

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего
образования
«ЮЖНЫЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
АКАДЕМИЯ БИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ
ИМ. Д. И. ИВАНОВСКОГО

На правах рукописи

Хайтин Андрей Михайлович

УЧАСТИЕ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ В ВЫЖИВАНИИ И СМЕРТИ НЕЙРОНОВ И
ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПОСЛЕ АКСОТОМИИ

Специальность 03.01.02 – Биофизика

диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель
доктор биологических наук
профессор Узденский А.Б.

Ростов-на-Дону 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	7
ВВЕДЕНИЕ	8
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Ранние исследования аксотомии	13
1.2 Модель аксотомии.....	14
1.3 Первичная и вторичная аксотомия в нервной системе	15
1.3.1 Различия центральной и периферической нервной системы в ответе на аксотомию	17
1.4 Клеточные изменения, вызываемые аксотомией	19
1.4.1 Оксидативное повреждение клеток вследствие аксотомии	21
1.4.2 Электрофизиологические изменения в ответ на аксотомию	22
1.5 Роль глии в процессах, вызванных аксотомией	23
1.5.1 Глия, удаленная от места аксонального повреждения	26
1.6 Сигнальные механизмы, участвующие в реакции нейронов и глии на аксотомию	27
1.6.1 Кальциевый сигнальный путь	27
1.6.1.1 Ca ²⁺ каналы	31
1.6.1.2 Ca ²⁺ -зависимые белки и каналы	35
1.6.2 Роль Ca ²⁺ в других сигнальных путях при аксотомии	37
1.7 Проксимальные и дистальные процессы	39
1.7.1 Проксимальные процессы	40
1.7.1.1 Воспаление	40
1.7.2 Дистальные процессы	40
1.7.2.1 Уоллера дегенерация	40
1.8 Ультраструктурные механизмы реакции нейронов и глии на аксотомию	42
1.9 Протекция и регенерация	44
1.10 Механизмы смерти нейронов и глии при аксотомии	49
1.10.1 Апоптоз	50
1.10.2 Некроз	53

1.10.3 Другие типы клеточной смерти	56
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	59
2.1 Оборудование и материалы	59
2.2 Объект исследования	60
2.2.1 Изоляция комплекса механорецепторного нейрона и ганглия (МРН-Г)	62
2.2.2 Морфология объекта исследования	75
2.3 Методы исследования	75
2.3.1 Регистрация импульсной активности нейрона	75
2.3.2 Флуоресцентное измерение вызванной аксотомией кальциевой динамики в МРН и клетках проксимальной сателлитной глиии	77
2.3.3 Флуоресцентная визуализация и оценка уровня смерти глиальных клеток .	80
2.3.4 Ингибиторный анализ	81
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	84
ГЛАВА 3. ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ НЕЙРОНА НА АКСОТОМИЮ	84
3.1 Влияние аксотомии на импульсную активность нейрона	84
3.2 Влияние аксотомии на продолжительность импульсации нейрона	85
ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ АКСОТОМИИ НА СМЕРТЬ ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК, УДАЛЕННЫХ ОТ МЕСТА ПЕРЕРЕЗКИ АКСОНА	87
4.1 Динамика некроза и апоптоза удаленных глиальных клеток в интактных и аксотомированных препаратах РРР при инкубации	87
4.2 Влияние аксотомии на смерть глиальных клеток в условиях постоянства внешней среды	89
ГЛАВА 5. ДИНАМИКА УРОВНЯ Ca^{2+} В НЕЙРОНЕ И УДАЛЕННОЙ ГЛИЕ ПОСЛЕ АКСОТОМИИ	90
ГЛАВА 6. РОЛЬ Ca^{2+} В ПРЕКРАЩЕНИИ ИМПУЛЬСАЦИИ НЕЙРОНА ПОСЛЕ АКСОТОМИИ	96
6.1 Роль различных путей изменения цитозольной концентрации Ca^{2+} в индуцированном аксотомией прекращении импульсной активности нейрона ...	96

6.1.1 Роль повышения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в прекращении импульсной активности нейрона после аксотомии	96
6.1.2 Роль потенциалзависимых Ca^{2+} каналов плазмалеммы в прекращении импульсной активности нейрона после аксотомии	97
6.1.3 Роль митохондриальных пор высокой проницаемости в прекращении импульсной активности нейрона после аксотомии	97
6.1.4 Роль рианодиновых рецепторов в прекращении импульсной активности нейронов после аксотомии	98
6.1.5 Роль Ca^{2+} -АТФазы эндоплазматического ретикулума в прекращении импульсной активности нейронов после аксотомии	101
6.2 Роль Ca^{2+} -зависимых белков в прекращении импульсации нейрона после аксотомии	101
6.2.1 Роль Ca^{2+} -зависимых калиевых каналов в прекращении импульсной активности нейрона после аксотомии	101
6.2.2 Роль протеинкиназы С в прекращении импульсной активности нейрона после аксотомии	102
6.2.3 Роль кальмодулина в прекращении импульсной активности нейрона после аксотомии	102
6.2.4 Роль кальмодулинкиназы II в прекращении импульсной активности нейрона после аксотомии	103
ГЛАВА 7. РОЛЬ Ca^{2+} В СМЕРТИ УДАЛЕННЫХ ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПОСЛЕ АКСОТОМИИ	105
7.1 Влияние внеклеточного Ca^{2+} на смерть удаленных глиальных клеток после аксотомии	105
7.2 Роль механизмов регуляции уровня Ca^{2+} в цитозоле в вызванной аксотомией смерти механически неповрежденных удаленных глиальных клеток	106
7.2.1 Влияние повышения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} на смерть глиальных клеток после аксотомии	106
7.2.2 Роль входа Ca^{2+} в цитозоль через потенциалзависимые Ca^{2+} каналы плазмалеммы в смерти удаленных глиальных клеток после аксотомии	107

7.2.3 Роль высокопроницаемых митохондриальных пор в смерти удаленных глиальных клеток после аксотомии	108
7.2.4 Роль риаудиновых рецепторов в смерти удаленных глиальных клеток после аксотомии	108
7.2.5 Роль Ca^{2+} -АТФазы эндоплазматического ретикулума в смерти удаленных глиальных клеток после аксотомии	109
7.3 Роль Ca^{2+} -зависимых каналов и внутриклеточных белков в смерти удаленных глиальных клеток после аксотомии	111
7.3.1 Роль Ca^{2+} -зависимых калиевых каналов в смерти удаленных глиальных клеток после аксотомии	111
7.3.2 Роль протеинкиназы С в смерти удаленных глиальных клеток после аксотомии	111
7.3.3 Роль кальмодулина в смерти удаленных глиальных клеток после аксотомии	112
7.3.4 Роль кальмодулинкиназы II в смерти удаленных глиальных клеток после аксотомии	112
7.4 Основные механизмы участия Ca^{2+} в индуцировании некроза и апоптоза удаленных глиальных клеток после аксотомии	113
ГЛАВА 8. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	117
8.1 Практическое значение модели интактного РРР	117
8.2 Воздействие аксотомии на импульсную активность механорецепторного нейрона и смерть удаленной сателлитной глиии	117
8.3 Повышение уровня внутриклеточного Ca^{2+} в нейроне и удаленных глиальных клетках вследствие аксотомии	121
8.4 Роль механизмов, регулирующих внутриклеточный Ca^{2+} , в индуцируемых аксотомией прекращении импульсной активности нейронов и смерти глиальных клеток	123
8.5 Роль кальций-зависимых каналов и сигнальных белков в индуцируемых аксотомией прекращении импульсной активности нейронов и смерти глиальных клеток	127

8.6 Дальнейшие перспективы исследований	130
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	133
ВЫВОДЫ	136
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	137
БЛАГОДАРНОСТИ	156
ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА	156

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АТ – аксотомия

БНЦ – брюшная нервная цепочка рака

ГК – глиальные клетки

МРН – механорецепторный нейрон

МРН-Г – комплекс механорецепторного нейрона рецептора растяжения рака с ганглием брюшной нервной цепочки

ПНС – периферическая нервная система

РРР – рецептор растяжения рака

УГК – удаленные глиальные клетки

ЦНС – центральная нервная система

СаМКП – кальмодулинкиназа II

CsA – циклоспорин А

Dan – дантролен

Im – иономицин

Int – интактные препараты МРН-Г

K(Ca) – кальций-зависимые калиевые каналы

МРТР – высокопроницаемые митохондриальные поры

МТХ – мауротоксин

PKC – протеинкиназа С

Rya – рианодин

RyR – рианодинновый рецептор

SERCA – кальциевая АТФаза саркоплазматического ретикулума

SS – стауроспорин

Tg – тапсигаргин

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Черепно-мозговая травма и повреждение спинного мозга входят в число ведущих причин смерти и инвалидности населения, особенно молодого и среднего возраста [1,2]. Как при травмах центральной нервной системы, так и травмах периферической, при ранениях и хирургических операциях происходит аксотомия (АТ), т.е. перерезка либо разрыв аксонов. АТ ведет к дегенерации и смерти нейронов либо к регенерации аксонов и восстановлению их связи с мишенями. Чтобы бороться с последствиями нейротравмы, необходимо в скорейшие сроки остановить процессы, ведущие к клеточной смерти. К сожалению, по сей день для этого не найдено надежных нейропротекторов с доказанной эффективностью. Необходимо более глубокое исследование молекулярных процессов, происходящих после повреждения аксона.

В выживании и регенерации нейронов после повреждения существенную роль играют нейроглиальные взаимодействия [3]. Показано, что повреждение глиии подавляет нейрональные функции и индуцирует смерть нейронов [4]. С другой стороны, повреждение нервов индуцирует смерть окружающих глиальных клеток [5]. Важно, что повреждение нервов вызывает смерть не только клеток глиии, непосредственно прилегающих к поврежденному участку, но и удаленных от места повреждения глиальных клеток (УГК). Следовательно, защита глиии, включая УГК, необходима для защиты нейронов. Для этого необходимо знать механизмы АТ-индуцированного повреждения и смерти этих клеток, которые на сегодняшний день недостаточно изучены.

Одним из возможных посредников между клеточно-молекулярными событиями в месте повреждения и в УГК является Ca^{2+} , ключевой элемент многих сигнальных путей, управляющих клеточным гомеостазом. Ионы Ca^{2+} играют важную роль в нейродегенерации [6,7], в частности, в реакции нейронов на АТ [2,8,9]. Повышение уровня цитозольного кальция до 10^{-4} – 10^{-3} М может запустить процесс клеточной смерти - некроза или апоптоза [10]. Конкретная роль Ca^{2+} в

выживании и смерти УГК после АТ остается невыясненной. Поэтому необходимо изучение влияния АТ на смерть и выживание УГК и роли в них различных элементов Ca^{2+} -зависимого сигнального пути, включая внеклеточный Ca^{2+} , различные механизмы регуляции Ca^{2+} (Ca^{2+} каналов) в цитозоле и Ca^{2+} -зависимые белки.

Абдоминальный рецептор растяжения рака (РРР), используемый в наших экспериментах как модель, является простым, но информативным объектом для изучения реакций нейронов и глии на АТ. Он включает в себя механорецепторный нейрон (МРН), окружённый многослойной глиальной оболочкой и направляющий аксон в ганглий вентральной нервной цепочки. Ультраструктура нейрона и сателлитной глии, сигнальные механизмы смерти этих клеток под воздействием различных физических и химических факторов хорошо изучены [11,12].

Цель работы:

Изучить Ca^{2+} -зависимые сигнальные механизмы реакции нейронов и окружающих их глиальных клеток на повреждение, вызванное аксотомией.

Задачи исследования:

1. Разработать методику выделения рецептора растяжения рака с сохранением связи между ним и ганглием вентральной нервной цепочки.
2. Исследовать влияние аксотомии на активность нейронов и смерть удаленных от места повреждения глиальных клеток *in vitro*.
3. Исследовать кальциевую динамику в рецепторе растяжения рака при аксотомии.
4. Изучить влияние ионов Ca^{2+} , Ca^{2+} каналов и Ca^{2+} -зависимых сигнальных белков на электрическую активность механорецепторного нейрона и смерть сателлитных глиальных клеток вдали от места повреждения при аксотомии.

Научная новизна результатов исследования

Разработана новая методика выделения механорецептора рака, сохраняющая связь механорецепторного нейрона с ганглием брюшной нервной цепочки. Изучены процессы, происходящие после аксотомии в глиальных клетках, удаленных от места перерезки аксона. Впервые показано, что в этих клетках аксотомия повышает уровень Ca^{2+} и стимулирует их некроз и апоптоз, регулируемые, в-основном, внеклеточным Ca^{2+} и Ca^{2+} -АТФазой эндоплазматического ретикулума (SERCA), а также рианодиновыми рецепторами, протеинкиназой С и кальмодулинкиназой-II. Кроме того, изучено влияние различных факторов повышения уровня цитозольного Ca^{2+} на продолжительность импульсной активности интактного и аксотомированного нейрона *in vitro*, выявлена роль Ca^{2+} каналов плазмалеммы и высокопроницаемых пор митохондрий в функциональной деактивации нейрона.

Научно-практическая значимость работы:

Полученные данные о характере индуцированных аксотомией изменений кальциевого гомеостаза в нейроне и в удаленной от места повреждения глие могут лежать в основе разработки новых подходов к лечению последствий нейротравм. Блокирование Ca^{2+} каналов плазматической мембраны нейрона может повысить устойчивость к повреждению, а активизация кальциевой АТФазы эндоплазматического ретикулума и ингибирование кальмодулин-зависимой киназы II могут снизить некроз и апоптоз глиальных клеток. Опыты показали критическое значение контроля внеклеточной среды для выживания глиальных клеток и выявили механизмы, переключающие тип клеточной смерти между некрозом и апоптозом.

В настоящей работе использовались биофизические методы исследования (флуоресцентная микроскопия) и производилось воздействие на ионные каналы. На данных о кальциевой динамике и клеточной смерти, полученных этими

методами, основаны главные выводы. Диссертация соответствует паспорту специальности 03.00.02 «Биофизика».

Результаты получены при выполнении грантов АВЦП МОН 4.6142.2011 и РФФИ № 16-34-00837 и государственного задания (грант Минобрнауки № 6.6324.2017/8.9).

Основные положения, выносимые на защиту:

Аксотомия ускоряет прекращение импульсной активности нейронов и стимулирует смерть сателлитной глии вдали от места повреждения, ионы Ca^{2+} играют в этом существенную роль.

Аксотомия вызывает повышение концентрации Ca^{2+} в нейроне и его сателлитной глие вдали от места повреждения.

При аксотомии повышение внеклеточной концентрации Ca^{2+} стимулирует апоптоз удаленной глии, но защищает ее от некроза.

Повышение концентрации Ca^{2+} в цитозоле стимулирует некроз и апоптоз удаленной глии, а также, в том числе при входе ионов Ca^{2+} через Ca^{2+} каналы плазмалеммы, ускоряет прекращение импульсной активности нейронов.

При аксотомии высокопроницаемые поры митохондрий поддерживают функциональную активность нейрона, работа Ca^{2+} -АТФазы эндоплазматического ретикулума защищает глию от апоптоза и некроза, риаудиновые рецепторы защищают глию от апоптоза, но усиливают ее некроз.

При аксотомии кальций-зависимые K^+ каналы и протеинкиназа С защищают удаленную глию от апоптоза, однако протеинкиназа С и кальмодулинкиназа II участвуют в некрозе глии.

Апробация диссертационной работы:

Материалы диссертации представлены на всероссийских и международных конференциях:

XVI международная конференция по нейрокибернетике, Ростов-на-Дону, 24-28 сентября 2012 г.; XXII съезд физиологического общества имени И. П. Павлова, 16-20 сентября 2013; XI European Meeting on Glial Cell Function in Health and Disease, July 3 - 6, 2013, Berlin; Twelfth International Conference on Neuroprotective Agents, Charlottesville, VA, USA Sep 28-Oct 01, 2014; XII European Meeting on Glial Cell Function in Health and Disease, Bilbao, July 15 - 18, 2015; 13th European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, Edinburgh, July 8-11, 2017; Рецепторы и внутриклеточная сигнализация, 27-30 мая 2013, 25-28 мая 2015, 22-25 мая 2017 и 20-24 мая 2019, г. Пущино; V съезд биофизиков России, 4-10 октября 2015 г, Ростов-на-Дону; EMBO Conference "Imaging the Brain", 18 – 21 May 2016, Warsaw; Biomembranes 2016: Mechanisms of Aging and Age-Related Diseases, International Conference, Dolgoprudny, 2016; International conference "Biomembranes 2018", Dolgoprudny; ECDO-2018 Conference "Cell death in disease: from small molecules to translational medicine"; Fourteenth International Conference on Neuroprotective agents 2018, Ester Park, Colorado, USA; Современные методы физиологических исследований; 5-я научно-практическая конференция по молекулярной нейробиологии и физиологии, Москва 2018; VI съезд биофизиков России, Сочи 2019; VI съезд физиологов, Дагомыс 2019.

Публикации: Основные результаты диссертационной работы изложены в 25 публикациях, 10 из них – в журналах, рекомендованных ВАК РФ и индексируемых в системах Web of Science и Scopus

Структура и объем работы: Диссертация изложена на 156 страницах текста и состоит из введения, обзора литературы, методики, результатов исследования, обсуждения результатов, заключения, выводов, списка литературы (206 источников). Иллюстрационный материал включает 38 рисунков, 7 таблиц.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Ранние исследования аксотомии

Исследования аксотомии ведутся более 100 лет. Францу Нисслю принадлежит первое описание (в 1892 г.) ответа тела нейрона на рассечение аксона (аксональная реакция), основанное на экспериментах с аксотомией лицевых нервов у кроликов. Возможно, и другие исследователи сделали аналогичные наблюдения, но Ниссль обладал преимуществом в виде используемых в качестве красителей анилиновых соединений, на тот момент впервые синтезированных в немецких химических лабораториях. Основное кольцо анилина сильно реагирует с кислотными компонентами нейрона, например, РНК, которая имеется в большом количестве в ядрышке и гранулярном эндоплазматическом ретикулуме (ГЭР). Кластеры ГЭР, типичные для нервных клеток, имеют характерный «тигровидный» вид в нейронах, окрашенных анилиновыми красителями; эти кластеры сейчас называют «субстанцией Ниссля» (или тельцами Ниссля). Анилиновые красители (т. н. «красители Ниссля»), чаще всего используемые в нейробиологии, включают кресил-фиолетовый, тионин и толуидиновый синий. Рассеяние ГЭР является одним из наиболее характерных ответов периферических нейронов на аксотомию. Поскольку анилиновые красители окрашивают ГЭР, они обладают большим преимуществом в обнаружении такого явления, как растворения субстанции Ниссля; поэтому они являются отличными маркерами аксотомированных клеточных тел для некоторых классов нейронов. Это растворение субстанции Ниссля, названное Маринеско «хроматолизом» вскоре после его открытия Нисслем, особенно хорошо наблюдается в аксотомированных мотонейронах.

В 1920-х гг. когда Рамон-и-Кахаль изучал нервную систему, он детально описал клеточные события, которые он наблюдал при регенерации периферических нервов [13]. После характерной Уоллеровой дегенерации, которая происходит при обрезании периферических аксонов [14], Рамон-и-Кахаль описал реорганизацию дистального нервного ствола во множество миниатюрных компартментов,

каждый из которых окружен новым периневрием [13]. Это явление, которое Моррис позднее назвал «компартиментализацией», изначально происходит в проксимальной культе после травмы и затем прогрессирует дистально по мере регенерации нерва [15].

1.2 Модель аксотомии

Со времен экспериментов Франца Ниссля и Рамон-и-Кахаля модель аксотомии обладает большим потенциалом для фундаментальных исследований. Аксотомия является очень популярным инструментом для нейробиологов-экспериментаторов. Она предоставляет очень полезные парадигмы для изучения клеточных ответов на повреждение, механизмов регенерации и пластичность и процессов, ведущих к дегенерации нервных клеток [16]. Модели аксотомии ценны для проверки экспериментальных подходов в терапии. Например, аксотомия зрительного нерва – классическая модель нейродегенерации. При ней происходит смерть ганглионарных клеток сетчатки, которая также развивается при глаукоме и других оптических невропатиях [17]. Многие факторы влияют на характер, развитие и последствия процессов, связанных с аксотомией. Наиболее тяжелым последствием аксотомии является клеточная смерть, весьма распространенная при повреждении нейронов центральной нервной системы, хотя и периферические нейроны также могут погибать, если место разреза достаточно близко к телу нервной клетки или если повреждения производятся у очень молодых животных (новорожденных). Исследования моделей аксотомии дали ключи к пониманию клеточно-молекулярных событий, ассоциирующихся со смертью нейронов и способами, которыми те или иные вмешательства могут отсрочить или предотвратить процессы, ведущие к клеточной смерти.

Использование модельных организмов (*Danio rerio*, цыплята, мыши и т.д.), дающее возможность уникальной комбинации генетической манипуляции и визуализации *in-vivo* в течение промежутка времени, изучение глии, образующей периневрий, меняют наши представления о том, как устроена ПНС и где образуются ее клетки, а также роли происходящей из ЦНС периневральной глии

не только в построении функционального периферийного нерва, но и в его перестройке после травмы или заболевания [18].

1.3 Первичная и вторичная аксотомия в нервной системе

Сейчас рассматриваются две формы повреждения аксонов (или нервных волокон). Первая – т.н. «первичная аксотомия», при которой аксоны разрываются или разрезаются непосредственно при механическом воздействии на нервную ткань и происходит массовый протеолиз аксоплазмы. После травматического повреждения в ЦНС в течение часов и дней происходит сложный и до конца не изученный ряд клеточных взаимодействий, который может привести к разделению и нарушению функций внутри и между нейронными сетями и контурами, так называемой «вторичной аксотомии» вследствие единичного и быстрого эпизода механического воздействия [19]. Распространенное, или диффузное, повреждение аксонов вызывается травматическим повреждением мозга (черепно-мозговой травмой) и вносит значительный вклад в связанные с ним заболеваемость и смертность. В то время, как классические теории предполагали, что при травме аксоны механически обрываются в момент повреждения, исследования последних десятилетий не подтверждают это предположение для большинства из них. В настоящее время травматическое повреждение аксонов рассматривается, скорее, как прогрессирующий процесс, вызванный растягивающими силами при травме и постепенно развивающийся от локальной структурной перестройки до итогового разрыва аксона.

В течение последних 70 лет диффузное аксональное повреждение головного мозга оказалось одним из наиболее общих и значимых патологических особенностей черепно-мозговой травмы. Аксоны белого вещества оказались особенно уязвимыми к травме из-за механической нагрузки на мозг во время черепно-мозговой травмы [1]. Как таковое, диффузное повреждение головного мозга было обнаружено при всех степенях тяжести черепно-мозговой травмы и может представлять собой ключевой патологический субстрат легкой черепно-мозговой травмы (сотрясение мозга). В ключе патологии диффузное аксональное

повреждение головного мозга охватывает широкий спектр нарушений, от первичного механического разрушения аксонального цитоскелета до нарушения транспорта, набухания и протеолиза через вторичные физиологические изменения [20]. В зависимости от серьезности и величины поражения, эти изменения могут проявлять себя в острой форме, например, в виде немедленной потери или помрачения сознания и сохраняться в виде комы и/или когнитивной дисфункции. Также, последние данные показывают, что черепно-мозговая травма может индуцировать долговременные нейродегенеративные процессы, такие как протекающая без явных симптомов прогрессирующая патология аксонов [20,21]. Последние наблюдения показали, что вызванная травмой очаговая проницаемость ведет к локальному притоку Ca^{2+} с последующей активацией цистеинпротеаз - кальпаина и каспаз - которые играют ведущую роль в результирующем патогенезе травматического повреждения аксонов посредством протеолитического расщепления мозгового спектрина, одной из основных составляющих субаксолеммального цитоскелета. В ходе этого патологического процесса такая локальная кальциевая перегрузка вместе с активацией кальпаина также вызывает повреждение митохондрий, приводящее к выходу цитохрома-с и активации каспаз. Тогда и активированный кальпаин, и каспазы участвуют в деградации локального аксонального цитоскелета, вызывая локальный разрыв и разделение аксона [22].

Первичная аксотомия – относительно редкое явление при травме головного мозга. В течение последних 50 лет в поддержку первичной аксотомии как основного фактора повреждения белого вещества мозга собрано пренебрежимо малое число экспериментальных подтверждений, даже в случае комы и смерти на месте при несчастном случае [23]. В отличие от диффузного аксонального повреждения, физическое перерезание аксона вызывает качественно иные последствия. Физическое перерезание аксона массово задействует его микроокружение и создает драматическое, немедленное нарушение ионной регуляции. По-видимому, медленно прогрессирующие изменения, вызванные диффузным повреждением аксонов, позволяют телу нейрона реорганизоваться и

выжить. Хотя и общеизвестно, что долгосрочная судьба этих аксотомированных нейронов остается predetermined, сама их сопротивляемость в течение суток после травмы заставляет предположить, что они могут производить различные регенеративные и нейропластические перестройки в мозге [19,22].

1.3.1 Различия центральной и периферической нервной системы в ответе на аксотомию

Травмированная взрослая ЦНС является окружением, препятствующим отрастанию аксонов из-за обилия ингибиторных белков и гликопротеидов наряду с нехваткой адекватного обеспечения трофическими факторами. Эти ингибиторы делятся на две категории: ингибиторные молекулы внеклеточного матрикса и ингибиторные белки, ассоциированные со зрелым миелином [24]. Кроме того, врожденные нейрональные механизмы, иницирующие программу роста, ограничены в нейронах ЦНС взрослых. Неспособность аксонов ЦНС к регенерации частично связывается с протеомным профилем ЦНС, особенно во внеклеточном окружении травмированных аксонов у взрослых.

Второе отличие ПНС от ЦНС заключается в стабилизации микротрубочек. После травмы аксоны ЦНС у большинства млекопитающих сокращаются, и лишь несколько аксонов дают отростки на короткие дистанции. Эти аксоны демонстрируют дистрофические, раздутые концы в ингибиторной среде [25]. Они не способны образовывать конусы роста, что приводит к невозможности регенерации. Последние исследования показывают, что луковицы втягивания в ЦНС имеют дезорганизованную сеть микротрубочек, в то время как конусы роста в ПНС содержат микротрубочки, организованные в пучки [26]. Кроме того, нарушение микротрубочек в конусах роста с помощью фармакологических препаратов превращает их в луковичеобразные структуры [27]. Стабилизация микротрубочек препятствует формированию луковиц втягивания и повышает способность нейронов ЦНС к отрастанию аксонов как *in vitro*, так и *in vivo* [24].

Третьим возможным механизмом, который может влиять на регенерацию, является нехватка рибосом и мРНК в аксонах ЦНС. Локальный синтез белков и локализация РНК тесно связаны с успешной регенерацией периферических нервов. Рибосомы активно транслируют белки в месте повреждения, передавая обратный сигнал соме и поставляя строительный материал для формирования нового конуса роста. Сведения об аналогичных механизмах в ЦНС скудны, и их потенциальный вклад в регенерацию аксонов ЦНС остается неизвестным. Сам по себе недостаток этих механизмов в окончании поврежденного аксона может ограничивать способность нейронов ЦНС к регенерации, поэтому надлежит изучить, достаточно ли представлен этот локальный ответ для ее обеспечения [24].

Наконец, важнейшие сигнальные пути, активируемые после повреждения, различаются в нейронах ЦНС и ПНС [28]. Впервые об этом предположили, когда было обнаружено, что поврежденные центральные аксоны спинальных ганглиев не смогли активировать программы регенерации. Повреждение периферических же аксонов нейронов спинальных ганглиев активирует гены, ассоциированные с регенерацией, и приводит к устойчивому отращиванию аксонов. Успешной регенерации сопутствует пролонгированная экспрессия генов, включая *SNP-23* и *GAP-43*. Аналогично, положительная регуляция ассоциированных с регенерацией генов наблюдалась в кортикоспинальных нейронах после проксимального интракортимального повреждения, но не после спинальной аксотомии. Гиперэкспрессия *GAP-43* показала улучшение регенерации в ПНС, но долгосрочную дегенерацию в ЦНС [24,29].

Для спинномозговой травмы первичная аксотомия намного более характерна, чем для черепно-мозговой травмы. При повреждениях спинного мозга характерно образование глиального рубца, препятствующего прорастанию регенерирующих аксонов и восстановлению их связей со своими мишенями [30]. После травмы спинного мозга реактивные макрофаги, клетки-предшественники олигодендроцитов и реактивные астроциты меняют природы внеклеточного матрикса в месте повреждения, высвобождая цитокины, миелин-ассоциированные

ингибиторы и молекулы хондроитинсульфат-протеогликанов, которые сильно ингибируют отращивание нейритов [31]. Эти ингибиторные молекулы отсутствуют в ПНС, где происходит устойчивая регенерация поврежденных аксонов.

Сказанное выше о типах аксотомии в ЦНС и ПНС обобщено в Таблице 1.

Таблица 1. Особенности первичной и вторичной аксотомии в центральной и периферической нервной системе

	Травмы ЦНС	Травмы ПНС
АТ	<ul style="list-style-type: none"> • регенерация затруднена ингибиторными факторами • дезорганизация микротрубочек препятствует образованию конуса роста • нехватка рибосом и РНК • недостаточно активируются сигнальные пути регенерации 	<ul style="list-style-type: none"> • мало ингибиторных факторов • микротрубочки организованы в пучки и способствуют формированию конуса роста
Первичная АТ	<ul style="list-style-type: none"> • более характерна для спинномозговой травмы • регенерация затруднена образованием глиального шрама 	<ul style="list-style-type: none"> • относительно много рибосом и РНК • активируются сигнальные пути регенерации
	<ul style="list-style-type: none"> • задействует микроокружение аксона • вызывает резкие нарушения ионной регуляции 	
Вторичная АТ	<ul style="list-style-type: none"> • более характерна для черепно-мозговой травмы • разрыв аксона опосредуется кальций-зависимыми ферментами • меньше задействует микроокружение аксона • вызывает медленно прогрессирующие изменения 	<ul style="list-style-type: none"> • мало данных в литературе

1.4 Клеточные изменения, вызываемые аксотомией

Изменения, вызываемые аксотомией в аксоне, включают в себя 1) нарушение проводимости мембраны; 2) вызванную повреждением обратную волну деполяризации мембраны [8]; 3) вход в аксональный просвет различных веществ из межклеточного пространства; 4) прерывание потока веществ,

поставляемых аксонным транспортом от мишени, резкое сокращение магистралей аксонного транспорта. В качестве клеточного ответа, т.е. биологической реакции на аксотомию, можно привести: 5) Центральный хроматолиз, принципиальный морфологический признак повреждения нейрона, впервые наблюдался Нисслем более 100 лет назад; 6) Изменения экспрессии многих генов, включая снижение у нейрофиламентных белков и белков, участвующих в нейротрансмиссии, а также изменения у белков, участвующих в трофических ответах; 7) Нарушенное распределение белков цитоскелета (т.е. фосфорилированных нейрофиламентов в перикарии); 8) Изменения в транспорте некоторых белков, включая сокращения количества транспортируемых нейрофиламентных белков; 9) Сокращение диаметра аксона [16]; 10) Изменения в возбудимости и импульсной активности нейрона: индуцированная аксотомией повышенная возбудимость [32–34], долговременная импульсная активность нейрона [35], либо снижение импульсной активности [36]; 11) Морфологический ответ (регенерация и т.д.).

Тело поврежденного нейрона нуждается в получении точной и своевременной информации о месте и протяженности повреждения аксона, чтобы сформировать нужный ответ. Поэтому должны существовать особые механизмы для передачи такой информации от места повреждения к телу клетки. Считается, что за этим процессом стоят три различных типа сигналов [8,37,38]:

- 1) Вызванный повреждением разряд аксонных потенциалов;
 - 2) Прерывание нормальной поставки ретроградно транспортируемых трофических факторов (т. н. «негативный сигнал»);
 - 3) Активированные белки с места повреждения («позитивный сигнал»).
- Причем нейротрофины также могут участвовать и в позитивной сигнализации о повреждении. Регенеративный ответ ядра наступает только при сочетании всех трех факторов.

Повреждение и нарушение работы аксональных митохондрий вблизи места повреждения аксона снижает производство АТФ, необходимого субстрата многих биохимических и физиологических процессов, и снижает нормальное функционирование трансмембранных переносчиков. Наличие прозрачных,

поврежденных митохондрий с отсутствующими кристами строго коррелирует с повреждением аксона, но может визуально наблюдаться только при трансмиссионной электронной микроскопии на тонких срезах. Сопровождающий выход цитохрома c в оставшуюся аксоплазму гипотетически вызывает ретроградный сигналинг через «апоптоз-индуцирующий фактор» или мембранные везикулы в направлении сомы поврежденного нейрона. В таком случае может быть запущен механизм запрограммированной клеточной смерти (апоптоза) поврежденных нейронов [9,20].

На уровне аксона, если происходит утрата нормального мембранного гомеостаза нейрона и если восстановления гомеостатических механизмов не происходит в течение нескольких минут после травмы, чтобы восстановилась нормальная функция мозга и возвращение в сознание, то поврежденные нервные волокна входят в нейропатологический кальций-опосредованный каскад, ведущий к вторичной аксотомии и разобщению нервных путей, которые опосредуют нормальное поведение [20].

Механические воздействия на аксолемму или нервные волокна могут, особенно в области перехватов Ранвье миелинизированных нервных волокон, повредить трансмембранные натриевые каналы и допустить неконтролируемый приток ионов кальция в аксоплазму [39]. Кальций также может высвободиться из внутриаксонных локаций, таких как аксоплазматический ретикулум и митохондрии. Одновременная с этим инверсия нормальной активности натрий-кальциевого обменника может привести к снижению выведения кальция из поврежденного нейрона и усугубить физиологическое поражение этого нейрона [8].

1.4.1 Оксидативное повреждение клеток вследствие аксотомии

Многие данные свидетельствуют о связи оксидативного стресса и апоптоза при аксотомии [40,41]. К настоящему времени, на основе имеющихся данных сделан вывод, что раздробление или перерезание диафрагмальных нервов может вызывать окислительный стресс путем повышения пероксидации липидов и

снижения активности антиоксидантных ферментов. Также был сделан вывод, что, в то время, как раздробление диафрагмальных нервов приводит к накоплению минеральных веществ, их аксотомия вызывает истощение минеральных запасов в тканях [42]. Окислительное повреждение имело место при смерти клеток сетчаточных ганглиев и глаукоматозных невропатиях. В то же время после аксотомии наблюдалось повышение уровней супероксидов [17].

1.4.2 Электрофизиологические изменения в ответ на аксотомию

Детальные исследования электрофизиологических реакций нейронов рака на аксотомию проводились еще Кувадой в 1970-80 гг. [43,44]. У раков в норме пассивные, не импульсирующие сомы определенных униполярных, эфферентных нейронов становились импульсирующими в период 36 ч после аксотомии. Эти изменения сохранялись приблизительно в течение 2 недель, а затем убывали. Снижение возбудимости происходило независимо от регенерации, а возбудимость не восстанавливалась после повторного обрезания культи аксона. При этом в сомах, в норме обладающих импульсной активностью, электрогенность также повышалась, что выражалось в повышении амплитуды и частоты спайков и большей легкости их провоцирования. Тем не менее, некоторые классы пассивных и активных в норме нейронов не реагировали на аксотомию электрофизиологическими изменениями. Обширное повреждение афферентных нейронов не инициировало изменений в эфферентных нейронах тех же ганглиев, равно как и не происходило взаимовлияния с аксотомией эфферентных нейронов. Нейроны с более длинными культиями аксонов медленнее развивали возбудимость сомы. Входящий ионный ток в вызванных аксотомией спайках сомы переносился преимущественно ионами Na^+ . На кальциевые спайки аксотомия не влияла. Также аксотомия не повлияла на зависимость мембранного потенциала от внеклеточной концентрации калия (в соответствии с функцией Нернста), и на ее независимость от внеклеточного натрия. В аксональных спайках входящий ток преимущественно переносился ионами натрия как до, так и после аксотомии. Заброс аксональных импульсов драматически не изменялся между

периодами наличия и отсутствия соматических импульсов. Повышение температуры ускоряло как начало, так и завершение вызванной аксотомией импульсации сомы. Аксотомия идентифицируемого анального мотонейрона рака *Procambarus clarkia* индуцирует долговременную импульсацию локально в месте перерезки. Эта импульсация, как и импульсация сомы в опытах Кувады, отвечает за потенциалзависимую Na^+ проводимость, но не за Ca^{2+} проводимость [35].

1.5. Роль глии в процессах, вызванных аксотомией

Астроциты подают друг другу сигналы с помощью АТФ. Щелевые контакты (также известные как электрические синапсы) между астроцитами позволяют молекуле-мессенджеру IP₃ диффундировать от одного астроцита к другому. IP₃ активирует кальциевые каналы в клеточных органеллах, что приводит к высвобождению кальция в цитозоль. Этот кальций может дополнительно стимулировать производство IP₃ и вызывать высвобождение АТФ через каналы в мембранах, построенных из паннексинов и иннексинов [35]. В итоге это приводит к кальциевой волне, которая распространяется от клетки к клетке. Выход АТФ во внеклеточную среду и последующая активация пуриnergических рецепторов в других астроцитах также может, в некоторых случаях, опосредовать кальциевые волны.

Сателлитные глиальные клетки являются малыми клетками, окружающими нейроны в сенсорных, симпатических и парасимпатических ганглиях. Эти клетки помогают регулировать внешнюю химическую среду, в частности буферизуя ее с помощью калиевых и кальциевых каналов [45]. Как и астроциты, они соединяются друг с другом щелевыми контактами и отвечают на АТФ-сигналы, повышая внутриклеточную концентрацию ионов кальция. Они высокочувствительны к повреждению и воспалению, и дают вклад в патологические состояния, такие как хроническая боль.

Периневральные глиальные клетки являются уникальным для периферической нервной системы типом клеток и, как было обнаружено, играют критическую роль в состояниях повреждения периферических нервов. Эти клетки

расположены оптимальным образом, чтобы влиять на функции сенсорных нейронов, так как берут в свое окружение сенсорные нейроны в структуре дорсальных корешковых ганглиев, формируя клеточную оболочку. Образованный ими барьер, обычно имеющий от одного до трех слоев, замедляет диффузию многих молекул, особенно крупных, что дает определенный контроль периневральной среды и помогает поддерживать в ней необходимый гомеостаз для распространения потенциалов действия в сенсорных нейронах [46].

В ряде случаев повреждение аксона ведет к пролиферации окружающей глии, выражающейся как в направленном увеличении глиальных отростков, так и в увеличении количества глиальных клеток путем их деления. В опытах с гигантскими нервными волокнами таракана *Periplaneta americana* пролиферация перинейрональных клеток начиналась вскоре после аксотомии [47]. При нарушении гомеостаза, как в случае повреждения периферических нервов, сателлитные глиальные клетки становятся активными, демонстрируя высокую экспрессию GFAP (glial fibrillary acidic protein) и пролиферируют. Повреждение периферических нервов также индуцирует повышение экспрессии субъединицы щелевых контактов коннексина 43 (Cx43) внутри сателлитных глиальных клеток в дорсальных корешковых ганглиях. Возникающее в результате повышенное щелевое сопряжение сателлитных глиальных клеток, окружающий отдельные нейроны и соседние с ними нейроны, выполняет много функций. Аналогично тому, как это происходит в случае астроцитов, повышенная способность глиальных контактов к диффузии метаболитов может быть полезной для нейрона. Повышенное сопряжение сателлитных глиальных клеток в сенсорных ганглиях также, по-видимому, участвует в различных состояниях невропатической боли, и может быть связано с изменением буферизации ионных токов, включая калиевых, между этими клетками. Кроме того, понижение экспрессии входного калиевого канала Kir4.1 (inward rectifying potassium channel) в сателлитных глиальных клетках, ассоциируемое с аксотомией сенсорных нейронов, также воздействует на эти болевые состояния. Таким образом, изменение уровней экспрессии Cx43 и Kir4.1 может косвенно воздействовать на пороговые значения потенциала

действия сенсорных нейронов путем изменения способности сателлитных глиальных клеток эффективно буферизовать внеклеточную перинейрональную среду [45].

Несмотря на нехватку прямого сопряжения между нейронами и сателлитной глией, их близкое расположение создает условия для эффективной коммуникации. Свидетельства прямой нейро-сателлитноглиальной сигнализации происходят от способности сателлитных глиальных клеток давать ответ на высвобождаемый нейронами АТФ и нейрональный оксид азота. В свою очередь, данные глиальные клетки способны регулировать нейрональную активность через высвобождение молекул, имеющих возбуждающее действие на сенсорные нейроны, а именно АТФ и фактор некроза опухолей TNF-альфа. Кроме того, обнаружены и двунаправленные кальциевые токи между нейронами и сателлитной глией, в которых участвуют как щелевые контакты, так и высвобождение АТФ [48,49]. Пока остается неизвестным, связана ли активация сателлитной глиии при повреждении аксона с нейроглиальной коммуникацией.

В ответ на повреждение периферических нервов в нейроне и сателлитной глие возникает ряд взаимосвязанных процессов, включая спаривание сателлитных глиальных клеток, повышение эктопической спонтанной импульсации нейронов и резкое изменение электрических характеристик нейронов и глиии (деполяризация и снижение сопротивления мембран и пороговых значений мембранного тока для генерации потенциала действия) [50], пролиферацию и повышение глиа-глиального взаимодействия посредством щелевых контактов [45,51]. Это создает условия для распространения волн кальциевой концентрации по всей глиальной оболочке в результате механического повреждения глиии либо сигнала от аксона [52]. Показано, что астроциты в течение часа после повреждения аксона мотонейрона повышают уровень белка щелевого контакта коннексина-43 и в течение суток – многофункционального белка GFAP [21]. Аналогичные процессы происходят и со шванновскими клетками, что может модулироваться воспалительными цитокинами [54].

Глия также может непосредственно участвовать в закрытии места повреждения. У некоторых беспозвоночных глия может входить в просвет обрезанного аксона вплоть до полного его заполнения [55]. Известно, что существует механизм переноса веществ из глии в нейрон посредством везикул [56–61] но неизвестно, возможен ли обратный процесс. Взаимодействие периневральной глии с шванновскими клетками играет важнейшую роль в развитии и здоровье ПНС. Перинейрональная глия формирует «мосты» после аксотомии двигательных нервов для последующей регенерации и направляет миграцию шванновских клеток для формирования возможности регенерации аксона в направлении мишени [18]. У некоторых беспозвоночных глия участвует в регенеративном ответе, запечатывая просвет аксона [55]. При травмах ЦНС зачастую формируется глиальный рубец, который препятствует регенерации аксонов ([30], [62]). Ингибиторы глии могут способствовать регенерации аксонов [31]. Глия, расположенная вблизи места перерезки аксона, гибнет от механического повреждения. Также современные исследования привели к выводу что поврежденный аксон может заимствовать рибосомы из соседних глиальных клеток [63]. Нейротрофические факторы, модулируя глию, могут способствовать выживанию нейронов после аксотомии, например, защищая от апоптоза [64].

Подвижная микроглия, в отличие от остальных глии (макроглии) у позвоночных развивается не из эктодермы, а из мезодермы, и, в ходе эмбриогенеза мигрирует в ЦНС, в дальнейшем осуществляя там иммунную функцию [65]. Поэтому реакции микроглии на аксотомиию – качественно иное явление, чем индуцированные аксотомией реакции перинейрональной глии (олигодендроцитов и астроцитов в ЦНС, шванновских клеток в ПНС).

1.5.1 Глия, удаленная от места аксонального повреждения

В отличие от глиальных клеток, находящихся в месте повреждения и в непосредственной близости к нему, которые при аксотомии повреждаются непосредственно, достаточно отдаленные клетки глии могут быть подвержены воздействию травмы только опосредованно. При этом мало изучен вопрос, что

происходит с этой глией, в частности с глиальной оболочкой, окружающей сому нейрона либо проксимальный участок аксона. В том числе, плохо известно, как в этом участвуют ионы кальция и кальций-зависимый сигнальный путь. Поэтому необходимо изучить характер изменения динамики кальциевой концентрации в глии вследствие аксотомии и роль различных элементов кальций-зависимого сигнального пути в индуцировании гибели глиальных клеток.

На Рис. 1 указаны основные известные аспекты участия глии и ионов кальция в вызванных аксотомией процессах в нейроне и подлежащие изучению реакции удаленной глии на аксотомию и ее роль в судьбе нейрона.

1.6. Сигнальные механизмы, участвующие в реакции нейрона и глии на аксотомию

1.6.1 Кальциевый сигнальный путь.

Кальций является центральным звеном и общим местом многих внутри- и внеклеточных процессов, от синаптической активности до межклеточной коммуникации и адгезии, включая пролиферацию, дифференциацию, генную транскрипцию и клеточную смерть.

Многочисленные исследования показывают, что кальций – важнейший регулятор апоптоза на всех стадиях, от инициации до конечного фагоцитоза апоптозом. Было показано, что повышение уровня цитозольного кальция стимулирует апоптоз по разным путям. Например, избыточный подъем кальция в цитозоле стимулирует вход кальция в митохондрии, в которых, в свою очередь, может индуцироваться открытие высокопроницаемых митохондриальных пор (MPTP), запуская в результате путь апоптоза. Другой механизм задействует кальций-зависимые цистеинпротеазы, т. н. кальпаины, опосредующие расщепление нескольких членов белковой семьи BCL-2 (включая проапоптотический BID и антиапоптотический BCL-2 и BCL-XL) и стимулируют пермеабиллизацию наружной митохондриальной мембраны и выход цитохрома с.

Повышенное содержание кальция в цитозоле (в результате воздействия мобилизаторов кальция, например, иономицина/A23187 или тапсигаргина), также связаны с апоптозом посредством активизации кальций-активируемой протеинфосфатазы кальцинейрина. Кальцинейрин дефосфорилирует BCL-2-ассоциированный агонист клеточной смерти (BAD), проапоптотический член семейства BCL-2, таким образом усиливая гетеродимеризацию BAD BCL-2-XL и стимулируя апоптоз. Циклоспорин А, ингибитор кальцинейрина и высокопроницаемых мембранных пор, снижал вторичную аксотомию и деградацию цитоскелета после повреждения аксонов растяжением [66].

В мозге кальций играет фундаментальную роль в контроле работы синапсов и формировании памяти, процесса, ведущего к активации специальных кальций-зависимых путей сигнальной трансдукции и задействует ключевые белковые эффекторы, такие как кальмодулинкиназы, киназы MAPK/ERK и CREB [7].

Должным образом контролируемый гомеостаз кальциевой сигнализации поддерживает не только нормальную физиологию мозга, но также целостность нейронов и долговременное выживание всех клеток. Накопленные данные показывают, что кальциевый гомеостаз не только критичен для физиологии и здоровья клеток, но и также, будучи дерегулирован, может приводить к нейродегенерации через сложные и разнообразные механизмы, вовлеченные в избирательное нейрональное повреждение и гибель. Идентификация нескольких модуляторов кальциевого гомеостаза, таких как пресенилины или CALHM1 [3,67], как потенциальных факторов, участвующих в патогенезе болезни Альцгеймера, дает весомое подтверждение роли кальция в нейродегенерации. Эти наблюдения являются важным шагом к пониманию молекулярных механизмов нарушения кальциевой сигнализации, наблюдаемых при различных заболеваниях мозга, таких, как болезни Альцгеймера, Паркинсона и Хантингтона [7]. На поверхности мозга ионоселективные электроды показали, что внеклеточный кальций снижается до 0,1 мМ в результате фокальной травмы мозга [68].

Ионы кальция опосредуют ранние события в аксосомальной коммуникации после повреждения нерва (начальные события в ретроградной сигнализации).

Появление брешы в аксонной мембране сопровождается притоком ионов и открытием потенциал-зависимых натриевых каналов. Избыточная натриевая нагрузка ведет к инверсии натрий-кальциевого обменника, что приводит к повышению уровня кальция в аксоне. К этому добавляется, возможно, также высвобождение кальция через инозитол-трифосфатный рецептор (IP3R) из внутриклеточных хранилищ, таких как эндоплазматический ретикулум (ЭР). Результирующие кальциевые волны также распространяются вдоль аксона и действуют как начальный сигнал для сомы. Повышение концентрации кальция активирует ряд молекулярных механизмов: происходит гиперактивация кальпаина и расщепление натриевых каналов и других аксонных белков, в some посредством протеинкиназы C α индуцируется экспорт HDAC-5 из ядра, что приводит к ацетилированию гистонов, предположительно являющееся подготовкой к транскрипционному ответу клетки. В дальнейшем, поступающие из просвета ионы кальция участвуют в ретроградной сигнализации по путям JUN-киназы и импортинов [8]. Повышение концентрации кальция в цитозоле также вызывает кальций-активируемые токи хлора [69]. Согласно Berliocchi [70], дисбаланс между притоком и оттоком Ca²⁺ из клеток является начальным сигналом, ведущим к Ca²⁺-перегрузке и смерти ишемических нейронов или кардиомиоцитов. Изменения во внутриклеточных кальциевых хранилищах могут действовать совместно с сигналами смерти, для которых изначально не требуется Ca²⁺, стимулируя утилизацию клеточных компонентов и смерть через апоптоз или некроз. Наконец, Ca²⁺ способен напрямую активизировать протеазы, фосфолипазы и нуклеазы, которые вызывают клеточную смерть и повреждение тканей. Известно, что повышение концентрации [Ca²⁺]_o повышает рН_i и снижает [Na⁺]_i, и наоборот [71]. С повышением внутриклеточной кальциевой концентрации связано повышение возбудимости нейронов и вспышки импульсации после аксотомии [32]. Однако, в опытах Hogan [72] при аксотомии также снижался и входящий ток ионов кальция в цитозоль через плазмалемму, а искусственное его восстановление устраняло гипервозбудимость. Это позволяет предположить, что вызванное аксотомией повышение концентрации кальция в

цитозоле нейрона происходит не за счет притока кальция через клеточную мембрану, а за счет других путей. Нарушение кальциевого гомеостаза является одним из основных факторов клеточной смерти. Повышение кальциевой концентрации в цитозоле вызывает выход ионов кальция и других высоко- и низкомолекулярных компонентов из митохондрий через МРТР, что приводит к некрозу или апоптозу нервных клеток [73]. Аксотомия может вести к истощению кальциевых депо [6,74].

Кальмодулин защищал механорецепторный нейрон и глиальные клетки речного рака от повреждения, вызванного аксотомией [75]. Регенерации аксонов после лазерной трансекции способствует повышение в цитозоле уровня Ca^{2+} . Аппликация *in vivo* ингибиторов высокопроницаемой митохондриальной поры бонгкрековой кислоты и циклоспорина А предотвращала как выброс цитохрома с, так и последующую активацию каспазы-3 и снижала апоптоз мотонейрона. Аналогичные результаты давало и применение ингибитора митохондриального кальциевого унипортера, аминокомплекса рутения RU360 [76].

С другой, стороны, индукция ЭР-стресса вследствие изменений в ЭР-кальциевом гомеостазе может активировать особую локализованную в ЭР каспазу-12 и, таким образом, запускать апоптоз способом, не связанным с митохондриями. Вдобавок, кальций-зависимое расщепление и деактивация каспазы-12 м-кальпаином предположительно является механизмом, стоящим за апоптотической смертью клетки, вызванной кислородной и глюкозной депривацией [77]. Повышение уровня цитозольного кальция так же связывается с активацией некоторых ДНК-деградирующих эндонуклеаз [78].

В глиальных клетках млекопитающих одним из основных источников Ca^{2+} для передачи кальциевого сигнала является просвет эндоплазматического ретикулума, который, в конечном счете, наполняется ионами кальция из внеклеточного пространства по механизму SOCE (store-operated calcium entrance) при истощении [79].

Уровень внутриклеточного кальция опосредует изменение импульсной активности нейронов в ответ на аксотомия [32].

В работе [80] разницы в уровнях покоя $[Ca^{2+}]_i$ между контрольными и аксотомированными за 7-10 дней до замера нейронами, не было выявлено. Тем не менее, подъем уровня внутриклеточного $[Ca^{2+}]_i$, вызванный ортодромной и антидромной стимуляцией, и восстановление после стимулирующего поезда были значительно ниже в аксотомированных нейронах, чем в контрольных.

Кальций участвует в работе факторов, связанных с цитоскелетом, например, кальтубин, белок моллюсков, взаимодействующий с тубулином, стимулирует рост аксона и снижает аксональную дегенерацию нейронов у грызунов [81].

Уровень кальция в митохондриях, ЭР и цитозоле регулируется кальций-проницаемыми ионными каналами, которые находятся на мембранах соответствующих органелл или на плазматической мембране. Эти кальций-проницаемые каналы весьма неоднородны и включают в себя семейства каналов транзистного рецепторного потенциала (TRP), каналы, управляемые высвобождением кальция из внутренних депо (SOC), потенциал-управляемые кальциевые каналы, митохондриальный кальциевый унипортер (MCU), IP₃- и рианодиновые рецепторы, и другие. Эти каналы дают вклад в изменение $[Ca^{2+}]_i$, предоставляя пути входа для Ca^{2+} , модулируя движущую силу для входа Ca^{2+} , а также предоставляя внутриклеточные пути для поглощения/высвобождения кальция из клеточных органелл. Таким образом, модулирование экспрессии либо функции кальций-проницаемых ионных каналов оказывает влияние на внутриклеточную концентрацию кальция и, соответственно, на кальций-зависимые процессы, включая апоптоз и некроз.

1.6.1.1 Ca^{2+} каналы

Эндоплазматический ретикулум является основным хранилищем Ca^{2+} в большинстве клеток. Инозитол-1,4,5 – трифосфатный рецептор (IP₃R) представляет собой канал первичного высвобождения кальция на мембранах эндоплазматического ретикулума. При нормальных условиях этот канал отвечает за высвобождение Ca^{2+} в цитоплазму в ответ на генерацию инозитол-1,4,5-трифосфата, стимулируемую различными способами, для поддержания

нормального клеточного гомеостаза. Апоптотические стимулы часто провоцируют повышенный выход кальция через IP_3R , который, в свою очередь, вызывает увеличение поглощения кальция митохондриями и индукцию апоптоза. Это подкрепляют и данные снижения апоптоза в ответ на различные стимулы в результате выключения генов различных изоформ рецептора. Предложено несколько механизмов, лежащих за проапоптотической ролью IP_3R . Во-первых, это прямой перенос кальция из эндоплазматического ретикулума в митохондрии через IP_3R [82]. Действительно, достоверно установлено, что эндоплазматический ретикулум и митохондрии образуют контакты, так называемые *mitochondria-associated membranes*, которые играют большую роль в липидном и кальциевом обмене между этими органеллами. Стимулирование повышенного выхода кальция через IP_3R апоптотическими стимулами будет усиливать поглощение кальция близлежащими митохондриями, которые могут запускать апоптоз посредством открытия пор РТР. Во-вторых, это расщепление IP_3R каспазой-3 или кальпаинами, которое, как предполагается, увеличивает отток кальция из ЭР, способствуя клеточной смерти [83]. В-третьих, это прямое связывание цитохрома С с IP_3R , которое усиливает кальций-зависимый апоптоз. Другие механизмы, стоящие за проапоптотической ролью IP_3R , включают в себя взаимодействие с различными членами семьи BCL-2, фосфорилирование протеинкиназой В/Akt, которое ведет к подавлению «смертоносной» активности IP_3R и таким образом защищает от апоптоза, проапоптотическую регуляцию фосфатазой и гомолог тенсина, удаленный на хромосоме 10 (PTEN), проапоптотическое модулирование белком PML и др. [10].

Роль другого основного канала высвобождения Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума, рианодинового рецептора (RyR), в регуляции апоптоза намного менее изучена по сравнению с IP_3R . Было показано, что RyR II типа участвует в переносе Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума в митохондрии в сердце посредством прямого спаривания митохондриального потенциал-активируемого анионного канала 2 (VDAC2) с RyR II типа. Поэтому, по всей видимости, RyR может регулировать апоптоз по аналогичным с IP_3R

путям, включая открытие МРТР (вследствие повышенного поглощения кальция митохондриями), активизацией кальций-зависимых эффекторов, участвующих в контроле апоптоза (т.е. кальпаинов) и др. Было показано, что ингибирование выхода кальция из ЭР через RyR и IP3R защищает кортикальные нейроны от NMDA-индуцированной эксайтотоксичности путем ограничения повышения концентрации цитозольного Ca^{2+} и смягчение как повреждения митохондрий, так и ЭР-стресса [7,10]. Как показывают недавние исследования, антиапоптотический белок BCL-2 был идентифицирован как новый ингибитор RyR[84], что означает существование важного регуляторного механизма, по которому активность RyR контролирует судьбу клетки.

Митохондриальный кальциевый унипортер (МКУ) представляет собой кальций-проницаемый канал внутренней митохондриальной мембраны, отвечающий за поглощение Ca^{2+} в матрикс и, таким образом, играет ключевую роль в контроле клеточного метаболизма и апоптоза.

Потенциалзависимый анионный канал (VDAC) импортирует Ca^{2+} через внешнюю митохондриальную мембрану. Высказывались предположения, что он опосредует зависимость от митохондрий клеточную смерть посредством образования МРТР. Также многие исследования говорят о том, что VDAC существенным образом участвует в управлении судьбой клетки, взаимодействуя с различными белками, включая члены семейства BCL-2, элементы цитоскелета, шапероны и др. [10]. Изоформа VDAC1 рассматривается как проапоптотический белок, в то время как VDAC2 демонстрировал антиапоптотические функции. Что интересно, VDAC демонстрировал высокую проницаемость для Ca^{2+} в закрытом состоянии (связываемом с пониженной проницаемостью для метаболитов, нарушением митохондриального гомеостаза и индукцией апоптоза), чем в открытом состоянии. Было показано, что VDAC1 физически связана с IP3-рецепторами эндоплазматического ретикулаума посредством молекулярного шаперона GRP75, таким образом предоставляя прямой путь для переноса Ca^{2+} в митохондрии. Напротив, изоформы VDAC2 и VDAC3 не формируют комплексов с IP3R [10,85], из чего можно сделать вывод, что их антиапоптотическая роль не

задействует передачу кальциевого сигнала. Таким образом, считается, что VDAC1 избирательно переносит апоптотические кальциевые сигналы в митохондрии.

Очень мало известно о воздействии митохондриального Ca^{2+} гомеостаза на сигнализацию в глии. Тем не менее, как и в других типах клеток, функциональные митохондрии в астроцитах и олигодендроцитах регулируют кальциевые волны, генерируемых инозитол-1,4,5-фосфатными (IP3) рецепторами (IP3R) и высвобождение Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума. Также было показано, что митохондриальный Ca^{2+} регулирует везикулярное высвобождение глутамата из астроцитов, которое модулирует синаптическую коммуникацию и возбудимость. Накопление Ca^{2+} в митохондриях также модулирует окислительное фосфорилирование и производство АТФ. Соответственно, высвобождение Ca^{2+} из ЭР стимулирует производство энергии митохондриями в астроцитах. Митохондрии регулируют не только накопление и динамику Ca^{2+} , но и его высвобождение. Было показано, что высвобождение Ca^{2+} через митохондриальный натриево-кальциевый обменник сопряжено с депо-зависимым входом Ca^{2+} (который запускается истощением запасов Ca^{2+} в ЭР) и регулирует пролиферацию астроцитов и экзайтотоксичное высвобождение глутамата [65].

Депо-регулируемые кальциевые каналы (store-operated channels, SOC) представляют собой один из основных путей входа кальция в невозбудимые клетки. SOC являются ионными каналами плазматической мембраны, активируемыми в ответ на опустошение кальциевого депо ЭР и доставляют Ca^{2+} для его пополнения, а также для целей клеточной сигнализации. Основным молекулярным компонентом SOC являются белки STIM1 и ORAI1, причем ORAI1 образует кальциевый канал плазматической мембраны, а STIM1 локализуется на эндоплазматическом ретикулуме и работает там в качестве кальциевого сенсора. Вследствие опустошения запаса Ca^{2+} в ЭР, STIM1 перемещается на плазматическую мембрану, где взаимодействует с каналом ORAI1, активируя его, и, тем самым, опосредует депо-регулируемый вход кальция (store-operated calcium entrance, SOCE). Было показано, что каналы SOC и, в особенности, их основные компоненты ORAI1 и STIM1 участвуют во многих

физиологических и патологических процессах, включая апоптоз. Тем не менее, роль SOC в апоптозе, похоже, зависит от многих факторов, таких как тип клетки, апоптотические стимулы, а также вовлеченные внутриклеточные сигнальные пути. Так, несколько исследований указывают на то, что SOCE, ORAI1, а также STIM1 дают вклад в апоптоз, вызванный различными стрессовыми стимулами, в то время как другие исследования показывают их протекторную антиапоптотическую роль [10,67,79].

TRP-каналы (transient receptor potential channels) представляют собой большое суперсемейство 28 катионных каналов у млекопитающих с различными физиологическими функциями и распределением в клетке. Большая их часть – неселективные Ca^{2+} -проницаемые катионные каналы. Суммарные данные исследований показывают явное участие TRP-каналов в регуляции апоптоза. Тем не менее, во многих случаях точные механизмы не вполне ясны [10].

Потенциалзависимые кальциевые каналы (voltage-gated calcium channels, VGCC) опосредуют вход Ca^{2+} в клетки в ответ на деполяризацию мембраны. Они делятся на активируемые низким потенциалом (типы L, P/Q, N и R) и активируемые высоким потенциалом (тип T). Есть данные об участии каналов L-типа в апоптозе различных типов клеток, в то время как каналы T-типа, в зависимости от типа клеток, могут проявлять как про-, так и антиапоптотические свойства [10].

1.6.1.2 Ca^{2+} -зависимые белки и каналы

В реакции нейрона и глии на аксотомию участвует ряд кальций-зависимых белков и каналов: кальпаин, кальмодулин, кальмодулин-киназа II, протеинкиназа C и другие. Аксотомия стимулировала экспрессию кальмодулина в ганглиях брюшной нервной цепочки рака [86]. Экспрессия кальмодулин-киназы II бета снижается при отрастании аксона, при этом кальмодулин-киназа II альфа, по-видимому, поддерживает отрастание аксона [87]. Утрата CaMKII-сигнализации в сенсорных нейронах после травмы периферических нервах может давать вклад в нейрональную дисфункцию и боль [88]. CaMKK-CaMK1a, новый

посттравматический сигнальный путь, индуцируется в соматосенсорных нейронах мышц при травмах периферических нервов. Индуцирование CaMK1a свойственно нейронам заднекорешковых ганглиев в ответ на периферическую нейротравму, и является потенциальной мишенью терапевтического вмешательства для улучшения регенерации периферических нервов [89].

Семейство протеинкиназы C (PKC) – это важные сигнальные молекулы участвующие в предотвращении нейродегенерации после травм нервной системы. Аксотомия повышает уровень PKC II типа в аксотомированных нейронах [90]. Ингибирование протеинкиназы C при аксотомии защищает клетки Пуркинье от смерти, но не влияет на регенерацию аксонов [91]. В корковых нейронах при действии ингибиторов протеинкиназы C (стауроспорина или PKC 41) активизация кальпаина ведет к импорту внеклеточного Ca^{2+} через активируемый гиперполяризацией канал плазматической мембраны HCN2. Отрицательная регуляция этого канала блокирует вход Ca^{2+} в клетку, а также AIF-регулируемый путь и апоптоз [78]. Нейротравма индуцирует экспрессию GDNF в шванновских клетках посредством пуринергической сигнализации и пути PKC-PKD [92]. Положительная регуляция экспрессии калбиндина может способствовать выживанию поврежденных мотонейронов [93].

Кальпаины являются кальций-активируемыми нейтральными нелизосомальными внутриклеточными цистеинпротеазами, состоящими из большой каталитической и малой регуляторной субъединицы. Особенно хорошо изучены две сходные изоформы, кальпаины I и II. Кальпаин I – это цистеинпротеаза с высокой экспрессией в нейронах, которая активируется подъемом цитозольного кальция в микромолярном диапазоне. Активированный кальпаин I может расщеплять Bax и Bid, вызывая высвобождение цитохрома c и AIF из митохондрий. Цитохром c может индуцировать активацию каспаз через апоптосомы, но в то же время кальпаин I может и напрямую расщеплять и активировать каспазы. Кальпаин I также расщепляет AIF до обрезанной (truncated) формы tAIF, которая транслоцируется в ядро и индуцирует там расщепление ДНК. Кальпаин II, также встречающийся в нейронах, может сам

транслоцироваться в ядро клетки, а также взаимодействует с белками семейства Bcl-2, регулирующими апоптоз. Активация кальпаина может также вызывать пермеабиллизацию лизосомальных мембран, которая приводит к выбросу токсичных катепсинов в цитозоль, что имеет место, например, в постишемической смерти нейронов у обезьян. Тем не менее, активация рецепторов NMDA также может вызывать пермеабиллизацию лизосомальных мембран независимо от активации кальпаина. При экзайтотоксичности и ишемии мозга, а также аксотомии [8] активизированный кальпаин I также расщепляет и инактивирует натриево-кальциевый обменник в нейронах, приводя к кальциевой перегрузке и некрозу, которые можно предотвратить ингибированием кальпаина либо экспрессией обменника, не расщепляемого кальпаином. Нейроны экспрессируют естественный ингибитор кальпаина, кальпастатин, удаление которого делает нейроны более уязвимыми для экзайтотоксической смерти, а гиперэкспрессия, наоборот, подавляет ее [94].

1.6.2 Роль Ca^{2+} в других сигнальных путях при аксотомии

Способность аксонов регенерировать свои конусы роста зависит от типа аксона и возраста и регулируется кальцием, цАМФ и ERK. Приток кальция также необходим для регенерации *in vitro*, и, по-видимому, действует через протеинкиназы, такие как ERK и PKA [38]. Кальций и цАМФ стимулируют аксональную регенерацию у *Caenorhabditis elegans*, задействуя киназу DLK-1 [95].

Bcl-2 поддерживает рост аксона путем усиления внутриклеточной Ca^{2+} сигнализации и активации белков CREB и Erk, стимулирующих регенеративный ответ и нейритогенез. Экспрессия Bcl-2 снижает забор и хранение Ca^{2+} в ЭР и таким образом ведет к большему внутриклеточному Ca^{2+} ответу, индуцируемому притоком Ca^{2+} или аксотомией в Bcl2-экспрессирующих нейронах, чем в контроле. Bclx(L), противоапоптотический член семейства Bcl-2, который не влияет на забор Ca^{2+} в ЭР, поддерживает выживание нейронов, но не может активировать CREB и Erk или способствовать регенерации аксонов [96].

Промежуточный филамент виментин взаимодействует с фосфорилированной Erk1, защищая ее от дефосфорилирования кальций-зависимым стерическим препятствием [38]. В защите нейронов при аксотомии значительную роль играют нейротрофические факторы. Уже в обзорной работе [97] были упомянуты несколько десятков нейротрофических факторов, защищающими мотонейроны. Цилиарный нейротрофический фактор CNTF, глиальный нейротрофический фактор GDNF, нейротрофический фактор мозга BDNF, нейротрофин 4/5, инсулиноподобный фактор роста 1, способствовали выживанию и регенерации аксотомированных нейронов на различных моделях [64,97–108]. CNTF является ранним ретроградным сигналом, вызванным аксотомией [109]. Посттравматическое ГАМК-опосредованное повышение внутриклеточной концентрации ионов кальция необходимо для индукции BDNF-зависимого выживания взрослых нейронов ЦНС [110]. Недавно открытый нейрональный Ca^{2+} -сенсор-1 (NCS-1) является фактором выживания поврежденных нейронов, опосредующим GDNF-сигнал выживания через сигнальный путь PI3K-Akt [111].

Давно известно, что уровень внеклеточного кальция спадает при нейрональной активности, и что выход глутамата связан с транзистными падениями уровня внеклеточного кальция. Глутаматэргическая трансмиссия запускает вход Ca^{2+} через ионотропные рецепторы глутамата (особенно AMPA и NMDA типа), а также через потенциалзависимые кальциевые каналы, приводя к транзистному снижению уровня внеклеточного Ca^{2+} . Синаптическое высвобождение глутамата считается одним из основных механизмом нейроглиальной сигнализации [112].

АТФ является важнейшим глиотрансмиттером, опосредующим, в том числе, обмен сигналами между соседними астроцитами, и вызывающим повышение внутриклеточного уровня кальция в глиальных клетках [113]. В мозга истощение запасов АТФ вызывает выход глутамата из нейронов и астроцитов, которое, совместно с деполяризацией нейронов, активизирует NMDA-рецепторы, через

которые в нейрон входит большое количество кальция и натрия (эксайтотоксичность) [94].

1.7 Проксимальные и дистальные процессы

Известны различные факторы, повышающие уязвимость к аксотомии:

1) Местоположение нейронов. Нейроны в периферической нервной системе, как правило, переживают аксотомию и регенерируют, но многие нейроны в центральной нервной системе претерпевают дегенерацию или смерть. Это связано как с нейрональными (различие в экспрессии генов при клеточном ответе на повреждение), так и с не нейрональными факторами, например, ингибирующими регенерацию иммунными белками, а также с взаимодействием тех и других [28].

2) Возраст особи. У очень молодых животных повреждение аксонов как в периферической, так и в центральной нервной системе, как правило, влечет за собой ретроградную дегенерацию и клеточную смерть.

3) Расстояние. Общее правило – чем дальше от сомы произведен разрез, тем устойчивее нейрон к аксотомии. Было предложено две альтернативных модели для объяснения как пространственная внутриклеточная информация кодируется ретроградной сигнализацией [8,114]: а) механизм двойных сигналов, где расстояние до места повреждения оценивается исходя из времени задержки между вызванными повреждением ранними и быстрыми ионными токами, и более поздним прибытием мотор-зависимых сигнальных комплексов; б) механизм непрерывного двунаправленного сканирования, который основан на корегуляции антероградного и ретроградного транспорта положительной и отрицательной негативной обратной связью. В этой модели антероградный сигнал, прибывающий в аксонный терминал, активирует или положительно регулирует ретроградный сигнал. По поступлении в тело клетки ретроградный сигнал подавляет или негативно регулирует антероградный сигнал. Это генерирует ретроградный сигнал, который осциллирует с частотой, которая коррелирует с преодолеваемым внутриклеточным расстоянием. Нервное повреждение вызывает

быстрое изменение длины аксона, доступное для системы, что повышает частоту ретроградного сигнала, ощущаемого сомой [8].

1.7.1 Проксимальные процессы

1.7.1.1 Воспаление

Воспаление – один из характерных компонентов клеточного ответа на повреждение аксонов. Воспаление и вторжение васкулярных макрофагов являются нейропротекторным ответом, который может быть также нужен для стимуляции максимального регенеративного ответа как в периферической, так и в центральной нервной системе. Существует проблема, как различать воспалительный ответ проксимального повреждение от эффектов аксотомии близко к телу клетки [115]. Стимуляция воспаления может придавать способность к регенерации клеткам, не проявляющих ее в нормальных условиях, что отчасти это связано с действием пути mTOR [116]. Нифедипин и нимодипин защищают допаминергические нейроны *substantia nigra* от индуцированной аксотомии клеточной смерти у крыс путем модулирования воспалительного ответа [117]. Кальций-связывающие белки S100A8 и S100A9 инициируют высвобождение хемокинов и цитокинов активированными шванновскими клетками, что является началом программы воспалительного ответа [118].

1.7.2 Дистальные процессы

1.7.2.1 Уоллера дегенерация

Судьбы проксимального и дистального сегментов перерезанных аксонов различны. В отличие от множественных дендритов, тянущихся от тела нервной клетки, большинство нейронов имеют единственный аксон. Поэтому перерезание аксона нарушает сообщение между нейронами и их мишенями иннервации. В то время, как проксимальный сегмент обычно восстанавливается после повреждения и регенерирует, дистальный сегмент претерпевает уоллерову дегенерацию [119,120], который впервые был описан Уоллером в 1850 г. В модели *Wlds*-мутантных мышей аксоны и периферической, и центральной нервных систем

демонстрируют медленную уоллерову дегенерацию после повреждения. Мутация Wlds производит гибридный белок из Ube4B and NMNAT1 и на данный момент идут активные дебаты, каким образом этот гибрид защищает аксоны мутантов. Контакт с интактными нейронами может продлевать жизнь дистальным сегментам. У высших позвоночных уоллерова дегенерация происходит в течение 3-4 суток после аксотомии, в то время как у низших позвоночных и беспозвоночных это время может длиться несколько месяцев [121]. По более современным данным, при травматическом повреждении центральной нервной системы у человека процесс уоллеровой дегенерации развивается в течении нескольких месяцев, а у более примитивных животных – в течении нескольких недель [22]. Таким образом, высокоорганизованная центральная нервная система, по-видимому, создает условия, в которых как регенеративные, так и дегенеративные процессы замедляются. Как считается, по крайней мере, отчасти это происходит из-за более медленной дегенерации миелиновых мембран в поврежденной центральной нервной системе по сравнению с периферической. Также это может быть из-за более низкой изначальной способности к росту нейронов центральной против нейронов периферической нервной системы и наличия белков и протеогликанов, которые активно ингибируют рост аксонов в зрелых нейронах. Многие из этих ингибиторных молекул являются производными миелина, поэтому задержка очистки миелиновых мембран в поврежденной центральной нервной системой дает вклад в слабую регенерацию головного и спинного мозга [63]. В мозге уоллерова дегенерация предсказуемо наблюдается преимущественно в белом веществе [122]. Глия активно участвует в уоллеровой дегенерации [52], также как и макрофаги [123]. Каспазозависимая дегенерация аксонов, связанная с каспазозависимым апоптозом тела клетки, была описана при уоллеровой дегенерации эксплантатов оптического и седалищного нервов и при локализованном разрушении аксона путем локальной нейротрофиновой депривации заднекорешкового ганглия. Тем не менее, о собственных апоптозу признаках, таких как воздействие фосфатидилсерина и утеря митохондриального мембранного потенциала сообщалось в нескольких

моделях уоллеровой дегенерации независимо от активации каспаз. Наблюдение, что в депривированных от фактора роста нервов симпатических нейронах ингибиторы протеасом способны задерживать дегенерацию нейритов, но не апоптоз клеточных тел, дает дополнительное подтверждение существованию различных программ, работающих при разрушении нейрональных отростков [70]. Как сниженный синтез, так и повышенная деградация цАМФ - характерные изменения после травм периферических нервов, которые, по всей видимости, являются характерными для процесса уоллеровой дегенерации [124]. Утеря адаптера толл-подобных рецепторов дрозофилы dSarm (sterile α /Armadillo/Toll-Interleukin receptor homology domain protein) автономно внутри клетки подавляет уоллерову дегенерацию в течение недель после аксотомии. Разделенные аксоны мышей Sarm1 null демонстрируют примечательное долговременное выживание как *in vivo*, так и *in vitro*, что показывает, что продегенеративная сигнализация Sarm1 сохраняется у млекопитающих. Аксоны активно стимулируют свое собственное разрушение после повреждения и dSarm/Sarm1 является семьей древнего аксонального сигнального пути смерти («сармоптоз») [125].

Ингибирование активности убиквитин-протеасомной системы как фармакологическими, так и генетическими средствами существенно задерживает дегенерацию аксона как *in vitro*, так и *in vivo*. Кроме того, фрагментация микротрубочек является самым ранним распознаваемым изменением в аксонах, претерпевающих уоллерову дегенерацию, которая, среди прочих дегенеративных процессов может замедляться протеасомными ингибиторами [126].

1.8 Ультраструктурные механизмы реакции нейронов и глии на аксотомиию

На уровне ультраструктуры после аксотомии может образовываться глиальная и/или везикулярная пробка, и конус роста для регенерации. Образование глиальной «пробки» на конце обрезанного аксона, возможно, характерно для ракообразных. В пределах дистальной культи одного и того же нерва одни аксоны были частично заполнены глиальными клетками, а другие полностью. Вторжение глиальных клеток было значительнее в областях,

ближайших к месту аксотомии и повышалось со временем. Глия, поглощаемая в культурах, демонстрировала гипертрофию и изменения в морфологии ядра. При этом, несмотря на серьезные морфологические изменения, эти культуры по-прежнему сохраняли способность к проведению потенциалов действия и высвобождению трансмиттеров в своих синапсах [55]. Приток кальция при больших или малых повреждениях побуждает различные мембранные структуры (включая эндоцитозные везикулы) глиального или аксонального происхождения взаимодействовать друг с другом, формировать, аккумулировать везикулы и аксолемму, чтобы устранять ущерб нанесенный аксону [127]. Везикулы, которые аккумулируются и взаимодействуют в месте повреждения, восстанавливают целостность аксолеммы кальций-индуцированными слияниями, опосредованными белками наподобие тех, которые участвуют в высвобождении нейротрансмиттеров. Процесс запечатывания просвета аксона требует подъема концентрации внутриклеточного Ca^{2+} и, скорее всего, опосредованного белками слияния мембран. Ca^{2+} также регулирует взаимодействие между синаптотагмином (Syt) и синтаксином (Sux), которые, как считается, опосредуют слияние синаптических везикул с аксолеммой, давая возможность для высвобождения трансмиттеров в синапсах. Чтобы определить, играют ли синаптические белки роль в запечатывании аксона после повреждения, в гигантские аксоны кальмара рака добавлялись антитела, ингибирующие связывание белком Syt ионов кальция, либо ингибирующие Ca^{2+} -зависимое взаимодействие Sux с кальций-связывающим доменом Syt. Аксоны, обработанные антителами к Syt и Sux, после аксотомии не запечатывались, что свидетельствует о том, что эти белки играют значительную роль в восстановлении повреждения мембраны нейрона после аксотомии [128,129]. Кальций и цАМФ стимулируют регенерацию аксона в *C. Elegans*, причем им для этого требуется DLK-1 киназа [95]. Быстрый переход от стационарного аксона к подвижному конусу роста требует задействования мембраны и ее включения в нейролемму. Источник восполнения мембраны для поддержки начального быстрого конуса роста после аксотомии до конца неизвестен. Есть предположение, что существует запас внутриклеточной

мембраны, который может быстро выводиться из нейролеммы [130]. Реструктурирование актиново-тубулиновой сети ведет к локальному накоплению транспортных везикул, которые затем смешиваются с плазматической мембраной для поддержки расширения конуса роста [131]. Известно, что ингибирование кальций-активируемых протеаз, предшествующее локальному подъему уровня кальция, блокирует формирование конуса роста. Ядерные инвагинации, смещение положения ядра и периферическое расположение гранулярного эндоплазматического ретикула являются составляющими общего ретроградного ответа, но наличие аутофагоцитозного пузырька, содержащего миелиновый профиль, указывает на дегенерацию [16]. Кальпаин, кальций-зависимая протеиназа, стимулирует запечатывание обрезанного аксона у кальмара, а у рака ингибиторы кальпаина препятствуют запечатыванию [132,133]. Предполагают, что кальпаин модулирует вытягивание глиальных ламеллиподий [134] и участвует в ультраструктурной перестройке в аксотомированном аксональном сегменте, приводящей к формированию конуса роста [135,136]. Кальциевый транзист при механическом повреждении может быть достаточен для индуцирования трансформации дифференцированных аксонных сегментов в конусы роста [137]. Локальные и кратковременные подъемы протеолитической активности в цитозоле могут запустить формирование конуса роста и нейритогенез, предположительно, локализованная протеолитическая активность играет роль в формировании конуса роста после аксотомии [138]. При изучении восстановительных процессов в аксоне рака определили, что после аксотомии через некоторое время барьерная проницаемость у обрезанного аксона рака снижается равномерно до исходного уровня, переставая пропускать молекулы все меньших размеров вплоть до полного запечатывания обрезанного конца [139].

1.9 Протекция и регенерация

В результате непосредственного притока кальция вблизи места повреждения его локальная концентрация повышается до 1 мМ. Этот резкий

подъем внутриклеточного кальция необходим для запуска регенерации аксона, так как нейроны в бескальциевой среде неспособны отрастить аксоны. Ретроградный сигнал первой волны передается в тело клетки через обратнораспространяющуюся кальциевую волну, которая, как считается, приводит к ремоделированию хроматина. Это первое сообщение от поврежденного конца к соме. Электронная микроскопия показывает, что индуцированные повреждением пузырьки загораживают обрезанный конец аксона, формируя плазмалеммную печать. Вторая волна ретроградной сигнализации, считающаяся основным сигналом о повреждении, возникает через 4-6 часов после травмы. Полностью временной ход коммуникации между поврежденным аксоном сомой еще не понятен. Местный синтез белков необходим для формирования ретроградного сигнала, при котором импортины и виментин локально транслируются в поврежденном аксоне. Нарушение этого сигнала ослабляет клеточный ответ на аксотомию. Белок JIP связывает аксонные пузырьки с сигналом о повреждении и ретроградно передает сигнал о повреждении вдоль микротрубочек [24]. Как уже было сказано, по мере восстановления мембранного потенциала покоя аксон может образовать либо ретракционную луковицу, либо новый конус роста. Считается, что ретракционные луковицы являются нерастущими аналогами конусов роста, где невозможность роста приписывается дестабилизации микротрубочек. Ertürk с коллегами [27] продемонстрировал, что стабилизация микротрубочек ослабляла как образование ретракционных луковиц и дегенерацию аксонов в периферической нервной системе, так и повышала способность к росту в культуре нейронов центральной нервной системы на миелине. В аксоплазме белки семейства кальпаинов активируются для расщепления мембранных спектринов, что приводит к протеолизу цитоскелета. Считается, что это реструктурирует концы микротрубочек и необходимо для преобразования в конус роста. После того, как микротрубочки реполимеризуются, возобновляется везикулярный транспорт, позволяющий образоваться конусу роста [24].

После аксотомии поврежденные нейроны переходят в стадию регенерации. Сомма получает сигналы о повреждении, активируются клеточные сигнальные пути выживания, и положительно регулируются многочисленные ассоциированные с регенерацией гены. Этот индуцированный травмой каскад событие включает в себя нейрохимические изменения, функциональные перестройки возбудимости, реконструкцию конуса роста, локальный синтез белков и многочисленные сигнальные пути для активизации регенерации аксона.

Хотя нейроны взрослых млекопитающих способны регенерировать свои аксоны в периферической нервной системе при определенных условиях, они не способны на это в центральной нервной системе. Среда, окружающая поврежденные аксоны, оказывается ключевым фактором аксональной регенерации. Многие исследовательские работы, направленные на усиления регенерации аксонов в центральной нервной системе взрослых млекопитающих успешно манипулировали этой средой путем добавления способствующих росту веществ либо путем устранения веществ, подавляющих рост. В обоих случаях, количество аксонов, способных к регенерации было низким, и различные популяции нейронов давали различны по силе регенеративный ответ, из чего можно сделать вывод, что среды не всегда достаточно. Это было, в частности, проиллюстрировано в системе мозжечка, где аксотомированные нейроны оливы регенерировали в среде, способствующей росту, в то время как клетки Пуркинье этого не делали. Свойственная нейрону способность регенерировать аксон в целом коррелирует с интенсивностью его реакции на аксотомию (экспрессия молекул, вероятность гибели). Кроме того, такие молекулы как GAP-43 (growth-associated molecule) и c-Jun участвуют как в регенерации аксона, так и в клеточной смерти [29], что позволяет предположить, что эти процессы взаимосвязаны. Оказалось неожиданностью, что клетки Пуркинье теряют свою способность к регенерации аксонов (даже в отсутствие миелина) в течение развития до того, как теряют способность реагировать на аксотомию путем клеточной смерти. Эти результаты подчеркивают различие реакции на аксотомию у разных типов нейронов и на примере клеток Пуркинье показывают, что два клеточных решения

(регенерация аксона и клеточная смерть) регулируются по-разному и поэтому не являются частями одного сигнального пути [29]. Любопытным является явление «кондиционирующего повреждения». Нейроны ганглия дорсального корешка уникальны в том, что имеют две аксональные ветви: длинную сенсорную ветвь, относящуюся к дорсальной колонне спинного мозга в центральной нервной системе и вторая ветвь, относящаяся к периферическим нервам. Сенсорные нейроны во взрослом спинном мозге не регенерируют после аксотомии, в то время как периферическое повреждение вызывает сильный регенеративный ответ. Регенерация центральной ветви может быть значительно усилена, если ей предшествует повреждение периферической ветви, называемое «кондиционирующим повреждением». Кондиционирующее повреждение позволяет предположить, что ответы на центральное и периферическое повреждение в нейронах ганглия дорсального корешка регулируются различными сигнальными механизмами, и могут лежать в основе различия в способности отращивать аксоны у разных типов нейронов [38].

Тело нейрона осуществляет транскрипционный контроль над протекцией и регенерацией нейрона. Сигналы, поступающие из места повреждения аксона, должны активировать программы транскрипции и трансляции, чтобы вызвать отрастание поврежденного аксона заново. На данный момент наше понимание этих процессов очень ограничено. Самые последние результаты исследований дают основание предположить, что ретроградные кальциевые волны вызывают ядерный экспорт гистон-диацетилазы 5 (HDAC5) через активацию белковой киназы $С_{mi}$ (PKC $_{mi}$) и это, в свою очередь, усиливает ацетилирование гистонов, праймируя хроматин для последующих транскрипционных событий [8]. Известно, что киназы Erk1, Erk2 и Jnk активируются в ответ на повреждение. При этом в опытах [140] уровень активации Jnk в нейронах дорсальных корневых ганглиев не зависел от расстояния между телом нейрона и местом аксотомии. Аксотомия также может вызывать повышение транскрипции и трансляции киназ в клеточных телах (JAK) [38]. Другой хорошо описанный клеточный ответ на повреждение периферических нервов – подъем уровня цАМФ в теле клетки, дающий вклад в

инициацию отрастания аксона. цАМФ не только повышает способность поврежденных нейронов к росту, но и частично ослабляет ингибирование роста в ЦНС [95]. Эффекты цАМФ зависимы от транскрипции и включают в себя активацию ПКА и фактор транскрипции CREB (cAMP response element binding protein) [141]. Дальнейшие события под влиянием активируемых аксотомией киназ включают в себя положительную регуляцию, или активацию, факторов транскрипции. Например, вызванный повреждением Jnk индуцирует положительную регуляцию и фосфорилирование факторов транскрипции c-Jun, JunD и Fos, а также транслокацию ATF-3 в ядро, приводя к формированию комплексов с ДНК-связывающим действием [8]. Другие факторы транскрипции, включая STAT3, P311, Sox11 и C/EBP β , также оказались положительно регулируемы и активированным вследствие повреждения, в то время как NF- κ B, наоборот, снижается [24]. Эти изменения в активности факторов транскрипции приводят к изменениям в экспрессии генов поврежденного нейрона, с положительной регуляцией растущего списка «генов, ассоциируемых с регенерацией». Трансгенные и гиперэкспрессионные подходы с несколькими генами, ассоциируемыми с регенерацией, в первую очередь GAP3-43/CAP-43, или c-jun, продемонстрировали скромное улучшение в регенерации периферийных нервов, но эти результаты не воспроизводились в центральных нейронах [114]. Затруднения в регенерации аксонов в ЦНС на данный момент объясняют в основном ингибирующей средой и возрастным снижением собственного потенциала роста аксона. В нейронах ПНС регенерация аксонов происходит при условии активации нейронной прорегенеративной транскрипционной программы и пластичности глиальных клеток. Отрастание аксона регулируется скоординированной генетической программой и локальным сигнальным каскадом. Для опосредования эффективной сборки аксона внеклеточные факторы роста, такие как нейротрофины и белки внеклеточного матрикса, активируют сигнальные каскады локально в аксоне, что вовлекает в участие актин-связывающие белки и белки, ассоциированные с микротрубочками (MAP). Эти ассоциированные с цитоскелетом молекулы затем опосредуют сборку аксона

совместной модуляцией полимеризации актина и микротрубочек [25]. В то же время, активированные сигнальные посредники могут ретроградно транспортироваться из аксона в тело клетки. После прибытия в сому это сигнальные посредники инициируют активацию набора факторов транскрипции, которые контролируют рост аксона. Внеклеточные факторы также могут активировать факторы транскрипции напрямую в соме для индуцирования экспрессии генов. Наконец, экспрессия генов, опосредованная этими факторами транскрипции и последующей трансляцией белков, производит сырье для новых аксонов, включая элементы цитоскелета. Эти строительные материалы далее транспортируются антероградно и встраиваются в растущий аксон. Ядерные исполнительные апоптотические белки CED-3 и CED-4 способствуют инициации регенерации нейрона у *Caenorhabditis elegans* [142].

1.10 Механизмы гибели нейронов и глии при аксотомии

При аксотомии развивается сложный комплекс метаболических и сигнальных процессов, направленных либо на противодействие поражению и компенсацию повреждений, либо на реализацию программы запрограммированной клеточной смерти - апоптоза или аутофагии [17]. В наименее благоприятных случаях происходит некроз. После аксотомии возможна смерть нервных клеток, как правило, по сценариям апоптоза, некроза и аутофагии. Некоторыми авторами предложен термин «параптоз» для типа клеточной смерти, не имеющего всех морфологических признаков апоптоза [143].

Важная роль ионов кальция в регуляции клеточной смерти известна давно. Некротическая смерть клеток уже давно ассоциируется с внутриклеточной кальциевой перегрузкой, ведущей к мембранной пермеабилитации и функциональному коллапсу митохондрий. При дальнейшем уточнении сигнальных путей апоптоза было обнаружено, что Ca^{2+} /кальпаин критическим образом вовлечен в работу фактора индукции апоптоза (AIF), локализованном на митохондриях. В дальнейшем было показано, что ионы кальция играют

важную регуляторную роль в других разновидностях клеточной смерти, из которых можно выделить аутофагию и апоптоз [78].

1.10.1 Апоптоз

Апоптоз описывается как разновидность самоубийства клетки, т.к. апоптотическая смерть является результатом активных процессов внутри самой клетки. Гибнущая клетка проходит через быстрые преобразования, которые отражаются и на ее структуре, и на ее биохимии. Морфологически, апоптоз характеризуется конденсацией ядерного хроматина (пикнозом), сжатием цитоплазмы, фрагментацией ядра (кариорексисом) и образованием вздутий на плазматической мембране. Клетка последовательно разбивается на заключенные в мембраны фрагменты, называемые апоптотическими тельцами, которые быстро распознаются и поглощаются соседними клетками или макрофагами. Внутри апоптотической клетки происходят также биохимические изменения для аккуратной упаковки и удаления апоптотических телец путем фагоцитоза. Апоптоз нейронов вследствие аксономии обычно связан с остановкой доставки в нейрон трофических факторов ретроградным транспортом.

Внутриклеточный механизм апоптоза связан с пермеабиллизацией внешней митохондриальной мембраны, при которой несколько апоптогенных белков, включая цитохром c, Smac/Diablo, фактор индукции апоптоза (AIF) и эндонуклеаза G (Endo G) могут высвобождаться из митохондрий в цитозоль. Из этих апоптогенов лучше всего роль в индукции апоптоза изучена у цитохрома c. Оказавшись в цитозоле, цитохром c связывается с Apaf-1 и, совместно с дезоксиаденозинтрифосфатом dATP образует крупную гептамерную молекулярную структуру, апоптосому, которая привлекает прокаспазу-9. Привлечение молекул прокаспазы-9 к апоптосоме позволяет им саморасщепиться с образованием зрелой каспазы-9, которая, в свою очередь расщепляет и активирует прокаспазу-3. Каспаза-3 и другие исполнительные каспазы расщепляют множество белков-мишеней, опосредуя системный демонтаж клеток, проходящих процесс апоптоза [94].

Индукция внутреннего механизма апоптоза в нейронах полностью зависима от экспрессии и активации Вах, отвечающего за пермеабиллизацию внешней митохондриальной мембраны. Удаление или ингибирование Вах предотвращает патологическую смерть нейронов в ряде *in vitro* и *in vivo* моделей нейродегенерации. Точный механизм, по которому олигомеры Вах индуцируют пермеабиллизацию внешней мембраны митохондрий и высвобождение цитохрома с пока еще не полностью понятен. Тем не менее, некоторые недавние исследования предоставили новые данные, проливающие свет на данный вопрос. Центральные альфа-спирали 5 и 6 белка Вах могут встраиваться в одной плоскости с внешней митохондриальной мембраной, потенциально вызывая ее искривление и пермеабиллизацию. При индукции апоптоза, Вах образует кольцевые структуры различного размера и формы, способные образовывать поры, которые отсутствуют в других мембранных белках. Образования колец белка Вах на митохондриях само по себе недостаточно для максимального высвобождения цитохрома с, в этом процессе также участвуют других белки, отвечающие за структурную динамику митохондрий, такие как Drp1 [94].

Перерезание оптического нерва у новорожденных крысят приводит к быстрой апоптотической дегенерации клеток ганглиев сетчатки. Этот массовый процесс гибели нейронов связывались скорее с нарушением поступления трофических факторов из мишеневых структур, чем с повреждением аксона как таковым, однако в опытах [144] было показано, что последнее также играет роль. Вызванная аксотомией гибель мотонейронов в спинном мозге происходит по механизму апоптоза. Молекулярные события апоптотической гибели мотонейронов включают активацию sTNFR1 - рецептора фактора некроза опухолей, TNF. В работе активация рецепторов смерти Fas при аксотомии запускает апоптоз, т.е. сигнальный путь Fas участвует в АТ-индуцированной смерти мотонейронов новорожденных крысят [145]. Рецепторы TNF частично защищают поврежденные нейроны в постнатальной ЦНС [146]. С другой стороны, двойная делеция рецепторов TNFR1 и TNFR2 предотвращает гибель мотонейронов после аксотомии лицевого нерва у взрослых мышей [147].

Гиперэкспрессия антиапоптотического белка Bcl-2 [148] и делеция проапоптотического белка Bax предупреждают вызванную аксотомией гибель клеток. Bcl-2 защищает мотонейроны как от апоптотической смерти, вызванной аксотомией [115]. Апликация *in vivo* ингибиторов митохондриальных пор блокирует запуск апоптоза в аксотомированных лицевых нейронах новорожденных мышат [76]. Вследствие вторичных патофизиологических механизмов, вызванных травмой спинного мозга, олигодендроциты умирают, подвергаясь апоптотическим волнам [149]. В частности, уоллерова дегенерация в аксонах белого вещества, которая происходит вследствие травмы спинного мозга может устранять аксонную поддержку и индуцировать апоптоз олигодендроцитов, запуская экспрессию Bax [150]. В нейронах гиппокампа L-глутамат, индуктор притока Ca^{2+} и активации кальцинейрина, запускал транслокацию Bad на митохондрии и апоптоз, которые могут быть подавлены коэкспрессией мутантной ингибиторной формы кальцинейрина или его фармакологическими ингибиторами [78].

Апоптоз глии наблюдался в двигательном ядре лицевого нерва после дистальной и проксимальной аксотомии [151]. У новорожденных крыс после аксотомии седалищного нерва глиа в ганглиях заднего корешка отмирала апоптотическим путем вслед за нейронами [5] NGF-опосредованная активация p75, видимо, является важным посредником апоптоза шванновских клеток в контексте повреждение периферических нервов [152]. В то же время, режущая травма приводила к очаговой патологии ткани с апоптозом белого вещества, демиелинизацией, неполной ремиелинизацией и выраженным ответом макрофагов в эпицентре травмы, но малыми патологическими особенностями на расстоянии от эпицентра травмы, на что указывал низкий уровень апоптоза и демиелинизации [153]. Апоптоз шванновских клеток задерживал регенерацию седалищного нерва после перерезания [154]

Одним из механизмов, по которому апоптоз может вызывать некроз нейронов, является расщепление кальциевого насоса плазматической мембраны каспазами, приводящее к кальциевой перегрузке клетки [77].

1.10.2 Некроз

Некроз играет немаловажную роль в различных патологических состояниях, включая повреждение, вызванное ишемией и реперфузией (т.е. инсульт и инфаркт миокарда), травмы и некоторыми формами нейродегенерации. Некроз сопровождается воспалительной реакцией и последующим высвобождением реактивных цитокинов, которых при апоптозе обычно пренебрежимо мало [143]. В цепи событий, ведущей к некротической смерти клетки, необходимым звеном является повышение уровня Ca^{2+} в цитозоле свыше 10^{-4} - 10^{-3} М вследствие входа из внеклеточной среды и кальциевых депо и последующей активации кальпаинов. В клетках нервной системы могут наблюдаться смешанные варианты клеточной гибели, совмещающие признаки апоптоза, некроза и аутофагии [155].

Некроз долгое время рассматривался как результат случайного или неуправляемого процесса, обычно вызванного факторами, внешними по отношению к клетке или ткани, такими как инфекция, токсины, термическое повреждение (жар или холод) или травма. Он характеризуется нарушением плазматической мембраны, набуханием клетки, расщеплением хроматина, гидролизом ДНК, и наконец, распадом (лизисом) клетки. Некроз часто ассоциируется с местным воспалением, запущенным высвобождением факторов из мертвых клеток, которые приводят в действие врожденную иммунную систему. Участие митохондрий в некротической смерти клеток известно уже давно. Общей причиной некроза является упадок митохондриального энергетического метаболизма, приводящий к резкому падению уровня АТФ. Это, в свою очередь, может привести к внутриклеточной Ca^{2+} перегрузке и стимулированию различных Ca^{2+} -зависимых ферментов – фосфолипаз, протеаз, эндонуклеаз. Исторически, роль ионов Ca^{2+} как триггеров смерти восходит к наблюдению Флекенштейна, что избыточный вход Ca^{2+} в кардиомиоциты служит основой сердечной патологии после ишемии. Последующие исследования подчеркивают общую важность этого открытия и ввиду гиперстимуляции рецепторов, и ввиду многих цитотоксических агентов, которые, как оказалось,

вызывают летальный уровень входа Ca^{2+} в клетки. Многие формы токсической смерти клеток изначально считались относящимися к некротическому типу с нарушением внутриклеточного кальциевого гомеостаза. В исследованиях 1970-х гг. было выяснено что смерти клеток, индуцированной парацетамолом и бромбензолом предшествует опосредованное цитохромом P450 образование активных метаболитов, истощение глутатиона и нарушение кальциевого гомеостаза [78,94,156].

Сейчас смерть клетки в результате повышения митохондриальной проницаемости (MPT) рассматривается как отдельная форма клеточной смерти. MPT означает сильное повышение проницаемости внутренней митохондриальной мембраны в ответ на повышенную концентрацию кальция, обычно приводящее к разобщению окислительного фосфорилирования, энергетическому истощению клетки и некротической смерти клетки. Перенос проницаемости вызывается открытием так называемых высокопроницаемых митохондриальных пор (MPTP), неселективных пор с диаметром 1,4-2,3 нм, которые делают внутреннюю мембрану свободно проницаемой для протонов, ионов металлов и малых молекул (около 10 кДа). Пока не выяснено, каковы молекулярные компоненты поры, поскольку многие из ранее предполагаемых кандидатов (потенциалзависимый анионный канал VDAC, фосфатный носитель, транслокационный белок TSPO) были исключены экспериментами по генетической инактивации белков в клетках и мышцах. В настоящее время считается, что необходимым компонентом MPTP является митохондриальным матричный фермент циклофилин D. Чтобы образовать пору во внутренней митохондриальной мембране, циклофилин D должен взаимодействовать с одним из нескольких таких трансмембранных белков, как переносчик НАД, переносчик фосфатов, F₀F₁-АТФ-синтаза и/или белок спастической параплегии 7 (SPG7). Существуют исследования, показывающие, что комплекс I митохондриальной цепи переноса электроном может также участвовать в образовании MPTP, по крайней мере, в некоторых типах клеток (например, в клеточных линиях астроглии), так как ингибиторы комплекса I, например, ротенон, пирицидин или метформин могут также

десенситизировать МРТР к Ca^{2+} . Однако, механизм, связывающий комплекс I с образованием поры, неясен. Выдвигают также гипотезу, что МРТР может образовываться множеством различных окисленных, денатурированных или неправильно свернувшихся белков внутренней митохондриальной мембраны [94].

Повышенная концентрация ионов кальция в митохондриальном матриксе является необходимым триггером открытия МРТР, которой также дополнительно стимулируется активными формами кислорода, неорганическим фосфатом, внутриклеточным окислением, уменьшением митохондриального мембранного потенциала и пониженным АТФ, помимо всего прочего. Самих по себе этих факторов недостаточно для открытия МРТР, скорее они сенситизируют пору к кальцию так что ее открытие происходит при относительно низких концентрациях ионов кальция. Открытие МРТР может подавляться лекарственными препаратами, например антибиотиком циклоспорином А, который связывается с циклофилином D, предотвращая его связывания с переносчиком НАД и/или другими компонентами поры. Также образование МРТР ингибируется аналогами аденина, такими как 3-метиладенин, но это также блокирует аутофагосомы и ингибирует киназы, регулирующие выживание и смерть в нейронах [73,94].

Открытие МРТР приводит к 1) деполяризации внутренней мембраны, вызывая 2) прекращение производства АТФ путем окислительного фосфорилирования и 3) обратному ходу работы АТФ-синтазы, гидролизируя вход цитозольной АТФ в митохондриальный матрикс, и, таким образом 4) истощению всех запасов АТФ в клетке, 5) набуханию митохондриального матрикса, что может привести к 6) разрыву наружной мембраны, 7) высвобождению цитохрома с и Endo G, что может 8) необратимо остановить клеточное дыхание и вызвать смерть клетки. Однако индукция повышения митохондриальной проницаемости и последующие разрыв внешней мембраны и выход цитохрома с в мозге менее выражены и менее чувствительны к циклоспорино А, чем в других тканях. В целом открытие МРТР приводит к некротической/онкотической смерти клетки из-за энергетического истощения. Тем не менее, в некоторых обстоятельствах

повышение митохондриальной проницаемости может запускать апоптоз благодаря выходу цитохрома с, и это произойдет с большей вероятностью, если уровень АТФ в клетке может быть поддержан с помощью гликолиза [94,157].

Повышение митохондриальной проницаемости стимулируется высоким уровнем цитозольного кальция, активными формами кислорода и низкими уровнями АТФ. Такие условия могут возникнуть при реперфузии ишемической ткани, включая мозг. Таким образом, смерть нейронов, вызванную ишемией/реперфузией мозга, можно частично предотвратить блокировкой открытия МРТР циклоспорином А или его неиммунносупрессивными производными, либо генетическим исключением циклофилина D [94,157–159].

1.10.3 Другие типы клеточной смерти

Аутофагия, в зависимости от ее интенсивности может иметь как защитный, так и нейродегенеративный эффект. Повышение аутофагии рапамицином защищало ганглии сетчатки от апоптоза после аксотомии зрительного нерва у мышей [17]. Выживание ганглионарных клеток сетчатки после аксотомии оптического нерва ухудшалось при удалении необходимых для аутофагии генов (Atg4B, Atg5) в клетках ганглиев и улучшалось индукцией аутофагии [94].

Некроптоз в глиальных клетках, в частности олигодендроцитах, также может играть важную роль в боковом амиотрофическом склерозе. Нехватка оптинейрина (мутации в котором связаны с боковым амиотрофическим склерозом) сенситизирует олигодендроциты к смерти путем RIPK1-, RIPK3-зависимого некроптоза, который, в свою очередь, запускает воспалительный каскад, приводящий к повреждению и патологии аксонов [94].

Аутолиз (лизосомальная клеточная смерть) может происходить, если кальпаин или иные кальций-зависимые ферменты разрушают мембрану лизосом, высвобождая катепсины (ДНКазы, липазы) и активные формы кислорода, а также протоны, что повышает кислотность внутриклеточной среды

Как было сказано выше, сармоптоз – смерть нейрона, обычно вызванная аксотомией. Хотя повреждение аксона, или блокада аксонального транспорта,

запускает SARM1-зависимую дегенерацию аксона, роль SARM1 в клеточной смерти не ограничивается аксонами. Митохондриальные токсины CCCP и ротенон приводят к SARM1-зависимой смерти нейрональных клеток и их аксонов, которая и получила название «сармоптоз». Однако потеря митохондриального потенциала, похоже, является поздним событием в вызванной повреждением аксональной дегенерации. Также неясно, нужно ли SARM1 локализоваться на митохондриях, чтобы вызывать сармоптоз, т.к. по этому вопросу имеются противоречивые данные [94].

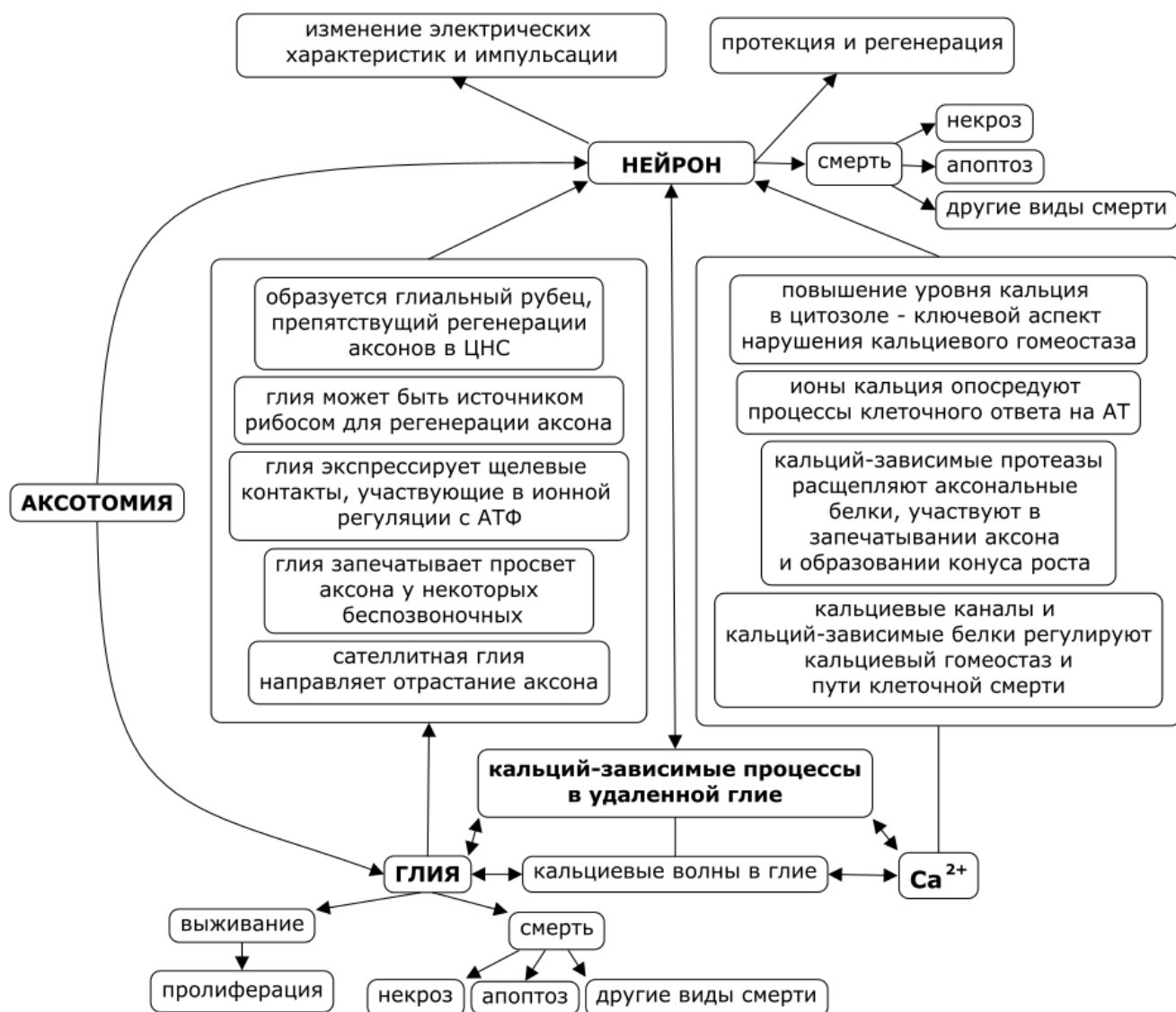


Рисунок 1. Взаимодействие нейрона, глии и ионов кальция в реакции нейронов и глии на аксотомия. Сравнительно мало изучены индуцированные аксотомией процессы в глии, удаленной от места повреждения, и их связь с судьбой нейрона (включая выживание/смерть нейрона и глии), а также роль в них ионов кальция.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Оборудование и материалы

Во всех экспериментах использовался физиологический раствор ван Харревельда для ракообразных: NaCl – 205 мМ (12.0 г/л); KCl - 5.4 мМ(0.4г/л); CaCl₂ - 13.5 мМ (1.5г/л); MgCl₂ - 5.4 мМ (MgCl₂• 6H₂O - 0.5 г/л); pH 7.2 - 7.4 [160].

Для изоляции интактного препарата механорецепторного нейрона вместе с его ганглием (МРН-Г) использовались плексигласовые ванночки. Одна размером 3х3х5 см с наклонным под углом 45° дном из смеси воска и парафина (в пропорции 1:1). Вторая представляла собой чашку Петри с горизонтальным слоем воска и парафина толщиной 5-7 мм. Препарирование производилось под бинокулярным микроскопом Альтами МБС-2. В качестве инструментов препаровки использовались ножницы (крупные и офтальмологические), пинцет, стеклянные и стальные иглы.

Для регистрации импульсной активности механорецепторных нейроном использовались стеклянные присасывающиеся микропипетки с внутренним диаметром наконечного капилляра 50-100 мкм, заполненные физиологическим раствором Ван Харревельда. В микропипетку вставлялась серебряная проволока диаметром 0,3 мм, соединенная с предусилителем. Для регистрации импульсной активности МРН-Г использовались разработанные в лаборатории Ю. И. Гусачем биоусилитель и программа NeuronXP, установленная на персональный компьютер с аналого-цифровым преобразователем L-783 (L-Card, Москва, Россия).

Для флуоресцентной визуализации кальциевой динамики в препарате рецептора растяжения рака, соединенного с ганглием брюшной нервной цепочки, использовались флуоресцентные кальциевые зонды Fluo-4 AM и Calcium Orange AM, а также сурфактант Pluronic F-127 фирмы Thermo Fisher Scientific (США). Флуоресцентная фотосъемка производилась на микроскопе Olympus BX51XI с цифровой камерой ColorViewIII (Olympus, Япония).

Для оценки уровня некроза и апоптоза нейрона и сателлитных глиальных клеток использовался флуоресцентный микроскоп AxioLab.A1 производства

компании Carl Zeiss (Германия). Флуорохромы йодид пропидия и Hoechst 33342 были приобретены в Sigma-Aldrich-Rus (Москва, Россия). Глутаральдегид (0,2%) использовался для фиксации препарата. Для флуоресцентной микроскопии препараты помещались в глицерин.

Использованные для изучения роли ионов кальция и кальций-зависимого пути в АТ-индуцированных процессах в нейронах и глии модуляторы иономицин, тапсигаргин, рианодин, стауроспорин и мауротоксин были приобретены в Alomone Labs Ltd (Израиль). Модуляторы циклоспорин А, дантролен и флуфеназин, KN-93 были приобретены в Sigma-Aldrich-Rus (Москва, Россия).

2.2 Объект исследования

В качестве источника механорецепторного препарата использовались речные раки *Astacus leptodactylus* из реки Дон и ее притоков (Маныч и др.), которые закупались на местных рынках. В каждом сегменте брюшка можно найти по два механорецепторных нейрона размером 50-100 мкм [161], иннервирующих соответствующий ганглий брюшной нервной цепочки в составе *n.dorsalis* (Рис.2), второго по счету в каудальном направлении. Последний также включает в себя афферентные аксоны, иннервирующие как сами нейроны механорецептора, так и механорецепторные мышцы [162–164]. Рецептор растяжения рака состоит из двух механорецепторных нейронов: медленно адаптирующегося (тонического) и быстро адаптирующегося (фазического). Их дендриты проникают в соответствующие мышцы (соответственно, быстро и медленно адаптирующуюся), крепящиеся на хитиновом панцире между соседними сегментами брюшка, и находятся в контакте с мышечными волокнами [165]. Растяжение тонической и фазической мышц вызывает кратковременный ответ обоих нейронов. Ганглионарные нейроны генерируют команды абдоминальным мышцам, которые контролируют движения хвоста. Частота импульсной активности медленно адаптирующегося нейрона пропорциональна степени растяжения тонической мышцы. Частота и количество спайков быстро адаптирующегося нейрона коррелируют со скоростью растяжения фазической мышцы [166–168]. Из брюшка

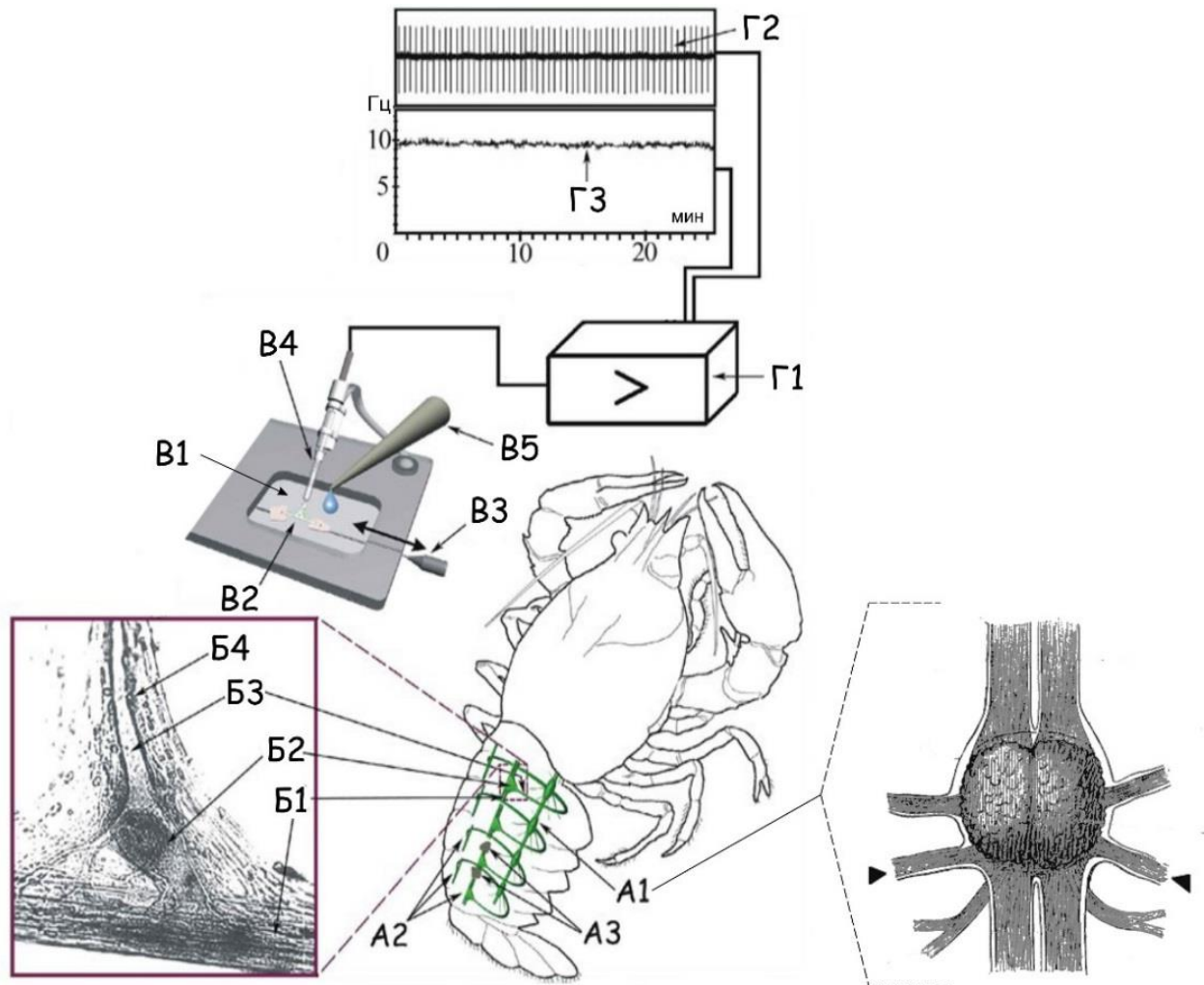


Рисунок 2. Брюшной рецептор растяжения рака. Каждый брюшной сегмент содержит симметричные рецепторы растяжения, каждый из которых состоит из двух сенсорных нейронов, крепящихся на рецепторных мышцах. Их аксоны входят в соответствующие ганглии в составе *n. dorsalis*. Внизу в центре: А1 ганглии брюшной нервной цепочки, в который входит пара *n. dorsalis* (внизу справа указаны стрелками); А2 – рецепторы растяжения; А3 – места крепления рецепторных мышц к панцирю. Слева внизу – микрофотография медленно адаптирующегося нейрона; его дендриты разветвляются между волокнами рецепторной мышцы. Б1 – мышца медленно адаптирующегося нейрона; Б2 – медленно адаптирующийся нейрон; Б3 – аксон; Б4 – клетки сателлитной глии. Выше – ванночка для регистрации импульсов и ингибиторного анализа *in vitro*. В1 – раствор ван Харревелда в ванночке; В2 – РРР, зафиксированный на иглах; В3 – подвижная игла для регулировки натяжения механорецепторной мышцы; В4 – стеклянный электрод для регистрации потенциала действия нейрона; В5 – добавление модулятора в ванночку. Вверху – регистрация потенциала действия. Г1 – биоусилитель; Г2 – осциллограмма импульсной активности нейрона; Г3 – частотограмма импульсной активности нейрона.

рака можно выделить 4-5 интактных препаратов МРН-Г.

Тело и аксон механорецепторного нейрона окружены 10-30 слоями глиальной оболочки, разделенными коллагеновыми прослойками. Межклеточное пространство между нейрональными и глиальными мембранами обычно имеет менее 10-15 нм в толщину. Это облегчает диффузию между нейронами и глией, но ограничивает сообщение нейронов с внешней средой. Пучки микротрубочек из дендритов в аксон ограничивают везикулярный транспорт между перикарием и нейрональной мембраной. Многочисленные инвагинации в нейронной цитоплазме усиливают связь глии с нейроном и сокращают путь диффузии между ними [57].

2.2.1 Изоляция комплекса механорецепторного нейрона и ганглия (МРН-Г)

Чтобы иметь контрольные интактные препараты для аксотомии, был разработана новая методика изоляции брюшного механорецептора рака вместе с соответствующим ганглием брюшной нервной цепочки. В отличие от предшествующих работ, в которых использовались *in vitro* только аксотомированные нейроны, в данном способе препаровки сохраняется связь между сенсорными нейронами и ганглием. Глиальные клетки, окружающие неаксотомированные нейроны, демонстрируют низкий по сравнению с аксотомированными уровень некроза и апоптоза, что дает основания считать, что данная методика является также более щадящей и лучше сохраняет жизнеспособность всей системы «нейрон-глия». Этот нейроглиальный препарат может быть использован в качестве простого и информативного модельного объекта в исследовании вызванных аксотомией и другими различными физическими и химическими факторами процессов: клеточного ответа, нейродегенерации, нейропротекции и регенерации нейронов, реакции глии и нейроглиальных взаимодействий.

Речной рак убивается путем отрезания передней области головы груди с глоточным ганглием за глазами. Брюшко разрезается по линии *a-a*, а тельсон – по

линии б-б (Рис. 3). Затем отрезаются боковые шиповые отростки тергитов и плеоподы (не показано).

Для получения доступа к брюшной нервной цепочке и МРН вентральный панцирь разрезается по линии, пролегающей в 2-3 латеральнее брюшной цепочки (Рис. 4). С дорсальной стороны панцирь разрезается вдоль центральной линии (Рис. 5). Глубинные мышцы брюшка рассекаются по плоскости, проходящей через оба разреза так, что образуются два фрагмента, один из которых содержит 5 МРН, соединенных с соответствующими ганглиями брюшной нервной цепочки (Рис. 6). Этот фрагмент фиксируется в ванночке №1 с раствором ван Харревельда (рис. 7). С помощью офтальмологических ножниц от вентральной стороны панциря отрезаются глубокие мышцы брюшка: латеральная косая мышца брюшка *m. obliquus lateralis abdominis (o.l.abd)*, задняя медиальная косая мышца *m. posterior medialis obliquus (p.m.o.)*, поперечная мышца брюшка *m. transverses abdominis (tr.abd.)*. (Рис. 8 и 9: *m1*, *m2*, and *m3*, соответственно).

Далее от дорсальной стороны панциря отсекаются *tr.abd.*, *o.l.abd.* медиолатеральная косая мышца брюшка *m. obliquus mediolateralis abdominis (o.ml.abd.)*, передняя медиальная косая мышца *m. anterior bliquus medialis, (a.o.m)* and *p.m.o.* (Рис 10,11: *m4*, *m5*, *m6*, and *m7*, соответственно). Это открывает доступ к *n. dorsalis*. (Рис. 11, 12).

После этого препарат переносится в чашку Петри или специальную ванночку с горизонтальным дном из смеси воска и парафина. Стерниты обрезаются у основания с внешней стороны офтальмологическими ножницами (Рис. 13), Ставший подвижным фрагмент вентрального панциря отгибается латерально и тоже фиксируется на дне (Рис. 14,15). Последующие действия производятся под микроскопом. На медиальной стороне препарата обрезаются дорсальная косая мышца брюшка *m. dorsales obliquus abdominis (d.o.abd.)* и дорсальная прямая мышца брюшка *m. dorsales rectus abdominis (d.r.abd.)* (Рис. 15,16: *m8* and *m9*, соответственно).

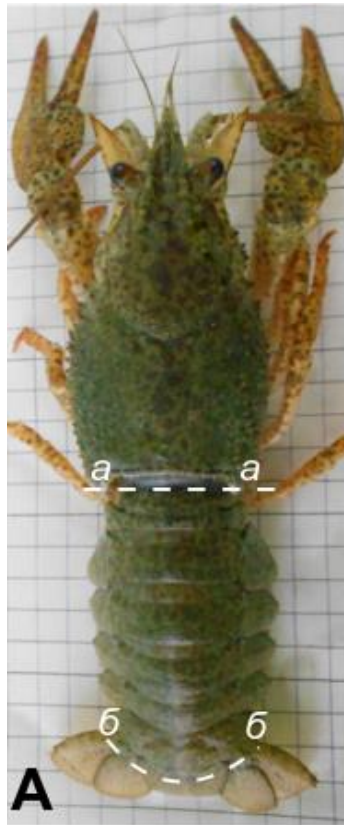


Рисунок 3. Изоляция брюшного сегмента рака: разрезание брюшного сегмента вдоль линии *a-a* и тельсона вдоль линии *б-б*.



Рисунок 4. Изоляция брюшного сегмента рака: Вентральный панцирь разрезается вдоль линии *г-г* в 2-3 мм латерально от центральной линии *в-в*.



Рисунок 5. Изоляция брюшного сегмента рака: разрезание дорсального панциря вдоль центральной линии $d-d$.



Рисунок 6. Изоляция брюшного сегмента рака: отсечение глубоких мышц брюшка по плоскости $d-e-e-d$. Полученные половинки брюшка являются неодинаковыми. Одна из них (слева) содержит неповрежденные МРН, соединенные с ганглиями БНЦ.

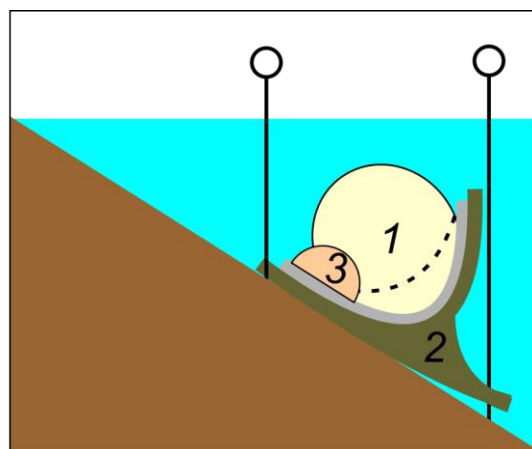
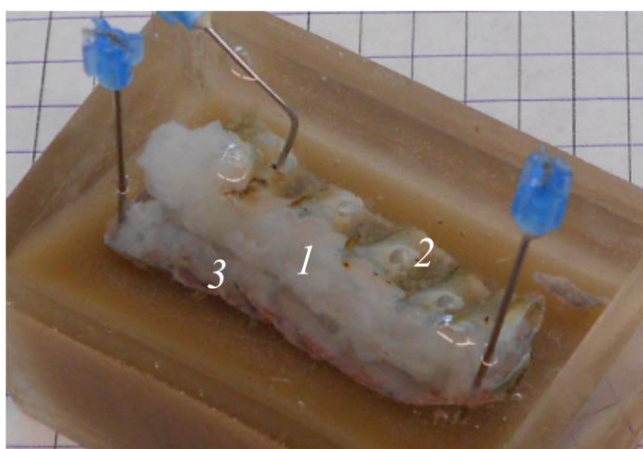


Рисунок 7. Удаление глубоких мышц в ванночке №1 с наклонным дном: закрепление половинки брюшка. Справа – схема препаровки. А.. 1 – глубокие мышцы; 2 – панцирь; 3 - *d.o.abd.* и *d.r.abd.*

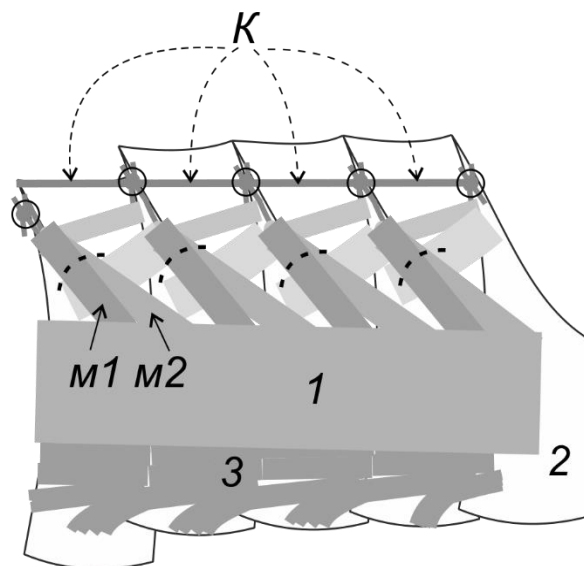
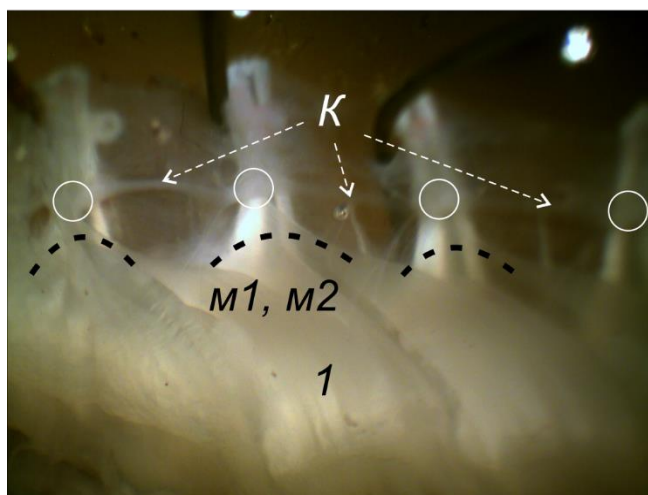


Рисунок 8. Удаление глубоких мышц в ванночке №1 с наклонным дном: ампутация *o.l.abd.* и *p.m.o.* (*m1* и *m2*, соответственно) на вентральной стороне панциря вдоль пунктирной линии. Справа – схема препаровки. *K* – коннектива БНЦ; кружки – ганглии БНЦ. 1 – глубокие мышцы; 2 – панцирь; 3 - *d.o.abd.* и *d.r.abd.*

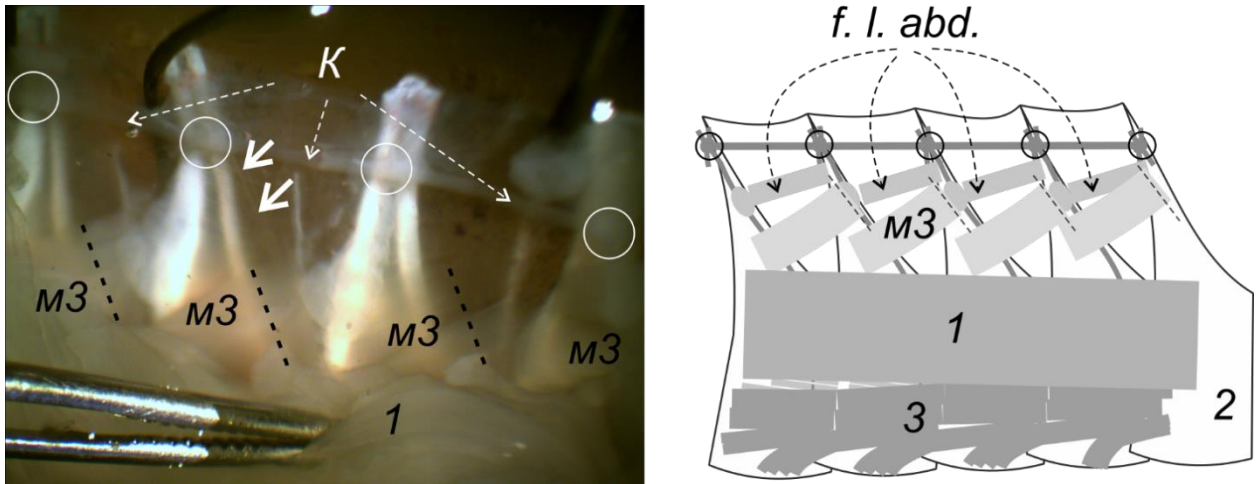


Рисунок 9. Удаление глубоких мышц в ванночке №1 с наклонным дном: ампутация *tr.abd* (*m3*) вдоль пунктирной линии на вентральной стороне панциря. Справа – схема препаровки. *K* – коннектива БНЦ; кружки – ганглии БНЦ. *1* – глубокие мышцы; *2* – панцирь; *3* - *d.o.abd.* и *d.r.abd.* Крупные стрелки – *n. dorsalis*

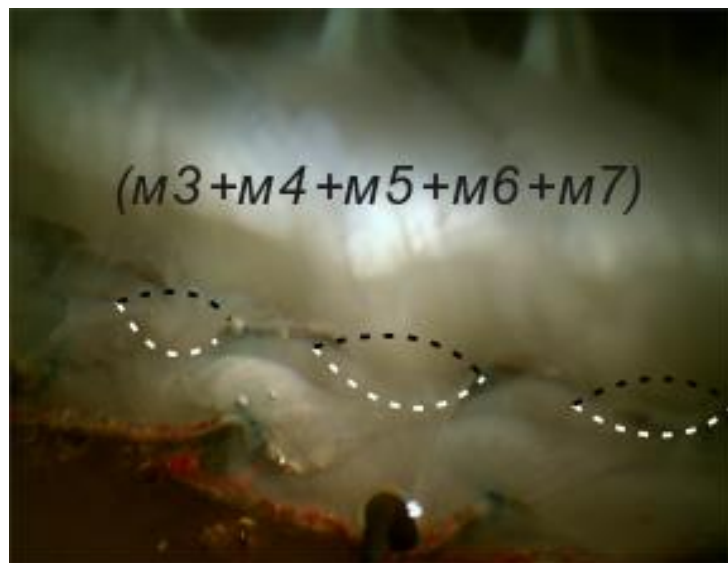


Рисунок 10. Дальнейшее удаление глубоких мышц: обрезание *tr.abd.*, *o.l.abd.*, *o.m.abd.*, *a.o.m.* и *p.m.o.* (обозначенных как *m3*, *m4*, *m5*, *m6* и *m7*, соответственно). Они неразличимы при препарировании и обрезаются все вместе в местах их крепления к вентральному панцирю. Белые пунктирные линии показывают направление перерезки с видимой стороны, черные – со стороны, скрытой пучками мышц.

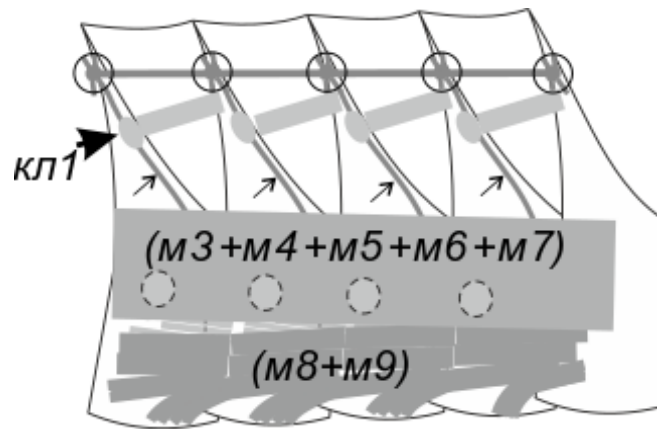


Рисунок 11. Дальнейшее удаление глубоких мышц: Схема обрезания *tr.abd.*, *o.l.abd.*, *o.m.abd.*, *a.o.m.* и *p.m.o.* (обозначенных как *m3*, *m4*, *m5*, *m6* и *m7*, соответственно). Стрелки – *n. dorsalis*. Мышцы *d.o.abd.* и *d.r.abd.* обозначены как *m8* и *m9*, соответственно. *кл1* – культя, остающаяся после обрезания *o.l.abd.*, *p.m.o.* и *tr. abd.* В. Препарат в ванночке №1 после удаления глубоких мышц. БНЦ становится видимым (пунктирный овал), кружки - ганглии.

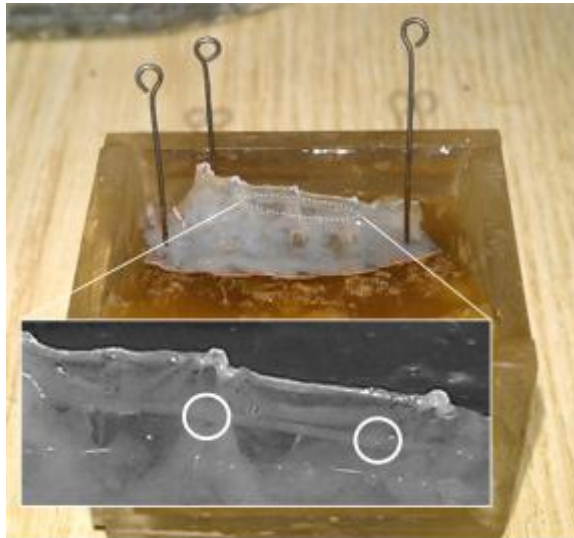


Рисунок 12. Препарат в ванночке №1 после удаления глубоких мышц. БНЦ становится видимым (пунктирный овал), кружки - ганглии.



Рисунок 13: Разгибание панциря и удаление оставшихся глубоких мышц: основания стернитов перерезаются по пунктирным линиям.

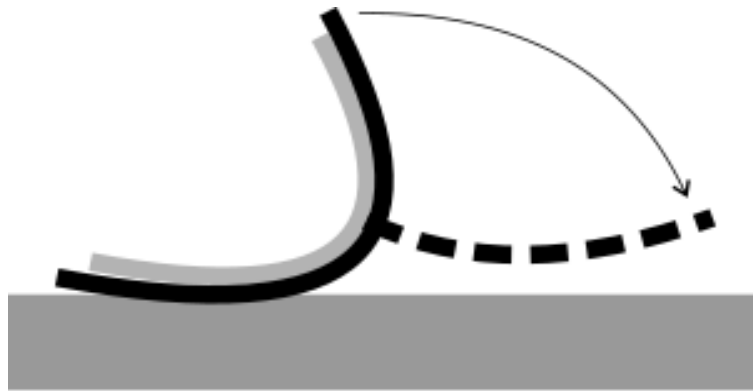


Рисунок 14. Разгибание панциря и удаление оставшихся глубоких мышц: схема разгибания панциря.

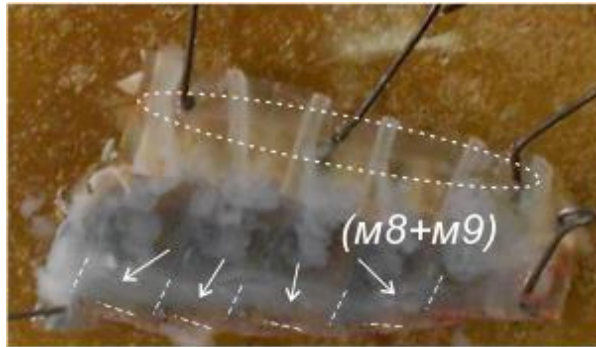


Рисунок 15. Разгибание панциря и удаление оставшихся глубоких мышц: выпрямленный панцирь фиксируется булавками. Пунктирным овалом указана БНЦ. Пунктирные линии указывают места обрезки *d.o.abd.* и *d.r.abd.* (*m8* и *m9*, соответственно).

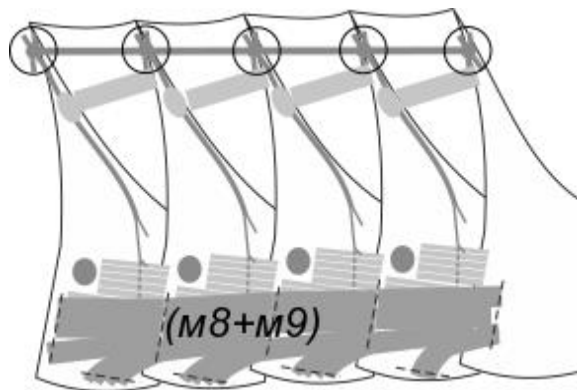


Рисунок 16. Разгибание панциря и удаление оставшихся глубоких мышц: схема обрезания *d.o.abd.* и *d.r.abd.* (*m8* и *m9*, соответственно). Пунктирные линии указывают места обрезки Кружки – ганглии.

После удаления толстых глубоких мышц открывается доступ к тонким дорсальным мышцам *m. d. s. abd.* (*m. dorsales superficialis abdominis* – поверхностная дорсальная мышца брюшка, или *m10* на Рис. 17 и 18), которые натянуты между соседними сегментами панциря. Этот слой мышц состоит из двух частей (нижнего и верхнего на Рис. 18). Верхний сегмент короче и крепится вблизи культи ранее обрезанной глубокой мышцы (*Кл2*). Сенсорные мышцы и нейроны механорецептора лежат непосредственно под *m.d.s.abd* (Рис. 17,18). Чтобы высвободить их, между механорецепторной мышцей и медиальным краем *m. d. s. abd.* вводятся стеклянные иглы, с помощью которых аккуратно разрываются соединительнотканые связки, соединяющие механорецептор и дорсальные мышцы. После этого становится виден треугольник, содержащий тела и проксимальные части аксонов БН и МН (Рис. 18). После этого *m. d. s. abd.* осторожно обрезается до культи *St2*, так, чтобы не повредить низлежащие рецепторные мышцы. Обрезанный пучок мышц отгибается с помощью пинцета в противоположном направлении, обнажая изогнутый пучок аксонов, входящий в *n. dorsalis*. Стеклянными иглами устраняются также тяжи соединительной ткани между *m. d. s. abd.* и аксоном, и отрезается *m.d.s.abd*. Верхний сегмент *m.d.s. abd.* удаляется аналогичным образом, но отгибается при этом в противоположную сторону.

После этого дорсальный нерв высвобождается из-под остатков *t. r. abd.* после осторожного разрушения ее культи *St1*, к которой примыкает *f. l. abd.* (*flexor lateralis abdominis* – латеральная мышца, сгибающая брюшко) (Рис. 19), это дает возможность возможна регистрация импульсной активности МРН на всем протяжении *n. dorsalis* (Рис. 19,20).

Для дальнейших исследований возможны следующие варианты препаратов МРН и комплекса МРН-ганглий (Рис. 21): I – Частичное высвобождение *n. dorsalis* без ампутации дорсальных мышц. II – Удаление дорсальных мышц и высвобождение *n.dorsalis*. III – Высвобождение МРН и аксона (аксотомия). IV – Полная изоляция комплекса МРН-Г от панциря без перерезки аксона. V – Полная изоляция МРН с перерезкой аксона.

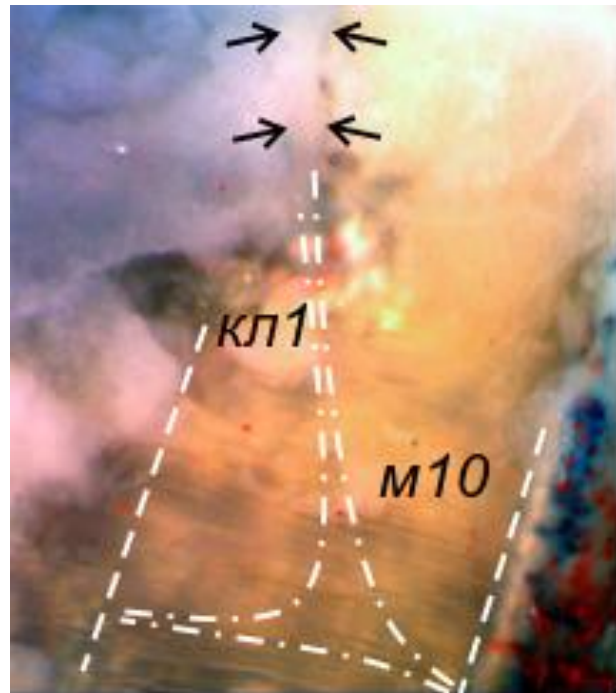


Рисунок 17. Последние этапы изоляции комплекса МРН-ганглий: микрофотография тонких дорсальных мышц (*m. dorsales superficialis abdominis*, *m.d.s.abd.*, или *m10*). *кл1* – культя, остающаяся после обрезания *o.l.abd.*, *p.m.o.* и *tr. abd.* Пунктирные линии указывают место перерезки *m.d.s.abd.* Штрих-пунктирная линия указывает расположение механорецептора под *m.d.s.abd.* Стрелки указывают *n. dorsalis*.

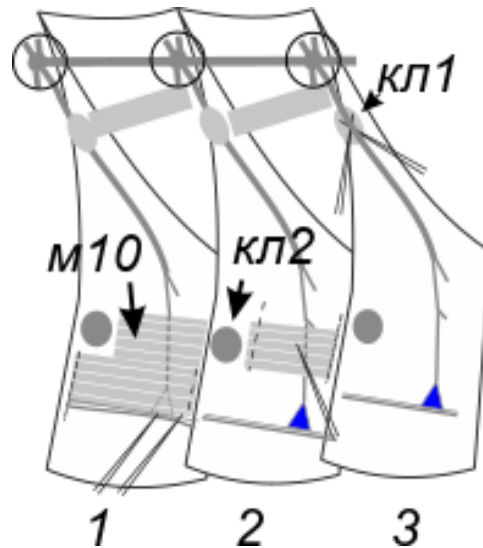


Рисунок 18. Последние этапы изоляции комплекса МРН-ганглий: схема ампутации *m.d.s.abd.* и высвобождения *n. dorsalis*. Пунктирные линии указывают место перерезку *m.d.s.abd.* Тяжи соединительной ткани между механорецепторными мышцами и *m.d.s.abd.* разрушаются стеклянными иглами (1). Нижний сегмент *m.d.s.abd.* разрезается вдоль пунктирной линии и удаляется. Далее соединительнотканые тяжи между механорецепторным аксоном и верхним сегментом *m.d.s.abd.* разрушаются стеклянными иглами и этот сегмент *m.d.s. abd.* разрезается вдоль пунктирной линии и удаляется, от него остается культя *кл2* (2). Культя *кл1* осторожно разрушается стеклянными иглами, и *n.dorsalis* высвобождается (3). Синий треугольник – высвобожденное тело МРН.

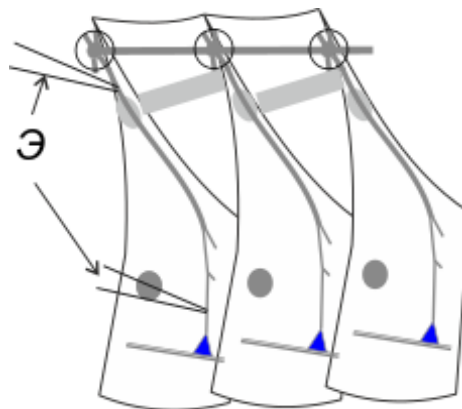


Рисунок 19. Последние этапы изоляции комплекса МРН-ганглий: Схема внеклеточной регистрации нейрональной активности с использованием стеклянных электродов (Э), присосанных к *n.dorsalis* возле ганглия и к аксону МРН вблизи сомы (синий треугольник).

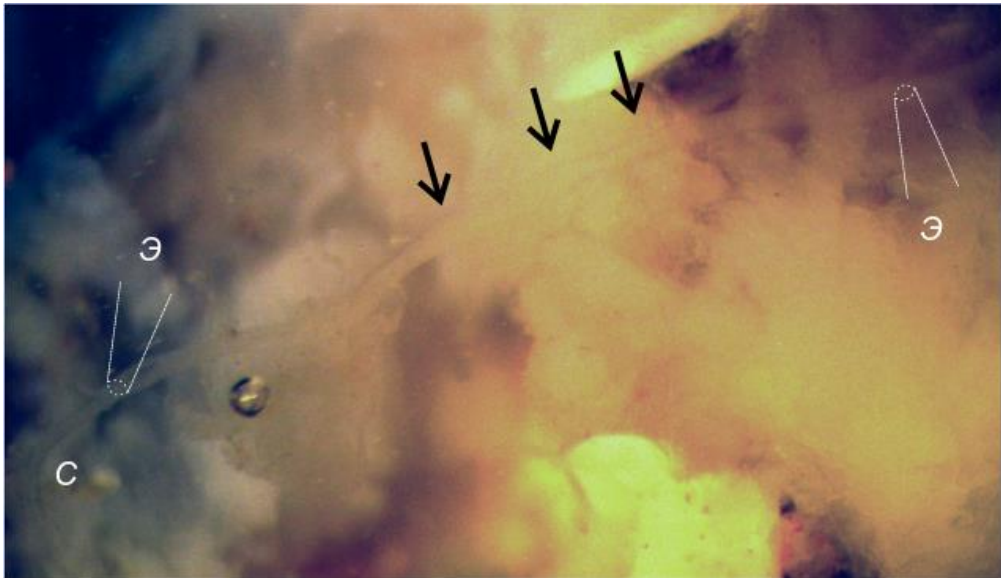


Рисунок 20. Последние этапы изоляции комплекса МРН-ганглий: микрофотография препарата после удаления всех мышц с указанием мест присасывания стеклянных электродов (Э) для внеклеточной регистрации нейрональной активности *n. dorsalis* возле ганглия и к аксону МРН вблизи сомы (С). Стрелки указывают *n. dorsalis*.

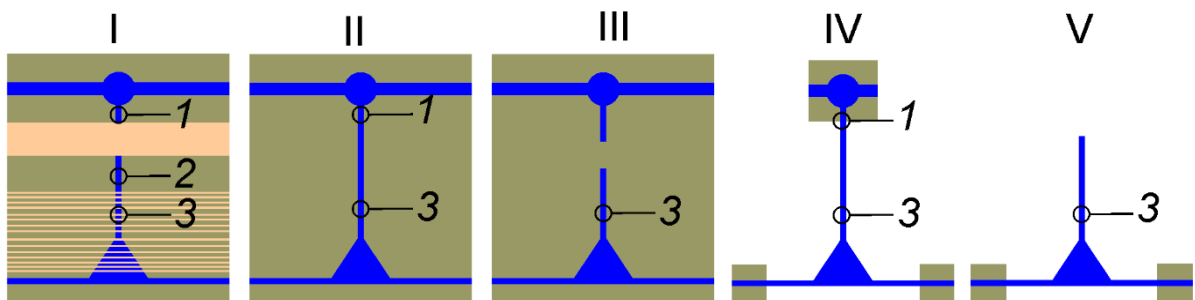


Рисунок 21. Варианты изоляции препарата комплекса МРН. I – Частичное высвобождение *n. dorsalis* без ампутации дорсальных мышц. Здесь нейрональная импульсная активность может регистрироваться возле ганглия (точка 1) и в области между мышечными пучками (точка 2). II – Удаление дорсальных мышц и высвобождение *n. dorsalis*. Нейронную электрическую активность можно регистрировать на всем протяжении аксонов, включая проксимальную точку 3. III – Высвобождение МРН и аксона (аксотомия). Электрическая активность МРН может регистрироваться на всем протяжении аксона до места его перерезки. IV – Полная изоляция комплекса МРН-Г от панциря без перерезки аксона. Остаются только маленькие фрагменты панциря, к которым крепятся рецепторные мышцы. V – Полная изоляция МРН от панциря с перерезкой аксона. Так же, как и в варианте IV, остаются фрагменты панциря, к которым крепятся рецепторные мышцы.

2.2.2. Морфология объекта исследования

Полностью изолированный по нашей методике комплекс «МРН-ганглий» (Рис. 22) содержит пару механорецепторных нейронов ($n1$ и $n2$, крепящихся на своих рецепторных мышцах и посылающих аксоны (a) в соответствующий ганглий брюшной нервной цепочки (Γ) в составе *n. dorsalis (n.d.)*. Аксотомия (АТ) в основных экспериментах производилась на расстоянии около 10 мм от сомы. Импульсная активность регистрировалась на расстоянии 5-7 мм от сомы (точка Т1), а также вблизи ганглия (точка Т2). Уровень некроза и апоптоза сателлитной глиии, находящейся вдали от места повреждения (удаленные глиальные клетки – УГК) оценивался на проксимальном к соме участке аксона длиной 2 мм.

2.3 Методы исследования

2.3.1 Регистрация импульсной активности нейрона

Импульсная активность МРН регистрировалась внеклеточно от аксонов с помощью присасывающихся стеклянных электродов, наполненных физиологическим раствором ван Харревельда. Для регистрации импульсной активности вблизи механорецептора стеклянный электрод (Рис. 23) присасывается к аксону МРН на расстоянии около 5-7 мм от сомы. Импульсы потенциала действия усиливались на биоусилителе, оцифровывались помощью АЦП, визуализировались и записывались на компьютере программой NeuronXP. Опыты проводились при температуре $22 \pm 4^\circ\text{C}$. Статистическая обработка данных о продолжительности импульсной активности производилась с использованием t-критерия Стьюдента и стандартной ошибки среднего.

Для того, чтобы удостовериться в целостности аксона и отсутствии нарушений проведения потенциала действия в изолированном препарате, была проведена одновременная регистрация импульсной активности около сомы и вблизи ганглия (локализация присасывающихся электродов показана на Рис. 19-22). Для одновременной регистрации в двух локациях одного препарата МРН-Г использовался микроманипулятор. Микропипетка через T-образный тройник

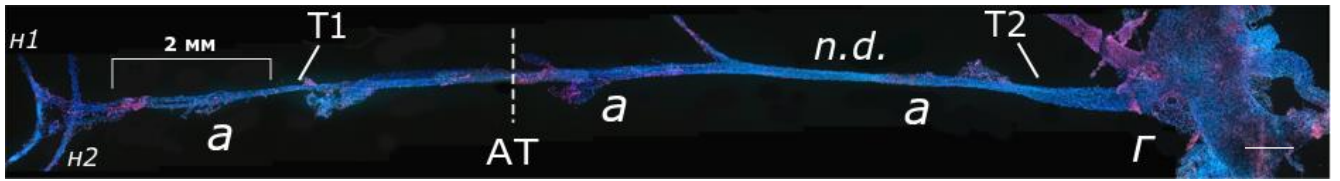


Рисунок 22. Панорамная фотография системы МРН-ганглий. *n1* - быстро адаптирующийся МРН, *n2* – медленно адаптирующийся МРН, *a* – аксон МРН, *Г* – ганглий брюшной нервной цепочки. *n.d.* – фрагмент *n.dorsalis*, включающий аксон МРН. АТ – место перерезки аксона. Т1 – место присасывания стеклянного электрода для регистрации импульсной активности МРН. Указан проксимальный сегмент аксона длиной 2 мм, на котором оценивался уровень смерти УГК. Масштабный отрезок - 500 мкм

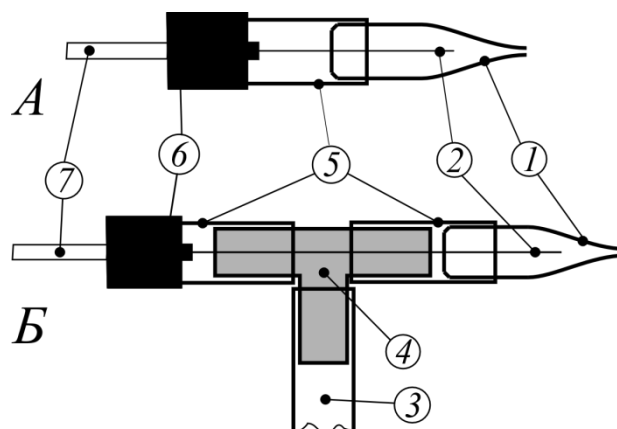


Рисунок 23. Стеклянный электрод для регистрации импульсной активности. А – основной вариант. Б вариант для использования с микроманипулятором. 1 – стеклянный капилляр. 2 – серебряная проволока. 3 – трубка-отвод для контроля давления. 4 – тройник. 5 – эластичная трубка для контроля давления. 6 – основание электрода. 7 – контакт для подсоединения к усилителю.

соединялась с пластиковой трубкой, присоединенной к шприцу, создающему отрицательное давление, позволяя осуществить плотный контакт с нервом через присасывание (Рис. 23).

В спокойном состоянии в обеих локациях регистрировалась регулярная импульсация с одинаковой частотой 2-3 Гц. Быстрое кратковременное растяжение рецепторной мышцы вызывало одинаковые всплески частоты импульсации с последующим постепенным возвращением к исходной частоте (Рис. 24). Это говорит о том, что в обеих локациях регистрировался один и тот же потенциал действия и в препарате не нарушалось проведение нервных импульсов от МРН к ганглию брюшной нервной цепочки.

2.3.2 Флуоресцентное измерение вызванной аксотомией кальциевой динамики в МРН и клетках проксимальной сателлитной глии

После проведения процедуры изоляции физиологически активный рецептор растяжения рака (РРР), поддерживающий регулярную импульсацию, переносился в кювету со стеклянным дном, заполненным 200 мл физ. раствора, и фиксировался в расправленном виде, с аксоном, обернутым вокруг пластикового крючка (Рис. 25). Препарат РРР далее инкубировался 60 минут с Fluo-4 либо Calcium Orange (1 мкМ) и Pluronic (0,005%) и далее 5-кратно промывался в физиологическом растворе. Флуоресцентные снимки были получены с помощью микроскопа Olympus BX51XI, оборудованного фильтрами FITC, TRITC и DAPI, с цифровой камерой ColorViewIII. Для Fluo-4 использовалась длина волны возбуждения $\lambda \sim 490$ нм, а флуоресценция регистрировалась на длине волны эмиссии $\lambda \sim 520$ нм, для Calcium Orange, соответственно $\lambda \sim 549$ нм и $\lambda \sim 576$ нм. После первого снимка ($t=0$ мин), аксон МРН перерезался и далее флуоресцентные снимки делались через $t = 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30$ и 40 минут после аксотомии. В контрольных препаратах аксон не перерезался. Флуоресценция зонда в глие измерялась на фото вдоль линий 70-150 мкм вдоль глиальной оболочки, окружающей проксимальный сегмент аксона (Рис. 26Б).

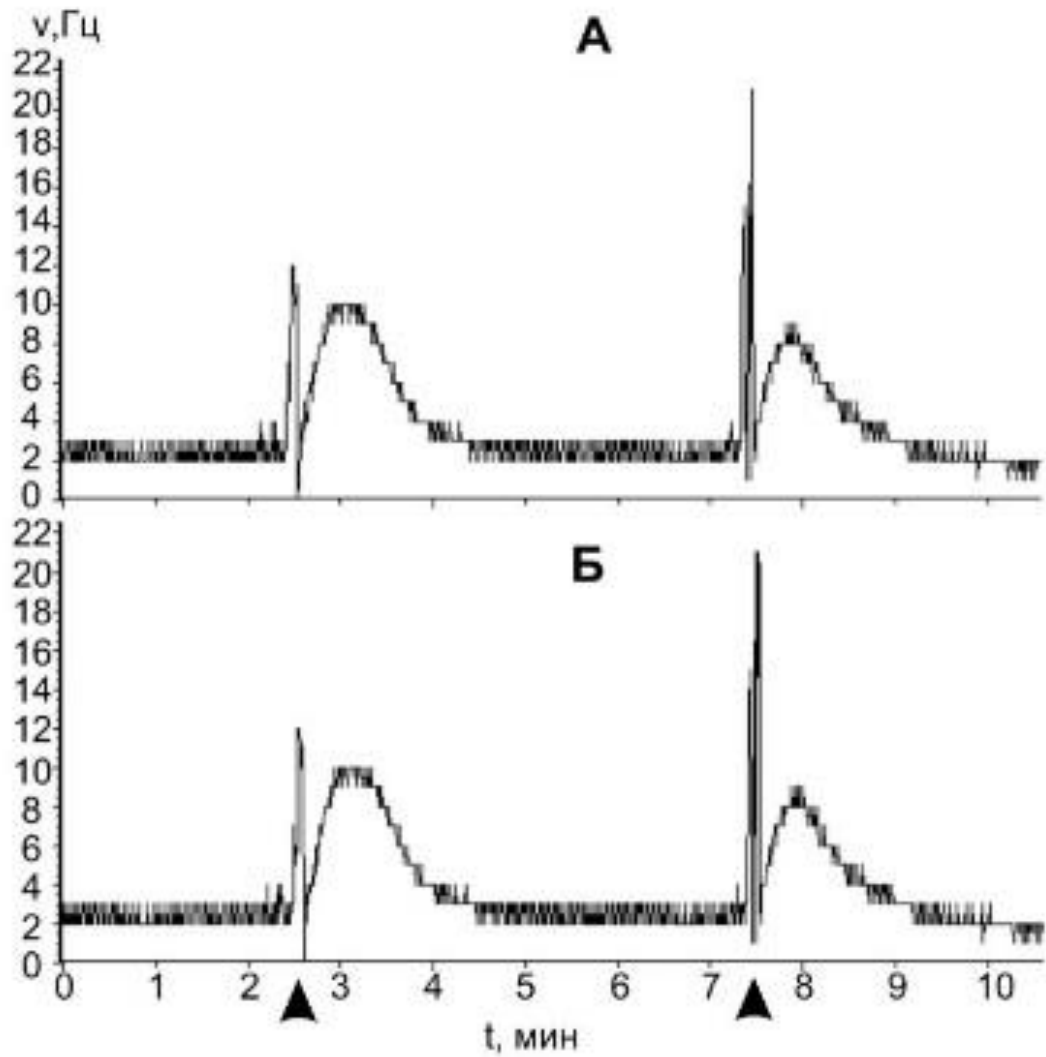


Рисунок 24. Одинаковое изменение частоты импульсации при растяжении механорецепторной мышцы: (А) частотограмма импульсной активности вблизи сомы МРН; (Б) частотограмма импульсной активности вблизи ганглия брюшной нервной цепочки. Стрелки указывают моменты растяжения механорецепторной мышцы.

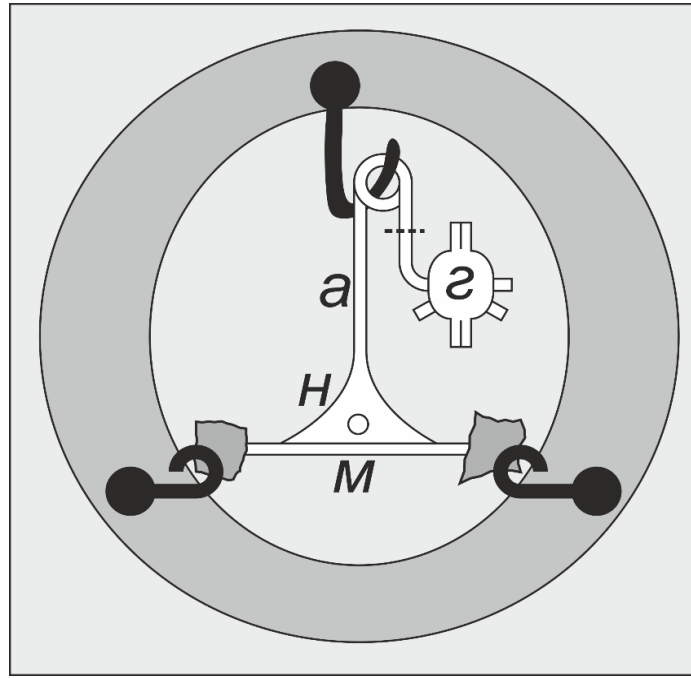


Рисунок 25. Ванночка для флуоресцентной микроскопии рецептора растяжения рака *in vitro*. а – аксон; г – ганглий брюшной нервной цепочки; м – механорецепторная мышца; н – механорецепторный нейрон; пунктирная линия – место перерезки аксона.

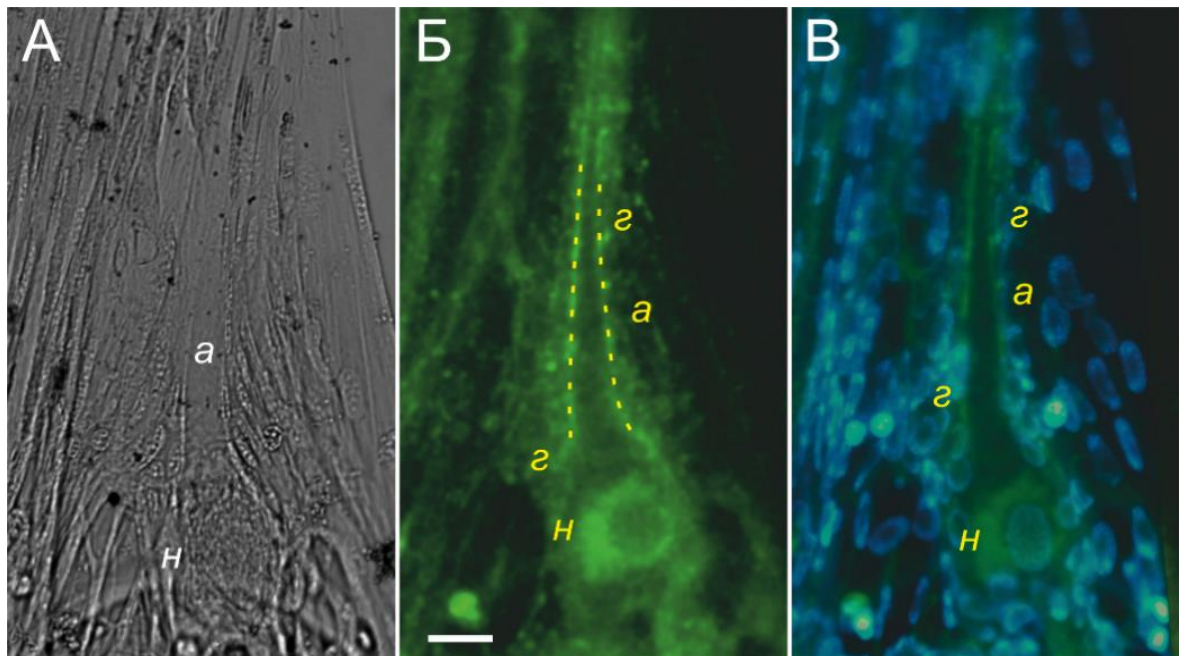


Рисунок 26. Визуализация уровня Ca^{2+} в РРР с помощью кальциевого зонда. А – фото в проходящем свете. Б – флуоресценция зонда. В – флуоресценция зонда с наложением флуоресценции Hoechst 33342 (визуализация клеточных ядер). н – нейрон, а – аксон, г – глия. Пунктир - линия измерения интенсивности в глии. Масштабный отрезок – 20 мкм.

Такая локализация глии подтверждается наложением флуоресценции Hoechst 33342 того же препарата (Рис. 25В). Измерения проводились с помощью программы ImageJ с плагином Time Series Analyzer. Относительная интенсивность флуоресценции вычислялась следующим образом. Интенсивность флуоресценции в цитозоле нейрона и глии (I_g) после вычитания из нее фоновой флуоресценции (I_b) показывала средний уровень содержания Ca^{2+} в соответствующих локациях препарата. Значения интенсивности флуоресценции в различные моменты времени после аксотомии Fluo-4 $I_{AT}(n, t)$ нормализовывались на начальное значение ($t=0$):

$$I_{AT}(n, t) = \frac{I_g(n, t) - I_b(n, t)}{I_g(n, 0) - I_b(n, 0)} * 100\%,$$

где n – номер экспериментального препарата. Аналогичные измерения проводились для контрольных препаратов $I_c(n, t)$. Эти величины усреднялись по n опытов для каждого момента времени, и отношение средних изменений интенсивности флуоресценции аксотомированных препаратов к контрольным были определены как соотношения их средних значений для каждого момента времени:

$$I_{norm}(t) = \frac{\bar{I}_{AT}(n, t)}{\bar{I}_c(n, t)} * 100\%$$

В статистической обработке использовались Repeated Measures ANOVA и t -критерий Стьюдента. Соотношения средних значений, полученные по указанной формуле, использовались для построения графиков Ca^{2+} динамики (см. раздел «Результаты»).

2.3.3 Флуоресцентная визуализация и оценка уровня смерти глиальных клеток

После выделения комплексы МРН-Г инкубировались в физиологическом растворе в течение 2, 4, 8, 12 и 15 часов от момента перерезки аксонов до момента фиксации. Смерти клеток выявлялась с помощью двойного флуорохромирования 20 мкМ йодида пропидия и 20 мкМ Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich-Rus, Россия).

После 5-кратной отмывки физ. раствором образцы постфиксировались 0,25% глутаральдегидом. Затем МРН заключались в глицерин. Йодид пропидия, флуорохром, не проникающий через неповрежденные мембраны, придавал красную флуоресценцию ядрам некротических клеток с поврежденной плазматической мембраной. Флуорохром Hoechst 33342 придавал голубую флуоресценцию ядерному хроматину всех клеток (Рис. 27). Флуоресцентные изображения были получены с помощью флуоресцентного микроскопа Axiolab.A1 (Carl Zeiss, Германия). Уровень некроза и апоптоза глиальных клеток подсчитывался на прилегающем к коме сегменту аксона длиной 2 мм.

Уровень некроза глии оценивался на полученных с помощью камеры изображениях как отношение количества некротических ядер глии к общему числу ядер и выражался в процентах. Апоптоз определялся по характерной фрагментации ядер (Рис. 27, внизу). Количество апоптотических ядер подсчитывалось непосредственно во время микроскопии, трактовалось как показатель уровня апоптоза и выражалось в условных единицах. Статистическая обработка производилась с использованием t-критерия Стьюдента и стандартной ошибки среднего. В случае, если нормальность выборок не отвечала условиям применимости t-критерия, использовался метод Манна-Уитни.

2.3.4 Ингибиторный анализ

Для изучения роли ионов кальция в выживании нейронов и глиальных клеток при аксотомии, интактные и аксотомированные препараты инкубировались с модуляторами кальций-зависимого сигнального пути в течение 8 часов, после чего оценивался уровень некроза и апоптоза проксимальной сателлитной глии и сравнивался с контролем (без добавления модуляторов). Использовались трехкратно увеличенная и трехкратно уменьшенная $[Ca^{2+}]_o$, кальциевый ионофор иономицин (500 нМ), блокатор кальциевых каналов клеточной мембраны Cd^{2+} (100 мкМ), ингибитор высокопроницаемой митохондриальной поры РТР циклоспорин А (5 мкМ), ингибиторы рианодиновых рецепторов рианодин (10 мкМ) и дантролен (20 мкМ), ингибитор

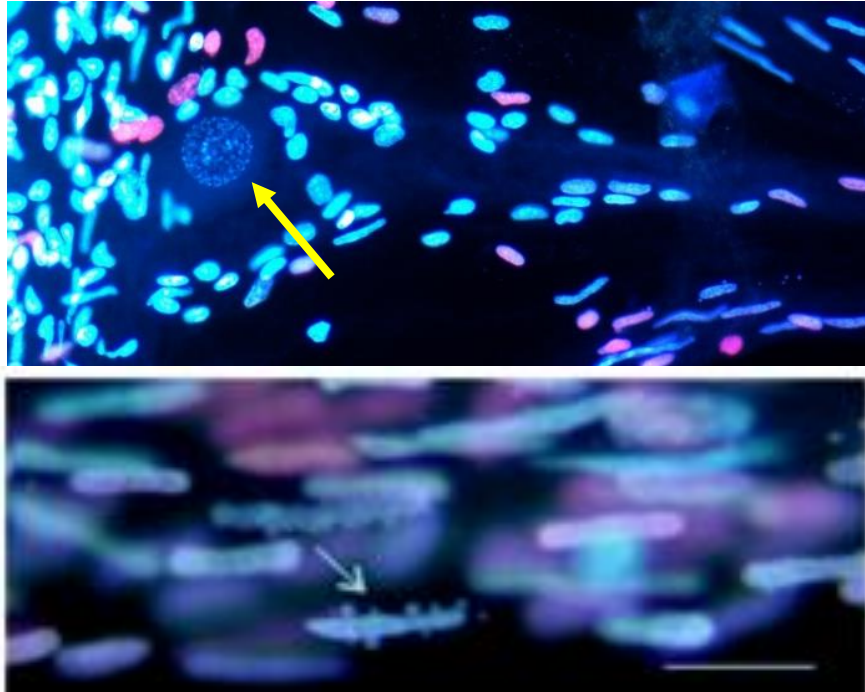


Рисунок 27. Флуоресцентная визуализация клеточных ядер и смерти клеток. Голубой цвет - Hoechst 33342 (ядерный хроматин всех клеток). Розовый - Hoechst 33342 + йодид пропидия (ядра некротических клеток). Вверху – область сомы и проксимального участка аксона МРН, стрелка указывает ядро МРН. Масштабный отрезок – 200 мкм. Внизу – фрагмент глиальной оболочки аксона МРН. Стрелка указывает на фрагментированное ядро апоптотической глиальной клетки. Масштабный отрезок – 50 мкм.

SERCA тапсигаргин (5 мкМ), ингибитор кальций-зависимых калиевых каналов мауротоксин (10 нМ), ингибитор кальмодулина флуфеназин (2 мкМ), ингибитор Ca^{2+} -кальмодулинкиназы II KN-93 (2 мкМ) и ингибитор протеинкиназы C стауроспорин (1 нМ). В выборе рабочих концентраций модуляторов руководствовались данными производителей, сведениями из литературы, опытом ранее проведенных экспериментов на аксотомированных препаратах РРР, а также при необходимости подбирали оптимальные концентрации по электрофизиологической реакции МРН на добавление вещества.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 3. ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ НЕЙРОНА НА АКСОТОМИЮ

Регулярная импульсация медленно адаптирующегося (тонического) механорецепторного нейрона рака является удобным показателем его функционального состояния и жизнеспособности. Мы изучили влияние аксотомии на характер и продолжительность импульсной активности медленно адаптирующегося механорецепторного нейрона рака.

3.1 Влияние аксотомии на импульсную активность нейрона

Для выявления влияния аксотомии на регулярность, амплитуду и частоту импульсации механорецепторного нейрона рака, стеклянный электрод присасывался на минимально возможное без повреждения нейрона расстояние 2-3 мм от сомы. Электрофизиологическая реакция нейрона на аксотомию регистрировалась как на максимальном расстоянии от сомы (вблизи ганглия), так и на минимальном расстоянии от электрода (около 2 мм). Перерезка аксона практически никогда не приводила к изменению частоты и амплитуды импульсации нейрона, хотя, в редких случаях, когда импульсация нейронов была изначально нерегулярной, перерезка аксона приводила к восстановлению характерного регулярного паттерна импульсов, что могло быть связано с перерезкой эфферентных (тормозных или возбуждающих) аксонов, идущих от ганглия. Таким образом, аксотомия не влияет на характер электрической активности МРН. Типичная осциллограмма импульсной активности МРН после перерезки аксона представлена на Рис. 28.

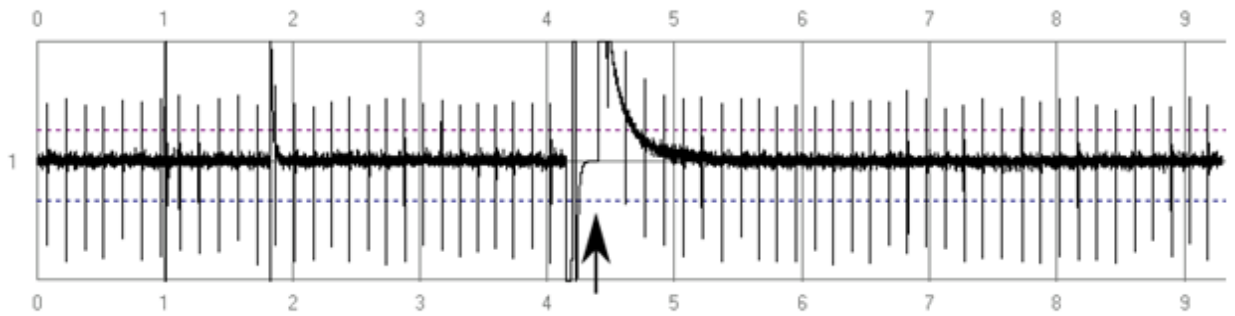


Рисунок 28. Частота и амплитуда импульсации механорецепторного нейрона рака сохраняются при аксотомии. Стрелка указывает момент перерезки.

3.2 Влияние аксотомии на продолжительность импульсации нейрона

Для выявления влияния аксотомии на продолжительность регулярной импульсной активности медленно адаптирующегося механорецепторного нейрона рака производилась ее регистрация у интактных и аксотомированных нейронов. В этом случае стеклянный электрод присасывался на расстоянии около 5-7 мм от сомы. В аксотомированных препаратах аксон перерезался непосредственно перед началом регистрации или сразу после него.

Ввиду того, что инкубация производилась в течение 8 часов, и после нее производилась фиксация препарата рецептора растяжения рака, регистрация импульсной активности производилась только в течение 480 минут, и это значение продолжительности импульсации записывалось для всех нейронов, сохранявших активность после 8 часов инкубации. Это принималось во внимание при статистической обработке и оценке результатов электрофизиологических измерений.

В каждой отдельной серии экспериментов не было выявлено достоверных отличий продолжительности сохранения импульсной активности между интактными и аксотомированными нейронами, хотя отмечалась тенденция в сторону меньших значений у аксотомированных нейронов. Если объединить значения продолжительности импульсной активности контрольных МРН, зарегистрированных в различных сериях экспериментов в две выборки –

интактных (49 опытов, из них в 12 тонические МРН работали более 8 ч) и аксотомированных (48 опытов, в 8 из них импульсация тонических МРН сохранялась более 8 ч), то их сравнение по непараметрическому критерию Манна-Уитни показывает, что аксотомия достоверно ($p = 0,011$) снижала среднюю продолжительность импульсной активности (которую мы называли «время жизни») механорецепторного нейрона с 340 до 280 минут (Таблица 2). Следовательно, аксотомия ускоряет прекращение импульсной активности нейронов.

Таблица 2. Влияние аксотомии на продолжительность импульсации механорецепторного нейрона рака и смерть сателлитной глии при 8-часовой инкубации в растворе ван Харревельда. В скобках указано количество опытов (препаратов). * $p < 0,05$; *** $p < 0,005$.

Показатель	Интakтные препараты (Int)	Аксотомированные препараты (AT)
Продолжительность импульсации МРН, мин	340±20 (n=49)	280±20 (n=48) *
Апоптоз глии, отн. ед.	0.2±0.1 (n=43)	0.4±0.1 (n=54)
Некроз глии, %	10±1 (n=43)	15±1 (n=54) ***

ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ АКСОТОМИИ НА СМЕРТЬ ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК, УДАЛЕННЫХ ОТ МЕСТА ПЕРЕРЕЗКИ АКСОНА

В ходе ранее проведенных в нашей лаборатории экспериментальных исследований на изолированном аксотомированном рецепторе растяжения рака было установлено, что время, достаточное для развития апоптоза глиальных клеток в условиях инкубации в растворе ван Харревельда при комнатной температуре составляет порядка 8 часов. Мы также сравнили динамику развития клеточной смерти в интактных препаратах, связанных с ганглием брюшной нервной цепочки рака, и аксотомированных препаратах для понимания вклада аксотомии в динамику развития некроза и апоптоза глиальных клеток, удаленных от места перерезки аксона.

4.1 Динамика некроза и апоптоза удаленных глиальных клеток в интактных и аксотомированных препаратах РРР при инкубации

Для выяснения особенностей динамики развития клеточной смерти сателлитной глии, интактные и аксотомированные препараты рецептора растяжения рака, после проверки на наличие импульсной активности у механорецепторного нейрона, инкубировались в физиологическом растворе ван Харревельда 4, 8, 12 или 15 часов после аксотомии. Для каждого типа препарата и времени инкубации было проведено 5-8 опытов. В интактных препаратах апоптоз достигал максимума за 8 часов и далее не развивался, а в аксотомированных препаратах продолжал усиливаться, пятикратно превышая контрольный уровень через 15 часов (Рис. 29). Ограниченное развитие апоптоза глии в интактных препаратах, видимо, связано с тем, что первичные проапоптотические факторы, такие как ионы Ca^{2+} , плохо проникают в клетки с ненарушенной мембраной. Таким образом, 8 часов оказались достаточным временем для развития апоптоза в обоих типах препаратов. Уровень некроза глии становился значимым после инкубации в физиологическом растворе в течение 12 часов. В аксотомированных препаратах он был достоверно выше, чем в интактных (Рис. 30). Это

свидетельствует о том, что аксотомия стимулирует оба типа смерти удаленных глиальных клеток, но не является необходимым условием ни для некроза, ни для апоптоза этих клеток.

4.2 Влияние аксотомии на смерть удаленных глиальных клеток в условиях постоянства внешней среды

Чтобы узнать, как аксотомия влияет на развитие некроза и апоптоза удаленных глиальных клеток в условиях постоянства внешней среды, интактные и аксотомированные препараты медленно перфузировали раствором ван Харревельда с помощью медицинской капельницы. Для каждого типа препарата и каждой продолжительности перфузии использовалось от 6 до 10 препаратов. Ни 8, ни 12, ни 16 часов спустя апоптоз в этих условиях не наблюдался, а уровень некроза глии в изолированных интактных и аксотомированных препаратах повышался незначительно. По-видимому, перфузия устраняла первичные проапоптотические факторы из среды, не позволяя им накапливаться вблизи глиальной оболочки РРР.

Таким образом, 8-часовая длительность инкубации в физиологическом растворе ван Харревельда была оптимальна для изучения индуцированной аксотомией гибели удаленных глиальных клеток (некроза и апоптоза) и роли в ней кальций-зависимого сигнального пути. Хотя в отдельных сериях экспериментов не было выявлено достоверных отличий уровня некроза и апоптоза между интактными и аксотомированными нейронами, наблюдалась тенденция в сторону больших значений у аксотомированных. Сравнение объединенных по различным сериям экспериментов выборок контрольных аксотомированных (всего 43 опыта) и интактных (всего 54 опыта) препаратов, инкубированных 8 часов, показало, что аксотомия повышает некроз сателлитной глии, окружающей как сому, так и аксон нейрона, с 10 до 15% ($p < 0,005$). Влияние аксотомии в отсутствие модуляторов на апоптоз глиальных клеток в контрольных препаратах было незначительным (Таблица 2). Гибель нейронов в этих экспериментах не наблюдалась.

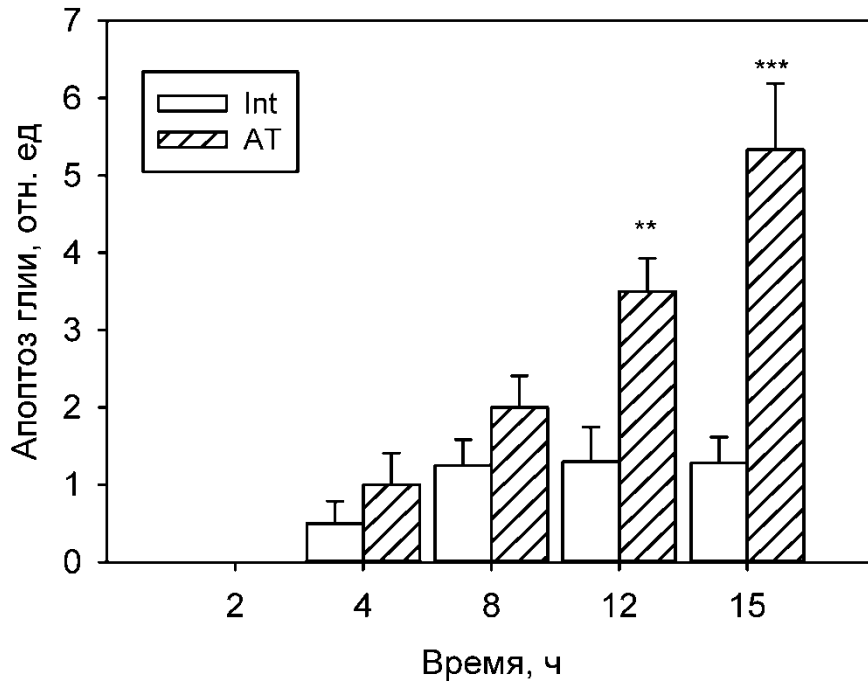


Рисунок 29. Динамика апоптоза сателлитной глии в интактных (Int) и аксотомированных (АТ) рецепторах растяжения рака в условиях инкубации в физиологическом растворе после перерезки аксона МРН. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

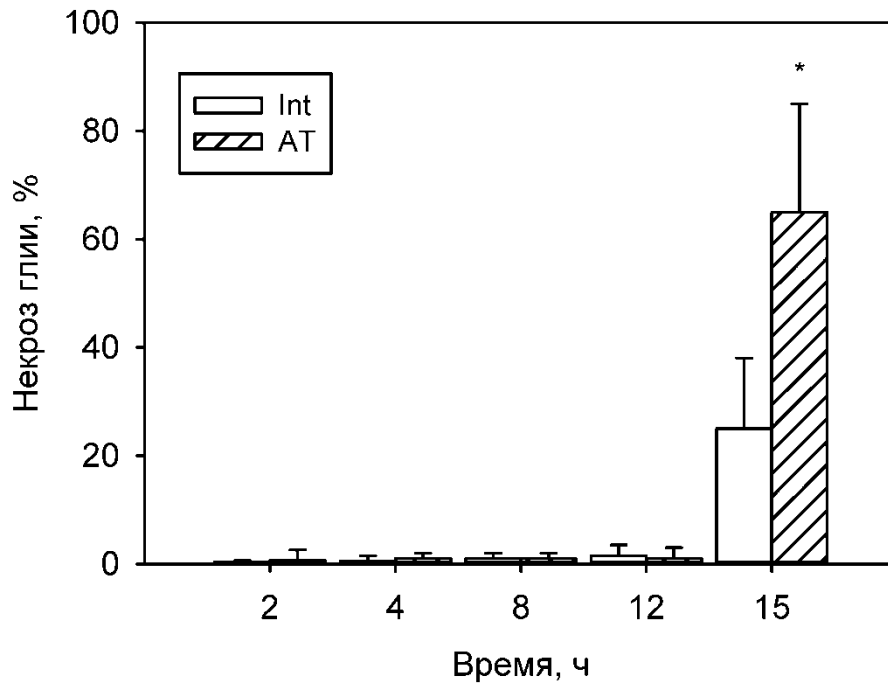


Рисунок 30. Динамика некроза сателлитной глии в интактных (Int) и аксотомированных (АТ) рецепторах растяжения рака в условиях инкубации в физиологическом растворе после перерезки аксона МРН. * $p < 0,05$.

ГЛАВА 5. ДИНАМИКА УРОВНЯ Ca^{2+} В НЕЙРОНЕ И УДАЛЕННОЙ ГЛИЕ ПОСЛЕ АКСОТОМИИ

Для изучения влияния аксотомии на уровень Ca^{2+} в нейроне и глии рецептора растяжения рака были проведены серии экспериментов с флуоресцентными кальциевыми зондами Fluo-4 и Calcium Orange. В обеих сериях было проведено по шесть опытов *in vitro* с интактными и аксотомированными препаратами РРР, сохраняющими импульсную активность.

Fluo-4, в отличие от Calcium Orange, слабо проникал в эндоплазматический ретикулум перикариона МРН, но хорошо окрашивал клетки глиальной оболочки. Calcium Orange, предположительно, преимущественно флуорохромировал ионы кальция в митохондриях аксонов МРН, расположенных вдоль аксолеммы, и слабее задерживался в глиальной оболочке (Рис. 30).

Интенсивность флуоресценции Fluo-4 в глии, окружающей проксимальный сегмент аксона, была заметно выше, чем в аксоплазме нейрона. Хотя глия окружает аксон со всех сторон [57], глиальная оболочка хорошо отличима от аксоплазмы благодаря тому, что РРР имеет уплощенное строение, и глия вместе со своими ядрами оптически проецируется на изучаемую плоскость микроскопии с намного большей плотностью в области видимого контура МРН (Рис. 31). Отношение интенсивности флуоресценции Fluo-4 в глии к интенсивности флуоресценции в аксоплазме МРН, после вычитания фона составляет порядка 2-х и более. Это позволяет оценить динамику изменения светимости зонда отдельно в проксимальном сегменте аксона (более темная область между двумя линиями флуоресценции глии) и в глиальной оболочке.

Флуоресцентная микроскопия с Calcium Orange показала, что в области перикариона нейрона, содержащего кальциевые депо (эндоплазматический ретикулум и митохондрии), уровень Ca^{2+} был намного выше, чем в ядре и аксоплазме. Это позволяет оценить динамику изменения уровня Ca^{2+} отдельно в перикарионе и проксимальном сегменте аксона.

После статистической обработки полученных данных флуориметрии с Fluo-4 было выявлено, что аксотомия повышала уровень Ca^{2+} в проксимальном сегменте аксона механорецепторного нейрона на 20% уже на третьей минуте и далее повышение доходило до 70% за 40 мин после аксотомии (Рис. 32). В области аксонного холмика индуцированное аксотомией повышение уровня Ca^{2+} становилось значимым только спустя 15 мин, превышало 20% спустя 20 мин, и достигало только 40% через 40 минут (Рис. 33). Это запаздывание свидетельствует о распространении кальциевого фронта от места перерезки в направлении сомы. Особенно интересно, что повышение уровня цитозольного Ca^{2+} в глии, удаленной от места повреждения аксона, становится заметным и достоверным уже на первой минуте и в течение 40 минут эксперимента превышает 100% (Рис. 34). Это может говорить о том, что индуцированное аксотомией повышение уровня внутриклеточного Ca^{2+} в глии происходит по иному механизму, более быстрому и эффективному. Таким образом, аксотомия вызывает повышение уровня Ca^{2+} в нейроне и глии не только вблизи места разреза аксона, но и на расстоянии от него, причем в аксоне и в глиальной оболочке оно, вероятно происходит разными путями.

В опытах с Calcium Orange аксотомия повышала уровень Ca^{2+} в проксимальном сегменте аксона уже на первой минуте, и в течение 40 минут различие с контролем доходило до 30%. В области перикариона различие с контролем становилось достоверным только на пятой минуте и составляло около 40% (Рис. 33). Это запаздывание также свидетельствует о ретроградном распространении ионов кальция от места перерезки. Ввиду того, что Calcium Orange слабо задерживался в глиальной оболочке, сопоставление кальциевой динамики в глии и нейроне не проводилось.

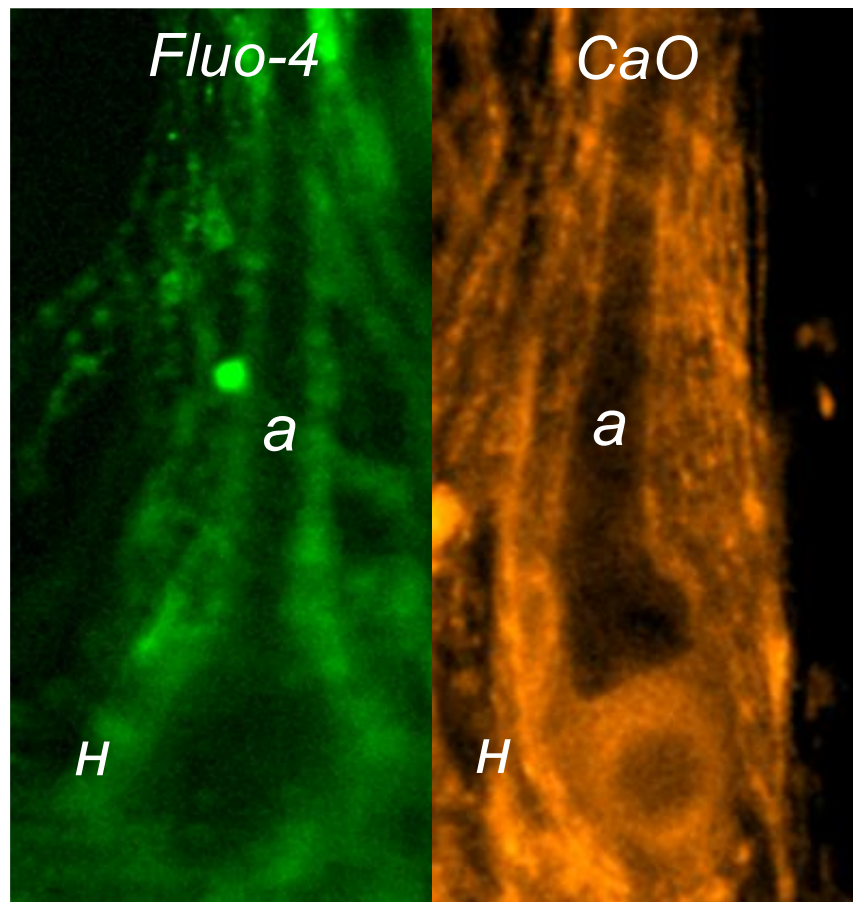


Рисунок 31. Флуоресценция кальциевых зондов Fluo-4 (слева) и Calcium Orange (справа) в *in vitro* препаратах механорецептора речного рака. *H* – сома нейрона, *a* – аксон.

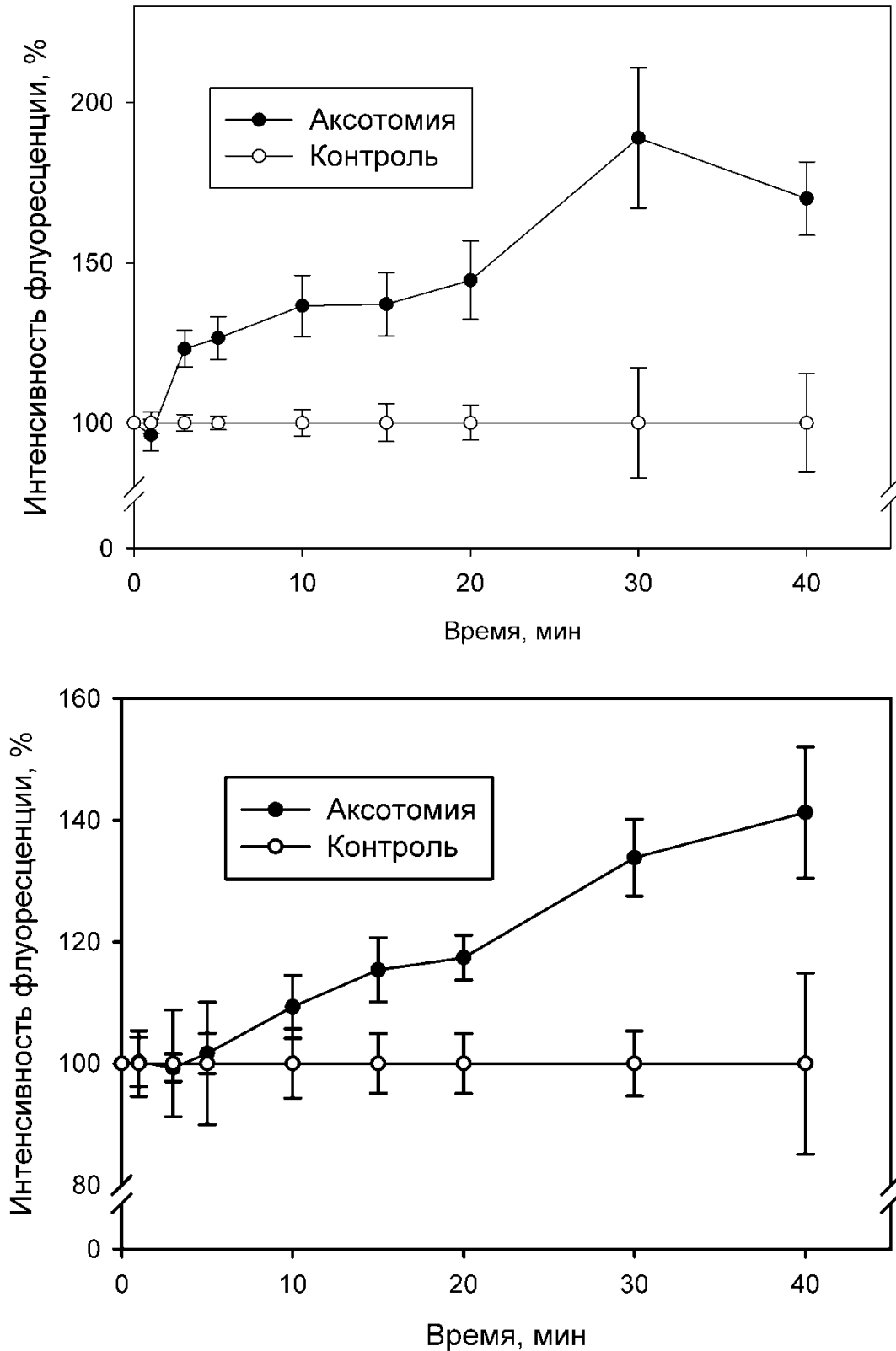


Рисунок 32. Динамика уровня кальция в аксоне МРН после аксотомии, наблюдаемая с применением зонда Fluo-4. Вверху – в проксимальном сегменте аксона. Внизу – в области аксонного холмика.

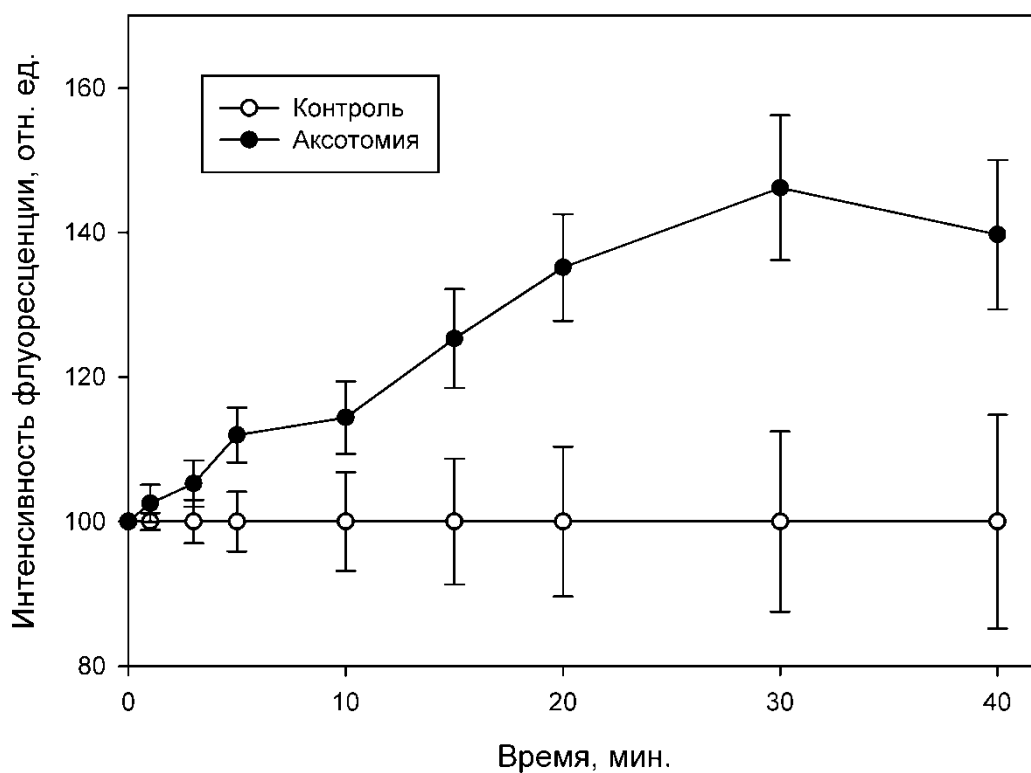
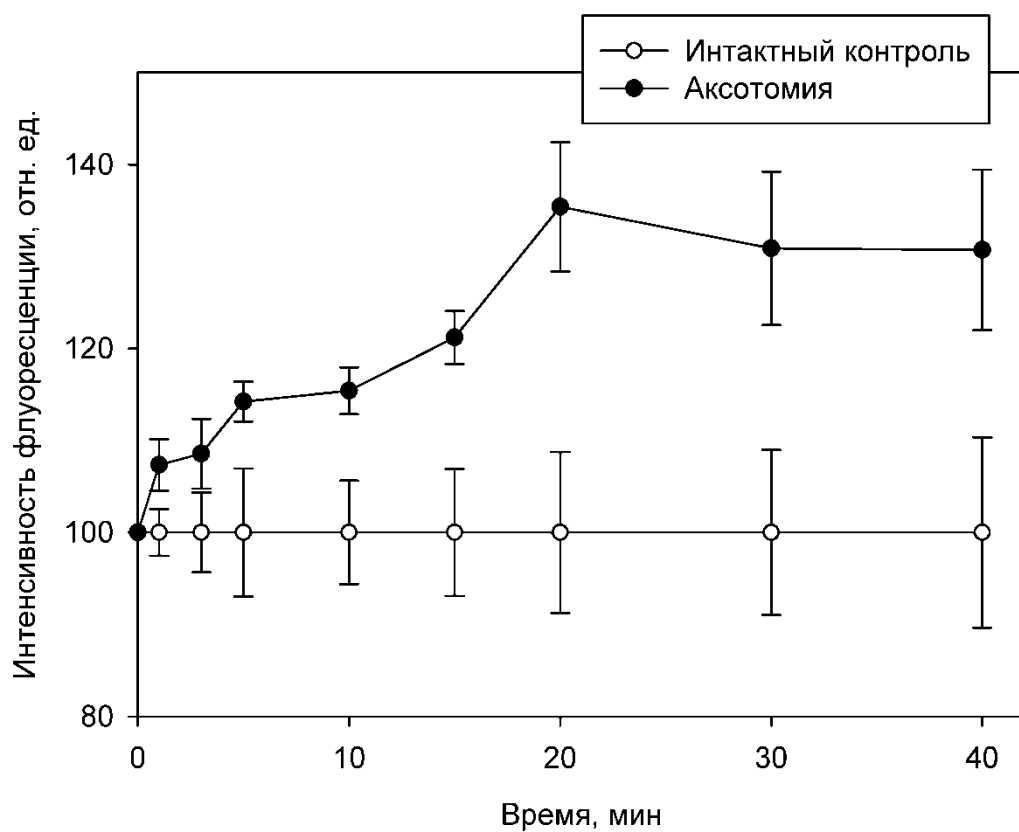


Рисунок 33. Динамика уровня кальция в МРН после аксотомии, наблюдаемая с применением зонда Calcium Orange. Вверху – в проксимальном сегменте аксона. Внизу – в перикарионе.

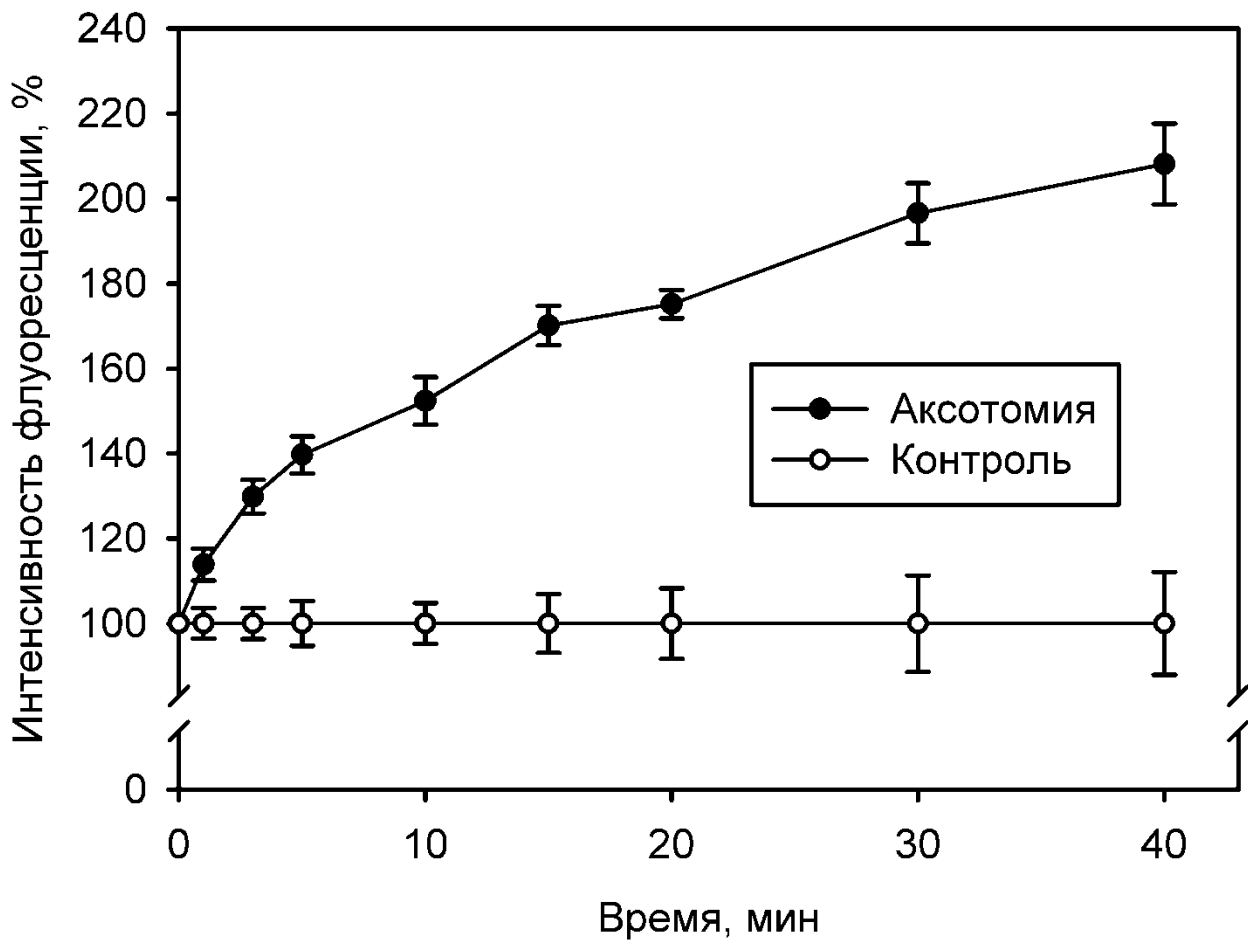


Рисунок 34. Динамика уровня кальция в глиальной оболочке МРН после аксотомии, наблюдаемая с применением зонда Fluo-4.

ГЛАВА 6. РОЛЬ Ca^{2+} В ПРЕКРАЩЕНИИ ИМПУЛЬСАЦИИ НЕЙРОНА ПОСЛЕ АКСОТОМИИ

Для выяснения молекулярных механизмов прекращения импульсной активности механорецепторного нейрона после аксотомии мы изучили роль ионов Ca^{2+} в этом процессе. С этой целью мы применили модуляторы основных механизмов, регулирующих Ca^{2+} гомеостаз в клетках, включая блокирование ионных каналов, через которые Ca^{2+} проникает в цитозоль, и ингибирование насосов, выкачивающих Ca^{2+} из цитозоля. Также мы изучили воздействие ингибиторов Ca^{2+} -зависимых калиевых каналов и некоторых важных сигнальных Ca^{2+} -активируемых белков.

6.1 Роль различных путей изменения цитозольной концентрации Ca^{2+} в индуцированном аксотомией прекращении импульсной активности нейрона

6.1.1 Исследование влияния кальциевого ионофора иономицина на продолжительность импульсной активности нейрона после аксотомии

Для выяснения роли повышения уровня ионов Ca^{2+} в цитозоле в спонтанном прекращении импульсной активности МРН после аксотомии, интактные и аксотомированные препараты инкубировались в присутствии кальциевого ионофора иономицина (500 нМ, 9 интактных и 9 аксотомированных препаратов). Иономицин сокращал среднюю продолжительность импульсации интактных и аксотомированных нейронов на 65 и 78%, соответственно ($p < 0,05$; Рис. 35, Таблица 3). Продолжительность импульсации МРН в присутствии иономицина не превышала 190 минут в интактных и 120 минут в аксотомированных препаратах.

Таким образом, вход Ca^{2+} в цитозоль, индуцированный иономицином, ускоряет прекращение импульсной активности как интактных, так и аксотомированных нейронов. Нарушение кальциевого гомеостаза усиливает повреждающее воздействие аксотомии.

6.1.2 Роль потенциалзависимых Ca^{2+} каналов плазмалеммы в прекращении импульсной активности нейрона после аксотомии

Ионы кальция способны входить в цитозоль из внеклеточной среды в основном через потенциалзависимые Ca^{2+} каналы плазматической мембраны. Для оценки их роли в индуцируемом аксотомией прекращении импульсной активности механорецепторного нейрона мы блокировали Ca^{2+} каналы ионами Cd^{2+} , вводимыми в физиологический раствор в виде хлорида кадмия (100 мкМ CdCl_2).

Дополнительный осмотический эффект, создаваемый ввиду ионного характера растворенного хлорида кадмия, несущественен, т.к. его концентрация ниже концентрации любой из солей в составе раствора ван Харревельда на порядок и более.

Cd^{2+} оказывал защитный эффект как на интактные, так и на аксотомированные рецептора растяжения рака, продлевая их импульсную активность на 35% ($p < 0,05$) и 32% ($p < 0,01$), соответственно (Рис. 35, Таблица 3). При этом следует отметить, что в большинстве интактных препаратов (6 из 7) в присутствии Cd^{2+} импульсная активность сохранялась более 8 часов, а значит +35% — это только нижний предел защитного действия блокировки кальциевых каналов плазмалеммы. Поэтому мы предполагаем, что защитное действие кадмия на МРН ослабляется аксотомией в более значительной степени, а вход ионов кальция через потенциалзависимые кальциевые каналы плазмалеммы является существенным элементом ускорения прекращения импульсной активности вследствие повреждения.

Эффект продления импульсной активности при блокировании кадмием кальциевых каналов плазмалеммы, по-видимому, связан с существенным снижением участия ионов кальция в формировании потенциала действия нейронов.

6.1.3 Роль митохондриальных пор высокой проницаемости в прекращении импульсной активности нейрона после аксотомии

Для выяснения роли митохондриальных пор высокой проницаемости (МРТР), через которые может происходить выход Ca^{2+} из митохондриальных депо в цитозоль, в индуцируемом аксотомией прекращении импульсной активности нейрона, препараты рецептора растяжения рака инкубировались в присутствии циклоспорина А, циклофилин D-связывающего ингибитора МРТР. В аксотомированных препаратах циклоспорин А (5 мкМ) снижал среднюю продолжительность импульсации нейронов на 42% (Рис. 35, Таблица 3). Это может указывать на то, что МРТР участвуют в поддержании импульсной активности аксотомированных нейронов по еще не выясненному механизму. Возможно, он связан с тем, что аксотомия, повышающая уровень Ca^{2+} в цитозоле, стимулирует его захват митохондриальным Ca^{2+} унипортером. В результате этого формирование МРТР становится механизмом снижения уровня кальция внутри митохондрий.

6.1.4 Роль рианодиновых рецепторов в прекращении импульсной активности нейрона после аксотомии

Рианодиновые рецепторы являются одним из основных путей выхода Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума в цитозоль. Роль этого пути повышения уровня Ca^{2+} в клетке была изучена нами с помощью ингибиторов рианодина (10 мкМ, 5 интактных и 5 аксотомированных препаратов) и дантролена (20 мкМ, 7 интактных и 7 аксотомированных препарата). Оба модулятора не оказали статистически достоверного действия на продолжительность импульсации МРН (Таблица 3).

Отсутствие эффекта от блокирования рианодиновых рецепторов в аксотомированных нейронах, по-видимому, связано с тем, что индуцированный повреждением выход Ca^{2+} из ЭР в цитозоль происходит очень быстро, до того, как модулятор успевает подействовать, и в дальнейшем рианодиновые рецепторы уже не играют существенной роли в управлении значимой для импульсации внутриклеточной кальциевой концентрацией.

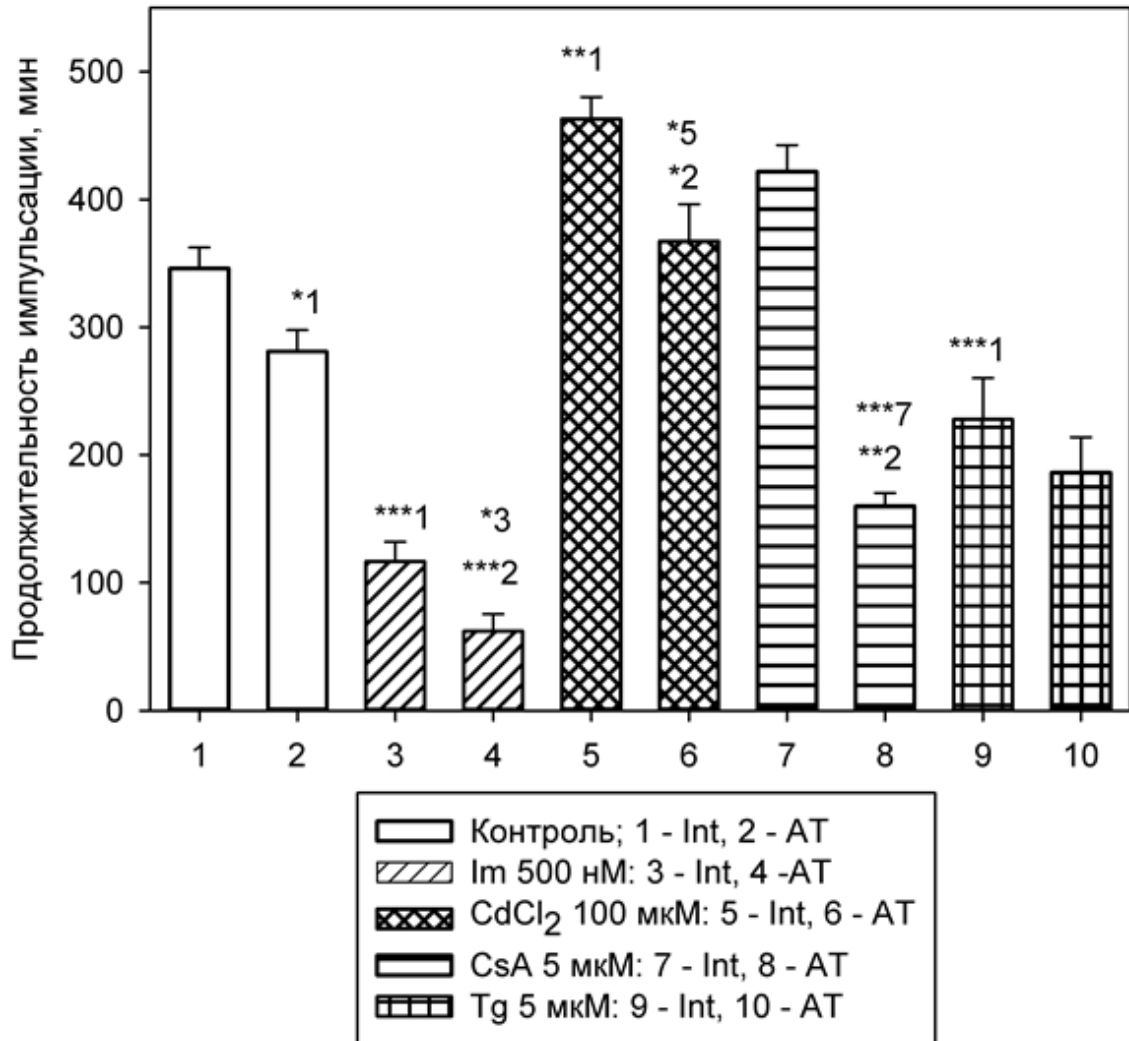


Рисунок 35. Влияние модуляторов кальциевых каналов на продолжительность импульсной активности механорецепторного нейрона после аксотомии. Int – интактные МРН, АТ – аксотомированные МРН. Im – иономицин, CsA – циклоспорин А, Tg - тапсигаргин. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Таблица 3. Влияние модуляторов цитозольной концентрации кальция на продолжительность импульсации механорецепторного нейрона после аксотомии. Int – интактные препараты, АТ – аксотомированные препараты. К – контроль. В скобках – количество опытов. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

Модулятор Ca^{2+}	Мишень и действие на $[Ca^{2+}]_i$	Длительность импульсации (мин)	
		Int	АТ
Контроль (К)		340±20 (49)	280±20 * (48)
Иономицин (500 нМ)	плазматическая мембрана – Ca^{2+} ионофор, $[Ca^{2+}]_i \uparrow$	120±20 (9) ***К	60±10 (9) *Int ***К
Ингибиторы Ca^{2+} каналов			
CdCl ₂ (100 мкМ)	Ca^{2+} каналы плазмалеммы, $[Ca^{2+}]_i \downarrow$	460±20 (7) **К	370±30 (7) *Int *К
Циклоспорин А (5 мкМ)	МРТР, $[Ca^{2+}]_i \downarrow$	420±20 (6)	160±10 (6) ***Int**К
Тапсигаргин (5 мкМ)	Ca^{2+} -АТФаза ЭР, $[Ca^{2+}]_i \uparrow$	230±30 (11) ***К	190±30 (5)
Рианодин (10 мкМ)	рианодиновые рецепторы, $[Ca^{2+}]_i \downarrow$	260±40 (5)	300±40 (5)
Дантролен (20 мкМ)		290±50 (7)	270±40 (7)

6.1.5 Роль Ca^{2+} -АТФазы эндоплазматического ретикула в прекращении импульсной активности нейрона после аксотомии

Одним из основных ионных насосов, поддерживающих низкую физиологическую внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} , является Ca^{2+} -АТФаза SERCA, откачивающая Ca^{2+} из цитозоля в эндоплазматический ретикулум. Ее предполагаемую защитную роль в нейроне при аксотомии мы проверили с помощью ингибирования тапсигаргином (5 мкМ, 11 интактных и 5 аксотомированных препаратов). Тапсигаргин достоверно снижал продолжительность импульсации в интактных препаратах на 32% и демонстрировал только тенденцию к ее снижению после аксотомии на 32% ($p=0,102$, Рис. 35, Таблица 3), что говорит о протекторной роли SERCA для интактных, но не аксотомированных нейронов.

6.2 Роль Ca^{2+} -зависимых белков в прекращении импульсации нейрона после аксотомии

Ряд активируемых кальцием белков, играет важную роль в регуляции клеточных функций. Мы изучили как белки, являющиеся каналами для других ионов в плазмалемме, так и белки, являющиеся элементами внутриклеточной сигнализации.

6.2.1 Роль Ca^{2+} -зависимых калиевых каналов в прекращении импульсной активности нейронов после аксотомии

Кальций-зависимые калиевые каналы участвуют в выведении ионов калия, тесно связанных с формированием нервных импульсов, из клетки по градиенту концентрации. Роль кальций-зависимых калиевых каналов в поддержании импульсной активности МРН при аксотомии была изучена с помощью их блокатора мауротоксина (10 нМ, 8 интактных и 8 аксотомированных препаратов), имеющего особую эффективность в каналах KCa3.1 , относящихся к т.н. каналам средней проводимости. Инкубирование с мауротоксином в течение 8 часов не

оказало никакого влияния на продолжительность импульсации МРН в обоих типах препаратов (Таблица 4). Возможно, эти каналы не активируются при аксотомии.

6.2.2 Роль протеинкиназы С в прекращении импульсной активности нейрона после аксотомии

Протеинкиназа С – один из центральных регуляторов в клеточной сигнальной системе, активируемый ионами кальция и диацилглицеролом. Роль протеинкиназы С в функциональной инактивации МРН при аксотомии исследовалась с помощью ее ингибитора стауроспорина (1 нМ, 6 интактных и 6 аксотомированных препаратов). Стауроспорин не оказал достоверного влияния на продолжительность импульсной активности интактных и аксотомированных препаратов (Таблица 4). Скорее всего, протеинкиназа С не участвует в вызванном аксотомией сокращении продолжительности импульсной активности нейрона.

6.2.3 Роль кальмодулина в прекращении импульсной активности нейрона после аксотомии

Кальмодулин является одним из наиболее высоких по содержанию белков в клетке и самым высоким по содержанию среди кальций-зависимых белков. Его участие в прекращении импульсной активности МРН было изучено с помощью ингибирования флуфеназином (2 мкМ, 8 интактных и 13 аксотомированных препаратов). В присутствии флуфеназина продолжительность импульсной активности нейронов сохранялась по сравнению с контролем в обоих типов препаратов (Таблица 4). По всей видимости, кальмодулин не участвует в ускорении прекращения импульсной активности нейрона в результате повреждения аксона.

6.2.4 Роль кальмодулинкиназы II в прекращении импульсной активности нейрона после аксотомии

Кальмодулинкиназа II – важный регуляторный белок клеточного метаболизма, обеспечивающая ряд механизмов обратной связи и активируемая совместно Ca^{2+} и кальмодулином. Ее роль в индуцированном аксотомией сокращении импульсации МРН изучили с помощью специфического ингибитора KN-93 (2 мкМ, 9 интактных и 8 аксотомированных препаратов). KN-93 не оказал достоверного влияния на продолжительность импульсации нейронов (Таблица 4).

Таблица 4. Влияние ингибиторов Ca^{2+} -зависимых каналов и сигнальных белков на продолжительность импульсации МРН после аксотомии. Int – интактные препараты, АТ – аксотомированные препараты. К – контроль. В скобках – количество опытов. * $p < 0,05$.

Ингибитор	Мишень	Длительность импульсации (мин)	
		Int	АТ
Контроль (К)		340±20 (49)	280±20 * (48)
Мауротоксин (10 нМ)	Ca^{2+} -зависимые K^+ каналы, $[K^+]_i \downarrow$	340±50 (8)	290±40 (8)
Стауроспорин (1 нМ)	протеинкиназа С	360±50 (6)	370±70 (6)
Флуфеназин (2 мкМ)	кальмодулин	350±60 (8)	250±40 (13)
KN-93 (2 мкМ)	кальмодулинкиназа II	370±60 (9)	350±60 (8)

Таким образом, повышение уровня Ca^{2+} в цитозоле является основным фактором индуцированного аксотомией ускорения прекращения импульсной активности нейронов, которое обусловлено в первую очередь входом Ca^{2+} через потенциалзависимые каналы плазмалеммы. Также оказалось, что формирование митохондриальной поры повышенной проводимости МРТР, является протекторным механизмом в нейроне при аксотомии.

ГЛАВА 7. РОЛЬ Ca^{2+} В СМЕРТИ УДАЛЕННЫХ ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПОСЛЕ АКСОТОМИИ

Интактные и аксотомированные препараты РРР, инкубировавшиеся в присутствии различных кальциевых модуляторов, сравнивались по уровню некроза и апоптоза глиальных клеток, удаленных от места перерезки аксона, с объединенным общим контролем, что позволяло сопоставлять эффекты различных воздействий на элементы кальциевого сигнального пути, выявляя ключевые для выживания и смерти глии кальций-зависимые механизмы.

7.1 Влияние внеклеточного Ca^{2+} на смерть удаленных глиальных клеток после аксотомии

Для изучения влияния внеклеточной концентрации Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_o$) на вызванную аксотомией смерть глиальных клеток, удаленных от места перерезки аксона МРН (УГК), препараты РРР инкубировались в растворе ван Харревельда с трехкратно увеличенной или трехкратно уменьшенной концентрацией хлорида кальция: $3[Ca^{2+}]_o$, 8 интактных и 8 аксотомированных препаратов; или $1/3[Ca^{2+}]_o$, 7 интактных и 7 аксотомированных препаратов. В среде с тройной концентрацией Ca^{2+} уровень апоптоза удаленных глиальных клеток после аксотомии повышался в 4,5 раза, а уровень их некроза в интактных и аксотомированных препаратах снижался на 90% и 60%, соответственно ($p < 0,005$, Рис. 36-37, Таблица 5).

При этом достоверного влияния сниженной $[Ca^{2+}]_o$ на смерть удаленной сателлитной глии в обоих типах препаратов не наблюдалось.

Таким образом, $[Ca^{2+}]_o$ является фактором, защищающим эти клетки от некроза, но стимулирующим апоптоз. Возможно, противонекротическое действие $[Ca^{2+}]_o$ побуждало некоторые клетки с нарушенным в результате аксотомии гомеостазом переходить на апоптотический сценарий смерти.

Таблица 5. Влияние изменения концентрации Ca^{2+} в среде на апоптоз и некроз удаленной глии после аксотомии МРН. Int – интактные препараты, АТ – аксотомированные препараты. К – контроль. В скобках – количество опытов. * $p < 0,05$; *** $p < 0,005$.

Модулятор	Апоптоз глии, отн. ед.		Некроз глии, %	
	Int	АТ	Int	АТ
Контроль (К)	0.2±0.1 (43)	0.4±0.1 (54)	10±1 (43)	15±1 (54) ***
(1/3)[Ca^{2+}] _о	0.3±0.2 (7)	0.6±0.2 (7)	9±1 (7)	16±2 (7) *Int
3[Ca^{2+}] _о	0.3±0.2(8)	1.8±0.3 (8) ***Int ***К	1±1 (8) ***К	6±1 (8) *Int***К

7.2 Роль механизмов регуляции уровня Ca^{2+} в цитозоле в смерти удаленных глиальных клеток после аксотомии

Мы изучили роль пассивных и активного путей регуляции цитозольной концентрации Ca^{2+} в вызванных аксотомией некрозе и апоптозе глиальных клеток, удаленных от места повреждения, с помощью специфических модуляторов.

7.2.1 Влияние повышения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} на смерть удаленных глиальных клеток после аксотомии

Для оценки роли повышения уровня Ca^{2+} в цитозоле клеток глии, удаленных от места перерезки аксона, был использован Ca^{2+} ионофор иономицин

(500 нМ, 9 интактных и 9 аксотомированных препаратов). Он повышал уровень апоптоза УГК в 37 раз в интактных и в 42,5 раза в аксотомированных препаратах ($p < 0,005$). Важно заметить, что в абсолютных значениях в присутствии иономицина уровень апоптоза при аксотомии был 2,3 раза больше, чем в интактных ($p < 0,01$) (Рис. 36, Таблица 6). Иономицин также повышал уровень некроза УГК в интактных препаратах на 150% и в аксотомированных на 180%, (Рис. 37, Таблица 6). Таким образом, повышение концентрации Ca^{2+} в цитозоле стимулирует оба вида клеточной смерти, причем эффекты аксотомии и ионофора на смерть сателлитной глиии взаимно усиливают друг друга.

Опыты с повышением проницаемости клеточной мембраны для Ca^{2+} с помощью иономицина показывают центральную роль повышения внутриклеточной кальциевой концентрации в смерти удаленных от места повреждения аксона глиальных клеток. Из всех использовавшихся при своих рабочих концентрациях модуляторов кальциевого сигнального пути иономицин наиболее сильно стимулировал некроз и апоптоз УГК.

7.2.2 Роль входа Ca^{2+} в цитозоль через потенциалзависимые Ca^{2+} каналы плазмалеммы в смерти удаленных глиальных клеток после аксотомии

Роль входа Ca^{2+} через потенциалзависимые кальциевые каналы плазмалеммы в некрозе и апоптозе УГК была изучена с помощью их неспецифического блокатора Cd^{2+} . Инкубация рецептора растяжения рака в присутствии хлорида кадмия (100 мкМ, 7 интактных и 11 аксотомированных препаратов) не оказала достоверного влияния на апоптоз удаленных глиальных клеток (Таблица 6). Ввиду изначально низкого уровня апоптоза в контрольных препаратах, предполагаемое антиапоптотическое действие модулятора было сложно заметить. Однако стоит обратить внимание, что во всех препаратах в присутствии модулятора не было замечено ни одной апоптотически измененной клетки. Кадмий также не оказал значительного пронекротического действия в глие. Таким образом, участие входа Ca^{2+} в цитозоль через кальциевые каналы

плазматической мембраны в некрозе и апоптозе удаленной глиии при аксотомии было незначительно.

7.2.3 Роль высокопроницаемых митохондриальных пор в смерти удаленных глиальных клеток после аксотомии

Ca^{2+} может выходить из митохондрий в цитозоль через высокопроницаемые митохондриальные поры (МРТР). Участие этого механизма в смерти удаленной глиии было изучено с помощью циклофилин D-связывающего ингибитора МРТР циклоспорина А (5 мкМ, 7 интактных и 13 аксотомированных препаратов). Мы не отметили значимого изменения уровня апоптоза в присутствии циклоспорина (Таблица 6). Ввиду изначально низкого апоптоза в контрольных препаратах было сложно зарегистрировать наличие или отсутствие предполагаемого антиапоптотического действия препарата. Однако в присутствии модулятора не было замечено ни одной апоптотически измененной глиальной клетки вдали от места перерезки. Циклоспорин не снижал достоверно некроз удаленной глиии (Таблица 6). Таким образом, МРТР, по-видимому, не участвовали в вызванной аксотомией смерти механически интактных глиальных клеток.

7.2.4 Роль рианодиновых рецепторов в смерти удаленных глиальных клеток после аксотомии

Одним из путей выхода Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума являются рианодиновые рецепторы (RyR). Их участие в индуцируемой аксотомией смерти интактных глиальных клеток изучили с помощью двух ингибиторов – рианодина (10 мкМ, 6 интактных и 7 аксотомированных препаратов) и дантролена (20 мкМ, 6 интактных и 6 аксотомированных препаратов). Рианодин не оказал значимого влияния на апоптоз удаленной глиии (Таблица 6). В то же время инкубация с дантроленом привела к появлению апоптоза в аксотомированных препаратах РРР (повышение в 5,3 раза до 2,1 единиц, $p < 0,005$, Рис. 36, Таблица 6). Поскольку дантролен считается более сильным ингибитором RyR, чем рианодин, возможно, что определенная степень блокировки данных каналов запускает апоптотические

механизмы, не связанные напрямую с выходом Ca^{2+} в цитозоль. Тем не менее, абсолютные значения индуцированного дантроленом апоптоза были небольшими, поэтому участие рианодиновых рецепторов в проапоптотическом нарушении кальциевого метаболизма клеток глии при аксотомии следует рассматривать как незначительное. При инкубации с рианодином не наблюдалось достоверного изменения уровня некроза в удаленных глиальных клетках ($p=0,3$, Таблица 6). В то же время дантролен достоверно защищал УГК при аксотомии, снижая уровень их некроза на 40% ($p<0,05$) (Рис. 37, Таблица 6). Это может говорить о том, что выход Ca^{2+} из ЭР в цитозоль удаленных глиальных клеток через рианодиновые рецепторы может являться пронекротическим фактором, но в то же время защищает клетку от апоптоза.

7.2.5 Роль Ca^{2+} -АТФазы эндоплазматического ретикулума в смерти удаленных глиальных клеток после аксотомии

Ca^{2+} АТФаза (SERCA) – самый распространенный белок в мембране эндоплазматического ретикулума, который является насосом, активно откачивающим ионы кальция из цитозоля. Мы изучили ее роль в защите глиальных клеток от смерти вследствие аксотомии с помощью специфического ингибитора тапсигаргина (5 мкМ, 7 интактных и 7 аксотомированных препаратов). Блокирование откачки ионов кальция в ЭР тапсигаргином не влияло на апоптоз удаленной глии в интактных препаратах, но повышало некроз на 30% ($p<0,05$). В аксотомированных препаратах тапсигаргин в 8 раз увеличивал уровень апоптоза ($p<0,01$) и на 60% повышал уровень некроза удаленной глии (Рис. 36-37, Таблица 6). Это указывает на то, что работа данной АТФазы по удалению Ca^{2+} из цитозоля в ЭР защищает удаленную от места повреждения глию от некроза и индуцированного аксотомией апоптоза.

Таблица 6. Влияние модуляторов уровня внутриклеточного Ca^{2+} на апоптоз и некроз сателлитной глии, расположенной вдали от места повреждения, после аксотомии МРН. Int – интактные препараты, АТ – аксотомированные препараты. В скобках – количество опытов. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

Модулятор, концентрация	Мишень, $[\text{Ca}^{2+}]_i$	Апоптоз глии, отн. ед.		Некроз глии, %	
		Int	АТ	Int	АТ
Контроль (К)		0.2±0.1 (43)	0.4±0.1 (54)	10±1 (43)	15±1 (54) ***
Иономицин (500 нМ)	Ca^{2+} ионофор $[\text{Ca}^{2+}]_i \uparrow$	7.4±0.7 (8) ***К	17±3.4 (8) **Int***К	25±2 (9) ***К	42±5 (7) **Int***К
Ингибиторы Ca^{2+} каналов					
CdCl_2 (100 мкМ)	Ca^{2+} каналы плазмалеммы $[\text{Ca}^{2+}]_i \downarrow$	0 (7)	0 (11)	9±1 (7)	12±1 (11) *Int
Циклоспорин А (5 мкМ)	МРТР $[\text{Ca}^{2+}]_i \downarrow$	0 (6)	0 (6)	7±1 (6)	13±2 (6) *Int
Тапсигаргин (5 мкМ)	SERCA $[\text{Ca}^{2+}]_i \uparrow$	0.3±0.2 (7)	3.3±0.7 (7) **Int ***К	13±1 (7) *К	24±2 (7) ***Int**К
Рианодин (10 мкМ)	RyR $[\text{Ca}^{2+}]_i \downarrow$	0 (6)	0 (6)	6±1 (6)	13 (6) ***Int
Дантролен (20 мкМ)		0.6±0.4 (6)	2.1±0.3 (7) *Int***К	6±1 (6)	9±2 (7) *К

7.3 Роль Ca^{2+} -зависимых каналов и внутриклеточных белков в смерти удаленных глиальных клеток после аксотомии

Кроме механизмов, непосредственно регулирующих концентрацию Ca^{2+} в клетке, важную роль в клеточной смерти играют сигнальные белки, активируемые при связывании с ионами кальция и участвующие в сигнальных каскадах, регулирующих различные пути регуляции клеточного метаболизма, включая пути, ведущие к некрозу и апоптозу.

7.3.1 Роль Ca^{2+} -зависимых калиевых каналов в смерти удаленных глиальных клеток после аксотомии

Ca^{2+} -активируемые калиевые каналы плазматической мембраны регулируют внутриклеточный уровень K^+ , будучи активированными Ca^{2+} . Мы изучили их участие в индукции некроза и апоптоза при аксотомии при помощи их блокатора мауротоксина (10 нМ, 8 интактных и 8 аксотомированных препаратов), особенно эффективного в отношении каналов средней проводимости (IK) KCa3.1 . Мауротоксин в 12,5 раз повышал апоптоз удаленных глиальных клеток во всех препаратах ($p < 0,005$, Рис. 36), но не влиял на некроз (Таблица 7). Видимо, эти каналы, выпуская ионы калия из клетки, играют антиапоптотическую роль, а аксотомия и индуцируемая ей кальциевая динамика не влияет на их активацию.

7.3.2 Роль протеинкиназы C в смерти удаленных глиальных клеток после аксотомии

Протеинкиназа C активируется Ca^{2+} и диацилглицеролом и играет важную роль в клеточном метаболизме, участвует в ряде клеточных функций, в том числе активирует ионные каналы. Ее роль в индуцированной аксотомией смерти дистальной глии была изучена путем ингибирования стауроспорином (1 нМ, 6 интактных и 6 аксотомированных препаратов). Стауроспорин повышал уровень апоптоза сателлитной глии как в интактных (в 6 раз, $p < 0,005$), так и в

аксотомированных (в 8 раз, $p < 0,005$) препаратах (Рис. 36, Таблица 7). Однако при этом он снижал уровень некроза глиальных клеток на уровне тенденции в интактных (на 40%, $p = 0,086$) и достоверно – в аксотомированных (на 47%, $p < 0,05$) препаратах (Рис. 37, Таблица 7). Таким образом, протеинкиназа С защищает удаленные глиальные клетки от апоптоза, но участвует в их некрозе, а аксотомия не влияет на активность данного сигнального белка. Скорее всего, проапоптотический и антинекротический эффекты ингибирования протеинкиназы С основаны на различных механизмах.

7.3.3 Роль кальмодулина в смерти удаленных глиальных клеток после аксотомии

Кальмодулин, активируемый Ca^{2+} , присутствует в клетке в больших количествах и влияет на клеточный метаболизм. Мы изучили его участие в смерти механически неповрежденной удаленной глиии при аксотомии с помощью его ингибитора флуфеназина (2 мкМ, 11 интактных и 15 аксотомированных препаратов). Флуфеназин не оказывал достоверного влияния на смерть глиальных клеток в обоих типах препаратов (Таблица 7). Видимо, кальмодулин не играет существенной роли в смерти глиии независимо от наличия удаленного повреждения.

7.3.4 Роль кальмодулинкиназы II в смерти удаленных глиальных клеток после аксотомии

Кальмодулинкиназа II, наряду с кальмодулином, обильно присутствует в клетке, управляется кальмодулином и Ca^{2+} , являясь важным регулятором клеточной жизнедеятельности. Мы изучили ее участие в индуцированной аксотомией смерти удаленной сателлитной глиии с помощью специфического ингибитора KN-93 (2 мкМ, 9 интактных и 9 аксотомированных препаратов). KN-93 не влиял на апоптоз, но снижал некроз в обоих типах препаратов (Рис. 37, Таблица 7). Видимо, кальмодулинкиназа II не участвует в апоптозе удаленной глиии, но может участвовать в ее некрозе.

7.4 Основные механизмы участия Ca^{2+} в индуцировании некроза и апоптоза удаленных глиальных клеток после аксотомии

Таким образом, центральным фактором смерти глиальных клеток при аксотомии выступает вход Ca^{2+} в цитозоль, а наиболее существенным защитным механизмом при этом является работа Ca^{2+} -АТФазы эндоплазматического ретикулума. Важную проапоптотическую роль играют повышение уровня внеклеточного Ca^{2+} , Ca^{2+} -зависимые калиевые каналы и протеинкиназа С. В сценарий некротической смерти клеток при аксотомии могут быть вовлечены риаудиновые рецепторы, протеинкиназа С и кальмодулинкиназа II, а снижение внеклеточной концентрации Ca^{2+} сдерживает этот сценарий.

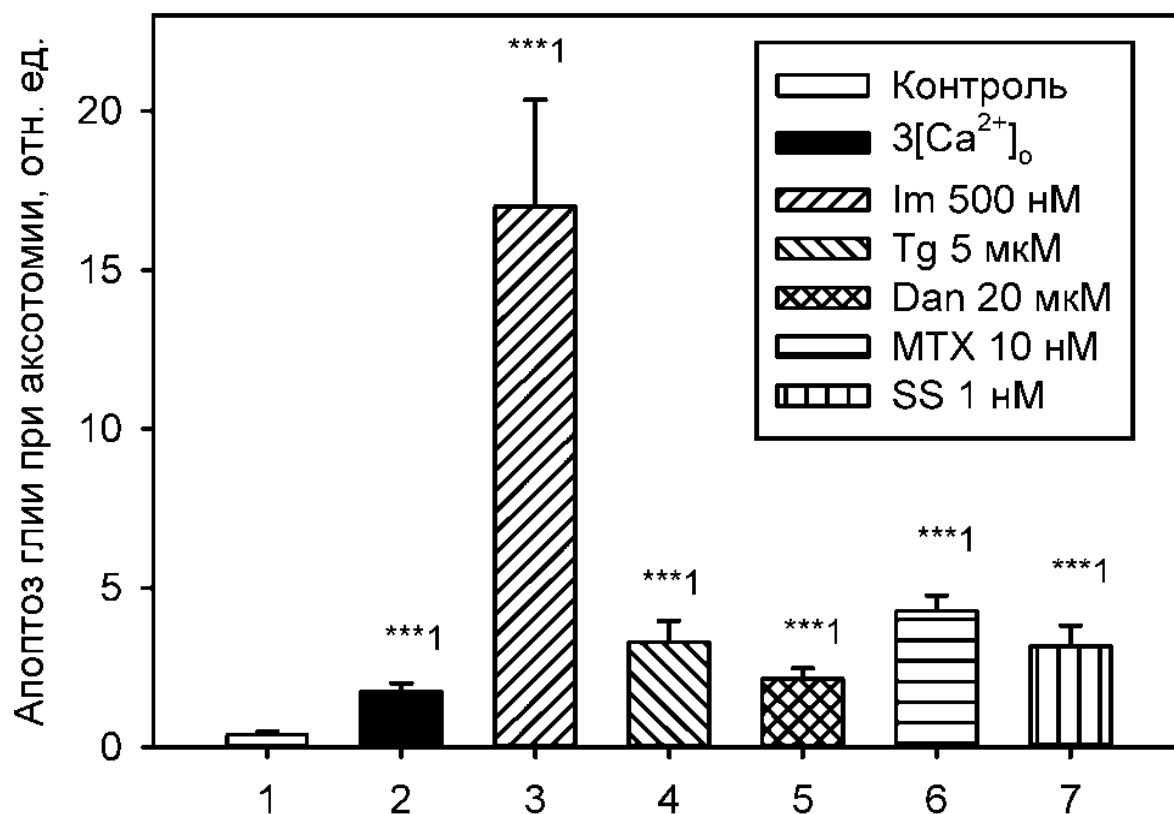


Рисунок 36. Влияние модуляторов кальций-зависимого сигнального пути на апоптоз глиальных клеток рецептора растяжения рака при аксотомии. Im – иономицин, Tg – тапсигаргин, Dan – дантролен, MTX – мауротоксин, SS – стауроспорин. Int – интактные препараты, AT – аксотомированные препараты. *** $p < 0,005$.

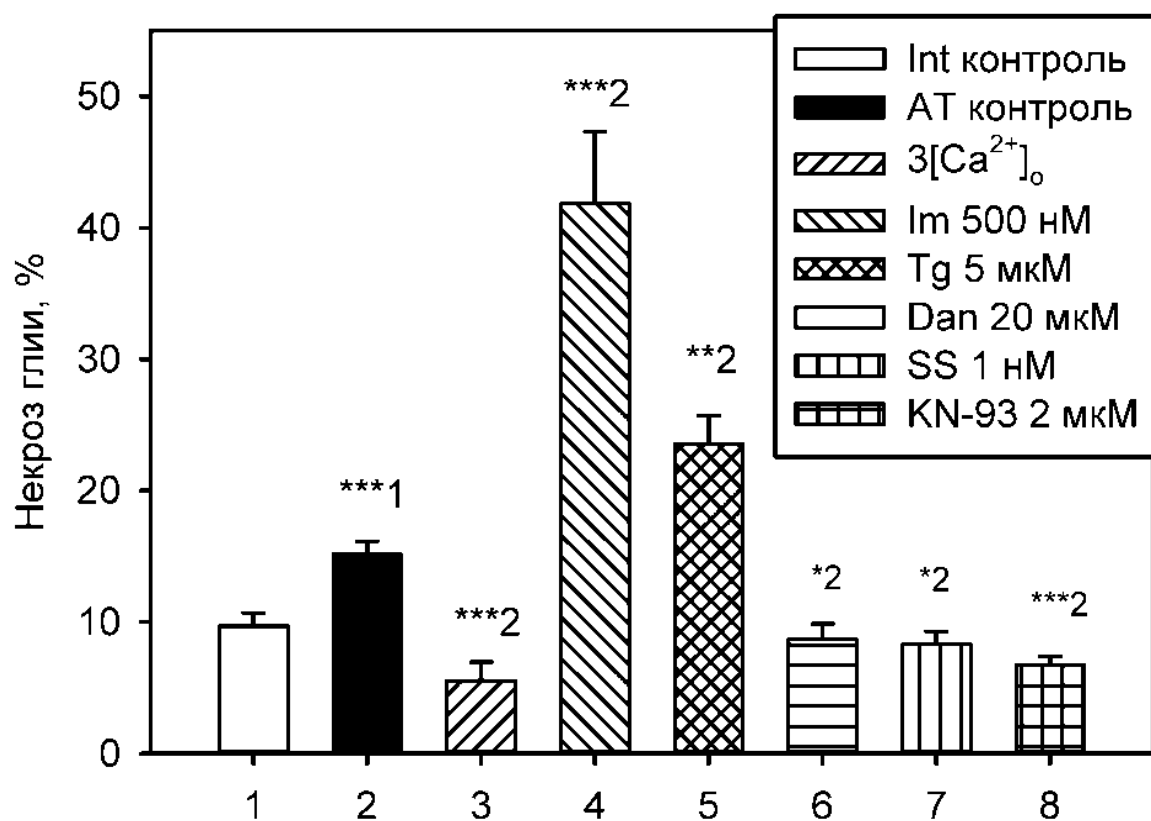


Рисунок 37. Влияние модуляторов кальций-зависимого сигнального пути на некроз глиальных клеток рецептора растяжения рака при аксотомии. Im – иономицин, Tg – тапсигаргин, Dan – дантролен, SS – стауроспорин. Int – интактные препараты, AT – аксотомированные препараты. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$

Таблица 7. Влияние ингибиторов кальций-зависимых белков на апоптоз и некроз удаленных клеток при аксотомии МРН. Int – интактные препараты, АТ – аксотомированные препараты. В скобках указано количество опытов. * $p < 0,05$; *** $p < 0,005$.

Ингибитор	Мишень	Апоптоз глии, отн. ед.		Некроз глии, %	
		Int	АТ	Int	АТ
Контроль (К)		0.2±0.1 (43)	0.4±0.1 (54)	10±1 (43)	15±1 (54) ***
Мауротоксин (10 нМ)	Ca ²⁺ -зависимые К ⁺ каналы	2.5±0.7 (8) ***К	5±2 (8) *Int***К	12±1 (8)	15±1 (8) *Int
Стауроспорин (1 нМ)	Протеинкиназа С	1.2±0.3 (6) ***К	3.2±0.7 (6) *Int***К	6±1 (6)	8±1 (6) *Int*К
Флуфеназин (2 мкМ)	Кальмодулин	0.5±0.2 (11)	0.6±0.2 (15)	7±1 (11)	19±2 (15) ***Int
KN-93 (2 мкМ)	Кальмодулин-киназа II	0 (9)	0 (9)	7±1 (9) ***К	7±1 (9) ***К

ГЛАВА 8. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1 Практическое значение модели интактного РРР

Разработанная нами модель изолированного комплекса МРН-ганглий может служить удобным и, в значительной мере, общим для нейробиологических исследований контролем для модели аксотомии. На этой модели можно не только регистрировать электрофизиологическую активность нейрона и визуализировать смерть глиальных клеток с помощью флуорохромов, но и проводить исследования с флуоресцентными зондами и трекерами, а также изучать изменения ультраструктуры [169] и уровня различных белков [170] вследствие аксотомии.

8.2 Воздействие аксотомии на импульсную активность механорецепторного нейрона и смерть удаленной сателлитной глии

Аксотомия механорецепторного нейрона не приводила к изменению характера его импульсации. В культурах кортикальных нейронов млекопитающих (мышей) наблюдается резкий электрофизиологический ответ на аксотомию [171]. Сенсорные нейроны спинальных ганглиев мышей отвечали на аксотомию повышением возбудимости [32], которая связана с индуцированной аксотомией отрицательной регуляцией потенциал-зависимых калиевых каналах Kv9.1 [172]. В опытах А. Мурамото на анальном мотонейроне рака *Procambarus clarkii* аксотомия вызывала долговременную импульсацию [35]. Такое различие может быть связано с периферийной либо центральной принадлежностью нейронов. Но весьма вероятно, что на характер импульсации и электрофизиологического ответа на повреждение сильно влияет глиальная оболочка, делая функциональную активность более устойчивой. Буфер, который глия создает между плазматической мембраной и внеклеточной средой, предположительно, снижает участие каналов, задействованных в генерации потенциала действия, в ответе нейрона на повреждение аксона.

Зарегистрированное ускорение прекращения импульсной активности МРН вследствие аксотомии можно связать с ускоренным истощением запасов АТФ, расходуемых на процессы клеточного ответа, поддержание гомеостаза и работу восстановительных механизмов. Свой вклад в индуцированное аксотомией ускорение прекращения импульсации нейрона вносили вход Ca^{2+} в цитозоль нейрона через Ca^{2+} каналы плазматической мембраны и недостаточное выведение Ca^{2+} из митохондрий через поры МРТР, по-видимому, негативно влияющее на функциональное состояние митохондрий и производство АТФ. Истощение запасов АТФ приводит к недостаточной работе натриево-калиевой АТФазы нейрона и, в итоге, к невозможности формирования потенциала действия.

Аксотомия РРР стимулировала некроз, но не апоптоз удаленных глиальных клеток при 8-часовой инкубации. Инкубация свыше 8 часов (до 15 часов) привела к росту апоптоза в аксотомированных препаратах, но не в интактных, что, возможно, связано с нехваткой АТФ, расходуемого на процессы клеточного ответа на аксотомию, и большей внутриклеточной концентрацией Ca^{2+} (выведение которого из цитозоля само по себе является энергозатратным процессом).

При этом, в условиях перфузии в течение 16 часов апоптоз глиии не появлялся. Это может свидетельствовать о том, что накопление во внеклеточной среде отходов клеточного метаболизма (возможно, наряду со снижением в ней концентрации кислорода) создает необходимые условия для развития апоптоза глиии. Это могут быть выводимый вакуолярным путем клеточный мусор, азотистые продукты переработки аминокислот (аммиак), остатки самих белков и другие токсины.

Ионы кальция, содержащиеся во внешней среде, играют важную роль в межклеточных сигнальных процессах и участвуют в поддержании клеточного гомеостаза. Различие вне- и внутриклеточной концентрации кальция само по себе является одним из основных элементов кальциевого гомеостаза клеток, а его роль в реакциях нейронов и глиальных клеток на аксотомию является ключевой.

Повышение внеклеточной концентрации Ca^{2+} стимулировало апоптоз и снижало некроз удаленной глии. В культуре астроцитов кальциевая депривация, наоборот, стимулировала апоптотические механизмы [173]. Повышенная $[\text{Ca}^{2+}]_o$ приводит к сжатию митохондрий в нейронах рака [174]. С другой стороны, повышение $[\text{Ca}^{2+}]_o$ приводит к снижению уровня Na^+ нейроне [71,175]. Возможно, эти процессы параллельно происходят и в глиальной оболочке, стимулируя апоптоз. Можно предположить, что высокий внеклеточный уровень кальция, воспринимаемый рецепторами плазматической мембраны как сигнал, может запускать в итоге каскад апоптоза в клетке.

При трехкратном увеличении содержания CaCl_2 осмотическая концентрация физиологического раствора повышается на 17%, что соответствует на порядок меньшей осмолярности, чем та, которая в растворе ван Харревельда вызывала значимые эффекты в опытах Winterhager et. al (1982) с сетчаткой рака [176], также следует учитывать допускаемые колебания стандартной осмолярности раствора порядка 7%. Создаваемое искусственно изменение концентрации, и, соответственно, градиента Ca^{2+} - само по себе более существенный фактор выживания клетки, чем указанное изменение осмотического давления, и, ввиду наличия механизмов входа Ca^{2+} и Cl^- из внеклеточной среды в цитозоль, изотония должна устанавливаться вскоре после помещения препарата в физиологический раствор с измененной концентрацией хлорида кальция. Наблюдаемое значимое противонекротическое действие трехкратного повышения внеклеточной кальциевой концентрации (с учетом также того, что количество апоптотических клеток всегда на порядки ниже количества некротических клеток) позволяет исключить повреждение вследствие предполагаемых осмотических процессов в слабо гипертонической среде.

В работе [71] исследовалось влияние трехкратного повышения уровня внеклеточного кальция на РРР. По сравнению с контролем повышение $[\text{Ca}^{2+}]_o$ в три раза (но, в отличие от наших опытов, в обмен на Na^+) вызвало некоторое защелачивание цитозоля нейрона, которое затем достаточно быстро

компенсировалось ответными механизмами, и было, видимо, связано с динамикой натрия.

В работе [112], где изучался эффект снижения внеклеточной кальциевой концентрации кальция на взаимодействие нейронов и астроцитов, Ca^{2+} рассматривается как модулятор нейроглиальных взаимодействий. Временное понижение внеклеточной кальциевой концентрации в два раза является нормальным физиологическим явлением в работе нервной системы.

В интактной ЦНС имеют место динамические флуктуации уровня $[\text{Ca}^{2+}]_o$ во время синаптической активности, которые отражают вход Ca^{2+} в нейроны через глутамат- и потенциалзависимые Ca^{2+} каналы. Снижение $[\text{Ca}^{2+}]_o$, в свою очередь, стимулирует в астроцитах ряд сигнальных процессов, включая выход АТФ. Методами атомно-силовой микроскопии показано, что снижение $[\text{Ca}^{2+}]_o$ повышает вероятность открытия щелевых контактов между глиальными клетками.

Резкое повышение трансмембранного градиента Ca^{2+} создает предпосылки для усиления его входа в цитозоль через кальциевые каналы и даже диффузию через мембрану и липидные поры, но это не объясняет противонекротического эффекта на глиальные клетки. Однако, вполне возможно, что повышение внеклеточной концентрации кальция снижает выход АТФ во внеклеточную среду, и у глиальных клеток остается больше ресурсов для поддержания жизнедеятельности, что и замедляет наступление некроза в условиях инкубации.

Действие повышенной внеклеточной концентрации Ca^{2+} , возможно, регулируется через сигнальные пути с участием протеинкиназы С, кальмодулина, кальмодулинкиназы II и кальций-зависимых калиевых каналов.

Как мы видим, факторы внеклеточной среды, в частности выведение продуктов клеточного метаболизма и уровень внеклеточного кальция, важны для выживания глиальных клеток. По-видимому, сочетание обеспечения постоянного обновления среды, в которой находится глия после травмы, со снижением уровня внеклеточного кальция должно защищать глию как от некроза, так и от апоптоза. Однако, процессы восстановления клеток от повреждений и регенерации аксонов

требуют высокой концентрации внеклеточного Ca^{2+} [177], поэтому искусственное изменение внеклеточной среды не должно длиться слишком долго, охватывая только начало острого периода непосредственно после травмы.

8.3 Повышение уровня внутриклеточного Ca^{2+} в нейроне и удаленных глиальных клетках вследствие аксотомии

Аксотомия РРР повышает уровень Ca^{2+} не только в нейроне, но и в удаленной глии. При этом, если механизмы первого факта изучены довольно хорошо, то механизмы второго остаются во многом неизвестными. В литературе известно несколько взаимосвязанных путей индуцированного аксотомией повышения уровня Ca^{2+} в цитозоле нейрона. Аксотомия приводит к входу Na^+ в аксоплазму и последующей инверсии работы $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменника [171]. Это ведет к выходу Na^+ из аксона и вторичному входу Ca^{2+} в аксон, что, наряду с высвобождением Ca^{2+} из ЭР и, в то же время, его входом через Ca^{2+} каналы плазмалеммы, лежит в основе механизма АТ-индуцированной ретроградной кальциевой волны в аксоне [8].

Индуцированное аксотомией повышение уровня внутриклеточного кальция в глии на данный момент мало изучено, особенно в периферической нервной системе. При черепно-мозговой травме наблюдается повышение уровня Ca^{2+} в миелине [39]. К гипотетическим механизмам индуцированного аксотомией повышения уровня Ca^{2+} в удаленных глиальных клетках можно отнести ретроградную волну Ca^{2+} от места повреждения, сопровождающуюся вторичным входом Ca^{2+} в цитозоль из внеклеточного пространства и внутриклеточных кальциевых депо. Кальциевые волны, проходящие в глиальной сети и опосредованные коннексиновыми и паннексиновыми щелевыми контактами, описаны в ЦНС для астроцитов [3] и олигодендроцитов, в том числе при черепно-мозговой травме [39], и, частично, в шванновских клетках периферической нервной системы млекопитающих при повреждении периферических нервов [54]. Сигналом, проходящим через иннексиновые каналы и полуканалы (аналог

коннексиновых у позвоночных) в модели PPP, может быть как сам двухвалентный ион кальция, так и IP₃, а также АТФ.

В работе [178] механически индуцированный подъем $[Ca^{2+}]_i$ и его последующее распространение на соседние клетки являются классической моделью астроцитарной кальциевой волны и опосредуется щелевыми контактами и внеклеточным АТФ. Было выяснено, что распространение кальциевой волны по щелевым контактам происходит намного быстрее и вызывает устойчивые изменения внутриклеточной кальциевой концентрации, в то время как кальциевые волны, опосредованные внеклеточным АТФ, распространяются медленнее и являются транзистными. Исходя из этого можно предположить, что наблюдаемое нами индуцированной аксотомией персистентное повышение уровня кальция связано именно со щелевыми контактами.

В то же время кальциевая волна в сателлитной глии PPP может быть инициирована не только механическим повреждением глии в месте перерезки аксона, но и нейроглиальным взаимодействием, при котором повышение интрааксонального/цитоплазматического уровня кальция влечет за собой даже еще большее относительное повышение внутриклеточного уровня кальция в глии, опосредованное сигнализацией внеклеточного Ca^{2+} между нейронами и глией. Эти два предполагаемых механизма индуцированной аксотомией кальциевой динамики в глии не только не противоречат друг другу, но и с высокой степенью вероятности могут сочетаться в модели рецептора растяжения рака ввиду того, что глиальная оболочка имеет многослойную структуру и непрерывна на всем протяжении аксона (в отличие от миелина у позвоночных). В пользу этого говорят данные об обнаруженных двунаправленных кальциевых токах между сенсорными нейронами и их перинейрональной сателлитной глией, в которых участвуют как щелевые контакты, так и высвобождение АТФ [48,49]. Тем не менее, исходя из того, что в наших опытах по измерению кальциевой динамики при аксотомии индуцированной повреждением повышение уровня Ca^{2+} выражено сильнее и становится значимым достоверно раньше, чем в аксоне и, тем более, в цитозоле МРН, можно заключить, что именно кальциевая волна,

распространяющаяся через щелевые контакты, является основным и, возможно, единственным механизмом в основе картины, наблюдаемой в глиальной оболочке. Однако остается неясным, каков основной источник Ca^{2+} для повышения его уровня в цитозоле. Таковым не может быть ЭР и митохондрии, т.к. они находятся в пределах клетки и не могут давать вклад в изменения, наблюдаемые с помощью зондов. Следует рассмотреть возможность вторичного входа Ca^{2+} из внешней среды, однако аргументом против ведущей роли этого механизма является многослойность глиальной оболочки, затрудняющая проникновение Ca^{2+} в глиальные слои, прилегающие к плазмалемме/аксолемме. Просвет аксона МРН, перерезанного хирургическими ножницами, сразу же закрывается вследствие компрессии и набухания коллагеновых слоев, окружающих аксон [169], что снижает вклад первичного входа Ca^{2+} в аксон. Поэтому наиболее вероятным представляется, что повышение уровня Ca^{2+} в цитозоле после аксотомии происходит за счет его проникновения из глиальной оболочки.

8.4 Роль механизмов, регулирующих внутриклеточный Ca^{2+} , в индуцированных аксотомией прекращении импульсной активности нейронов и смерти глиальных клеток

Нарушение кальциевого гомеостаза в УГК, по-видимому, является центральным фактором индуцированной аксотомией повышения уровня их гибели – некроза и апоптоза. Возможный механизм апоптоза удаленной сателлитной глии, индуцируемого повышением внутриклеточной концентрации ионов кальция, может быть связанным с митохондриями как каспазозависимым путем, так и каспазозависимым с участием фактора индукции апоптоза (AIF). Механизм некроза, развивающегося вследствие нарушения кальциевого гомеостаза, может быть связан со связыванием Ca^{2+} с кальпаином и последующим воздействием последнего на лизосомы, что приводит к выходу гидролаз и катепсинов в цитозоль.

Ряд клеточных механизмов регулирует уровень кальция в цитозоле и может либо участвовать в его индуцированном входе в цитозоль, либо сопротивляться ему. В первую очередь это кальциевые каналы, большая часть разновидностей которых ответственна за пассивный транспорт Ca^{2+} в цитозоль по направлению градиента концентрации из мест с его более высоким содержанием – внеклеточной среды, эндоплазматического ретикулума и митохондрий. Но некоторые каналы пассивного транспорта могут закрываться в ответ на повышение входа Ca^{2+} внутрь клетки, например, митохондриальный кальциевый унипортер (MCU). Поддержание низкой внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в основном обеспечивается мембранными насосами – кальциевой АТФазой плазматической мембраны РМСА, кальциевой АТФазой ЭР (SERCA). Также в кальциевом гомеостазе участвуют натриево-кальциевые обменники плазмалеммы и митохондрий.

Иономицин, высокоселективный Ca^{2+} ионофор, более эффективный и специфичный по сравнению с кальцимицином (A23187), повышая уровень Ca^{2+} в цитозоле, резко сокращал продолжительность импульсной активности нейрона и стимулировал оба типа смерти удаленных глиальных клеток во всех препаратах. Это указывает на центральную роль повышения цитозольного Ca^{2+} в цепи событий, ведущей к клеточной смерти. Известно, что иономицин может, в зависимости от условий (в первую очередь внутриклеточной концентрации Ca^{2+}) и типа глии, вызывать некроз и апоптоз глии. Иономицин, будучи антибиотиком узкого спектра для грампозитивных бактерий, также широко применяется в экспериментальной практике как индуктор повышения внутриклеточного кальция. Он способствует переносу ионов кальция не только через плазматическую мембрану, но и через внутриклеточные мембраны. Индуцируемый иономицином апоптоз может задействовать кальций-чувствительные эндонуклеазы [179]. Также иономицин может индуцировать гидролиз фосфоинозитидов и активацию протеинкиназы С.

Кадмий, широко используемый как неспецифический блокатор кальциевых каналов плазматической мембраны нейрона, увеличивал продолжительность

импульсации нейронов, но не влиял на смерть удаленных глиальных клеток. Частичная блокада потенциалзависимых кальциевых каналов кадмием улучшала генерацию потенциала действия в дорсальной колонне спинного мозга крыс после повреждения белого вещества. При этом было установлено, что блокируемые кадмием потенциалзависимые каналы L- и N-типа находились в астроцитах и в олигодендроцитах, но не в аксонах [180]. В нашей модели потенциалзависимые кальциевые каналы, по-видимому, не работали в мембранах глиальных клеток, что связано с невозбудимым типом клеток и, видимо, отсутствием факторов, существенно меняющих их мембранный потенциал.

Тапсигаргин, известный как надежный индуктор апоптоза [181], блокирующий откачку цитозольного кальция в ЭР через кальциевую АТФазу [182], в наших опытах сильно стимулировал апоптоз глии при аксотомии, а также достоверно увеличивал некроз. Интересно, что проапоптотическое действие тапсигаргина проявлялось только в аксотомированных препаратах. Это может быть связано с тем, что аксотомия снижает активность кальциевой АТФазы ЭР, как это, например, происходило в нейронах в опытах Duncan et al. [183], в результате чего ингибирующие действия травмы аксона и модулятора комбинируются, что, однако, подразумевает наличие соответствующего нейроглиального взаимодействия, о котором на данный момент мало что известно.

Негативное воздействие внутриклеточного кальция при повреждении белого вещества в ЦНС опосредуется как рианодиновыми рецепторами, так и IP₃-рецепторами (посредством кальций-зависимых рецепторов высвобождения кальция CICR) [184].

Стимуляция апоптоза блокатором рианодиновых рецепторов дантроленом, известным нейропротектором, была довольно неожиданным результатом. При этом более слабый блокатор рианодиновых рецепторов рианодин не оказал влияния на смерть глиальных клеток. Дантролен, в зависимости от типа проапоптотического воздействия, может защищать или не защищать глию от апоптоза [185,186], однако данных о его защитном действии на глию при

нейротравмах очень мало. Есть данные о неэффективности дантролена в предотвращении некроза и апоптоза глии и даже о тенденции к стимулированию экспрессии проапоптотического белка Вах и клеточной смерти при экспериментальном повреждении спинного мозга у крыс [187].

Можно предположить, что глиальные клетки обладают своими отличными от нейронов особенностями кальциевого гомеостаза и иным участием высвобождения ионов кальция из ЭР в жизненной активности клетки, что, в первую очередь, следует связать с глутаматной и АТФ-сигнализацией.

Активация нейрональных NMDA-рецепторов может вызывать открытие МРТР через повышение уровня кальция и активных форм кислорода и азота, а блокирование МРТР циклоспорином А может снижать вызываемую ими смерть нейронов. Циклоспорин А может также потенциально защищать нейроны от эксайтотоксичности *in vivo* [94].

В нашей модели циклоспорин А не оказал влияния на смерть глиальных клеток при аксотомии и при этом снижал время сохранения импульсной активности МРН. Ввиду изначально низкого уровня апоптоза глиальных клеток, антиапоптотическое действие циклоспоринона, препятствующее выходу индукторов апоптоза из митохондрий, не наблюдалось. После первичной аксотомии происходит спад митохондриального дыхания и гликолиза, что приводит к снижению уровня АТФ и вносит свой вклад в необратимое повреждение аксонов, хотя последние данные показывают, что утрата митохондриального мембранного потенциала может быть довольно поздним событием. Травмированные аксоны являются местами производства активных форм кислорода, перебоев с энергообеспечением и образования высокопроницаемых митохондриальных пор МРТР [1]. Известно, что ингибирование МРТР циклоспорином защищает нейроны при повреждении аксонов [188], а также защищает астроциты от некроза [189]. Повышение концентрации кальция в цитозоле глиальных клеток в результате аксотомии, по всей видимости, снижало эффект блокирования МРТР в глие. Функциональная нагрузка на митохондрии повышается при аксотомии, т.к. они задействуются в клеточном ответе на повреждение. Также в результате

связывания циклоспорина А с циклофилином D может страдать функциональное состояние самих митохондрий, что снижает производство АТФ, и возможность депонирования избытка цитозольного Ca^{2+} . Известно, что аккумуляция Ca^{2+} в митохондриях модулирует окислительное фосфорилирование и производство энергии. Активность пируватдегидрогеназы регулируется Ca^{2+} -зависимым дефосфорилированием, в то время как связывание с Ca^{2+} регулирует активность альфа-кетоглутарат- и изоцитратдегидрогеназ, что повышает уровень NADH, электронный ток и синтез АТФ [190]. Однако избыточное накопление кальция в митохондриях может привести к более быстрому истощению субстратов окислительного фосфорилирования (глюкозы), повышенному производству свободных радикалов, а также, при достаточно сильной кальциевой нагрузке, нарушению работы всего энергетического комплекса. Выход цитохрома с в модели аксотомии РРР, по-видимому, происходит благодаря белку Вах.

Здесь следует упомянуть о достаточно сложном и пока недостаточно изученном явлении кальциевой сигнализации между митохондриями и ЭР, в котором участвуют IP3-рецепторы. В мышечных клетках для захвата кальция митохондриями требуются как функциональные IP3-рецепторы, так и рианодиновые рецепторы [191].

8.5 Роль кальций-зависимых каналов и сигнальных белков в индуцируемой аксотомией смерти удаленных глиальных клеток

В исследованиях барьерных свойств перинейрональной глии у рака была обнаружена связь повышения проницаемости глиальной мембраны для ионов калия с потенциалзависимыми кальциевыми каналами и кальций-активируемыми калиевыми каналами [192]. Ингибирование Ca^{2+} -зависимых калиевых каналов мауротоксином стимулировало апоптоз, но не некроз удаленных глиальных клеток в обоих типах препаратов. Данных по воздействию мауротоксина на клеточную смерть в литературе нет. Блокада каналов KCa3.1 , на которые особенно эффективно действует мауротоксин (согласно данным производителя) в клетках злокачественной глиомы, стимулировала их апоптоз и подавляла

пролиферацию [193]. С другой стороны, ряд работ на других типах клеток показывает, что каналы $K_{Ca3.1}$ в них, наоборот, участвуют в апоптозе. Существует предположение, что блокада Ca^{2+} -зависимых калиевых каналов нарушает митохондриальный гомеостаз клеток, в итоге приводя к апоптозу [10]. Известно, что каналы средней проводимости, к которым относятся каналы $K_{Ca3.1}$, модулируются кальмодулином. Эти же Ca^{2+} -зависимые калиевые каналы участвуют в апоптозе клеток глиобластомы, индуцированном ингибитором протеинкиназы С стауроспорином [10]. Известно, что в данных клетках эти каналы управляют важным элементом апоптоза – апоптотическим уменьшением объема клетки, сопровождающимся также повышением уровня цитозольного Ca^{2+} [194], а у $K_{Ca3.1}$ эта функция известна в Т-лимфоцитах. В целом, на сегодняшний день, данные об антиапоптотических свойствах $K_{Ca3.1}$ превалируют, а проапоптотические свойства этих каналов наблюдаются в определенных типах клеток [195].

В аксотомированном РРР протеинкиназа С, наряду с Ca^{2+} -зависимыми калиевыми каналами, выполняет противоапоптотическую функцию. Механизмы действия данных каналов и протеинкиназы С, вероятно, связаны друг с другом. Известно, что протеинкиназа С участвует в индуцированной аксотомией периферических нервов экспрессии GDNF в шванновских клетках [92]. При этом, стауроспорин, блокируя протеинкиназу С, достоверно снижал некроз УГК при аксотомии. Видимо, протеинкиназа С также участвует в некрозе УГК, но по иному механизму, чем в случае апоптоза. Она может стимулировать вход Ca^{2+} в клетку, фосфорилируя кальциевые каналы в плазматической мембране [196], а также регулировать уровень цитозольного кальция, стимулируя кальциевые насосы [197].

Кальмодулин участвует в хранении Ca^{2+} в клеточных депо, однако значимость его роли в цитозольной регуляции кальциевого гомеостаза еще не до конца изучена. Ингибирование кальмодулина флуфеназином в наших опытах не повлияло на смерть удаленных глиальных клеток. В протеомном исследовании влияния аксотомии на вентральную нервную цепочку, проведенном в нашей

лаборатории, наблюдалось повышение экспрессии кальмодулина [86]. В случае, если в РРР тоже имеет место индуцированная аксотомией гиперэкспрессия кальмодулина, эффекты ингибирования кальмодулина флуфеназином и индуцированной аксотомией гиперэкспрессии кальмодулина могут взаимно подавляться.

Альфа- и бета- изоформы кальмодулинкиназы-II играют разную функциональную роль в клетке, по-разному экспрессируются в ходе развития клетки и претерпевают различные изменения экспрессии вследствие аксотомии [87]. В наших опытах наблюдался противонекротический эффект ингибитора кальмодулинкиназы-II KN-93. В литературе существует ряд свидетельств об участии кальмодулинкиназы II в смерти различных видов клеток – кардиомиоцитов [198], клеток трубчатого эпителия почек [199], а также нервных клеток мозга [200,201], в основном в условиях гипоксии/ишемии/реперфузии. Возможно, при аксотомии происходит оксидативная активация кальмодулинкиназы-II, которая вносит свой вклад в индукцию некроза клеток.

Таким образом, повышение некроза удаленных глиальных клеток при аксотомии было связано с повышением уровня Ca^{2+} в цитозоле, нехваткой внеклеточного Ca^{2+} , недостаточной работой АТФазы SERCA по закачке Ca^{2+} в ЭР и участием протеинкиназы С и кальмодулинкиназы II. Стимуляция апоптоза удаленной глии при аксотомии была связана с действием внеклеточного Ca^{2+} , проникновением Ca^{2+} через плазматическую мембрану в цитозоль, недостаточной откачкой Ca^{2+} из цитозоля через SERCA, выходом Ca^{2+} в цитозоль через рианодинорные рецепторы, притоком ионов калия через Ca^{2+} -зависимые K^+ каналы и работой протеинкиназы С. Следовательно: 1) $[Ca^{2+}]_o$ необходим для развития апоптоза УГК при аксотомии; 2) работа SERCA защищает УГК от АТ-индуцированного апоптоза.

Результаты экспериментов обобщены в концептуальной схеме (Рис. 38). Аксотомия вызывает кальций-опосредованное пространственно-отдаленное воздействие на физиологическую активность нейрона и смерть прилегающей к нему глии. Первичный кальциевый сигнал о повреждении передается ретроградно

через аксон, как известно в литературе, в виде индуцированной волны вторичного входа кальция в аксоплазму [8]. В глии можно гипотетически предположить ретроградную кальциевую волну вдоль глиальной оболочки через щелевые контакты и перфорации.

Индуцированное аксотомией повышение уровня внутриклеточного кальция в нейроне опосредует ускорение прекращения его импульсной активности, но этот эффект отчасти ослабляется МРТР, через которые ионы кальция выходят из митохондриальных депо в цитозоль. Индуцированное аксотомией повышение уровня внутриклеточного кальция в удаленных глиальных клетках опосредованно стимулирует их некроз или апоптоз, однако также включает и защитные факторы, такие как протеинкиназа С и кальций-зависимые калиевые каналы.

8.6 Дальнейшие перспективы исследований

Исследования свидетельствуют о том, что аксотомия стимулирует активность кальциевой АТФазы плазматической мембраны (PMCA), которая регулирует внутриклеточную концентрацию кальция, выводя последний из клетки [202]. Кроме того, было обнаружено, что аксотомия седалищного нерва стимулирует экспрессию PMCA в корешковых ганглиях [203]. В настоящее время ингибиторы PMCA (caloxin и пр.) труднодоступны, поэтому используются косвенные методы ингибирования этого насоса, например, путем повышения pH физиологического раствора на фоне блокирования SERCA [202]. В перспективе нужно изучить эту мишень на модели аксотомии МРН-Г.

Инозитолтрифосфатные рецепторы (IP3R) являются, наряду с RyR, путем выхода Ca^{2+} из ЭР. Кальциевая сигнализация в астроглие обеспечивается совместной работой IP3R и депо-регулируемых кальциевых каналов (Store-Operated Ca^{2+} Channels, SOCC) в плазматической мембране, относящихся к семейству Orai и действующие совместно с молекулой STIM 1 и 2, передающей им сигнал об опустошении ЭР [204]. Как и PMCA, эти каналы могут давать вклад в АТ-индуцированное повышение кальциевой концентрации в удаленной от места повреждения глии.

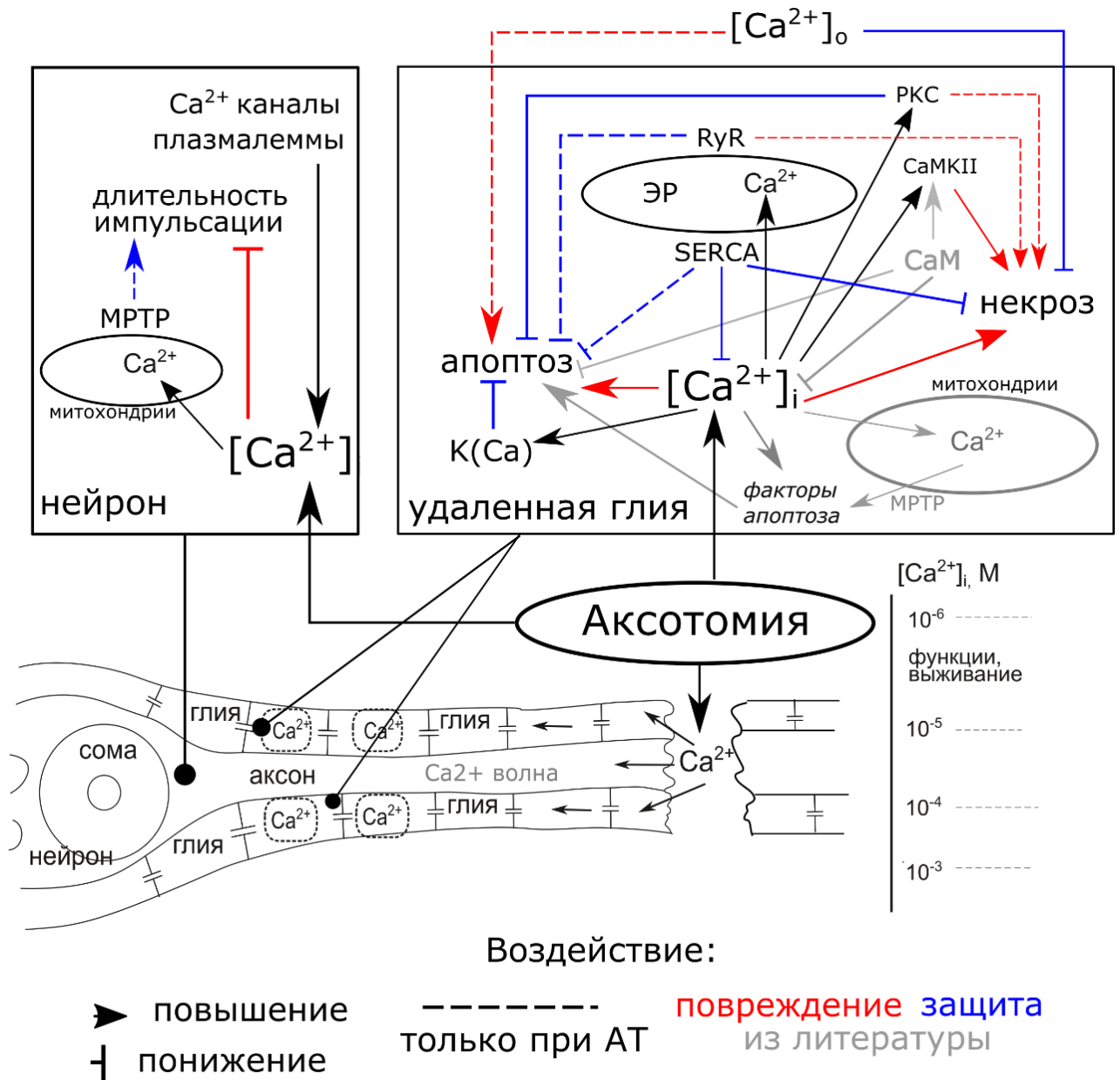


Рисунок 38. Схема участия ионов Ca²⁺, Ca²⁺ каналов и белков Ca²⁺-зависимого пути в смерти или выживании УГК РРР после АТ на основе полученных экспериментальных данных. АТ провоцирует вход Ca²⁺ в аксолему и повышение уровня Ca²⁺ в цитозоле нейрона и глии, при этом сокращая время активности нейрона. В то же время выход Ca²⁺ из митохондрий через МРТР продлевает время импульсации МРН. Повышение [Ca²⁺]_i стимулирует апоптоз и некроз УГК, при этом работа SERCA, выкачивающей Ca²⁺ из цитозоля, защищает УГК от некроза и апоптоза. РКС и СаМКII участвуют в некрозе УГК, однако РКС препятствует апоптозу УГК. Будучи активированными ионами Ca²⁺, Ca²⁺-зависимые К⁺ каналы К(Ca) защищают УГК от апоптоза. [Ca²⁺]_o стимулирует апоптоз, но снижает некроз УГК.

Креатин является эндогенной аминокислотой, введение которой может увеличить запасы ее макроэргического метаболита фосфокреатина. Также креатин может напрямую действовать на аксоны центральной нервной системы, ингибируя кальций-индуцируемую активацию МРТР, поддерживая уровень АТФ, сохраняя нормальный митохондриальный потенциал и снижая внутримитохондриальный уровень кальция. Перспективность креатина как нейропротектора подкрепляется успешными опытами его применения у детей с серьезными черепно-мозговыми травмами, где достигалось частичное предотвращение посттравматических симптомов и улучшение таких параметров, как необходимость пребывания в реанимации и когнитивные показатели [1].

Митохондриальные каналы – митохондриальный кальциевый унипортер (MCU), через которые Ca^{2+} входит в митохондрии, и митохондриальный натриево-кальциевый обменник (NCX), выводящий Ca^{2+} из митохондрий, регулируют движение Ca^{2+} между митохондриями и цитозолем, и, соответственно, участвуют в кальциевом гомеостазе и выживании клетки. Для ингибирования MCU в настоящее время используются комплексы рутения Ru360 и Ru265 [205]. Для митохондриальных NCX также существуют селективные ингибиторы (CGP-37157) [206].

Требует ответа и вопрос о характере причинно-следственного механизма, связывающего повреждение аксона и подъем внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в удаленной глии. Для изучения возможного механизма АТ-индуцированного ретроградного прохождения кальциевой волны вдоль глиальной оболочки имеет смысл применить ингибиторы щелевых контактов (иннексинов в случае беспозвоночных), например, арахидоновую кислоту.

Таким образом, перспективными направлениями для дальнейших исследований участия кальциевых механизмов в ответе нейронов и глии на повреждение представляются анализ участия АТФаз клеточной мембраны, натриево-кальциевых обменников, щелевых контактов, также IP3R-каналов и связанной с ними депо-зависимой регуляции цитозольного кальция, а также дифференцированных кальций-зависимых калиевых каналов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Черепно-мозговая травма является одной из главных причин смертности в молодом и среднем возрасте, а травмы спинного мозга – одной из главных причин инвалидности, ограничивающей подвижность у людей всех возрастов. Травмы периферической нервной системы остаются растущим социально-экономическим бременем, поражающим, в основном, молодое работающее население. Существующие клинические методы лечения, необходимые для предотвращения смерти и дегенерации нервных клеток в первые часы после травмы, дают в целом неудовлетворительный результат, при котором остается значительная потеря сенсорных либо моторных функций. Одним из условий выздоровления после таких травм является сохранение жизнеспособности поврежденных нейронов и глии, которое, в свою очередь, зависит от ряда факторов, включая кальциевый гомеостаз и нейроглиальные взаимодействия. На данный момент не создано достаточно эффективных лекарственных препаратов и методов лечения, направленных на оба этих фактора жизнеспособности нейронов и учитывающих их связь. Настоящая работа изучает участие кальций-зависимого сигнального пути в реакции системы “нейрон-глия” на аксотомию, используя относительно простую и удобную для электрофизиологических и флуоресцентных методов исследования модель изолированного рецептора растяжения рака, окруженного многослойной глиальной оболочкой.

В ходе работы использовалась специально разработанная новая методика изоляции интактного рецептора растяжения рака вместе с ганглием, в который рецепторные нейроны посылают свои аксоны, что дает возможность использовать такие препараты в качестве контролей для препаратов с изначально перерезанными аксонами, которые ранее использовались в экспериментах на данном объекте.

В опытах по наблюдению кальциевой динамики при аксотомии было обнаружено, что она индуцирует значительный подъем уровня кальция не только в цитозоле нейрона, но и в прилегающей к нему глиальной оболочке, не

подвергающейся механическому повреждению. Было сделано предположение о ретроградной индуцированной аксотомией кальциевой волне вдоль глиальной оболочки и о возможных механизмах ее передачи.

Аксотомия не влияет на характер импульсной активности МРН, но сокращает ее продолжительность. Обусловленное повреждением аксона прекращение импульсной активности нейрона связано с повышением внутриклеточного уровня кальция в нейронах, которое обусловлено входом кальция в цитозоль через специфические каналы клеточной мембраны, недостаточной откачкой кальция в ЭР кальциевой АТФазой, а также недостаточным образованием митохондриальных пор МРТР, влекущим за собой ослабление энергетической функции митохондрий.

Было обнаружено, что в интактных препаратах, в отличие от аксотомированных, апоптоз удаленных глиальных клеток прекращает нарастать спустя 8 часов после изоляции. Опыты с поддержанием постоянного состава внешней среды путем равномерной перфузии физиологическим раствором показали, что для апоптоза удаленной глии необходимо присутствие продуктов клеточного метаболизма в среде.

Смерть и выживание глии имеют существенное значение в восстановлении организма после нейротравмы, где, с одной стороны, глиа выполняет протекторную роль, а с другой – не должна препятствовать процессам регенерации. То, что должно происходить с глией при ответе на травму – некий баланс между выживанием и пролиферацией с одной стороны, и апоптозом, управляемым некрозом и аутофагией – с другой. Очевидно, что одни способы изменения кальциевой концентрации повышают либо уменьшают и некроз, и апоптоз, а другие, в зависимости от условий, действуют более избирательно, способствуя или препятствуя тому или иному типу клеточной смерти. В данной работе достаточно высокая внеклеточная концентрация Ca^{2+} стимулировала апоптоз и защищала от некроза удаленные клетки глии при повреждении аксона, а риаудиновые рецепторы и протеинкиназа С действовали противоположным

образом. Ca^{2+} -зависимые калиевые каналы регулировали только апоптоз глии, а кальмодулинкиназа II – только некроз.

Важным моментом представляется то, что чувствительность (уязвимость) к активизации или блокировке определенных сигнальных путей, причем для определенных типов клеточной смерти, резко повышается при АТ, например, когда глиальные клетки становятся подверженными апоптозу при недостаточной активности Ca^{2+} АТФазы эндоплазматического ретикулама, и некрозу – при активизации протеинкиназы С.

Полученные данные об участии механизмов кальциевой регуляции в индуцированной аксотомией смерти удаленных глиальных клеток указывают на некоторые возможные направления поиска новых и развития существующих фармакологических методов воздействия, защищающих нейроны и глию от последствий нейротравм.

Экспериментальные данные о кальциевой динамике и клеточной смерти в настоящей работе получены биофизическими методами флуоресцентной микроскопии (двойное флуорохромирование и флуоресцентные зонды), а в ходе экспериментов производилось воздействие на ионные каналы и клеточные мембраны. Выводы работы, в свою очередь, основаны на этих данных. Таким образом, диссертация соответствует паспорту специальности 03.00.02 «Биофизика».

ВЫВОДЫ

1. Аксотомия способствует прекращению импульсной активности нейрона и смерти сателлитной глии вдали от места повреждения.

2. Уровень Ca^{2+} в нейроне и удаленной глие повышается вследствие аксотомии и опосредует индуцируемые ей некроз и апоптоз удаленной глии, а также ускорение прекращения импульсной активности нейрона.

3. При аксотомии высокий уровень внеклеточного Ca^{2+} стимулирует апоптоз удаленной глии, но защищает ее от некроза.

4. При аксотомии работа кальциевой АТФазы эндоплазматического ретикулума защищает удаленную глию от апоптоза и некроза, риаудиновые рецепторы участвуют в некрозе удаленной глии, при этом защищая ее от апоптоза, а высокопроницаемые митохондриальные поры способствуют сохранению функциональной активности нейрона.

5. При аксотомии кальций-зависимые калиевые каналы и протеинкиназа С защищают глию от апоптоза, при этом протеинкиназа С и кальмодулинкиназа II участвуют в некрозе глии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hill C.S., Coleman M.P., Menon D.K. Traumatic Axonal Injury: Mechanisms and Translational Opportunities // *Trends Neurosci.* 2016. Vol. 39, № 5. P. 311–324.
2. Kobeissy F.H. Brain Neurotrauma // *Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects.* CRC Press/Taylor & Francis, 2015.
3. Giaume C. et al. Connexin and pannexin hemichannels in brain glial cells: properties, pharmacology, and roles. // *Front. Pharmacol. Frontiers*, 2013. Vol. 4. P. 88.
4. Largo C., Cuevas P., Herreras O. Is glia dysfunction the initial cause of neuronal death in ischemic penumbra? // *Neurol. Res.* 1996. Vol. 18, № 5. P. 445–448.
5. Whiteside G. et al. Differential time course of neuronal and glial apoptosis in neonatal rat dorsal root ganglia after sciatic nerve axotomy. // *Eur. J. Neurosci.* 1998. Vol. 10, № 11. P. 3400–3408.
6. Gemes G. et al. Depletion of Calcium Stores in Injured Sensory Neurons- Anatomic and Functional Correlates // *Anesthesiology.* 2009. Vol. 111, № 2. P. 393–405.
7. Marambaud P., Dreses-Werringloer U., Vingtdeux V. Calcium signaling in neurodegeneration. // *Mol. Neurodegener. BioMed Central*, 2009. Vol. 4, № 1. P. 20.
8. Rishal I., Fainzilber M. Axon-soma communication in neuronal injury // *Nat. Rev. Neurosci.* Nature Publishing Group, 2014. Vol. 15, № 1. P. 32–42.
9. Siedler D.G. et al. Diffuse axonal injury in brain trauma: insights from alterations in neurofilaments. // *Front. Cell. Neurosci. Frontiers*, 2014. Vol. 8, № December. P. 429.
10. Kondratskyi A. et al. Ion channels in the regulation of apoptosis. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2015. Vol. 1848, № 10 Pt B. P. 2532–2546.
11. Узденский А.Б. Клеточно-молекулярные механизмы фотодинамической терапии. Санкт-Петербург: Наука, 2010.

12. Uzdensky A. et al. Protection of the Crayfish Mechanoreceptor Neuron and Glial Cells from Photooxidative Injury by Modulators of Diverse Signal Transduction Pathways // *Molecular Neurobiology*. The Boar's Head Inn, Charlottesville, Virginia: Springer US, 2014. Vol. 52, № 2. P. 40.
13. Geuna S. et al. Chapter 3 Histology of the Peripheral Nerve and Changes Occurring During Nerve Regeneration // *International review of neurobiology*. 2009. Vol. 87. P. 27–46.
14. Waller A. Experiments on the Section of the Glosso-Pharyngeal and Hypoglossal Nerves of the Frog, and Observations of the Alterations Produced Thereby in the Structure of Their Primitive Fibres. // *Edinburgh Med. Surg. J.* 1851. Vol. 76, № 189. P. 369–376.
15. Morris J.H., Hudson A.R., Weddell G. A study of degeneration and regeneration in the divided rat sciatic nerve based on electron microscopy. II. The development of the "regenerating unit". // *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 1972. Vol. 124, № 1. P. 103–130.
16. Koliatsos V.E., Price D.L. Axotomy as an experimental model of neuronal injury and cell death. // *Brain Pathol.* 1996. Vol. 6, № 4. P. 447–465.
17. Rodríguez-Muela N., Boya P. Axonal damage, autophagy and neuronal survival // *Autophagy*. 2012. Vol. 8, № 2. P. 286–288.
18. Kucenas S. Perineurial Glia // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2015. Vol. 7, № 6. P. a020511.
19. Kindy M.S., Vertegel A. Nanoparticles for neurotherapeutic drug delivery in neurodegenerative disorders: Application in neurotrauma // *Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects* / ed. Kobeissy F.H. CRC Press, 2015. 581–586 p.
20. Johnson V.E., Stewart W., Smith D.H. Axonal pathology in traumatic brain injury // *Exp. Neurol.* 2013. Vol. 246. P. 35–43.
21. Laskowski R.A., Creed J.A., Raghupathi R. Pathophysiology of Mild TBI // *Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects*. CRC Press, 2015. P. 35–43.

22. Büki A., Povlishock J.T. All roads lead to disconnection? - Traumatic axonal injury revisited // *Acta Neurochir. (Wien)*. 2006. Vol. 148, № 2. P. 181–193.
23. Maxwell W.L. Development of Concepts in the Pathology of Traumatic Axonal and Traumatic Brain Injury // *Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects*. 2015. 1–33 p.
24. Van Niekerk E. a et al. Molecular and Cellular Mechanisms of Axonal Regeneration After Spinal Cord Injury // *Mol. Cell. Proteomics*. 2016. Vol. 15, № 2. P. 394–408.
25. Hendricks B.K., Shi R. Mechanisms of neuronal membrane sealing following mechanical trauma // *Neurosci. Bull. Springer*, 2014. Vol. 30, № 4. P. 627–644.
26. Kirkcaldie M.T.K., Collins J.M. The axon as a physical structure in health and acute trauma // *J. Chem. Neuroanat. Elsevier*, 2016. Vol. 76. P. 9–18.
27. Ertürk A. et al. Disorganized microtubules underlie the formation of retraction bulbs and the failure of axonal regeneration. // *J. Neurosci*. 2007. Vol. 27, № 34. P. 9169–9180.
28. Plunet W., Kwon B.K., Tetzlaff W. Promoting axonal regeneration in the central nervous system by enhancing the cell body response to axotomy // *J. Neurosci. Res*. 2002. Vol. 68, № 1. P. 1–6.
29. Dusart I. et al. Cell death and axon regeneration of Purkinje cells after axotomy: Challenges of classical hypotheses of axon regeneration // *Brain Res. Rev*. 2005. Vol. 49, № 2. P. 300–316.
30. Rolls A., Shechter R., Schwartz M. The bright side of the glial scar in CNS repair // *Nat. Rev. Neurosci*. 2009. Vol. 10, № 3. P. 235–241.
31. Wang X. et al. Axonal regeneration induced by blockade of glial inhibitors coupled with activation of intrinsic neuronal growth pathways // *Exp. Neurol*. 2012. Vol. 237, № 1. P. 55–69.
32. Hilaire C. et al. Calcium dependence of axotomized sensory neurons excitability. // *Neurosci. Lett*. 2005. Vol. 380, № 3. P. 330–334.
33. Bedi S.S., Cai D., Glanzman D.L. Effects of axotomy on cultured sensory neurons of *Aplysia*: long-term injury-induced changes in excitability and morphology are

- mediated by different signaling pathways. // *J. Neurophysiol.* 2008. Vol. 100, № 6. P. 3209–3224.
34. Tsantoulas C. et al. Kv2 dysfunction after peripheral axotomy enhances sensory neuron responsiveness to sustained input. // *Exp. Neurol.* 2014. Vol. 251. P. 115–126.
 35. Muramoto A. Ionic Dependence of the Axotomy-Induced Long-Lasting Firing in an Identified Crayfish Motoneuron // *Zoolog. Sci.* 1998. Vol. 15, № 1. P. 11–18.
 36. De La Cruz R.R., Delgado-García J.M., Pastor Á.M. Discharge characteristics of axotomized abducens internuclear neurons in the adult cat // *J. Comp. Neurol.* 2000. Vol. 427, № 3. P. 391–404.
 37. Perlson E. et al. From snails to sciatic nerve: Retrograde injury signaling from axon to soma in lesioned neurons. // *J. Neurobiol.* 2004. Vol. 58, № 2. P. 287–294.
 38. Abe N., Cavalli V. Nerve injury signaling // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2008. Vol. 18, № 3. P. 276–283.
 39. Maxwell W.L. Damage to myelin and oligodendrocytes: a role in chronic outcomes following traumatic brain injury? // *Brain Sci. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 2013. Vol. 3, № 3. P. 1374–1394.
 40. Martin L.J. et al. Early events of target deprivation/axotomy-induced neuronal apoptosis in vivo: oxidative stress, DNA damage, p53 phosphorylation and subcellular redistribution of death proteins // *J. Neurochem.* 2003. Vol. 85, № 1. P. 234–247.
 41. Liu Z., Martin L.J. Motor neurons rapidly accumulate DNA single-strand breaks after in vitro exposure to nitric oxide and peroxynitrite and in vivo axotomy // *J. Comp. Neurol.* 2001. Vol. 432, № 1. P. 35–60.
 42. Sayır F. et al. Effects of crush and axotomy on oxidative stress and some trace element levels in phrenic nerve of rats // *Brain Res. Bull.* 2013. Vol. 92. P. 84–88.
 43. Kuwada B.Y.J.Y. et al. Transient, axotomy-induced changes in the membrane properties of crayfish central neurones. // *J. Physiol.* 1981. Vol. 317. P. 435–461.
 44. Kuwada J.Y. Ionic and metabolic dependence of axotomy-induced somatic membrane changes in crayfish. // *J. Physiol.* 1981. Vol. 317, № 1. P. 463–473.

45. Nadeau J.R., Wilson-Gerwing T.D., Verge V.M.K. Induction of a reactive state in perineuronal satellite glial cells akin to that produced by nerve injury is linked to the level of p75NTR expression in adult sensory neurons // *Glia*. 2014. Vol. 62, № 5. P. 763–777.
46. Hanani M. Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function // *Brain Res. Rev. Brain Res Brain Res Rev*, 2005. Vol. 48, № 3. P. 457–476.
47. Meiri H., Dormann A., Spira M.E. Comparison of ultrastructural changes in proximal and distal segments of transected giant fibers of the cockroach *Periplaneta americana*. // *Brain Res*. 1983. Vol. 263, № 1. P. 1–14.
48. Suadican S.O. et al. Bidirectional calcium signaling between satellite glial cells and neurons in cultured mouse trigeminal ganglia // *Neuron Glia Biol. Neuron Glia Biol*, 2010. Vol. 6, № 1. P. 43–51.
49. Spray D.C. et al. Gap junction mediated signaling between satellite glia and neurons in trigeminal ganglia // *Glia*. John Wiley and Sons Inc., 2019. Vol. 67, № 5. P. 791–801.
50. Cherkas P.S. et al. The effects of axotomy on neurons and satellite glial cells in mouse trigeminal ganglion. // *Pain*. 2004. Vol. 110, № 1–2. P. 290–298.
51. Hanani M. Intercellular communication in sensory ganglia by purinergic receptors and gap junctions: Implications for chronic pain // *Brain Res*. 2012. Vol. 1487. P. 183–191.
52. Aldskogius H., Kozlova E.N. Central neuron-glial and glial-glial interactions following axon injury // *Prog. Neurobiol*. 1998. Vol. 55, № 1. P. 1–26.
53. Hurley S.D., Coleman P.D. Facial nerve axotomy in aged and young adult rats: Analysis of the glial response // *Neurobiol. Aging*. 2003. Vol. 24, № 3. P. 511–518.
54. Chandross K.J. Nerve injury and inflammatory cytokines modulate gap junctions in the peripheral nervous system. // *Glia*. 1998. Vol. 24, № 1. P. 21–31.
55. Zohar O. Electrophysiological and ultrastructural changes in severed motor axons of the crayfish // *Neurosci. Res*. 2001. Vol. 41, № 2. P. 151–159.
56. Fedorenko G. et al. The paired neuroglial and interglial membranes in the crayfish

- stretch receptor and their local disorganization // *J. Neurosci. Res.* 2015. Vol. 93, № 5. P. 707–713.
57. Fedorenko G.M., Uzdensky A.B. Ultrastructure of neuroglial contacts in crayfish stretch receptor // *Cell Tissue Res.* 2009. Vol. 337, № 3. P. 477–490.
58. Fedorenko G.M., Uzdensky A.B. Cellular Structures Involved in the Transport Processes and Neuroglial Interactions in the Crayfish Stretch Receptor // *J. Integr. Neurosci.* 2009. Vol. 08, № 04. P. 433–440.
59. Fedorenko G.M., Uzdensky A.B. Dynamics of ultrastructural changes in the isolated crayfish mechanoreceptor neuron under photodynamic impact // *J. Neurosci. Res.* 2008. Vol. 86, № 6. P. 1409–1416.
60. Fedorenko G.M. et al. Dynamics of ultrastructural alterations in photosensitized crayfish glial and neuronal cells: Structures involved in transport processes and neuroglial interactions // *J. Neurosci. Res.* 2011. Vol. 89, № 3. P. 341–351.
61. Lopez-Verrilli M.A., Court F.A. Transfer of vesicles from Schwann cells to axons: A novel mechanism of communication in the peripheral nervous system // *Front. Physiol.* 2012. Vol. 3 JUN.
62. SHAGASS C., SCHWARTZ M. Evoked cortical potentials and sensation in man. // *J. Neuropsychiatr.* / ed. Bähr M. Weinheim, FRG: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 1961. Vol. 2. P. 262–270.
63. Twiss J.L., Fainzilber M. Ribosomes in axons - scrounging from the neighbors? // *Trends Cell Biol.* 2009. Vol. 19, № 5. P. 236–243.
64. Van Adel B.A. et al. Ciliary neurotrophic factor protects retinal ganglion cells from axotomy-induced apoptosis via modulation of retinal glia in vivo // *J. Neurobiol.* 2005. Vol. 63, № 3. P. 215–234.
65. Rose J. et al. Mitochondrial dysfunction in glial cells: Implications for neuronal homeostasis and survival. // *Toxicology. NIH Public Access*, 2017. Vol. 391. P. 109–115.
66. Staal J.A. et al. Cyclosporin-A treatment attenuates delayed cytoskeletal alterations and secondary axotomy following mild axonal stretch injury // *Dev. Neurobiol.* 2007. Vol. 67, № 14. P. 1831–1842.

67. Brini M. et al. Neuronal calcium signaling: function and dysfunction // *Cell. Mol. Life Sci.* Springer Basel, 2014. Vol. 71, № 15. P. 2787–2814.
68. Nilsson P. et al. Calcium movements in traumatic brain injury: the role of glutamate receptor-operated ion channels. // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1996. Vol. 16, № 2. P. 262–270.
69. Boudes M., Scamps F. Calcium-activated chloride current expression in axotomized sensory neurons: what for? // *Front. Mol. Neurosci.* 2012. Vol. 5, № March. P. 35.
70. Berliocchi L., Bano D., Nicotera P. Ca²⁺ signals and death programmes in neurons. // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2005. Vol. 360, № 1464. P. 2255–2258.
71. Moser, Mair, Fresser. Extracellular Ca²⁺ and its effect on acid extrusion in the crayfish stretch receptor neurone // *J. Exp. Biol.* 1996. Vol. 199, № Pt 8. P. 1781–1789.
72. Hogan Q. et al. Restoration of calcium influx corrects membrane hyperexcitability in injured rat dorsal root ganglion neurons // *Anesth. Analg.* 2008. Vol. 107, № 3. P. 1045–1051.
73. Sullivan P.G.P.G. et al. Mitochondrial permeability transition in CNS trauma: Cause or effect of neuronal cell death? // *J. Neurosci. Res.* 2005. Vol. 79, № 1–2. P. 231–239.
74. Rigaud M. et al. Axotomy depletes intracellular calcium stores in primary sensory neurons. // *Anesthesiology.* 2009. Vol. 111, № 2. P. 381–392.
75. Лобанов А.В., Узденский А.Б. Защита кальмодулином нейронов и глиальных клеток речного рака от смерти, вызванной аксотомией и изоляцией // *Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки.* 2007. Vol. 3. P. 65–67.
76. Vanderluit J.L. et al. In vivo application of mitochondrial pore inhibitors blocks the induction of apoptosis in axotomized neonatal facial motoneurons. // *Cell Death Differ.* 2003. Vol. 10, № 9. P. 969–976.
77. Schwab B.L. et al. Cleavage of plasma membrane calcium pumps by caspases: A

- link between apoptosis and necrosis // *Cell Death Differ.* Nature Publishing Group, 2002. Vol. 9, № 8. P. 818–831.
78. Orrenius S., Gogvadze V., Zhivotovsky B. Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015. Vol. 460, № 1. P. 72–81.
79. Verkhatsky A., Parpura V. Store-operated calcium entry in neuroglia // *Neuroscience Bulletin.* Science Press, 2014. Vol. 30, № 1. P. 125–133.
80. Sánchez-Vives M. V. et al. Axotomy-induced Changes in Ca²⁺ Homeostasis in Rat Sympathetic Ganglion Cells // *Eur. J. Neurosci.* 1994. Vol. 6, № 1. P. 9–17.
81. Nejatbakhsh N. et al. Caltubin, a novel molluscan tubulin-interacting protein, promotes axonal growth and attenuates axonal degeneration of rodent neurons. // *J. Neurosci.* 2011. Vol. 31, № 43. P. 15231–15244.
82. Rizzuto R. et al. Ca²⁺ transfer from the ER to mitochondria: When, how and why // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 2009. Vol. 1787, № 11. P. 1342–1351.
83. Szlufcik K. et al. Uncoupled IP₃ receptor can function as a Ca²⁺-leak channel: cell biological and pathological consequences. // *Biol. Cell.* 2006. Vol. 98, № 1. P. 1–14.
84. Vervliet T. et al. Bcl-2 binds to and inhibits ryanodine receptors // *J. Cell Sci.* 2014. Vol. 127, № 12. P. 2782–2792.
85. Marchi S. et al. Mitochondrial and endoplasmic reticulum calcium homeostasis and cell death. // *Cell Calcium.* Elsevier Ltd, 2018. Vol. 69. P. 62–72.
86. Demyanenko S., Dzreyan V., Uzdensky A. Axotomy-Induced Changes of the Protein Profile in the Crayfish Ventral Cord Ganglia // *J. Mol. Neurosci.* Springer, 2019. Vol. 68, № 4. P. 667–678.
87. Lund L.M., McQuarrie I.G. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II expression in motor neurons: effect of axotomy. // *J. Neurobiol.* 1997. Vol. 33, № 6. P. 796–810.
88. Bangaru M.L.Y. et al. Differential expression of CaMKII isoforms and overall kinase activity in rat dorsal root ganglia after injury. // *Neuroscience.* 2015. Vol. 300. P. 116–127.

89. Elzière L. et al. CaMKK-CaMK1a, a New Post-Traumatic Signalling Pathway Induced in Mouse Somatosensory Neurons // PLoS One / ed. Hetman M. 2014. Vol. 9, № 5. P. e97736.
90. Yamada E., Kataoka H., Hazama F. Specific expression of type II protein kinase c after axotomy in the dorsal motor nucleus of the vagus nerve and the hypoglossal nucleus. // Brain Res. 1994. Vol. 639, № 2. P. 341–346.
91. Ghomari A.M. et al. Inhibition of protein kinase C prevents Purkinje cell death but does not affect axonal regeneration. // J. Neurosci. 2002. Vol. 22, № 9. P. 3531–3542.
92. Xu P. et al. Nerve injury induces glial cell line-derived neurotrophic factor (gdnf) expression in schwann cells through purinergic signaling and the pkc-pkd pathway // Glia. 2013. Vol. 61, № 7. P. 1029–1040.
93. Dassel D. et al. Differential expression of calbindin and calmodulin in motoneurons after hypoglossal axotomy. // Brain Res. 1998. Vol. 786, № 1–2. P. 181–188.
94. Fricker M. et al. Neuronal cell death // Physiological Reviews. American Physiological Society, 2018. Vol. 98, № 2. P. 813–880.
95. Ghosh-Roy A. et al. Calcium and cyclic AMP promote axonal regeneration in Caenorhabditis elegans and require DLK-1 kinase. // J. Neurosci. 2010. Vol. 30, № 9. P. 3175–3183.
96. Jiao J. et al. Bcl-2 enhances Ca²⁺ signaling to support the intrinsic regenerative capacity of CNS axons // EMBO J. 2005. Vol. 24, № 5. P. 1068–1078.
97. Li L. et al. Rescue of adult mouse motoneurons from injury-induced cell death by glial cell line-derived neurotrophic factor. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1995. Vol. 92, № October. P. 9771–9775.
98. Sendtner M., Kreutzberg G.W., Thoenen H. Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. // Nature. 1990. Vol. 345, № 6274. P. 440–441.
99. Sendtner M. et al. Brain-derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section. // Nature. 1992. Vol. 360, №

6406. P. 757–759.
100. Yan Q., Elliott J., Snider W.D. Brain-derived neurotrophic factor rescues spinal motor neurons from axotomy-induced cell death. // *Nature*. 1992. Vol. 360, № 6406. P. 753–755.
 101. Gordon T. The physiology of neural injury and regeneration: The role of neurotrophic factors // *J. Commun. Disord.* 2010. Vol. 43, № 4. P. 265–273.
 102. Grider M.H. et al. In situ expression of brain-derived neurotrophic factor or neurotrophin-3 promotes sprouting of cortical serotonergic axons following a neurotoxic lesion // *J. Neurosci. Res.* 2005. Vol. 82, № 3. P. 404–412.
 103. Watanabe M., Fukuda Y. Survival and axonal regeneration of retinal ganglion cells in adult cats // *Prog. Retin. Eye Res.* 2002. Vol. 21, № 6. P. 529–553.
 104. Michael G.J. et al. Axotomy results in major changes in BDNF expression by dorsal root ganglion cells: BDNF expression in large trkB and trkC cells, in pericellular baskets, and in projections to deep dorsal horn and dorsal column nuclei. // *Eur. J. Neurosci.* 1999. Vol. 11, № 10. P. 3539–3551.
 105. Iwasaki Y., Ikeda K. Prevention by insulin-like growth factor-I and riluzole in motor neuron death after neonatal axotomy // *J. Neurol. Sci.* 1999. Vol. 169, № 1–2. P. 148–155.
 106. Schmalbruch H., Rosenthal a. Neurotrophin-4/5 postpones the death of injured spinal motoneurons in newborn rats. // *Brain Res.* 1995. Vol. 700, № 1–2. P. 254–260.
 107. Wilcox B.J. et al. Nerve growth factor prevents apoptotic cell death in injured central cholinergic neurons // *J Comp Neurol.* 1995. Vol. 359, № 4. P. 573–585.
 108. Henderson C.E. et al. GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. // *Science*. 1994. Vol. 266, № 5187. P. 1062–1064.
 109. Kirsch M., Terheggen U., Hofmann H.D. Ciliary neurotrophic factor is an early lesion-induced retrograde signal for axotomized facial motoneurons // *Mol. Cell. Neurosci.* 2003. Vol. 24, № 1. P. 130–138.
 110. Shulga A. et al. Posttraumatic GABAA-Mediated $[Ca^{2+}]_i$ Increase Is Essential for the Induction of Brain-Derived Neurotrophic Factor-Dependent Survival of

- Mature Central Neurons // *J. Neurosci.* 2008. Vol. 28, № 27. P. 6996–7005.
111. Nakamura T.Y. et al. Novel role of neuronal Ca²⁺ sensor-1 as a survival factor up-regulated in injured neurons // *J. Cell Biol.* 2006. Vol. 172, № 7. P. 1081–1091.
112. Torres A. et al. Extracellular Ca²⁺ Acts as a Mediator of Communication from Neurons to Glia // *Sci. Signal. NIH Public Access*, 2012. Vol. 5, № 208. P. ra8–ra8.
113. Salter M.W., Hicks J.L. ATP-evoked increases in intracellular calcium in neurons and glia from the dorsal spinal cord // *J. Neurosci.* *J Neurosci*, 1994. Vol. 14, № 3 II. P. 1563–1575.
114. Ben-Yaakov K., Fainzilber M. Retrograde injury signaling in lesioned axons. // *Results Probl. Cell Differ.* 2009. Vol. 48. P. 327–338.
115. Siebert J.R., Middleton F.A., Stelzner D.J. Long descending cervical propriospinal neurons differ from thoracic propriospinal neurons in response to low thoracic spinal injury. // *BMC Neurosci.* 2010. Vol. 11. P. 148.
116. Leibinger M., Andreadaki A., Fischer D. Role of mTOR in neuroprotection and axon regeneration after inflammatory stimulation. // *Neurobiol. Dis.* 2012. Vol. 46, № 2. P. 314–324.
117. Daschil N., Humpel C. Nifedipine and nimodipine protect dopaminergic substantia nigra neurons against axotomy-induced cell death in rat vibrosections via modulating inflammatory responses // *Brain Res.* 2014. Vol. 1581. P. 1–11.
118. Chernov A. V. et al. The Calcium-binding Proteins S100A8 and S100A9 Initiate the Early Inflammatory Program in Injured Peripheral Nerves // *J. Biol. Chem.* 2015. Vol. 290, № 18. P. 11771–11784.
119. Spira M.E., Benbassat D., Dormann A. Resealing of the proximal and distal cut ends of transected axons: electrophysiological and ultrastructural analysis. // *J. Neurobiol.* 1993. Vol. 24, № 3. P. 300–316.
120. Benbassat D., Spira M.E. Survival of Isolated Axonal Segments in Culture: Morphological, Ultrastructural, and Physiological Analysis // *Exp. Neurol.* 1993. Vol. 122, № 2. P. 295–310.

121. Benbassat D., Spira M.E. The Survival of Transected Axonal Segments of Cultured Aplysia Neurons is Prolonged by Contact with Intact Nerve Cells // *Eur. J. Neurosci.* 1994. Vol. 6, № 10. P. 1605–1614.
122. Torres B.B.J. et al. Effects of dantrolene on apoptosis and immunohistochemical expression of NeuN in the spinal cord after traumatic injury in rats // *Int. J. Exp. Pathol.* 2010. Vol. 91, № 6. P. 530–536.
123. Müller H.W., Stoll G. Nerve injury and regeneration: basic insights and therapeutic interventions. // *Curr. Opin. Neurol.* 1998. Vol. 11, № 5. P. 557–562.
124. Walikonis R.S., Poduslo J.F. Activity of cyclic AMP phosphodiesterases and adenylyl cyclase in peripheral nerve after crush and permanent transection injuries // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273, № 15. P. 9070–9077.
125. Osterloh J.M. et al. dSarm/Sarm1 is required for activation of an injury-induced axon death pathway. // *Science.* 2012. Vol. 337, № 6093. P. 481–484.
126. Zhai Q. et al. Involvement of the ubiquitin-proteasome system in the early stages of Wallerian degeneration // *Neuron.* 2003. Vol. 39, № 2. P. 217–225.
127. Eddleman C.S. et al. Endocytotic formation of vesicles and other membranous structures induced by Ca²⁺ and axolemmal injury. // *J. Neurosci.* 1998. Vol. 18, № 11. P. 4029–4041.
128. Detrait E.R. et al. Plasmalemmal repair of severed neurites of PC12 cells requires Ca²⁺ and synaptotagmin // *J. Neurosci. Res.* 2000. Vol. 62, № 4. P. 566–573.
129. Detrait E. et al. Axolemmal repair requires proteins that mediate synaptic vesicle fusion // *J. Neurobiol.* 2000. Vol. 44, № 4. P. 382–391.
130. Ashery U., Penner R., Spira M.E. Acceleration of membrane recycling by axotomy of cultured aplysia neurons. // *Neuron.* 1996. Vol. 16, № 3. P. 641–651.
131. Spira M.E. et al. Calcium, protease activation, and cytoskeleton remodeling underlie growth cone formation and neuronal regeneration // *Cell. Mol. Neurobiol.* 2001. Vol. 21, № 6. P. 591–604.
132. Eddleman C.S., Bittner G.D., Fishman H.M. SEM comparison of severed ends of giant axons isolated from squid (*Loligo pealeii*) and crayfish (*Procambarus clarkii*) // *Biol. Bull.* 2002. Vol. 203, № 2. P. 219–220.

133. Godell C.M. et al. Calpain activity promotes the sealing of severed giant axons. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1997. Vol. 94, № 9. P. 4751–4756.
134. Gitler D., Spira M.E. Short window of opportunity for calpain induced growth cone formation after axotomy of *Aplysia* neurons // J. Neurobiol. 2002. Vol. 52, № 4. P. 267–279.
135. Gitler D., Spira M.E. Real time imaging of calcium-induced localized proteolytic activity after axotomy and its relation to growth cone formation. // Neuron. 1998. Vol. 20, № 6. P. 1123–1135.
136. Spira M.E. et al. Critical calpain-dependent ultrastructural alterations underlie the transformation of an axonal segment into a growth cone after axotomy of cultured *Aplysia* neurons // J. Comp. Neurol. 2003. Vol. 457, № 3. P. 293–312.
137. Ziv N.E., Spira M.E. Localized and transient elevations of intracellular Ca²⁺ induce the dedifferentiation of axonal segments into growth cones. // J. Neurosci. 1997. Vol. 17, № 10. P. 3568–3579.
138. Ziv N.E., Spira M.E. Induction of growth cone formation by transient and localized increases of intracellular proteolytic activity // J. Cell Biol. 1998. Vol. 140, № 1. P. 223–232.
139. Eddleman C.S., Bittner G.D., Fishman H.M. Barrier permeability at cut axonal ends progressively decreases until an ionic seal is formed // Biophys. J. 2000. Vol. 79, № 4. P. 1883–1890.
140. Kenney A.M., Kocsis J.D. Peripheral axotomy induces long-term c-Jun amino-terminal kinase-1 activation and activator protein-1 binding activity by c-Jun and junD in adult rat dorsal root ganglia In vivo. // J. Neurosci. 1998. Vol. 18, № 4. P. 1318–1328.
141. Gao Y. et al. Activated CREB is sufficient to overcome inhibitors in myelin and promote spinal axon regeneration in vivo // Neuron. 2004. Vol. 44, № 4. P. 609–621.
142. Pinan-Lucarre B. et al. The core apoptotic executioner proteins CED-3 and CED-4 promote initiation of neuronal regeneration in *Caenorhabditis elegans* // PLoS Biol. 2012. Vol. 10, № 5. P. e1001331.

143. Mattson M.P., Bazan N.G. Apoptosis and Necrosis // Basic Neurochemistry. Weinheim, FRG: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012. P. 663–676.
144. Fagiolini M. et al. Axonal transport blockade in the neonatal rat optic nerve induces limited retinal ganglion cell death. // J. Neurosci. 1997. Vol. 17, № 18. P. 7045–7052.
145. Ugolini G. et al. Fas/tumor necrosis factor receptor death signaling is required for axotomy-induced death of motoneurons in vivo. // J. Neurosci. 2003. Vol. 23, № 24. P. 8526–8531.
146. Terrado J. et al. Soluble TNF receptors partially protect injured motoneurons in the postnatal CNS // Eur. J. Neurosci. 2000. Vol. 12, № 9. P. 3443–3447.
147. Raivich G. Cytotoxic Potential of Proinflammatory Cytokines: Combined Deletion of TNF Receptors TNFR1 and TNFR2 Prevents Motoneuron Cell Death after Facial Axotomy in Adult Mouse // Exp. Neurol. 2002. Vol. 178, № 2. P. 186–193.
148. Dubois-Dauphin M. et al. Neonatal motoneurons overexpressing the bcl-2 protooncogene in transgenic mice are protected from axotomy-induced cell death. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1994. Vol. 91, № 8. P. 3309–3313.
149. Azari M.F. et al. Leukemia Inhibitory Factor Arrests Oligodendrocyte Death and Demyelination in Spinal Cord Injury // J. Neuropathol. Exp. Neurol. 2006. Vol. 65, № 9. P. 914–929.
150. Dong H. et al. Enhanced oligodendrocyte survival after spinal cord injury in Bax-deficient mice and mice with delayed Wallerian degeneration. // J. Neurosci. 2003. Vol. 23, № 25. P. 8682–8691.
151. Mattsson P. et al. Motor neuronal and glial apoptosis in the adult facial nucleus after intracranial nerve transection. // J. Neurosurg. 2006. Vol. 104, № 3. P. 411–418.
152. Syroid D.E. et al. Induction of postnatal schwann cell death by the low-affinity neurotrophin receptor in vitro and after axotomy. // J. Neurosci. 2000. Vol. 20, № 15. P. 5741–5747.
153. Siegenthaler M.M., Tu M.K., Keirstead H.S. The Extent of Myelin Pathology

- Differs following Contusion and Transection Spinal Cord Injury // J. Neurotrauma. 2007. Vol. 24, № 10. P. 1631–1646.
154. Saito H., Kanje M., Dahlin L.B. Delayed nerve repair increases number of caspase 3 stained Schwann cells. // *Neurosci. Lett.* 2009. Vol. 456, № 1. P. 30–33.
155. Наквасина М.А., Артюхов В. Г. Механизмы клеточной гибели: апоптоз, аутофагия, некроз: учебное пособие / ed. А.Ю. Игнатова. Воронеж: Издательский дом ВГУ, 2019.
156. Zhivotovsky B., Orrenius S. Calcium and cell death mechanisms: a perspective from the cell death community. // *Cell Calcium.* 2011. Vol. 50, № 3. P. 211–221.
157. Rottenberg H., Hoek J.B. The Mitochondrial Permeability Transition: Nexus of Aging, Disease and Longevity // *Cells.* 2021. Vol. 10, № 1. P. 79.
158. Angeli S. et al. The Mitochondrial Permeability Transition Pore Activates a Maladaptive Mitochondrial Unfolded Protein Response // *bioRxiv.* Cold Spring Harbor Laboratory, 2020. P. 2020.11.03.366815.
159. Springer J.E., Prajapati P., Sullivan P.G. Targeting the mitochondrial permeability transition pore in traumatic central nervous system injury // *Neural Regen. Res.* Medknow Publications, 2018. Vol. 13, № 8. P. 1338–1341.
160. Van Harreveld A. A Physiological Solution for Freshwater Crustaceans // *Exp. Biol. Med.* SAGE Publications, 1936. Vol. 34, № 4. P. 428–432.
161. Leksrisawat B. et al. Muscle receptor organs in the crayfish abdomen: a student laboratory exercise in proprioception. // *J. Vis. Exp.* 2010. № 45. P. 1–9.
162. Florey E., Florey E. Microanatomy of the abdominal stretch receptors of the crayfish (*Astacus fluviatilis* L.). // *J. Gen. Physiol.* 1955. Vol. 39, № 1. P. 69–85.
163. Ильинский О. Б. Физиология сенсорных систем. Часть третья. Физиология механорецепторов. Ленинград: Л Наука, 1975.
164. Фомичев Н.И. Речной рак. Методы исследования. 1986.
165. Tao-Cheng J.-H., Hirokawa K., Nakajima Y. Ultrastructure of the crayfish stretch receptor in relation to its function // *J. Comp. Neurol.* 1981. Vol. 200, № 1. P. 1–21.
166. Eyzaguirre C., Kuffler S.W. Processes of Excitation in the Dendrites and in the

- Soma of Single Isolated Sensory Nerve Cells of the Lobster and Crayfish // *J. Gen. Physiol.* 1955. Vol. 39, № 1. P. 87–119.
167. Purali N. Structure and function relationship in the abdominal stretch receptor organs of the crayfish // *J. Comp. Neurol.* 2005. Vol. 488, № 4. P. 369–383.
168. Rydqvist B. et al. Mechanotransduction and the crayfish stretch receptor // *Physiol. Behav.* 2007. Vol. 92, № 1–2. P. 21–28.
169. Rudkovskii M. V. et al. The effect of axotomy on firing and ultrastructure of the crayfish mechanoreceptor neurons and satellite glial cells // *Mol. Cell. Neurosci.* 2020. Vol. 107. P. 103534.
170. Rodkin S. et al. 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.* Springer US, 2019. Vol. 70, № 4. P. 532–541.
171. Mandolesi G. et al. Acute physiological response of mammalian central neurons to axotomy: ionic regulation and electrical activity. // *FASEB J.* 2004. Vol. 18, № 15. P. 1934–1936.
172. Tsantoulas C. et al. Sensory neuron downregulation of the Kv9.1 potassium channel subunit mediates neuropathic pain following nerve injury // *J. Neurosci.* 2012. Vol. 32, № 48. P. 17502–17513.
173. Chiesa R. et al. Extracellular calcium deprivation in astrocytes: regulation of mRNA expression and apoptosis. // *J. Neurochem.* *J Neurochem*, 1998. Vol. 70, № 4. P. 1474–1483.
174. Petrunyaka V. V, Nauchitel M.M. The effect of extracellular Ca and Mg on mitochondrial ultrastructure in isolated intact neurons // *Eur J Cell Biol.* 1987. Vol. 43, № 3. P. 438–442.
175. Rassner M.P. et al. Neocortical GABA release at high intracellular sodium and low extracellular calcium: An anti-seizure mechanism // *J. Neurochem.* 2016. Vol. 137, № 2. P. 177–189.
176. Winterhager E., Stieve H. Effect of hyper- and hypoosmotic solutions on the structure of the *Astacus* retina // *Cell Tissue Res.* 1982. Vol. 223, № 2. P. 267–280.

177. Moe A.M., Golding A.E., Bement W.M. Cell healing: Calcium, repair and regeneration // *Semin. Cell Dev. Biol.* NIH Public Access, 2015. Vol. 45. P. 18–23.
178. Fujii Y., Maekawa S., Morita M. Astrocyte calcium waves propagate proximally by gap junction and distally by extracellular diffusion of ATP released from volume-regulated anion channels // *Sci. Rep.* Nature Publishing Group, 2017. Vol. 7, № 1.
179. Aagaard-Tillery K.M., Jelinek D.F. Differential activation of a calcium-dependent endonuclease in human B lymphocytes: Role in ionomycin-induced apoptosis // *J. Immunol. Am Assoc Immunol*, 1995. Vol. 155, № 7. P. 3297–3307.
180. Agrawal S., Nashmi R., Fehlings M.. Role of L- and N-type calcium channels in the pathophysiology of traumatic spinal cord white matter injury // *Neuroscience*. Neuroscience, 2000. Vol. 99, № 1. P. 179–188.
181. Wei H. et al. Bcl-2 protects against apoptosis in neuronal cell line caused by thapsigargin-induced depletion of intracellular calcium stores. // *J. Neurochem.* 1998. Vol. 70, № 6. P. 2305–2314.
182. Sagara Y., Inesi G. Inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ transport ATPase by thapsigargin at subnanomolar concentrations // *J. Biol. Chem.* 1991. Vol. 266, № 21. P. 13503–13506.
183. Duncan C. et al. Painful nerve injury decreases sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase activity in axotomized sensory neurons // *Neuroscience*. 2013. Vol. 231. P. 247–257.
184. Thorell W.E., Leibrock L.G., Agrawal S.K. Role of RyRs and IP₃ receptors after traumatic injury to spinal cord white matter // *J. Neurotrauma*. Mary Ann Liebert Inc., 2002. Vol. 19, № 3. P. 335–342.
185. Wood J.P.M. et al. Mitochondrial inhibition in rat retinal cell cultures as a model of metabolic compromise: mechanisms of injury and neuroprotection. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012. Vol. 53, № 8. P. 4897–4909.
186. Aizenman E. et al. Induction of neuronal apoptosis by thiol oxidation: putative

- role of intracellular zinc release. // *J. Neurochem.* *J Neurochem*, 2000. Vol. 75, № 5. P. 1878–1888.
187. Rosado I.R. et al. Effects of methylprednisolone, dantrolene, and their combination on experimental spinal cord injury. // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2014. Vol. 7, № 8. P. 4617–4626.
188. Mazzeo A.T. et al. The role of mitochondrial transition pore, and its modulation, in traumatic brain injury and delayed neurodegeneration after TBI. // *Exp. Neurol.* 2009. Vol. 218, № 2. P. 363–370.
189. Kasseckert S.A. et al. The mechanisms of energy crisis in human astrocytes after subarachnoid hemorrhage // *Neurosurgery.* 2013. Vol. 72, № 3. P. 468–474.
190. Rizzuto R. et al. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012. Vol. 13, № 9. P. 566–578.
191. Díaz-Vegas A.R. et al. Mitochondrial calcium increase induced by RyR1 and IP3R channel activation after membrane depolarization regulates skeletal muscle metabolism // *Front. Physiol.* *Frontiers Media S.A.*, 2018. Vol. 9, № JUN.
192. Hargittai P.T., Butt A.M., Lieberman E.M. High potassium selective permeability and extracellular ion regulation in the glial perineurium (blood-brain barrier) of the crayfish. // *Neuroscience.* 1990. Vol. 38, № 1. P. 163–173.
193. D’Alessandro G. et al. KCa3.1 channel inhibition sensitizes malignant gliomas to temozolomide treatment // *Oncotarget.* *Oncotarget*, 2016. Vol. 7, № 21. P. 30781–30796.
194. McFerrin M.B. et al. Differential role of IK and BK potassium channels as mediators of intrinsic and extrinsic apoptotic cell death // *Am. J. Physiol. Physiol.* *American Physiological Society Bethesda, MD*, 2012. Vol. 303, № 10. P. C1070–C1078.
195. Mohr C.J. et al. Cancer-associated intermediate conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel K_{Ca} 3.1 // *Cancers.* *MDPI AG*, 2019. Vol. 11, № 1.
196. Bartschat D.K., Rhodes T.E. Protein Kinase C Modulates Calcium Channels in Isolated Presynaptic Nerve Terminals of Rat Hippocampus // *J. Neurochem.* *J Neurochem*, 1995. Vol. 64, № 5. P. 2064–2072.

197. Balasubramanyam M., Gardner J.P. Protein kinase C modulates cytosolic free calcium by stimulating calcium pump activity in Jurkat T cells // *Cell Calcium*. Cell Calcium, 1995. Vol. 18, № 6. P. 526–541.
198. Feng N., Anderson M.E. CaMKII is a nodal signal for multiple programmed cell death pathways in heart // *J. Mol. Cell. Cardiol.* Academic Press, 2017. Vol. 103. P. 102–109.
199. Shen B. et al. TRPC6 may protect renal ischemia-reperfusion injury through inhibiting necroptosis of renal tubular epithelial cells // *Med. Sci. Monit.* International Scientific Literature Inc., 2016. Vol. 22. P. 633–641.
200. Min J.-W. et al. Vitexin protects against hypoxic-ischemic injury via inhibiting Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II and apoptosis signaling in the neonatal mouse brain // *Oncotarget*. Impact Journals LLC, 2017. Vol. 8, № 15. P. 25513–25524.
201. Wei Y., Wang R., Teng J. Inhibition of Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II α Suppresses Oxidative Stress in Cerebral Ischemic Rats Through Targeting Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase // *Neurochem. Res.* Springer New York LLC, 2019. Vol. 44, № 7. P. 1613–1620.
202. Gemes G. et al. Painful nerve injury increases plasma membrane Ca²⁺-ATPase activity in axotomized sensory neurons. // *Mol. Pain*. 2012. Vol. 8. P. 46.
203. Ogura H. et al. Axotomy increases plasma membrane Ca²⁺ pump isoform4 in primary afferent neurons // *Neuroreport*. 2007. Vol. 18, № 1. P. 17–22.
204. Sakuragi S. et al. Astroglial Ca²⁺ signaling is generated by the coordination of IP₃ R and store-operated Ca²⁺ channels // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Elsevier B.V., 2017. Vol. 486, № 4. P. 879–885.
205. Woods J.J. et al. A Selective and Cell-Permeable Mitochondrial Calcium Uniporter (MCU) Inhibitor Preserves Mitochondrial Bioenergetics after Hypoxia/Reoxygenation Injury // *ACS Cent. Sci.* American Chemical Society, 2019. Vol. 5, № 1. P. 153–166.
206. Namekata I., Hamaguchi S., Tanaka H. Pharmacological discrimination of plasmalemmal and mitochondrial sodium-calcium exchanger in cardiomyocyte-

derived H9c2 cells // Biol. Pharm. Bull. Pharmaceutical Society of Japan, 2015. Vol. 38, № 1. P. 147–150.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность своему научному руководителю – профессору Узденскому Анатолию Борисовичу, а также сотрудникам лаборатории «Молекулярная нейробиология» – Рудковскому М.В., Бережной Е.В. и Негинской М.А. за оказанную помощь в выполнении диссертационной работы.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа была поддержана грантами АВЦП МОН 4.6142.2011, РФФИ № 16-34-00837 и Минобрнауки № 6.6324.2017/8.9 и № 0852-2020-0028.