



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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой
степени кандидата биологических наук

Симферополь 2022

Работа выполнена на кафедре «Биология и общая патология» факультета «Биоинженерия и ветеринарная медицина» федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Донской государственной технической университет»

- Научный руководитель:** **Кириченко Евгения Юрьевна**
доктор биологических наук, заведующая кафедрой «Биоинженерия» факультета «Биоинженерия и ветеринарная медицина» Донского государственного технического университета
- Научный консультант:** **Ермаков Алексей Михайлович**
доктор биологических наук, профессор, декан факультета «Биоинженерия и ветеринарная медицина» Донского государственного технического университета
- Официальные оппоненты:** **Ванин Анатолий Фёдорович**
доктор биологических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук», главный научный сотрудник, и.о. заведующего лабораторией физической химии биополимеров
- Шихлярова Алла Ивановна**
доктор биологических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии», старший научный сотрудник лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей.
- Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук»

Защита диссертации состоится « ____ » _____ 2022 года в _____ часов на заседании диссертационного совета 24.2.318.08 при ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» по адресу: 295007, Республика Крым, г. Симферополь, ул. Ялтинская, 20, зал защиты диссертаций (аудитория 301).

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» по адресу: 295007, Республика Крым, г. Симферополь, проспект Академика Вернадского, 4, корпус А и на сайте университета <https://science.cfuv.ru>.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета 24.2.318.08,
к.б.н., доцент

Денис Рашидович Хусаинов

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, которые часто становятся пациентами ветеринарных клиник из-за различных онкологических болезней, в частности нервной системы, (Lucroy et al., 2003; McCaw et al., 2000) и нейротравм, включая травмы периферических нервов (DiFazio et al., 2013; Park et al., 2012). Также и сельскохозяйственные животные являются жертвами этих патологий, что наносит большой экономический ущерб (Dammann et al., 2020; Finnie., 2014). Поэтому является актуальным изучение биохимических механизмов выживания и гибели нейронов и глиальных клеток при повреждении нервов и фотодинамической терапии, характеризующейся мощным фотоокислительным стрессом.

Фотодинамическая терапия (ФДТ) является перспективным методом лечения рака, включая рак мозга, в ветеринарии (Hicks et al., 2017). Однако при этой терапии повреждаются нормальные нервные и глиальные клетки. Было показано, что NO играет важную роль в выживании и гибели нейронов и глии при ФДТ (Kovaleva, Uzdensky, 2016; Kovaleva et al., 2013). Однако, роль NO при ФД-воздействии остается неоднозначной (Reeves et al., 2009). Роль Ca^{2+} - и NF- κ B-зависимых механизмов и обратной регуляции между NOS и sGC в фотоиндуцированной генерации практически не изучена.

Другим стрессовым фактором для нейронов является травма периферических нервов, часто являющаяся причиной смерти и инвалидности животных (DiFazio et al., 2013; Park et al., 2012). Одним из видов механического повреждения является аксотомия, т.е. полная перерезка нервов, инициирующая каскад молекулярных и клеточных событий, приводящих к гибели нейронов (Barron, 2004). Известно, что в процессах выживания и гибели нейронов участвует NO (Kovaleva et al., 2013), а также 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 ретикулаума 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- κ B-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, оценить 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 pNOS 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 показано 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 ретикулула, 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 речевого рака.

4. Аксотомия индуцирует экспрессию E2F1 и APP в нейронах речевого 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).

Полученные результаты внедрены в научно-исследовательскую деятельность неврологического центра ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» и ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии», а также используются в педагогической и научно-исследовательской работе факультета «Ветеринарная медицина» ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет».

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.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе отражены данные научной литературы, освещающие представления о функциях монооксида азота в организме, строении и разновидностях ферментов, продуцирующих его, о роли данного низкомолекулярного мессенджера, Ca²⁺ и NF-κB при

фотодинамическом воздействии в клетках нервной системы, а также изложены научные представления о роли проапоптотических белков p53, E2F1 и APP в выживании и гибели нейронов при разрыве нерва и NO-зависимых процессах регулирования уровня данных белков.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы исследований

Исследования проведены на базе факультета «Биоинженерия и ветеринарная медицина» ФГБОУ ВО ДГТУ. Часть исследований была проведена в Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского ФГАОУ ВО ЮФУ.

Исследования проведены на абдоминальном рецепторе растяжения рака (PPP) *Astacus leptodactylus*, который состоит из двух механорецепторных нейронов (МРН), окруженных сателлитными глиальными клетками и крепящихся к паре рецепторных мышц, и на дорзальных ганглиях крысы (DRG). Исследования выполнены в соответствии с требованиями "Правил лабораторной практики в Российской Федерации" (приказ № 708н от 23.08.2010) и Директив Совета Европейского сообщества 86/609/ЕЕС об использовании животных для экспериментальных исследований (24.11.1986) и протокола № 2, утвержденного Комиссией по биоэтике Донского государственного технического университета 17 февраля 2020.

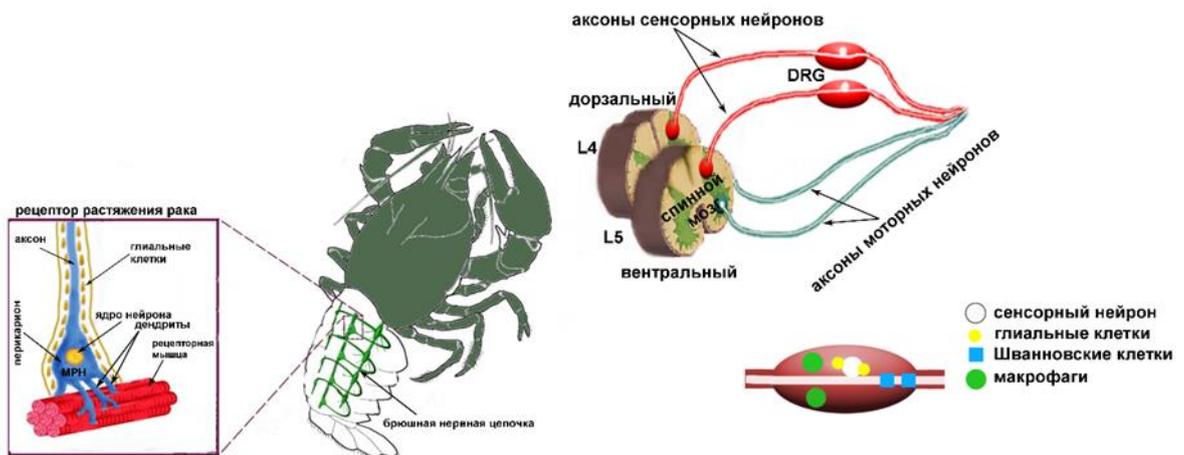


Рисунок 1 - Схема модельных объектов по исследованию влияния аксотомии на выживание и гибель нейронов и глиальных клеток: рецептор растяжения рака *Astacus leptodactylus*, а также дорзальные ганглии крысы [Родькин и др., 2021].

В исследовании были представлены **модели аксотомии** на беспозвоночных и позвоночных животных (Рисунок 1). МРН выделялись из раков *Astacus leptodactylus* по методике (Khaitin et al., 2015), позволяющей получать интактные МРН с целым аксоном, сохраняющим связь с соответствующим ганглием вентральной брюшной нервной цепочки (БНЦ) рака. Интактные МРН аксотомировали через 1, 4 и 8 часов. Перерезка седалищного нерва проводилась на взрослых самцах крыс возрастом 2-2,5 месяца и весом 200-250 г. Хирургическая операция по перерезке седалищного нерва проводилась по стандартному протоколу (Savastano et al., 2014). Общий наркоз крысам был осуществлен путем внутримышечного введения 0,75 мл смеси Ксила и Телазола в соотношении 2:1. Выведение животных из эксперимента осуществлялось при помощи декапитирования механической гильотиной через 4 и 24 часа или 7 суток после аксотомии.

Модель ФД-воздействия была выполнена на МРН, которые выделялись по классической методике Florey and Florey. Изолированные МРН помещались в специальную ванночку, заполненную физиологическим раствором ван Харревельда для

холоднокровных животных с добавлением отечественного фотосенсибилизатора Фотосенс (НИОПИК, Москва). Облучение осуществлялось полупроводниковым лазером, излучающим красный свет (670нм, 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. ФД-индуцированная генерация NO изучалась с помощью 4,5-диаминофлуоресцеина диацетата (DAF-2DA) до облучения и через 1, 4, 7, 10, 15, 20, 25, 30 мин с помощью камеры xioCam ERc 5s и программного обеспечения ZEN 2012 (Carl Zeiss).

Для исследования **фотоиндуцированной генерации NO** в МРН были применены 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 Ca²⁺-каналов L-типа (Nifedipine, 20 мкМ), блокатор Ca²⁺-каналов плазматической мембраны (CdCl₂, 100 мкМ), Ca²⁺-ионофор (Ionomycin, 2 мкМ), селективный ингибитор iNOS (SMT, 100 мкМ), ингибитор Ca²⁺-АТФазы эндоплазматического ретикулума (tBuBHQ, 35 мкМ). Все химические реактивы были приобретены у Sigma-Aldrich Rus (Москва, Россия) и Alomone Labs (Иерусалим, Израиль). Кроме этого проводились эксперименты с влиянием разных концентраций внеклеточного Ca²⁺ на динамику фотоиндуцированной генерации NO: в четыре раза выше нормы (54 мМ [Ca²⁺]_i) и в два раза меньше (6,7 мМ [Ca²⁺]_i).

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.

Определение локализации и экспрессии белков p53, E2F1 и APP в МРН и DRG после аксотомии проводилось с помощью методов **вестерн-блот и иммунофлуоресцентной микроскопии**. Так иммунофлуоресцентное исследование апоптотических белков в нейронах DRG включало следующие этапы: зафиксированный в 4% PFA биоматериал заливался в агарозные блоки, нарезался на вибраторе Leica VT 1000 S (Германия), полученные срезы толщиной 20 мкм блокировались в 5% BSA, инкубировались с первичными антителами к изучаемым белкам, маркерами нейроспецифического ядерного белка NeuN и далее со вторичными антителами. Аналогичные этапы блокирования и инкубации выдерживались и в отношении МРН. Ядра нейронов и глиальных клеток визуализировали с помощью Hoechst 33342. Срезы и МРН помещали в 60% глицерин и исследовали на микроскопе Olympus BX-51, оснащённом цифровой камерой OrcaFlash 4.0 V3 (Hamamatsu, Япония).

Для визуализации гибели клеток по пути апоптоза применялся метод TUNEL. Срезы, проинкубированные с первичными антителами, обрабатывались реагентами набора с добавлением вторичных антител, а также Hoechst 33342 (10 мкг/мл) и помещались во влажную камеру на 1 час при +37°C. Затем препараты промывались и заключались под предметное стекло. Анализ препаратов осуществлялся на флуоресцентном микроскопе Olympus BX51WI (Япония), оснащённом цифровой камерой ORCA-Flash4.0 V3, при возбуждении в диапазоне 570-620 нм.

Вестерн-блот анализ белков p53, E2F1 и APP в DRG осуществлялся путем гомогенизирования 4- и 5-ого DRG 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. Цитоплазматическая и ядерная фракции были выделены с использованием набора для экстракции ядерной фракции CellLytic NuCLEAR (Sigma Aldrich). Образцы по 10-20 мкг белка подвергали электрофоретическому разделению по методу Лэммли в полиакриламидном геле (7-10%) в присутствии додецилсульфата натрия, используя Mini-PROTEAN Tetracell (Bio-Rad). 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 и в течение ночи при 4 °С с первичными антителами против p53, E2F1, N-APP и β -актина, промывали и инкубировали с вторичными антителами. Детекцию белков проводили на Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad). Хемилюминесценцию анализировали с помощью системы гель-документации Fusion SL (Vilber Lourmat, Франция).

Статистический анализ выполняли с использованием One Way ANOVA. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Данные представлены, как Mean \pm SEM.

2.2. ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В разделе представлены результаты научных исследований, которые опубликованы в журналах, входящих в базы цитирования Web of Science, Scopus и РИНЦ. Результаты нашего исследования содержат новые сведения, расширяющие понимание о механизмах выживания и гибели нейронов и глиальных клеток при аксотомии и фотоокислительном воздействии.

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

Наши исследования показали, что динамика фотогенерации NO в нейронах и глиальных клетках PPP зависит от внеклеточной концентрации Ca^{2+} . Так 4-кратное увеличение внеклеточной концентрации Ca^{2+} повышало генерацию NO в PPP при ФДТ. В соме МРН наблюдался быстрый рост генерации 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, 10 мин в 2,5 раза и 15 мин в 1,9 раза относительно контрольной серии. В ГК и дендритах также происходило достоверное увеличение флуоресценции DAF-2DA (Рисунок 2 а; Таблица 1).

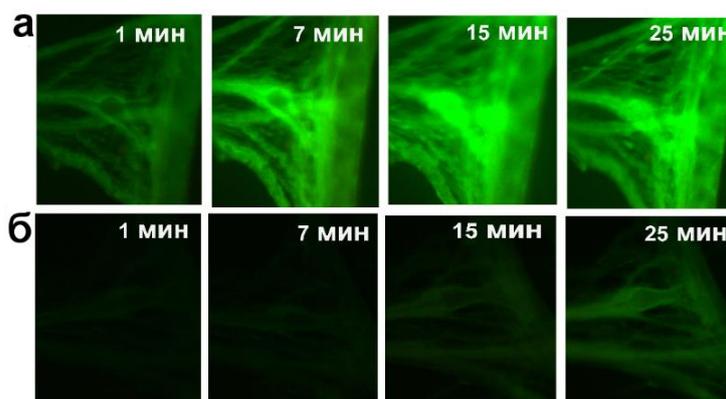


Рисунок 2 - Динамика генерации NO под действием 54 мМ внеклеточной концентрации Ca^{2+} во время ФД-воздействия с окраской NO-чувствительным флуоресцентным зондом DAF-2DA в различных областях изолированного PPP: а – опыт, б – контроль.

Продолжение Таблицы 1

tBuBHQ	-	-	-	-	-	-	↑(1,4)	↑(1,6)*
Prostratin	↑(1,3)*	↑(1,4)*	↑(1,5)*	↑(1,6)**	↑(1,7)*	↑(1,6)*	↑(1,5)*	↑(1,6)*
Parthenolide	-	↓(1,3)**	↓(1,4)**	↓(1,4)**	↓(1,6)**	↓(1,5)*	-	-
SMT	↓(1,2)*	↓(2,4)*	↓(2,5)*	↓(3,4)*	↓(3,9)*	↓(3,8)*	↓(3,7)*	↓(3,2)*
SMT+prostratin	-	↓(1,5)*	↓(2,0)*	-	-	-	-	-
ODQ	-	↓(1,3)*	↓(1,4)*	↓(1,3)*	↓(1,4)**	-	-	-
A350619	-	-	-	-	-	-	-	-
Глиальные клетки								
Вещество	1	4	7	10	15	20	25	30
Ca ²⁺ (54 мМ)	-	↑(1,9)*	↑(2,2)*	-	↑(2,3)*	↑(1,8)*	↑(1,9)*	↑(1,8)*
Ca ²⁺ (6,7 мМ)	-	-	-	-	-	-	-	-
Ionomycin	-	-	-	-	-	-	↑(1,6)*	↑(1,8)*
CdCl ₂	-	-	-	↓(2,2)*	-	-	-	-
Nifedipine	-	-	-	-	-	↓(2,0)*	↓(2,0)*	-
tBuBHQ	-	-	-	-	-	-	↑(1,8)*	↑(2,0)*
Prostratin	-	↑(1,3)*	-	-	-	-	-	-
Parthenolide	-	-	-	-	↓(1,5)*	-	-	-
SMT	-	-	↓(2,3)*	↓(2,8)*	↓(3,3)*	↓(3,0)*	-	-
SMT+prostratin	↓(1,6)*	↓(1,6)*	↓(1,6)*	-	-	↓(1,4)*	-	-
ODQ	-	-	-	-	↓(1,5)*	-	-	-
A350619	-	-	-	-	-	-	-	-
Дендриты								
Вещество	1	4	7	10	15	20	25	30
Ca ²⁺ (54 мМ)	-	-	↑(2,5)*	↑(2,5)*	-	↑(1,7)*	-	-
Ca ²⁺ (6,7 мМ)	-	-	-	-	-	-	-	-
Ionomycin	-	-	-	-	-	↑(1,8)*	↑(1,8)*	↑(1,8)*
CdCl ₂	-	-	↓(3,5)*	↓(3,8)*	↓(2,8)*	-	-	-
Nifedipine	-	-	-	-	↓(1,7)*	↓(1,6)*	↓(1,8)*	↓(2,0)*
tBuBHQ	-	-	-	-	-	-	↑(1,7)*	↑(2,0)*
Prostratin	-	-	-	↑(2,0)*	-	↑(1,5)*	↑(1,4)*	-
Parthenolide	-	↓(1,3)*	↓(1,4)*	-	↓(1,5)*	↓(1,7)*	-	-
SMT	-	↓(1,9)*	↓(2,0)*	↓(2,5)**	↓(2,5)*	↓(2,5)*	-	-
SMT+ prostratin	-	-	-	-	-	-	↓(1,7)*	-
ODQ	-	-	-	-	-	-	-	-
A350619	-	-	-	-	-	-	-	-
Аксон								
Вещество	1	4	7	10	15	20	25	30
Ca ²⁺ (54 мМ)	-	-	-	-	-	-	-	-
Ca ²⁺ (6,7 мМ)	-	-	-	-	-	-	-	-
Ionomycin	-	-	-	-	-	-	↑(1,5)*	-
CdCl ₂	-	↓(1,7)*	↓(2,0)*	↓(2,2)*	↓(1,8)*	-	-	-
Nifedipine	-	-	-	-	↓(1,7)*	↓(1,7)*	↓(1,9)*	-
tBuBHQ	-	-	-	-	-	-	↑(1,7)*	↑(2,0)*
Prostratin	↑(1,5)**	-	-	-	-	↑(1,4)*	-	-
Parthenolide	-	-	↓(1,5)*	↓(1,7)**	↓(1,8)**	↓(1,6)*	-	-
SMT	↓(1,2)*	-	-	↓(2,6)*	↓(2,6)*	↓(2,4)*	↓(2,0)*	↓(2,0)*
SMT+prostratin	-	↓(1,6)*	↓(1,6)*	↓(1,5)*	-	-	↓(1,7)*	-
ODQ	-	-	↓(1,4)*	↓(1,7)*	↓(1,6)*	↓(1,4)*	-	-
A350619	-	-	-	-	-	-	-	-

Фотоиндуцированная генерация NO в МРН и глиальных клетках под действием блокатора SERCA tBuBHQ, ингибирующего Ca²⁺-АТФазу эндоплазматического ретикулума (ЭПР), имела положительную тенденцию и достоверно увеличивалась на последних минутах облучения в соме, дендритах и аксоне МРН, а также в ГК (Таблица 1). Известно, что SERCA эффективно рекрутирует Ca²⁺ из цитоплазматического пространства в эндоплазматический ретикулум (Chemaly et al., 2018; Periasamy et al., 2017). Вероятно, поздняя реакция увеличения NO при ФД воздействии под действием tBuBHQ в разных частях МРН и ГК связана с внутриклеточными компенсаторными механизмами рекрутирования или удаления из клетки Ca²⁺ в условиях блокирования SERCA, что препятствует излишнему повышению Ca²⁺ в цитоплазме и активации nNOS. Кроме ЭПР, в поддержании Ca²⁺-гомеостаза участвуют митохондрии (Maklad et al., 2019), аппарат

Гольджи (Dolman, Terpikin, 2006). Также 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).

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

Исследование влияния фактора транскрипции NF-κB на продукцию NO в нейронах и ГК PPP при ФД воздействии проводилось с помощью модуляторов NF-κB, активатора Prostratin и ингибитора Parthenolide. Известно, что NF-κB является важным транскрипционным фактором, который, в частности, ответственен за экспрессию iNOS (Kleinert et al., 2003; Singh et al., 2016). Так было показано, что Prostratin повышает продукцию NO в соме МРН с первых минут облучения, максимально увеличивая её в 1,6 раза на 15 мин относительно контроля, а в ГК – на 4 мин в 1,3 раза. В аксоне и дендритах Prostratin также увеличивал генерацию NO, максимальный уровень которого наблюдался на 20 мин облучения (Таблица 1). При этом динамика генерации NO в МРН имела двухфазовый характер: быстрый рост и медленный спад. Вероятно, увеличение продукции NO в нейронах осуществляется через NF-κB-зависимый путь активации iNOS, а наблюдаемый спад связан с развивающимся фотоокислительным стрессом, который может через АФК ингибировать iNOS (Forstermann, 2010; Weidinger et al., 2015). Наблюдаемая фотоиндуцированная генерация NO в аксоне может быть объяснена, как центробежным транспортом iNOS в эту часть нейрона, как было показано с nNOS (Gonzalez-Hernandez, Rustioni, 1999), так и диффузией NO из окружающих ГК. Данная NOS продуцируется во многих клетках организма, включая нейроны и глиальные клетки (Arias-Salvatierra et al., 2011; Shang et al., 2017; Brown, Vilalta, 2015). Продукция NO в дендритных окончаниях согласуется с прошлыми исследованиями, в которых наблюдалась экспрессия iNOS в дендритной области нейрона (Takumida et al., 2000).

Противоположные результаты были получены в экспериментах с ингибитором NF-κB Parthenolide, причем во всех препаратах, что, может свидетельствовать 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).

Для подтверждения экспрессии iNOS в МРН и ГК нами были проведены дополнительные эксперименты с селективным ингибитором iNOS SMT, а также комбинированные опыты SMT+Prostratin. SMT с первых минут облучения значительно снижало генерацию NO как в соме, дендритах и аксоне МРН, так и в ГК. Максимальное уменьшение в 3,9 раз относительно контроля в теле МРН было зафиксировано на 15 мин, а в ГК – на 15 мин в 3,3 раза. В дендритах и аксоне SMT также приводило к достоверному уменьшению продукции NO (Таблица 1).

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 с Prostratin.

2.2.3 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). Исследование влияния sGC на продукцию NO в нейронах и ГК PPP при ФД воздействии проводилось с помощью модуляторов sGC, активатора A350619 и ингибитора ODQ. Было показано, что ODQ приводит к максимальному снижению продукции NO в соме МРН на 15 мин

облучения в 1,46 раза относительно контроля. Уменьшение генерации NO наблюдалось в ГК и аксоне (Таблица 1).

Продукция NO под действием A350619 в теле и аксоне нейрона, а также в глиальных клетках не отличалась от контрольных образцов. Только в дендритных окончаниях достоверное уменьшение флуоресценции наблюдаются на 4 и 7 минутах после облучения (Таблица 1).

Полученные данные могут свидетельствовать о механизмах обратной связи между NOS и cGMP, которые наблюдались в прошлых исследованиях (Inoue et al., 1995; Dawson et al., 1993). Однако, молекулярные аспекты этих процессов остаются пока слабо изученными. Отсутствие достоверных изменений в экспериментах с активатором sGC могут быть связаны с изначально высоким уровнем sGC, инактивацией Ca^{2+} -каналов L-типа через сигнальный путь cGMP / PKG (Sandoval et al., 2017).

2.2.4 Роль NO в выживании и гибели нейронов и глиальных клеток DRG при перерезке седалищного нерва

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). NO может участвовать в выживании и гибели нейронов при аксотомии (Thippeswamy et al., 2007), однако до конца его роль в этом патологическом процессе не изучена. В нашем исследовании с помощью донора NO и селективного ингибитора iNOS мы показали, что NO ответственен за гибель нейронов и глиальных клеток в дорзальных ганглиях крысы при аксотомии (Рисунок 3).

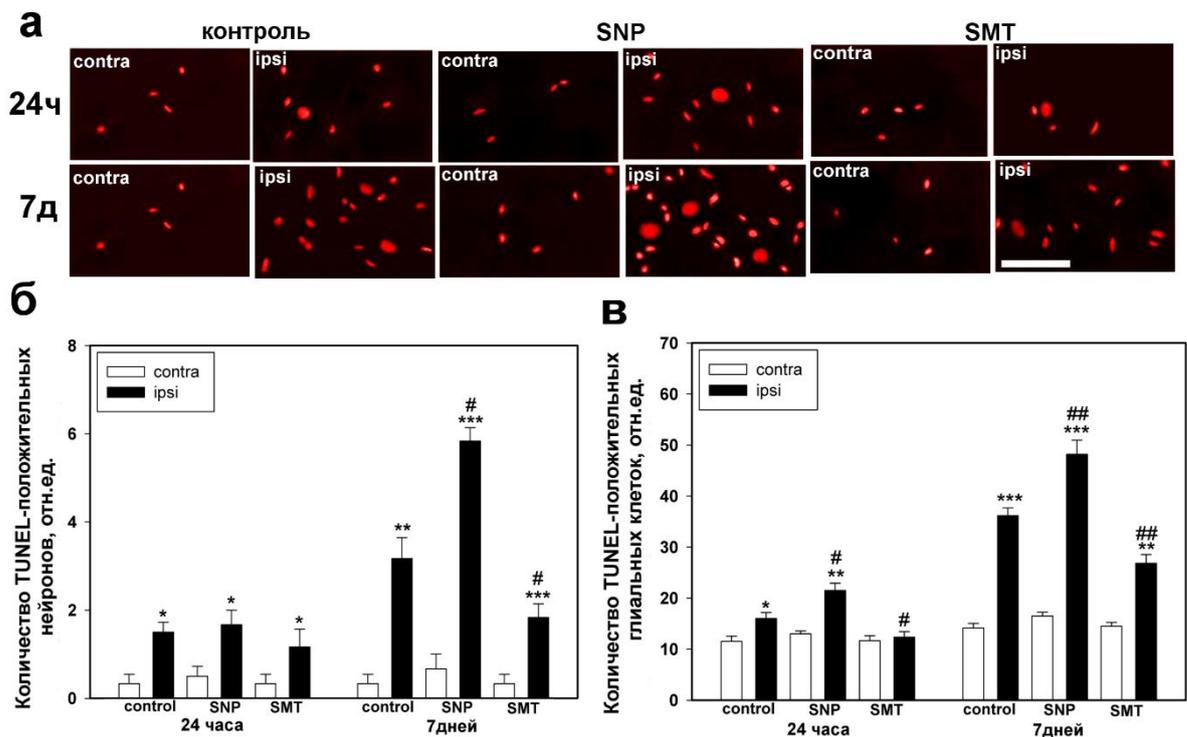


Рисунок 3 - Количество TUNEL-положительных клеток в контролатеральном и ипсилатеральном DRG контрольной и экспериментальных групп животных после перерезки седалищного нерва. (а) - Иммунофлуоресцентная микроскопия срезов DRG, окрашенных TUNEL. (б) - Количество TUNEL-положительных нейронов. (в) - Количество TUNEL-положительных ГК. Достоверность отличий: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$, относительно контролатерального DRG внутри одного животного; ## $p < 0,01$; # $p < 0,05$, относительно ипсилатерального DRG контрольной группы. $n=6$.

В нашем исследовании было показано, что через 7 суток после аксотомии количество апоптотических нейронов и ГК значительно увеличивается относительно 24 часов, причем донор NO достоверно увеличивает эту тенденцию, а селективный ингибитор iNOS снижает её, проявляя нейропротекторный эффект (Рисунок 3 а, б, в). Так количество TUNEL-положительных нервных клеток и ГК ипсилатеральных ганглиев групп с применением SNP и SMT относительно ипсилатерального DRG контрольной группы в первом случае увеличилось в 1,8 раза и 30%, а во втором – уменьшилось в 1,7 раз и 25%, соответственно (Рисунок 3 б, в).

Полученные нами данные свидетельствуют, что в гибели нейронов и ГК 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). Механизмами, реализующими апоптотическую гибель нейронов и ГК, могут быть, как NO-зависимый нейротоксический ответ глии, блокирование цитохромоксидазы NO, окислительный стресс, вызванный гиперпродукцией ONOO⁻ через активацию iNOS (Förstermann, Sessa, 2012), так и активация p53 сигнального пути NO.

2.2.5 Роль p53 в нейронах и глиальных клетках беспозвоночных животных при аксотомии

Белок p53 участвует в различных процессах в организме. Как фактор транскрипции, он контролирует экспрессию множества генов, участвующих в регуляции метаболизма, стрессовых реакций, пролиферации, апоптоза и др. (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). В нашем исследовании было показано, что в контрольных МРН p53 локализован главным образом в ядрышке и узком, шириной 2-4 мкм, цитоплазматическом кольце вокруг ядра. Уровень p53 в перикарионе и ядрах ГК была ниже. Также p53 не обнаруживался в аксонах. Через 4 и 8 часов после аксотомии уровень p53 увеличивался в ядрах нейронов и ГК, в перикарионе и перинуклеарном кольце МРН относительно контроля (Рисунок 4 а, б).

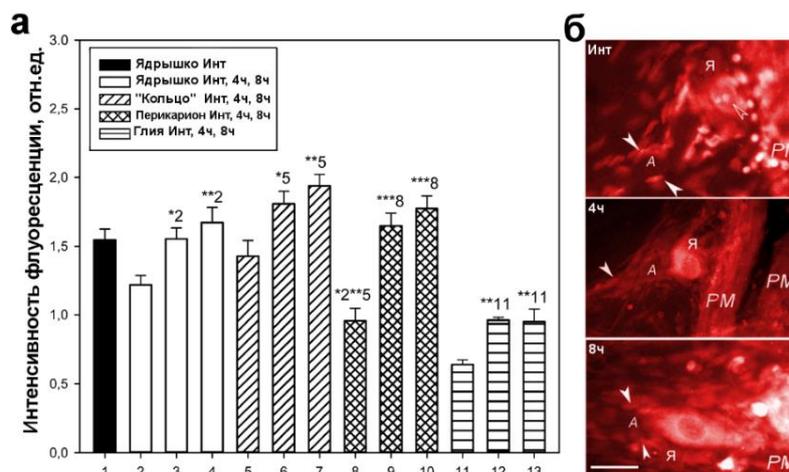


Рисунок 4 - (а) - Динамика иммунофлуоресценции p53 в разных частях аксотомизированного РРР. (б) - Экспрессия p53 (красная флуоресценция) в МРН интактном и через 4 и 8 часов после аксотомии, а также в ГК. Достоверность отличий: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. $n=10$.

Накопление p53 в ядре, вероятно, связано с его интенсивным синтезом и быстрой посттрансляционной транслокацией в ядро, а также затрудненным ядерно-

цитоплазматическим транспортом. Известно, что 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 (Culmsee and Mattson., 2005). Узкое цитоплазматическое кольцо в интактных МРН может быть связано с удерживанием p53 рядом с ядерной мембраной до своего импорта через ядерные поры ввиду быстрого его синтеза. Накопление p53 в ядрышках нейронов также вызывает интерес. Ядрышко, как известно, является фабрикой рибосом (McLeod et al., 2014). 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). Отсутствие избыточного количества p53 в ядрышках после аксотомии может быть связано с деструкцией мультибелкового комплекса, управляющего связыванием p53 с ядрышковыми структурами. (Erickson and Bazan 2013).

Использование пифитрина-μ, ингибирующего связывание p53 с митохондриями, приводило к уменьшению площади иммунофлуоресценции p53 в перикарионе. Это показало, что пифитрин-μ частично ингибировал связывание p53 с нейрональными митохондриями.

2.2.6 NO-зависимые механизмы экспрессии p53 в нейронах и глиальных клетках DRG

На сегодняшний день известно, что NO может регулировать различные белки, включая p53. Наши исследования, показали, что аксотомия через 24 часа вызывает значительное уменьшение уровня p53 в ядре и практически двукратное увеличение его в цитоплазме нейронов (Рисунок 5 а, б).

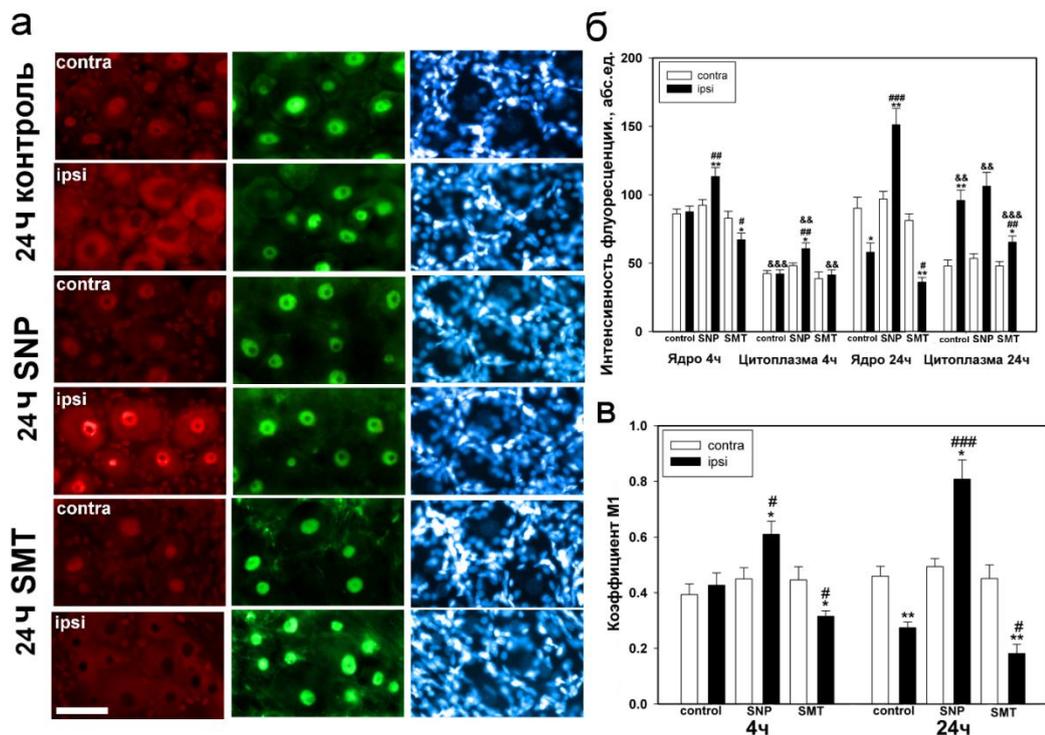


Рисунок 5 - Экспрессия p53 в ядрах и цитоплазме нейронов ипсилатерального и контралатерального DRG в контрольной и экспериментальных группах через 4 и 24 часа после перерезки седалищного нерва. (а) – Иммунофлуоресцентная микроскопия: экспрессия p53 через 24 часа после аксотомии. (б) – Интенсивность флуоресценции. (в) – Коэффициент MI. Достоверность отличий: *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. n=6.

В контралатеральных DRG p53 локализуется, главным образом, в нуклеоплазме нейронов и ГК. 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 (Рисунок 5 в). Это указывает, что, возможно, независимая от транскрипции активность p53 участвует в индуцированном аксотомией апоптозе нейронов DRG. Известно, что апоптотическая активность p53 может быть 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 (Aubrey et al. 2018; Wan et al. 2014). Апоптоз ГК происходит, вероятно, по p53-транскрипционно зависимому пути. 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 (Engelmann, Puttzer, 2010; Meng, Gosh, 2014).

Введение SNP приводило к увеличению уровня p53 максимально в ядре и цитоплазме аксотомированных нейронов и в ядрах, окружающих их, ГК через 4 и 24 часа после перерезки седалищного нерва, как относительно контралатерального DRG этого животного, так и контрольной группы. Иная динамика наблюдалась в ипсилатеральных DRG 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 (Рисунок 5 а, б, в). Проведенный вестерн-блот анализ подтверждает данные иммунофлуоресцентной микроскопии (Рисунок 6).

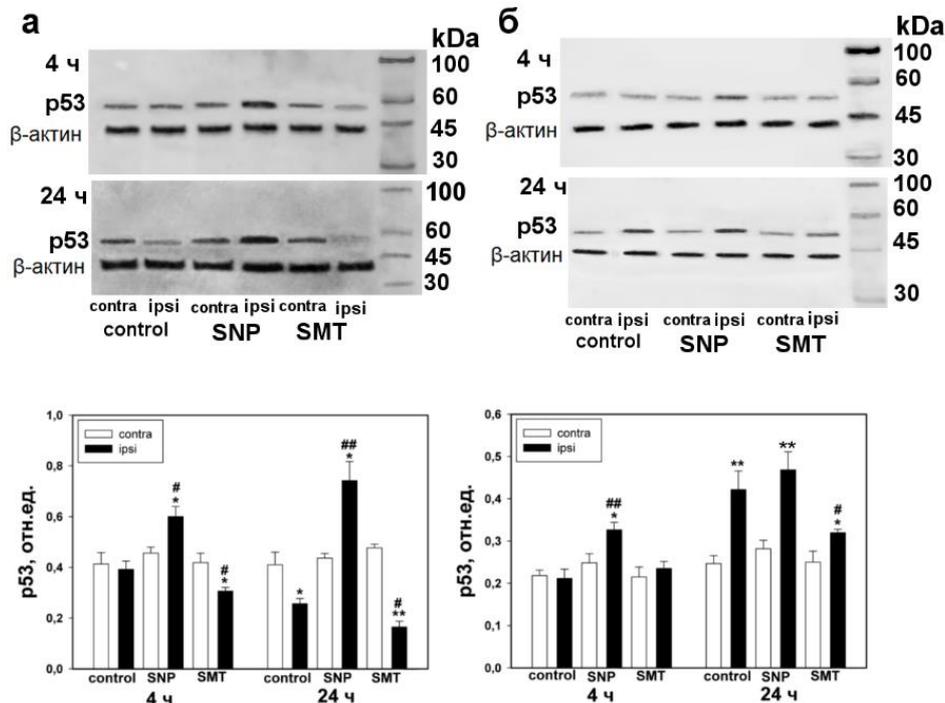


Рисунок 6 - Вестерн-блот анализ. Влияние SNP и SMT на экспрессию белка p53 в ипсилатеральном DRG и контралатеральном DRG через разное время после аксотомии. (а) – ядерная фракция. (б) – цитоплазматическая фракция. Достоверность отличий: *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 – ипсилатеральный DRG относительно контралатерального DRG одного животного; #p < 0.05, ##p < 0.01, ###p < 0.001 – ипсилатеральный DRG относительно ипсилатерального DRG контрольной группы. n=6.

Эти данные согласуются 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). Известно, что на ранних сроках NO приводит к уменьшению уровня Mdm2, снижая убиквитинирование и последующую протеосомную деградацию p53 (Wang et al., 2003), что может быть одним из механизмов его накопления при аксотомии в условиях высокого уровня NO.

2.2.7. Роль E2F1 в нейронах при аксотомии

Транскрипционный фактор E2F1 играет важную роль в регуляции критических клеточных процессов, включая остановку клеточного цикла и апоптоз. 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. Иммунофлуоресцентная микроскопия показала, что E2F1 локализовался исключительно в нейронах DRG и практически отсутствовал в ГК (Рисунок 7 а). Через 1 час после перерезки седалищного нерва E2F1 практически отсутствовал в DRG. Но через 4 часа после аксотомии средний уровень E2F1 в аксотомированных ганглиях значительно повышался относительно одночасовой группы как в цитоплазме нейронов в 2,5 раза, так и в особенности в их ядрах почти в 5 раз, где флуоресценция E2F1 была максимальной. Через 24 часа после перерезки седалищного нерва уровень иммунофлуоресценции E2F1 относительно контралатеральных ганглиев не изменялся, но наблюдалось снижение интенсивности флуоресценции E2F1 (Рисунок 7 б, в).

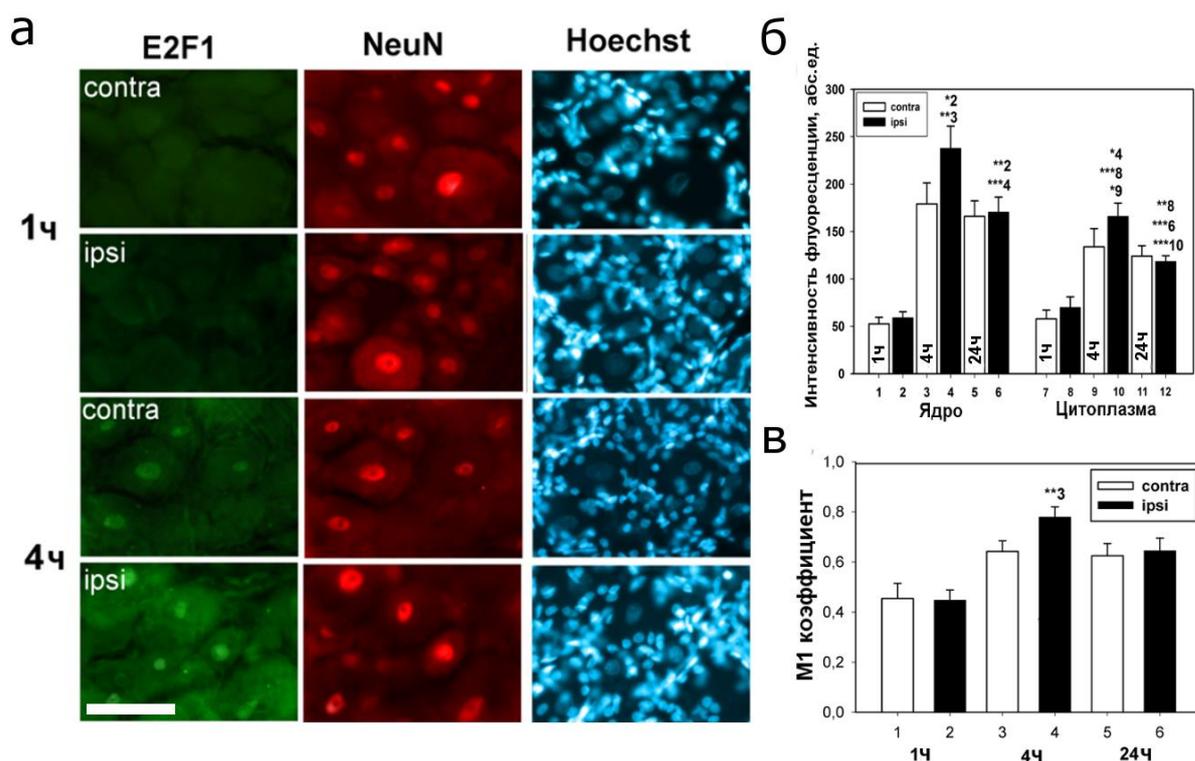


Рисунок 7 - Экспрессия E2F1 в ядрах и цитоплазме нейронов ипсилатерального и контралатерального DRG через 1, 4 и 24 часа после перерезки седалищного нерва. (а) - Иммунофлуоресцентная микроскопия E2F1. (б) - Интенсивности флуоресценции E2F1. (в) - Коэффициент M1. Достоверность отличий: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. $n=6$.

Известно, что E2F1 является фактором транскрипции p53 (Ma et al., 2017). 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).

Вестерн-блот анализ показал, что E2F1 в ипсилатеральных DRG был достоверно выше, чем в контралатеральных DRG через 4 часа после перерезки седалищного нерва. При этом уровень этого белка через 4 и 24 часа в аксотомированных DRG крысы был существенно выше, чем через 1 час после перерезки седалищного нерва (Рисунок 8).

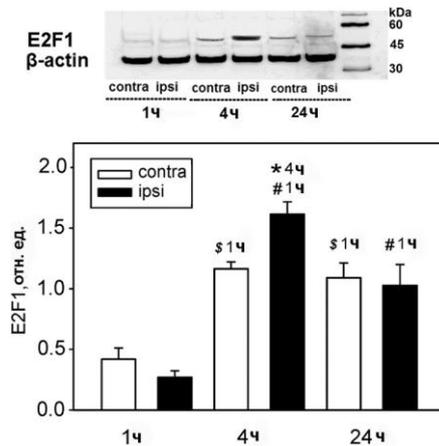


Рисунок 8 - Влияние перерезки седалищного нерва на экспрессию белка E2F1 в контралатеральном DRG и ипсилатеральном DRG через разное время после аксотомии. Достоверность отличий от контроля: * $p < 0.05$; достоверность отличий от величин, определенных в разные моменты времени: # $p < 0.05$, \$ $p < 0.05$. $n = 6$.

Более детальные изменения на клеточном уровне наблюдались на изолированном PPP. На микрофотографиях ясно видно, что E2F1 локализуется только в теле МРН, но не в аксоне и дендритах и не в окружающих глиальных клетках (Рисунок 9 а). В контрольных МРН экспрессия E2F1 практически не наблюдалась. Уровень E2F1 резко возрастал в перикарионе и слабее в ядре после аксотомии через 4 часа и еще больше через 8 часов (Рисунок 9 б).

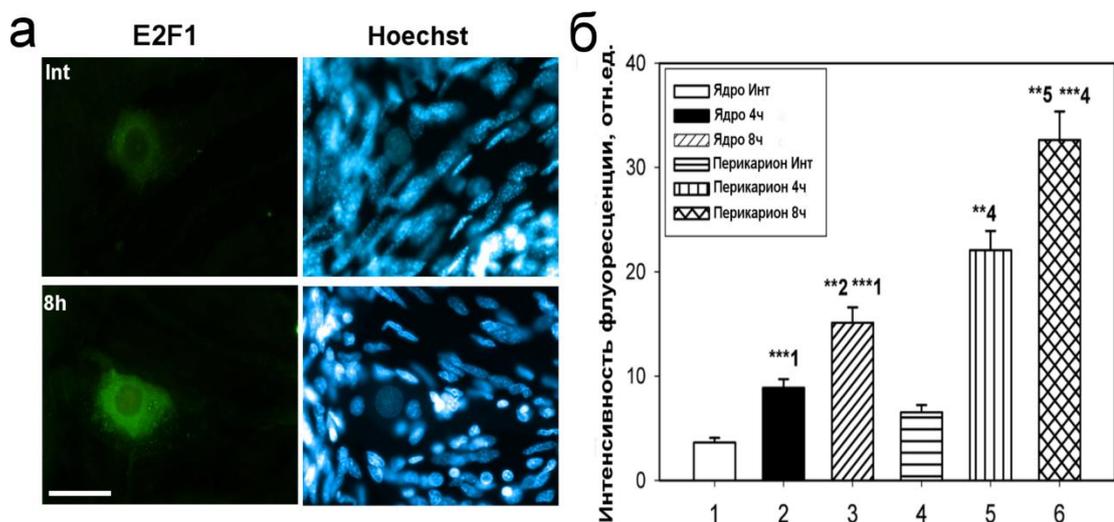


Рисунок 9 - Экспрессия E2F1 в МРН интактных и через 4 и 8 часов после аксотомии: (а) - Флуоресцентная микроскопия E2F1. Масштабный отрезок 100 мкм (б) - E2F1 в ядре и перикарионе. Достоверность отличий: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0.001$. $n = 10$.

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 (Dzrean et al., 2020). 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 пермеабилзации (Demyanenko and Uzdensky., 2017).

2.2.8. Роль APP в нейронах при аксотомии

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 с помощью иммунофлуоресцентного исследования было показано, что C-APP и N-APP локализовались преимущественно в нейронах DRG, а не в ГК. В контралатеральных DRG C-APP локализовался в цитоплазме нейрональной сомы, где его средний уровень был достоверно выше, чем в ядрах (Рисунок 10 а).

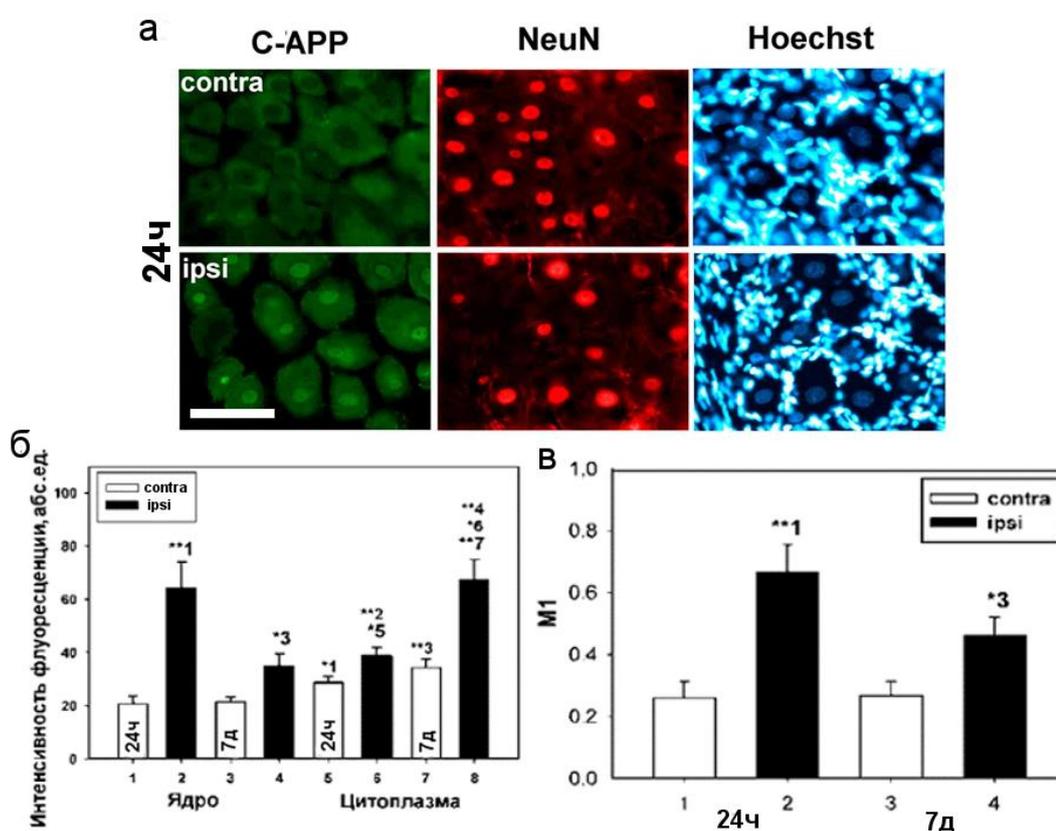


Рисунок 10 - Экспрессия C-APP в ядрах и цитоплазме нейронов ипсилатерального и контралатерального DRG через 24 часа и 7 дней после перерезки седалищного нерва. (а) - Иммунофлуоресцентная микроскопия. (б) - Интенсивности флуоресценции. (в) - Коэффициент M1. Достоверность отличий: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. $n=6$.

Через 24 часа и 7 суток после перерезки седалищного нерва средний уровень C-APP в аксотомированном ипсилатеральном DRG заметно повышался по сравнению с контралатеральным DRG, как в ядрах в 3 раза и в 1,8 раза, соответственно, так и в цитоплазме нейронов на 33% и на 88%, соответственно. Через 24 часа C-APP преимущественно локализовался в ядрах аксотомированных нейронов (Рисунок 10 а, б, в).

В отличие от C-APP, накопления N-APP в нейрональных ядрах не отмечалось, при этом его уровень в цитоплазме аксотомированных нейронов повышался относительно

контрольных препаратов (Рисунок 11 а, б). Эти данные подтверждает коэффициент M1 (Рисунок 11 в).

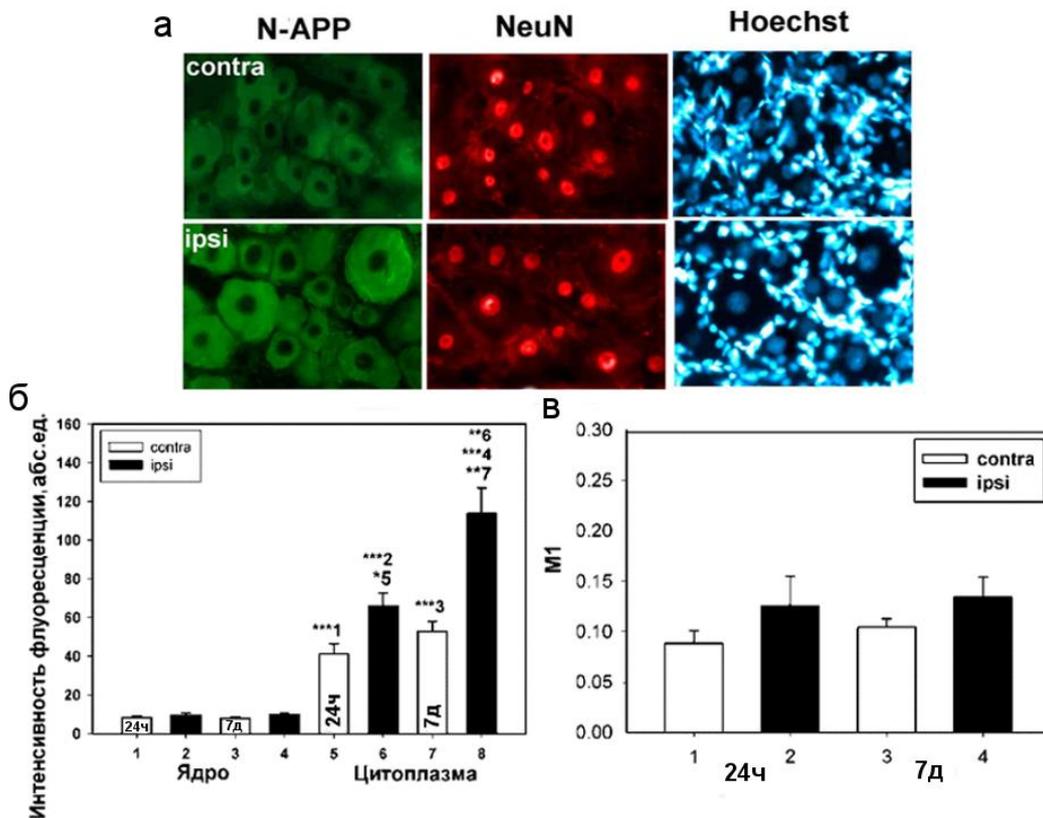


Рисунок 11 - Экспрессия N-APP в ядрах и цитоплазме нейронов ипсилатерального и контралатерального DRG через 24 часа и 7 дней после перерезки седалищного нерва. (а) - Иммунофлуоресцентная микроскопия. (б) - Интенсивности флуоресценции. (в) - Коэффициент M1. Достоверность отличий: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. $n=6$.

Детали внутриклеточной локализации и перераспределения APP в нейроне после аксотомии были также исследованы на примере МРН РРР. С-APP и N-APP в контрольных интактных препаратах (Int) и через 4-8 часов после перерезки аксона обнаруживались исключительно в МРН, но не в окружающих его ГК (Рисунок 12 а). Флуоресценция С-APP в перикарионе и других частях МРН существенно возрастала после аксотомии: на 50% через 4 и на 150% через 8 часов. Интерес вызывает флуоресценция С-APP в ядрышке МРН. Через 4 часа после перерезки появлялась флуоресценция в аксоне, которая еще больше усиливалась через 8 часов после аксотомии, в 9 раз выше (Рисунок 12 б).

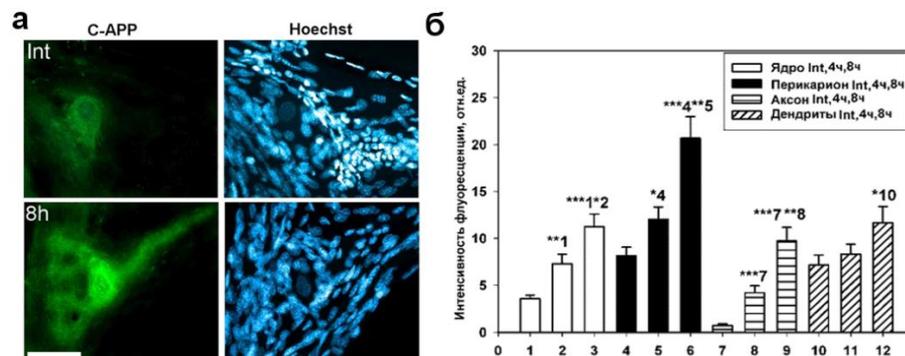


Рисунок 12 - Экспрессия С-APP в МРН интактных и через 4 и 8 часов после аксотомии: (а) - Флуоресцентная микроскопия С-APP. Масштабный отрезок 100 мкм. (б) - Интенсивность флуоресценции С-APP в ядре, перикарионе, аксоне и дендритах. Достоверность отличий: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0.001$. $n=10$.

N-APP, в отличие от С-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 (Рисунок 13 а). Через 4 и 8 часов после аксотомии флуоресценция в этих зонах прогрессивно увеличивалась и появлялась в аксоне МРН (Рисунок 13 б).

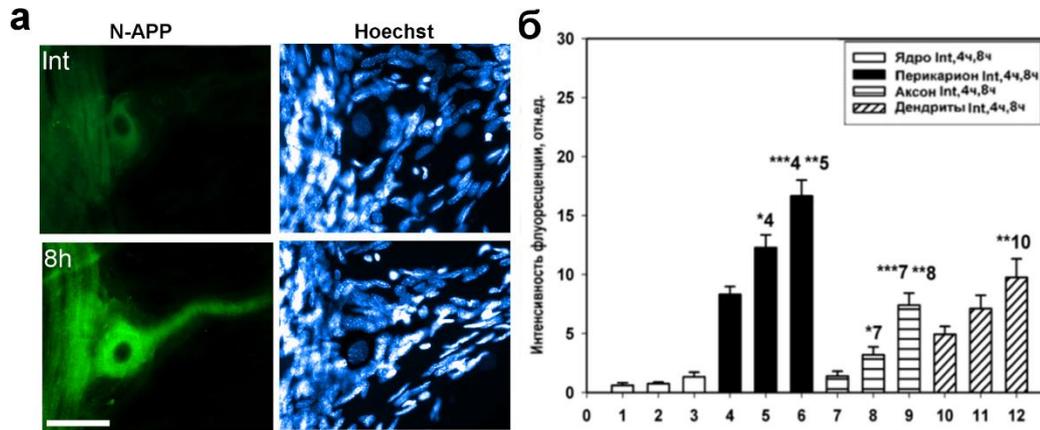


Рисунок 13 - Экспрессия N-APP в МРН интактных и через 4 и 8 часов после аксотомии: (а) -Флуоресцентная микроскопия N-APP. Масштабный отрезок 100 мкм. (б) - Интенсивность флуоресценции N-APP в ядре, перикарионе, аксоне и дендритах. Достоверность отличий: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. $n=10$.

Мы предполагаем, что ядерная локализация С-APP обусловлена С-терминальным фрагментом АICD, 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). Известно, что АICD 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 (Koistinen et al., 2017; Multhaup et al., 2015; Vukhari et al., 2017). 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. Интерес представляет флуоресценция С-APP в ядрышке. Известно, что ядрышко необходимо для поддержания внутриклеточного гомеостаза. Локализация С-APP в ядрышке предполагает его участие в этих сложных процессах.

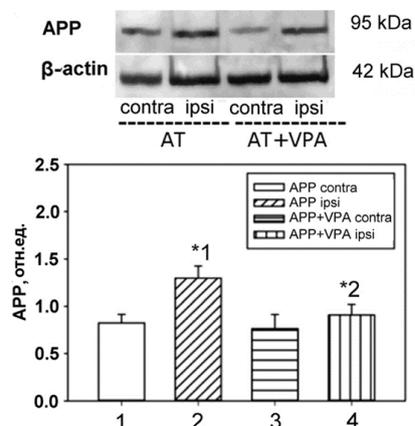


Рисунок 14 - Вестерн-блот анализ: влияние вальпроата натрия (VPA) на уровень белка APP в ипсилатеральном DRG (ipsi) относительно контралатерального DRG (contra) на 7 день после аксотомии. Достоверность отличий: * $p < 0,05$. $n=6$.

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 вальпроата натрия снижало экспрессию N-APP (Рисунок 14). 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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе исследования было установлено, что в ФД-индуцированной генерации NO в нейронах и ГК участвует, как nNOS, так iNOS. Было показано, что четырехкратное повышение внеклеточного Ca^{2+} в условиях фотоокислительного стресса быстро приводит к активации nNOS, активируемой, как известно, Ca^{2+} /кальмодулином (Zhou et al., 2018). Мы установили, что в фотоиндуцированной генерации NO участвуют Ca^{2+} -каналы плазматической мембраны, в частности, Ca^{2+} -каналы L-типа и SERCA, блокирование которого, вероятно, компенсировалось Ca^{2+} -рекрутирующими клеточными органеллами (Maklad et al., 2019; Dolman, Terikín, 2006) и выходом Ca^{2+} во внеклеточное пространство (Рисунок 15 а).

Исследования с селективным ингибитором iNOS продемонстрировали частично-конститутивный тип экспрессии этого фермента (Tang, 2007; Ruscheweyh, 2006). Результаты с активатором и ингибитором NF-κB показали NF-κB-зависимую фотоиндуцированную генерацию NO, реализующуюся через активацию iNOS. Эти данные подтверждают эксперименты с SMT+Prostratin. Также в нашем исследовании было показано, что существуют механизмы обратной связи между sGC и NO при фотоокислительном стрессе.

Мы изучили вопрос по влиянию NO на выживание нейронов и ГК и установили, что NO участвует в процессах апоптоза этих клеток. Нами было продемонстрировано достоверное увеличение в аксотомированных DRG апоптоза нейронов и ГК при использовании NO-донора. Противоположный эффект наблюдался в экспериментах с селективным ингибитором iNOS. Эти результаты указывают на одну из ключевых ролей NO, продуцируемого iNOS, в апоптозе этих типов клеток в условиях аксонального повреждения, что согласуется с прошлыми исследованиями (Caggiano and Kraig., 1998; Martin et al., 2005).

Кроме того, эксперименты с NO-донором и ингибитором iNOS продемонстрировали NO-зависимые механизмы экспрессии и локализации p53 при аксотомии в нейронах и ГК. NO-донор вызывал выраженное накопление p53 в ядрах этих клеток, а также менее интенсивное увеличение его уровня в цитоплазме нейронов. При этом в аксотомированных нейронах контрольной группы наблюдалось ядерно-цитоплазматическое перераспределение p53, что еще больше усиливалось ингибитором iNOS. Эти данные указывают на NO-зависимые механизмы экспрессии и локализации p53 в нейронах и ГК, которые могут лежать в основе гибели этих клеток при аксотомии (Рисунок 15 б). Полученные данные согласуются с прошлыми исследованиями, в которых сообщалось о NO-зависимой индукции p53 (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).

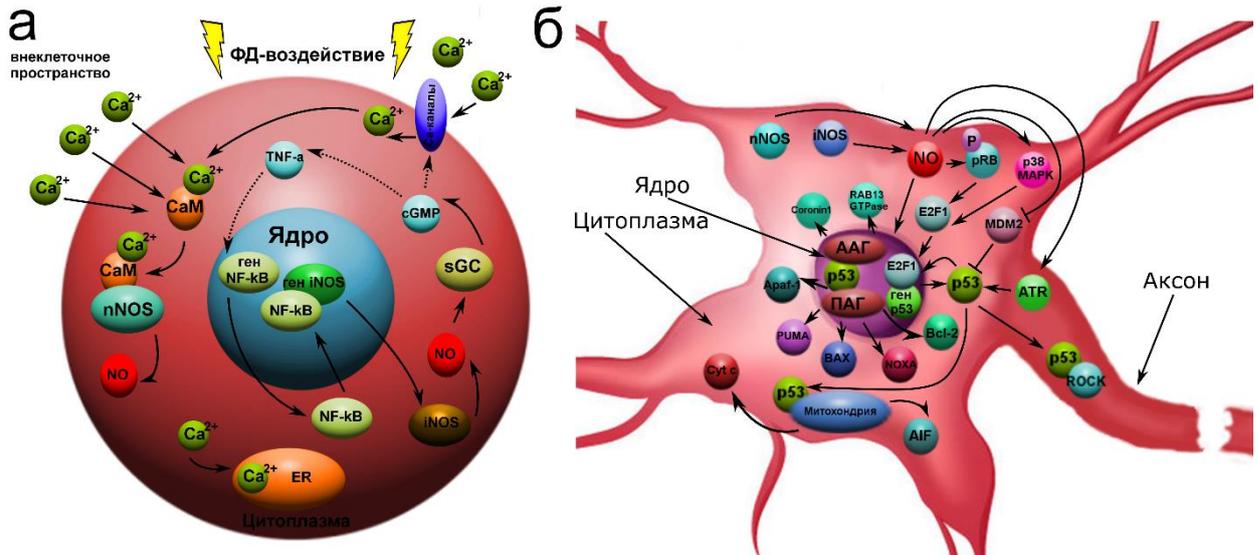


Рисунок 15 - Концептуальные схемы: (а) – молекулярно-клеточные механизмы, контролирующие генерацию NO в нейронах и глиальных клетках при фотоокислительном стрессе. (б) - механизмы экспрессии и локализации p53, а также его роли в нейронах при аксотомии.

Также мы детально рассмотрели экспрессию p53 в МРН речного рака. Мы показали, что после перерезки аксона флуоресценция p53 исчезает в ядрышке, увеличивается в ядре, цитоплазме и узком кариоплазматическом кольце. Наши исследования подтверждают критическую роль ядрышка в регулировании p53 при стрессе (Erickson and Bazan 2013; Parlato and Kreiner 2013). В ГК флуоресценция p53 наблюдалась в ядрах. Пифитрин-μ уменьшал цитоплазматическое распределение p53 при аксотомии.

Важные результаты были получены в ходе изучения E2F1. Аксотомия приводила к накоплению E2F1 в цитоплазме и менее выражено в ядре нейронов. E2F1 может регулировать уровень p53 при аксотомии (Ertosun et al., 2016). В свою очередь NO может контролировать E2F1 (Рисунок 15 б) (Ying et al., 2007).

Другим белком, изученным в нашей работе, стал APP. Нами было показано, что аксотомия вызывает рост уровня C-APP и N-APP в нейронах DRG и рака. Увеличение уровня C-APP в ядре МРН и нейронах DRG через 4, 8 часов и 24 часа, 7 дней после аксотомии, соответственно, указывает на проникновение в ядро нейрона растворимого фрагмента AICD. Флуоресценция C-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, которые также были изучены в нашей работе.

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.

Практическое приложение

В нашей работе было показано, что в фотоиндуцированной генерации NO в нейронах и глиальных клетках участвуют Ca^{2+} , sGC и NF- κB , что указывает на их ключевое значение в механизмах NO-зависимого выживания или гибели этих клеток в условиях фотоокислительного стресса. Фармакологическая модуляция Ca^{2+} -, sGC- и NF- κB -сигнальных путей представляет потенциально эффективный терапевтический способ регулирования активности nNOS и iNOS, позволяющий снизить негативное ФД воздействие на здоровую нервную ткань.

Изученные с помощью NO-донора и селективного ингибитора iNOS механизмы экспрессии p53 и клеточной гибели в DRG при перерезке седалищного нерва могут быть учтены при терапии травм периферических нервов с их полным или частичным разрывом. Изученные нами при аксональном стрессе проапоптотические белки p53, E2F1 и APP, экспрессия которых увеличивается в клетках нервной ткани при этом патологическом процессе, могут стать терапевтической мишенью при борьбе за выживание поврежденных нейронов и окружающих их глиальных клеток в результате нейротравмы. Используемые в нашем исследовании ингибиторы и активаторы могут помочь в разработке эффективных нейропротекторных препаратов.

Рекомендации и перспективы дальнейшего развития

Учитывая полученные данные о роли Ca^{2+} , sGC и NF-κB, а также iNOS в фотоиндуцированной генерации NO в нейронах и глиальных клетках представляется целесообразным провести комплексное иммунофлуоресцентное исследование экспрессии и локализации pNOS и iNOS в этих клетках при фотоокислительном стрессе. Принимая во внимание результаты исследования по влиянию NO на экспрессию p53 и клеточную гибель в DRG при аксотомии, стоит также изучить распределение выше представленных изоформ NOS на данной модели повреждения нерва. Повышение экспрессии проапоптотических белков E2F1 и APP в нейронах DRG и МРН речевого рака при аксотомии может в будущем быть рассмотрена с позиции частичного NO-модулирования их активности с помощью ингибиторно-активаторного анализа, что представляет научный интерес с учетом ранее выявленных механизмов экспрессии этих белков через NO-зависимые сигнальные пути. Выявленная консервативная природа p53-, E2F1- и APP-сигналинга на моделях аксотомии позвоночных и беспозвоночных животных представляет интерес с точки зрения теории эволюции внутриклеточной сигнализации и механизмов выживания и гибели нейрональных клеток в условиях аксонального стресса. Исходя из выше сказанного, стоит рассмотреть экспрессию данных белков, а также изучить их возможное регулирование NO в сенсорных и моторных нейронах, а также в глиальных клетках спинного и головного мозга при нейротравмах, связанных с разрывом нервных путей.

Также использованные в нашем исследовании ингибиторы и активаторы могут помочь в разработке эффективных нейропротекторных препаратов, способных защитить нервные и глиальные клетки от гибели в условиях аксонального и фотоокислительного стресса.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в журналах, входящих в базы данных Scopus и Web of Science (Q1-Q2)

1. **Rodkin S.V.**, Kovaleva V.D., Berezhnaya E.V., Neginskaya M.A., Uzdensky A.B. Ca^{2+} - and NF- κ B-dependent generation of NO in the photosensitized neurons and satellite glial cells // J Photochem Photobiol B. – 2019. – V. 199. – P. 1111603.
2. 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.
3. **Rodkin S.V.**, Kovaleva, V.D., Berezhnaya E.V., Neginskaya M.A., Uzdensky A. B. The role of Ca^{2+} and NF - kappa B in NO generation in photosensitized neurons and glial cells // Journal of bioenergetics and biomembranes. Meeting Abstract. – 2018. – V. 50. – № 6. – P. 593 – 594.
4. Kovaleva V., Berezhnaya E., Neginskaya M., **Rodkin S.**, Uzdensky A. Transcription factor NF - κ B and soluble guanylyl cyclase are involved in the modulation of NO level in glial cells during photodynamic treatment // Glia. Meeting Abstract. – 2017. – V. 65. – P. 195.

Публикации в журналах, входящих в базы данных Scopus и Web of Science (Q3-Q4)

5. **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.
6. 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.
7. **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.

Публикации в других изданиях

8. Дзряян В.А., Никул В.В., Питинова М.А., **Родькин С.В.**, Бибов М.Ю., Бережная Е.В., Негинская М.А., Узденский А.Б. Нейротравма: смерть нейронов и экспрессия сигнальных белков в ганглиях дорзальных корешков спинного мозга крысы после перерезки седалищного нерва // Сборник статей: Рецепторы и внутриклеточная сигнализация / Под редакцией В.П. Зинченко, А.В. Бережнова – Серпухов: Типография Пятый Формат. – 2019. – Т.2 – С. 776.
9. Дзряян В.А. **Родькин С.В.**, Бибов М.Ю., Питинова М.А., Никул В.В. Изменения экспрессии сигнальных белков в ганглиях дорзальных корешков спинного мозга крысы после повреждения периферического нерва // Сб. статей: XVIII Международная конференция «Обмен веществ при адаптации и повреждении». – 2019. – С. 17 – 20.
10. **Родькин С.В.**, Ковалева В.Д., Негинская М.А., Бережная Е.В., Узденский А.Б. Роль Ca^{2+} , NF - κ B и sGC в генерации оксида азота в нейронах и глиальных клетках при

- фотодинамическом воздействии // Сборник статей: Рецепторы и внутриклеточная сигнализация / Под редакцией В.П. Зинченко, А.В. Бережнова – Серпухов: Типография Пятый Формат. – 2019. – Т.2 – С. 847 – 850.
11. Хайтин А.М., Питинова М.А., **Родькин С.В.** Участие кальций - зависимых белков и ионных каналов в индуцированной аксотомией смерти глиальных клеток. Сборник статей: Рецепторы и внутриклеточная сигнализация / Под редакцией В.П. Зинченко, А.В. Бережнова – Серпухов: Типография Пятый Формат. – 2019. – Т.2 – С. 516 – 520.
 12. Дзряян В.А., Гузенко В.В., **Родькин С.В.**, Питинова М.А., Бибов М.Ю., Никул В.В. Экспрессия сигнальных белков и нейропротекторная роль вальпроата натрия в спинномозговых ганглиях крысы после перерезки седалищного нерва // Статья в сборнике: Обмен веществ при адаптации и повреждении – дни клинической лабораторной диагностики на Дону: материалы XIX Российской научно-практической конференции / под ред. З.И. Микашинович. – 2020. – С. 10 – 16.
 13. **Родькин С.В.**, Дзряян В.А., Питинова М.А. Роль Ca^{2+} - и NF- κ B-зависимой генерации оксида азота в фотосенсибилизированных нейронах и сателлитных глиальных клетках. // Статья в сборнике: Обмен веществ при адаптации и повреждении – дни клинической лабораторной диагностики на Дону: материалы XIX Российской научно-практической конференции / под ред. З.И. Микашинович. – 2020. – С. 48 – 53.
 14. **Родькин С.В.**, Дзряян В.А., Хайтин А.М., Питинова М.А., Ид М.А., Узденский А.Б. Экспрессия и локализация APP в нейронах речевого рака при аксотомии // Сборник статей: Рецепторы и внутриклеточная сигнализация / Под редакцией В.П. Зинченко, А.В. Бережнова – Серпухов: Типография Пятый Формат. – 2021. – Т.2 – С. 122 – 127.
 15. Дзряян В.А., **Родькин С.В.**, Питинова М.А., Узденский А.Б. Содержание сигнальных белков и нейропротекторная роль вальпроата натрия в спинномозговых ганглиях крысы после аксотомии седалищного нерва. // Сборник статей: Рецепторы и внутриклеточная сигнализация / Под редакцией В.П. Зинченко, А.В. Бережнова – Серпухов: Типография Пятый Формат. – 2021. – Т.2 – С. 63 – 69.
 16. **Родькин С.В.**, Дзряян В.А., Питинова М.А., Хайтин А.М., Узденский А.Б. Влияние аксотомии на экспрессию и внутриклеточную локализацию E2F1 в нейронах ганглиев крысы и рака и рецепторов растяжения рака. В сборнике: Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. // Сборник статей: Рецепторы и внутриклеточная сигнализация / Под редакцией В.П. Зинченко, А.В. Бережнова – Серпухов: Типография Пятый Формат. – 2021. – Т.2 – С. 431 – 437.
 17. Дзряян В.А., **Родькин С.В.**, Узденский А.Б. Нейротравма: экспрессия сигнальных белков и нейропротекторная роль вальпроата натрия в спинномозговых ганглиях крысы после перерезки седалищного нерва // Российский нейрохирургический журнал им. профессора А.Л. Поленова. – 2021. – Т. 13. – № S1. – С. 209.
 18. Дзряян В.А., Гузенко В.В., **Родькин С.В.**, Никул В.В., Питинова М.А., Бибов М.Ю. Экспрессия сигнальных белков в ганглиях дорсальных корешков крысы после перерезки седалищного нерва // Материалы VIII научно - практической конференции с международным участием: Генетика – фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции. Южный федеральный университет / Издательство Южного федерального университета – Ростов-на-Дону, 2019, 26-29 сентября. – С 161.

19. **Родькин С.В.**, Хайтин А.М., Питинова М.А., Дзряян В.А., Шарифулина С.А., Гузенко В.В., А.Б. Узденский. Белок p53 опосредует вызванную аксотомией смерть нейронов и глиальных клеток рака. Научные труды VI Съезда физиологов СНГ, VI Съезда биохимиков России и IX Российского симпозиума «Белки и пептиды» /ACTA NATURAE/ М.: Издательство «Перо». – 2019. – Т. 2. – С. 125.
20. Дзряян В.А, Гузенко В.В., **Родькин С.В.**, Питинова М.А., Никул В.В. Содержание сигнальных белков в спинномозговых ганглиях крысы после аксотомии седалищного нерва // Материалы XXI Зимней молодежной школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии. – Россия, Гатчина, 24-29 февраля 2020. – С. 68 – 69.
21. **Родькин С.В.**, Ковалева В.Д., Бережная Е.В., Негинская М.А., Узденский А.Б. Генерация оксида азота в механорецепторных нейронах и глиальных клетках рака при фотодинамическом воздействии: роль Ca^{2+} , NF - κB и sGC // VI Съезд биофизиков России. – 2019. – С. 143 –144.
22. **Родькин С.В.**, Ковалева В.Д., Узденский А.Б. Роль NF- κB , гуанилатциклазы и ионов кальция в генерации NO в нейронах и глиальных клетках при фотодинамическом воздействии // Современные методы физиологических исследований. 5 - я научно - практическая конференция по молекулярной нейробиологии и физиологии. – 2018. – С. 14 –15.
23. **Rodkin S.V.**, Kovaleva V. D., Berezhnaya E., Neginskaya M., Uzdensky A.B. The role of NO in photodynamic therapy // e - Book of Abstracts of the 3rd School on Advanced Fluorescence Imaging Methods (ADFLIM). – 2018. – P.15.
24. **Rodkin S.V.**, Kovaleva V.D., Berezhnaya E.V., Neginskaya M.A. Uzdensky A.B // The role of Ca^{2+} and NF - κB in NO generation in photosensitized neurons and glial cells Book of abstracts of the International conference Biomembranes '18 – 2018. – P.362.
25. Дзряян В.А., **Родькин С.В.**, Питинова М.А. Анализ экспрессии и внутриклеточной локализации фактора транскрипции E2F1 в периферической нервной системе млекопитающих и беспозвоночных после аксотомии методом иммунофлуоресцентной микроскопии // IX Молодёжная конференция ИОХ РАН. - 11-12 ноября 2021. Москва. – С.144.

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
 NOS – 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
 BH4 – (6R-)5,6,7,8-тетрагидробиоптерин
 PKA – цАМФ-зависимая протеинкиназа
 АМПК – 5'АМФ-активируемая протеинкиназа
 Akt – протеинкиназа B
 LPS – липополисахариды
 IL-1β – интерлейкин 1β
 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
 MOMP – проницаемость наружной мембраны митохондрий
 STAT3 – фактор сигнальной трансдукции и активации транскрипции 3
 MDM2 – фермент убиквитин-протеинлигаза E3
 СТГ – сателлитные глиальные клетки
 APP- белок предшественник бета-амилоида