (Engelmann, Puttzer, 2010; Meng, Gosh, 2014). В дополнение к прямому влиянию на экспрессию и активацию p53 белок E2F1 также способствует p53-опосредованному апоптозу, вызывая экспрессию кофакторов p53, таких как ASPP1 и ASPP2. Более того E2F1 может вызывать апоптоз независимо от p53, инициируя экспрессию Araf-1, p73, и подавляя – антиапоптотическую экспрессию Mcl-1. Но с другой стороны, E2F1 также может инициировать экспрессию Bcl-2, который, ингибируя цитохром c и AIF, обеспечивает механизмы подавления апоптоза (Carthy et al., 2003). Помимо прямого влияния E2F1 на экспрессию и активацию p53, существуют механизмы отрицательной обратной связи между p53 и E2F1 через DP1. Проапоптотический белок p53 конкурирует с E2F1 в связывании с DP1, являющегося партнером димеризации необходимым для E2F1-опосредованной активации p53 (Ertosun et al., 2016).

1.11. Белок APP и его роль при аксотомии

Белок APP (amyloid precursor protein) начал интенсивно изучаться с 1980-х годов в связи с его центральной ролью в развитии болезни Альцгеймера (БА). Его фрагмент β -амилоидный пептид (A β), накапливающийся в амилоидных бляшках в мозге больных является одним из основных компонентов патогенеза БА. APP играет важную роль в различных клетках человека и животных. Это древний, эволюционно консервативный белок (Jacobsen, Iverfeldt, 2009; Guo et al., 2012). Высокий уровень его экспрессии в мозге указывает на важную роль в нервной системе. Он участвует в процессах развития, дифференцировки и функционирования нейронов, в росте нейритов и образовании синапсов, в

формировании долговременной памяти и поддержании целостности мозга, а также в реакциях нейронов на повреждающие воздействия (Dawkins, Small, 2014; Muller et al., 2017). Но конкретные биохимические и физиологические функции APP и продуктов его протеолиза пока неизвестны. Накопление APP в поврежденных нейронах при ишемическом (Hefter, Draguhn, 2017) или травматическом воздействиях (Bird et al., 2016; Ikonovic et al., 2017) свидетельствует об общих механизмах патогенеза БА и ишемического или травматического повреждения мозга, а также о возможной роли этих повреждений в развитии болезни Альцгеймера.

APP – крупный трансмембранный гликопротеин, однократно пересекающий плазматическую мембрану (ПМ). Его большой N-терминальный домен обращен во внеклеточную среду, а малый C-терминальный домен - в цитоплазму. Известны три основные изоформы APP, получаемые при альтернативном сплайсинге первичного транскрипта: APP695, APP751 и APP770. В нервной системе экспрессируется в основном APP695. APP подвергается протеолитическому расщеплению α -, β - и γ -секретазами с образованием ряда пептидов: sAPP α (soluble amyloid precursor protein alpha), sAPP β (soluble amyloid precursor protein beta), A β (β -амилоидный пептид), AICD (amyloid precursor protein intracellular domain) и некоторых менее изученных и, видимо, менее важных пептидов. Продукты протеолиза APP обладают самостоятельной активностью и вовлечены в разнообразные клеточные процессы. Выделяют амилоидогенный и неамилоидогенные пути протеолиза APP (Рис.1.1).

В неамилоидогенном пути α -секретаза отщепляет от APP крупный N-терминальный фрагмент sAPP α . При этом расщепляется и инактивируется A β , погруженный в мембрану фрагмент APP. Затем встроенная в мембрану γ -секретаза отщепляет внутриклеточный пептид AICD, который деградирует в цитоплазме. Расщепление APP α -секретазой происходит в основном на поверхности клетки, хотя некоторая часть APP расщепляется на пути процессинга и трафика в цистернах и везикулах эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи (Haas et al., 2012; Vincent, Govitrapong, 2011).

β -секретаза – аспартилпротеаза, представленная двумя основными изоформами BACE1 (beta-site APP cleaving enzyme 1) и BACE2. BACE1 изобилует в нервной системе: в нейронах, астроцитах и олигодендроцитах, а BACE2 в периферических тканях, например, в меланоцитах или панкреатических β -клетках. В амилоидогенном пути BACE1 и γ -секретаза расщепляют APP в плазматической мембране так, что во внешнюю среду выделяется пептид A β , а в цитоплазму – AICD (Рис.1.1). При ишемии мозга BACE1 активируется в результате окислительного стресса и стимуляции кислородного сенсора HIF1 α (Zhang et al., 2007; Guglielmotto et al., 2009). γ -секретаза – большой мультисубъединичный фермент, состоящий из пресенилина-1 (PS-1), выполняющего, собственно, протеолитическую функцию, пресенилина-2 (presenilin enhancer 2, PEN2), играющего роль в сборке комплекса, никастрина (NCT), участвующего в распознавании субстратов, и белка APH-1 (anterior pharynx-defective 1), образующего платформу для связывания субъединиц (Carroll, Li, 2016). Основные результаты активности γ -секретазы – высвобождение во внеклеточную среду амилоидного пептида A β , стимулирующего развитие болезни Альцгеймера, и высвобождение в цитоплазму фактора транскрипции AICD, регулирующего экспрессию ряда проапоптотических генов (Haas et al., 2012).

Продукты протеолиза APP: sAPP α , A β , AICD. Крупный N-терминальный полипептид sAPP α , отщепляемый от APP α -секретазой, попадая во внеклеточную среду, оказывает нейропротекторное действие (Heftner, Draguhn, 2017), в частности, стимулирует регенерацию поврежденных аксонов (Vincent, Govitrapong, 2011). Функции фрагмента sAPP β , вырезаемого из APP β -секретазой, не ясны: не выявлено ни его нейропротекторного, ни нейротоксического действия.

После протеолиза APP β -секретазой оставшийся трансмембранный фрагмент, разрезается γ -секретазой (Рис.1). Это происходит в клеточных компартментах с кислым pH, таких как везикулы аппарата Гольджи или ранние эндосомы (но не лизосомы). Высвобождающийся во внеклеточную среду β -амилоидный пептид A β нейротоксичен. Он играет ключевую роль в патогенезе

БА (Caruso et al., 2019). Появление множества агрегатов А β в мозге приводит к смерти нейронов и развитию болезни Альцгеймера.

В результате протеолиза APP β - и γ -секретазами внутрь клетки выделяется небольшой С-концевой пептид AICD (AICD50-99). Вблизи от клеточного ядра он соединяется с белком Fe65, который стабилизирует его и способствует переносу в ядро. Там вместе с белком Tip60 этот комплекс стимулирует транскрипцию ряда белков, участвующих в регуляции апоптоза и патогенеза болезни Альцгеймера. К ним относятся сам белок APP, β -секретаза BACE1, белки Tip60, неприлизин, разрушающий пептид А β , проапоптотические белки p53, KAI1, GSK-3 β , SNOR, циклины B1 и D1, регулирующие клеточный цикл, аквапорин AQP-1, регуляторы динамики цитоскелета трансгелин и актин α 2, транспортер глутамата в везикулах VGLUT2 (Muller et al., 2008; Becket et al., 2012; Konietzko, 2012; Pardossi-Piquard et al., 2012). Пептид А β распространяет нейротоксическое действие на другие клетки, а результатом экспрессии AICD является смерть самой клетки-источника А β и предохранение мозга от его нейротоксического действия.

В нейросигнальных процессах, развивающихся при травме ПНР, может участвовать, как полноразмерный APP, так продукты его протеолитического распада sAPP α , sAPP β , А β , AICD и другие менее важные пептиды (Kobayashi et al., 2010; Chow et al., 2010; Brunholz et al., 2012). Так было показано, что в аксотомированных нейронах накапливается APP (Kobayashi et al., 2010; Muresan and Ladescu Muresan, 2015; Wang et al., 2012; Kelley et al., 2012; DeGiorgio et al., 2002). Роли APP и продуктов его протеолиза при аксотомии посвящено не так много научных исследований, а имеющиеся результаты носят довольно противоречивый характер. Например, указывается о нейротоксичности APP при аксотомии (DeGiorgio et al., 2002; Liu et al., 2018), при этом в других исследованиях показано, что APP обладает нейропротекторным действием (Truong et al., 2019), способствует росту аксонов и выживанию нейронов (Muresan and Ladescu Muresan, 2015). Сигнальные механизмы, лежащие в основе регулирования уровня APP в нейронах при аксотомии практически не изучены.

Одним из таких молекулярных нейрорегуляторов APP может выступать оксид азота (NO). Роль NO при аксотомии носит противоречивый характер: одни авторы приписывают ему негативные функции, вызывающие деградацию нейронов в условиях патологического нейронального стресса (Dawson et al., 1995; Vajragupta et al., 2006; Goyagi et al., 2001; Li et al., 2006), другие показывают, что NO способствует регенерации клеток (Cristino et al., 2000; Thippeswamy et al., 2006; Chu et al., 2006). В недавних исследованиях было показано, что NO может модулировать амилоидногенный путь процессинга APP, ингибируя его либо активируя в зависимости от своей концентрации через сигнальный путь sGC/cGMP/PKG либо через пероксинитрит (Cai et al., 2016). Другие авторы указывают на уменьшение экспрессии APP в нейронах через NO-зависимый рост связывания IRP1/2 и IRE (Ayton et al., 2015). Однако механизмы регулирования APP через NO-зависимые сигнальные пути, а также роль различных изоформ NO-синтаз в этом процессе, в нейронах не изучены.

Другим альтернативным механизмом регулирования уровня APP может служить p53. Так в недавнем исследовании было показано, что p53 может модулировать уровень APP по средствам репрессирования промотора его гена, а также предотвращает связывание стимулирующего белок 1 (Sp1) с ДНК и, следовательно, стимуляцию промотора APP этим фактором транскрипции (Cuesta et al., 2009). В свою очередь APP может регулировать экспрессию p53. Было показано, что внутриклеточный домен APP – AICD модулирует уровень p53 с помощью механизмов прямого связывания с внутренним сайтом входа в рибосому (IRES) мРНК p53, а также рекрутирует нуклеолин, известный IRES-специфичный транс-действующий фактор, который связывается с элементами IRES p53 и регулирует трансляцию изоформ p53 (Li et al., 2015).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

2.1.1 Рецептор растяжения рака *Astacus leptodactylus*

Первый объект - абдоминальный рецептор растяжения рака (РРР) *Astacus leptodactylus*, который состоит из двух механорецепторных нейронов (МРН), окруженных сателлитными глиальными клетками, и пары рецепторных мышц (Рис. 5, Рис 6). РРР давно используется в нейрофизиологии, как простой экспериментальный объект для изучения электрофизиологии, морфологии и биохимии в условиях фотоокислительного стресса. Два РРР находятся в каждом сегменте брюшка на внутренней ее поверхности с дорзальной стороны. Механорецепторные нейроны имеют несколько больших дендритов, разветвляющихся на мышце на более мелкие ветви, и аксон. В процессе растяжения мышцы мембрана дендритов деполяризуется и генерируется рецепторный потенциал.

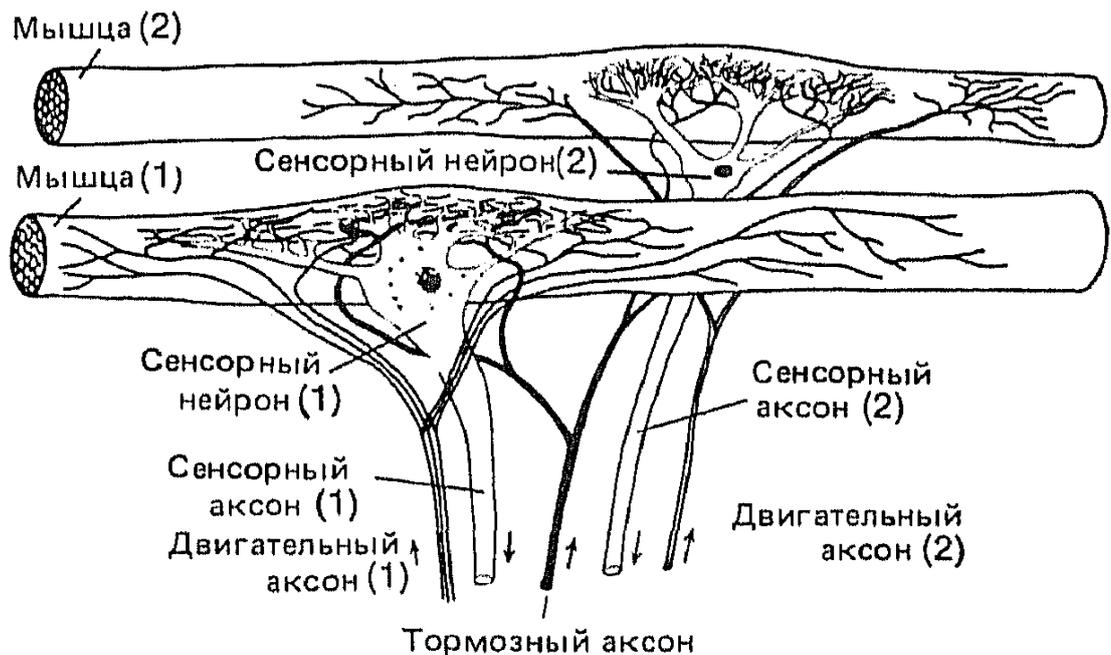


Рисунок 5. Строение абдоминального рецептора растяжения рака [Шеперд ,1987]

Один из МРН генерирует потенциал действия (ПД) с частотой пропорциональной степени растяжения. Этот нейрон называется тоническим и информирует о положении хвоста рака в пространстве. Другой МРН, именуемый адаптирующимся или фазическим, генерирует кратковременные импульсы, являясь «датчиком» скорости движения брюшка рака, а при постоянном растяжении рецепторной мышцы его импульсная активность отсутствует. Тела МРН большие (50-100 мкм), что позволяет хорошо наблюдать их под микроскопом. Глиальная оболочка, окружающая нейроны и состоящая из слоев сателлитных глиальных клеток, не является классической, так как в ней не образуется миелин.

Тонический нейрон способен генерировать потенциалы действия в течение длительного времени от 8 до 12 ч. Такая биоэлектрическая активность оптимально подходит для оценки жизнеспособности МРН для дальнейшего его изучения в условиях фотодинамического воздействия. Нейроглиальные взаимодействия PPP в условиях фотоокислительного стресса ранее изучались и были получены важные результаты в этой области исследования.

2.1.2 Дорзальные ганглии крысы

Второй объект – ганглии корешков спинного мозга крысы (DRG, dorsal root ganglion). DRG, главным образом, образуют сенсорные нейроны, получающие информацию от седалищного нерва, который иннервирует задние конечности. Перерезка седалищного нерва позволяет получать аксотомированные нейроны DRG.

Перерезка седалищного нерва грызунов является одной из наиболее распространённых и информативных экспериментальных моделей нейротравмы периферической нервной системы. Широкое распространение данная модель получила в связи с доступностью седалищного нерва в средней части бедра животного для его перерезки и хорошей переносимостью животных этой хирургической операции по сравнению с рассечением нервов верхних конечностей (Savastano et al., 2014).

В седалищный нерв входят аксоны сенсорных, соматических и автономных мотонейронов, локализующиеся главным образом в DRG 4-го и 5-го корешков спинного мозга. Сомы моторных нейронов располагаются в спинном мозге внутри позвонков, а сомы сенсорных нейронов наоборот образуют DRG за пределами позвоночника. Аксоны двигательных нейронов обеспечивают моторную иннервацию скелетных мышц задних конечностей животного, а чувствительные аксоны передают информацию об ориентации в пространстве конечностей, болевых механических и термических повреждениях в ЦНС (Рис. 6).

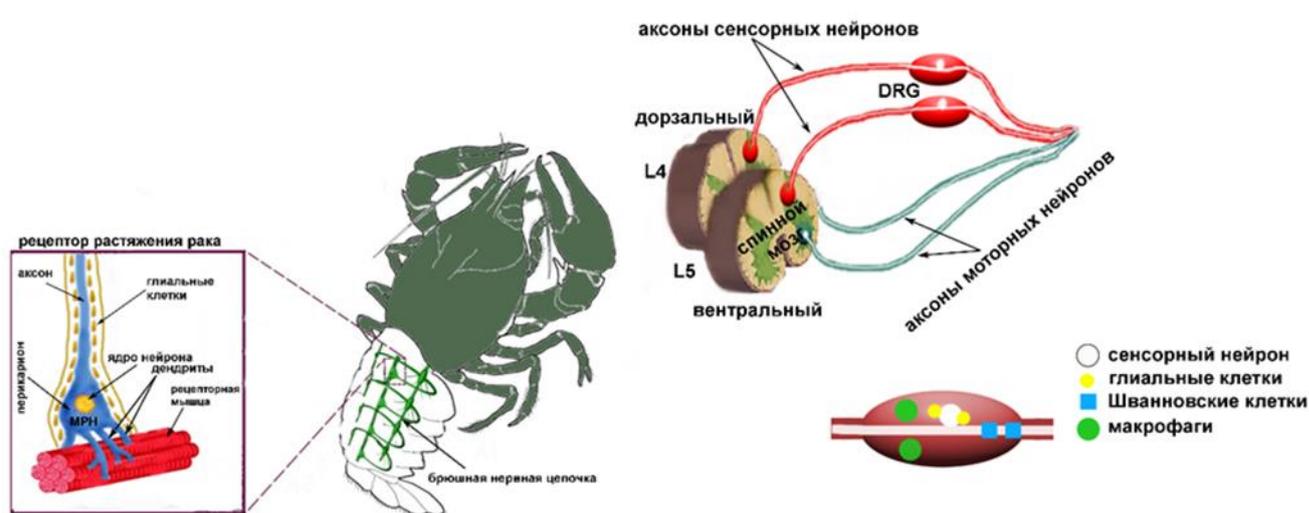


Рисунок 6. Схема модельных объектов по исследованию влияния аксотомии на выживание и гибель нейронов и глиальных клеток: рецептор растяжения рака *Astacus leptodactylus*, а также дорзальные ганглии крысы [Родькин и др., 2021].

Количество нейронов от всех клеток DRG составляет довольно небольшой процент, приблизительно 15%. Псевдоуниполярные нейроны DRG имеют Т-образный аксон. Его длинная дистальная ветвь идет к рецепторным окончаниям в коже, мышцах и внутренних органах, а проксимальная короткая оканчивается в спинном мозге. Нейроны DRG лишены дендритов и не имеют синапсов, но при этом располагают рецепторами различных нейромедиаторов (Julius, Basbaum, 2001). Сателлитные глиальные клетки (СТГ) плотным слоем окружают каждый нейрон DRG, обеспечивая трофическую, коммуникативную и защитную функции (Lawson, 1979). Нейрон и окружающие его СТГ формируют своеобразную

морфофункциональную ячейку в DRG, огражденную и защищенную слоем соединительной ткани.

2.2. Изолирование механорецепторного нейрона рака: модели аксотомии и фотодинамического воздействия

Раки *Astacus leptodactylus* из притоков Дона были приобретены на местном рынке. Рецепторы растяжения рака выделялись для экспериментов с флуоресцентным зондом DAF-2DA по классической методике Florey and Florey, разработанной в 1955 г., в результате которой МРН аксотомировали в период их извлечения. Для исследования локализации и экспрессии белков p53, E2F1 и APP применялась специально разработанная методика Khaitin et al. (2015), позволяющая получать интактные МРН с целым аксоном, сохраняющим связь с соответствующим ганглием вентральной брюшной нервной цепочки рака. Интактные МРН аксотомировали через 1, 4 и 8 часов офтальмологическими ножницами на расстоянии 8-10 мм от нейрональной сомы.

Рецепторы изолировались с частями хитинового панциря, к которым они прикреплялись, и помещались в плексигласовую кювету, заполненную 2 мл физиологического раствора ван Харревельда для холоднокровных животных (mM:NaCl - 205; KCl - 5.4; NaHCO₃ - 0.24; MgCl₂ - 5.4; CaCl₂ - 13.5; pH 7.2-7.4). Кювета была оборудована одним фиксированным крючком и другим, манипуляторным, способным задавать степень растяжения рецепторных мышц. Кусочки хитинового панциря насаживались на данные специальные приспособления (Рис. 7).

Таким образом, контролировалась степень растяжения рецепторной мышцы медленно адаптирующегося нейрона, что позволяло задавать частоту импульсной активности в режиме «online». На фоне этого происходила кратковременная генерация ПД быстро адаптирующимся нейроном, которая не отражалась на общей картине частотограммы (Рис. 7, Рис. 8).

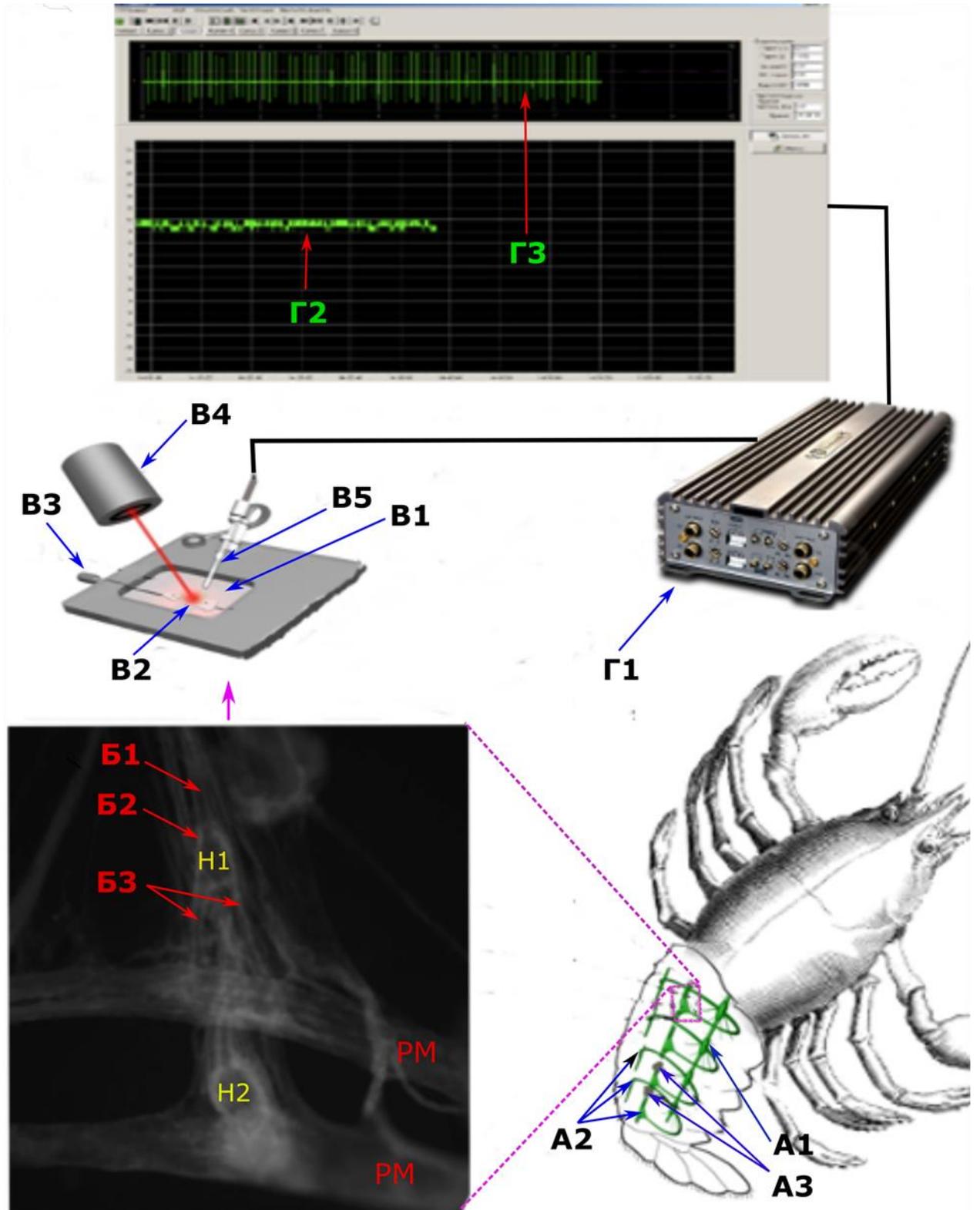


Рисунок 7. Схема эксперимента по исследованию ФД воздействия на нейроны и глию PPP. *Рак Astacus leptodactylus*: A1 – брюшная нервная цепочка, A2 – абдоминальный рецептор растяжения рака, A3 – изолированные кусочки панциря, к которым прикрепляются рецепторные мышцы МРН. *Препарат*: PM – рецепторные мышцы МРН, H1 – тонический механорецепторный нейрон, H2 –

фазический механорецепторный нейрон, В1 – аксон, В2 – оболочка из сателлитных глиальных клеток, В3 – дендриты. Установка: В1—ванночка, В2 – рецептор растяжения рака, В3 – манипулятор степени растяжения рецепторных мышц, В4 – лазер, В5 – стеклянные присасывающиеся электроды. *Биопотенциалы*: Г1 – усилитель, Г2 – частотограмма тонического нейрона РРР, Г3 – импульсная активность тонического нейрона РРР.

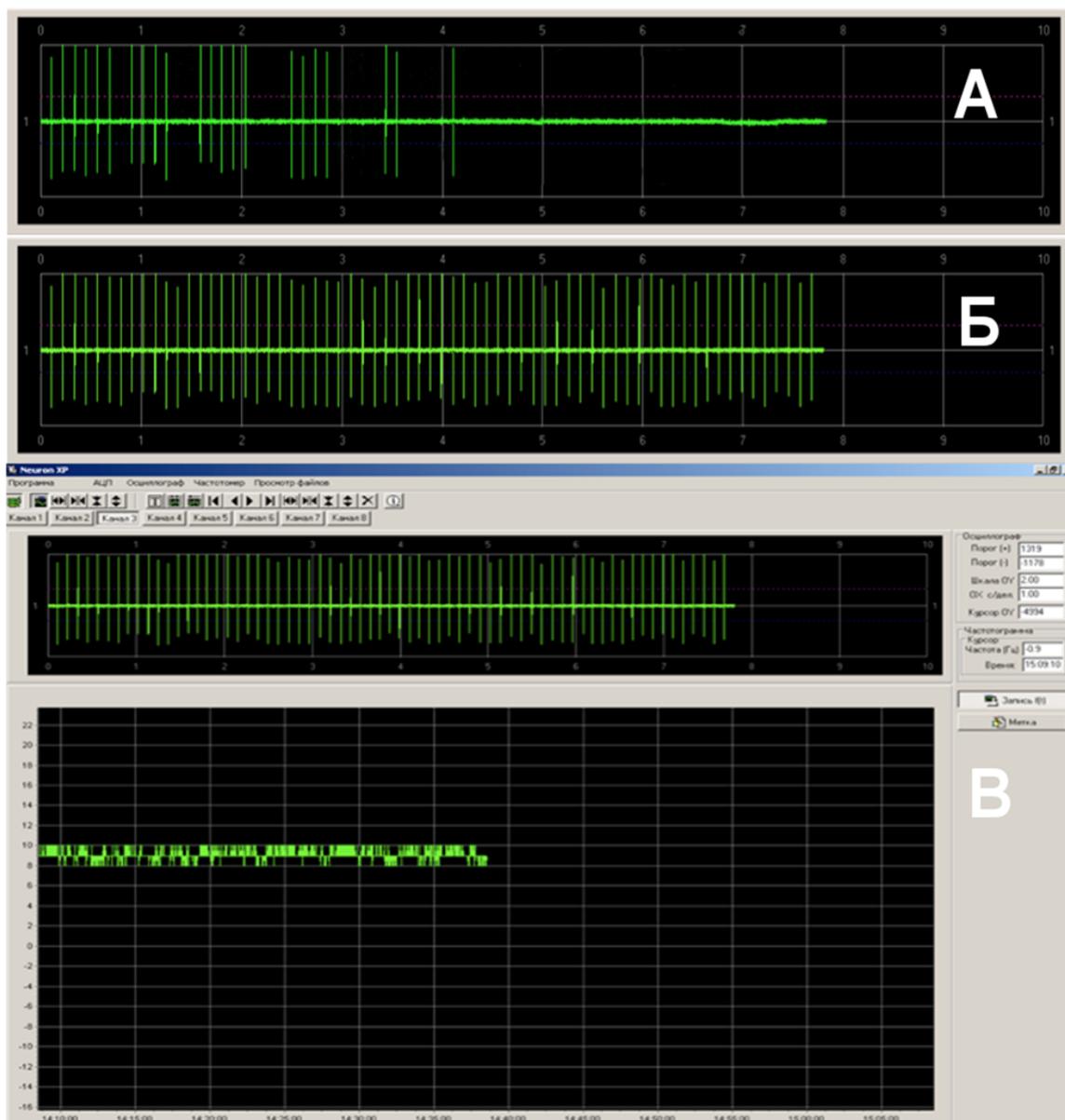


Рисунок 8. А – характерная импульсная активность фазического МРН. Б – характерная импульсная активность тонического МРН. В – пример биоэлектрической активности и частотограммы тонического нейрона в контрольной серии.

Частоту импульсной активности устанавливали на уровне 6-10 Гц и проводили в течение 60 минут её контрольную регистрацию для оценки жизнеспособности тонического нейрона. Прекращение биоэлектрической активности интерпретировалась как функциональная смерть нейрона. Такие МРН выводились из исследования. Эксперименты проводили при температуре $25 \pm 4^\circ\text{C}$.

Снятие ПД с аксона осуществлялось внеклеточно с помощью стеклянного присасывающегося микроэлектрода, заполненного физиологическим раствором ван Харревельда. Потенциалы действия усиливались усилителем биоэлектрической активности. Изменение частоты ПД регистрировалось непрерывно вплоть до конца ФД воздействия или окончания инкубации после аксотомии (Рис. 7).

Частота импульсной активности регистрировалась с помощью персонального компьютера, аналогово-цифрового преобразователя L-761 (Л-Кард, Москва) и специальной программы Neuron, отражающей динамику ПД на экране монитора и сохраняющей частотограмму ПД в компьютерный файл.

2.3. Аксотомия седалищного нерва крысы

Перерезка седалищного нерва проводилась на взрослых самцах крыс возрастом 2-2,5 месяцев и весом 200-250 г. Животные содержались в условиях, соответствующих международным стандартам и правилам. Опыты были проведены строго в соответствии с этическими нормами и правилами проведения экспериментов над животными Европейского Союза (86/609/ЕЕС). Хирургическая операция по перерезке седалищного нерва проводилась по стандартному протоколу, который был описан в статье Savastano et al. (2014). Общий наркоз животным был осуществлен путем внутримышечного введения 0,75 мл смеси Ксила и Телазола в соотношении 2:1. Препарат Ксила: 2% раствора ксилазина гидрохлорид (Interchemie Werken «de Adelaar» BV, Нидерланды). Комбинированный препарат Телазол: тилетамина гидрохлорид/золазепам гидрохлорид (Zoetis, США). Выведение животных из эксперимента

осуществлялось при помощи декапитирования механической гильотиной через 4 и 24 часа или 7 суток после односторонней перерезки правого седалищного нерва.

2.4. Фотоокислительный стресс

Фотоокислительный стресс механорецепторных нейронов и глиальных клеток был индуцирован ФД – воздействием при помощи отечественного фотосенсибилизатора Фотосенс (НИОПИК, Москва), применяемого в клинической практике при ФДТ различных форм рака. Фотосенс – это фталоцианиновый комплекс с алюминием, обладающий рядом преимуществ: поглощение света в длинноволновой части спектра, высокий коэффициент экстинкции и высокий квантовый выход синглетного кислорода (Рис. 9) (Brilkina et al., 2018).

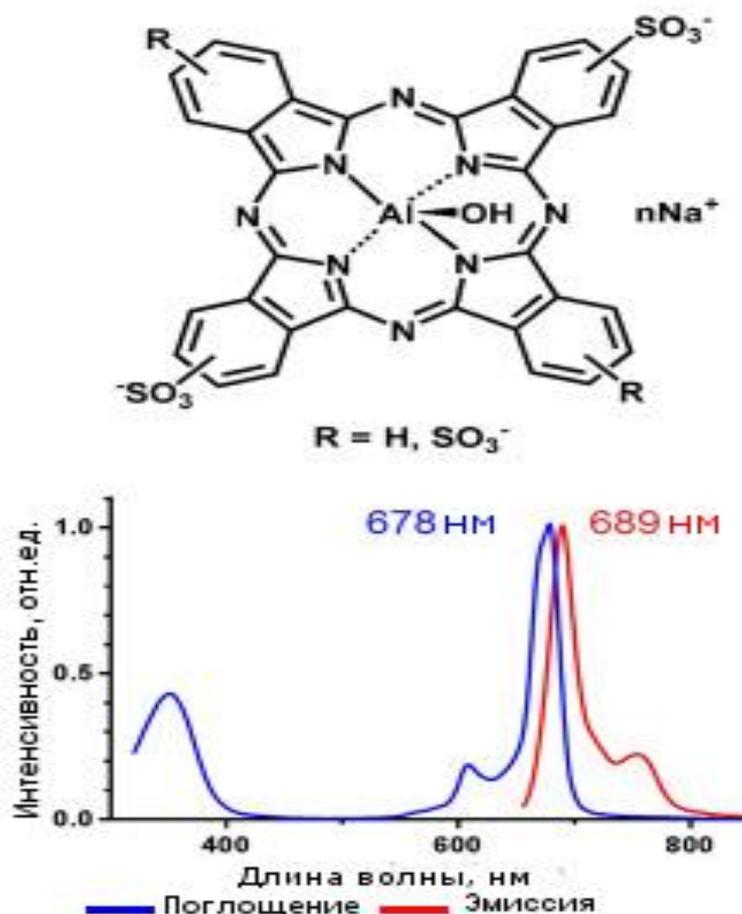


Рисунок 9. Структурная формула и спектр поглощения и флуоресценции Фотосенса [адаптировано по Brilkina et al., 2018]

Фотосенс представляет собой смесь ди-, три- и тетра-алюмофталоцианинов ($AlPcS_n$, среднее $n=3,1$; 75 нМ), различающихся по гидрофобным свойствам и локализующихся в различных клеточных структурах. $AlPcS_4$, благодаря гидрофильным свойствам, легко абсорбируется на цитоплазматической мембране и далее транслоцируется в лизосомы. $AlPcS_2$ и $AlPcS_3$ локализуются главным образом в мембранных структурах из-за высокой липофильности.

Облучение осуществлялось полупроводниковым лазером, излучающим красный свет (670 нм, 0,4 Вт/см²) в течение 30 минут. Диаметр лазерного луча составлял 3 мм, что позволяло подвергнуть облучению тело нейрона, дендриты и большую часть аксона. Концентрация Фотосенса в кювете составляла 100 нМ.

2.5. Ингибиторно-активаторный анализ

Для исследования фотоиндуцированной генерации NO использовались следующие модуляторы: активатор NF-κB (Prostratin, 10 мкМ), ингибитор NF-κB (Parthenolide, 10 мкМ), активатор растворимой гуанилатциклазы (A350619, 1 мкМ) и её ингибитор (ODQ, 10 мкМ), блокатор Ca^{2+} -каналов L-типа (Nifedipine, 20 мкМ), блокатор Ca^{2+} -каналов плазматической мембраны ($CdCl_2$, 100 мкМ), Ca^{2+} -ионофор (Ionomycin, 2 мкМ), селективный ингибитор iNOS (SMT, 100 мкМ), ингибитора Ca^{2+} -АТФазы эндоплазматического ретикулума (tBuBHQ, 35 мкМ). Все химические реактивы были приобретены у Sigma-Aldrich Rus (Москва, Россия) и Alomone Labs (Иерусалим, Израиль).

Также проводились эксперименты с влиянием разных концентраций внеклеточного Ca^{2+} на динамику фотоиндуцированной генерации NO: в четыре раза выше нормы (54 мМ [Ca^{2+}]_i) и в два раза меньше (6,7 мМ [Ca^{2+}]_i).

После контрольной проверки импульсной активности нейронов в течение 60 мин в кювету добавлялись ингибиторы или активаторы либо уменьшалась\увеличивалась концентрация внеклеточного Ca^{2+} . Препараты инкубировались еще 60 мин. Контрольные препараты инкубировались в течение 60 мин в растворе ван Харревельда.

Далее они перекладывались в специально оборудованную камеру с физиологическим раствором ван Харревельда с высокочувствительным зондом к NO DAF-2DA (5 мкМ) и инкубировались в темноте 60 мин. Затем нейроглиальные препараты пятикратно отмывались физиологическим раствором, не содержащим флуоресцентный краситель, для удаления избытка DAF-2DA, после чего в ванночку добавлялся фотосенсибилизатор (Фотосенс, 100 нМ) и следовала инкубация в темноте 30 мин. Затем препараты облучались лазером (670 нм, 0.4 Вт/см²) в течение 30 мин. Флуоресценция DAF-2DA регистрировалась до облучения и через 1, 4, 7, 10, 15, 20, 25, 30 мин.

Для оценки p53-нетранскрипционного пути апоптоза использовался пифитрин-μ (PFT-μ, 15 μМ), способный ингибировать взаимодействие этого белка с митохондриями. Пифитрин-μ добавлялся в кювету с МРН и ингибировался с ним в течение 4 либо 8 часов после аксотомии.

Для исследования NO-зависимых механизмов регулирования p53, а также изучения влияния NO на выживание и гибель нейронов и глиальных клеток в DRG после перерезки седалищного нерва применялись следующие NO-модуляторы: селективный ингибитор iNOS гемисульфат S-метилизотиомочевины (SMT) и NO-донор нитропруссид натрия (SNP). Также изучалось влияние вальпроата натрия на экспрессию APP в DRG после аксотомии. Все реактивы были приобретены у Sigma-Aldrich Rus (Москва, Россия). SMT (10 мг/кг) (Li et al., 2020), SNP (3 мг/кг) (Naik et al., 2006) и вальпроат натрия (300 мг/кг) (Dzreyan et al., 2021) вводили после перерезки седалищного нерва и далее ежедневно до момента декапитации. Контрольной группе крыс вводили физиологический раствор. Далее локализация и экспрессия p53 и APP через 4, 24 часа и 7 дней после аксотомии изучались с помощью иммунофлуоресцентного и вестерн-блот исследований, а оценка гибели нейронов и глиальных клеток проводилась с помощью метода TUNEL.

2.6. Исследование фотоиндуцированной генерации NO с помощью флуоресцентного зонда DAF-2DA

Исследование фотоиндуцированной генерации NO проводилось с помощью флуоресцентного NO-специфического зонда 4,5-диаминофлуоресцеина диацетата (DAF-2DA) по классической методике.

Диаминофлуоресцентные красители (DAF) широко используются в качестве флуоресцентных зондов для обнаружения NO в различных тканях (Lambertucci et al., 2012; Agurto et al., 2017; Kolamunne et al., 2013), в том числе и в нервной ткани (Shlosberg et al., 2012; Kovaleva, Uzdensky, 2016). Преимущество этих красителей заключается в том, что они не вступают в реакцию с NO_2^- , NO_3^- и ONOO^- . Также они позволяют обнаруживать NO при его низких концентрациях, около 5 нМ. Наличие возбуждения диаминофлуоресцеин триазола (DAF-2T), флуоресцентного продукта DAF, на 495 нм выгодно из-за меньшего повреждения клеток, так как длина этой волны довольно безопасная. DAF не являются токсическими соединениями, поэтому физиологические свойства не меняются во время эксперимента (Wany, Gupta, 2016).

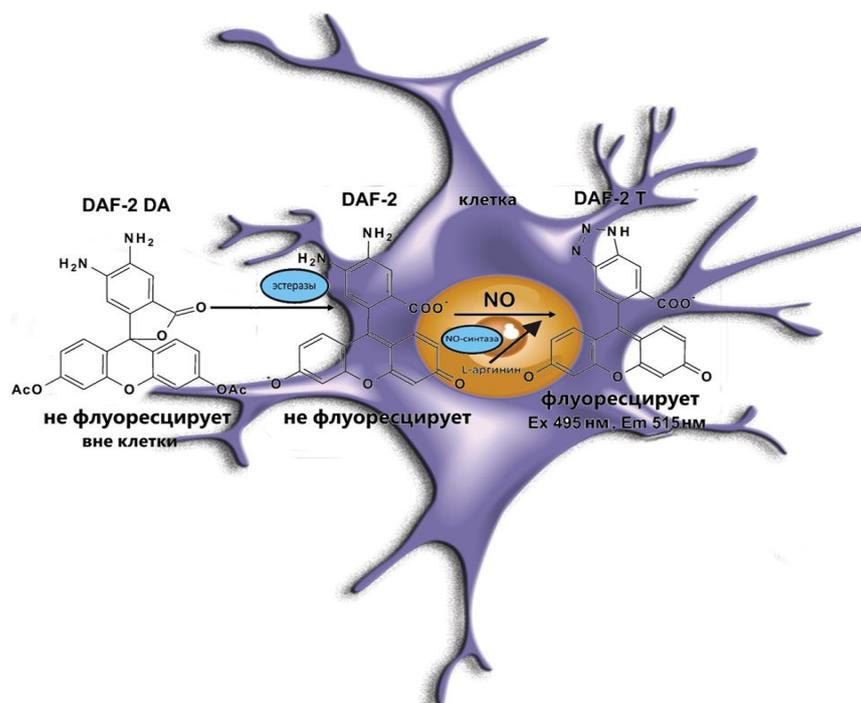


Рисунок 10. Механизм флуоресценции DAF-2DA в живой клетке [адаптировано по Tarpey et al., 2004]

DAF-2DA активно диффундирует в клетку, где подвергается гидролизации неспецифическими эстеразами с образованием 4,5-диаминофлуоресцеина (DAF-2). Генерируемый DAF-2 может легко реагировать с эндогенным NO, с образованием высокофлуоресцентного соединения диаминофлуоресцеин триазола (DAF-2T) (Рис. 10) (Wany, Gupta, 2016).

Для исследования фотоиндуцированной генерации NO нейроглиальные препараты инкубировались с DAF-2DA (5 мкМ) в течение 60 мин в кюветах, после чего пятикратно отмывались физиологическим раствором. Далее следовала инкубация с Фотосенсом (100 нМ) 30 мин. Затем препараты облучались диодным лазером (670 нм, 0.4 Вт/см²) в течение 30 мин на флуоресцентном микроскопе AxioLab.A1 (Carl Zeiss). Флуоресценция DAF-2DA регистрировалась до облучения и через 1, 4, 7, 10, 15, 20, 25, 30 мин. Изображения были получены с помощью камеры xioCam ERc 5s и программного обеспечения ZEN 2012 (Carl Zeiss).

2.7. Иммунофлуоресцентная регистрация локализации p53, E2F1 и APP в рецепторе растяжения рака и дорзальных ганглиях крысы

2.7.1 Иммунофлуоресцентная регистрация локализации p53, E2F1 и APP в рецепторе растяжения рака

Через 1, 4 и 8 часов после аксотомии в процессе выделения PPP проводилось иммунофлуоресцентное исследование локализации белка p53, E2F1 и APP в ядре, ядрышке, перикарионе МРН, а также в глиальных клетках, окружающих проксимальную часть аксона. Первичными антителами служили мышьиные антитела к p53 (P5813, Sigma-Aldrich), кроличьи антитела к N- или С-терминальным фрагментам белка APP (N-APP и С-APP, SAB4200536 и A8717 соответственно, Sigma-Aldrich), кроличьи антитела к E2F1 (SAB2103144, Sigma-Aldrich). Все первичные антитела были разведены в отношении 1:100 в PBST - фосфатном буфере (PBS: 10 мМ фосфатный буфер плюс 2,7 мМ KCl и 137 мМ NaCl, pH 7.4, при +25 °C), содержащем 0,1% Tween 20.

В качестве вторичных антител использовались Anti-Mouse IgG1 ($\gamma 1$), меченые CFTM555 (SAB4600302), и Anti-Rabbit IgG (H+L), меченным CFTM 488A (SAB4600045; 1:500), разведенные 1:500 в PBS. Препараты РРР фиксировались 24 часа 4% раствором параформальдегида в PBS. Затем 24 часа отмывались смесью 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA), 0,2% NaN₃ и 1% TritonX-100. Затем они инкубировались 24 часа в растворе первичных антител, отмывались и инкубировались 24 часа в растворе вторичных антител, снова отмывались 24 часа при +4°C.

Для визуализации ядер глиальных клеток и нейронов препараты флуорохромировали Hoechst-33342 (40 мкМ) в течение 10 минут при +25°C. После промывали и заключали в глицерин под покровное стекло. Препараты рецептора растяжения рака фотографировали на флуоресцентном микроскопе Olympus BX-51, который снабжен цифровой камерой OrcaFlash 4.0 V3 (Hamamatsu, Japan), при длинах волн возбуждения около 535 нм для Anti-Mouse IgG1 ($\gamma 1$), меченого CF555 и 365 нм для Hoechst-33342. Флуоресценция регистрировалась на длинах волн >580 нм и >460 нм, соответственно.

2.7.2 Иммунофлуоресцентная регистрация локализации p53, E2F1 и APP в дорзальных ганглиях крысы

Идентификация белков p53, E2F1, N-APP и C-APP в DRG производилась через 24 часа или 7 дней после перерезки седалищного нерва. Для этого производили хирургическую операцию по извлечению 4- и 5-ого ганглия, фиксировали их 6 часов в 4% параформальдегиде и инкубировали 48 часов 20% сахарозе при 4 °С, если было необходимо их заморозить. Зафиксированный биоматериал заливался в специальных формах 4% агарозным гелем, охлаждался при +4°C до затвердевания и нарезался хирургическим скальпелем до блоков с DRG. После на вибраторе Leica VT 1000 S (Германия) были получены срезы агарозных блоков толщиной 20 мкм. Срезы промывали 3 раза PBS и инкубировали 1 час при температуре 25 °С в растворе, состоящем из % BSA и 0,3% тритоном X-100, для блокирования сайтов неспецифического связывания.

Затем срезы инкубировались с первичными антителами: мышинными антителами к p53 (P5813, Sigma-Aldrich) и, соответственно, кроличьим антителом против нейроспецифического ядерного белка NeuN (ABN78, Sigma-Aldrich), а также кроличьими антителами к N- или C-терминальным фрагментам белка APP (N-APP и C-APP, SAB4200536 и A8717 соответственно, Sigma-Aldrich), или кроличьими антителами к E2F1 (SAB2103144, Sigma-Aldrich) и, соответственно, мышинным антителом Anti-NeuN (MAB 377, Sigma-Aldrich) в течение ночи при 4°C. После трехкратного промывания в PBS срезы инкубировали со вторичными антителами Anti-Rabbit IgG (H+L), CF™ 488A (SAB4600045; 1:500) и Anti-Mouse IgG1 (γ1), CF™555 (SAB4600302; 1:500) в течение ночи при 4 °C. Отрицательный контроль - отсутствие первичных антител. Ядра нейронов и глиальных клеток визуализировали с помощью Hoechst 33342 (40 мкМ; 10 мин). Срезы помещали в 60% глицерин и исследовали на микроскопе Olympus BX-51, оснащенном цифровой камерой OrcaFlash 4.0 V3 (Hamamatsu, Япония).

Затем срезы инкубировали с первичными кроличьими антителами против C-APP или N-APP (1:100) и мышинным антителом против нейроспецифического ядерного белка NeuN (MAB377, Sigma; 1:1000) в течение ночи при 4 °C. После трехкратного промывания в PBS срезы инкубировали со вторичными антителами anti-rabbit IgG (H+L), CF™ 488A (SAB4600045; 1:500) и anti-mouse IgG1 (γ1), CF™555 (SAB4600302; 1:500). Отрицательный контроль - отсутствие первичных антител. Ядра нейронов и глиальных клеток визуализировали с помощью Hoechst 33342 (40 мкМ; 10 мин). Срезы помещали в 60% глицерин и исследовали на микроскопе Olympus BX-51, оснащенном цифровой камерой OrcaFlash 4.0 V3 (Hamamatsu, Япония).

2.8. Визуализация апоптоза на срезах дорзальных ганглиев крысы методом TUNEL

Для визуализации гибели клеток по пути апоптоза применялся метод TUNEL, который окрашивает разрывы цепи ДНК. Реакционную смесь готовили непосредственно перед применением и держали на льду в течение ее

использования. Срезы DRG, зафиксированные в 4% параформальдегиде, аккуратно переносились на предметное стекло, промывались PBS 3 раза и подвергались пермеабиллизации путем инкубирования в течение 2 минут при +4 °С в 0,1% в растворе цитрата натрия с добавлением 0,1% Triton X-100 (SigmaAldrich). После повышения проницаемости клеточных мембран срезы промывали 2 раза в PBS, излишки влаги удалялись фильтровальной бумагой, подсушивались. Далее на каждый препарат наносилась 50 мкл реакционной смеси TUNEL. Обработанный таким образом образец инкубировался 60 мин во влажной камере в темноте при +37°С. По истечении заданного времени препараты промывали 3 раза в PBS, подсушивали и заключали в глицерин под покровное стекло. Для оценки эффективности определения апоптоза нейронов и глиальных клеток на срезах DRG методом TUNEL проводился позитивный контроль путем 10-минутного инкубирования пермеабиллизованных срезов с нуклеазой бензоназа (1500 U/мл в 50 mM Tris-HCl буфере, pH7.5; 1 мг/мл BSA) при +25°С. Анализ препаратов осуществлялся на флуоресцентном микроскопе Olympus BX51WI (Япония), оснащенный цифровой камерой ORCA-Flash4.0 V3, при возбуждении в диапазоне 570-620 нм.

2.9. Вестерн-блот анализ белков p53, APP в дорзальных ганглиях крысы

Для получения образцов аксотомированных или контрольных DRG крыс анестезировали и декапитировали через 4 или 24 часа или 7 суток после перерезки седалищного нерва, затем быстро вырезали 4-й и 5-й люмбарные DRG и гомогенизировали на льду с помощью ультразвукового гомогенизатора Vibra-Cell VCX 130 (Sonics, USA) в Extraction/Labeling Lysis Buffer, дополненном нуклеазой бензоназа и ингибиторами протеаз и фосфатаз. В каждой группе объединяли гомогенаты от трех животных и центрифугировали 10 мин при 10000 g и 4 °С.

Цитоплазматическая и ядерная фракции были выделены с использованием набора для экстракции ядерной фракции CelLytic NuCLEAR (Sigma Aldrich). Осадок содержал клеточные ядра, а супернатант, в котором не обнаруживался

ядерный белок гистон H3, использовался в качестве цитоплазматической фракции.

Образцы, содержащие 10-20 мкг белка в 15 мкл, подвергали электрофоретическому разделению в полиакриламидном геле (7-10%) в присутствии додецилсульфата натрия в ячейке mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad, США). В качестве стандартных белковых маркеров использовали ColorBurst Electrophoresis Marker (C1992, Sigma-Aldrich). После разделения белки подвергали электропереносу на PVDF-мембрану (polyvinyl difluoride membrane 162-0177, Bio-Rad) с использованием системы Trans-Blot® Turbo Transfer System (Bio-Rad, США). После промывки PBS мембрану последовательно инкубировали 1 час в блокирующем буфере (TBS 1% Casein Blocker, Bio-Rad) и в течение ночи при 4 °C с первичными кроличьими антителами против p53 (P5813, Sigma-Aldrich), N-APP (SAB4200536, SigmaAldrich, 1:500), E2F1 (SAB2103144, Sigma-Aldrich) и β -актина (A5441, 1:5000). После инкубации мембраны промывали в Трис-буфере с добавлением 0,1% Твин-20 (TTVS, 10 мМ; pH 8) и инкубировали 1 час при комнатной температуре с вторичным антителом против IgG-пероксидазы кролика (A6154, SigmaAldrich, 1:1000) и IgG-пероксидазы мыши (A4416-1ML). Детекцию белков проводили на Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad). Хемилюминесценцию анализировали с помощью системы гель-документации Fusion SL (Vilber Lourmat, Франция).

2.10. Обработка изображений и статистический анализ

Интенсивность флуоресценции DAF-2DA анализировалась в программе ImagePRO. Средняя интенсивность флуоресценции была измерена и усреднена в кругах диаметром 10-20 мкм на четырех местоположениях:

1. Проксимальная область аксона;
2. Нейрональная сома;
3. Проксимальная часть дендритов;
4. Глиальная оболочка.

Полученные цифровые значения нормализовались относительно исходного уровня флуоресценции до ФД воздействия.

Уровень p53, E2F1, а также C-APP и N-APP в различных частях рецептора растяжения рака - ядрышке, ядре и перикарионе механорецепторного нейрона, а также в глиальных клетках, окружающих проксимальную часть аксона, анализировали по интенсивности флуоресценции с помощью программы ImageJ. Оценивали среднюю флуоресценцию (по площади) ядрышка, ядра без ядрышка, и ядер глиальных клеток и усредняли по площади. Флуоресценцию перикариона около ядра (p) усредняли вдоль зеленой пунктирной линии, окружающей ядро (Рис. 11). Данные измерений нормализовали на интенсивность фоновой флуоресценции:

$$I_{norm} = \frac{I_{meas} - I_{back}}{I_{back}},$$

где I_{meas} – средняя интенсивность в данной области (ядрышко, ядро, перикарион нейрона и глиальные клетки), I_{back} – средняя интенсивность фона.

В опытах на DRG крыс, где в пределах ганглия отсутствовали фоновые участки, нормализация не проводилась. Колокализацию p53, E2F1, C-APP и N-APP с маркером нейронов NeuN оценивали с помощью программы Image J с плагином JACoP (Volte, Cordelières, 2006). Коэффициент колокализации M1 отражает долю пикселей в зеленых каналах (E2F1, C-APP и N-APP), относительно общего сигнала, зарегистрированного в красном канале (маркер нейронов Anti-NeuN MAB377) либо долю пикселей в красном канале (p53) относительно общего сигнала, зарегистрированного в зеленом канале (маркер нейронов NeuN ABN78) (Fletcher et al., 2010). В расчетах использовали не менее 100 клеток. Для количественной оценки среднего уровня флуоресценции p53, E2F1, C-APP и N-APP в экспериментальных и контрольных препаратах DRG использовали 10 контрольных и 10 опытных изображений для каждой из 6 крыс. Оценивали среднюю (по площади) флуоресценцию цитоплазмы и ядра для каждой клетки и усредняли полученные значения. Анализ среднего уровня флуоресценции APP в

МРН раков проводился по одной фотографии для каждого из 10 опытных и 10 контрольных раков.

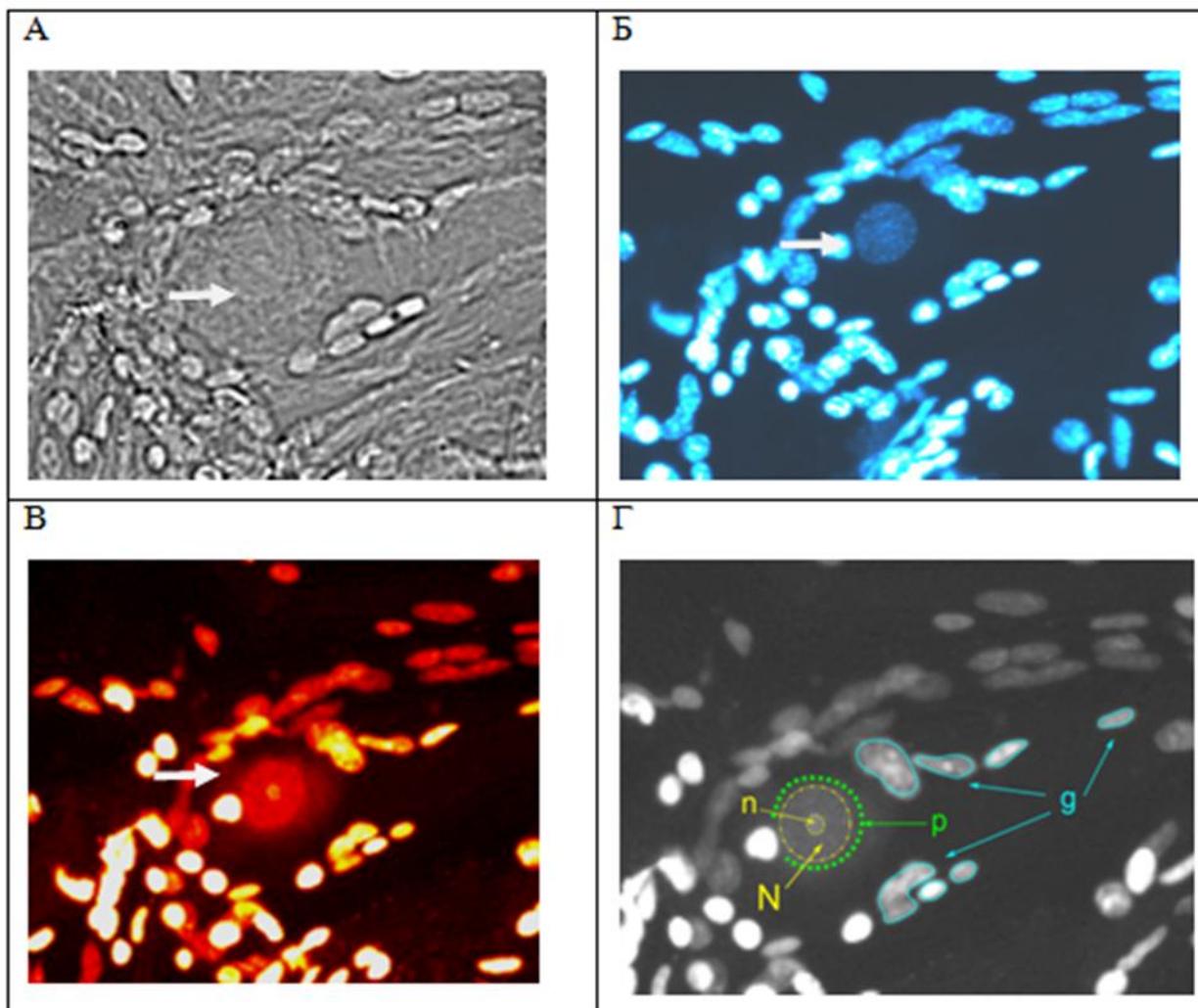


Рисунок 11. Микрофотографии рецептора растяжения рака. (А) - в проходящем свете, (Б) - флуорохромирование Hoechst 33342, который придает голубую флуоресценцию клеточным ядрам, (В) – иммуно-флуоресцентная визуализация белка p53 (красная флуоресценция CF555). Белые стрелки указывают на ядро нейрона; (Г) Схема измерений интенсивности флуоресценции вторичных антител Anti-Mouse IgG1 (γ 1)/CFTM555. n – ядрышко МРН; N – область ядра; p – область перикариона вокруг ядра, g – область глии. Оценивали среднюю (по площади) флуоресценцию ядрышка, ядра без ядрышка, и ядер глиальных клеток. Флуоресценцию перикариона около ядра (p) усредняли вдоль зеленой пунктирной линии, окружающей ядро.

Полученные изображения методом вестерн-блот обрабатывали с помощью программного пакета Vision Capt.

Клетки, позитивно окрашенные TUNEL, подсчитывали в 3 срезах DRG с ипсилатеральной стороны, где нейроны не сохраняли аксональную целостность в результате операции по перерезке седалищного нерва, а также с интактной контралатеральной стороны каждого из 6 животных. Статистическая оценка масштаба апоптотической гибели нейронов и глиальных клеток ганглиев осуществлялась через 24 часа или через 7 суток после перерезки седалищного нерва.

Статистическая оценка отличий нейроглиальных образцов в различных экспериментальных сериях проводилась с помощью однофакторного дисперсионного анализа (One Way ANOVA). Достоверными отличия считались при уровне значимости $p < 0.05$. Данные представлены в виде среднее значение \pm стандартная ошибка среднего.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Динамика генерации NO при изменении внеклеточной концентрации Ca^{2+} во время ФДТ

Динамика генерации NO в МРН и глиальных клетках при ФД воздействии сильно зависит от внеклеточной концентрации Ca^{2+} . Четырехкратное повышение внеклеточной концентрации Ca^{2+} приводило к достоверному увеличению интенсивности флуоресценции DAF-2DA в нейрональной соме, дендритах и глиальных клетках, также прослеживалась положительная тенденция в продукции NO и в аксоне (Рис. 12 а, 13). Так в соме МРН наблюдался быстрый рост образования NO, достигающий пика на 10 мин, после чего следовало медленное уменьшение уровня NO. Фотоиндуцированная генерация NO в нейрональной соме достоверно увеличивалась на 7 мин в 2,6 раза ($p < 0.05$), 10 мин в 2,5 раза ($p < 0.05$) и 15 мин в 1,9 раза ($p < 0.05$) относительно контрольной серии (Рис. 13 а).

В глиальных клетках происходило быстрое увеличение NO, достигая максимального значения на 15 мин и увеличиваясь в 2,3 раза ($p < 0.05$) по сравнению с контрольными препаратами. После 15 минут шла фаза медленного уменьшения образования NO. Флуоресценция DAF-2DA в глии при облучении достоверно увеличивалась на 4 мин в 1,9 раза ($p < 0.05$), 7 мин в 2,2 раза ($p < 0.05$), 15 мин в 2,3 раза ($p < 0.05$), 20 мин в 1,8 раза ($p < 0.05$), 25 мин в 1,9 раза ($p < 0.05$) и 30 мин в 1,8 ($p < 0.05$) относительно контрольной серии (Рис. 13 б).

В дендритах и аксоне наблюдалась схожая динамика продукции NO при ФД воздействии. Резкий рост уровня NO наблюдался с 1 мин облучения вплоть до 10 мин, сменяясь медленным увеличением генерации NO до конца ФДТ (Рис. 13 в, г). Достоверное увеличение флуоресценции DAF-2DA в дендритах зафиксировано на 7 мин в 2,5 раза ($p < 0.05$), 10 мин в 2,5 раза ($p < 0.05$) и 20 мин в 1,7 раза ($p < 0.05$) по сравнению с контрольными препаратами (Рис. 13 г).

Уменьшение внеклеточной концентрации Ca^{2+} вдвое не приводило к существенным изменениям в продукции NO в PPP при облучении (Рис. 14).

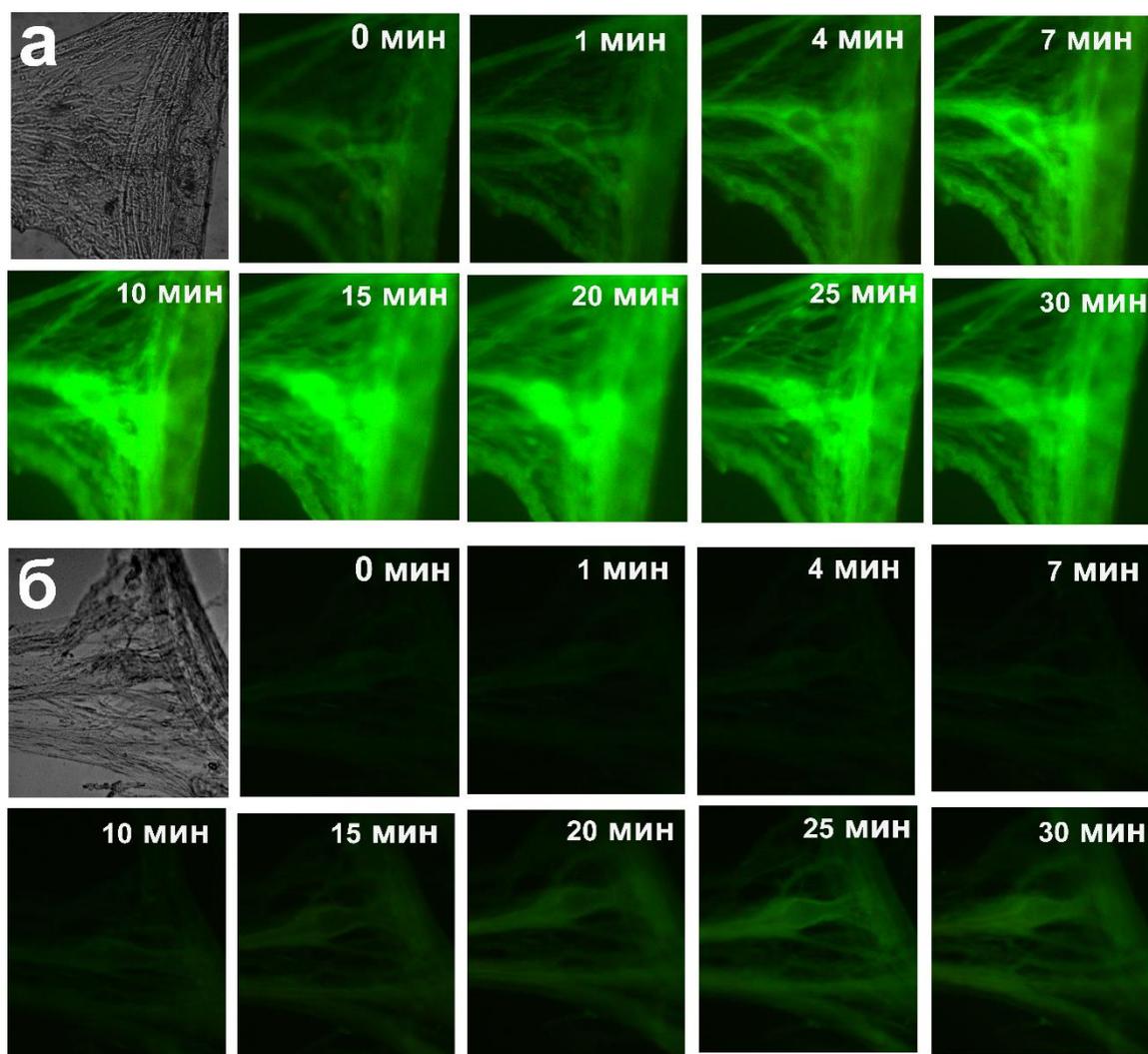


Рисунок 12. Динамика генерации NO под действием 54 мМ внеклеточной концентрации Ca^{2+} во время ФД-воздействия с окраской NO-чувствительным флуоресцентным зондом DAF-2DA в различных областях изолированного PPP: а – опыт, б – контроль.

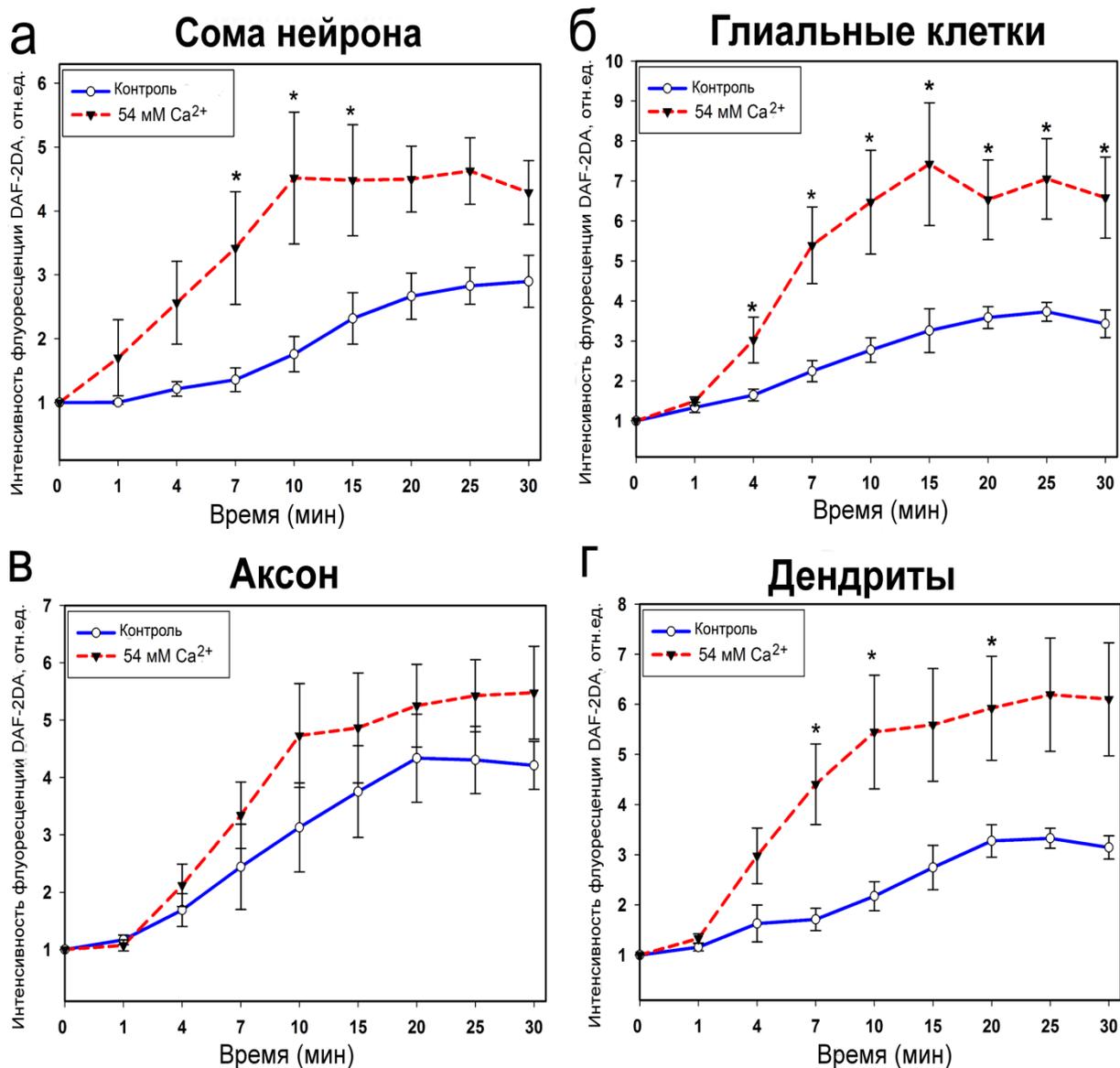


Рисунок 13. Динамика генерации NO под действием 54 мМ внеклеточной концентрации Ca^{2+} во время ФД-воздействия с окраской NO-чувствительным флуоресцентным зондом DAF-2DA в различных областях изолированного РРР. Пунктирная линия с треугольниками отражает динамику генерации NO в опытных препаратах, сплошная линия с кружками – в контрольных препаратах. Динамика средней флуоресценции: а – тело нейрона, б – глиальные клетки, в – аксон, г – дендриты: * $p < 0.05$. n=6.

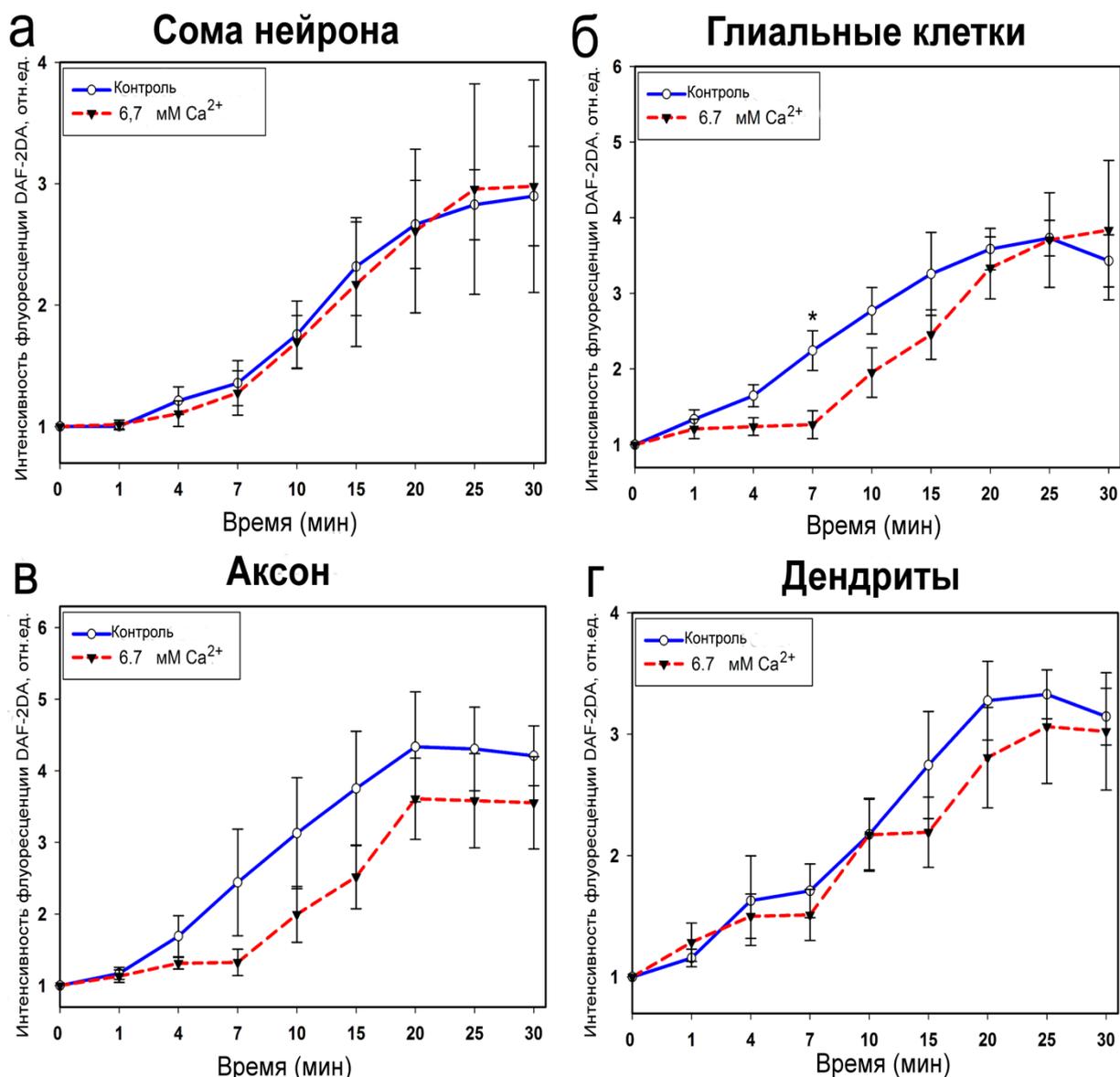


Рисунок 14. Динамика генерации NO под действием 6,7 мМ внеклеточной концентрации Ca²⁺ во время ФД-воздействия с окраской NO-чувствительным флуоресцентным зондом DAF-2DA в различных областях изолированного РРР. Пунктирная линия с треугольниками отражает динамику генерации NO в опытных препаратах, сплошная линия с кружками – в контрольных препаратах. Динамика средней флуоресценции: а – тело нейрона, б – глиальные клетки, в – аксон, г – дендриты: *p<0.05. n=6.

3.2. Динамика генерации NO под действием Ca²⁺-ионофора во время ФДТ

Динамика генерации NO в МРН и глиальных клетках под действием Ca²⁺-ионофора Ionomycin, вызывающего значительный приток Ca²⁺ во внутриклеточное пространство, имела ярко выраженный характер увеличения уровня NO вплоть до конца ФД воздействия (Рис. 15). Так в нейрональной соме уже с первых минут облучения наблюдается рост продукции NO, достигающий пика на 30 мин облучения и увеличивающийся практически в 10 раз относительно исходного уровня. Фотоиндуцированная генерация в теле МРН достоверно увеличивалась на 1 мин в 1,6 раза ($p < 0.05$), 15 мин в 1,8 раза ($p < 0.05$), 20 мин в 2,2 раза ($p < 0.05$), 25 мин в 2,4 раза ($p < 0.05$) и 30 мин в 2,8 раза ($p < 0.05$) относительно контрольных значений (Рис. 15 а).

В глиальных клетках действие Ionomycin сказывается на более поздних минутах облучения, хотя положительная тенденция в генерации NO прослеживается с первых минут, но не имеет достоверных значений. Флуоресценция DAF-2DA достоверно увеличивается на 25 мин в 1,6 раза ($p < 0.05$) и 30 мин в 1,8 раза ($p < 0.05$) относительно контрольных экспериментов (Рис. 15 б).

В дендритах и аксоне наблюдается схожая динамика генерации NO при ФД воздействии, достигающая пиковых значений флуоресценции DAF-2DA на последних минутах облучения (Рис. 15 в, г). В аксоне достоверно увеличивается фотоиндуцированная генерация NO на 25 мин в 1,5 раза ($p < 0.05$) по сравнению с контрольными показателями (Рис. 15 в). В дендритах максимальное значение флуоресценции DAF-2DA приходится на 30 мин, увеличиваясь практически в 9,5 раза относительно исходного уровня. Достоверные отличия генерации NO в дендритах от контрольных значений наблюдаются на 20 мин в 1,7 раза ($p < 0.05$), 25 мин в 2 раза ($p < 0.05$) и 30 мин в 2,4 раза ($p < 0.05$) (Рис. 15 г).

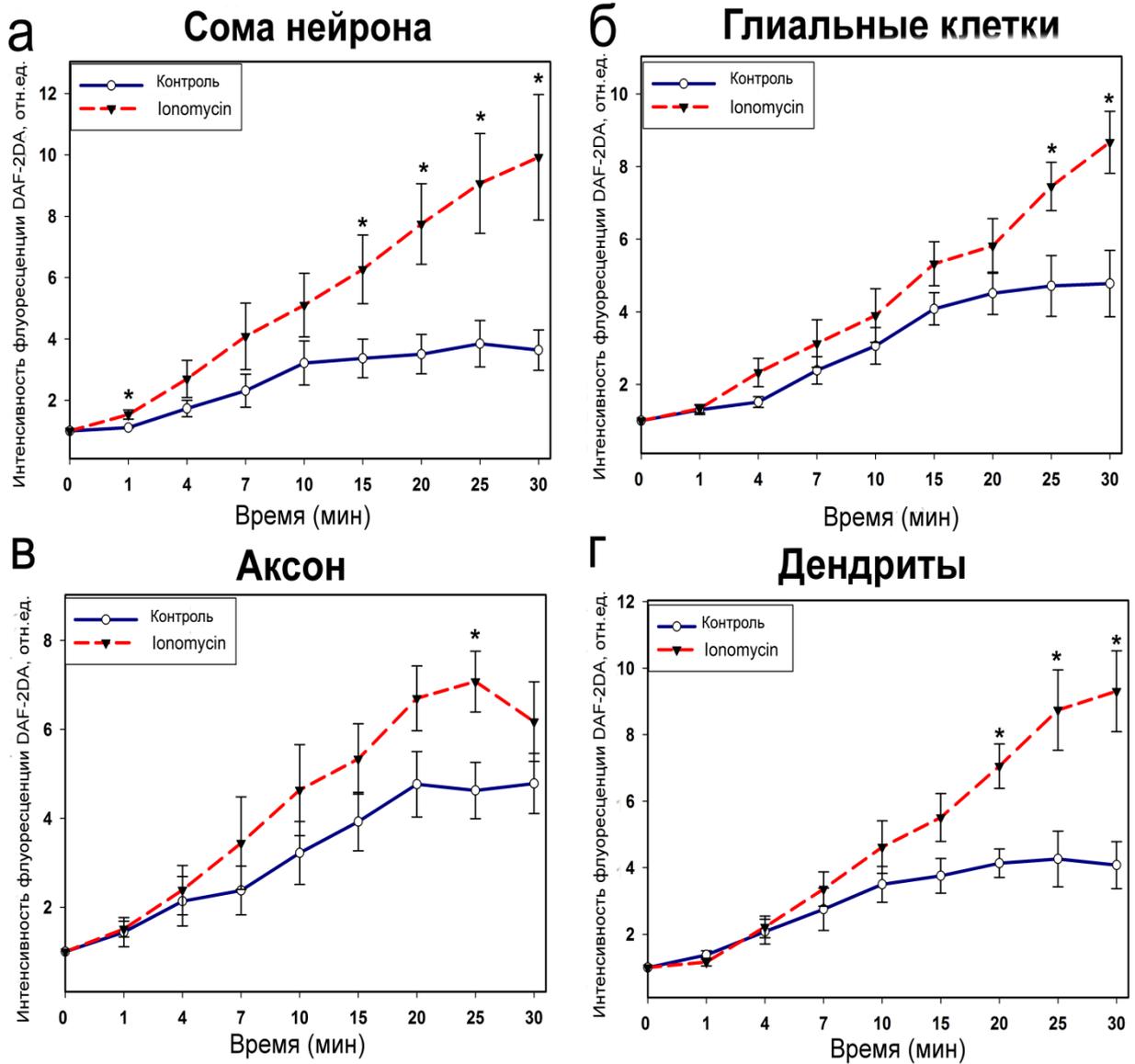


Рисунок 15. Динамика генерации NO под действием Ca^{2+} -ионофора Ionomycin 2 мкМ во время ФД-воздействия с окраской NO-чувствительным флуоресцентным зондом DAF-2DA в различных областях изолированного PPR. Пунктирная линия с треугольниками отражает динамику генерации NO в опытных препаратах, сплошная линия с кружками – в контрольных препаратах. Динамика средней флуоресценции: а – тело нейрона, б – глиальные клетки, в – аксон, г – дендриты: * $p < 0.05$. $n=6$.

3.3. Динамика генерации NO под действием блокатора Ca²⁺-каналов плазматической мембраны во время ФДТ

Динамика генерации NO в МРН и глиальных клетках под действием блокатора Ca²⁺-каналов плазматической мембраны CdCl₂ была снижена относительно контрольных препаратов (Рис. 16). В нейрональной соме флуоресценция DAF-2DA была снижена относительно контрольных значений. Достоверное уменьшение продукции NO в теле МРН зафиксировано на 10 мин, отличаясь от контрольных показателей в 2 раза (p<0.05) (Рис. 16 а).

В глиальных клетках фотоиндуцированная генерация NO также была снижена в результате действия CdCl₂ в 10 раз относительно исходного уровня. Достоверное уменьшение флуоресценция DAF-2DA зафиксировано на 10 мин облучения, отличаясь от контрольных значений в 2,2 раза (p<0.05) (Рис.16 б). При этом флуоресценция DAF-2DA в глиальных клетках, как и в нейрональной соме, под действием CdCl₂ при ФД воздействию имеет тенденцию к увеличению продукции NO.

Динамика генерации NO в дендритах и аксоне при ФДТ, в условиях блокирования Ca²⁺-каналов плазматической мембраны CdCl₂, имеет схожий двухфазовый характер: увеличение продукции NO сменяется её медленным спадом (Рис. 16 в, г). Достоверное уменьшение флуоресценция DAF-2DA в аксоне зафиксировано на 4 мин в 1,7 раза (p<0.05), 7 мин в 2 раза (p<0.05), 10 мин в 2,2 раза (p<0.05) и 15 мин в 1,8 раза (p<0.05) по сравнению с контрольными значениями (Рис. 16 в). Достоверное уменьшение фотоиндуцированной генерации NO в дендритах наблюдалось на 7 мин в 3,5 раза, 10 мин в 3,8 раза и 15 мин в 2,8 раза относительно контрольной серии (Рис. 16 г).

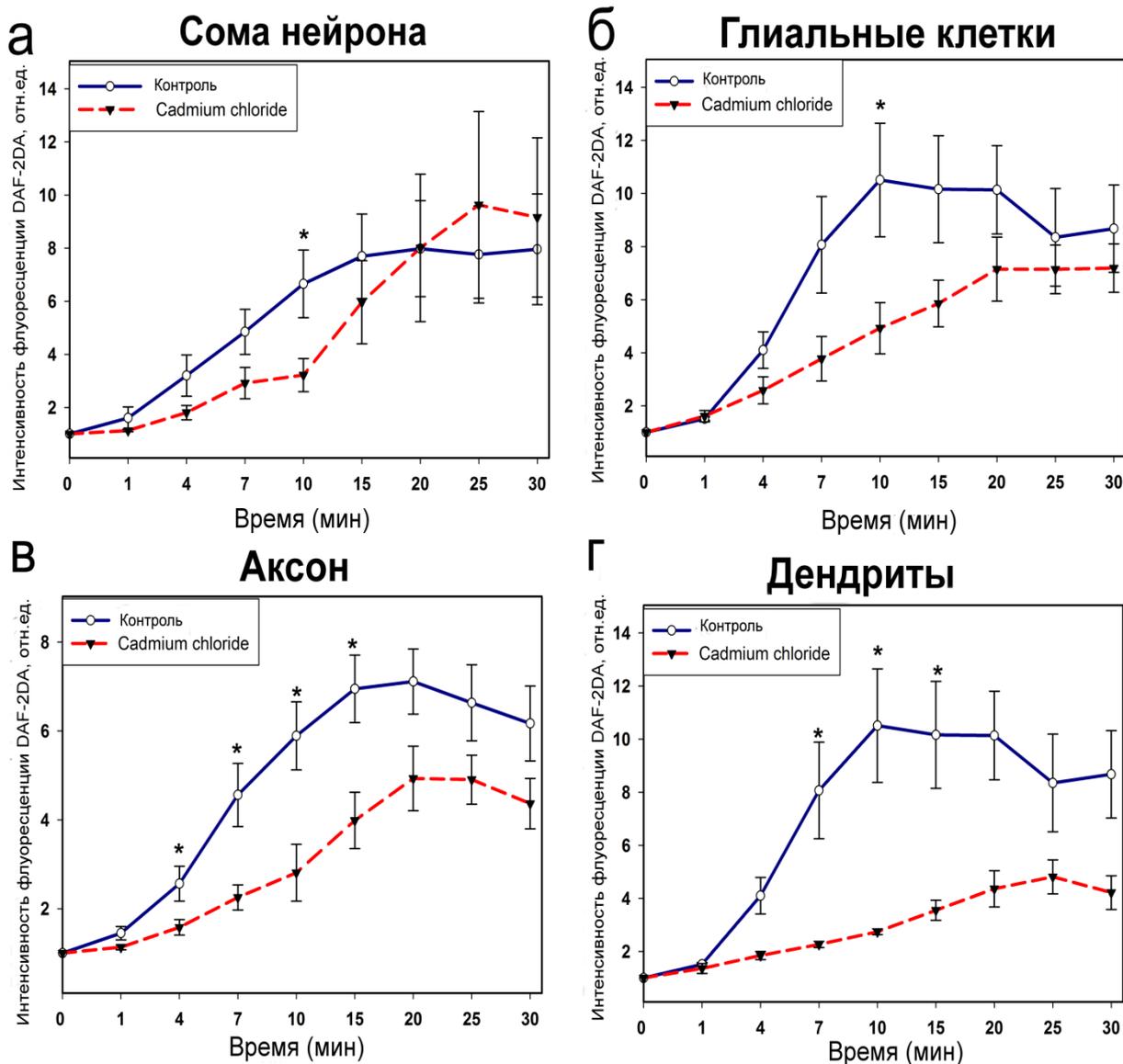


Рисунок 16. Динамика генерации NO под действием блокатора Ca^{2+} -каналов CdCl_2 100 мкМ во время ФД-воздействия с окраской NO-чувствительным флуоресцентным зондом DAF-2DA в различных областях изолированного РРР. Пунктирная линия с треугольниками отражает динамику генерации NO в опытных препаратах, сплошная линия с кружками – в контрольных препаратах. Динамика средней флуоресценции: а – тело нейрона, б – глиальные клетки, в – аксон, г – дендриты: * $p < 0.05$. $n = 6$.

3.4. Динамика генерации NO под действием блокатора Ca²⁺-каналов L-типа во время ФДТ

Фотоиндуцированная генерация NO в МРН и глиальных клетках под действием блокатора Ca²⁺-каналов L-типа Nifedipine была снижена относительно контрольных препаратов (Рис. 17). Так в нейрональной соме в условиях блокирования Ca²⁺-каналов L-типа образование NO держалось практически на одном уровне, незначительно возрастая на первых минутах облучения, и было снижено по сравнению с контрольными значениями. Достоверное уменьшение флуоресценции DAF-2DA наблюдалось на последней минуте ФД воздействия, отличаясь от контрольных показателей в 2 раза ($p < 0.05$) (Рис. 17 а).

В глиальных клетках фотоиндуцированная генерация NO также была снижена в результате действия нифедипина. Достоверное уменьшение флуоресценции DAF-2DA зафиксировано на 20 мин и 25 мин облучения, отличаясь от контрольных значений в 2 раза ($p < 0.05$) (Рис. 17 б). При этом флуоресценция DAF-2DA в глиальных клетках, как и в нейрональной соме, практически держалась на одном уровне, за исключением первых минут облучения, где наблюдалась тенденция к росту продукции NO.

Динамика генерации NO в аксоне и в дендритах под действием нифедипина в условиях фотоокислительного стресса также была снижена (Рис. 17 в, г). В аксоне образование NO достоверно было ниже по сравнению с контрольными показателями на 15 мин в 1,7 раза ($p < 0.05$), 20 мин в 1,7 раза ($p < 0.05$), 25 мин в 1,9 раза ($p < 0.05$) и 30 мин в 1,8 раза ($p < 0.05$) (Рис. 17 в). В дендритах наблюдалась похожая картина фотоиндуцированной генерации NO. Так достоверное уменьшение флуоресценции DAF-2DA было зафиксировано на 15 мин в 1,7 раза ($p < 0.05$), 20 мин в 1,6 раза ($p < 0.05$), 25 мин в 1,8 раза ($p < 0.05$) и 30 мин в 2 раза ($p < 0.05$) (Рис. 17 г).

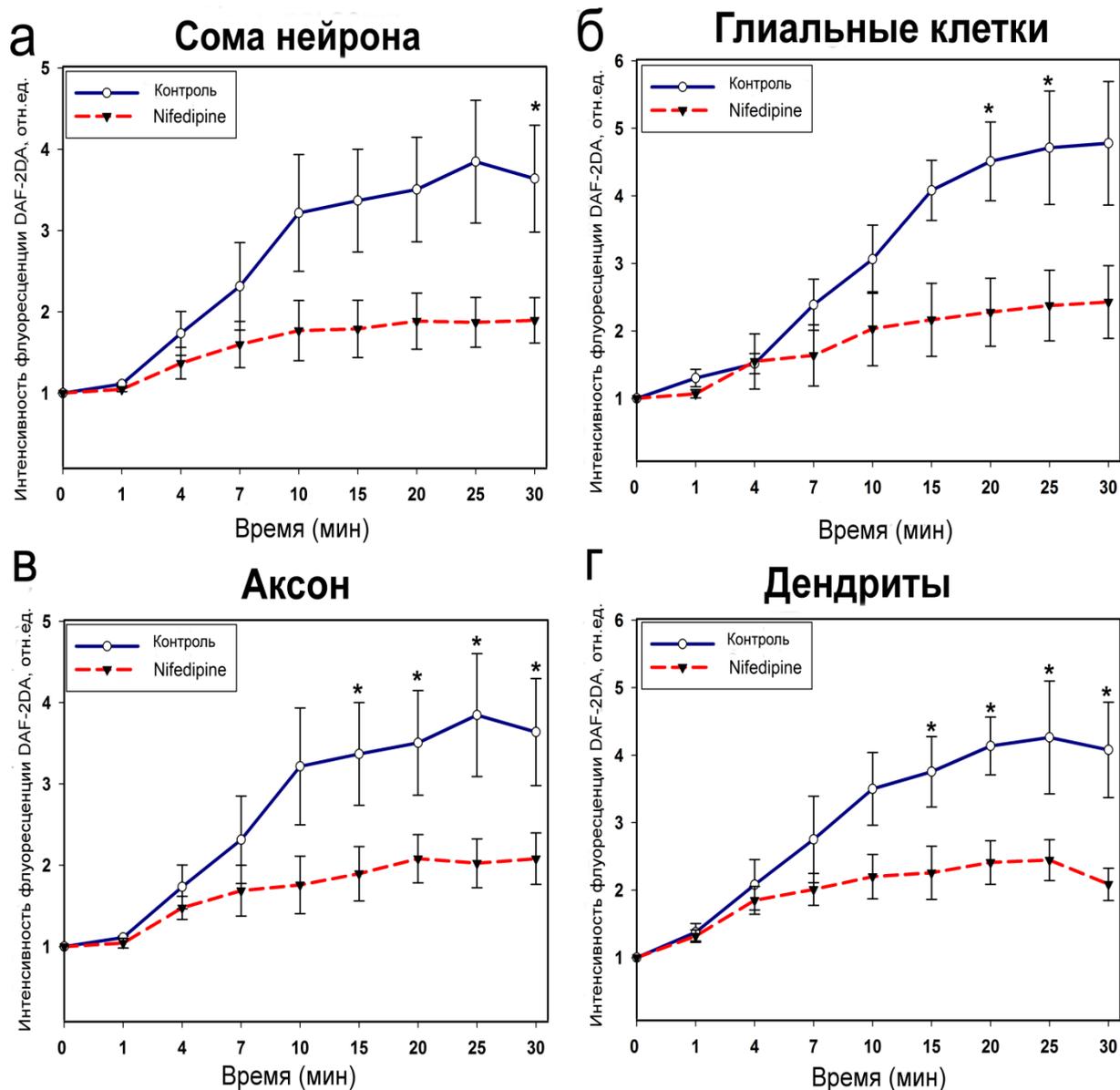


Рисунок 17. Динамика генерации NO под действием блокатора Ca^{2+} -каналов L-типа нефидипина 20 мкМ во время ФД-воздействия с окраской NO-чувствительным флуоресцентным зондом DAF-2DA в различных областях изолированного PPP. Пунктирная линия с треугольниками отражает динамику генерации NO в опытных препаратах, сплошная линия с кружками – в контрольных препаратах. Динамика средней флуоресценции: а – тело нейрона, б – глиальные клетки, в – аксон, г – дендриты: * $p < 0.05$. $n = 6$.

3.5. Динамика генерации NO под действием блокатора SERCA во время ФДТ

Фотоиндуцированная генерация NO в МРН и глиальных клетках под действием блокатора SERCA tBuBHQ, ингибирующего Ca²⁺-АТФазу эндоплазматического ретикула, имела положительную тенденцию и достоверно увеличивалась на последних минутах облучения в соме, дендритах и аксоне МРН, а также в глиальных клетках (Рис. 18). Так в теле нейрона достоверное повышение интенсивности флуоресценции DAF-2DA наблюдалось на 25 и 30 мин, увеличиваясь в 1,4 и 1,6 раза (p<0.05) соответственно относительно контрольных значений (Рис. 18 а).

В глиальных клетках продукции NO под действием tBuBHQ в условиях фотоокислительного стресса максимально увеличивалась в 7 раз по сравнению с исходным уровнем. Флуоресценции DAF-2DA достоверно увеличивалась на 25 и 30 мин ФД воздействия в 1,8 и 2 (p<0.05) раза соответственно относительно контрольных показателей (Рис. 18 б).

В дендритах и аксоне наблюдалась аналогичная, как и в соме нейрона и глиальных клетках, динамика фотоиндуцированной генерации NO в условиях блокирования Ca²⁺-АТФазы эндоплазматического ретикула (Рис. 18 в, г). Продукция NO в аксоне МРН увеличивалась на 25 мин в 1,9 раза (p<0.05) и 30 мин в 2,4 раза (p<0.05) относительно контрольной серии (рис. 16 в). Генерация NO в дендритах нейрона повышалась на 25 мин в 1,7 раза (p<0.05) и на 30 мин в 2 раза (p<0.05) по сравнению с контрольными препаратами (Рис.18 г).

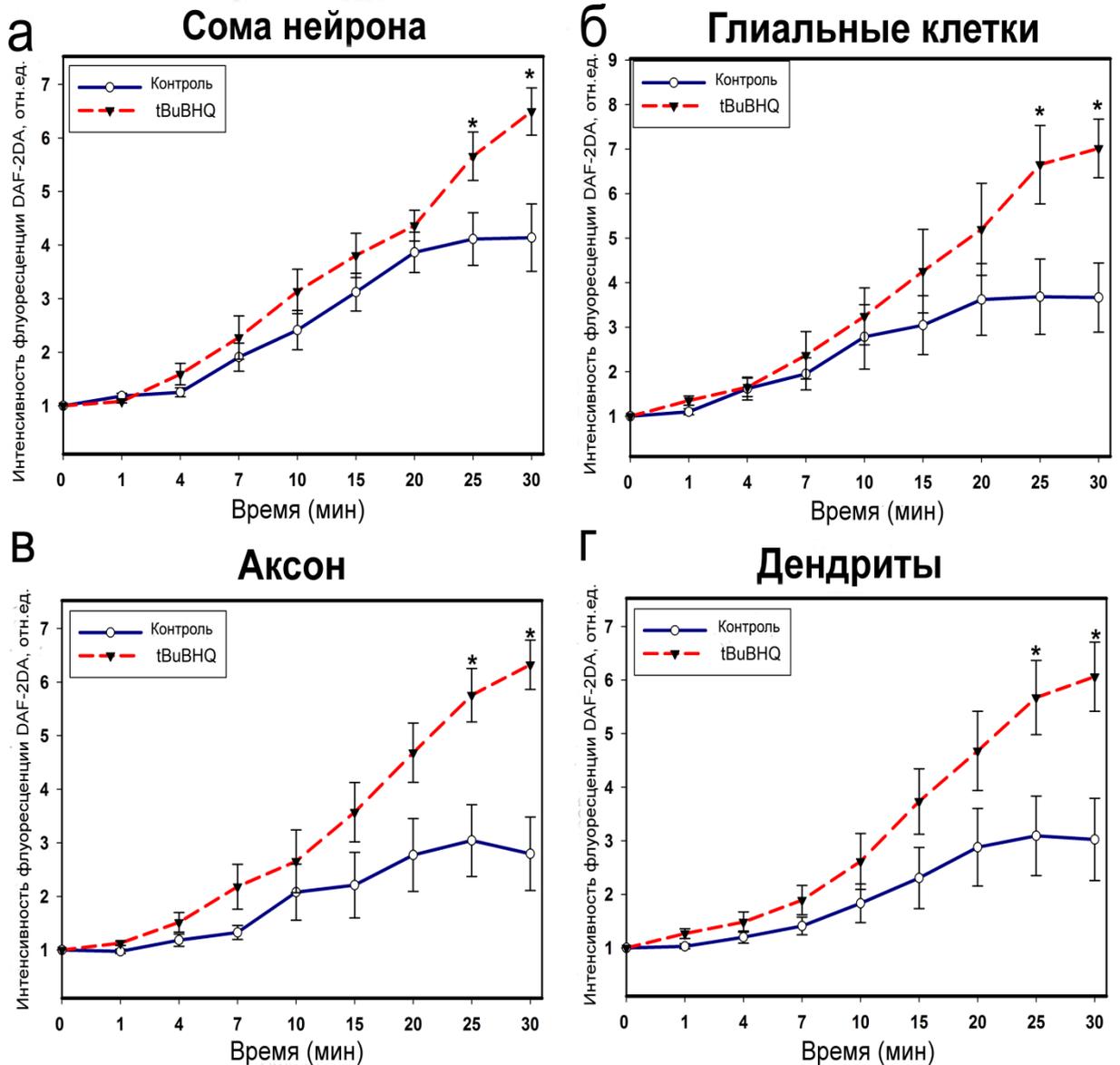


Рисунок 18. Динамика генерации NO под действием ингибитора Ca^{2+} -АТФазы эндоплазматического ретикулума tBuBHQ 35 мкМ во время ФД-воздействия с окраской NO-чувствительным флуоресцентным зондом DAF-2DA в различных областях изолированного PPP. Пунктирная линия с треугольниками отражает динамику генерации NO в опытных препаратах, сплошная линия с кружками – в контрольных препаратах. Динамика средней флуоресценции: а – тело нейрона, б – глиальные клетки, в – аксон, г – дендриты: * $p < 0.05$. $n = 6$.

3.6. Динамика генерации NO под действием ингибитора и активатора NF-κB во время ФДТ

Исследование влияния фактора транскрипции NF-κB на продукцию NO в нейронах и глиальных клетках рецептора растяжения рака при фотодинамическом воздействии проводилось с помощью модуляторов NF-κB, активатора Prostratin и ингибитора Parthenolide. Было показано, что под действием активатора NF-κB Prostratin продукция NO в теле нейрона имеет сходную с контрольными препаратами двухфазовую динамику, во время первой фазы которой наблюдается быстрый рост уровня NO, сменяющийся его медленным уменьшением. Так с первой минуты облучения наблюдается достоверный рост флуоресценции DAF-2DA в нейрональной соме, который достигает максимума на 15 мин, увеличиваясь в 1,6 раза ($p < 0.05$) относительно контроля. Затем в течение 10 мин генерация NO медленно снижается (Рис. 19 а).

В глиальных клетках под действием этого модулятора увеличение в 1,3 раза ($p < 0.05$) флуоресценции зафиксировано на 4 минуте (Рис. 19 б). В аксоне продукция NO достоверно возрастает на 1 мин в 1,3 раза ($p < 0.001$), на 4 минуте в 1,5 раза ($p < 0.05$), на 20 мин в 1,4 раза ($p < 0.05$), при этом максимальный уровень NO приходится на 20 мин (Рис. 19 в). В дендритных окончаниях достоверные отличия относительной флуоресценции DAF2-DA обнаружены на 10, 20 и 25 мин. Так на 10 мин продукция NO увеличивается в 2 раза ($p < 0.05$), на 20 мин в 1,5 раза ($p < 0.05$), на 25 мин в 1,4 раза ($p < 0.05$), но пиковый уровень генерации NO приходится на 20 мин, так же как и в аксоне, после чего наблюдается спад продукции NO (Рис. 19 г).

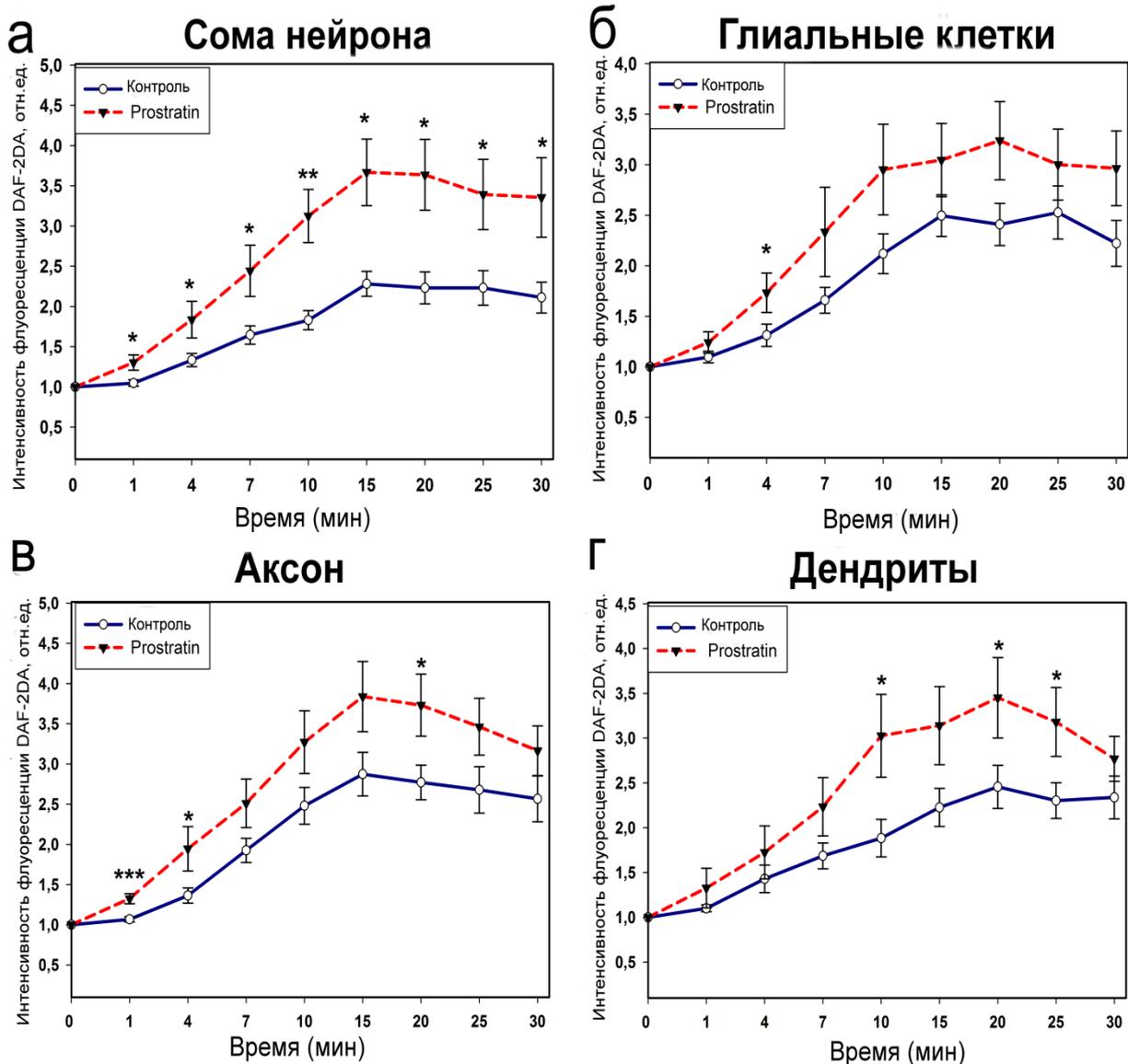


Рисунок 19. Динамика генерации NO под действием активатора ядерного фактора-кВ Prostratin 10 мкМ во время ФД-воздействия с окраской NO-чувствительным флуоресцентным зондом DAF-2DA в различных областях изолированного РРР. Пунктирная линия с треугольниками отражает динамику генерации NO в опытных препаратах, сплошная линия с кружками – в контрольных препаратах. Динамика средней флуоресценции: а – тело нейрона, б – глиальные клетки, в – аксон, г – дендриты: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. $n = 6$.

Ингибитор NF-κB Parthenolide снижал уровень флуоресценции в теле нейрона максимально на 15 минуте облучения в 1,6 раза ($p < 0.01$) относительно контрольных значений. Однако продукция NO под действием этого ингибитора, хотя и была значительно меньше, чем в контрольных образцах, имела достоверную тенденцию к росту на протяжении всего фотодинамического воздействия в отличие от продукции NO под действием активатора Prostratin, где кривая флуоресценции DAF2-DA имеет двухфазовую динамику. Достоверные значения были зафиксированы на 4 мин в 1,3 раза ($p < 0.01$), 7 мин в 1,4 раза ($p < 0.01$), 10 мин в 1,4 раза ($p < 0.01$), 15 мин в 1,6 раза ($p < 0.01$), 20 мин в 1,5 раза ($p < 0.05$) (Рис. 20 а).

В глиальных клетках в условиях ингибирования NF-κB наблюдается положительная динамика генерации NO вплоть до конца облучения. Достоверное уменьшение флуоресценции DAF-2DA в глии нейрона зафиксировано на 15 мин в 1,5 раза ($p < 0.05$) относительно контрольных значений (рис. 20 б).

В аксоне и в дендритных окончаниях прослеживается сходная с сомой нейрона динамика генерации NO (Рис. 20 в, г). В аксоне максимальное уменьшение в 1,8 раза ($p < 0.01$) флуоресценции DAF-2DA зафиксировано на 15 мин относительно контроля. Образование NO достоверно было ниже по сравнению с контрольными показателями на 7 мин в 1,5 раза ($p < 0.05$), 10 мин в 1,7 раза ($p < 0.01$), 15 мин в 1,8 раза ($p < 0.01$) и 20 мин в 1,6 раза ($p < 0.01$). После чего наблюдается медленный спад продукции NO (Рис. 20 в).

Максимальное уменьшение в 1,7 раза ($p < 0.05$) по сравнению с контролем образования NO в дендритных окончаниях под действием Parthenolide. Достоверное уменьшение флуоресценции DAF2-DA по сравнению с контрольными показателями было зафиксировано на 4 мин в 1,3 раза ($p < 0.05$), 7 мин в 1,4 раза ($p < 0.01$), 15 мин в 1,5 раза ($p < 0.01$) и 20 мин в 1,7 раза ($p < 0.01$) (Рис. 20 г).

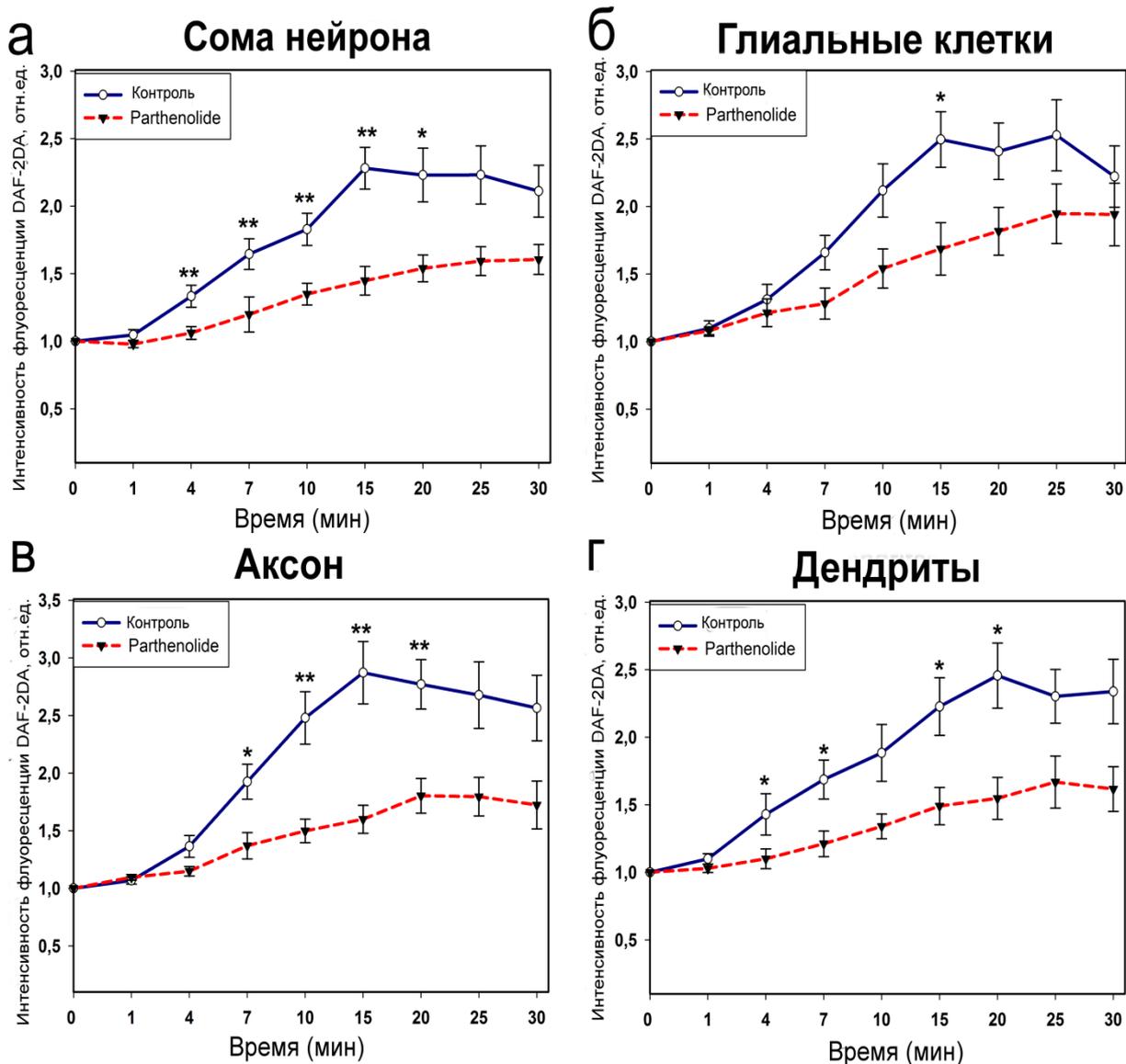


Рисунок 20. Динамика генерации NO под действием ингибитора ядерного фактора-кВ Parthenolide 10 мкМ во время ФД-воздействия с окраской NO-чувствительным флуоресцентным зондом DAF-2DA в различных областях изолированного PPP. Пунктирная линия с треугольниками отражает динамику генерации NO в опытных препаратах, сплошная линия с кружками – в контрольных препаратах. Динамика средней флуоресценции: а – тело нейрона, б – глиальные клетки, в – аксон, г – дендриты: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. $n = 6$.

3.7. Динамика генерации NO под действием ингибитора iNOS и ингибитора iNOS с активатором NF-κB во время ФДТ

Исследование влияния iNOS на продукцию NO в нейронах и глиальных клетках рецептора растяжения рака при фотодинамическом воздействии проводилось с помощью SMT, селективного ингибитора iNOS. Для подтверждения, что фотоиндуцированная генерация NO под действием Prostratin осуществляется через сигнальный путь NF-κB/iNOS был предложен эксперимент с применением и активатора NF-κB, Prostratin, и селективного ингибитора iNOS, SMT.

Под действием SMT продукция NO при ФДТ значительно снижалась как в соме, дендритах и аксоне нейрона, так и в глиальных клетках (Рис. 21). В нейрональной соме уже с первой минуты облучения генерация NO было ниже, чем в контрольных препаратах. Достоверное увеличение флуоресценции DAF-2DA наблюдалось на 1 мин в 1,19 раза ($p < 0.05$), 4 мин в 2,4 раза, 7 мин в 2,5 раза ($p < 0.05$), 10 мин в 3,4 раза ($p < 0.05$), 15 мин в 3,9 раза ($p < 0.05$), 20 мин в 3,8 раза ($p < 0.05$), 25 мин в 3,7 раза ($p < 0.05$) и 30 мин в 3,2 раза ($p < 0.05$) относительно контрольных значений (Рис. 21 а).

В глиальных клетках в условиях ингибирования iNOS и фотоокислительного стресса продукция NO достоверно снижалась на 7 мин в 2,3 раза ($p < 0.05$), 10 мин в 2,8 раза ($p < 0.05$), 15 мин в 3,3 раза ($p < 0.05$), 20 мин в 3 раза ($p < 0.05$) по сравнению с контролем (Рис. 21 б).

Изменения в уровне продукции NO в аксоне под действием SMT во время ФДТ фиксируются уже на первой минуте облучения. Достоверное снижение фотоиндуцированной генерации NO по сравнению с контролем наблюдаются на 1 мин в 1,2 раза ($p < 0.05$), 10 мин в 2,6 раза ($p < 0.05$), 15 мин в 2,6 раза ($p < 0.05$), 20 мин в 2,4 раза ($p < 0.05$), 25 мин в 2 раза ($p < 0.05$) и 30 мин в 2 раза ($p < 0.01$) (рис. 21 в). Флуоресценция DAF-2DA в дендритах достоверно снижена на 4 мин в 1,9 раза, 7 мин в 2 раза ($p < 0.05$), 10 мин в 2,5 раза ($p < 0.01$), 15 мин в 2,5 раза ($p < 0.05$), 20 мин в 2,5 раза ($p < 0.05$) относительно контрольных препаратов (Рис. 21 г).

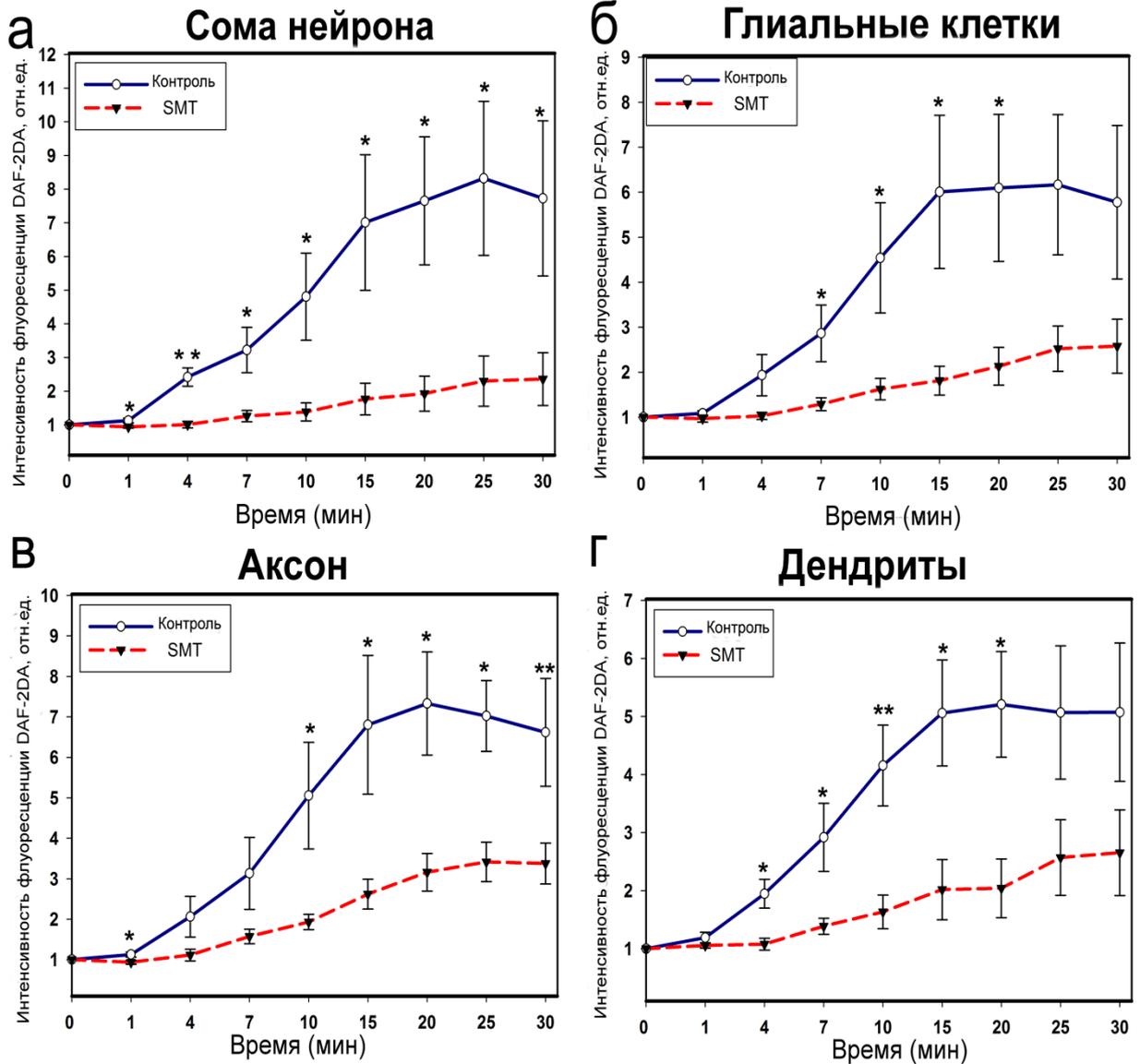


Рисунок 21. Динамика генерации NO под действием селективного ингибитора iNOS SMT 100 мкМ во время ФД-воздействия с окраской NO-чувствительным флуоресцентным зондом DAF-2DA в различных областях изолированного PPP. Пунктирная линия с треугольниками отражает динамику генерации NO в опытных препаратах, сплошная линия с кружками – в контрольных препаратах. Динамика средней флуоресценции: а – тело нейрона, б – глиальные клетки, в – аксон, г – дендриты: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. $n = 6$.

SMT снижало фотоиндуцированную генерацию NO с Prostratin в соме, аксоне, дендритах нейрона, а также в глиальных клетках (Рис. 22). Так в нейрональной соме уже с первой минуты ФД воздействия регистрируется достоверное снижение уровня продукции NO в 1,5 раза ($p < 0.05$) относительно контрольных показателей. Достоверное снижение флуоресценции DAF-2DA наблюдается на 4 и 7 мин в 1,5 раза ($p < 0.05$) и 1,7 раза ($p < 0.05$) соответственно (Рис. 22 а).

В глиальных клетках достоверные изменения уровня NO наблюдаются с первой минуты облучения, как и в теле нейрона. Достоверное уменьшение флуоресценции DAF-2DA по сравнению с контролем фиксировалось на 1 мин в 1,6 раза ($p < 0.05$), 4 мин в 1,6 раза ($p < 0.05$), 7 мин в 1,6 раза ($p < 0.05$), 20 мин в 1,4 раза ($p < 0.05$) (Рис. 22 б).

Фотоиндуцированная генерация NO достоверно снижалась в аксоне МРН (Рис. 22 в, г). Достоверное уменьшение флуоресценции DAF-2DA наблюдалось на 4 мин в 1,6 раза ($p < 0.05$), 7 мин в 1,6 раза ($p < 0.05$), 10 мин в 1,5 раза ($p < 0.05$), 25 мин в 1,7 раза ($p < 0.05$) относительно контрольных показателей (Рис. 22 в).

В дендритах изменения уровня NO носили более сглаженный характер. Достоверные изменения фотоиндуцированной генерации NO наблюдались на 25 мин ФД воздействия относительно контроля. Флуоресценции DAF-2DA на 25 мин уменьшалась в 1,7 раза ($p < 0.05$) (Рис. 22 г).

В экспериментах с SMT и комбинированных опытах SMT+Prostratin наблюдалась медленная положительная тенденция к увеличению продукции NO, хотя она не выходила на уровень с контрольными препаратами.

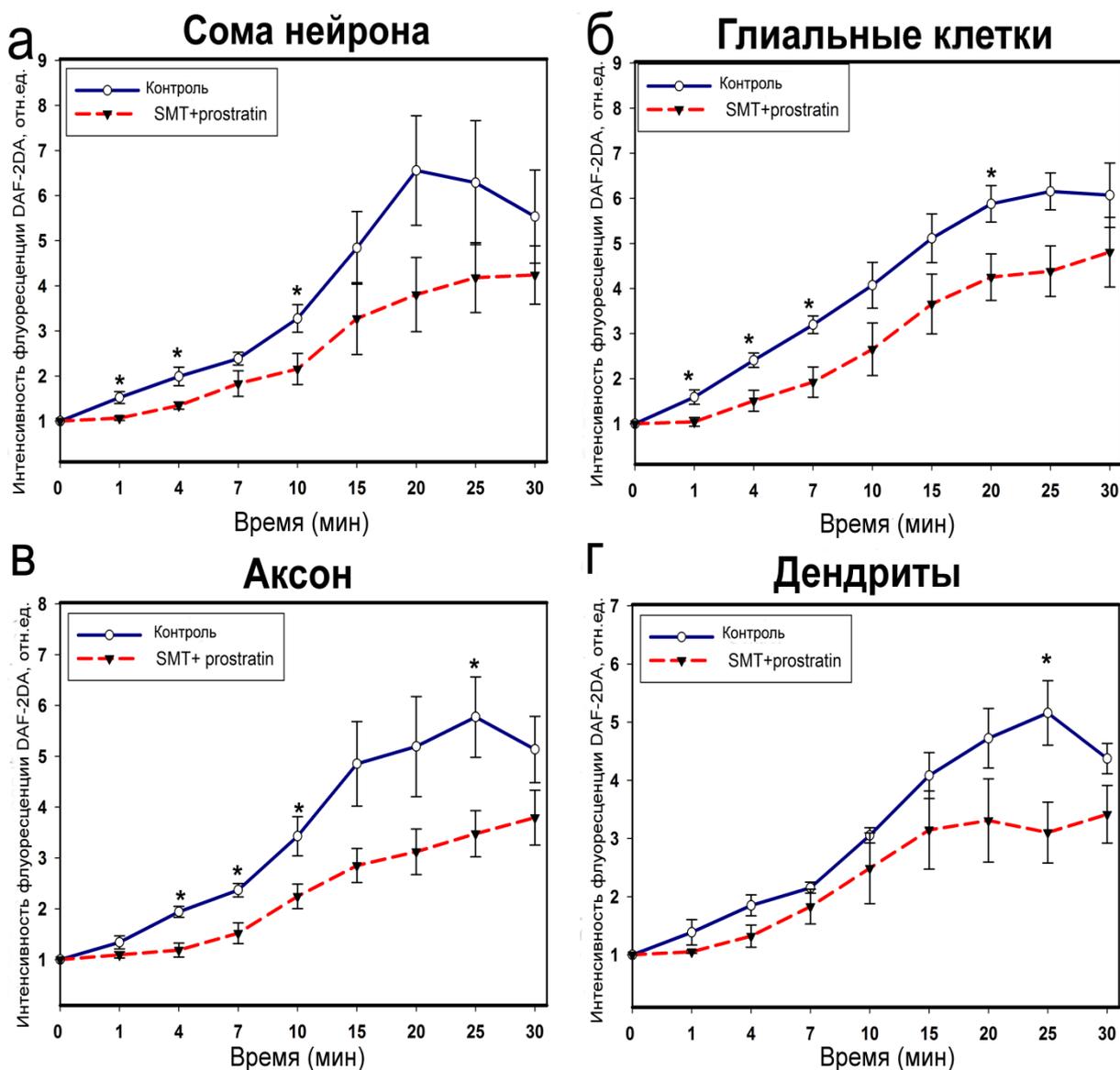


Рисунок 22. Динамика генерации NO под действием селективного ингибитора iNOS SMT 100 мкМ и активатора ядерного фактора-кВ Prostratin 10 мкМ во время ФД-воздействия с окраской NO-чувствительным флуоресцентным зондом DAF-2DA в различных областях изолированного PPP. Пунктирная линия с треугольниками отражает динамику генерации NO в опытных препаратах, сплошная линия с кружками – в контрольных препаратах. Динамика средней флуоресценции: а – тело нейрона, б – глиальные клетки, в – аксон, г – дендриты: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. $n = 5$.

3.8. Динамика генерации NO под действием ингибитора и активатора растворимой гуанилатциклазы во время ФДТ

Исследование влияния гуанилатциклазы на продукцию NO в нейронах и глиальных клетках рецептора растяжения рака при фотодинамическом воздействии проводилось с помощью модуляторов гуанилатциклазы, активатора A350619 и ингибитора ODQ.

Ингибирование гуанилатциклазы ODQ приводило к уменьшению продукции NO (Рис.23). Динамика флуоресценции DAF2-DA под действием данного ингибитора имеет медленный рост на протяжении всего времени облучения и похожа на динамику флуоресценции препаратов в условиях инактивации NF-kB Parthenolide. Максимальное достоверное снижение под действием ODQ в нейрональной соме зафиксировано на 15 минуте фотодинамического воздействия и снижено относительно контрольных образцов в 1,5 раза ($p < 0.05$) относительно контроля (Рис. 23 а).

В глиальных клетках уровень генерации NO достоверно отличается от контрольных препаратов на 15 минуте и был снижен в 1,46 раза ($p < 0.05$) (Рис. 23 б). В аксоне достоверное уменьшение флуоресценции под действием ODQ обнаружено с 7 по 20 минуту фотодинамического воздействия, при этом максимальное уменьшение в 1,69 раза ($p < 0.05$) приходится на 15 минуту (Рис. 23 в). В дендритных окончаниях статистически достоверных отличий флуоресценции препаратов с ODQ от контрольных обнаружено не было (Рис. 23 г).

Продукция NO под действием A350619 в теле и аксоне нейрона, а также в глиальных клетках не отличалась от контрольных образцов (Рис. 24). Только в дендритных окончаниях достоверные отличия уменьшения флуоресценции наблюдаются на 4 и 7 минутах после облучения (Рис. 24 г).

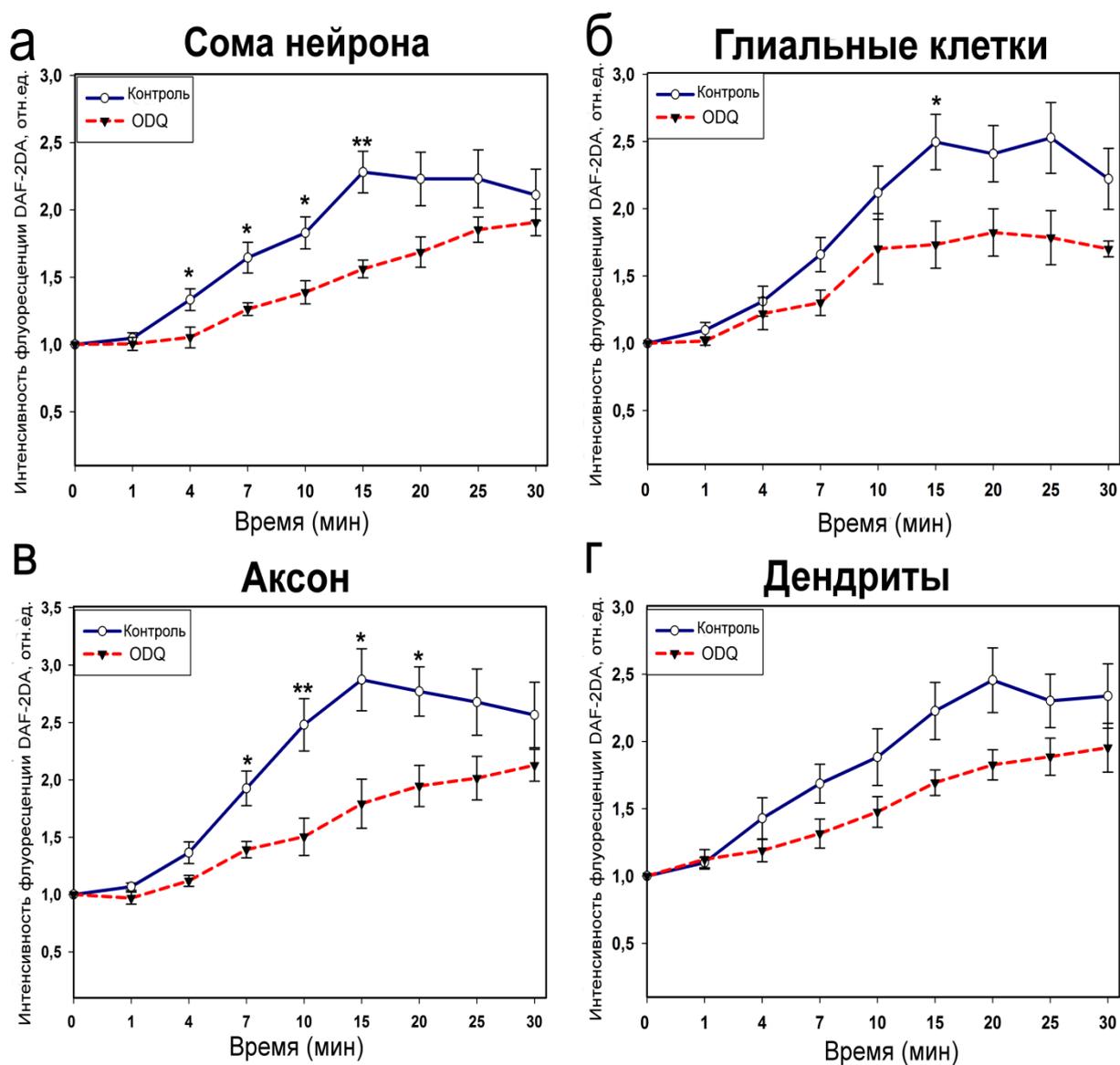


Рисунок 23. Динамика генерации NO под действием ингибитора гуанилатциклазы ODQ 10 мкМ во время ФД-воздействия с окраской NO-чувствительным флуоресцентным зондом DAF-2DA в различных областях изолированного PPP. Пунктирная линия с треугольниками отражает динамику генерации NO в опытных препаратах, сплошная линия с кружками – в контрольных препаратах. Динамика средней флуоресценции: а – тело нейрона, б – глиальные клетки, в – аксон, г – дендриты: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. $n=6$.

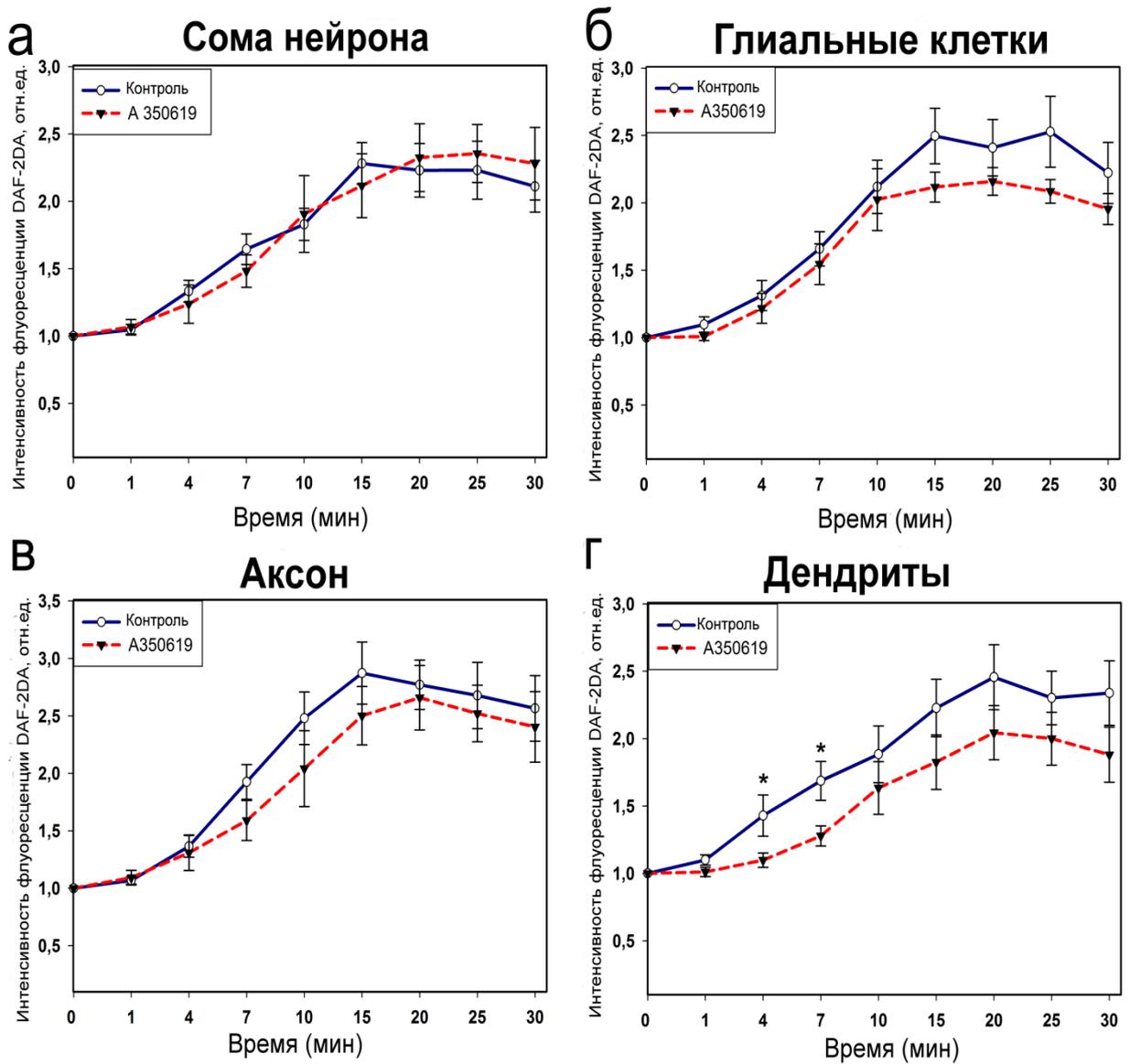


Рисунок 24. Динамика генерации NO под действием активатора гуанилатциклазы A350619 1 мкМ во время ФД-воздействия с окраской NO-чувствительным флуоресцентным зондом DAF-2DA в различных областях изолированного PPP. Пунктирная линия с треугольниками отражает динамику генерации NO в опытных препаратах, сплошная линия с кружками – в контрольных препаратах. Динамика средней флуоресценции: а – тело нейрона, б – глиальные клетки, в – аксон, г – дендриты: * $p < 0.05$. $n = 6$.

3.9. Развитие апоптоза нейронов и глиальных клеток в дорзальных ганглиях крысы после перерезки седалищного нерва под действием донора NO и ингибитора iNOS

В контралатеральных ганглиях DRG, не подвергшихся аксотомии, во всех группах животных методом TUNEL практически не выявлялись апоптотические нейроны через 1 и 7 суток после перерезки седалищного нерва. Через 24 часа после аксотомии в ипсилатеральных ганглиях контрольной и опытных групп наблюдалась равная достоверная тенденция роста апоптоза нервных клеток, которая значительно усиливалась на 7 сутки после травмы (Рис. 25). Статистически достоверных межгрупповых значений через 24 часа после аксотомии не было (Рис. 26 а).

Через 7 дней после перерезки седалищного нерва количество апоптотических нейронов в ипсилатеральных ганглиях контрольной группы и опытных групп с применением донора NO SNP и ингибитора iNOS SMT увеличилось относительно контралатеральных DRG практически в 7,5 раз с $0,4 \pm 0,2$ до $3 \pm 0,5$ отн.ед. ($p < 0,01$), 10 раз с $0,6 \pm 0,3$ до $5,8 \pm 0,7$ отн.ед. ($p < 0,001$) и 6 раз с $0,3 \pm 0,1$ до $1,8 \pm 0,3$ отн.ед. ($p < 0,001$), соответственно. Количество TUNEL-положительных нервных клеток ипсилатеральных ганглиев групп с применением SNP и iNOS относительно ипсилатерального DRG контрольной группы в первом случае увеличилось в 1,8 раза ($p < 0,01$), а во втором – уменьшилось на 1,7 раз ($p < 0,01$), соответственно (Рис. 26 а).

Глиальные клетки были больше подвержены апоптозу, чем нейроны (Рис 25). TUNEL-позитивные апоптотические глиальные клетки наблюдались как в контрольном контралатеральном, так и в подопытном аксотомированном ганглии в большем количестве, чем нейроны. Через 24 часа после аксотомии апоптоз глии в ипсилатеральном DRG контрольной и экспериментальной с использованием SNP групп увеличивался относительно контралатеральных DRG на 33% с 12 ± 1 до 16 ± 1 отн.ед. ($p < 0,05$) и 62% с $13 \pm 1,4$ до 21 ± 3 отн.ед. ($p < 0,01$), соответственно (Рис. 26 б).

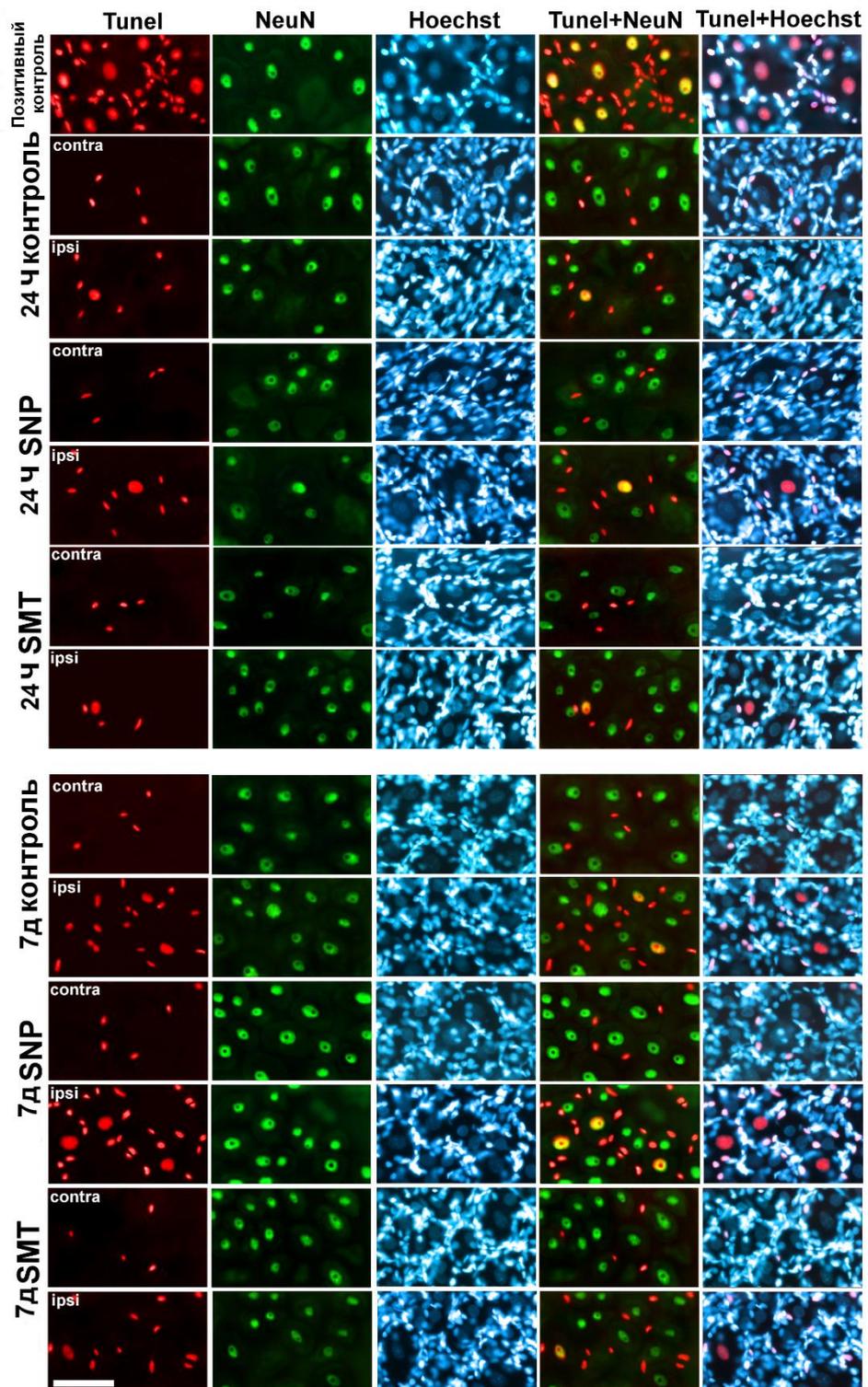


Рисунок 25. Флуоресцентная микроскопия апоптотических клеток, окрашенных TUNEL в срезах DRG контрольной группы, которым вводили физиологический раствор, и экспериментальных групп животных, которым вводили донор NO SNP и ингибитор iNOS SMT, через 24 часа и 7 суток после аксотомии, а также срез DRG в присутствии нуклеазы бензоназа (позитивный

контроль). Масштабный отрезок 50 мкм. Ipsi – аксотомированный ипсилатеральный ганглий, contra – контралатеральный контрольный ганглий. TUNEL – ядерный маркер апоптоза клеток (красная флуоресценция), NeuN – маркер ядер нейронов (зеленая флуоресценция); TUNEL +NeuN и TUNEL +Hoechst – наложение. Hoechst – флуоресценция Hoechst 33342, который визуализирует ядра всех клеток, нейронов и глии.

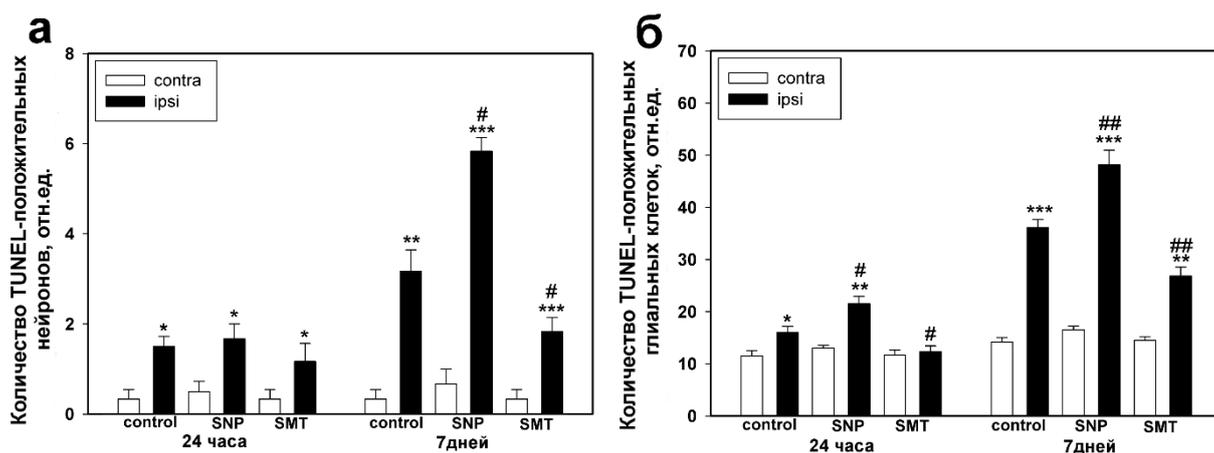


Рисунок 26. Количество TUNEL-положительных клеток в контралатеральном и ипсилатеральном DRG контрольной группы, которым вводили физиологический раствор, и экспериментальных групп животных, которым вводили донор NO SNP и ингибитор iNOS SMT, после перерезки седалищного нерва по сравнению с симметричными контралатеральными ганглиями. (а) - Количество TUNEL-положительных нейронов. (б) - Количество TUNEL-положительных глиальных клеток. $n = 6$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ - относительно контралатерального ганглия внутри одного животного; ### $p < 0,01$; # $p < 0,05$ - относительно ипсилатерального ганглия контрольной группы.

Использование ингибитора iNOS приводило к уменьшению роста апоптоза глиальных клеток в аксотомированном DRG по сравнению с контралатеральным и было достоверно ниже относительно ипсилатерального DRG контрольной группы на 25% ($p < 0,05$). Достоверные значения были получены и при межгрупповом сравнении апоптоза глиальных клеток ипсилатерального DRG групп с использованием SNP и SMT относительно ипсилатерального DRG

контрольных животных и составило увеличение на 30% ($p < 0,05$) и уменьшение на 25% ($p < 0,05$), соответственно (Рис. 26 б).

Через 7 суток после перерезки седалищного нерва наблюдался значительный рост TUNEL–позитивных апоптотических глиальных клеток в ипсилатеральных DRG всех групп животных. Так апоптоз глии в ипсилатеральном DRG контрольной и экспериментальных с использованием SNP и SMT групп увеличивался относительно контралатеральных DRG в 2,6 раза с 14 ± 1 до 36 ± 2 отн.ед. ($p < 0,001$), в 3 раза с 16 ± 2 до 48 ± 3 отн.ед. ($p < 0,001$) и в 1,9 раза с 14 ± 2 до 27 ± 3 отн.ед. ($p < 0,01$), соответственно. Апоптоз глиальных клеток ипсилатерального DRG групп с использованием SNP и SMT относительно ипсилатерального DRG контрольных животных увеличивался на 33% ($p < 0,01$) и уменьшался на 25% ($p < 0,01$), соответственно (Рис. 26 б).

3.10. Локализация и экспрессия p53 в механорецепторных нейронах и глиальных клетках при аксотомии

Иммунофлуоресцентное исследование показало, что в контрольных препаратах МРН, в которых не был поврежден аксон и сохранялась связь с брюшной нервной цепочкой, p53 локализовался главным образом в ядрышке и в узком, шириной 2-4 мкм, цитоплазматическом кольце вокруг ядра. Иммунофлуоресценция p53 в кариоплазме нейронов и в ядрах глиальных клеток, где ядрышки не наблюдались, была заметно ниже. Иммунофлуоресценция p53 в перикарионе за ярким цитоплазматическим кольцом была низкой: она почти отсутствовала у 2/3 нейронов. Также p53 не обнаруживался в аксонах (Рис. 27 а)

Через 4-8 ч после аксотомии иммунофлуоресценция p53 увеличивалась в нейрональной и глиальной кариоплазме, в перикарионе и перинуклеарном кольце МРН по сравнению с интактными препаратами (Рис. 27 б, в). В соме МРН p53-положительная флуоресцентная область наблюдалась в основном в перикарионе, который богат митохондриями и другими внутриклеточными органеллами (Fedorenko and Uzdensky, 2009).

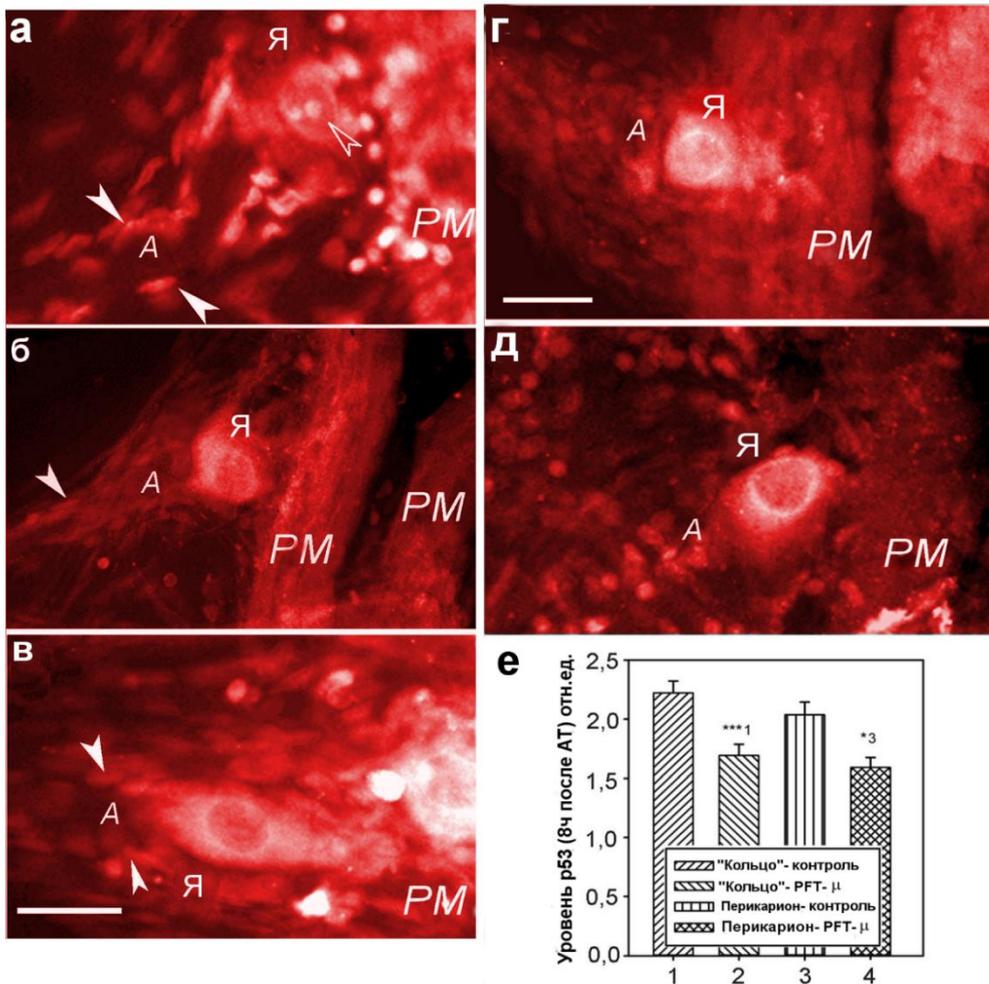


Рисунок 27. Иммунофлуоресцентная микроскопия: локализация p53 в изолированном рецепторе растяжения рака: а – интактный рецептор растяжения рака без аксотомии, б - рецептор растяжения рака через 4 часа после аксотомии, в-рецептор растяжения рака через 8 часов после аксотомии, г - рецептор растяжения рака через 4 часа после аксотомии в присутствии пифитрина (PFT-μ, 15 μM), д – рецептор растяжения рака через 8 часа после аксотомии в присутствии пифитрина (PFT-μ, 15 μM), е – влияние PFT-μ на средний уровень p53 в цитоплазматическом кольце вокруг ядра и в цитоплазме перикариона. n =10. * p <0,05; *** p <0,001. Условные обозначения: А - аксон; Я - ядро механорецепторного нейрона; РМ - рецепторная мышца. Масштабный отрезок - 20 мкм.

Иммунофлуоресценция p53 ядрышка МРН через 4-8 часов после аксотомии была менее интенсивной и наблюдалась редко, лишь в 1/3 контрольных препаратов (Рис. 27 б, в). Иммунофлуоресценция p53 в перикарионе контрольных

интактных нейронов изначально были ниже, чем в ядре и в кольце (Рис. 27 а). Однако через 4–8 ч после аксотомии она стала достоверно выше ($p < 0,05$; Рис. 28 а), что было показано с использованием парных статистических сравнений для каждого МРН.

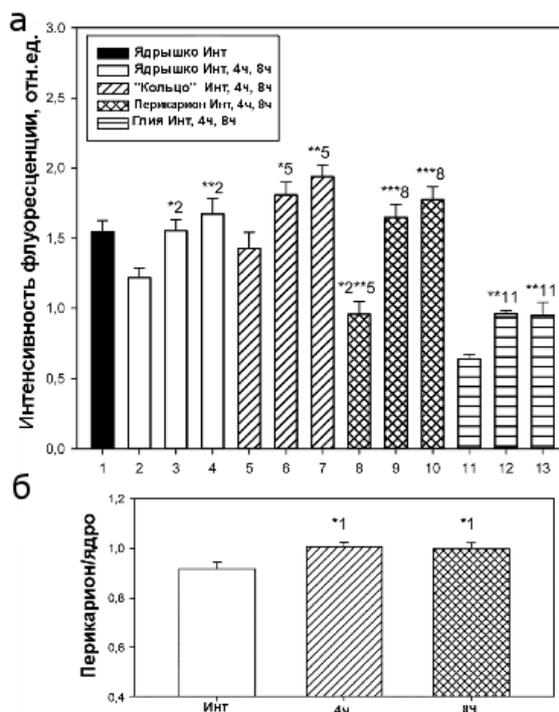


Рисунок 28. (а) Динамика иммунофлуоресценции p53 в разных частях аксотомизированного рецептора растяжения рака: ядре нейрона, перинуклеарном кольце, цитоплазме перикариона и ядре глиальных клеток, окружающих проксимальный сегмент аксона до и через 4 или 8 ч после аксотомии. (б) Соотношение перикарион/ядро. $n = 8$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Поскольку пифитрин- μ может ингибировать связывание p53 с митохондриями (Strom et al. 2006; Nijboer et al. 2011), мы изучили его влияние на локализацию p53 в MRN через 4 или 8 ч после аксотомии (Рис. 27 г, д). Распределение p53 было аналогичным без пифитрина- μ : иммунофлуоресценция p53 наблюдалась в цитоплазматическом кольце вокруг ядра и в перикарионе. Ядро нейронов не флуоресцировало. Однако площадь локализации p53 в перикарионе и общая иммунофлуоресценция p53 в этой области была ниже, чем в отсутствие пифитрина- μ (Рис 27. е). Это показало, что пифитрин- μ частично ингибировал связывание p53 с нейрональными митохондриями.

3.11. Экспрессия и локализация p53 в нейронах дорзальных ганглиев крысы под действием донора NO и ингибитора индуцибельной NO-синтазы

Иммунофлуоресцентная микроскопия показала, что p53 локализуется в нейронах DRG и глиальных клетках, чья ядра выявлялись флуорохромом Hoechst 33342 (Рис. 29). Крупные нейроны, экспрессирующие p53, окружены глиальными клетками. Уровень проапоптотического белка p53 изменялся по-разному в ядрах и цитоплазме нейронов поврежденного ипсилатерального DRG относительно контралатерального DRG, не подвергшегося перерезке седалищного нерва. Так в контрольной группе крыс, которым вводили физиологический раствор, через 24 часа после травмы происходило достоверное изменение, выраженное в перераспределении p53 между ядром и цитоплазмой, которое наблюдалось в нейронах аксотомированных ганглиев. Однако через 4 часа после аксотомии уровень p53 как в ядрах, так и в цитоплазме нейронов поврежденного DRG не отличался от контрольных образцов: в ипсилатеральном DRG иммунофлуоресценция p53 главным образом выявлялась в нуклеоплазме нейронов, по сравнению с цитоплазмой она была выше в 2 раза, аналогичное соотношение сохранялось и в контралатеральном DRG ($p < 0,001$). Через 24 часа после перерезки седалищного нерва иммунофлуоресценция p53 в ядрах аксотомированных нейронов уменьшалась в 1,6 раза ($* p < 0,05$) и увеличилась в их цитоплазме практически в 2 раза ($p < 0,01$) относительно контрольных значений неповрежденных нервных клеток DRG с контралатеральной стороны этого же животного (Рис. 30 а). О транслокации p53 из ядра в цитоплазму через 24 часа после аксотомии в нейронах ипсилатерального DRG убедительно свидетельствует уменьшение коэффициента M1, характеризующего колокализацию p53 с маркером нейрональных ядер NeuN, на 40% относительно контралатерального ганглия (Рис. 30 б).

В экспериментах с использованием донора оксида азота SNP и ингибитора индуцибельной NO-синтазы SMT флуоресценция p53 в контралатеральных DRG была аналогичной, как в контрольной группе животных, но отличалась в

поврежденных ганглиях. Так в 4- и 24-часовых аксотомированных нейроглиальных препаратах, полученных из крыс, которым вводили SNP, уровень p53 увеличивался относительно значений контралатерального ганглия этого же животного как в нейрональных ядрах на 23% ($p < 0,01$) и 56% ($p < 0,01$), так и в цитоплазме на 27% ($p < 0,01$) и 98% ($p < 0,01$), соответственно. В ядерной области абсолютная флуоресценция p53 была выше, чем в цитоплазме, через 4 и 24 часа после аксотомии в нейронах ипсилатеральных DRG. При сравнении флуоресценция p53 через 4 и 24 часа после травмы в ядрах и цитоплазме аксотомированных нейронов с SNP относительно значений ипсилатеральных ганглиев группы животных, которым вводили физиологический раствор, были получены следующие данные: увеличение в ядрах на 29% ($p < 0,01$) и практически в 3 раза ($p < 0,001$), соответственно, а в цитоплазме достоверное отличие было на 4 часах и составило прирост в 40% (Рис. 30 а). Наблюдалась выраженная картина NO-зависимого депонирования p53 в ядрах аксотомированных нейронов. Подтверждением этому служит и коэффициент M1, на графике которого представлен достоверный рост значений колокализации p53 с NeuN в аксотомированных относительно неповрежденных DRG экспериментальной группы с SNP на 33% ($p < 0,05$) и 63% ($p < 0,05$) через 4 и 24 часа после аксотомии, соответственно. Также проведенный сравнительный анализ коэффициента M1 ипсилатерального DRG с SNP относительно ипсилатерального DRG контрольной группы показал увеличение на 50% ($p < 0,05$) и практически в 3 раза ($p < 0,001$) через 4 и 24 часа после аксотомии, соответственно (Рис. 30 б).

Иная динамика наблюдалась в ипсилатеральных DRG экспериментальной группы с SMT. Она была схожей с динамикой в контрольной группе, в аксотомированных нейронах которой наблюдалось перераспределение p53 между ядром и цитоплазмой. Но здесь флуоресценция p53 была менее интенсивной. Так в нейронах ипсилатерального DRG с SMT относительно контралатерального DRG этого же животного уменьшение уровня p53 составило в ядре 20% ($p < 0,05$) и 55% ($p < 0,01$) через 4 и 24 часа после аксотомии.

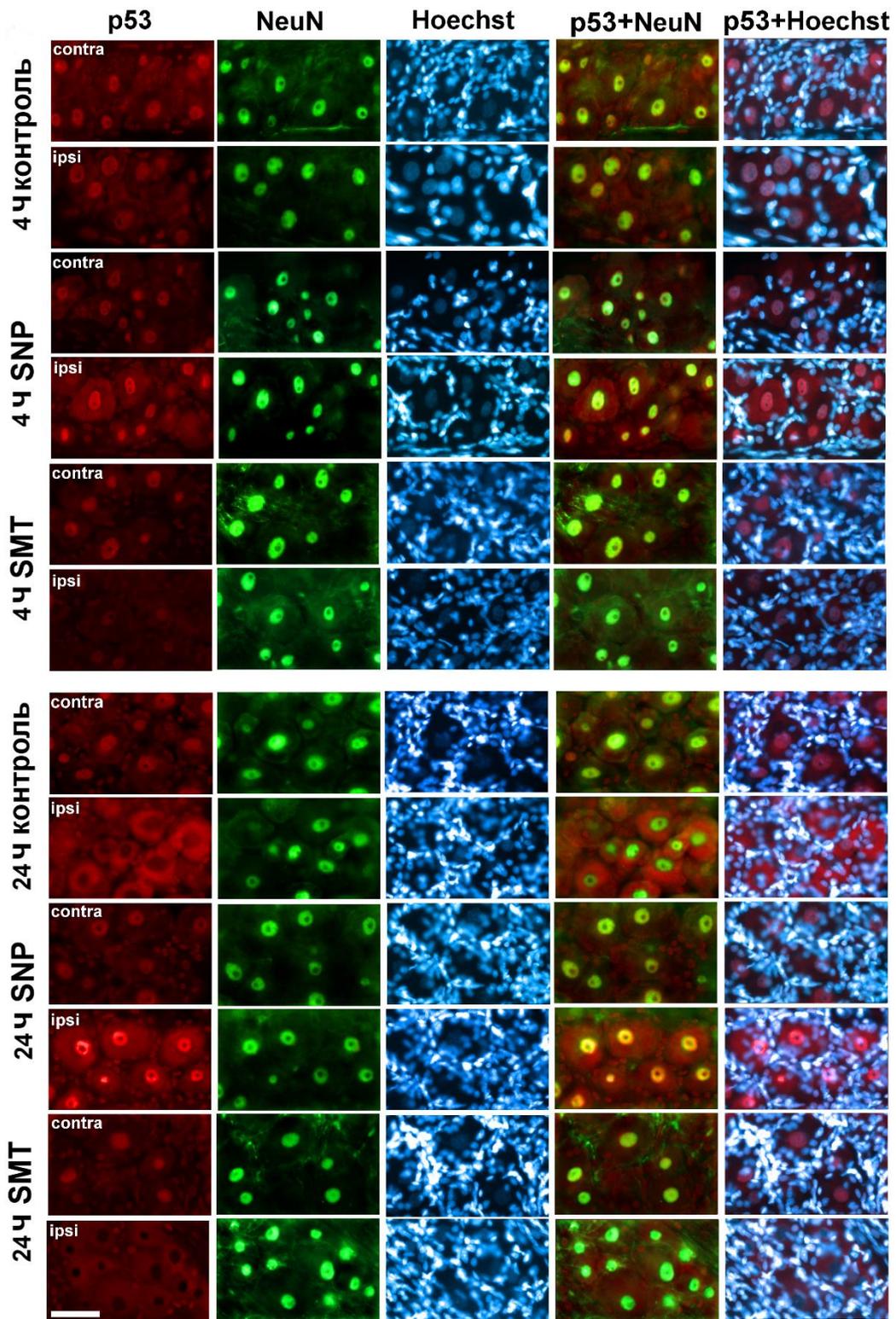


Рисунок 29. Иммунофлуоресцентная микроскопия: экспрессия p53 (красная флуоресценция) в нейронах DRG крыс контрольной группы, которым вводили физиологический раствор, и экспериментальных групп животных, которым вводили донор NO SNP и ингибитор iNOS SMT, через 4 и 24 часа после перерезки седалищного нерва. Масштабный отрезок 50 мкм. Ipsi – аксотомированный

ипсилатеральный ганглий, contra – контралатеральный контрольный ганглий. NeuN – маркер ядер нейронов (зеленая флуоресценция); NeuN+p53 и Hoeschst+p53 – наложение. Hoeschst – флуоресценция Hoeschst 33342, который визуализирует ядра всех клеток, нейронов и глии.

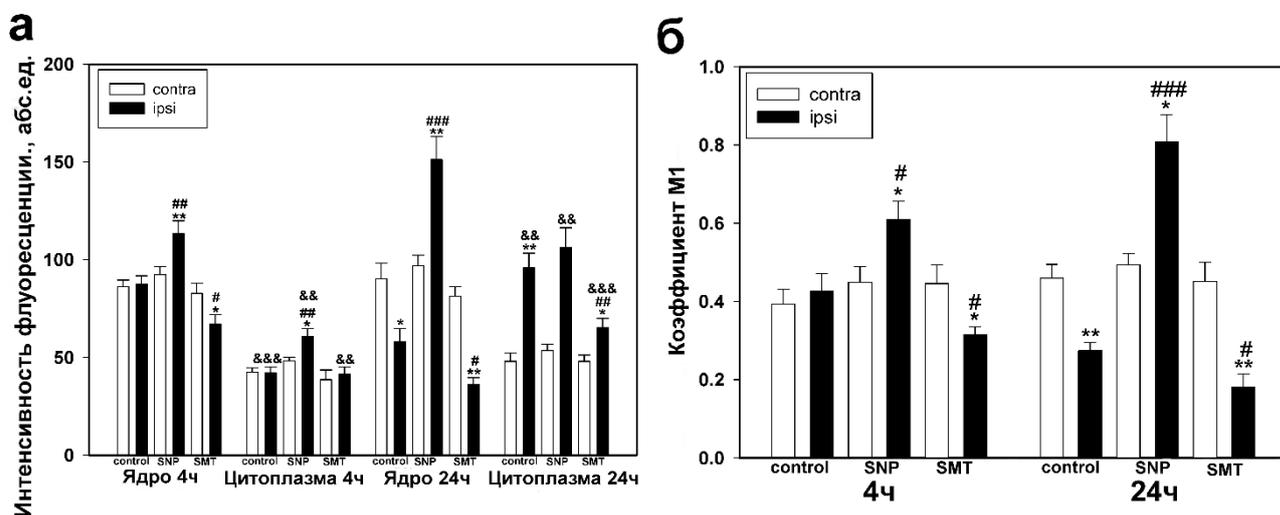


Рисунок 30. (а) Зависимость средней интенсивности флуоресценции p53 в ядрах и цитоплазме нейронов ипсилатерального и контрольного контралатерального DRG через 4 и 24 часа после перерезки седалищного нерва. (б) коэффициент M1 колокализации p53 и маркера ядер нейронов NeuN в контралатеральном и ипсилатеральном DRG крысы через 4 и 24 часа после перерезки седалищного нерва. Ipsi – аксотомированный ипсилатеральный ганглий, contra – контралатеральный контрольный ганглий. n=6. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 – ипсилатеральный DRG относительно контралатерального DRG одного животного; #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001- ипсилатеральный DRG относительно ипсилатерального DRG контрольной группы; &p<0.05, &&p<0.01, &&&p<0.001- ипсилатеральный DRG относительно ипсилатерального DRG одного животного.

В цитоплазме аксотомированных нейронов через 24 часа после аксотомии наблюдался достоверный рост уровня p53 относительно контралатерального ганглия, но по сравнению с ипсилатеральным DRG контрольной группы он был значительно менее выраженным, на 37% меньше (p<0,01). Флуоресценция p53 в кариоплазме нейронов ипсилатерального DRG группы с SMT уменьшалась

относительно ипсилатерального DRG контрольной группы на 23% ($p < 0,05$) и 37% ($p < 0,05$) через 4 и 24 часа после аксотомии, соответственно (Рис. 30 а). Эти данные подтверждает коэффициент M1, на графике которого представлено достоверное уменьшение значений колокализации p53 с NeuN в аксотомированных относительно неповрежденных DRG экспериментальной группы с SMT на 29% ($p < 0,05$) и 60% ($p < 0,01$) через 4 и 24 часа после аксотомии, соответственно. Также проведенный сравнительный анализ коэффициента M1 ипсилатерального DRG группы с SMT относительно ипсилатерального DRG контрольной группы показал увеличение на 26% ($p < 0,05$) и 33% ($p < 0,05$) через 4 и 24 часа после аксотомии, соответственно (Рис. 30 б).

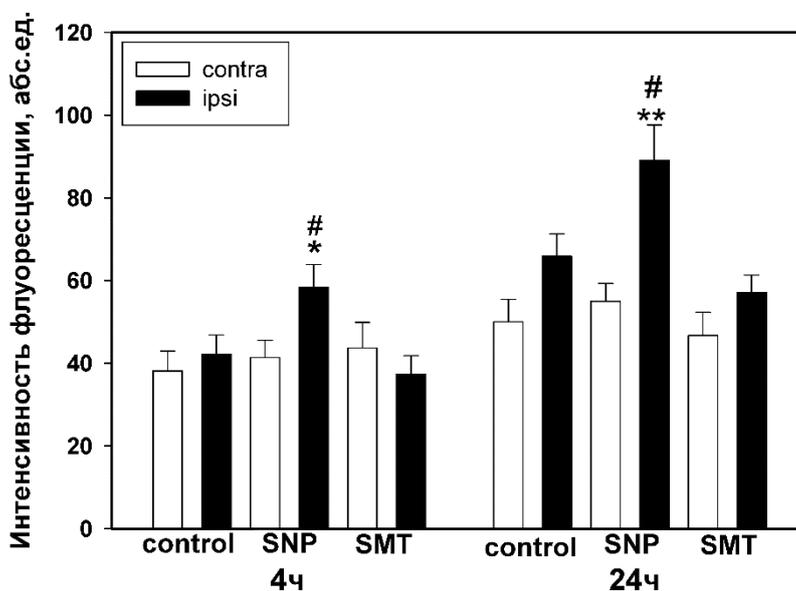


Рисунок 31. Зависимость средней интенсивности флуоресценции p53 в ядрах глиальных клеток DRG через 4 и 24 часа после перерезки седалищного нерва. Ipsi – аксотомированный ипсилатеральный ганглий, contra – контралатеральный контрольный ганглий. $n=6$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ – ипсилатеральный DRG относительно контралатерального DRG одного животного; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ – ипсилатеральный DRG относительно ипсилатерального DRG контрольной группы.

В глиальных клетках p53 главным образом локализовался в их ядрах (Рис. 29). Введение NO повышало экспрессию p53 в глиальных клетках

аксотомированного ганглия, как относительно ипсилатерального DRG этого животного, так и контрольной группы (Рис. 31).

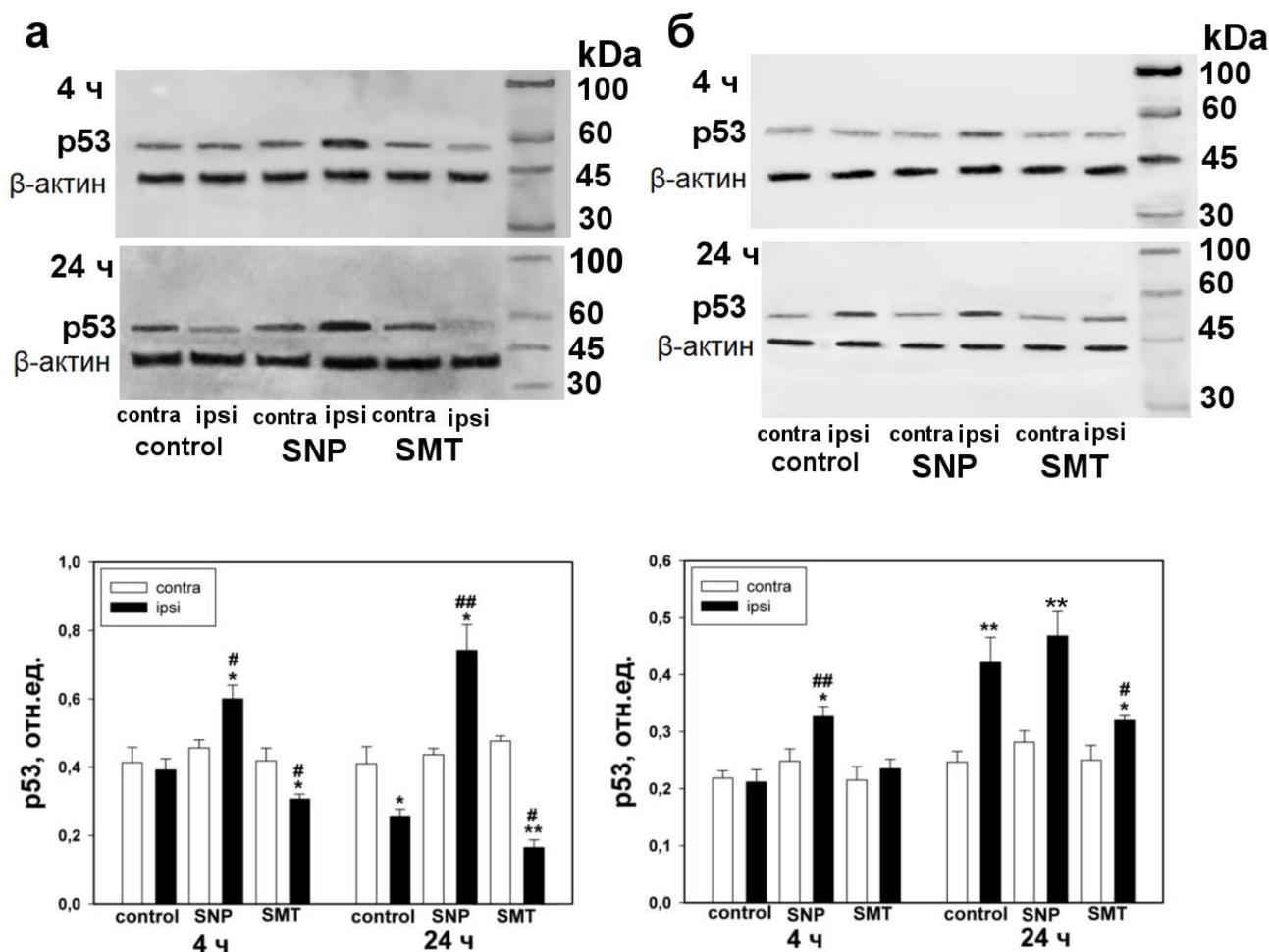


Рисунок 32. Вестерн-блот анализ. Влияние NO-донора SNP и селективного ингибитора iNOS SMT на экспрессию белка p53 в ипсилатеральном DRG и контралатеральном DRG через разное время после аксотомии. (а) – ядерная фракция. (б) – цитоплазматическая фракция. Достоверность отличий от контроля контралатерального DRG одного животного: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; достоверность отличий от ипсилатерального DRG контрольной группы: # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$. $n=6$.

Проведенный вестерн-блот анализ подтверждает данные иммунофлуоресцентной микроскопии. Так в ядерной фракции уровень p53 увеличивается через 4 часа и еще больше через 24 часа после аксотомии в ипсилатеральном ганглии при введении SNP относительно контралатерального DRG экспериментальной группы и ипсилатерального ганглия контрольной

группы. Противоположную динамику мы видим при использовании селективного ингибитора iNOS SMT. В контрольной группе через 24 часа после аксотомии уровень p53 в ядерной фракции в аксотомированном DRG практически вдвое уменьшается относительно противоположного неповрежденного ганглия (Рис. 32 а).

В цитоплазматической фракции уровень p53 увеличивается при использовании SNP через 4 часа и еще больше через 24 часа после аксотомии в ипсилатеральном ганглии при введении SNP относительно контралатерального DRG экспериментальной группы и ипсилатерального ганглия контрольной группы. При использовании SMT уровень p53 через 24 часа после аксотомии уменьшается относительно аксотомированного DRG контрольной группы. Практически в два раза уровень p53 цитоплазматической фракции увеличивается в аксотомированном DRG относительно противоположного неповрежденного DRG (Рис. 32 б).

3.12. Экспрессия и локализация E2F1 в нейронах дорзальных ганглиев крыс

Иммунофлуоресцентная микроскопия показала, что E2F1 локализовался исключительно в нейронах DRG и практически отсутствовал в глиальных клетках (Рис. 33). Крупные нейроны DRG, экспрессирующие E2F1, окружены множеством глиальных клеток, чьи ядра выявляются флуорохромом Hoechst 33342 (Рис. 33).

Через 1 час после перерезки седалищного нерва E2F1 практически отсутствовал в DRG. Но через 4 часа после аксотомии средний уровень E2F1 аксотомированных ганглиев значительно повышался относительно одночасовой группы как в цитоплазме нейронов (в 2,5 раза, $p < 0,001$), так и в особенности в их ядрах (почти в 5 раз, $p < 0,05$), где флуоресценция E2F1 была максимальной (Рис. 34 а). О повышенной локализации E2F1 в кариоплазме нейронов DRG свидетельствует увеличение коэффициента Мандерса (Рис. 34 б).

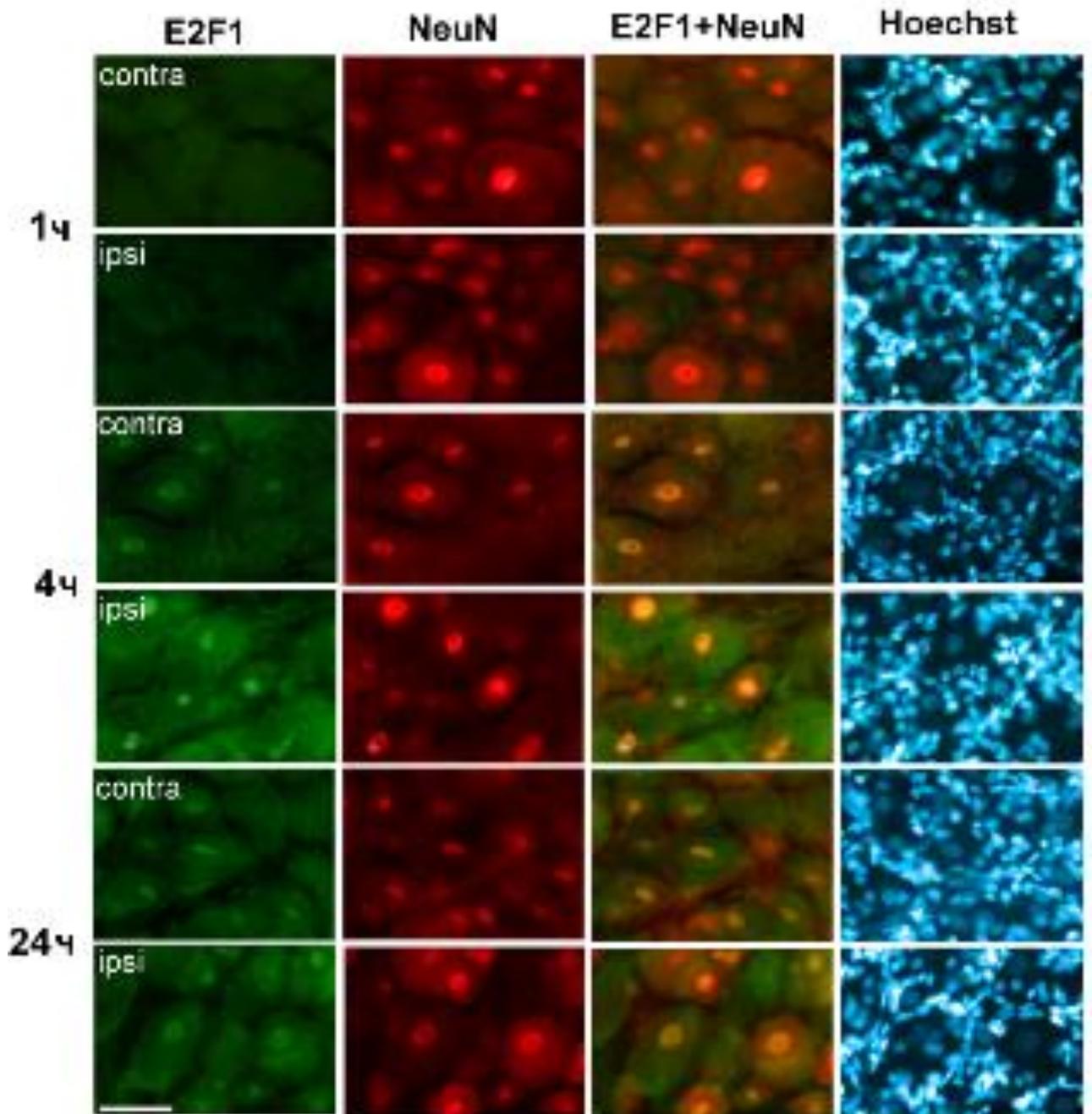


Рисунок 33. Флуоресцентная микроскопия: экспрессия E2F1 (зеленая флуоресценция) в нейронах DRG крысы через 1, 4 и 24 часа после перерезки седалищного нерва. Масштабный отрезок 50 мкм. Ipsi – аксотомированный ипсилатеральный ганглий, contra – контралатеральный контрольный ганглий. NeuN – маркер ядер нейронов; E2F1+NeuN – наложение. Hoechst – флуоресценция Hoechst 33342, который визуализирует ядра всех клеток, нейронов и глии.

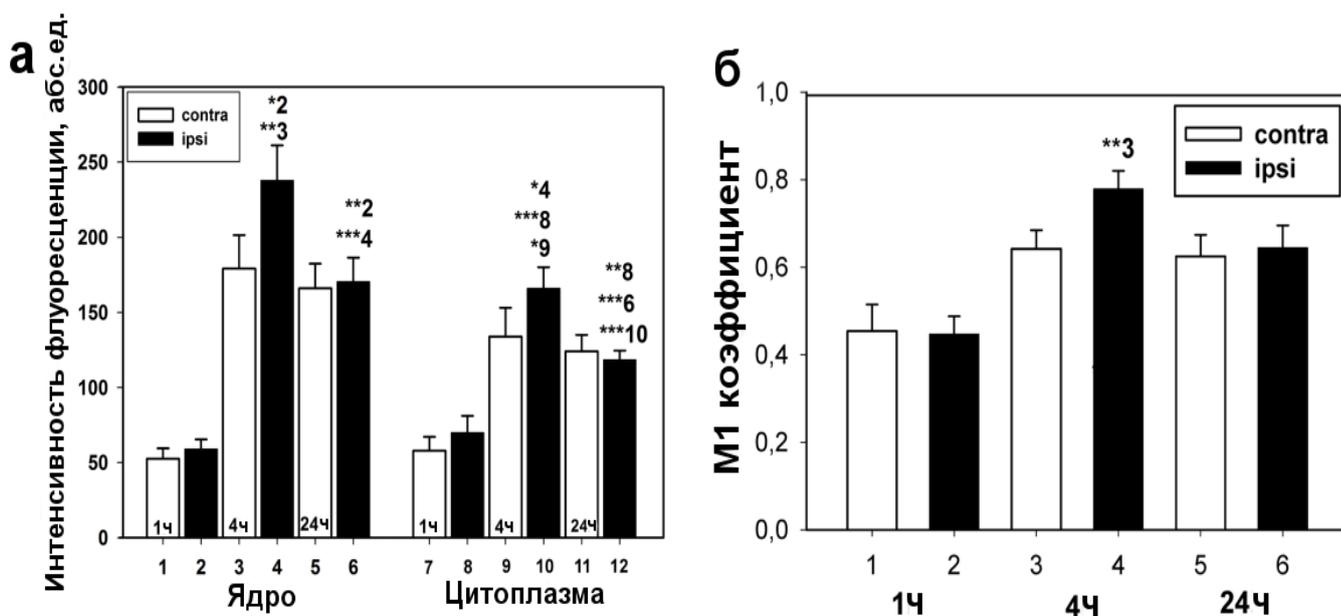


Рисунок 34. (а) Зависимость средней интенсивности флуоресценции E2F1 в ядрах и цитоплазме нейронов ипсилатерального и контрольного контралатерального DRG через 1, 4 и 24 часа после перерезки седалищного нерва. (б) коэффициент M1 колокализации E2F1 и маркера ядер нейронов NeuN в контралатеральном и ипсилатеральном ганглиях DRG крысы через 1, 4 и 24 часа после перерезки седалищного нерва. Ipsi – аксотомированный ипсилатеральный ганглий, contra – контралатеральный контрольный ганглий. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. $n=6$.

Уровень E2F1 четырехчасовых аксотомированных DRG относительно контралатеральных не подвергшихся аксотомии ганглиев, увеличивался в цитоплазме нейронов на 15% ($p < 0,05$) и в ядрах на 30% ($p < 0,01$), соответственно (Рис. 34 а). Через 24 часа после перерезки седалищного нерва уровень иммунофлуоресценции E2F1 относительно контралатеральных ганглиев не изменялся, но наблюдалось снижение интенсивности флуоресценции E2F1 в ядрах и цитоплазме нейронов как аксотомированных, так и контрольных ганглиев относительно четырехчасовой группы (Рис. 34 б).

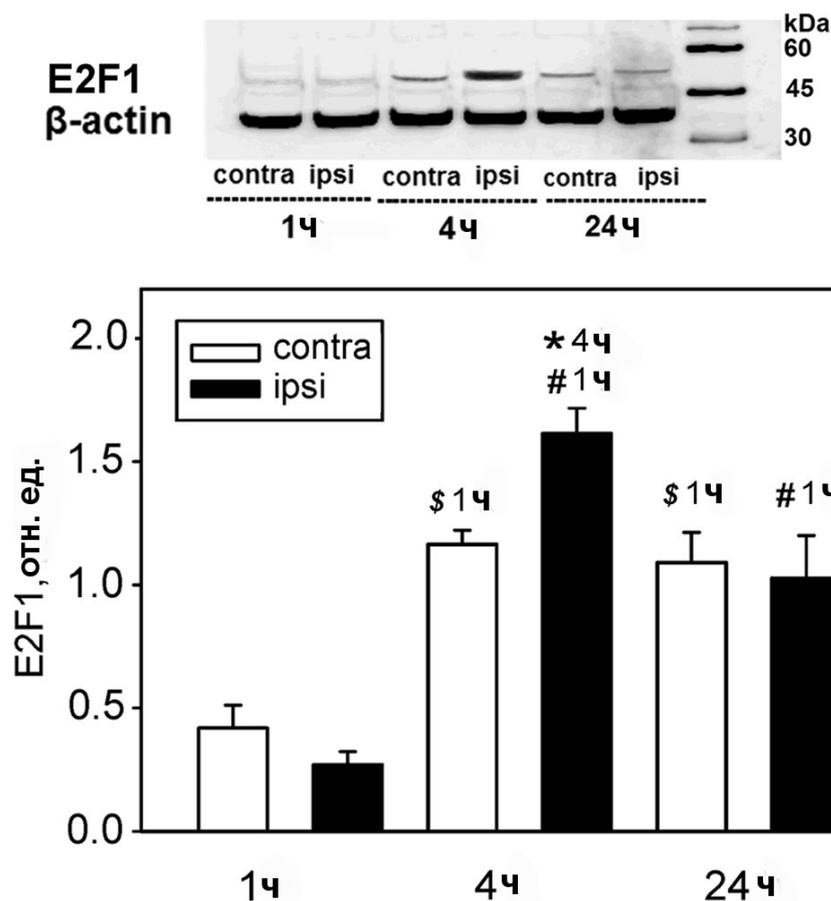


Рисунок 35. Вестерн-блот: влияние перерезки седалищного нерва на правой задней лапе крысы на экспрессию белка E2F1 в ипсилатеральном и контралатеральном DRG через разное время после аксотомии. Достоверность отличий от контроля: * $p < 0.05$; достоверность отличий от величин, определенных в разные моменты времени: # $p < 0.05$ и \$ $p < 0.05$; $n = 6$.

Данные вестерн-блота, проведенного на 4 и 5 DRG ганглиях крысы, подтверждают результаты иммунофлуоресцентной микроскопии. Так уровень белка E2F1 в аксотомированных ипсилатеральных ганглиях был достоверно выше, чем в интактных контралатеральных ганглиях через 4 часа после перерезки седалищного нерва (Рис. 35).

При этом уровень этого белка через 4 и 24 часа в аксотомированном DRG крысы был существенно выше, чем через 1 час после перерезки седалищного нерва (Рис. 35). Следовательно, гиперэкспрессия E2F1, инициируемая через 4 часа после аксотомии и поддерживаемая в течение 24 часов, вероятно, являлась необходимым звеном регуляции выживаемости и смерти клеток DRG ганглиев.

Она была, по-видимому, связана как с общим неспецифическим ухудшением состояния животного, так и с регуляцией апоптоза в аксотомированных нейронах.

3.13. Экспрессия и локализация E2F1 в механорецепторных нейронах рака.

Более детальные изменения на клеточном уровне наблюдались на изолированном рецепторе растяжения рака. На микрофотографиях ясно видно, что E2F1 локализуется только в теле МРН, но не в аксоне и дендритах и не в окружающих глиальных клетках (Рис. 36 а).

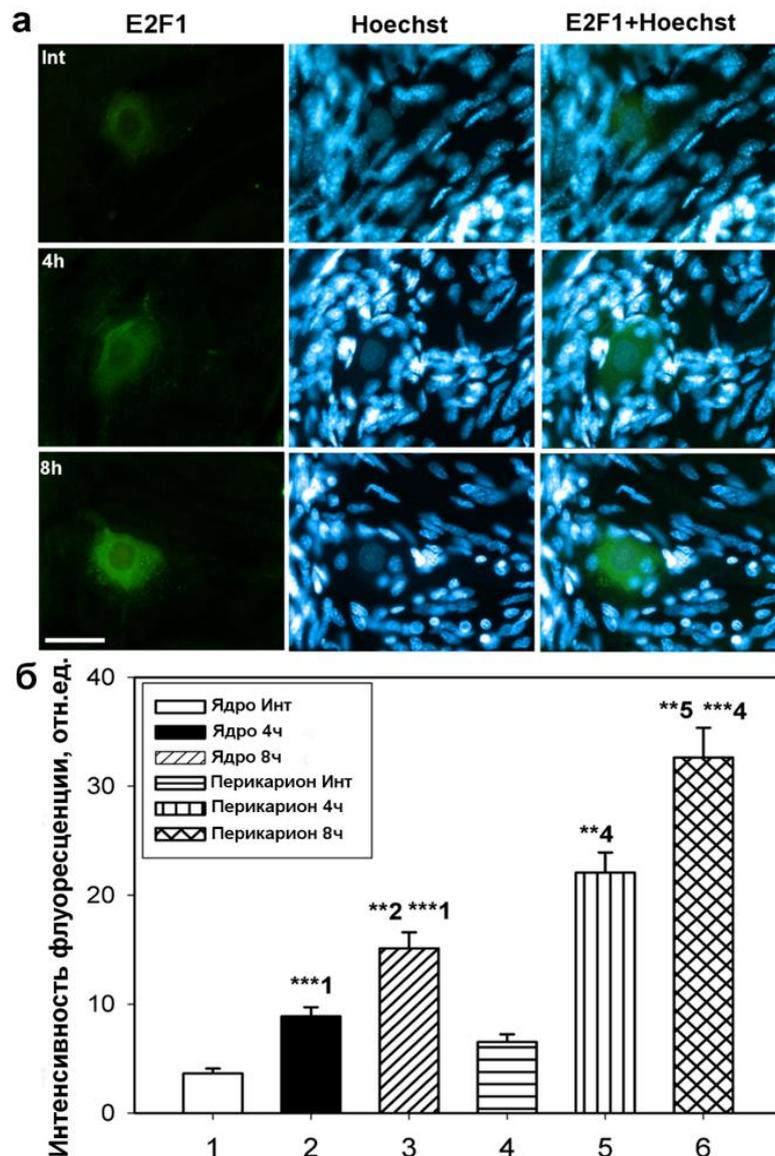


Рисунок 36. Флуоресцентная микроскопия: (а) внутриклеточное распределение E2F1 в рецепторе растяжения рака через 4 и 8 часов после аксотомии и его колокализация с маркером ядер всех клеток Hoechst33342.

Масштабный отрезок 100 мкм (б) флуоресценция E2F1 в разных компартментах рецептора растяжения рака: ядре и перикарионе интактных нейронов (Int), сохранивших связь с ганглием брюшной нервной цепочки и аксотомированных нейронов через 4 или 8 часов после перерезки аксона. $n=10$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0.001$.

В контрольных интактных МРН, у которых аксон не был поврежден и сохранял связь с соответствующим ганглием БНЦ, экспрессия E2F1 практически не наблюдалась (Рис. 36 а). Уровень E2F1 резко возрастал в перикарионе после аксотомии через 4 часа ($p < 0,01$) и еще больше через 8 часов ($p < 0,001$) (Рис. 36 б).

Интенсивность флуоресценции E2F1 увеличивалась не только перикарионе, но и в ядре, хотя и несколько слабее. Так через 4 часа после перерезки аксона в МРН уровень E2F1 по сравнению с контрольной группой увеличивался в ядре в 2 раза ($p < 0,001$), а в перикарионе почти в 3 раза ($p < 0,01$). В восьмичасовых аксотомированных МРН флуоресценция E2F1 возрастала относительно интактных нейронов в ядре в 3,4 раза ($p < 0,001$) и в цитоплазме в 4,4 раза ($p < 0,001$), а относительно нейронов, инкубированных 4 часа после аксотомии, в 1,7 ($p < 0,01$) и 1,6 ($p < 0,01$) раза, соответственно (Рис. 36 б).

3.14. Экспрессия APP в дорзальных ганглиях крысы

Иммунофлуоресцентное исследование показало, что С-APP и N-APP локализовались преимущественно в нейронах DRG, а не в глиальных клетках, многочисленные ядра которых были селективно флуорохромированы в синий цвет с помощью Hoechst33342 (Рис. 37, 39) (Crowley et al., 2016). В контрольных контролатеральных DRG ганглиях крысы С-APP локализовался в цитоплазме нейрональной сомы, где его средний уровень был достоверно выше, чем в ядрах (Рис 37).

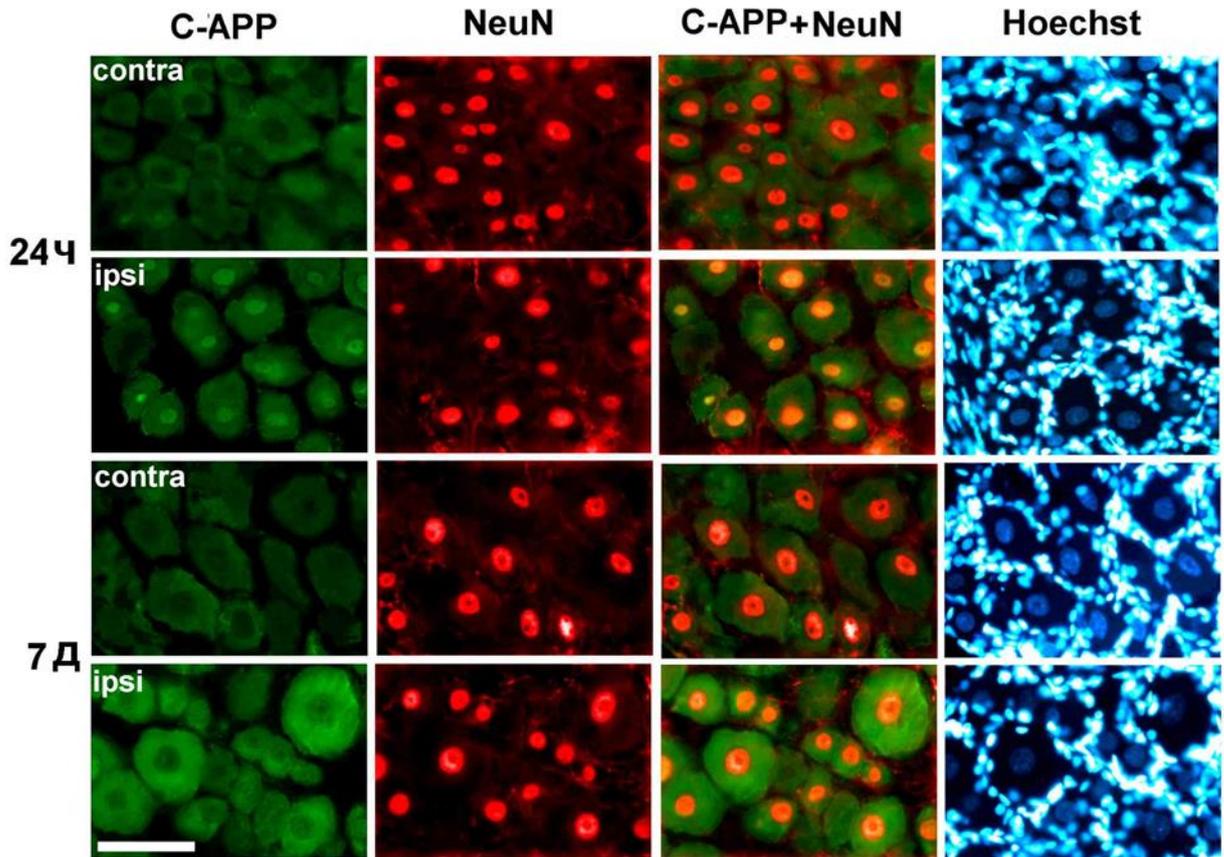


Рисунок 37. Экспрессия С-APP (зеленая флуоресценция) в нейронах DRG крысы через 24 часа и 7 дней после перерезки седалищного нерва. Ipsi – аксотомированный ипсилатеральный ганглий, contra – контралатеральный контрольный ганглий. NeuN – маркер ядер нейронов; С-APP+NeuN – наложение. Hoechst – флуоресценция Hoechst 33342, который визуализирует ядра всех клеток, нейронов и глии. Масштабный отрезок 50 мкм

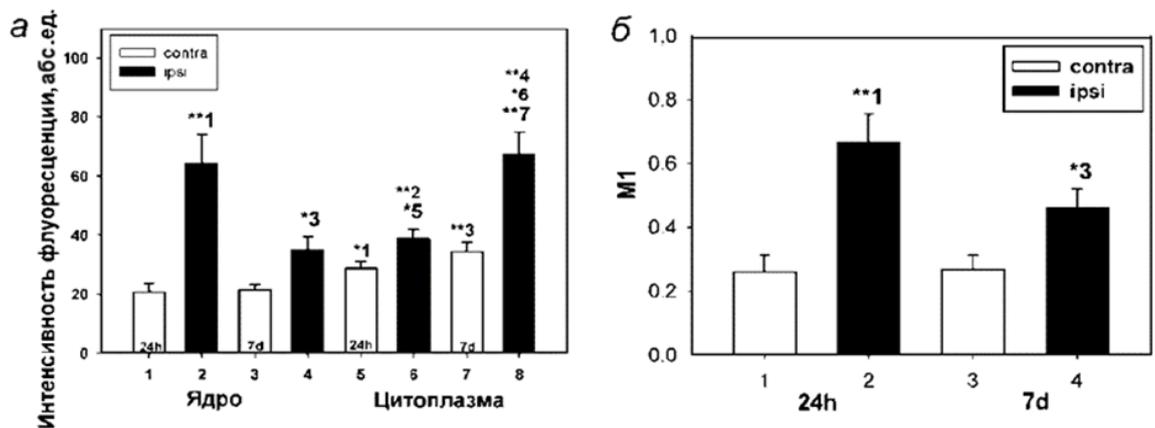


Рисунок 38. (а) Зависимость средней интенсивности флуоресценции С-APP в ядрах и цитоплазме нейронов ипсилатерального и контрольного

контралатерального DRG через 24 часа и 7 дней после перерезки седалищного нерва. (б) Коэффициент M1 колокализации C-APP и маркера ядер нейронов NeuN в контралатеральном и ипсилатеральном DRG крысы через 24 часа и 7 дней после перерезки седалищного нерва. $n=6$; $*p < 0.05$; $**p < 0.01$.

Через 24 часа и 7 суток после перерезки седалищного нерва средний уровень C-APP в аксотомированном ипсилатеральном ганглии заметно повышался по сравнению с контрольными контралатеральными ганглиями, как в ядрах (в 3 раза, $p < 0,01$ и в 1,8 раза, $p < 0,05$, соответственно), так и в цитоплазме нейронов (на 33%, $p < 0,05$ и на 88%, $p < 0,01$, соответственно) (Рис. 38 а). Интересно, что через 24 часа C-APP концентрировался в ядрах нейронов, где его уровень существенно превышает уровень в цитоплазме (Рис. 37, 38 а, б). Уровень N-APP в цитоплазме контрольных и аксотомированных нейронов был существенно выше, чем в ядрах этих клеток (Рис. 39, 40 а, б). Через 24 часа и особенно через 7 суток после перерезки седалищного нерва он еще больше увеличивался на 40% ($p < 0,05$) и 92% ($p < 0,01$), соответственно (Рис. 40 а). Однако, в отличие от C-APP, накопления N-APP в нейрональных ядрах не отмечалось (Рис. 39, 40 а, б). Так как целый белок APP не должен проникать в клеточные ядра, то этот эффект, вероятно, отражает проникновение в ядра его C-терминального фрагмента AICD, который запускает транскрипцию как самого APP и некоторых ферментов его процессинга, так и ряда проапоптотических белков. Однако через 7 суток этот эффект исчезает и C-APP практически не обнаруживается в ядрах, а накапливается в цитоплазме тел нейронов (Рис. 37). О повышенной локализации C-APP в нейрональных ядрах, особенно через 24 часа после аксотомии свидетельствует увеличение коэффициента M1, характеризующего колокализацию C-APP с маркером нейрональных ядер NeuN (Рис. 37 б). Нейроны DRG, как известно, униполярны. Их отросток разветвляется в седалищном нерве на афферентную и эфферентную ветви. Внутри ганглия отростки этих нейронов не выявляются, и нет оснований говорить о транспорте APP вдоль нейритов.

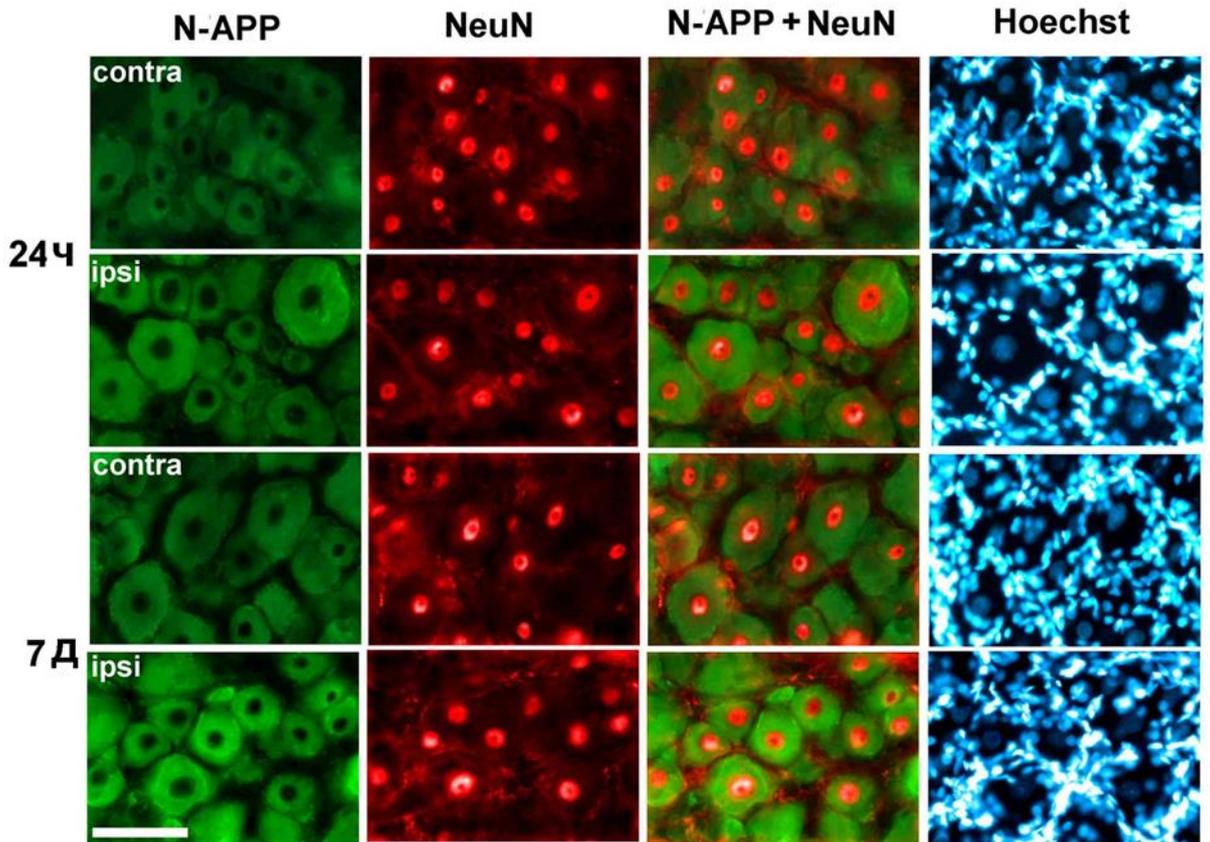


Рисунок 39. Экспрессия N-APP (зеленая флуоресценция) в нейронах DRG крысы через 24 часа и 7 дней после перерезки седалищного нерва. Ipsi – аксотомированный ипсилатеральный ганглий, contra – контралатеральный контрольный ганглий. NeuN – маркер ядер нейронов; N-APP+NeuN – наложение. Hoechst – флуоресценция Hoechst 33342, который визуализирует ядра всех клеток, нейронов и глии. Масштабный отрезок 50 мкм

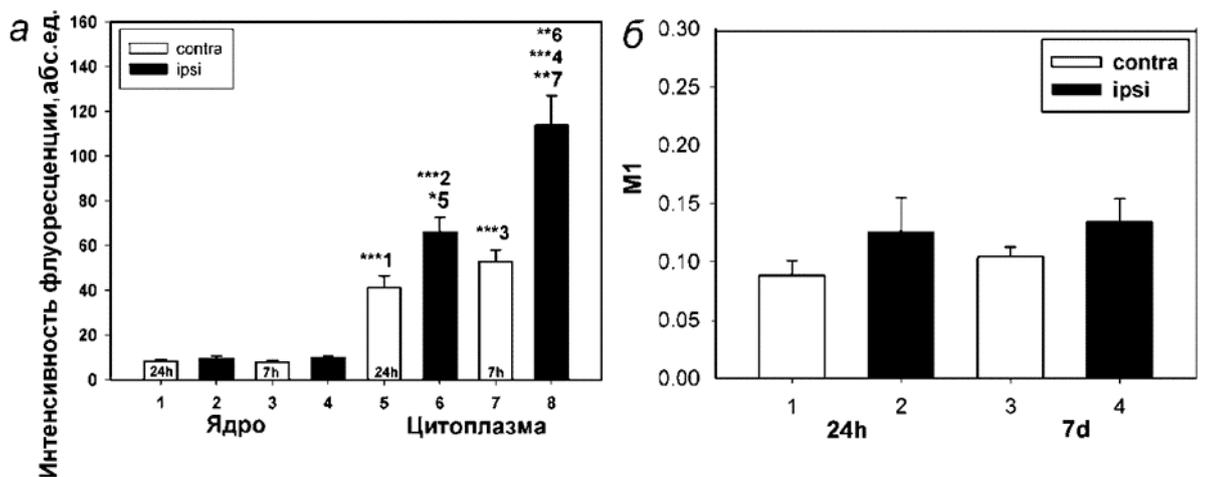


Рисунок 40. (а) Зависимость средней интенсивности флуоресценции N-APP в ядрах и цитоплазме нейронов ипсилатерального и контрольного

контралатерального DRG через 24 часа и 7 дней после перерезки седалищного нерва. (б) Коэффициент M1 колокализации N-APP и маркера ядер нейронов NeuN в контрольном контралатеральном и аксотомированном ипсилатеральном DRG крысы через 24 часа и 7 дней после перерезки седалищного нерва. n=6. * p <0,05; ** p <0,01; ***p<0.001

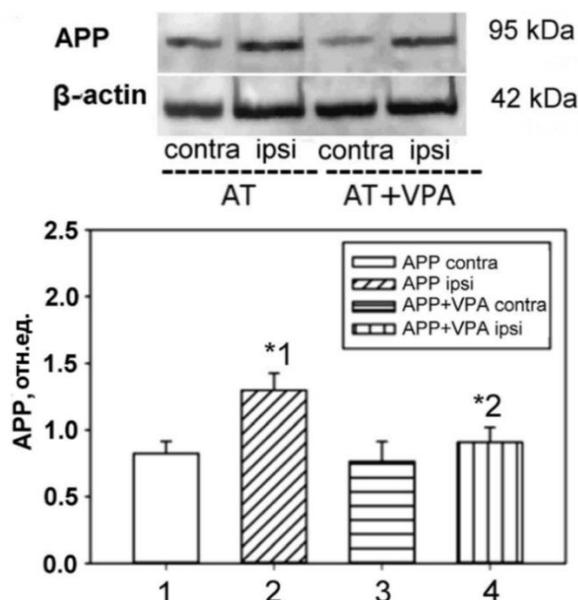


Рисунок 41. Вестерн-блот анализ: влияние вальпроата натрия (VPA) на уровень белка APP в ипсилатеральном ганглии (ipsi) относительно неповрежденного контралатерального ганглии (contra) на 7 дней после аксотомии. n=6; * p <0,05; ** p <0,01.

Интересные результаты были получены в ходе проведения эксперимента по влиянию вальпроата натрия на экспрессию N-APP в DRG после перерезки седалищного нерва. Так вестерн-блот анализ показал, что на 7 сутки после аксотомии уровень N-APP повышается в аксотомированном DRG контрольной группы, а введение вальпрата натрия снижало экспрессию N-APP (Рис. 41).

3.15. Экспрессия и локализация белка APP в рецепторе растяжения рака

Детали внутриклеточной локализации и перераспределения APP в нейроне после аксотомии были также исследованы на примере МРН PPP. Как С-APP, так и N-APP и в контрольных интактных препаратах (Int), и через 4-8 часов после перерезки аксона обнаруживались исключительно в МРН, но не в окружающих

его глиальных клетках, ядра которых визуализировались флуорохромированием Hoechst 33342 (Рис. 42, 44).

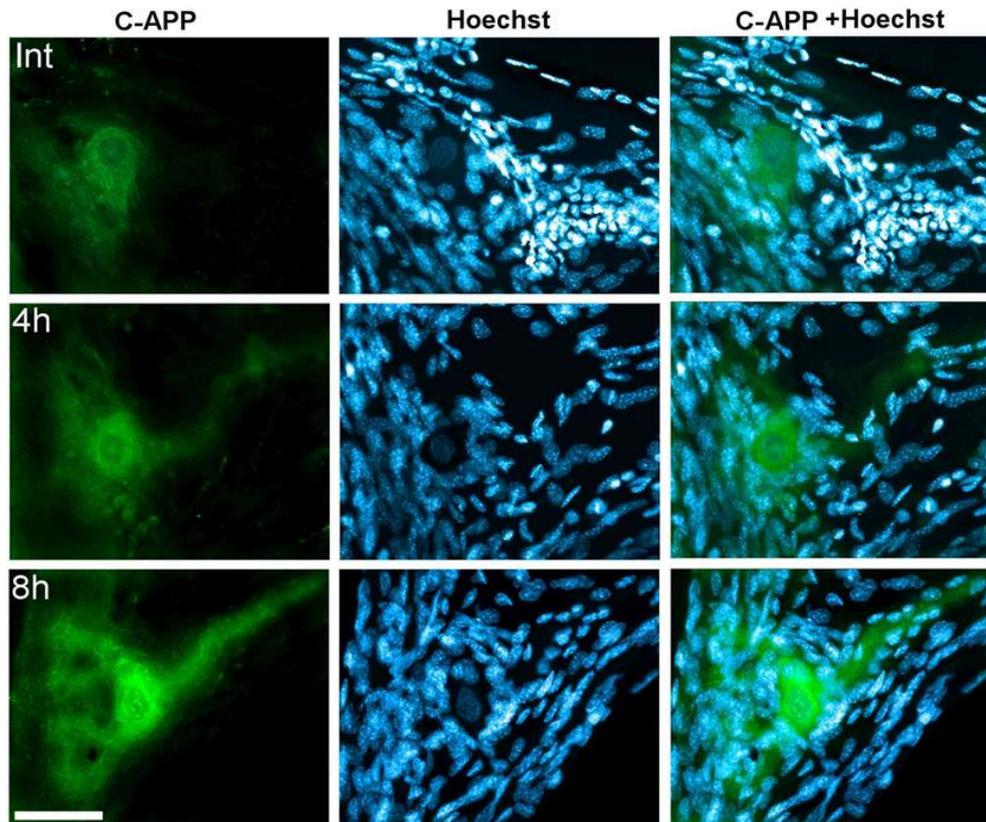


Рисунок 42. Внутриклеточное распределение С-APP в рецепторе растяжения рака через 4 и 8 часов после аксотомии и его колокализация с маркером ядре всех клеток Hoechst33342. Масштабный отрезок 100 мкм

В интактных нейронах, сохраняющих целостность аксона, С-APP локализовался преимущественно в перикарионе и меньше в ядре (Рис. 42). Интересно, что флуоресценция С-APP в ядрышке МРН была повышена по сравнению с кариоплазмой, и ядрышко отчетливо визуализировалось (Рис. 42). Слабо флуоресцировали дендриты МРН, а аксон не флуоресцировал вовсе. Через 4 (на 50%, $p \geq 0,05$) и особенно через 8 (на 150%, $p \geq 0,001$) часов после аксотомии флуоресценция С-APP в перикарионе и других частях МРН существенно возрастала (Рис. 43).

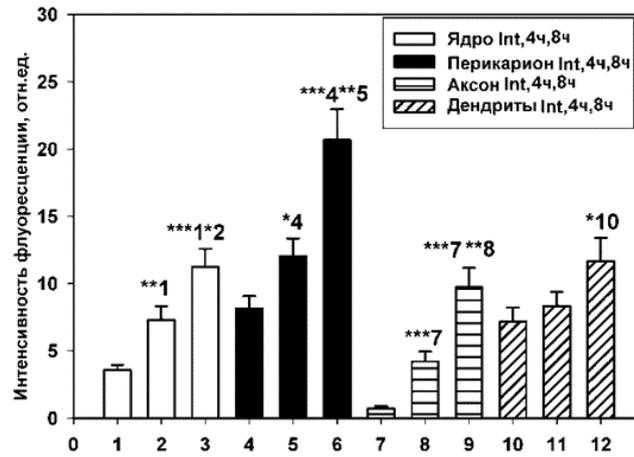


Рисунок 43. Флуоресценция С-APP в разных компартаментах рецептора растяжения рака: ядре, перикарионе, аксоне и дендритах интактных нейронов (Int), сохранивших связь с ганглием брюшной нервной цепочки и аксотомированных нейронов через 4 или 8 часов после перерезки аксона. $n=10$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

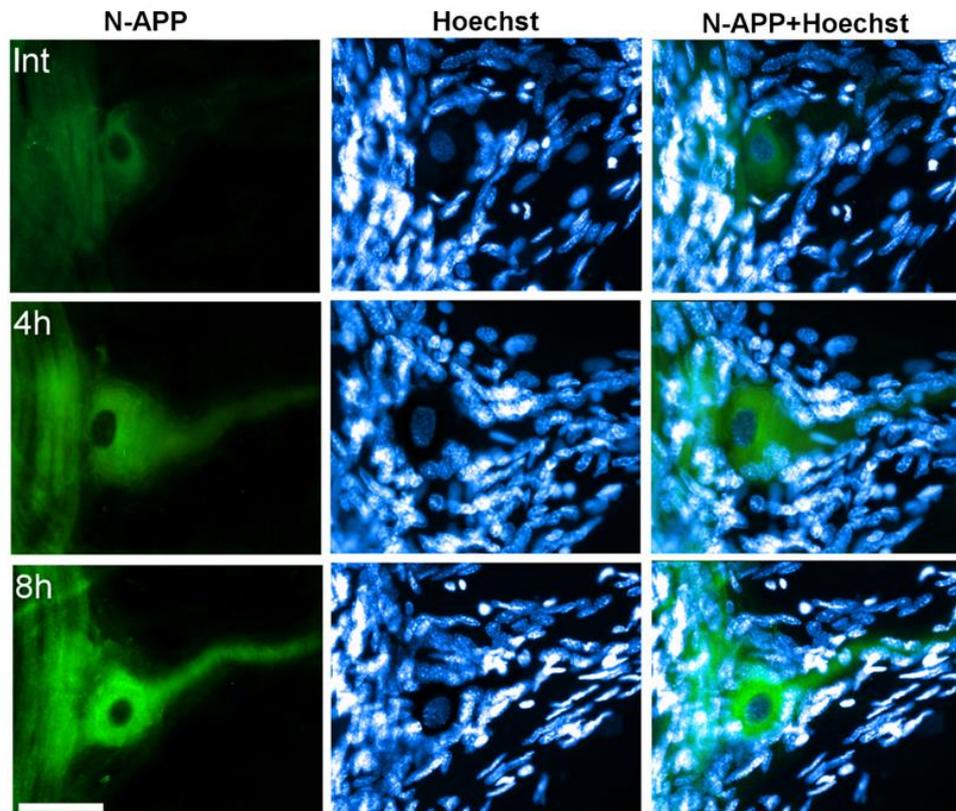


Рисунок 44. Внутриклеточное распределение N-APP в рецепторе растяжения рака через 4 и 8 часов после аксотомии и его колокализация с маркером ядер всех клеток Hoechst33342. Масштабный отрезок 100 мкм

Через 4 часа после перерезки появлялась флуоресценция в аксоне (в 4 раза выше по сравнению с интактными нейронами, $p \geq 0,001$), которая еще больше усиливалась через 8 часов после аксотомии (в 9 раз выше, $p < 0,01$) (Рис. 43). Увеличивалась флуоресценция белка в ядре в 2 раза через 4 часа после аксотомии ($p < 0,01$) и в 3 раза через 8 часов ($p < 0,001$), соответственно (Рис. 43). Через 8 часов четко визуализировались крупные дендриты и зоны их контакта с рецепторной мышцей, где разветвляются дендритные окончания (Рис. 43).

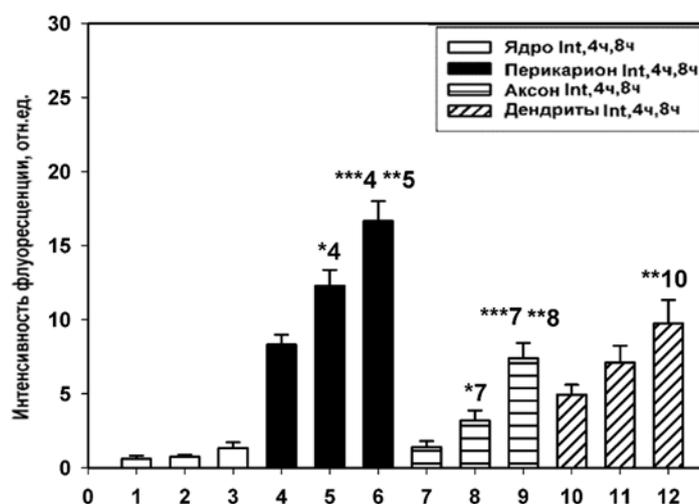


Рисунок 45. Флуоресценция N-APP в разных компартментах рецептора растяжения рака: ядре, перикарионе, аксоне и дендритах интактных нейронов (Int), сохранивших связь с ганглием брюшной нервной цепочки и аксотомированных нейронов через 4 или 8 часов после перерезки аксона. $n=10$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

N-APP, в отличие от C-APP, не обнаруживался в ядре и ядрышке МРН, ни в контроле, ни после аксотомии. Он локализовался в перикарионе МРН, а также в рецепторной мышце, в области контакта с ней дендритов (Рис. 44).

Эта область была заметно шире, чем в случае C-APP. Через 4 и 8 часов после аксотомии флуоресценция в этих зонах прогрессивно увеличивалась и появлялась в аксоне МРН (Рис. 45). Дендритное дерево не так четко выявлялось, но зона контакта дендритов в мышце была шире и через 8 часов после аксотомии флуоресцировала почти также ярко, как и перикарион нейрона (Рис. 45). Нужно отметить, что увеличение флуоресценции как C-APP, так и N-APP в дендритах

развивалось позже, чем в перикарионе и аксоне. Она достоверно превышала контрольный уровень через 8 часов, но не через 4 часа (Рис. 45).

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Ca^{2+} -зависимые механизмы в фотоиндуцированной генерации NO

Известно, что Ca^{2+} необходим для активации конститутивных форм NOS (Eroglu et al., 2017; Förstermann, Sessa, 2012; Qian, Fulton, 2013). Динамика процессов образования NO в соме, аксоне, дендритах нейронов и глиальных клетках при ФД – воздействии в зависимости от внеклеточной концентрации Ca^{2+} , степени проводимости Ca^{2+} -каналов и активности Ca^{2+} -АТФазы эндоплазматического ретикулума ранее не изучалась.

Наши исследования показали, что четырехкратное повышение внеклеточного кальция при ФДТ вызывает усиленную генерацию NO в нейрональной соме и дендритном дереве, разветвляющемся между рецепторными мышцами, а также в глиальной оболочке с первых минут облучения. Высокая продукция NO в глии согласуется с прошлыми исследованиями, в которых было продемонстрировано эффективное стимулирование апоптоза глиальных клеток NO, индуцированным ФД-воздействием (Kovaleva et al., 2013).

Быстрое увеличение генерации NO в условиях повышенной внеклеточной концентрации Ca^{2+} и фотоокислительного стресса, вероятно, связано с притоком Ca^{2+} в цитоплазму из внеклеточного пространства, который усиливается в результате фотоповреждения плазматической мембраны и мембран внутриклеточных органелл, резервирующих Ca^{2+} . Эти процессы детерминируют активацию nNOS, активируемой, как известно, Ca^{2+} / кальмодулином (Рис. 46) (Zhou et al., 2018).

Использование Ionomycin, представляющего ион-носитель для Ca^{2+} и широко применяемого для исследования влияния потока Ca^{2+} в цитозоль на различные клеточные процессы (Pi et al., 2016), показало схожую динамику генерации NO, как с повышенной концентрацией внеклеточного Ca^{2+} . Полученные данные свидетельствуют о важной роли транспорта Ca^{2+} через плазматическую мембрану в регулировании уровня NO при ФДТ.

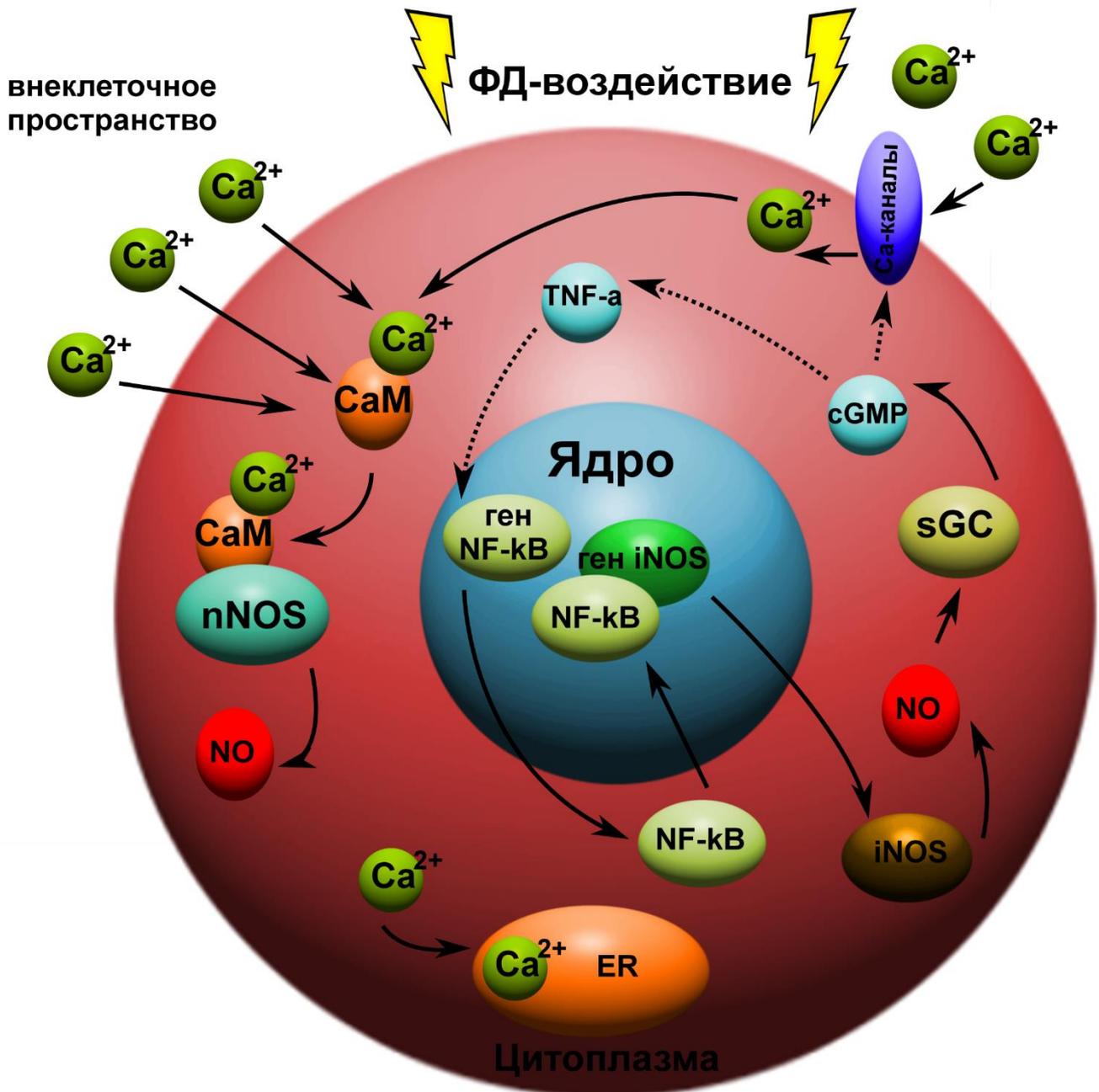


Рисунок 46. Концептуальная схема молекулярно-клеточных механизмов, контролирующих генерацию NO в нейронах и глиальных клетках при фотоокислительном стрессе.

Динамика флуоресценции DAF-2DA при блокировании SERCA tBuBHQ, рекрутирующей Ca²⁺ из цитоплазматического пространства в эндоплазматический ретикулум (Chemaly et al., 2018; Periasamy et al., 2017), была иной нежели, чем в экспериментах с четырехкратной концентрацией внеклеточного Ca²⁺.

Достоверное увеличение флуоресценции DAF-2DA наблюдалось на поздних мин облучения в соме, дендритах и аксоне МРН и глиальных клетках. Возможно, это связано с внутриклеточными компенсаторными механизмами рекрутирования или удаления из клетки Ca^{2+} в условиях инактивации SERCA, что препятствует излишнему повышению Ca^{2+} в цитоплазме, и активации nNOS на ранних мин ФДТ. Так, кроме эндоплазматического ретикулума, в поддержании кальциевого гомеостаза участвуют такие клеточные компартменты, как митохондрии (Maklad et al., 2019), аппарат Гольджи (Dolman, Terpikin, 2006). Из цитоплазмы клетки наружу Ca^{2+} может удаляться за счет Ca^{2+} -АТФазы (Saffioti et al., 2018) и $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -антипорта плазмолеммы (Liao et al., 2018). Стоит отметить, что высвобождением Ca^{2+} из внутриклеточных кальциевых депо может быть объяснено отсутствие различий от контрольных препаратов при двукратном уменьшении внеклеточного Ca^{2+} . В условиях фотоиндуцированной деградации мембранных структур, наиболее интенсивно развивающейся в поздние минуты облучения, и блокирования SERCA поддержание кальциевого гомеостаза становится невозможным для клетки. В результате увеличения цитоплазматического Ca^{2+} возрастает активность nNOS (Рис. 46).

Противоположные результаты были получены при использовании блокатора Ca^{2+} -каналов L-типа Nifedipine и блокатора Ca^{2+} -каналов плазматической мембраны CaCl_2 . Ca^{2+} -каналы L-типа – один из основных представителей семейства потенциал-управляемых кальциевых каналов. Открытие этих каналов происходит в ответ на сильную деполяризацию мембраны и вызывает длительный ток Ca^{2+} . Экспрессируются Ca^{2+} -каналы L-типа во многих тканях, включая и нервную (Vega-Vela et al., 2017). Эффективность ингибирования этих каналов нифедипином была продемонстрирована на беспозвоночных (Spafford et al., 2006). Вклад данных каналов в фотоиндуцированную генерацию NO ранее не изучался.

Наши исследования показали, что интенсивность флуоресценции DAF-2DA достоверно снижается под действием Nifedipine на более поздних минутах облучения, чем под действием хлорида кадмия. При этом достоверное

уменьшение продукции NO при действии обоих модуляторов происходит как в механорецепторном нейроне, так и в окружающих его глиальных клетках. Известно, что Ca²⁺-каналы L-типа в основном локализованы на клеточных телах (Spafford et al., 2006), но также они были обнаружены на несинаптической аксональной мембране и в дендритах (Kadas et al., 2017) и в глиальных клетках (Santiago González et al., 2017). Поэтому блокирование данных каналов могло сказаться непосредственно на активности nNOS. Вероятно, отличия в динамике генерации NO в случае нифедипина и хлорида кадмия связаны с разной значимостью кальциевого тока из различных Ca²⁺-каналов для активности nNOS в условиях ФД-воздействия.

4.2. NF-κB-зависимые механизмы в фотоиндуцированной генерации NO

NF-κB является важным транскрипционным фактором, который, в частности, ответственен за экспрессию iNOS (Kleinert et al., 2003; Singh et al., 2016). Данная изоформа NOS продуцируется во многих клетках организма, включая нейроны и глиальные клетки (Arias-Salvatierra et al., 2011; Shang et al., 2017; Brown, Vilalta, 2015), и активируется по кальций-независимому пути (Wang et al., 2018). iNOS генерирует на 1-2 порядка эффективнее NO, чем nNOS (Farrell, Blake, 1996). Динамика генерации NO под действием активаторов и ингибиторов NF-κB при ФД-воздействии ранее не была изучена.

Динамика генерации NO в нейронах под действием Prostratina в условиях фотоиндуцированного стресса имеет две фазы: быстрый рост и медленный спад. Молекулярный механизм, лежащий в основе первой фазы, связан, вероятно, с активацией iNOS, повышенная экспрессия которой была инициирована NF-κB. Фаза спада может быть обусловлена снижением активности iNOS, детерминированной развивающимся фотоокислительным стрессом. Так было показано, что высокий уровень АФК (активные формы кислорода) может приводить к снижению активности NO-синтазы, хотя до конца молекулярные механизмы регулирования внутриклеточной сигнализации NO через АФК неизвестны (Forstermann, 2010; Weidinger et al., 2015). В условиях окислительного

шока NO взаимодействует с супероксидным анион-радикалом ($O_2^{\cdot -}$), что приводит к образованию пероксинитрита, обладающего высоким свободнорадикальным потенциалом и способного легко модифицировать биомолекулярные мишени (Roe, 2012; Yamakura, 2006). Данный чрезвычайно мощный окислитель может вызывать деструкцию NO-синтазы путем S-глутатионилирования цистеиновых остатков, снижая генерацию NO и повышая продукцию $O_2^{\cdot -}$ из редуктазного домена: этот процесс был изучен на примере eNOS (Forstermann, 2010; Weidinger et al., 2015; Chen et al., 2010; Zweier et al., 2011). Другим немаловажным моментом этого молекулярного процесса является S-глутатионилирование субъединиц NF- κ B (p50 и p65), что значительно подавляет экспрессию iNOS из-за уменьшения связывания NF- κ B с промоторной областью гена iNOS (Singh et al., 2016). Наряду с этим повышенная внутриклеточная концентрация Ca^{2+} может дестабилизировать iPNAiNOS (Geng, Lotz, 1995). Кроме этого уменьшение продукции NO iNOS может быть детерминировано отрицательной обратной связью NO и cGMP на данную изоформу NO-синтазы (Рис. 46) (Perez-Sala, 2001; Korhonen, 2002).

Незначительное увеличение флуоресценции DAF2-DA в глиальной оболочке под действием активатора NF- κ B при ФДТ свидетельствует о неосновной роли iNOS в генерации NO в этом типе клеток. Хотя в рамках нашего исследования снижение экспрессии iNOS не могло отразиться в столь короткий временной промежуток, зато снижение фонового NO-уровня, создаваемого конститутивными формами NOS, достоверно подверженных S-глутатионилированию, может объяснить это явление (Forstermann, 2010; Weidinger et al., 2015; Chen et al., 2010; Zweier et al., 2011).

Прошлые исследования показали, что индуцибельная форма NO-синтазы экспрессируется в глиальных клеточных линиях (Ko et al., 2017). В наших исследованиях флуоресценция DAF2-DA незначительно увеличивалась в глиальной оболочке под действием активатора NF- κ B при ФДТ, что, вероятно, свидетельствует о неосновной роли iNOS в фотоиндуцированной генерации NO в этом типе клеток.

Активация NF-κB вызвала увеличение генерации NO при ФД-воздействии в проксимальной части аксона МРН. iNOS могла центробежно транспортироваться в аксон, как было ранее показана на примере nNOS в сенсорных нейронах (Gonzalez-Hernandez, Rustioni, 1999). Также необходимо учитывать тот факт, что NO будучи небольшой липофильной молекулой, легко диффундирующей через биологические мембраны, может проникать в близлежащие клетки (Lundberg, Weitzberg, 2005): в данном случае он мог проникнуть из глии в аксон. Равным образом NO мог быть транспортирован в виде S-нитрозотиолов (SNO), выполняющих функции доноров NO (Lundberg, Weitzberg, 2005; Stamler et al., 1992; Rassaf et al., 2002). Более выраженную картину флуоресценции, чем в аксоне, мы наблюдаем в дендритных окончаниях. Эти данные подтверждают прошлые исследования, в которых была показана экспрессия iNOS в дендритной области нейрона (Takumida et al., 2000).

Противоположные результаты были получены в экспериментах с Parthenolide, который эффективно ингибирует NF-κB (López-Franco et al., 2006). При использовании этого ингибитора достоверно уменьшалась продукция NO во всех препаратах, что свидетельствует в пользу предположения о частично конститутивном характере экспрессии iNOS (Perner et al., 2002; Roberts et al., 2001; Kobzik et al., 1993; Lane et al., 2004) в нервной ткани (Tang, 2007; Ruscheweyh, 2006). Постепенное увеличение флуоресценции DAF2-DA в экспериментальных образцах с Parthenolide, скорее всего, связано с активацией nNOS (Gupta et al., 1998). Увеличение активности данных NOS во время ФДТ связано с высвобождением внутриклеточного Ca^{2+} в цитоплазматическое пространство из фотоиндуцированных клеточных компартментов, депонирующих Ca^{2+} , например, митохондрий и эндоплазматического ретикулума (Рис. 46) (Thor et al., 1985; Castano et al., 2005; Uzdensky, 2008). Кроме того между iNOS и конститутивными формами NOS существует обратная связь, которая может регулировать их уровень продукции NO (Connelly et al., 2003). Поэтому не исключено, что ингибирование NF-κB-сигнального пути может отразиться и на экспрессии nNOS.

Для подтверждения экспрессии iNOS в МРН и глиальных клетках нами были проведены дополнительные эксперименты с селективным ингибитором iNOS SMT, а также комбинированные опыты SMT+Prostratin. В исследованиях с SMT наблюдалось достоверное уменьшение генерации NO в теле нейрона, дендритах, аксоне и в глиальной оболочке, что доказывает экспрессию iNOS в МРН и глии. Полученные результаты согласуются с исследованиями, в которых был показан частично конститутивный тип экспрессии iNOS (Perner et al., 2002; Roberts et al., 2001; Kobzik et al., 1993; Lane et al., 2004) в нервной ткани (Tang, 2007; Ruscheweyh, 2006).

Эксперименты SMT+Prostratin подтвердили роль NF-κB-сигнального пути в фотоиндуцированной генерации NO через активацию iNOS. Так активация NF-κB в условиях ингибирования iNOS не приводила к генерации NO выше контрольных показателей, как было в экспериментах просто с Prostratin.

Выше представленные результаты дают лишь частичный ответ о сложных механизмах генерации iNOS в условиях ФД-воздействия. Каковы причины столь быстрой фотоиндуцированной генерации iNOS? Ответов может быть несколько:

1. ФДТ интенсивно продуцирует активные формы кислорода, которые могут быстро стимулировать NF-κB к индукции синтеза iNOS. Как ранее было показано, ФДТ быстро увеличивает уровень NF-κB при раке (Piette, 2015; Volanti et al., 2001) и вызывает быструю активацию iNOS (Bhowmick, Girotti, 2009; Bhowmick, Girotti, 2011).

2. Частично синтез iNOS в нейроне и глиальных клетках может быть результатом аксотомии в процессе выделения рецептора растяжения рака.

3. Экспрессия iNOS может быть частично конститутивной (Perner et al., 2002; Roberts et al., 2001; Kobzik et al., 1993; Lane et al., 2004; Tang, 2007; Ruscheweyh, 2006).

Эти гипотезы должны быть в дальнейшем проверены.

4.3. sGC-зависимые механизмы в фотоиндуцированной генерации NO

Одним из основных сигнальных путей NO является молекулярный каскад, связанный с растворимой гуанилатциклазой (sGC) (Montfort et al., 2017). Присоединение NO к heme-Fe(II) регуляторной субъединицы sGC детерминирует конформационные изменения белка и активного центра, что приводит к значительному увеличению ферментативной активности sGC-heme-Fe-NO и синтезу циклического гуанозина-3'-5'-монофосфата (cGMP) (Bellamy, 2002), активирующего cGMP-зависимую протеинкиназу (PKG) (Garthwaite, 2008; Hofmann et al., 2006). Кроме PKG клеточными мишенями cGMP выступают cGMP-регулируемые фосфодиэстеразы и cGMP-активируемые ионные каналы (Рис. 46) (Koesling, 2000). В ряде работ было показано, что существуют механизмы обратной связи между NOS и cGMP (Inoue et al., 1995; Dawson et al., 1993). Правда, молекулярные аспекты этих процессов остаются пока слабо изученными. Так было выявлено, что cGMP может усиливать экспрессию iNOS посредством стимуляции синтеза TNF-а (Dawson et al., 1993). Основная роль в секреции этого цитокина в нервной ткани принадлежит глиальным клеткам, но и нейроны могут его продуцировать (Stellwagen, Malenka, 2006; Pozo, Goda, 2010). TNF-а индуцирует экспрессию NF-κB через активацию транскрипционных факторов RELB и NF-κB2 (Broekgaarden, 2015), а ядерный фактор транскрипции NF-κB запускает экспрессию iNOS (Рис. 46) (Kleinert et al., 2003; Singh et al., 2016).

Использование ингибитора sGC продемонстрировало достоверное падение уровня продукции NO в соме, аксоне и глии нейрона, а также тенденцию к уменьшению NO в дендритах, что свидетельствует в пользу существования обратной связи между NOS и cGMP. Возможно, за уменьшение генерации NO при ингибировании sGC ответственна iNOS, экспрессия которой падает по вышеизложенному механизму, связанному с TNF-а. Также не исключаются и иные механизмы, сказывающиеся на внутриклеточном пуле NO, в условиях дефицита cGMP. Но тогда возникает справедливый вопрос: почему обратную

картину мы не наблюдаем при использовании активатора sGC? И этому может быть несколько объяснений:

1. Высокий уровень sGMP на начальном этапе может приводить к повышению iNOS через путь TNF- α /NF- κ B, но нерегулируемый увеличивающийся внутриклеточный пул sGMP способен вызвать дестабилизацию mRNA iNOS, что приведет к ограниченному синтезу iNOS (Perez-Sala, 2001).

2. Сигнальный путь sGMP / PGK может ингибировать медленные кальциевые каналы L-типа (Sandoval et al., 2017), что, конечно, отразится на активности конститутивных форм NOS.

3. sGC была активирована ранее повышенным уровнем NOS.

4.4. Роль NO в выживании и гибели нейронов и глиальных клеток дорзальных ганглиев крысы при перерезке седалищного нерва

Молекулярно-клеточные сигнальные механизмы, участвующие в выживании нейронов и глиальных клеток, на сегодняшний день представляют большой интерес. Ранее мы рассмотрели ФДТ-зависимые процессы генерации NO, лежащие в основе гибели нервных и глиальных клеток при ФД-индуцированном фотоокислительном стрессе. Также большой научный интерес представляет NO-зависимые процессы сигнальной трансдукции, определяющие судьбу клетки при нейротравмах, в частности аксотомии (Cooke et al., 2013).

Аксотомия, т.е. полная перерезка нерва, является одним из видов механического повреждения, инициирующая каскад молекулярных и клеточных событий, приводящих к гибели или выживанию нейронов (Rishal and Fainzilber., 2014; Demyanenko et al., 2019). При этом в поврежденной нервной ткани развиваются различные патологические процессы, определяющие клеточную судьбу – выживание или смерть, варьирующиеся в зависимости от степени тяжести травмы, лечения и компенсаторных возможностей организма. Аксотомия характеризуется тремя основными молекулярно-клеточными событиями: валлерова деградация отрезанного аксона, гибель поврежденного нейрона или его регенерация с отращиванием аксона и восстановлением нервных связей. В ПНС

способствовать регенерации клеток (Cristino et al., 2000; Thippeswamy et al., 2007; Chu and Wu., 2006).

В нашем исследовании мы показали, что NO ответственен за гибель нейронов и глиальных клеток в дорзальных ганглиях крысы. Уровень апоптоза глиальных клеток был значительно выше по сравнению с нейронами как в аксотомированных, так и в контрольных ганглиях, что согласуется с прошлыми исследованиями (Dzreya et al., 2021; McKay Hart et al., 2002). Апоптоз нейронов и глиальных клеток определялся по количеству TUNEL-положительной маркировки ядер, соотнесенных с NeuN и Hoechst 33342. В DRG крысы количество сенсорных нейронов, окрашенных NeuN намного меньше, чем общее количество клеток, яркие ядра которых окрашены Hoechst 33342. Это доказывает тот факт, что большинство окрашенных Hoechst 33342 малых ярких ядер – это ядра сателлитных глиальных клеток. Бледные крупные ядра, визуализируемые в спектре флуоресценции Hoechst 33342, являются ядрами нейронов, плотно окруженными спутниковой глией.

Уровень апоптоза глиальных клеток повышался в аксотомированных DRG животных, которым вводили NO-донор, уже с 4 часов и набирал пиковые значения к 24 часам после аксотомии. Достоверные отличия глиального апоптоза, индуцированного NO в условиях аксонального стресса, были и относительно контралатерального ганглия в рамках одной группы, так и против аксотомированного DRG контрольных животных. Используемый в нашем исследовании селективный ингибитор iNOS вызывал снижение апоптоза глиальных клеток аксотомированных DRG относительно аксотомированного DRG контрольной группы. Известно, что в глиальных клетках экспрессируется iNOS (Emirandetti et al., 2010) также, как и в нейронах (Shang et al., 2017). Индукция экспрессии iNOS в глиальных клетках наблюдалась при воздействии различных стимулов, например, при ишемии, после стимуляции липополисахаридами, цитокинами, а также при перерезке периферических нервов (Caggiano and Kraig., 1998).

Реакция аксотомированных нейронов через 4 часа после травмы была выражена в TUNEL-позитивной флуоресценции менее интенсивно и равномерно со стороны всех ипсилатеральных DRG, проявляющих достоверные апоптотические тенденции относительно контралатеральных DRG. Через 24 часа после перерезки седалищного нерва аксотомированные нейроны проявляли сходную с глиальными клетками реакцию на NO-донор и селективный ингибитор iNOS.

Полученные нами данные свидетельствуют, что в гибели нейронов и глиальных клеток при аксотомии большую роль играет NO, а в частности его индуцибельная гиперпродукция. Это согласуется с прошлыми исследованиями, в которых было показано, что iNOS является одним из ключевых механизмов гибели клеток в условиях клеточных стресс-реакций (Förstermann, Sessa, 2012; Rapozzi et al., 2013; Rapozzi et al., 2015; Della Pietra et al., 2015), в том числе и при аксотомии (Caggiano and Kraig., 1998; Martin et al., 2005).

На выраженный нейрональный апоптоз, который мы наблюдаем на 7 сутки после аксотомии, на фоне растущей апоптотической гибели глиальных клеток может влиять именно активированная индуцибельной NO-гиперпродукцией сателлитная глия. Так механизмы, с помощью которых активированные микроглиальные и астроцитарные клетки убивают нейроны, были идентифицированы в клеточных культурах. Эти механизмы включают активацию фагоцитарной NADPH-оксидазы в микроглии и экспрессию iNOS в глии, что приводит к апоптозу через ONOO⁻. Также NO, продуцируемый iNOS, вызывает гибель нейронов путем блокирования цитохромоксидазы (Förstermann, Sessa, 2012). Кроме этого гибель нейронов и глиальных клеток может быть результатом активации p53-митохондриального пути апоптоза. В наших исследованиях на примере нейронов и глиальных клеток позвоночных и беспозвоночных животных была показана активация p53-сигнального пути в этих клетках в ответ на аксональное повреждение (Rodkin et al., 2019; Dzreyan et al., 2021). В свою очередь p53 и NF-κB регулируют друг друга положительно или отрицательно в

зависимости от внутриклеточных условий (Huang et al., 2018). NF- κ B в свою очередь может активировать iNOS (Kleinert et al., 2003; Singh et al., 2016).

4.5. Роль p53 в нейронах и глиальных клетках беспозвоночных животных при аксотомии

Многофункциональный белок p53 участвует в различных процессах в организме. Как фактор транскрипции, он контролирует экспрессию сотен и, возможно, тысячи генов, участвующих в регуляции метаболизма, стрессовых реакциях, пролиферации, апоптоза и др. клеточных процессах (Morrison et al. 2003; Bonini et al. 2004; Culmsee and Mattson 2005; Nicolai et al. 2015; Fisher 2017; Simabuco et al. 2018; Sullivan et al. 2018; Kiryu-Seo et al., 2005). Его проапоптотическая активность связана со стимуляцией биосинтеза каспазы 6, Puma, Noxa, Araf-1 и других белков, участвующих в различных стадиях апоптоза (Jebelli et al. 2012; Akhter et al. 2014; Wan et al. 2014; Wang et al. 2014). Он также может функционировать в режиме, независимом от транскрипции. Будучи перемещенным в митохондрии, нарушает биоэнергетические процессы и стимулирует высвобождение цитохрома c и AIF, которые вызывают апоптоз (Wang et al. 2014; Dai et al. 2016; Aubrey et al. 2018). В нормальных клетках уровень p53 низкий из-за быстрого MDM2-зависимого убиквитинирования и протеасомной деградации (Gottifredi and Prives., 2001). Однако обширное повреждение ДНК и стресс, вызванные различными вредными факторами, такими как гипоксия, эксайтотоксичность, окислительный стресс, ионизирующее излучение, приводят к нарушению функций ядрышка и вызывают гиперэкспрессию p53 (Bonini et al. 2004; Culmsee and Mattson 2005; Checler and Alves da Costa 2014; Wan et al. 2014; Wang et al. 2014). В нервной системе не только нейрональный, но также астроцитарный p53 координирует патогенез различных нейродегенеративных заболеваний (Jebelli et al., 2012).

Наши эксперименты показали повышенную регуляцию p53 в ядрах и цитоплазме механорецепторного нейрона и в ядрах глиальных клеток речного рака через 4–8 ч после аксотомии. Проапоптотический белок p53 синтезируется в

цитоплазме, а затем транспортируется в ядро. Несвязанный p53 образует комплекс с MDM2, который транспортирует его обратно в цитоплазму, где он быстро разлагается в протеасомах. Его накопление в ядре может быть связано с интенсивным синтезом и быстрой посттрансляционной транслокацией в ядро, а также затрудненным ядерно-цитоплазматическим транспортом. Накопление p53 в цитоплазме может возникнуть, если скорость его синтеза выше темпа деградации и ядерного переноса. Наблюдаемое накопление p53 как в ядерном, так и в цитоплазматическом компартментах может быть связано с обоими факторами. Фосфорилирование предотвращает взаимодействие p53 с MDM2, препятствует деградации, и стабилизирует пул p53. Различные протеинкиназы, такие как киназы MAP JNK, p38, ERK и др. фосфорилируют p53 (Culmsee and Mattson., 2005). Поскольку аксотомия не вызывает разрывы ДНК, потенциальные сигналы для синтеза p53 включают факторы транскрипции, такие как E2F1, c-Мус, p38, а также универсальный вторичный мессенджер NO и т. д. Гиперэкспрессия этих сигнальных белков в аксотомизированные ганглии БНЦ раков были продемонстрированы в недавнем протеомном исследовании (Demuyanenko et al., 2019).

Фрагментация ядер нейронов, которое может указывать на апоптоз клеток в МРН не наблюдалось через 4–8 ч после аксотомии, а также после фотоокислительного стресса и воздействия различных фармакологических агентов в других исследованиях на МРН (Uzdensky et al. 2002, 2015). Как предполагалось ранее, в МРН апоптоз внутренне заблокирован, вероятно, потому что это уникальный одиночный нейрон жизненно важен для управления движением и выживанием животных. Тем не менее, аксотомия индуцировала активацию и накопление p53 в нейронах рака. Возможно, апоптоз в МРН может развиваться после 8-часового инкубационного интервала. Также, возможно, в МРН может произойти апоптоз иначе, чем в глиальных клетках, без фрагментации ядер.

Известно, что пифитрин-μ блокирует связывание p53 с митохондриями и, как следствие, ингибирует независимый от транскрипции митохондриальный путь

апоптоза, связанный с подавлением антиапоптотических белков семейства Bcl-2, увеличением проницаемости внешней митохондриальной мембраны, снижением митохондриального потенциала и биоэнергетической дисфункцией (Strom et al. 2006; Nijboer et al. 2011; Dong et al. 2012; Zhang et al. 2013; Wan et al. 2014; Wang et al. 2014; Maj et al. 2017; Glas et al. 2018). Через 4 и особенно 8 ч после перерезки аксона p53 накапливался в перикарионной области МРН в большом количестве с митохондриями (Fedorenko and Uzdensky 2009). Пифитрин-μ, который ингибирует связывание p53 с митохондриями уменьшает вызванную аксотомией область цитоплазматического расположения p53. Этот эффект был неполным, возможно, из-за меньшего тормозящего действия пифитрин-μ по сравнению со скоростью накопления p53 в цитоплазме и его связывания с митохондриями.

Интересно, что в неаксотомизированной МРН p53 был сконцентрирован в узком цитоплазматическом кольце вокруг ядра. Другие авторы также не наблюдали аналогичного кольца в перикарионе нейронов. Можно предположить, что после синтеза в цитоплазме p53 может удерживаться рядом с ядерной мембраной до своего импорта через ядерные поры. Возможно, скорость синтеза p53 был выше, чем скорость его деградации и скорость его ядерного транспорта. Накопление p53 в ядрышках нейронов также вызывает интерес.

Ядрышко, как известно, является фабрикой рибосом (McLeod et al., 2014). Биогенез рибосом необходим для жизни нейронов. В стрессовых условиях ядрышко участвует в реакциях на повреждение клетки. Его целостность и активность важна для регуляции уровня и активности p53 в клетке (Woods et al. 2015). Повреждение ядрышка приводит к активации p53 и передает сигнал повреждения системам, которые контролируют клеточный метаболизм, гомеостаз и выживаемость (Erickson and Bazan 2013; Parlato and Kreiner 2013). Через 4–8 ч после аксотомии МРН средний ядерный уровень p53 увеличился, но флуоресцирующие ядрышки наблюдались лишь в редких экспериментах. Отсутствие избыточного количества p53 в ядрышках может быть связано с деструкцией мультибелкового комплекса, управляющего связывание p53 с ядрышковыми структурами. (Erickson and Bazan 2013). В глиальных клетках p53

был распределен довольно равномерно по всей нуклеоплазме, ядрышек не наблюдалось.

В заключение, p53 был активирован в механорецепторных нейронах рака аксотомией. Он накапливался в ядрышке и в узком цитоплазматическом кольце вокруг ядра. Его уровень в кариоплазме и цитоплазме был значительно ниже. После аксотомии иммунофлуоресценция p53 в ядрышке исчезала. Какие молекулы служат проапоптотическими нейроглиальными сигналами, стимулирующими накопление p53 в клетке? Можно предложить участие Ca^{2+} или NO в качестве низкомолекулярных мессенджеров в нейронах и глиальных клетках. Сразу после аксотомии Ca^{2+} может проникать в поврежденные глиальные клетки в месте рассечения и распространяться по глиальным синцитиям. Как вариант, он может попасть в разрез аксона и индуцирует ретроградные сигнальные каскады, запускающие экспрессию p53 (Khaitin et al., 2018). Оксид азота легко переносится между клетками, а также способствует апоптозу. Ca^{2+} активирует нейрональную NO-синтазу, которая производит NO. В астроцитах NO вызывает p53-опосредованную транслокацию Bax в митохондрии, вызывая апоптоз (Yung et al., 2014).

4.6. NO-зависимые механизмы экспрессии p53 в нейронах и глиальных клетках дорзальных ганглиев крысы

На сегодняшний день известно, что NO может регулировать различные белки, включая p53. В основном регулирование экспрессии p53 через NO-зависимые сигнальные пути исследовались в условиях гамма- и УФ-облучения на клеточных культурах с помощью доноров и ингибиторов NO (Sandau et al., 1997; Wang et al., 2003; Schneiderhan et al., 2003; Nakaya et al., 2000; Poluha et al., 1997; Wang et al., 2003; Martin et al., 2005). Однако механизмы NO-зависимого регулирования p53 в периферической нервной системе при аксотомии практически не изучены.

Наши исследования, показали, что аксотомия вызывает значительное уменьшение уровня p53 в ядре и практически двукратное увеличение его в

цитоплазме нейронов. Это показывает, что транскрипционно-зависимая активация p53 не участвует в индуцированном аксотомией апоптозе нейронов DRG. Независимая от транскрипции проапоптотическая активность p53 связана с его транслокацией в митохондрии с нарушением биоэнергетических процессов, высвобождением цитохрома c и AIF, которые вызывают активацию каспазы 3, ключевой проапоптотической протеазы (Yakovlev and Faden 2001). В конечном итоге это приводит к апоптозу (Рис. 48) (Aubrey et al. 2018; Wan et al. 2014; Wang et al. 2014). Глиальные клетки также экспрессировали p53, который главным образом сосредотачивался в их кариоплазме. Это показывает, что апоптоз глиальных клеток при аксотомии происходит по транскрипционно-зависимому p53 пути.

Однако, необходимо учитывать тот факт, что p53 может участвовать не только в процессах клеточной гибели, в контексте которой обычно рассматривают p53, но и в выживании клетки. Было показано, что p53 может также направлять рост аксонов и нейритов путем регулирования экспрессии актин-связывающего белка Coronin 1b и малой ГТФазы Rab13 (Рис. 48), которые являются критически важными белками для ремоделирования цитоскелета (Di Giovanni et al., 2006). Эти функции опосредуются ацетилированием p53, посттрансляционной модификацией, которая как недавно было показано, индуцирует новый транскрипционный модуль, включающий p53 и гистоновые ацетилтрансферазы (НАТ), CREB-связывающий белок/p300 (CBP/p300) и p300-CBP связывающий фактор (P/CAF), усиливающий экспрессию белка GAP-43, связанного с ростом аксонов (Gaub et al., 2010; Tedeschi et al., 2009). Наряду с этим сообщалось и о независимой роли p53 в ремоделировании аксонов. И возможно, наблюдаемое нами накопление p53 в цитоплазме нейронов после аксотомии является также, кроме проапоптотического механизма, молекулярно-клеточным событием, предшествующим транспорту p53 в аксоны.

Так в исследовании первичных нейронов гиппокампа было показано, что фосфорилированный p53 локализуется в аксоне, чтобы напрямую взаимодействовать с Rho-киназой (ROCK) (Рис. 48), способствующей росту

аксонов за счет регулирования системы актина и микротрубочек (Qin et al., 2009). Однако, нейроны DRG, как известно, униполярные. Их отросток разветвляется в седалищном нерве на афферентную и эфферентную ветви. Внутри ганглия отростки этих нейронов не выявляются, что не дает оснований утверждать о транспорте p53 вдоль нейритов.

Стоит подчеркнуть, что показанная нами ядерная экспрессия p53 в глиальных клетках, сохраняющаяся и после аксотомии, указывает на существенное отличие реализации p53-сигнального пути в этих клетках от нейронов, где наблюдалась ядерно-цитоплазматическая транслокация p53. Известно, что именно астроцитарный p53 имеет фундаментальное значение в патогенезе различных нейродегенеративных заболеваний (Jebelli JD, 2012). Взаимодействие нейронов и глиальных клеток является важным звеном в регуляции гомеостаза в нервной системе и в выживании обоих типов клеток (Jäkel et al., 2017).

NO-зависимое увеличение экспрессии p53, которое мы наблюдали в нашей работе, в нейронах и глиальных клетках DRG через 4 часа и 24 часа после аксотомии при введении NO-доноров согласуется с прошлыми исследованиями, в которых было показано, что NO является мощным индуктором экспрессии p53 (Wang et al., 2003; Sandau et al., 1997; Schneiderhan et al., 2003; Nakaya et al., 2000; Kim et al., 2019; Martin et al., 2005). Увеличение p53 через 4 часа в ядре и в цитоплазме аксотомированных нейронов под действием донора NO может свидетельствовать о активации транскрипции гена p53 или NO-зависимом механизме уменьшения уровня деградации p53. Так известно, что на ранних сроках NO приводит к уменьшению уровня Mdm2 (Рис. 48), снижая убиквитинирование и последующую протеосомную деградацию p53 (Wang et al., 2003). Эффект NO-зависимой транскрипции гена p53 может реализовываться через активацию E2F1, увеличение экспрессии которого мы показали в нашем исследовании. Известно, что NO индуцирует увеличение уровня E2F1 через гиперфосфорилирование и инактивацию pRb, а также увеличивает ДНК-связывающую способность E2F1 посредством активации p38 MAPK (Cui et al.,

2005). А E2F1 в свою очередь является фактором транскрипции множества белков, в том числе и p53 (Рис. 48) (Engelmann, Puttzer, 2010; Meng, Gosh, 2014).

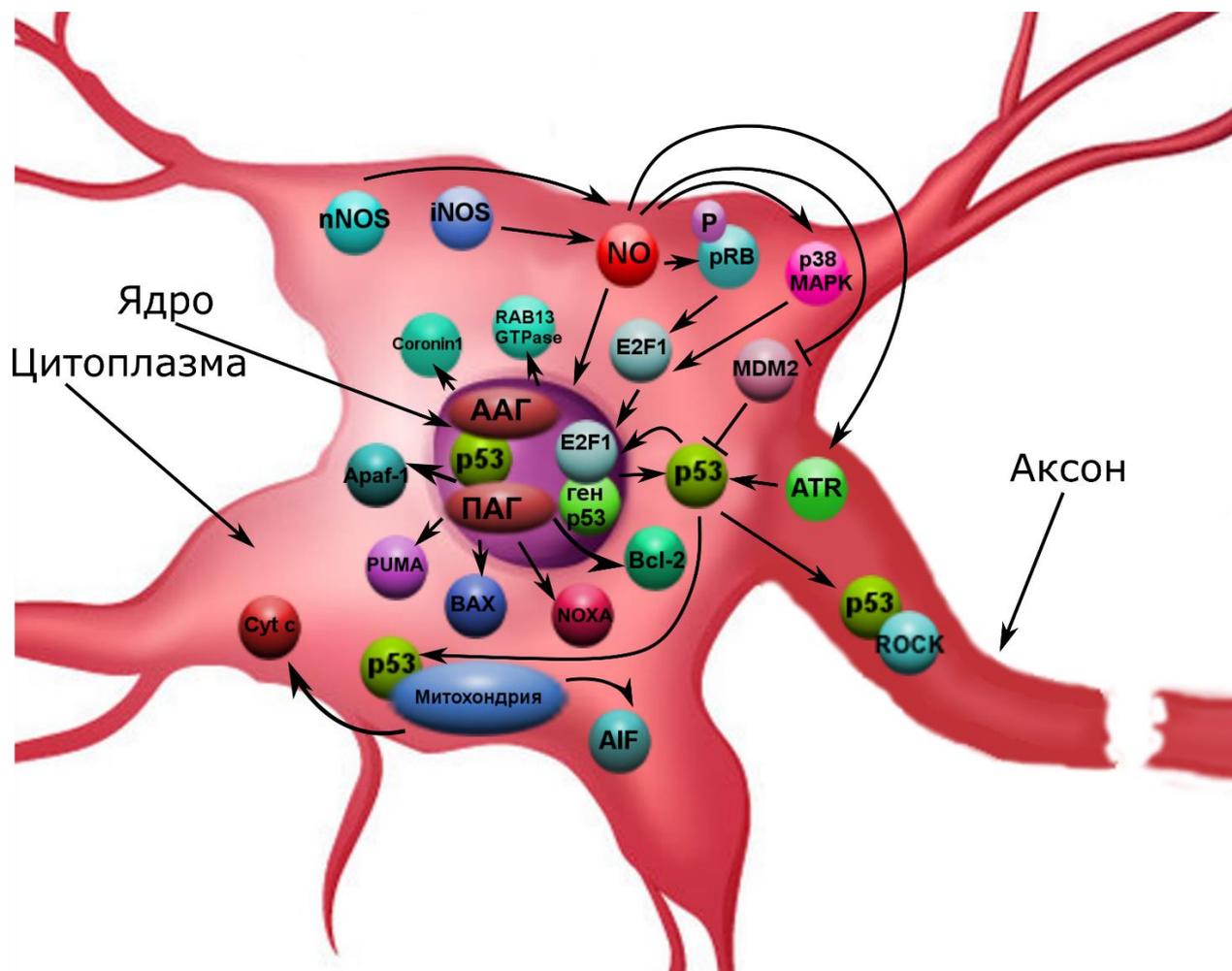


Рисунок 48. Концептуальная схема механизмов экспрессии и локализации p53, а также его роли в нейронах при аксотомии. Обозначения: ААГ – антиапоптотические гены; ПАГ – проапоптотические гены.

Перерезка седалищного нерва приводила к выраженному NO-индуцированному ядерному депонированию в нейронах и глиальных клетках в более поздние сроки после травмы, точнее через 24 часа. Ядерно-цитоплазматической транслокации p53, которую мы наблюдали в аксотомированных нейронах контрольной группы животных, в условиях введения NO-доноров не наблюдалось. Уровень p53 в цитоплазме нейронов ипсилатерального DRG животных, которым вводили донор NO относительно ипсилатерального DRG контрольной группы через 24 часа после аксотомии сопоставимы. При этом ядерный уровень отличается практически в три раза, что

говорит, как о повышенном синтезе p53, так и о его депонировании в нейрональной нуклеоплазме, индуцированном избытком NO. В глиальных клетках аксотомированных нейронов под действием NO-донора наблюдалось увеличение уровня p53, но не столь выраженное, как в поврежденных нейронах. Эти данные согласуются с прошлыми исследованиями, в которых было продемонстрировано, что NO-доноры на ранних сроках после стресса приводят к уменьшению уровня Mdm2, ключевого фермента, ответственного за убиквитинирование и последующую за этим протеосомную деградацию p53. Также NO ингибирует ядерный экспорт p53 через серин/треониновую протеинкиназу (ATR), которая фосфорилируя Ser15, инактивирует сигналы ядерного экспорта p53, что приводит к депонированию p53 в нуклеоплазме (Рис. 48). Известно, что NO-индуцированное ядерное накопление p53 может приводить к апоптозу (Wang et al., 2003; Schneiderhan et al., 2003; Nakaya et al., 2000).

Ингибирование iNOS, одного из ключевых ферментов в системе воспаления, генерирующего высокий уровень NO в отличие от nNOS и eNOS, приводило к уменьшению экспрессии p53 в ядрах нейронов через 4 и 24 часа после аксотомии, но не в глиальных клетках. Возможно, это связано с тем, что в глиальных клетках iNOS еще не успела экспрессироваться, а в нейронах присутствует конститутивный уровень экспрессии iNOS (Perner et al., 2002; Roberts et al., 2001; Kobzik et al., 1993; Lane et al., 2004; Tang, 2007; Ruscheweyh, 2006).

4.7. Роль E2F1 в нейронах позвоночных и беспозвоночных животных при аксотомии

Транскрипционный фактор E2F1 играет важную роль в регуляции критических клеточных процессов, включая остановку клеточного цикла и апоптоз, что делает его объектом интенсивных исследований в контексте профилактики и лечения рака. Тем не менее, помимо роли E2F1 в механизмах защиты от опухолей, на сегодняшний день имеются доказательства того, что E2F1 опосредует патологическую гибель клеток, вызывающую разрушение ткани

(например, дегенерацию нейронов и повреждение клеток, вызванное ишемией). Исследования последних лет на различных моделях повреждения ЦНС, включая травмы позвоночника, нейродегенеративные патологии, ишемию мозга, выявили сверхэкспрессию данного белка. Эти результаты в очередной раз доказывают, что при заболеваниях, поражающих нервную систему, E2F1 может играть ключевую роль.

Наши эксперименты показали повышенную регуляцию E2F1 в различных модельных объектах беспозвоночных и позвоночных животных: в ядрах и цитоплазме механорецепторного нейрона, а также в аксотомированных спинномозговых ганглиях крыс на ранних сроках после аксотомии. Это позволило детально изучить внутриклеточную локализацию и экспрессию E2F1 как в нейронах позвоночных животных, на примере крысы, так и в нервных клетках беспозвоночных, таких как речной рак *Astacus leptodactylus*. Так кроличьи антитела против E2F1 млекопитающих животных, использованные в настоящей работе, прекрасно распознавали соответствующие эпитопы в гомологичном белке речного рака. Это свидетельствует о консервативности белка E2F1 и присутствии его в нервной системе беспозвоночных животных, включая ракообразных.

Иммуноблоттинг и иммунофлуоресцентная микроскопия выявили сверхэкспрессию E2F1 уже через 4 часа и даже 1 час после аксотомии механорецепторных нейронов, а также DRG крысы. Эти результаты согласуются с данными предыдущих опытов с протеомными микрочипами, в которых 1.8-кратное повышение экспрессии E2F1 в аксотомированных ганглиях БНЦ речного рака наблюдалось уже через 1 и 3 часа после аксотомии (Carnevale et al., 2012). Видно, что динамика экспрессии E2F1 в аксотомированных ганглиях и МРН, достигая своего максимума к 4 часам после аксотомии, постепенно уменьшается. Это говорит, о скором E2F1-зависимом ответе в нейронах, развивающемся при стрессе.

Важное наблюдение состоит в том, что уровень экспрессии E2F1 в наших экспериментах повышался как в цитоплазме, так и в ядрах нейронов, о чем свидетельствуют как иммуноблоттинг, так и иммунофлуоресцентная

микроскопия. В ядре E2F1, очевидно, действует как фактор транскрипции. Известно, что он транскрипционно индуцирует экспрессию проапоптотических белков, таких как каспазы 3, 7, 8 и 9, SMAC/DIABLO, Apaf-1, p53, p73, белки семейства Bcl-2 и тем самым стимулирует апоптоз (Bolte and Cordelières., 2006). Как показано ранее в протеомном исследовании, в аксотомированных ганглиях БНЦ рака одновременно с E2F1 повышались уровни этих проапоптотических белков (Ceol and Horvitz., 2001). Это свидетельствует об участии E2F1 в апоптозе нейронов.

В случае цитоплазматической локализации одна из возможных функций E2F1 – его взаимодействие с митохондриями и регуляция их функций, например, путем непосредственного взаимодействия с белком Bcl-xL на наружной митохондриальной мембране и регулирования ее пермеабилитации (Demyanenko and Uzdensky., 2017).

Нарушение регуляции экспрессии E2F1 вызывает апоптоз через p53-зависимые и p53-независимые пути. Литературные данные по поводу взаимодействия p53 и E2F1 остаются достаточно противоречивыми. Показано, что в раковых клетках активация p53 ингибирует активность E2F1, вызывая остановку клеточного цикла, либо p53 взаимодействует напрямую с E2F1 и запускает апоптоз. Напротив, в случае повреждения нервов экспрессия E2F1 увеличивается, что стимулирует высвобождение цитохрома C из митохондрий и, в конечном итоге, приводит к апоптозу. В ряде работ показано, что E2F1 взаимодействует с p53 путем активации экспрессии проапоптотических кофакторов p53, таких как JMΥ и TP53INP1, а также белков, стимулирующих апоптоз (ASPP) ASPP-1 и ASPP-2 с помощью прямого механизма транскрипции. Ma et al в своей работе на модели компрессионного повреждения спинного мозга у крысы наблюдали противоположный ход проапоптотических явлений: сверхэкспрессия p53 через 1 час после травмы сопровождалась повышающей регуляцией E2F1 через 3 часа (Ma et al., 2017). Такие противоречивые данные говорят о том, что механизмы развития апоптоза, сопровождающиеся активацией этих двух белков остается открытыми.

Отсутствуют данные и о взаимосвязи между p53 и E2F1 при повреждении периферических нервов. Это натолкнуло нас на второе важное наблюдение, сделанное по итогу исследований: сверхэкспрессия E2F1 через 4 часа после травмы сопровождается повышенной регуляцией p53, а также активацией каспазы 3 с последующим развитием апоптоза глиии через 24 часа и развитием апоптоза нейронов через 7 дней после аксотомии седалищного нерва крысы. Последовательное увеличение сверхэкспрессии E2F1 и p53 было также показано нами в ходе протеомного анализа аксотомированных ганглиев раков. Мы можем предположить, что в условиях аксотомии фактор транскрипции E2F1 активирует p53 в качестве нижестоящего фактора – мишени что, в свою очередь, вызывает вторичные изменения в экспрессии генов и белков, запускающих апоптоз. Таким образом, сверхэкспрессия E2F1 является ключевым событием в инициации апоптоза нейронов и удаленных глиальных клеток в аксотомированных DRG и готовит последующие изменения других белков, в частности, p53, и общую реакцию клеток ганглиев в ответ на повреждение. Так, например, Camins et al. показано, что ингибирование пути E2F1/p53 предотвращает апоптоз нейронов (Camins et al., 2007).

Проведенный нами ранее ингибиторный анализ *in vivo* на нейронах PPP с использованием активаторов и ингибиторов p53 показал, что индуцированная аксотомией гибель нейронов и удаленных глиальных клеток была связана как с эффектом p53 на процессы транскрипции, так и с независимым от транскрипции эффектом p53 на митохондрии в цитоплазме клетки. Эти результаты, в совокупности с данными иммуноблоттинга и иммунофлуоресцентной микроскопии в пользу ядерной и цитоплазматической локализации E2F1 свидетельствуют о том, что роль этого белка в гибели нервных клеток не ограничивается действием в качестве фактора транскрипции, но также связана с его непосредственным взаимодействием с митохондриями и белком p53 в цитоплазме клеток. Важно отметить, что глиальные клетки, удаленные на большое расстояние в несколько сантиметров от места рассечения были более уязвимы для аксотомии, чем нейроны DRG. Фактически, глиальный апоптоз

наблюдался через 24 часа после SNT и усиливался на 7-й день, тогда как апоптоз некоторых нейронов DRG начинался только на 7-й день.

В связи с этим, нам также важно было определить, в каких клетках, нейронах или глии, экспрессируется данный белок. Интересно было отметить, что E2F1 экспрессировался исключительно в нейронах и практически не наблюдается в глиальных клетках ганглиев DRG и рецептора растяжение рака. Возможно, такие особенности распределения данного белка могут объяснить разную реакцию нейронов и глиальных клеток в ответ на перерезку аксона. На следующем этапе исследования мы планируем с помощью ингибиторного анализа изучить влияние E2F1 на апоптоз нейронов после аксотомии.

Таким образом, мы изучили экспрессию E2F1 на трех моделях нейротравмы позвоночных и беспозвоночных животных. Было продемонстрировано, что E2F1 присутствует не только в нервной системе беспозвоночных животных, таких как нематоды *C. elegans* или *Drosophila*, но и у ракообразных, подтверждая консервативную природу этого белка.

E2F1 – универсальный белок, играющий важную роль во внутриклеточной сигнализации. По-видимому, судьба нейронов и глиальных клеток в аксотомированных ганглиях и рецепторе растяжения раков определяется балансом между различными модальностями активности E2F1. E2F1 и p53 могут рассматриваться как потенциальные мишени для терапии повреждения нервов, а их ингибиторы следует изучать как перспективные нейропротективные препараты.

4.8. Роль APP в нейронах позвоночных и беспозвоночных животных при аксотомии

Аксотомия – тяжелое травмирующее воздействие на нейрон, характеризующиеся полной перерезкой аксона и инициирующая каскад сигнальных и метаболических процессов, ведущих клетку к двум сценариям: гибели или регенерации с последующим восстановлением нервных связей (Dzreyan et al., 2020; Dzreyan et al., 2020; Rodkin et al., 2020; Takaso et al., 2020;

Khaitin et al., 2018; Duan et al., 2015). В нашем исследовании было использовано три модели травмы периферической нервной системы, что позволило детально изучить внутриклеточную локализацию и экспрессию С-APP и N-APP как в нейронах позвоночных животных, на примере крысы, так и в нервных клетках беспозвоночных, таких как речной рак *Astacus leptodactylus*. Так кроличьи антитела против С-APP и N-APP млекопитающих животных, использованные в настоящей работе, прекрасно распознавали соответствующие эпитопы в гомологичном белке речного рака. Это свидетельствует о консервативности белка APP и присутствии его в нервной системе беспозвоночных животных, не только у нематоды *C. elegans* или *Drosophila*, о которых сообщалось в работах (Guo et al., 2012; Jacobsen, Iverfeldt, 2009), но и у ракообразных.

APP – универсальный белок, играющий важную роль во внутриклеточной сигнализации. Продукты его протеолитического распада sAPP α , sAPP β , A β , AICD принимают участие во многих физиологических и биохимических клеточных процессах (Kobayashi et al., 2010; Chow et al., 2010; Brunholz et al., 2011). Нами было показано увеличение экспрессии С-APP и N-APP в нейронах ганглиев задних корешков спинного мозга крысы после перерезки седалищного нерва, который иннервирует заднюю конечность. Это согласуется с прошлыми исследованиями, в которых было продемонстрировано увеличение APP в сенсорных нейронах DRG (Scott et al., 1991) и мотонейронах двигательного ядра лицевого нерва при аксотомии (Palacios et al., 1992).

Известно, что при травме нерва в нейроне происходит синтез важных белков в том, числе NGF, который может увеличивать экспрессию APP. Было показано, что NGF модулирует экспрессию APP в нейронах (Nishimura et al., 2003). NGF – один из важнейших игроков в нейросигнальной трансдукции, ответственный за выживание нейронов, рост и регенерацию аксонов, образование нервных связей, а также за синтез нейромедиаторов и нейропептидов (Minnone et al., 2017). Поврежденные нейроны могут передавать сигналы глиальным клеткам об увеличении экспрессии нейротрофических факторов, которые необходимы им для регенерации и дальнейшего выживания (Lobanov et al., 2009).

Другим фактором увеличения APP при аксотомии в нейронах может выступать повышение концентрации Ca^{2+} , а также NO. Ca^{2+} -ключевой вторичный мессенджер множества сигнальных путей, регулирующий клеточный гомеостаз. Известно, что Ca^{2+} играет важную роль во многих нейродегенеративных процессах (Gemes et al., 2009), включая реакции нервных клеток на повреждение нерва (Kobeissy., 2015; Rishal, Fainzilber., 2014; Tomita et al., 2020). Недавние исследования показали сверхэкспрессию Ca^{2+} -каналов, $\text{Ca}_v 3.2$ Т-типа, в DRG после перерезки спинномозгового нерва у крыс (Tomita et al., 2020). Ca^{2+} может проникать в аксон через его место рассечения и запускать ретроградную аксональную сигнализацию (Khaitin et al., 2018). Ca^{2+} стимулирует уровень NO через Ca^{2+} -CaM-систему активации конститутивных NOS, включающие в себя нейрональную и эндотелиальную изоформы NOS (Eroglu et al, 2017). NO – универсальный нейротрансмиттер нового поколения, участвующий во множестве физиологических и патологических процессах. Исследования показали, что после повреждения периферических нервов в аксотомированных нейронах наблюдается увеличение экспрессии nNOS, которая транспортируется к месту повреждения, что указывает на участие NO/nNOS в регенерации (Cristino et al., 2000). Избыточная продукция NO инициирует окислительный стресс, который является характерной чертой нарушения внутриклеточного гомеостаза при нейротравме (Rodkin et al., 2020). В свою очередь было показано, что окислительный стресс сопровождается увеличением продукции APP, в частности продуктом его протеолиза sAPP β . При этом NO регулирует активность протеазы BACE1 (beta-site APP cleaving enzyme 1) (Muche et al., 2017). BACE1 активно экспрессируется в нейронах и совместно с γ -секретазой осуществляет протеолиз APP до A β и небольшого С-концевого пептида AICD (Bukhari et al., 2017).

Интересна выраженная ядерная локализация С-APP через 24 часа после аксотомии, которая не наблюдалась ни в одной из серий экспериментов с N-APP. Этот эффект наблюдался как в нейронах DRG, так и в механорецепторных нейронах, в последних он был менее выраженным относительно цитоплазмы через 4-8 часов после аксотомии. Мы предполагаем, что это С-терминальный

фрагмента AICD, так как полноразмерный APP не должен проникать в ядро. Недавние исследования показали, что полноразмерный APP в нейронах локализуется в перикарионе, не проникая в ядро (Hicks., 2021; Hicks et al., 2020). Однако имеются данные о взаимодействии и формировании относительно устойчивого комплекса полноразмерного APP или фрагмента APP, превышающего AICD, с Tip60, Fe65 и Pat1a, который далее, возможно, транслоцируется в ядерную область. Известно, что APP может связываться с ганглиозидом GM1, который широко представлен в нервной ткани и локализуется в цитоплазме, а также ядерной оболочке (Okamoto.,2012).

AICD вблизи от клеточного ядра соединяется с белком Fe65, который стабилизирует его и способствует переносу в ядро. Там вместе с белком Tip60 этот комплекс стимулирует транскрипцию ряда белков, участвующих в регуляции апоптоза и патогенеза болезни Альцгеймера. К ним относятся сам белок APP, β -секретаза BACE1, белки Tip60, неприлизин, разрушающий пептид A β , проапоптотические белки p53, KAI1, GSK-3 β , CHOP, циклины B1 и D1, регулирующие клеточный цикл, аквапорин AQP-1, регуляторы динамики цитоскелета трансгелин и актин α 2, транспортер глутамата в везикулах VGLUT2 (Becket et al., 2012; Pardossi-Piquard et al., 2012; Koistinen et al., 2017; Multhaup et al., 2015; Bukhari et al., 2017). Отсутствие ядерной локализации N-APP в нейронах DRG и PPP свидетельствует в пользу вышеизложенной версии. Также это предположение подтверждает значительное уменьшение флуоресценции C-APP в ядрах нейронов на 7 сутки после перерезки седалищного нерва, так как известно, что AICD быстро подвергается протеолизу каспазами с образованием фрагмента, называемого C31 (Multhaup et al., 2015).

Большой интерес вызывает наблюдаемая нами в МРН флуоресценция C-APP в ядрышках. Основная функция ядрышка заключается в синтезе рРНК и рибосом, которые необходимы для поддержания внутриклеточного гомеостаза. Локализация C-APP в ядрышке предполагает его участие в этих сложных процессах. В прошлых исследованиях было показано, что APP в ядрышке может участвовать в процессинге прерибосомной рРНК и экспорте части 60S из ядра в

цитоплазму (Okamoto., 2012). Возможно, в нашей работе мы наблюдаем более плотную, чем в окружающей кариоплазме, локализацию AICD в ядрышке. Это согласуется с недавним исследованием Hicks et al., в котором была показана преимущественная локализация AICD в ядрышке нейрональных клеток (Hicks., 2021; Hicks et al., 2020).

Повышение уровня как С-APP, так и N-APP в соме МРН и его отростках свидетельствует о повышенном синтезе этого белка в цитоплазме и транспорте его вдоль отростков на периферию. Поскольку аксон МРН перерезан, транспорт APP ограничен сохранившейся частью аксона, где и накапливается этот белок. Известно, что APP транспортируется вдоль микротрубочек аксонов и дендритов на периферию нейронов. В аксонах он транспортируется кинезином-1, а как транспортируется в дендритах, пока не известно (Muresan and Ladescu Muresan, 2015). Интерес вызывает повышенный транспорт APP в дендриты МРН и их терминальные части, где они контактируют с волокнами рецепторных мышц. APP, возможно, проникает в них из дендритных окончаний. Так как известна адгезионная роль APP в формировании синаптических контактов между нейронами (Muresan and Ladescu Muresan, 2015), то представленные данные могут также указывать на участие APP в формировании контактов между дендритами механорецепторных нейронов с мышечными волокнами.

Отсутствие флуоресценции С-APP и N-APP в аксонах МРН, сохраняющих связь с брюшной нервной цепочкой, подтверждает участие APP в аксональных процессах при травме. Эти данные подтверждаются прошлыми исследованиями, в которых экспрессия APP не наблюдалась в здоровых аксонах, но появлялась в поврежденных (Truong et al., 2019).

Также большой интерес представляют результаты по влиянию вальпроата натрия на экспрессию APP в DRG после перерезки седалищного нерва. Известно, что вальпроат натрия является эффективным ингибитором HDAC. HDAC являются ферментами, катализирующими удаление ацетильной группы ϵ -N-ацетил-лизина гистонов, внесенными ферментами гистонацетилазами. Эпигенетические факторы, такие как ацетилирование или деацетилирование

гистонов, регулируют конденсацию или деконденсацию хроматина и, соответственно, транскрипцию и синтез белков. Ацетилирование гистонов H3 и H4 приводит к деконденсации хроматина и более легкому доступу факторов транскрипции и РНК-полимераз в промоторную область генов. Напротив, деацетилирование гистонов стимулирует конденсацию хроматина, подавляя синтез белка в клетке (Kouzarides et al., 2006). На сегодняшний день известно, что вальпроевая кислота ингибирует пролиферацию раковых клеток через механизмы подавления экспрессии APP. В регуляции APP весомую роль играют эпигенетические механизмы, такие как метилирование ДНК, структура хроматина и модификация гистонов. Подавление экспрессии HDAC1 приводит к уменьшению уровня APP (Zhao et al., 2017). Вероятно, в нашем исследовании мы наблюдаем HDAC-зависимые механизмы регулирования экспрессии APP.

Таким образом, мы изучили экспрессию С-APP и N-APP на трех моделях нейротравмы позвоночных и беспозвоночных животных. Было продемонстрировано, что APP присутствует не только в нервной системе беспозвоночных животных, таких как нематоды *C. elegans* или *Drosophila*, но и у ракообразных, подтверждая консервативную природу этого белка. С-APP и N-APP локализовались преимущественно в нейронах DRG, а не в глиальных клетках. Аксотомия вызывала рост уровня С-APP и N-APP в нейронах DRG и рака. Увеличение уровня С-APP, а не N-APP, в ядре МРН и нейронов DRG через 4, 8 часов и 24 часа, 7 дней после аксотомии, соответственно, указывает на проникновение в ядро нейрона растворимого фрагмента AICD, а не целого белка APP. Флуоресценция С-APP в ядрышке МРН может указывать на роль AICD в синтезе рРНК и формировании рибосом. Накопление С- и N-APP в поврежденных аксонах МРН подтверждает роль APP в аксональных процессах, развивающихся при травме. Кроме этого в регуляции APP в нейронах при аксотомии играют HDAC-зависимые механизмы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе исследования было установлено, что в ФД-индуцированной генерации NO в нейронах и глиальных клетках участвует, как pNOS, так iNOS, экспрессия которой реализуется через активацию NF-κB сигнального пути.

Фотоиндуцированная генерация NO тесно сопряжена с Ca²⁺-гомеостазом в клетке, нарушение которого происходит при ФДТ в результате деструкции плазматической мембраны и мембран Ca²⁺-депонирующих органелл. Так было показано, что четырехкратное повышение внеклеточного Ca²⁺ в условиях фотоокислительного стресса быстро приводит к активации pNOS, активируемой, как известно, Ca²⁺/кальмодулином (Zhou et al., 2018), при этом двукратное уменьшение внеклеточного Ca²⁺ не критично для уровня NO в нейронах при ФДТ.

Наша работа продемонстрировала, что в фотоиндуцированной продукции NO в основном принимают участие Ca²⁺-каналы плазматической мембраны, в частности, Ca²⁺-каналы L-типа. Ca²⁺-зависимые механизмы генерации NO при ФД-воздействии могут реализовываться и через SERCA, правда её роль не столь очевидна. Вероятно, блокирование SERCA компенсируется за счет рекрутирования Ca²⁺ такими клеточными компартментами, как митохондрии (Maklad et al., 2019) и аппарат Гольджи (Dolman, Terikin, 2006), а также удалением избытка Ca²⁺ через Ca²⁺-АТФазы (Saffioti et al., 2018) и Na⁺/Ca²⁺-антипорт плазмолеммы (Liao et al., 2018).

Результаты с селективным ингибитором iNOS частично подтвердили данные других исследований о неканоническом типе экспрессии iNOS (Perner et al., 2002; Roberts et al., 2001; Kobzik et al., 1993; Lane et al., 2004; Tang, 2007; Ruscheweyh, 2006) в нервной ткани (Tang, 2007; Ruscheweyh, 2006). Эксперименты с активатором и ингибитором NF-κB показали ключевую роль этого фактора транскрипции в активации iNOS при ФД-воздействии. Роль именно NF-κB в активации iNOS при ФДТ доказали комбинированные опыты с SMT+Prostratin.

Нами был исследован также вопрос о механизмах обратной связи между NOS и cGMP, показанный в ряде работ (Inoue et al., 1995; Dawson et al., 1993), при ФД-воздействии. Было установлено, что sGC не только молекулярная мишень для NO, но внутриклеточный модулятор уровня NO в условиях фотоокислительного стресса.

Исследование по влиянию NO на выживание нейронов и глиальных клеток продемонстрировало, что NO участвует в процессах апоптоза этих клеток. NO-донор увеличивал в аксотомированных DRG апоптотическую гибель нейронов и глиальных клеток, а использование ингибитора индуцибельной NO-синтазы приводило к обратному эффекту. Это свидетельствует о роли индуцибельной продукции NO в сигнальных механизмах активации апоптоза. Представленные данные согласуются с прошлыми исследованиями, в которых была изучена iNOS-индуцированная гибель клеток в условиях клеточных стресс-реакций (Förstermann, Sessa, 2012; Rapozzi et al., 2013; Rapozzi et al., 2015; Della Pietra et al., 2015), в том числе и при аксотомии (Caggiano and Kraig., 1998; Martin et al., 2005). При этом реализация NO-индуцированной гибели нейронов и глиальных клеток, возможно, осуществляется через активацию p53-сигнального пути, часто приводящего по транскрипционно- и нетранскрипционно-зависимым механизмам к апоптозу (Jebelli et al. 2012; Akhter et al. 2014; Wan et al. 2014; Wang et al. 2014). Наши исследования NO-зависимой экспрессии p53 в нейронах и глиальных клетках позвоночных и беспозвоночных животных подтверждают вышеизложенные механизмы апоптотической клеточной гибели.

Так было показано, что в аксотомированных DRG под действием NO-донора происходит депонирование NO в кариоплазме нейронов на менее выраженном фоне увеличения уровня NO в цитоплазматической области через 4 и 24 часа после перерезки седалищного нерва. Наблюдалась и NO-зависимая реакция глиальных клеток. При этом аксотомия в контрольной группе приводила к ядерно-цитоплазматическому перераспределению p53, что еще больше было выражено при использовании селективного ингибитора iNOS. По-видимому, NO может усиливать транскрипционно- и нетранскрипционно-индуцированные

механизмы апоптоза, увеличивая экспрессию проапоптотических белков и детерминируя митохондриальный апоптотический путь гибели клетки. О том, что NO является мощным индуктором p53, и о его ядерном NO-зависимом депонировании сообщается в ряде научных исследований (Sandau et al., 1997; Wang et al., 2003; Schneiderhan et al., 2003; Nakaya et al., 2000; Poluha et al., 1997; Wang et al., 2003; Martin et al., 2005). Теперь мы исследовали его на модели аксотомии млекопитающих в нейронах и глиальных клетках.

Интересные результаты были получены в ходе исследования экспрессии p53 в МРН речного рака. Здесь мы показали критическую роль ядрышка, наблюдаемого в интактных нейронах, в регулировании уровня p53, но после процедуры перерезки аксона ядрышко исчезало, а иммунофлуоресценция p53 возрастала в ядре и усиливалась в узком кольце вокруг кариоплазмы и цитоплазме перикариона. Это подтверждает прошлые исследования, в которых была показана роль ядрышка в регулировании p53 при стрессе (Erickson and Bazan 2013; Parlato and Kreiner 2013).

В глиальных клетках иммунофлуоресценция возрастала только в ядрах. Ядерно-цитоплазматического перераспределения не наблюдалось. Пифитрин-μ, который ингибирует связывание p53 с митохондриями (Strom et al. 2006; Nijboer et al. 2011; Dong et al. 2012; Zhang et al. 2013; Wan et al. 2014; Wang et al. 2014; Maj et al. 2017; Glas et al. 2018) уменьшал вызванную аксотомией область цитоплазматической локализации p53 и его флуоресценцию. Этот эффект был неполным, возможно, из-за меньшего тормозящего действия пифитрин-μ по сравнению со скоростью накопления p53 в цитоплазме и его связывания с митохондриями.

Не менее важным было исследование и белка E2F1 в идентичных, изложенных выше, моделях аксотомии. Было показано, что E2F1 преимущественно экспрессируется в нейронах, как беспозвоночных, так и позвоночных животных. Аксотомия явилась мощным индуктором накопления E2F1 в ядре и цитоплазме нейронов в ранние сроки после аксотомии. Известно, что E2F1 регулирует уровень экспрессии p53 (Ertosun et al., 2016). Наблюдаемое

нами повышение уровня E2F1 при аксотомии может детерминировать увеличение активности p53 в условиях аксонального стресса. Кроме этого, в регуляции экспрессии E2F1 может играть роль NO (Ying et al., 2007).

Другим молекулярным объектом в нашей работе стал белок APP, который преимущественно рассматривается в контексте болезни Альцгеймера, но который также играет немаловажную роль во множестве клеточных нормальных и патологических процессов (Jacobsen, Iverfeldt, 2009; Guo et al., 2012). Нами было продемонстрировано, что APP присутствует не только в нервной системе беспозвоночных животных, таких как нематоды *C. elegans* или *Drosophila*, но и у ракообразных, подтверждая консервативную природу этого белка. С-APP и N-APP локализовались преимущественно в нейронах DRG и речевого рака, а не в глиальных клетках. Аксотомия вызывала рост уровня С-APP и N-APP в нейронах DRG и рака. Увеличение уровня С-APP, а не N-APP, в ядре МРН и нейронов DRG через 4, 8 часов и 24 часа, 7 дней после аксотомии, соответственно, указывает на проникновение в ядро нейрона растворимого фрагмента AICD, а не целого белка APP. Флуоресценция С-APP в ядрышке МРН может указывать на роль AICD в синтезе рРНК и формировании рибосом. Накопление С- и N-APP в поврежденных аксонах МРН подтверждает роль APP в аксональных процессах, развивающихся при травме. Кроме этого в регуляции APP в нейронах при аксотомии играют HDAC-зависимые механизмы.

ВЫВОДЫ

1. Повышение внеклеточной концентрации Ca^{2+} , использование Ca^{2+} -ионофора, блокирование Ca^{2+} -АТФазы эндоплазматического ретикулума с помощью tBuVHQ, активация NF- κ B с помощью Prostratin увеличивали фотоиндуцированную генерацию NO в нейронах и глиальных клетках речевого рака.
2. Блокирование кальциевых каналов плазматической мембраны ионами хлорида кадмия или Nifedipine (блокатор кальциевых каналов L-типа), а также ингибирование NF- κ B с помощью Parthenolide и ингибирование индуцибельной NO-синтазы с помощью SMT отдельно или совместно с Prostratin и ингибирование растворимой гуанилатциклазы с помощью ODQ приводили к уменьшению фотоиндуцированной генерации NO в нейронах и глиальных клетках речевого рака.
3. В интактных нейронах рака p53 локализуется преимущественно в ядрышке и узком цитоплазматическом кольце вокруг ядра нейрона речевого рака. Уровень p53 в остальной части перикариона нейрона был низким. Через 4 и 8 часов после аксотомии уровень p53 повышался в ядре и перикарионе нейрона и в нуклеоплазме глиальных клеток, а в ядрышке исчезал. Пифитрин- μ снижал площадь локализации p53 в перикарионе и общую иммунофлуоресценцию p53 в этой области после аксотомии.
4. Перерезка седалищного нерва увеличивает уровень апоптоза нейронов и глиальных клеток в DRG через 24 часа и 7 суток после аксотомии, а использование NO-донора SNP усиливает этот процесс. Обратный эффект оказывает использование селективного ингибитора индуцибельной NO-синтазы SMT.
5. Перерезка седалищного нерва вызывает транслокацию p53 из ядер нейронов DRG в цитоплазму через 24 часа после аксотомии. Использование NO-донора SNP увеличивает уровень p53 больше в ядрах и меньше в цитоплазме нейронов

DRG через 4 и 24 после аксотомии. А применение iNOS-ингибитора SMT оказывает обратный эффект в аксотомированных нейронах DRG. SNP увеличивает уровень p53 в ядрах глиальных клеток аксотомированного DRG.

6. АКСОТОМИЯ вызывает увеличение уровня E2F1 и APP в нейронах рецептора растяжения рака и DRG. При этом уровень E2F1 и C-APP в ядре выше, чем в цитоплазме аксотомированных нейронов DRG, и наоборот в механорецепторных нейронах рака. N-APP не обнаруживается в нейрональных ядрах.

7. Использование ингибитора HDACs вальпроата натрия снижает экспрессию APP в DRG через 7 суток после аксотомии.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

NO – монооксид азота

Ca²⁺ – ионы кальция

АФК – активные формы кислорода

ГК – глиальные клетки

ПД – потенциал действия

ПОЛ – перекисное окисление липидов

МРН – механорецепторный нейрон

РРР – рецептор растяжения рака

ФД – фотодинамический

ФДТ – фотодинамическая терапия

ФС – фотосенсибилизатор

ALA – аминолевулиновая кислота

CaM – Ca²⁺-связывающий белок кальмодулин

cGMP – циклический гуанозинмонофосфат

GTP – гуанозинтрифосфат

eNOS – эндотелиальная NO-синтаза

iNOS – индуцибельная NO-синтаза

MAL – метиловый эфир

nNOS – нейрональная NO-синтаза

NF-κB – ядерный фактор-κB

NMDA – N-метил-D-аспартат

NOS – NO-синтаза

PKG – протеинкиназа G

sGC – растворимая гуанилатциклаза

DRG – ганглии корешков спинного мозга крысы

HDACs – гистондеацетилазы

ЦНС – центральная нервная система

ПНС – периферическая нервная система

cAMP – циклический аденозинмонофосфат

PKG – cGMP-зависимая протеинкиназа

НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

ФАД – флавин-аденин-динуклеотид

ФМН – флавин-моноклеотид

ВН4 – (6R-)5,6,7,8-тетрагидробиоптерин

PKA – цАМФ-зависимая протеинкиназа

АМПК – 5'АМФ-активируемая протенкиназа

Akt – протеинкиназа В

LPS – липополисахариды

IL-1 β – интерлейкин 1 β

TNF- α – фактор некроза опухоли- α

Smac – второй митохондриальный активатор каспазы

DIABLO – прямой IAP-связывающий белок с низким pI

AIF – апоптоз-индуцирующий фактор

ER – эндоплазматический ретикулум

МOMP – проницаемость наружной мембраны митохондрий

STAT3 – фактор сигнальной трансдукции и активации транскрипции 3

MDM2 – фермент убиквитин-протеинлигаза E3

СТГ – сателлитные глиальные клетки

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Салей А.П., Рецкий М.И. Роль оксида азота в формировании мотивационного поведения и обучения // Вестник ВГУ. – 2003. – № 1. – С. 75-80.
2. Сапрыгина Ю. Сколько собак и кошек можно «прописать» в квартире // Парламентская газета. 2021. [<https://www.pnp.ru/social/skolko-sobak-i-koshek-mozhno-propisat-v-kvartire.html>]
3. Узденский А.Б. Клеточно-молекулярные механизмы фотодинамической терапии. – СПб.: Наука, 1980. – 321 с.
4. Шеперд Г. Нейробиология / Под ред. Д.А. Сахарова. – М.: Мир, 1987. – 451 с.
5. Родькин С.В., Дзряян В.А., Демьяненко С.В., Узденский А.Б. Роль p53-зависимых сигнальных путей в выживании и гибели нейронов и глиальных клеток при повреждении периферической нервной системы // Биологические мембраны. – 2021. – Т. 6. – № 6. – С. 402 – 417.
6. Agurto A., Vielma A.H., Cadiz B., Couve E., Schmachtenberg O. NO signaling in retinal bipolar cells // Exp Eye Res. – 2017. – V. 161. – P. 30 – 35.
7. Ahn C., Kang J.H., Jeung E.B. Calcium homeostasis in diabetes mellitus // J Vet Sci. – 2017. – V. 18. – № 3. – P. 261 – 266.
8. Akhter R., Sanphui P., Biswas S. The essential role of p53-upregulated modulator of apoptosis (Puma) and its regulation by FoxO3a transcription factor in β -amyloid-induced neuron death // J Biol Chem. – 2014 – V. 289. – P. 10812 – 10822.
9. Ambs S., Ogunfusika M.O., Merriam W.G., Bennett W.P., Billiar T.R., Harris C.C. Up-regulation of inducible nitric oxide synthase expression in cancer-prone p53 knockout mice // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1998. – V. 95. – № 15. – P. 8823 – 8828.

10. Andrzejak M., Price M., Kessel D.H. Apoptotic and autophagic responses to photodynamic therapy in 1c1c7 murine hepatoma cells // *Autophagy*. – 2011. – V. 18. – № 3. – P. 979 – 984.
11. Arias-Salvatierra D., Silbergeld E.K., Acosta-Saavedra L.C., Calderon-Aranda E.S. Role of nitric oxide produced by iNOS through NF- κ B pathway in migration of cerebellar granule neurons induced by Lipopolysaccharide // *Cell Signal*. – 2011. – V. 23. – № 2. – P. 425–435.
12. Aubrey B.J., Kelly G.L., Janic A., Herold M.J., Strasser A. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? // *Cell Death Differ*. – 2018. – V. 25. – № 1. – P.104 – 113.
13. Ayton S., Lei P., Hare D.J, Duce J.A., George J.L, Adlard P.A., McLean C., Rogers J.T., Cherny R.A., Finkelstein D.I., Bush A.I. Parkinson's disease iron deposition caused by nitric oxide-induced loss of β -amyloid precursor protein // *J Neurosci*. – 2015. – V. 35. – № 8. – P. 3591 – 3597.
14. Bano D., Ankarcrona M. Beyond the critical point: An overview of excitotoxicity, calcium overload and the downstream consequences. // *Neurosci Lett*. – 2018. – V. 663. – P. 79 – 85.
15. Bano D., Prehn J.H. Apoptosis-Inducing Factor (AIF) in Physiology and Disease: The Tale of a Repented Natural Born Killer // *EBioMedicine*. – 2018. – V. 30. – P. 29 – 37.
16. Barron K.D. The axotomy response. // *J Neurol Sci*. – 2004. – V. 220. –P. 119 – 121.
17. Bauer G. Autoamplificatory singlet oxygen generation sensitizes tumor cells for intercellular apoptosis-inducing signaling // *Mech Ageing Dev*. –2018. – V. 172. – P.59 –77.
18. Bauer G. The Antitumor Effect of Singlet Oxygen // *Anticancer Res*. – 2016. – V. 36. – № 11. – P. 5649 – 5663.
19. Bechet D., Mordon S.R., Guillemin F., Heyob-Barberi M.A. Photodynamic therapy of malignant brain tumours: a complementary approach to conventional therapies // *Cancer Treat Rev*. – 2014. – V. 40. – № 2. – P. 229–241.

20. Beckett C, Nalivaeva NN, Belyaev ND, Turner AJ. Nuclear signalling by membrane protein intracellular domains: the AICD enigma // *Cell Signal.* – 2012. – V. 24. – № 2. – P.402 – 409.
21. Bellamy T.C. On the activation of soluble guanylylcyclase by nitric oxide / T.C. Bellamy, J. Wood, J. Garthwaite // *PNAS.* – 2002. – V. 99. – № 1. – P. 507 – 510.
22. Bentires M. Kappa-B nuclear factor and apoptosis of cancerous cells. // *Bull Mem.Acad. R. Med Belg.* – 2001. – V. – 156. – P. 329–337.
23. Berezhnaya E.V., Bibov M.Y., Komandirov M.A., Neginskaya M.A., Rudkovskii M.V., Uzdensky A.B. Involvement of MAPK, Akt/GSK-3 β and AMPK/mTOR signaling pathways in protection of remote glial cells from axotomy-induced necrosis and apoptosis in the isolated crayfish stretch receptor // *Mol Cell Neurosci.* – 2017. – V. 83. – P. 1–5.
24. Bernstein J.J., Goldbery W.J., Laws E.R. C6 glioma cells invasion and migration of rat brain after neural homografting: Ultrastructure // *Neurosurg.* – 1990. – V.26. – P. 622– 628.
25. Beyfuss K., Hood D.A. A systematic review of p53 regulation of oxidative stress in skeletal muscle. // *Redox Rep.* – 2018. – V. 23. – P.100 – 117.
26. Bhowmick R., Girotti A.W. Rapid upregulation of cytoprotective nitric oxide in breast tumor cells subjected to a photodynamic therapy-like oxidative challenge // *Photochem Photobiol.* – 2011. – V.87. – № 2. – P. 378–386.
27. Bhowmick R., Girotti A.W. Signaling events in apoptotic photokilling of 5-aminolevulinic acid-treated tumor cells: inhibitory effects of nitric oxide // *Free Radic Biol Med.* – 2009. – V.47. – P. 731–740.
28. Bird SM, Sohrabi HR, et al. Cerebral amyloid- β accumulation and deposition following traumatic brain injury--A narrative review and meta-analysis of animal studies. // *Neurosci Biobehav Rev.* – 2016. – V.64. – P.215 – 228.
29. Bloom M.J., Saksena S.D., Swain G.P., Behar M.S., Yankeelov T.E., Sorace A.G. The effects of IKK-beta inhibition on early NF-kappa-B activation and transcription of downstream genes // *Cell Signal.* – 2019 – V. 55. – P. –17 – 25.

30. Bolte, S., Cordelières F.P. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy // *Journal of microscopy*. – 2006. – V.224. – No 3. – P. 213–232.
31. Bonavida B. Regulation of cell death apoptotic pathways by nitric oxide in cancer: reversal of drug/immune resistance // *Redox Biol.* – 2015. – V. 5. – P. 415.
32. Bonavida B. RKIP-mediated chemo-immunosensitization of resistant cancer cells via disruption of the NF- κ B/Snail/YY1/RKIP resistance-driver loop // *Crit Rev Oncog.* – 2014. – V. 19. – № 6. – P. 435 – 445.
33. Bonini P., Cicconi S., Cardinale A., Vitale C., Serafino A.L., Ciotti M.T., Marlier L.N. (2004) Oxidative stress induces p53-mediated apoptosis in glia: p53 transcription-independent way to die // *J Neurosci Res.* – 2004. – V.75. – P. 83 – 95.
34. Bouton C., Demple B. Nitric oxide-inducible expression of heme oxygenase-1 in human cells. Translation-independent stabilization of the mRNA and evidence for direct action of nitric oxide // *J Biol Chem.* – 2000. – V. 275. – № 42. – P. 32688 – 93.
35. Brandt T., Kaar J., Fersht A., Veprintsev D. Stability of p53 homologs // *PLoS One.* – 2012. – V.7. – P. e47889.
36. Bretones G, Delgado M.D, León J. Myc and cell cycle control // *Biochim Biophys Acta* – 2015. – V. 1848. – P. 506 – 516.
37. Brilkina A.A., Dubasova L.V., Sergeeva E.A., Pospelov A.J., Shilyagina N.Y., Shakhova N.M., Balalaeva I.V. Photobiological properties of phthalocyanine photosensitizers Photosens, Holosens and Phthalosens: A comparative in vitro analysis // *J Photochem Photobiol B.* – 2019. – V. 191. – P. 128 – 134.
38. Broekgaarden M. Tumor cell survival pathways activated by photodynamic therapy: a molecular basis for pharmacological inhibition strategies // Broekgaarden M., Weijer R., Gulik T.M. van, Hamblin M.R., Heger M. // *Cancer and Metastasis Reviews.* – 2015. – V. 34. – № 4. – P.643–690.

39. Brooks C., Gu W. 2010. New insights into p53 activation. *Cell Research*. – 2010. – V. 20. – P.614–621.
40. Brown G.C, Vilalta A. How microglia kill neurons // *Brain Res*. – 2015. – V. 1628. – P.288 – 297.
41. Brown G.C. Nitric oxide and neuronal death // *Nitric Oxide*. – 2010. – V. 23. – № 3. – P.153–165.
42. Brunholz S., Sisodia S., Lorenzo A., Deyts C., Kins S., Morfini G. Axonal transport of APP and the spatial regulation of APP cleavage and function in neuronal cells // *Exp Brain Res*. – 2012. – V. 217. – № 3. – P. 353–364.
43. Buchholz J., Walt H. Veterinary photodynamic therapy: a review // *Photodiagnosis Photodyn Ther*. – 2013. – V. 10. – № 4. – P. 342 – 347.
44. Bukhari H., Glotzbach A., Kolbe K., Leonhardt G., Loosse C., Müller T. Small things matter: Implications of APP intracellular domain AICD nuclear signaling in the progression and pathogenesis of Alzheimer's disease // *Prog Neurobiol*. – 2017. – V. 156. – P. 189 – 213.
45. Buytaert E., Dewaele M., Agostinis P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy // *Biochim Biophys Acta*. – 2007. – V. 1776. – P. 86 – 107.
46. Caggiano AO, Kraig RP. Neuronal nitric oxide synthase expression is induced in neocortical astrocytes after spreading depression // *J Cereb Blood Flow Metab*. – 1998. – V. 18. – № 1. – P. 75 – 87.
47. Cai Z.X., Guo H.S., Wang C., Wei M., Cheng C., Yang Z.F., Chen Y.W., Le W.D., Li S. Double-edged roles of nitric oxide signaling on APP processing and amyloid- β production in vitro: preliminary evidence from sodium nitroprusside // *Neurotox Res*. – 2016. – V. 29. – № 1. – P. 21 – 34.
48. Calabrese V. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity // *Nat. Rev. Neurosci*. – 2007. – V. 8. – №. 10. – P.766–775.
49. Camins A., Verdaguer E., Folch J., Beas-Zarate C., Canudas A.M., Pallàs M. Inhibition of ataxia telangiectasia-p53-E2F-1 pathway in neurons as a target for

- the prevention of neuronal apoptosis // *Current drug metabolism*. – 2007. – V. 8. – № 7. – P. 709 – 715.
50. Cao AR, Rabinovich R, Xu M, Xu X, Jin VX, Farnham PJ. Genome-wide analysis of transcription factor E2F1 mutant proteins reveals that N- and C-terminal protein interaction domains do not participate in targeting E2F1 to the human genome // *J Biol Chem*. – 2011. – V. 286. – № 14. – P. 11985 – 11996.
51. Carafoli E. Calcium-mediated cellular signals: a story of failures // *Trends Biochem Sci*. – 2004. – V. 29. – № 7. – P. 371–379.
52. Carneiro Z.A., de Moraes J.C., Rodrigues F.P., de Lima R.G., Curti C., da Rocha Z.N., Paulo M., Bendhack L.M., Tedesco A.C., Formiga A.L., da Silva R.S. Photocytotoxic activity of a nitrosyl phthalocyanine ruthenium complex—a system capable of producing nitric oxide and singlet oxygen // *J. Inorg. Biochem*. – 2011. – V. 105. – P. 1035–1045.
53. Carnevale J., Palander O., Seifried L.A., Dick F.A. DNA damage signals through differentially modified E2F1 molecules to induce apoptosis // *Molecular and cellular biology*. – 2012. – V. 35. – № 5. – P. 900 – 912.
54. Carroll C.M, Li Y.M. Physiological and pathological roles of the γ -secretase complex // *Brain Res Bull*. – 2016. – V. 126. – № 2. – P. 199 –206.
55. Carthy C.M., Yanagawa B., Luo H., Granville D.J., Yang D., Cheung P., Cheung C., Esfandiarei M., Rudin C.M., Thompson C.B., Hunt D.W., McManus B.M. Bcl-2 and Bcl-xL overexpression inhibits cytochrome c release, activation of multiple caspases, and virus release following coxsackievirus B3 infection // *Virology*. – 2003. – V. 313. – № 1. – P. 147 – 157.
56. Caruso G., Spampinato S.F., Cardaci V., Caraci F., Sortino M.A., Merlo S. β -amyloid and Oxidative Stress: Perspectives in Drug Development // *Curr Pharm Des*. – 2019. – V. 25. – № 45. – P. 4771 – 4781.
57. Casas C., Isus L., Herrando-Grabulosa M., Mancuso F.M., Borrás E., Sabidó E., Forés J., Aloy P. Network-based proteomic approaches reveal the neurodegenerative, neuroprotective and pain-related mechanisms involved after retrograde axonal damage // *Sci Rep*. – 2015. – V. 18. – № 5. – P. 9185.

58. Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part two – cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death // *Photodiagn. Photodyn. Ther.* – 2005. – V. 2. – P. 1 – 23.
59. Ceol C. J., Horvitz H. R. dpl-1 DP and efl-1 E2F act with lin-35 Rb to antagonize Ras signaling in *C. elegans* vulval development // *Molecular cell.* – 2001. – V. 7. – № 3. – P. 461 – 473.
60. Cerro P.D., Barriga-Martín A., Vara H., Romero-Muñoz L.M., Rodríguez-De-Lope Á., Collazos-Castro J.E. Neuropathological and Motor Impairments after Incomplete Cervical Spinal Cord Injury in Pigs // *J Neurotrauma.* – 2021. – V. 38. – № 21. – P. 2956 – 2977.
61. Chao C. Mechanisms of p53 degradation // *Clin. Chim. Acta.* – 2015. – V. 438. – P. 139 – 147.
62. Checler F., Alvs da Costa C. p53 in neurodegenerative diseases and brain cancers // *Pharmacol Ther.* – 2014. – V. 142. – P. 99 – 113.
63. Chemaly E.R., Troncone L., Lebeche D. SERCA control of cell death and survival // *Cell Calcium.* – 2018. – V. 69. – P. 46 – 61.
64. Chen C.A., Wang T.Y., Varadharaj S., Reyes L.A., Hemann C., Talukder M.A., Chen Y.R., Druhan L.J., Zweier J.L. S-glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function // *Nature.* – 2010. – V. 468. – P. 1115 – 1118.
65. Choi Y.B., Tenneti L., Le D.A., Ortiz J., Bai G., Chen H.S., Lipton S.A. Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S-nitrosylation // *Nat Neurosci.* – 2000. – V. 3. – № 1. – P. 15 – 21.
66. Chow V.W., Mattson M.P., Wong P.C., Gleichmann M. An overview of APP processing enzymes and products // *Neuromolecular Med.* – 2010. – V. 12. – № 1. – P. 1 – 12.
67. Chu T.H., Wu W.T. Nitric oxide synthase inhibitor attenuates number of regenerating spinal motoneurons in adult rats // *Neuroreport.* – 2006. – V. 17. – № 10. – P. 969 – 973.

68. Clapham D.E. Calcium signaling // *Cell*. – 2007. – V. 131. – № 6. – P. 1047 – 1058.
69. Connelly L., Jacobs A.T., Palacios-Callender M., Moncada S., Hobbs A.J. Macrophage endothelial nitric-oxide synthase autoregulates cellular activation and pro-inflammatory protein expression // *J Biol Chem*. – 2003. – V. 278. – № 29. – P. 26480 – 26710.
70. Cooke R.M., Mistry R., Challiss R.A., Straub V.A. Nitric oxide synthesis and cGMP production is important for neurite growth and synapse remodeling after axotomy // *J Neurosci*. – 2013. – V. 33. – № 13. – P. 5626 – 5637.
71. Coutts A.S., Adams C.J., La Thangue N.B. p53 ubiquitination by Mdm2: a never ending tail? // *DNA Repair (Amst)*. – 2009. – V. 8. – № 4. – P. 483 – 490.
72. Cristino L., Pica A., Della Corte F., Bentivoglio M. Co-induction of nitric oxide synthase, bcl-2 and growth-associated protein-43 in spinal motoneurons during axon regeneration in the lizard tail // *Neuroscience*. – 2000. – V. 101. – № 2. – P. 451 – 458.
73. Cuesta A., Zambrano A., Royo M., Pascual A. The tumour suppressor p53 regulates the expression of amyloid precursor protein (APP) // *Biochem J*. – 2009. – V. 418. – № 3. – P. 643 – 650.
74. Cui X., Zhang J., Ma P., Myers D.E., Goldberg I.G., Sittler K.J., Barb J.J., Munson P.J., Cintron Adel P., McCoy J.P., Wang S., Danner R.L. cGMP-independent nitric oxide signaling and regulation of the cell cycle // *BMC Genomics*. – 2005. – V. 3. – № 6. – P. 151.
75. Culmsee C., Mattson M.P. p53 in neuronal apoptosis // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2005. – V. 331. – P. 761 – 777.
76. Dai C.Q., Luo T.T., Luo S.C., Wang J.Q., Wang S.M., Bai Y.H., Yang Y.L., Wang Y.Y. p53 and mitochondrial dysfunction: novel insight of neurodegenerative diseases. *J Bioenerg Biomembr*. – 2016. – V. 48. – P. 337 – 47.
77. Daiber A., Xia N., Steven S., Oelze M., Hanf A., Krölller-Schön S., Münzel T., Li H. New Therapeutic Implications of Endothelial Nitric Oxide Synthase

- (eNOS) Function/Dysfunction in Cardiovascular Disease // *Int J Mol Sci.* – 2019. – V. 20. – № 1. – P.187.
- 78.Dammann I., Wemheuer W.M., Wrede A., Wemheuer W.E., Campe A., Petschenka J., Schulze-Sturm U., Hahmann U., Czerny C.P., Münster P., Brening B., Kreienbrock L., Herden C., Schulz-Schaeffer W.J. Unexpected high frequency of neurofibroma in the celiac ganglion of German cattle // *Vet Res.* – 2020. – V. 51. – № 1. – P.82.
- 79.Das R., Coupar J., Clavijo P.E., Saleh A., Cheng T.F., Yang X., Chen J., Van Waes C., Chen Z. Lymphotoxin- β receptor-NIK signaling induces alternative RELB/NF- κ B2 activation to promote metastatic gene expression and cell migration in head and neck cancer // *Mol Carcinog.* – 2018. – V. 58. – No. 3. – P. 411– 425.
- 80.Dawkins E, Small D.H. Insights into the physiological function of the β -amyloid precursor protein: beyond Alzheimer's disease // *J Neurochem.* – 2014. – V. 129. – P. 756 – 769.
- 81.Dawson T.M., Steiner J.P., Dawson V.L., Dinerman J.L., Uhl G.R., Snyder S.H. Immunosuppressant FK506 enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against glutamate neurotoxicity // *ProcNatlAcadSci USA.* – 1993. – V. 90. – № 21. – P. 9808 – 9812.
- 82.Dawson V. L. Nitric oxide: role in neurotoxicity // *Clin Exp Pharmacol Physiol.* – 1995. – V. 22. – № 4. – P. 305 – 308.
- 83.DeGiorgio L.A., Shimizu Y., Chun H.S., Kim Y.S., Sugama S., Son J.H., Joh T.H., Volpe B.T. Amyloid precursor protein gene disruption attenuates degeneration of substantia nigra compacta neurons following axotomy // *Brain Res.* – 2002. – V. 938. – № 1. – P. 38 – 44.
- 84.Déliot N., Constantin B. Plasma membrane calcium channels in cancer: Alterations and consequences for cell proliferation and migration // *Biochim Biophys Acta.* – 2015. – V. 1848. – № 10. – P. 2512 – 2522.
- 85.Della Pietra E., Simonella F., Bonavida B., Xodo L.E., Rapozzi V. Repeated sub-optimal photodynamic treatments with pheophorbide a induce an epithelial

- mesenchymal transition in prostate cancer cells via nitric oxide // Nitric Oxide. – 2015. – V. 45. – P. 43 – 53.
- 86.Demyanenko S., Dzreyan V., Uzdensky A. Axotomy-induced changes of the protein profile in the crayfish ventral cord ganglia // J Mol Neurosci. – 2019. – V. 68. – P. 667 – 678.
- 87.Demyanenko S., Uzdensky A. (2017). Profiling of Signaling Proteins in Penumbra After Focal Photothrombotic Infarct in the Rat Brain Cortex // Molecular. – 2017. – V. 54. – № 9. – P. 6839 – 6856.
- 88.Derbyshire E.R., Marletta M.A. Structure and regulation of soluble guanylatecyclase // Annu. Rev. Biochem. – 2012. – V.81. – P.533 – 559.
- 89.Deuker MM, Lewis KN, Ingaramo M, Kimmel J, Buffenstein R, Settleman J. Unprovoked Stabilization and Nuclear Accumulation of the Naked Mole-Rat p53 Protein // Sci Rep. – 2020. – V. 10. – № 1. – P. 6966
- 90.Di Giovanni S., Knights C.D., Rao M., Yakovlev A., Beers J., Catania J., Avantaggiati M.L., Faden A.I. The tumor suppressor protein p53 is required for neurite outgrowth and axon regeneration // EMBO J. – 2006. – V. 25. – № 17. – P. 4084 – 4096.
- 91.Di Giovanni S., Rathore K. p53-Dependent pathways in neurite outgrowth and axonal regeneration // Cell Tissue Res. – 2012. – V. 349. – №. 1. – P. 87 – 95.
- 92.DiFazio J., Fletcher D.J. Updates in the management of the small animal patient with neurologic trauma // Vet Clin North Am Small Anim Pract. – 2013. – V. 43. – №. 4. – P. 915 – 940.
- 93.Dolman N.J., Tepikin A.V. Calcium gradients and the Golgi // Cell Calcium. – 2006. – V. 40. – No. 5-6. – P. 505 – 512.
- 94.Dong X.X., Wang Y.R., Qin S., Liang Z.Q., Liu B.H., Qin Z.H., Wang Y. (2012) p53 mediates autophagy activation and mitochondria dysfunction in kainic acid-induced excitotoxicity in primary striatal neurons // Neuroscience. – 2012. – V. 207. – P. 52 – 64.

95. Duan X., Qiao M., Bei F., Kim I.J., He Z., Sanes J.R. Subtype-specific regeneration of retinal ganglion cells following axotomy: effects of osteopontin and mTOR signaling // *Neuron*. – 2015. – V. 85. – №. 6. – P. 1244– 1256.
96. Duda J., Pötschke C., Liss B. Converging roles of ion channels, calcium, metabolic stress, and activity pattern of Substantia nigra dopaminergic neurons in health and Parkinson's disease // *J Neurochem*. – 2006. – V. 139. – P. 156 – 178.
97. Dzreyan V., Rodkin S., Nikul V., Pitinova M., Uzdensky A. The Expression of E2F1, p53, and Caspase 3 in the Rat Dorsal Root Ganglia After Sciatic Nerve Transection // *J Mol Neurosci*. – 2021. – V. 74. – №. 4. – P. 826 – 835.
98. Dzreyan V.A., Rodkin S.V., Pitinova M.A., Uzdensky A.B. HDAC1 Expression, Histone Deacetylation, and Protective Role of Sodium Valproate in the Rat Dorsal Root Ganglia After Sciatic Nerve Transection // *Mol Neurobiol*. – 2021. – V. 58. – №. 1. – P. 217 – 228.
99. El-Husseini A.E., Bladen C., Williams J.A., Reiner P.B., Vincent S.R. Nitric oxide regulates cyclic GMP-dependent protein kinase phosphorylation in rat brain // *J Neurochem*. – 1998. – V. 71. – P. 676 – 683.
100. Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death // *Toxicol Pathol*. – 2007. – V. 35. – P. 495 – 516.
101. Eminaga S., Palus V., Cherubini G.B. Acute spinal cord injury in the cat: causes, treatment and prognosis // *J Feline Med Surg*. – 2011. – V. 13. – №. 11. – P. 850 – 862.
102. Emirandetti A, Simões GF, Zanon RG, Oliveira AL. Spinal motoneuron synaptic plasticity after axotomy in the absence of inducible nitric oxide synthase // *J Neuroinflammation*. – 2010. – V. 24. – №. 7. – P. 31.
103. Engelmann D., Pützer B.M. Translating DNA damage into cancer cell death-A roadmap for E2F1 apoptotic signalling and opportunities for new drug combinations to overcome chemoresistance // *Drug Resist Updat*. – 2010. – V. 13. – P. 119 – 131.

104. Erickson J.D., Bazan N.G. The nucleolus fine-tunes the orchestration of an early neuroprotection response in neurodegeneration // *Cell Death Differ.* – 2013. – V. 20. – No. 11. – P. 1435 – 1437.
105. Eroglu E., Hallström S., Bischof H., Opelt M., Schmidt K., Mayer B., Waldeck-Weiermair M., Graier W.F., Malli R. Real-time visualization of distinct nitric oxide generation of nitric oxide synthase isoforms in single cells // *Nitric Oxide.* – 2017. – V.70. – P. 59 – 67.
106. Ertosun M.G., Hapil F.Z., Osman Nidai O. E2F1 transcription factor and its impact on growth factor and cytokine signaling // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2016. – V. 31. – P. 17 – 25.
107. Evangelopoulos M.E., Wüller S., Weis J., Krüttgen A. A role of nitric oxide in neurite outgrowth of neuroblastoma cells triggered by mevastatin or serum reduction // *Neurosci Lett.* – 2010. – V. 468. – № 1. – P. 28 – 33.
108. Fadda E., Nixon M. The transient manifold structure of the p53 extreme C-terminal domain: Insight into disorder, recognition, and binding promiscuity by molecular dynamics simulations // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2017. – V. 19. – P. 21287 – 21296.
109. Fahey J.M., Emmer J.V., Korytowski W., Hogg N., Girotti A.W. Antagonistic Effects of Endogenous Nitric Oxide in a Glioblastoma Photodynamic Therapy Model // *Photochem Photobiol.* – 2016. – V. 92. – No. 6. – P. 842 – 853.
110. Fahey J.M., Girotti A.W. Accelerated migration and invasion of prostate cancer cells after a photodynamic therapy-like challenge: Role of nitric oxide // *Nitric Oxide.* – 2015. – V. 49. – P. 47 – 55.
111. Fang Z., Lin M., Li C., Liu H., Gong C. A comprehensive review of the roles of E2F1 in colon cancer // *Am J Cancer Res.* – 2020. – V. 10. – №. 3. – P. 757 – 768.
112. Faria M., Matos P., Pereira T., Cabrera R., Cardoso B.A., Bugalho M.J, Silva A.L. RAC1b overexpression stimulates proliferation and NF-kB-mediated

- anti-apoptotic signaling in thyroid cancer cells // *PLoS One*. – 2017. – V. 12. – № 2. – P. e0172689.
113. Farrell A.J., Blake D.R. Nitric oxide // *Annal. Rheum. Dis*. – 1996. – V. 55. – P. 7 – 20.
114. Fawcett J.W., Verhaagen J. Intrinsic Determinants of Axon Regeneration // *Dev Neurobiol*. – 2018. – V. 78. – № 10. – P. 890 – 897.
115. Fedorenko G.M., Uzdensky A.B. Ultrastructure of neuroglial contacts in crayfish stretch receptor // *Cell Tissue Res*. – 2009. – V. 337. – P. 477 – 490.
116. Finnie J. Animal models of traumatic brain injury: a review // *Aust Vet J*. – 2001. – V. 79. – № 9. – P. 628 – 633.
117. Finnie J.W. Comparative approach to understanding traumatic injury in the immature, postnatal brain of domestic animals // *Aust Vet J*. – 2012. – V. 90. – № 8. – P. 301 – 307.
118. Finnie J.W. Pathology of traumatic brain injury // *Vet Res Commun*. – 2014. – V. 38. – № 4. – P. 297 – 305.
119. Fisher M. Census and evaluation of p53 target genes // *Oncogenes*. – 2017. – V. 36. – P. 3943 – 3956.
120. Fleming I., Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. – 2003. – V. 284. – № 1. – P. 1 – 12.
121. Florean C., Song S., Dicato M., Diederich M. Redox biology of regulated cell death in cancer: A focus on necroptosis and ferroptosis // *Free Radic Biol Med*. – 2019. – V. 134. – P. 177 – 189.
122. Förstermann U., Sessa W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function // *Eur Heart J*. – 2012. – V. 33. – No. 7. – P. 829 – 837.
123. Förstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease // *Pflugers Arch*. – 2010. – V. 459. – P. 923 – 937.
124. Förstermann U. Regulation of nitric oxide synthase expression and activity // *Nitric Oxide*. – 2000. – V. 143. – P. 71 – 91.

125. Forterre F., Tomek A., Rytz U., Brunberg L., Jaggy A., Spreng D. Iatrogenic sciatic nerve injury in eighteen dogs and nine cats (1997-2006) // *Vet Surg.* – 2007. – V. 36. – № 5. – P. 464 – 471.
126. Fukumura D., Kashiwagi S., Jain R.K. The role of nitric oxide in tumour progression // *Nat Rev Cancer.* – 2006. – V. 6. – №. 7. – P. 521 – 534.
127. Fulton D.J. Transcriptional and Posttranslational Regulation of eNOS in the Endothelium // *Adv Pharmacol.* – 2016. – V. 77. –P. 29 – 64.
128. Gao Y., Zhou S., Xu Y., Sheng S., Qian S.Y., Huo X. Nitric oxide synthase inhibitors 1400W and L-NIO inhibit angiogenesis pathway of colorectal cancer // *Nitric Oxide.* – 2019. – V. 1. – P. 33 – 39.
129. Garcia V., Sessa W.C. Endothelial NOS: perspective and recent developments // *Br J Pharmacol.* – 2019. – V. 176. – № 2. – P. 189 – 196.
130. Garthwaite J. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission // *Eur. J. Neurosci.* – 2008. – V. 27. – P. 2783 – 2802.
131. Garthwaite J. NO as a multimodal transmitter in the brain: discovery and current status // *Br J Pharmacol.* – 2019. – V. 176. – № 2. – P. 197 – 211.
132. Gaub P., Tedeschi A., Puttagunta R., Nguyen T., Schmandke A., Di Giovanni S. HDAC inhibition promotes neuronal outgrowth and counteracts growth cone collapse through CBP/p300 and P/CAF-dependent p53 acetylation // *Cell Death Differ.* – 2010. – V. 17. – P. 1392 – 1408.
133. Geiselhoring A., Gaisa M., Hofmann F., Schlossmann J. Distribution of IRAG and cGKI-isoforms in murine tissues // *FEBS Lett.* – 2004. – V. 575. – P. 19 – 22.
134. Gemes G., Rigaud M., Weyker P.D., Abram S.E., Weihrauch D., Poroli M., Zoga V., Hogan Q.H. Depletion of calcium stores in injured sensory neurons: anatomic and functional correlates // *Anesthesiology.* – 2009. – V.111. – № 2. – P. 393 – 405.
135. Geng Y., Lotz M. Increased intracellular Ca²⁺ selectively suppresses IL-1-induced NO production by reducing iNOS mRNA stability // *J Cell Biol.* – 1995. – V. 129. – P. 1651 – 1657.

136. Giorgi C., Baldassari F., Bononi A., Bonora M., De Marchi E., Marchi S., Missiroli S., Patergnani S., Rimessi A., Suski J.M., Wieckowski M.R., Pinton P. Mitochondrial Ca(2+) and apoptosis // *Cell Calcium*. – 2012. – V. 52. – № 1. – P. 36 – 43.
137. Girotti A.W. Upregulation of nitric oxide in tumor cells as a negative adaptation to photodynamic therapy // *Lasers Surg Med*. – 2018. – V. 50. – № 5. – P. 590 – 598.
138. Giuliano E.A., Johnson P.J., Delgado C., Pearce J.W., Moore C.P. Local photodynamic therapy delays recurrence of equine periocular squamous cell carcinoma compared to cryotherapy // *Vet Ophthalmol*. – 2014. – V. 17. – № 1. – P. 37 – 45.
139. Giuliano E.A., MacDonald I., McCaw D.L., Dougherty T.J., Klauss G., Ota J., Pearce J.W., Johnson P.J. Photodynamic therapy for the treatment of periocular squamous cell carcinoma in horses: a pilot study // *Veterinary Ophthalmology*. – 2008. – V. 11. – № 1. – P. 27– 34.
140. Glas M., Frick T., Springe D., Putzu A., Zuercher P., Grandgirard D., Leib S.L., Jakob S.M., Takala J., Haenggi M. Neuroprotection with the P53-inhibitor pifithrin- μ after cardiac arrest in a rodent model // *Shock*. – 2018. – V. 49. – P. 229– 234.
141. Gonzalez-Hernandez T., Rustioni A. Expression of three forms of nitric oxide synthase in peripheral nerve regeneration // *J. Neurosci. Res*. – 1999. – V. 55. – P. 198 – 207.
142. Gottifredi V., Prives C. Getting p53 out of the nucleus // *Science*. – 2001. – V. 292. – P. 1851 – 1852.
143. Goyagi T., Goto S., Bhardwaj A., Dawson V.L., Hurn P.D., Kirsch J.R. Neuroprotective effect of sigma(1)-receptor ligand 4-phenyl-1-(4-phenylbutyl) piperidine (PPBP) is linked to reduced neuronal nitric oxide production // *Stroke*. – 2001. – V. 32. – № 7. – P. 1613 – 1620.

144. Grivennikov S.I., Karin M. Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2010. – V. 21. – № 1. – P. 11 – 9.
145. Gu L., Wang Z., Zuo J., Li H., Zha L. Prognostic significance of NF-κB expression in non-small cell lung cancer: A meta-analysis // *PLoS One.* – 2018. – V. 13. – № 5. – P. 198 – 223.
146. Guglielmotto M., Aragno M., Autelli R., Giliberto L., Novo E., Colombatto S., Danni O., Parola M., Smith M.A., Perry G., Tamagno E., Tabaton M. The up-regulation of BACE1 mediated by hypoxia and ischemic injury: role of oxidative stress and HIF1alpha // *J Neurochem.* – 2009. – V. 108. – P. 1045 – 1056.
147. Guo Q., Wang Z., Li H., Wiese M., Zheng H. APP physiological and pathophysiological functions: insights from animal models // *Cell Res.* – 2012. – V. 22. – P. 78 – 89.
148. Gupta S., Ahmad N., Mukhtar H. Involvement of nitric oxide during phthalocyanine (Pc4) photodynamic therapy-mediated apoptosis // *Cancer Res.* – 1998. – V. 58. – № 9. – P. 1785 – 1788.
149. Haass C., Kaether C., Thinakaran G., Sisodia S. Trafficking and proteolytic processing of APP // *Cold Spring Harb Perspect Med.* – 2012. – V. 2. – P. a006270.
150. Han J.M., Tanimura A., Kirk V., Sneyd J. A mathematical model of calcium dynamics in HSY cells // *PLoS Comput Biol.* – 2017. – V. 13. – № 2. – P. e1005275.
151. Hefter D., Draguhn A. APP as a Protective Factor in Acute Neuronal Insults. // *Front Mol Neurosci.* – 2017. – V.10. – P. 22.
152. Henderson B.W., Sitnik-Busch T.M., Vaughan L.A. Potentiation of photodynamic therapy antitumor activity in mice by nitric oxide synthase inhibition is fluence rate dependent // *PhotochemPhotobiol.* – 1999. – V. 70. – P. 64 – 71.

153. Hicks D.A., Jones A.C., Pickering-Brown S.M., Hooper N.M. The cellular expression and proteolytic processing of the amyloid precursor protein is independent of TDP-43 // *Biosci Rep.* – 2010. – V. 40. – № 4. – P. BSR20200435.
154. Hicks DA. TDP-43 and amyloid precursor protein processing: implications for Alzheimer's disease // *Neural Regen Res.* – 2021. – V. 16. – № 7. – P. 1402 – 1403.
155. Hicks J., Platt S., Kent M., Haley A. Canine brain tumours: a model for the human disease? // *Vet Comp Oncol.* – 2017. – V. 15. – № 1. – P. 252 – 272.
156. Hinz M., Scheidereit C. The I κ B kinase complex in NF- κ B regulation and beyond // *EMBO Rep.* – 2014. – V. 15. – №. 1. – P. 46 – 61.
157. Hoesel B., Schmid J.A. The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer // *Mol. Cancer.* – 2013. – V. 12. – №. 1. – P.86.
158. Hofmann F., Feil R., Kleppisch T., Schlossmann J. Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion // *Physiol. Rev.* – 2006. – V. 86. – P. 1 – 23.
159. Hoorelbeke D., Decrock E., Van Haver V., De Bock M., Leybaert L. Calcium, a pivotal player in photodynamic therapy? // *Biochim Biophys Acta.* – 2018. – P. 30232 – 30235.
160. Huang W., Cao Y., Liu Y., Ping F., Shang J., Zhang Z., Li Y. Activating Mas receptor protects human pulmonary microvascular endothelial cells against LPS-induced apoptosis via the NF-kB p65/P53 feedback pathways // *J Cell Physiol.* – 2018. – 2019. – V. 234. – №. 8. – P. 12865 – 12875.
161. Hunter J.E., Leslie J., Perkins N.D. c-Rel and its many roles in cancer: an old story with new twists // *Br J Cancer.* – 2016. – V. 114. – №. 1. – P. 1 – 6.
162. Ikonomovic M.D., Mi Z., Abrahamson E.E. Disordered APP metabolism and neurovasculature in trauma and aging: Combined risks for chronic neurodegenerative disorders. // *Ageing Res Rev.* – 2017. – V. 34. – P. 51 – 63.

163. Inoue T., Fukuo K., Nakahashi T., Hata S., Morimoto S., Ogihara T. cGMP upregulates nitric oxide synthase expression in vascular smooth muscle cells // *Hypertension*. – 1995. – V. 25. – P. 711 – 714.
164. Issa M.C, Manela-Azulay M. Photodynamic therapy: a review of the literature and image documentation // *An Bras Dermatol*. – 2010. – V. 85. – № 4. – P. 501 – 511.
165. Jacobsen K.T., Iverfeldt K. Amyloid precursor protein and its homologues: a family of proteolysis-dependent receptors // *Cell Mol Life Sci*. – 2009. – V. 66. – P. 2299 – 22318.
166. Jäkel S., Dimou L. Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation // *Front Cell Neurosci*. – 2017. – V. 13. – №. 11. – P. 24.
167. Jebelli J.D., Hooper C., Garden G.A., Pocock J.M. Emerging roles of p53 in glial cell function in health and disease // *Glia*. – 2012. – V. 60. – №. 4. – P. 515 – 525.
168. Ji J.H., Kim Y.Y., Patel K., Cho N., Park S.E., Ko M.S., Park S.J., Kim J.O. Dexamethasone Facilitates NF- κ B Signal Pathway in TNF- α stimulated Rotator Cuff Tenocytes // *J Microbiol Biotechnol*. – 2018. – V. 29. – №. 2. – P. 297 – 303.
169. Julius D., Basbaum A. I., Molecular mechanisms of nociception // *Nature*. – 2001. – V. 413. – №. 6852. – P. 203 – 210.
170. Kadas D., Klein A., Krick N., Worrell J.W., Ryglewski S., Duch C. Dendritic and Axonal L-Type Calcium Channels Cooperate to Enhance Motoneuron Firing Output during *Drosophila* Larval Locomotion // *J Neurosci*. – 2017. – V. 37. – № 45. – P. 10971 – 10982.
171. Kang R., Kroemer G., Tang D. The tumor suppressor protein p53 and the ferroptosis network // *Free Radic Biol Med*. – 2019. – V. 133. – P. 162 – 168.
172. Kannappan R., Mattapally S., Wagle P., Zhang J. Transactivation domain of p53 regulates DNA repair and integrity in human iPS cells // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. – 2018. – V. 315. – P. 512 – 521.

173. Karakostis K., López I., Peña-Balderas A., Fåhareus R., Olivares-Illana V. 2020. Molecular and biochemical techniques for deciphering p53-MDM2 regulatory mechanisms // *Biomolecules*. – 2020. – V. 11. – № 1. – P. 36.
174. Karbach S., Wenzel P., Waisman A., Munzel T., Daiber A. eNOS uncoupling in cardiovascular diseases--the role of oxidative stress and inflammation // *Curr Pharm Des*. – 2014. – V. 20. – № 22. – P. 3579 – 3594.
175. Kawamoto E.M., Vivar C., Camandola S. Physiology and pathology of calcium signaling in the brain // *Front Pharmacol*. – 2012. – V. 3. – P. 61.
176. Kelley B.J., Farkas O., Lifshitz J., Povlishock J.T. Traumatic axonal injury in the perisomatic domain triggers ultrarapid secondary axotomy and Wallerian degeneration // *Exp Neurol*. – 2006. – V. 198. – № 2. – P. 350 – 360.
177. Kessel D., Castelli M. Evidence that bcl-2 is the target of three photosensitizers that induce a rapid apoptotic response // *Photochem Photobiol*. – 2001. – V. 74. – P. 318 – 322.
178. Kessel D.H., Price V., Reiners J., John J. ATG7 deficiency suppresses apoptosis and cell death induced by lysosomal photodamage // *Autophagy*. – 2012. – V. 8. – P. 1333 – 1341.
179. Khaitin A., Rudkovskii M., Uzdensky A. Ca²⁺ mediates axotomy-induced necrosis and apoptosis of satellite glial cells remote from the transection site in the isolated crayfish mechanoreceptor // *Mol Cell Neurosci*. – 2018. – V. 88. – P. 7 – 15.
180. Khaitin A.M., Rudkovskii M.V., Uzdensky A.B. The method of isolation of the crayfish abdominal stretch receptor maintaining a connection of the sensory neuron to the ventral nerve cord ganglion // *Invertebr Neurosci*. – 2015. – V. 15. – № 1. – P. 176.
181. Kim M.K., Yoon C.S., Kim S.G., Park Y.W., Lee S.S., Lee S.K. Effects of 4-Hexylresorcinol on Protein Expressions in RAW 264.7 Cells as Determined by Immunoprecipitation High Performance Liquid Chromatography // *Sci Rep*. – 2019. – V. 9. – № 1. – P.3379.

182. Kim S.H., MacIntyre D.A., Firmino Da Silva M., Blanks A.M., Lee Y.S., Thornton S., Bennett P.R., Terzidou V. Oxytocin activates NF- κ B-mediated inflammatory pathways in human gestational tissues // *Mol Cell Endocrinol.* – 2015. – V. 403. – P. 64 – 77.
183. Kim W.K., Choi Y.B., Rayudu P.V., Das P., Asaad W., Arnelles D.R., Stamler J.S., Lipton S.A. Attenuation of NMDA receptor activity and neurotoxicity by nitroxyl anion, NO⁻ // *Neuron.* – 1999. – V. 24. – № 2. – P. 461 – 469.
184. Kimura S., Uchiyama S., Takahashi H.E., Shibukic K. AMP-dependent long-term potentiation of nitric oxide release from cerebellar parallel fibers in rats // *J. Neurosci.* – 1998. – V. 18. – P. 8551 – 8558.
185. Kına I., Sultuybek G.K., Soydas T., Yenmis G., Biceroglu H., Dirican A., Uzan M., Ulutin T. Variations in Toll-like receptor and nuclear factor-kappa B genes and the risk of glioma // *Br J Neurosurg.* – 2018. – P. 1 – 6.
186. Kiryu-Seo S., Hirayama T., Kato R., Kiyama H. Noxa is a critical mediator of p53-dependent motor neuron death after nerve injury in adult mouse // *J Neurosci.* – 2005. – V. 25. – № 6. – P. 1442 – 1447.
187. Kleinert H., Schwarz P.M., Förstermann U. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase // *Biol Chem.* – 2003. – V. 384. – № 10. – P. 1343 – 1364.
188. Ko H.M., Lee S.H., Bang M., Kim K.C., Jeon S.J., Park Y.M., Han S.H., Kim H.Y., Lee J., Shin C.Y. Tyrosine kinase Fyn regulates iNOS expression in LPS-stimulated astrocytes via modulation of ERK phosphorylation // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2018. – V. 495. – № 1. – P. 1214 – 1220.
189. Kobayashi S., Sasaki T., Katayama T., Hasegawa T., Nagano A., Sato K. Temporal-spatial expression of presenilin 1 and the production of amyloid-beta after acute spinal cord injury in adult rat // *Neurochem Int.* – 2010. – V. 56. – № 3. – P. 387 – 393.

190. Kobeissy F.H. (Ed.). Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects // Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis. – 2015.
191. Kobzik L., Bredt D.S., Lowenstein C.J., Drazen J., Gaston B., Sugarbaker D., et al. Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization // Am J Respir Cell Mol Biol. – 1993. – V. 9. – No. 4. – P. 371 – 710.
192. Kodama T., Koyama Y. Nitric oxide from the laterodorsal tegmental neurons: its possible retrograde modulation on norepinephrine release from the axon terminal of the locus coeruleus neurons // Neuroscience. – 2006. – V. 138. – P. 245 – 256.
193. Koesling D. Structure–function relationships in NO–sensitive Guanylylcyclase. Nitric oxide. biology and pathobiology / D. Koesling, A. Friebe // Academic Press. – 2000. – P. 369–379.
194. Kohlmeier K.A., Leonard C.S. Transmitter modulation of spike-evoked calcium transients in arousal related neurons: muscarinic inhibition of SNX-482-sensitive calcium influx // Eur. J. Neurosci. – 2006. – V. 23. – P. 1151 – 1162.
195. Koistinen N.A., Edlund A.K., Menon P.K., Ivanova E.V., Bacanu S., Iverfeldt K. Nuclear localization of amyloid- β precursor protein-binding protein Fe65 is dependent on regulated intramembrane proteolysis // PLoS One. – 2017. – V. 12. – № 3. – P. e0173888.
196. Kolamunne R.T., Dias I.H., Vernallis A.B., Grant M.M., Griffiths H.R. Nrf2 activation supports cell survival during hypoxia and hypoxia/reoxygenation in cardiomyoblasts; the roles of reactive oxygen and nitrogen species // Redox Biol. – 2013. – P. 418 – 422.
197. Komiya Y., Habas R. Wnt signal transduction pathways // Organogenesis. – 2008. – V. 4. – №. 2. – P. 68 – 75.
198. Kone B.C. Molecular biology of natriuretic peptides and nitric oxide synthases // Cardiovasc Res. – 2001. – V. 51. – №. 3. – P. 426 – 441.

199. Kong L.R., Ong R.W., Tan T.Z., Mohamed Salleh NAB, Thangavelu M, Chan J.V., Koh L.J., Periyasamy G., Lau J.A., Le T.U., Wang L., Lee M., Kannan S., Verma C.S., Lim C.M., Chng W.J., Lane D.P., Venkitaraman A., Hung H.T., Cheok C.F., Goh B.C. Targeting codon 158 p53-mutant cancers via the induction of p53 acetylation. *Nat Commun.* – 2020. – V. 11. – №. 1. – P. 2086.
200. Korbelik M., Shibuya H., Cecic I. Relevance of nitric oxide to the response of tumours to photodynamic therapy // *SPIE.* – 1998. – P. 98 – 105.
201. Korhonen R., Lahti A., Hämäläinen M., Kankaanranta H., Moilanen E. Dexamethasone inhibits inducible nitric-oxide synthase expression and nitric oxide production by destabilizing mRNA in lipopolysaccharide-treated macrophages // *Mol. Pharmacol.* – 2002. – Vol. 62. – No.3. – P.698 – 704.
202. Kouzarides T., Berger S.L. Chromatin modifications and mechanisms // In: Allis C.D., Jenuwein T., Reinberg D (eds) *Epigenetics.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. –2006. – P. 191–209.
203. Kovaleva V., Berezhnaya E., Komandirov M., Rudkovskii M., Uzdensky A. Involvement of nitric oxide in photodynamic injury of neurons and glial cells // *Nitric Oxide.* – 2013. – Vol. 28. – №. 29. – P.46 – 52.
204. Kovaleva V.D, Uzdensky A.B. Photodynamic therapy-induced nitric oxide production in neuronal and glial cells // *J Biomed Opt.* – 2016. – V. 21. – №. 10. – P.105005.
205. Kumari S., Sammut I.A., Giles G.I. The design of nitric oxide donor drugs: s-nitrosothiol tDodSNO is a superior photoactivated donor in comparison to GSNO and SNAP // *Eur. J. Pharmacol.* – 2014. – V. 737. – P. 168 – 176.
206. Lam A.K., Galione A. The endoplasmic reticulum and junctional membrane communication during calcium signaling // *Biochim Biophys Acta.* – 2013. – V. 1833. – No. 11. – P. 2542 – 2559.
207. Lambertucci R.H., Leandro C.G., Vinolo M.A., Nachbar R.T., Dos Reis Silveira L, Hirabara S.M., Curi R., Pithon-Curi T.C. The effects of palmitic acid on nitric oxide production by rat skeletal muscle: mechanism via superoxide and

- iNOS activation // *Cell Physiol Biochem.* – 2012. – V. 30. – №. 5. – P. 1169 – 1180.
208. Lane C., Knight D., Burgess S., Franklin P., Horak F., Legg J., et al. Epithelial inducible nitric oxide synthase activity is the major determinant of nitric oxide concentration in exhaled breath // *Thorax.* – 2004. – V. 59. – №. 9. – P. 757 – 7
209. Lawson S. N. The postnatal development of large light and small dark neurons in mouse dorsal root ganglia: a statistical analysis of cell numbers and size // *J. Neurocytol.* – 1979. – V. 8. – №. 9. – P. 275 – 294.
210. Lechner M., Lirk P., Rieder J. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin // *Semin Cancer Biol.* – 2005. – V. 15. – №. 4. – P. 277 – 289.
211. Lee M., Rey K., Besler K., Wang C., Choy J. Immunobiology of Nitric Oxide and Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase // *Results Probl Cell Differ.* – 2017. – V. 62. – P. 181 – 207.
212. Li D., Li L., Li P., Li Y., Chen X. Apoptosis of HeLa cells induced by a new targeting photosensitizer-based PDT via a mitochondrial pathway and ER stress // *Onco Targets Ther.* – 2015. – V. 8. – P. 703 – 711.
213. Li M., Pehar M., Liu Y., Bhattacharyya A., Zhang S.C., O'Riordan K.J., Burger C., D'Adamio L., Puglielli L. The amyloid precursor protein (APP) intracellular domain regulates translation of p44, a short isoform of p53, through an IRES-dependent mechanism // *Neurobiol Aging.* – 2015. – V. 36. – №. 10. – P. 2725 – 2536.
214. Li S., Ning L.G., Lou X.H., Xu G.Q. Necroptosis in inflammatory bowel disease and other intestinal diseases // *World J Clin Cases.* – 2018. – V. 6. – No. 14. – P. 745 – 752.
215. Li W, Lee NT, Fu H, Kan KK, Pang Y, Li M, Tsim KW, Li X, Han Y. Neuroprotection via inhibition of nitric oxide synthase by bis(7)-tacrine // *Neuroreport.* – 2006. – V. 17. – №. 5. – P. 471 – 474.

216. Li Y., Wang B., Zheng S., He Y. Photodynamic therapy in the treatment of oral leukoplakia: a systematic review // *Photodiagnosis Photodyn Ther.* – 2018. – V. 25. – №. 3. – P. 17 – 22.
217. Li J, Zhang W, Zhu S, Shi F. Nitric oxide synthase is involved in follicular development via the PI3K/AKT/FoxO3a pathway in neonatal and immature rats // *Animals (Basel).* – 2020. – V. 10. – P.248.
218. Liao Q.S., Du Q., Lou J., Xu J.Y., Xie R. Roles of Na(+)/Ca(2+) exchanger 1 in digestive system physiology and pathophysiology // *World J Gastroenterol.* – 2019. – V. 25. – №. 3. – P. 287 – 299.
219. Lim K.H., Ancrile B.B., Kashatus D.F., Counter C.M. Tumour maintenance is mediated by eNOS // *Nature.* – 2008. – V. 452. – P. 646 – 649.
220. Liu C., Zhang C.W., Zhou Y., Wong W.Q., Lee L.C., Ong W.Y., Yoon S.O., Hong W., Fu X.Y., Soong T.W., Koo E.H., Stanton L.W., Lim K.L., Xiao Z.C., Dawe G.S. APP upregulation contributes to retinal ganglion cell degeneration via JNK3. *Cell Death Differ.* – 2018. – V. 25. – №. 4. – P. 663 – 678.
221. Liu K., Tedeschi A., Park K., He Z. Neuronal intrinsic mechanisms of axon regeneration // *Annu Rev Neurosci.* – 2011. – V. 34. – P. 131 – 152.
222. Liu Y.Y. Resuscitating wild-type p53 expression by disrupting ceramide glycosylation: a novel approach to target mutant p53 tumors // *Cancer Res.* – 2011. – V. 71. – №. 20. – P. 6295 – 6299.
223. Lobanov A.V., Uzdensky A.B. Protection of crayfish glial cells but not neurons from photodynamic injury by nerve growth factor // *J Mol Neurosci.* – 2009. – V. 39. – №. 1. – P. 308 – 319.
224. Lopez-Franco O., Hernandez-Vargas P., Ortiz-Muñoz G., Sanjuan G., Suzuki Y., Ortega L., Blanco J., Egado J., Gomez-Guerrero C. Parthenolide modulates the NF-kappaB-mediated inflammatory responses in experimental atherosclerosis // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* – 2006. – V. 26. – №. 8. – P. 1864 – 1870.

225. Lucroy M.D., Long K.R., Blaik M.A. Photodynamic therapy for the treatment of intranasal tumors in 3 dogs and 1 cat. *Journal of Veterinary Internal Medicine.* – 2003. – V. 17. – P. 727 – 729.
226. Lundberg J.O., Weitzberg E. NO generation from nitrite and its role in vascular control // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2005. – V. 25. – №. 5. – P. 915 – 922.
227. Luo Q., Wu X., Chang W., Zhao P., Nan Y., Zhu X., Katz J.P., Su D., Liu Z. ARID1A prevents squamous cell carcinoma initiation and chemoresistance by antagonizing pRb/E2F1/c-Myc-mediated cancer stemness // *Cell Death Differ.* – 2020. – V. 27. – №. 6. – P. 1981 – 1997.
228. Lv Z., Song X., Xu J., Jia Z., Yang B., Jia Y., Qiu L., Wang L., Song L. The modulation of Smac/DIABLO on mitochondrial apoptosis induced by LPS in *Crassostrea gigas* // *Fish Shellfish Immunol.* – 2019. – V. 84. – P. 587 – 598.
229. Ma L., Yu H. J., Gan S.W., Gong R., Mou K.J., Xue J., Sun S.Q. (2017). p53-Mediated oligodendrocyte apoptosis initiates demyelination after compressed spinal cord injury by enhancing ER-mitochondria interaction and E2F1 expression // *Neuroscience letters.* – 2017. – V. 644. – №. 4. – P. 55 – 61.
230. Maffei A., Prestori F., Shibuki K., Rossi P., Taglietti V., D'Angelo E. NO enhances presynaptic currents during cerebellar mossy fiber-granule cell LTP // *J. Neurophysiol.* – 2003. – V. 90. – №. 3. – P. 2478 – 2483.
231. Maggioni D., Galli M., D'Alfonso L., Inverso D., Dozzi M.V., Sironi L., Iannacone M., Collini M., Ferruti P., Ranucci E., D'Alfonso G. A luminescent poly(amidoamine)-iridium complex as a new singlet-oxygen sensitizer for photodynamic therapy // *Inorg Chem.* – 2015. – V. 54. – №. 2. – P. 544 – 553.
232. Maj M.A., Ma J., Krukowski K.N., Kavelaars A., Heijnen C.J. Inhibition of mitochondrial p53 accumulation by PFT- μ prevents cisplatin-induced peripheral neuropathy // *Front Mol Neurosci.* – 2017. – V. 10. – P. 108.
233. Maklad A., Sharma A., Azimi I. Calcium Signaling in Brain Cancers: Roles and Therapeutic Targeting // *Cancers (Basel).* – 2019. – V. 11. – №. 2. – P. 145.

234. Marcel V., Nguyen Van Long F., Diaz J.J. 40 Years of Research Put p53 in Translation // *Cancers (Basel)*. – 2018. – V. 10. – №. 5. – P. 152.
235. Martens A, de Moor A, Waelkens E, Merlevede W, De Witte P. In vitro and in vivo evaluation of hypericin for photo-dynamic therapy of equine sarcoids // *Veterinary Journal*. – 2000. – V. 159. – №. 1. – P. 77 – 84.
236. Martin L.J., Al-Abdulla N.A., Brambrink A.M., Kirsch J.R., Sieber F.E., et al. Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis // *Brain Res Bull*. – 1998. – V. 46. – P. 281 – 309.
237. Martin L.J., Chen K., Liu Z. Adult motor neuron apoptosis is mediated by nitric oxide and Fas death receptor linked by DNA damage and p53 activation // *J Neurosci*. – 2005. – V. 25. – №. 27. – P. 6449 – 6459.
238. Maruyama W., Shirakawa K., Matsui H., Matsumoto T., Yamazaki H., Sarca A.D., Kazuma Y., Kobayashi M., Shindo K., Takaori-Kondo A. Classical NF- κ B pathway is responsible for APOBEC3B expression in cancer cells // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2016. – V. 478. – No. 3. – P. 1466 – 1477.
239. McCaw D.L., Pope E.R., Payne J.T., West M.K., Tompson R.V., Tate D. Treatment of canine oral squamous cell carcinomas with photo-dynamic therapy // *British Journal of Cancer*. – 2000. – V. 82. – P. 1297 – 1299.
240. McKay Hart A., Brannstrom T., Wiberg M., Terenghi G. Primary sensory neurons and satellite cells after peripheral axotomy in the adult rat: timecourse of cell death and elimination // *Exp Brain Res*. – 2002. – V. 142. – №. 3. – P. 308 – 318.
241. McLeod T., Abdullahi A., Li M., Brogna S. Recent studies implicate the nucleolus as the major site of nuclear translation // *Biochem Soc Trans*. – 2014. – V. 42. – P. 1224 – 1228.
242. Mehraban N., Freeman H.S. Developments in PDT Sensitizers for Increased Selectivity and Singlet Oxygen Production // *Materials (Basel)*. – 2015. – V. 20. – №. 8. – P. 4421 – 4456.

243. Meng P, Ghosh R (2014) Transcription addiction: can we garner the Yin and Yang functions of E2F1 for cancer therapy? // *Cell Death Dis.* – 2014. – V. 5. – P. e1360.
244. Minnone G., De Benedetti F., Bracci-Laudiero L. NGF and Its Receptors in the Regulation of Inflammatory Response // *Int J Mol Sci.* – 2017. – V. 18. – №. 5. – P. 1028.
245. Miyazaki M., Kayama Y., Kihara T., Kawasaki K., Yamaguchi E., Wada Y., Ikeda M. Possible release of nitric oxide from cholinergic axons in the thalamus by stimulation of the rat laterodorsal tegmental nucleus as measured with voltammetry // *Neuroanat.* – 1996. – V. 10. – P. 203 – 207.
246. Montfort W.R., Wales J.A., Weichsel A. Structure and Activation of Soluble Guanylyl Cyclase, the Nitric Oxide Sensor // *Antioxid Redox Signal.* – 2017. – V. 26. – №. 3. – P. 107 – 121.
247. Morrison R.S., Kinoshita Y., Johnson M.D., Guo W., Garden G.A. p53-dependent cell death signaling in neurons // *Neurochem Res.* – V. 28. – P. 15 – 27.
248. Moserova I., Kralova J. Role of ER stress response in photodynamic therapy: ROS generated in different subcellular compartments trigger diverse cell death pathways // *PLoS One.* – 2012. – V. 7. – No. 3.
249. Muche A., Arendt T., Schliebs R. Oxidative stress affects processing of amyloid precursor protein in vascular endothelial cells // *PLoS One.* – 2017. – V.12. – №. 6. – P. e0178127.
250. Müller U.C., Deller T., Korte M. Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family // *Nat Rev Neurosci.* – 2017. – V. 18. – P. 281 – 298.
251. Multhaup G, Huber O, Buée L, Galas MC. Amyloid Precursor Protein (APP) Metabolites APP Intracellular Fragment (AICD), A β 42, and Tau in Nuclear Roles // *J Biol Chem.* – 2015. – V. 290. – №.39. – P. 23515 – 23522.

252. Muresan V., Ladescu Muresan Z. Amyloid- β precursor protein: Multiple fragments, numerous transport routes and mechanisms. // *Exp Cell Res.* – 2015. – V. 334. – P. 45 – 53.
253. Nakaya N., Lowe S.W., Taya Y., Chenchik A., Enikolopov G. Specific pattern of p53 phosphorylation during nitric oxide-induced cell cycle arrest // *Oncogene.* – 2000. – V. 19. – №. 54. – P. 6369 – 6375.
254. Naik, A. K., Tandan, S. K., Kumar, D., & Dudhgaonkar, S. P. Nitric oxide and its modulators in chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats // *European journal of pharmacology.* – 2006. – V. 530. – P.56 – 69.
255. Navarro X., Vivo M., Valero-Cabre A. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration // *ProgNeurobiol.* – 2007. – V. 82. – P. 163 – 201.
256. Nicolai S., Rossi A., Di Daniele N., Melino G., Annicchiarico-Petruzzelli M., Raschellà G. DNA repair and aging: the impact of the p53 family // *Aging (Albany NY).* – 2015. – V. 7. – P. 1050 – 1065.
257. Nijboer C.H., Heijnen C.J., van der Kooij M.A., Zijlstra J., van Velthoven C.T., Culmsee C., van Bel F., Hagberg H., Kavelaars A. Targeting the p53 pathway to protect the neonatal ischemic brain // *Ann Neurol.* – 2011. – V. 70. – P. 255 – 264.
258. Nishimura I., Takazaki R., Kuwako K., Enokido Y., Yoshikawa K. Upregulation and antiapoptotic role of endogenous Alzheimer amyloid precursor protein in dorsal root ganglion neurons // *Exp Cell Res.* – 2003. – V. 286. – №. 2. – P. 241 – 251.
259. Niziolek M., Korytowski W., Girotti A.W. Nitric oxide inhibition of free radical-mediated lipid peroxidation in photodynamically treated membranes and cells // *Free Radic Biol Med.* – 2003. – V. 34. – P. 997 – 1005.
260. Ogilby P.R. Singlet oxygen: there is indeed something new under the sun // *Chem Soc Rev.* – 2010. – V. 39. – №. 8. – P. 3181 – 3209.
261. Okamoto M. Immunoreactivity of the amino-terminal portion of the amyloid-beta precursor protein in the nucleolus // *Neurosci Lett.* – 2012. – V. 521. – №. 1. – P. 82 – 87.

262. Ouyang G., Xiong L., Liu Z., Lam B., Bui B., Ma L., Chen X., Zhou P., Wang K., Zhang Z., Huang H., Miao X., Chen W., Wen Y. Inhibition of autophagy potentiates the apoptosis-inducing effects of photodynamic therapy on human colon cancer cells // *Photodiagnosis Photodyn Ther.* – 2018. – V. 21. – P. 396 – 403.
263. Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease // *Physiol. Rev.* – 2007. – V. 87. – P. 315 – 424.
264. Palacios G., Palacios J.M., Mengod G., Frey P. Beta-amyloid precursor protein localization in the Golgi apparatus in neurons and oligodendrocytes. An immunocytochemical structural and ultrastructural study in normal and axotomized neurons // *Brain Res Mol Brain Res.* – 1992. – V. 15. – №. 3. – P. 195 – 206.
265. Pardossi-Piquard R., Checler F. The physiology of the β -amyloid precursor protein intracellular domain AICD // *J Neurochem.* – 2012. – V. 120. – №. 1. – P. 109 – 124.
266. Park E.H., White G.A., Tieber L.M. Mechanisms of injury and emergency care of acute spinal cord injury in dogs and cats // *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio).* – 2012. – V. 22. – №. 2. – P. 160 – 178.
267. Parlato R., Kreiner G. Nucleolar activity in neurodegenerative diseases: a missing piece of the puzzle? // *J MolMed (Berl).* – 2013. – V. 91. – №. 2. – P. 541 – 547.
268. Pedersen P.H. Migration pattern of fetal rat brain cells and human glioma cells in adult rat brain // *Cancer Res.* – 1993. – V. 53. – P. 5158 – 5165.
269. Perez-Sala D. Posttranscriptional regulation of human iNOS by NO/cGMP pathway / D. Perez-Sala, E. Gernuda-Morollon, M. Diaz-Cazorla et al. // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* – 2001. – V. 280. – №. 3. – P. 466 – 473.
270. Periasamy M., Maurya S.K., Sahoo S.K., Singh S., Sahoo S.K., Reis FCG, Bal N.C. Role of SERCA Pump in Muscle Thermogenesis and Metabolism. *Compr Physiol.* – 2017. – V. 7. – №. 3. – P. 879– 890.

271. Perner A., Andresen L., Normark M., Rask-Madsen J. Constitutive expression of inducible nitric oxide synthase in the normal human colonic epithelium // *Scand J Gastroenterol.* – 2002. – V. 37. – №. 8. – P. 944 – 948.
272. Pi J., Huang L., Yang F., Jiang J., Jin H., Liu J., Su X., Wu A., Cai H., Yang P., Cai J. Atomic force microscopy study of ionomycin-induced degranulation in RBL-2H3 cells // *Scanning.* – 2016. – V. 38. – №. 6. – P. 525 – 534.
273. Piette J. Signalling pathway activation by photodynamic therapy: NF- κ B at the crossroad between oncology and immunology // *Photochem Photobiol Sci.* – 2015. – V. 14. – №. 8. – P. 1510 – 1517.
274. Pinton P., Giorgi C., Siviero R., Zecchini E., Rizzuto R. Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca^{2+} transfer in the control of apoptosis // *Oncogene.* – 2008. – V. 27. – No. 50. – P. 6407 – 6418.
275. Poluha W., Schonhoff C.M., Harrington K.S., Lachyankar M.B., Crosbie N.E., Bulseco D.A., Ross A.H. A novel, nerve growth factor-activated pathway involving nitric oxide, p53, and p21WAF1 regulates neuronal differentiation of PC12 cells // *J Biol Chem.* – 1997. – V. 272. – №. 38. – P. 24002 – 24007.
276. Povlishock J.T., Christman C.W. The pathobiology of traumatically induced axonal injury in animals and humans: a review of current thoughts // *J Neurotraum.* – 1995. – V. 12. – P. 555 – 565.
277. Pozo K., Goda Y. Unraveling mechanisms of homeostatic synaptic plasticity // *Neuron.* – 2010. – V. 66. – No. 3. – P. 337 – 351.
278. Qian J., Fulton D. Post-translational regulation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelium // *Front Physiol.* – 2013. – V. 4. – P. 347.
279. Qin Q., Baudry M., Liao G., Noniyev A., Galeano J., Bi X. A novel function for p53: Regulation of growth cone motility through interaction with Rho kinase // *J Neurosci.* – V. 29. – P. 5183 – 5192.
280. Quirk B.J., Brandal G., Donlon S., Vera J.C., Mang T.S., Foy A.B., Lew S.M., Girotti A.W., Jogal S., LaViolette P.S., Connelly J.M., Whelan H.T.

- Photodynamic therapy (PDT) for malignant brain tumors--where do we stand? // Photodiagnosis Photodyn Ther. – 2015. – V. 12. – №. 8. – P. 530 – 544.
281. Raj N., Attardi L. The transactivation domains of the p53 protein // Cold Spring Harb. Perspect. Med. – 2017. – V. 7. – P. 026047.
282. Rakers C., Schmid M., Petzold G.C. TRPV4 channels contribute to calcium transients in astrocytes and neurons during peri-infarct depolarizations in a stroke model // Glia. – 2017. – V. 65. – №. 9. – P. 1550 – 1561.
283. Rapozzi V., Della Pietra E., Bonavida B. Dual roles of nitric oxide in the regulation of tumor cell response and resistance to photodynamic therapy // Redox Biol. – 2015. – V. 6. – P. 311 – 317.
284. Rapozzi V., Della Pietra E., Zorzet S., Zacchigna M., Bonavida B., Xodo L.E. Nitric oxide-mediated activity in anti-cancer photodynamic therapy // Nitric Oxide. – 2013. – V. 30. – P. 26 – 35.
285. Rapozzi V., Ragno D., Guerrini A., Ferroni C., Pietra E.D., Cesselli D., Castoria G., Di Donato M., Saracino E., Benfenati V., Varchi G. Androgen receptor targeted conjugate for bimodal photodynamic therapy of prostate cancer in vitro // Bioconjug. Chem. – 2015. – V. 26. – №. 8. – P. 1662 – 1671.
286. Rassaf T., Kleinbongard P., Preik M., Dejam A., Gharini P., Lauer T., Erckenbrecht J., Duschin A., Schulz R., Heusch G., Feelisch M., Kelm M. Plasma nitrosothiols contribute to the systemic vasodilator effects of intravenously applied NO: experimental and clinical Study on the fate of NO in human blood // Circ Res. – 2002. – V. 91. – P. 470 – 477.
287. Rebhandl S., Huemer M., Greil R., Geisberger R. AID/APOBEC deaminases and cancer // Oncoscience. – 2015. – V. 2. – №. 4. – P. 320 – 333.
288. Reeves K.J., Reed M.W., Brown N.J. Is nitric oxide important in photodynamic therapy? // J Photochem Photobiol B. – 2009. – V. 95. – №. 3. – P. 141 – 147.
289. Reiners J.J., Caruso J.A., Mathieu P., Chelladurai B., Yin X.M., Kessel D. Release of cytochrome c and activation of pro-caspase-9 following lysosomal

- photodamage involves Bid cleavage // *Cell Death Differ.* – 2002. – V. 9. – P. 934 – 944.
290. Richardson P.M., Miao T., Wu D., Zhang Y., Yeh J., Bo X. Responses of the nerve cell body to axotomy // *Neurosurgery.* – 2009. – V. 65. – P. 74 – 79.
291. Riethmüller M., Burger N., Bauer G. Singlet oxygen treatment of tumor cells triggers extracellular singlet oxygen generation, catalase inactivation and reactivation of intercellular apoptosis-inducing signaling // *Redox Biol.* – 2015. – V. 5. – P. 157 – 168.
292. Rishal I., Fainzilber M. Axon-soma communication in neuronal injury // *Nat Rev Neurosci.* – 2014. – V. 15. – №. 1. – P. 32 – 42.
293. Roberts P.J., Riley G.P., Morgan K., Miller R., Hunter J.O., Middleton S.J. The physiological expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the human colon // *J Clin Pathol.* – 2001. – V. 54. – №. 4. – P. 293 – 297.
294. Roberts W.G., Klein M.K., Loomis M., Weldy S., Berns M.W. Photodynamic therapy of spontaneous cancers in felines, canines and snakes with chloro-aluminum sulfonated phthalocyanine // *Journal of the National Cancer Institute.* – 1991. – V. 83. – №. 1. – P. 18 – 23.
295. Rodkin S., Khaitin A., Pitinova M., Dzreyan V., Guzenko V., Rudkovskii M., Sharifulina S., Uzdensky A. The Localization of p53 in the Crayfish Mechanoreceptor Neurons and Its Role in Axotomy-Induced Death of Satellite Glial Cells Remote from the Axon Transection Site // *J Mol Neurosci.* – 2020. – V. 70. – №. 4. – P. 532 – 541.
296. Rodrigo J., Springall D.R., Uttenthal O., Bentura M.L., Abadia-Molina F., Riveros-Moreno V., Martinez-Murillo R., Polak J.M., Moncada S. Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* – 1994. – V. 345. – P. 175 – 221.
297. Roe N.D. Nitric oxide synthase uncoupling: a therapeutic target in cardiovascular diseases / N.D. Roe, J. Ren // *Vascul. Pharmacol.* – 2012. – V. 57. – №. 5-6. – P. 168 – 172.

298. Ruscheweyh R. Possible sources and sites of action of the nitric oxide involved in synaptic plasticity at spinal lamina I projection neurons / R. Ruscheweyh, A. Goralczyk, G. Wunderbaldinger, A. Schober, J. Sandkuhler // *Neuroscience*. – 2006. – V. 141. – №. 2. – P. 977 – 988.
299. Ryter S.W., Gomer C. J. Nuclear factor kappa B binding activity in mouse L1210 cells following photofrin II-mediated photosensitization // *Photochem Photobiol.* – 1993. – V. 58. – №. 5. – P. 753 – 756.
300. Saffioti N.A, de Sautu M., Ferreira-Gomes M.S., Rossi R.C., Berlin J., Rossi JPFC, Mangialavori I.C. E2P-like states of plasma membrane Ca(2+)-ATPase characterization of vanadate and fluoride-stabilized phosphoenzyme analogues // *Biochim Biophys Acta Biomembr.* – 2019. – V. 1861. – №. 2. – P. 366 – 379.
301. Sandau K., Pfeilschifter J., Brüne B. Nitric oxide and superoxide induced p53 and Bax accumulation during mesangial cell apoptosis // *Kidney Int.* – 1997. – V. 52. – №. 2. – P. 378 – 386.
302. Sandoval A., Paz Duran, MaríaA. Gandini, Arturo Andrade, Angélica Almanza, Simon Kaja, Ricardo Felix. Regulation of L-type Cav1.3 channel activity and insulin secretion by the cGMP-PKG signaling pathway // *Cell Calcium*. – 2017. – V. 66. – P. 1 – 9.
303. Santiago González D.A., Cheli V.T., Zamora N.N., Lama T.N., Spreuer V., Murphy G.G., Paez P.M. Conditional Deletion of the L-Type Calcium Channel Cav1.2 in NG2-Positive Cells Impairs Remyelination in Mice // *J Neurosci.* – 2017. – V. 37. – №. 42. – P. 10038 – 10051.
304. Savastano L.E., Laurito S.R., Fitt M.R., Rasmussen J.A., Gonzalez Polo V., Patterson S.I. Sciatic nerve injury: a simple and subtle model for investigating many aspects of nervous system damage and recovery // *J Neurosci Methods*. – 2014. – V. 227. – P. 166 – 180.
305. Schneiderhan N., Budde A., Zhang Y., Brüne B. Nitric oxide induces phosphorylation of p53 and impairs nuclear export // *Oncogene*. – 2003. – V. 22. – №. 19. – P. 2857 – 2868.

306. Scott J.N., Parhad I.M., Clark A.W. Beta-amyloid precursor protein gene is differentially expressed in axotomized sensory and motor systems // *Brain Res Mol Brain Res.* – 1991. – V. 10. – №. 4. – P. 315 – 325.
307. Shang H., Wang Y., Chao X., Sun G., Bai X., Xu L., Han Y., Li J., Wang H., Fan Z. Artemin transiently increases iNOS expression in primary cultured trigeminal ganglion neurons // *Neurosci Lett.* – 2017. – V. 660. – P. 34 – 38.
308. Shibuki K., Kimura S. Dynamic properties of nitric oxide release from parallel fibres in rat cerebellar slices // *J. Physiol.* – 1997. – V. 498. – P. 443 – 452.
309. Shindo R., Kakehashi H., Okumura K., Kumagai Y., Nakano H. Critical contribution of oxidative stress to TNF α -induced necroptosis downstream of RIPK1 activation // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2013. – V. 436. – No. 2. – P. 212 – 216.
310. Shinkai T., Ohmori O., Hori H., Nakamura J. Allelic association of the neuronal nitric oxide synthase (NOS1) gene with schizophrenia // *Mol Psychiatry.* – 2002. – V. 7. – №. 6. – P. 560 – 563.
311. Shlosberg D., Buskila Y., Abu-Ghanem Y., Amitai Y. Spatiotemporal alterations of cortical network activity by selective loss of NOS-expressing interneurons // *Front Neural Circuits.* – 2012. – V. 6. – No. 3.
312. Simabuco F.M., Morale M.G., Pavan I.B., Morelli A.P., Silva F.R., Tamura R.E. p53 and metabolism: from mechanism to therapeutics // *Oncotarget.* – 2018. – V. 9. – №. 34. – P. 23780 – 23823.
313. Singh A.K., Awasthi D., Dubey M., Nagarkoti S., Kumar A., Chandra T., Barthwal M.K., Tripathi A.K., Dikshit M. High Oxidative stress adversely affects NF- κ B mediated induction of inducible nitric oxide synthase in human neutrophils: Implications in chronic myeloid leukemia // *Nitric Oxide.* – 2016. – V. 58. – P. 28 – 41.
314. Slomp A., Peperzak V. Role and Regulation of Pro-survival BCL-2 Proteins in Multiple Myeloma // *Front Oncol.* – 2018. – V. 8. – P. 533.

315. Spafford J.D., Dunn T., Smit A.B., Syed N.I., Zamponi G.W. In vitro characterization of L-type calcium channels and their contribution to firing behavior in invertebrate respiratory neurons // *J Neurophysiol.* – 2006. – V. 95. – №. 1. – P. 42 – 52.
316. Squire L.R., et al. *Fundamental neuroscience* // 4th Edition. – 2014. – P. 189 – 209.
317. Stamler J.S., Jaraki O., Osborne J., Simon D.I., Keaney J., Vita J., Singel D., Valeri C.R., Loscalzo J. Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1992. – V. 89. – P. 7674 – 7677.
318. Steinert J.R, Chernova T., Forsythe I.D. Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia // *Neuroscientist.* – 2010. – V. 16. – №. 4. – P. 435 – 452.
319. Stellwagen D., Malenka R.C. Synaptic scaling mediated by glial TNF- α // *Nature.* – 2006. – V. 440. – P. 1054 – 1059.
320. Strom E., Sathe S., Komarov P.G., Chernova O.B., Pavlovska I., Shyshynova I., Bosykh D.A., Burdelya L.G., Macklis R.M., Skaliter R., Komarova E.A., Gudkov A.V. Small-molecule inhibitor of p53 binding to mitochondria protects mice from gamma radiation // *Nat Chem Biol.* – 2006. – V. 2. – №. 9. – P. 474 – 479.
321. Strom E., Sathe S., Komarov P.G., Chernova O.B., Pavlovska I., Shyshynova Sullivan K.D., Galbraith M.D., Andrysik Z., Espinosa J. M. Mechanisms of transcriptional regulation by p53. *Cell Death Differ.* – 2018. – V. 25. – P. 133 – 144.
322. Sullivan K.D., Galbraith M.D., Andrysik Z., Espinosa J.M. Mechanisms of transcriptional regulation by p53 // *Cell Death Differ.* – 2018. – V. 25. – P. 133 – 143.
323. Takaso Y, Noda M, Hattori T, Roboon J, Hatano M, Sugimoto H, Brenner C, Yamamoto Y, Okamoto H, Higashida H, Ito M, Yoshizaki T, Hori O. Deletion of CD38 and supplementation of NAD⁺ attenuate axon degeneration in

- a mouse facial nerve axotomy model // *Sci Rep.* – 2020. – V. 10. – №. 1. – P.17795.
324. Takata N., Ohshima Y., Suzuki-Karasaki M., Yoshida Y., Tokuhashi Y., Suzuki-Karasaki Y. Mitochondrial Ca^{2+} removal amplifies TRAIL cytotoxicity toward apoptosis-resistant tumor cells via promotion of multiple cell death modalities // *Int J Oncol.* – 2017. – V. 51. – №. 1. – P. 193 – 203.
325. Takumida M., Anniko M., Popa R., Zhang D.M. Lipopolysaccharide-induced expression of inducible nitric oxide synthase in the guinea pig organ of Corti // *Hear Res.* – 2000. – V. 140. – No. 1-2. – P. 91 – 98.
326. Tang Q. Inhibition of spinal constitutive NOS-2 by 1400W attenuates tissue injury and inflammation-induced hyperalgesia and spinal p38 activation / Q. Tang, C.I. Svensson, B. Fitzsimmons, M. Webb, T.L. Yaksh, X.Y. Hua // *Eur J Neurosci.* – 2007. – V. 25. – №. 10. – P. 2964 –2972.
327. Tanriover N., Ulu M.O., Isler C., Durak H., Oz B., Uzan M., Akar Z. Neuronal nitric oxide synthase expression in glial tumors: correlation with malignancy and tumor proliferation // *Neurol Res.* – 2008. – V. 30. – №. 9. – P. 940 –944.
328. Tarpey M.M. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations / M.M. Tarpey, D.A. Wink, M.B. Grisham // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* – 2004. – V. 286. – №. 3. – P. 431–444.
329. Taub A.F. Photodynamic therapy in dermatology: history and horizons // *J Drugs Dermatol.* – 2004. – V. 3. – №. 1. – P. 8 – 25.
330. Tedeschi A., Nguyen T., Puttagunta R., Gaub P., Di Giovanni S. A p53-CBP/p300 transcription module is required for GAP-43 expression, axon outgrowth, and regeneration // *Cell Death Differ.* – 2009. – V. 16. –№. 4. – P. 543 –554.
331. Thippeswamy T., Haddley K., Corness J.D., Howard M.R., McKay J.S., Beaucourt S.M., Pope M.D., Murphy D., Morris R., Hökfelt T., Quinn J.P. NO-

- cGMP mediated galanin expression in NGF-deprived or axotomized sensory neurons // *J Neurochem.* – 2007. – V. 100. – №. 3. – P. 790 – 801.
332. Thor H., Hartzell P., Suensson S.A., Orrenius S., Mirabelli F., Mnarinoni V., Bellomo G. On the role of thiol groups in the inhibition of liver microsomal Ca^{2+} sequestration by toxic agents // *Biochem.Pharmacol.* – 1985. – V. 34. – P. 3717 – 3723.
333. Tilborghs S., Corthouts J., Verhoeven Y., Arias D., Rolfo C., Trinh X.B., van Dam P.A. The role of Nuclear Factor-kappa B signaling in human cervical cancer // *Crit Rev Oncol Hematol.* – 2017. – V. 120. – P. 141 – 150.
334. Tomita S., Sekiguchi F., Kasanami Y., Naoe K., Tsubota M., Wake H., Nishibori M., Kawabata A. Cav3.2 overexpression in L4 dorsal root ganglion neurons after L5 spinal nerve cutting involves Egr-1, USP5 and HMGB1 in rats: An emerging signaling pathway for neuropathic pain // *Eur J Pharmacol.* – 2020. – V. 888. – №. 34. – P.173587.
335. Tozer G.M., S.A. Everett. Nitric oxide in tumor biology and cancer therapy. Part2: Therapeutic implications // *Clin. Oncol. (Roy. Coll. Radiol.)*. – 1997. – V. 9. – P. 357 –364.
336. Truong P.H., Ciccotosto G.D., Merson T.D., Spoerri L., Chuei M.J., Ayers M., Xing Y.L., Emery B., Cappai R. Amyloid precursor protein and amyloid precursor-like protein 2 have distinct roles in modulating myelination, demyelination, and remyelination of axons // *Glia.* – 2019. – V. 67. – №. 3. – P. 525 – 538.
337. Udayakumar T., Shareef M.M., Diaz D.A., Ahmed M.M., Pollack A. The E2F1/Rb and p53/MDM2 pathways in DNA repair and apoptosis: understanding the crosstalk to develop novel strategies for prostate cancer radiotherapy // *Semin Radiat Oncol.* – 2010. – V. 20. – P. 258 – 266.
338. Usuda J., Chiu S.M., Murphy E.S., Lam M., Nieminen A.L., Oleinick N.L. Domain-dependent photodamage to Bcl-2. A membrane anchorage region is needed to form the target of phthalocyanine photosensitization // *J Biol Chem.* – 2003. – V. 278. – P. 2021 – 2029.

339. Uzdensky A., Berezhnaya E., Khaitin A., Kovaleva V., Komandirov M., Neginskaya M., Rudkovskii M., Sharifulina S. Protection of the crayfish mechanoreceptor neuron and glial cells from photooxidative injury by modulators of diverse signal transduction pathways // *Mol Neurobiol.* – 2015. – V. 58. – №. 34. – P. 811 – 825.
340. Uzdensky A.B. Signal transduction and photodynamic therapy // *Curr. Signal Transduction Ther.* – 2008. – V. 3. – P. 55 –74.
341. Uzdensky A.B., Bragin D.E., Kolosov M.S., Dergacheva O.Y., Fedorenko G.M., Zhavoronkova A.A. (2002) Photodynamic inactivation of isolated crayfish mechanoreceptor neuron: different death modes under different photosensitizer concentrations // *Photochem Photobiol.* – 2002. – V. 76. – P. 431 – 437.
342. Vajragupta O., Boonyarat C., Murakami Y., Tohda M., Musatmoto K., Olson A.J., Watanabe H. A novel neuroprotective agent with antioxidant and nitric oxide synthase inhibitory action // *Free Radic Res.* – 2006. – V. 40. – №. 7. – P. 685 – 695.
343. Vali Y., Gielen I., Soroori S., Ludewig E. The diagnostic value of intravenous contrast computed tomography in addition to plain computed tomography in dogs with head trauma // *BMC Vet Res.* – 2021. – V. 17. – №. 1. – P.46.
344. Van W.S., Steinbusch H.W., Markerink-Van Ittersum M., Repaske D.R., Goy M.F., Kotera J., Omori K., Beavo J.A. RNA expression patterns of the cGMP-hydrolyzing phosphodiesterases types 2, 5, and 9 during development of the rat brain // *J. Comp. Neurol.* – 2003. – V. 467. –P. 566 –580.
345. Varga K., Hollósi A., Pászty K., Hegedűs L., Szakács G., Tímár J., Papp B., Enyedi Á., Padányi R. Expression of calcium pumps is differentially regulated by histone deacetylase inhibitors and estrogen receptor alpha in breast cancer cells // *BMC Cancer.* – 2018. – V. 18. – №. 1. – P. 1029.
346. Vega-Vela N.E., Osorio D., Avila-Rodriguez M., Gonzalez J., García-Segura L.M., Echeverria V., Barreto G.E. L-Type Calcium Channels

- Modulation by Estradiol // *Mol Neurobiol.* – 2018. – V. 54. – №. 7. – P. 4996 – 5007.
347. Vincent B., Govitrapong P. Activation of the α -secretase processing of A β PP as a therapeutic approach in Alzheimer's disease // *J Alzheimers Dis.* – 2011. – V. 24. – №. 2. – P. 75 – 94.
348. Vincent S.R. Nitric oxide neurons and neurotransmission // *Prog Neurobiol.* – 2010. – V. 90. – №. 2. – P. 246 – 255.
349. Vincent S.R. The ascending reticular activating system—from aminergic neurons to nitric oxide // *J. Chem. Neuroanat.* – 2000. – V. 18. – №. 1-2. – P. 23 – 30.
350. Vincent S.R., Kimura H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience.* – 1992. – V. 46. – P. 755 – 784.
351. Volanti C., Matroule J.Y., Piette J. Involvement of oxidative stress in NF-kappaB activation in endothelial cells treated by photodynamic therapy // *Photochem Photobiol.* – 2002. – V. 75. – №. 1. – P. 36 – 45.
352. Wan C., Ma X., Shi S., Zhao J., Nie X., Han J et al. Pivotal roles of p53 transcription-dependent and -independent pathways in manganese-induced mitochondrial dysfunction and neuronal apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol.* – 2014. – V. 9. – №. 281. – P. 294 – 302.
353. Wang D.B., Kinoshita C., Kinoshita Y., Morrison R.S. p53 and mitochondrial function in neurons // *Biochim Biophys Acta.* – 2014. – V. 1842. – №. 8. – P. 1186 – 1197.
354. Wang E., Gao J., Yang Q., et al. Molecular mechanisms underlying effects of neural stem cells against traumatic axonal injury // *J Neurotrauma.* – 2012. – V. 29. – P. 295 – 312.
355. Wang T., Luo S., Qin H., Xia Y. Hsp90 inhibition renders iNOS aggregation and the clearance of iNOS aggregates by proteasomes requires SPSB2 // *Free Radic Biol Med.* – 2018. – V. 117. – P. 90 – 98.

356. Wang X., Zalcenstein A., Oren M. Nitric oxide promotes p53 nuclear retention and sensitizes neuroblastoma cells to apoptosis by ionizing radiation // *Cell Death Differ.* – 2003. – V. 10. – №. 4. – P. 468–476.
357. Wany A., Gupta K.J. Localization of Nitric Oxide in Wheat Roots by DAF Fluorescence // *Methods Mol Biol.* – 2016. – V. 1424. – P. 39 – 47.
358. Wawryk-Gawda E, Chylińska-Wrzos P, Lis-Sochocka M, Chłapek K, Bulak K, Jędrych M, Jodłowska-Jędrych B. P53 protein in proliferation, repair and apoptosis of cells // *Protoplasma.* – 2014. – V. 251. – №. 3. – P. 525 – 533.
359. Weidinger A., Müllebner A., PaierPourani J., Banerjee A., Miller I., Lauterbock L., Duvigneau J.C., Skulachev V.P., Redl H., Kozlov A.V. Vicious inducible nitric oxide synthase-mitochondrial reactive oxygen species cycle accelerates inflammatory response and causes liver injury in rats // *Antioxid Redox Signal.* – 2015. – V. 22. – №. 7. – P. 572 – 586.
360. Welch J.A. Peripheral nerve injury // *Semin Vet Med Surg Small Anim.* – 1998. – V. 11. – №. 4. – P. 273 – 284.
361. Whelan H.T. High-grade glioma/glioblastoma multiforme: is there a role for photodynamic therapy? // *J Natl Compr Canc Netw.* – 2012. – V. 10. – P. 31 – 34.
362. Wong D., Teixeira A., Oikonomopoulos S., Humburg P., Lone I.N., Saliba D., Siggers T., Bulyk M., Angelov D., Dimitrov S., Udalova I.A., Ragoussis J. Extensive characterization of NF- κ B binding uncovers non-canonical motifs and advances the interpretation of genetic functional traits // *Genome Biol.* – 2011. – V. 12. – №. 7. – P. 70.
363. Woods S.J., Hannan K.M., Pearson R.B., Hannan R.D. The nucleolus as a fundamental regulator of the p53 response and a new target for cancer therapy // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms.* – 2015. – V. 1849. – P. 821 – 829.
364. Wu D., Fan L., Xu C., Liu Z., Zhang Y., Liu L., Wang Q., Tao L. GJIC Enhances the phototoxicity of photofrin-mediated photodynamic treatment by

- the mechanisms related with ROS and Calcium pathways // *J Biophotonics*. – 2015. – V. 8. – №. 9. – P. 764 – 774.
365. Xue L.Y., Chiu S.M., Oleinick N.L. Photochemical destruction of the Bcl-2 oncoprotein during photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc // *Oncogene*. – 2001. – V. 20. – №. 26. – P. 3420 – 3427.
366. Yakovlev A.G., Faden A.I. Caspase-dependent apoptotic pathways in CNS injury // *Mol Neurobiol*. – 2010. – V. 24. – P. 131 – 144.
367. Yamakura F. Modification of tryptophan and tryptophan residues in proteins by reactive nitrogen species / F. Yamakura, K. Ikeda // *Nitric Oxide*. – 2006. – V. 14. – №. 2. – P. 152 – 161.
368. Yáñez M., Gil-Longo J., Campos-Toimil M. Calcium binding proteins // *Adv Exp Med Biol*. – 2012. – V. 740. – P. 461– 482.
369. Yang G., Chen G., Ebner T.J., Iadecola C. Nitric oxide is the predominant mediator of cerebellar hyperemia during somatosensory activation in rats // *Am. J. Physiol*. – 1999. – V. 277. – №. 6. – P. 1760 – 1770.
370. Yang H., Ma Y., Chen G., Zhou H., Yamazaki T., Klein C., Pietrocola F., Vacchelli E., Souquere S., Sauvat A., Zitvogel L., Kepp O., Kroemer G. Contribution of RIP3 and MLKL to immunogenic cell death signaling in cancer chemotherapy. *Oncoimmunology*. – 2016. – V. 5. – №. 6. – P. 1149673.
371. Yang Z., Misner B., Poulos T.L, Silverman R.B, Meyskens F.L, Yang S. Targeting nitric oxide signaling with nNOS inhibitors as a novel strategy for the therapy and prevention of human melanoma // *Antioxid Redox Signal*. – 2013. – V. 19. – №. 5. – P. 433– 447.
372. Ye Y.C., Wang H. Z., Yu L., Tashiro L., Onodera S., Ikejima T. RIP1-mediated mitochondrial dysfunction and ROS production contributed to tumor necrosis factor alpha-induced L929 cell necroptosis and autophagy // *Int. Immunopharmacol*. – 2012. – V. 14. – №. 4. – P. 674 – 682.
373. Ying L., Hofseth A.B., Browning D.D., Nagarkatti M., Nagarkatti P.S., Hofseth L.J. Nitric oxide inactivates the retinoblastoma pathway in chronic inflammation // *Cancer Res*. – 2007. – V. 67. – №. 19. – P. 9286 – 9293.

374. Ying L., Hofseth L.J. An emerging role for endothelial nitric oxide synthase in chronic inflammation and cancer // *Cancer Res.* – 2007. – V. 64. – No. 4. – P. 1407 – 1410.
375. You Y. Chemical tools for the generation and detection of singlet oxygen // *Org Biomol Chem.* – 2018. – V. 16. – №. 22. – P. 4044 – 4060.
376. Yu J., Zhang L. The transcriptional targets of p53 in apoptosis control // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2005. – V. 331. – №. 3. – P. 851 – 858.
377. Yun D.K., Lee J., Keum Y.S. Finasteride Increases the Expression of Hemoxygenase-1 (HO-1) and NF-E2-Related Factor-2 (Nrf2) Proteins in PC-3 Cells: Implication of Finasteride-Mediated High-Grade Prostate Tumor Occurrence. *Biomol Ther (Seoul).* – 2013. – V. 21. – №. 1. – P. 49 – 53.
378. Yung H.W., Bal-Price A.K., Brown G.C., Tolkovsky A.M. Nitric oxide-induced cell death of cerebrocortical murine astrocytes is mediated through p53- and Bax-dependent pathways // *J Neurochem.* – 2004. – V. 89. – P. 812 – 821.
379. Zhang H., Chang L., Zhang H., Nie J., Zhang Z., Yang X., Vuong A.M., Wang Z., Chen A., Niu Q. Calpain-2/p35-p25/Cdk5 pathway is involved in the neuronal apoptosis induced by polybrominated diphenyl ether-153 // *Toxicol Lett.* – 2017. – V. 5. – P. 41 – 53.
380. Zhang J., Yu Q., Han L., Chen C., Li H., Han G. Study on the apoptosis mediated by cytochrome c and factors that affect the activation of bovine longissimus muscle during postmortem aging // *Apoptosis.* – 2017. – V. 22. – №. 6. – P. 777 – 785.
381. Zhang S., Kuang G., Zhao G., Wu X., Zhang C., Lei R., Xia T., Chen J., Wang Z., Ma R., Li B., Yang L., Wang A. Involvement of the mitochondrial p53 pathway in PBDE-47-induced SH-SY5Y cells apoptosis and its underlying activation mechanism. *Food Chem Toxicol.* – 2013. – V. 62. – №. 34. – P. 699 – 706.
382. Zhang X, Zhou K, Wang R, et al. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha)-mediated hypoxia increases BACE1 expression and beta-amyloid generation // *J Biol Chem.* – 2007. – V.282. –P. 10873 – 10881.

383. Zhao L., He D., Jiao M., Kong L., Shao C., Chen J., Fang Z., Ma X., Chen H., Li L., Luo S., Zheng N., Chen Y., Wang Q., Fang S. Overexpression of Histone Deacetylase and Amyloid Precursor Protein in Hepatocellular Carcinoma // *Technol Cancer Res Treat.* – 2017. – V. 16. – №. 5. – P. 586 – 594.
384. Zhao L, Ouyang Y, Li Q, Zhang Z. Modulation of p53 N-terminal transactivation domain 2 conformation ensemble and kinetics by phosphorylation // *J Biomol Struct Dyn.* – 2020. – V.38. – №. 9. – P. 2613 – 2623.
385. Zheng J.H., Shi D., Zhao Y., Chen Z.L. Role of calcium signal in apoptosis and protective mechanism of colon cancer cell line SW480 in response to 5-aminolevulinic acid-photodynamic therapy // *Ai Zheng.* – 2006. – V. 25. – №. 6. – P. 683 – 688.
386. Zhou Q.G, Zhu X.H, Nemes A.D, Zhu D.Y. Neuronal nitric oxide synthase and affective disorders // *IBRO Rep.* – 2018. – V. 17. – №. 5. – P. 116 – 132.
387. Zweier J., Chen C.A., Druhan L.J. S-glutathionylation reshapes our understanding of eNOS Uncoupling and NO/ROS-mediated signaling // *Antioxid Redox Signal.* – 2011. – V. 14. – P. 1769 – 1775.