

На правах рукописи

Хайтин Андрей Михайлович



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

Специальность 03.01.02 – Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Воронеж 2021

Работа выполнена в ФГАОУ ВО «Южный Федеральный Университет» в
Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор,
Узденский Анатолий Борисович

Официальные оппоненты:

Мухина Ирина Васильевна

доктор биологических наук, профессор, ФГАОУ
ВО "Национальный исследовательский
Нижегородский государственный университет им.
Н.И. Лобачевского", Институт биологии и
биомедицины, кафедра нейротехнологий,
профессор

Сури́н Александр Михайлович

доктор биологических наук, ФГБНУ «Научно-
исследовательский институт общей патологии и
патофизиологии», лаборатория фундаментальных
и прикладных проблем боли, главный научный
сотрудник

Ведущая организация

ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр
«Пущинский научный центр биологических
исследований Российской академии наук»,
Институт биофизики клетки РАН

Защита диссертации состоится 3 июня 2021 г. в 15:30 на заседании диссертационного совета
Д 212.038.03 на базе Федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет» по адресу:
394018, г. Воронеж, Университетская пл., 1, ауд. 59.

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке Воронежского
государственного университета и на сайте <http://www.science.vsu.ru>

Автореферат разослан

« » апреля 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук,
профессор



Грабович Маргарита Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Черепно-мозговая травма и повреждение спинного мозга входят в число ведущих причин смерти и инвалидности населения, особенно молодого и среднего возраста (Hill et al., 2016; Kobeissy, 2015). Как при травмах ЦНС, так и травмах ПНС, при ранениях и хирургических операциях происходит аксотомия (АТ), т.е. перерезка или разрыв аксонов. АТ ведет к дегенерации и смерти нейронов или 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 (Giaume et al., 2013). Показано, что повреждение глиии подавляет нейрональные функции и индуцирует смерть нейронов (Largo et al., 1996). С другой стороны, повреждение нервов индуцирует смерть окружающих глиальных клеток (Whiteside et al., 1998). 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 (Gemes et al., 2009; Marambaud et al., 2009), в частности, в реакции нейронов на аксотомию (Kobeissy, 2015; Rishal and Fainzilber, 2014; Siedler et al., 2014). Повышение уровня цитозольного

кальция до 10^{-4} – 10^{-3} М может запустить процесс клеточной смерти - некроза или апоптоза (Kondratskyi et al., 2015). Конкретная роль Ca^{2+} в выживании и смерти УГК после аксотомии остается невыясненной. Поэтому необходимо изучение влияния аксотомии на смерть и выживание УГК и роли в них различных элементов Ca^{2+} -зависимого сигнального пути, включая различные механизмы регуляции уровня Ca^{2+} в цитозоле и Ca^{2+} -зависимые белки.

Абдоминальный рецептор растяжения рака (PPP), используемый в наших экспериментах как модель, является простым, но информативным объектом для изучения реакций нейронов и глии на аксотомиию. Он включает в себя механорецепторный нейрон (MPN), 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 (Узденский, 2010; Uzdensky et al., 2015).

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, которые регулируются внеклеточным Ca^{2+} и Ca^{2+} -АТФазой эндоплазматического ретикулума (SERCA), а также риаудиновыми рецепторами, протеинкиназой С и кальмодулинкиназой-II. Получены данные о влиянии различных факторов повышения уровня цитозольного Ca^{2+} на импульсную активность интактного и аксотомированного нейрона *in vitro*, выявлена роль Ca^{2+} каналов плазмалеммы и высокопроницаемых пор митохондрий в функциональной инактивации нейрона.

Научно-практическая значимость работы:

Полученные данные о характере индуцированных аксотомией изменений кальциевого гомеостаза в нейроне и в удаленной от места повреждения глии 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.

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

Основные положения, выносимые на защиту:

Аксотомия ускоряет функциональную инактивацию 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 глии 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 функциональную инактивацию 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. По теме работы имеется 25 публикаций, 10 из них – в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 156 страницах машинописного текста, состоит из введения, 8 глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследований, обсуждение полученных результатов), заключения, выводов и библиографического указателя, включающего 206 отечественных и зарубежных источников. Работа иллюстрирована 38 рисунками и 7 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Объект исследования – речные раки *Astacus leptodactylus*. В каждом сегменте их брюшка находятся две симметричные пары РРР, посылающих аксоны в ганглии брюшной нервной цепочки (БНЦ), расположенные в этом сегменте. РРР состоит из медленно адаптирующегося и быстро адаптирующегося МРН. Их дендриты контактируют с волокнами механорецепторных мышц, крепящихся между соседними сегментами брюшного панциря. Частота импульсации медленно и быстро адаптирующихся МРН пропорциональна соответственно степени и скорости растяжения их механорецепторных мышц.

Выделение интактного комплекса МРН-ганглий. Нами разработана новая методика, позволяющая выделять препарат РРР вместе с ганглием брюшной нервной цепочки, куда МРН посылает аксон (Khaitin et al., 2015). Для этого панцирь брюшного сегмента разрезается с вентральной стороны в 2 мм латерально от брюшной нервной цепочки и вдоль центральной линии с дорсальной стороны. Путем удаления глубоких и поверхностных мышц брюшного сегмента высвобождается аксон МРН. Тяжи брюшной нервной

цепочки обрезаются с двух сторон от ганглия, и вырезаются фрагменты панциря, на которых крепятся механорецепторные мышцы. Изолированный комплекс МРН-ганглий переносится в ванночку объемом 2 мл. Из одного рака можно выделить 4 препарата МРН-ганглий. Аксотомия осуществляется путем перерезки аксона на расстоянии примерно 1 см от сомы МРН.

Регистрация импульсной активности МРН. Для регистрации потенциалов действия нейрона стеклянный электрод, заполненный физиологическим раствором ван Харревельда для ракообразных (мМ: NaCl – 205; KCl – 5,4; NaHCO₃ – 0,2; CaCl₂ – 13,5; MgCl₂ – 5,4; pH 7,2–7,4; далее «раствор Харревельда») с серебряной тонкой проволокой внутри, присасывался к аксону МРН на расстоянии 5-10 мм от сомы. Импульсы МРН усиливались, оцифровывались и регистрировались с помощью программы NeuronXP, разработанной в нашей лаборатории Ю. Гусачем. Опыты проводились при температуре $22 \pm 4^\circ\text{C}$.

Визуализация кальциевой динамики в нейроне и глиальных клетках глии при аксотомии. После изоляции препарат PPP, сохраняющий регулярную импульсацию, переносился в кювету объемом 200 мкл и инкубировался 60 минут с кальциевым зондом Fluo-4 (1 мкМ), растворенном в 0,005% Pluronic (Abramov et al., 2007). Флуоресцентные изображения препарата получали на микроскопе Olympus BX51XI с цифровой камерой ColorViewIII до перерезки аксона ($t = 0$ мин) и через 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30 или 40 минут после аксотомии. Изучены 6 аксотомированных (AT) и шесть контрольных интактных (Int) препаратов. Флуоресценция Fluo-4 измерялась вдоль глиальной оболочки, окружающей проксимальный сегмент (Рис. 1). Статистическая обработка производилась с использованием t-критерия Стьюдента и метода ANOVA (RM).

Визуализация некроза и апоптоза глиальных клеток. После выделения интактные (Int) и аксотомированные (AT) препараты PPP инкубировались в растворе Харревельда в течение 2, 4, 8, 12 и 15 часов от момента перерезки аксонов до момента фиксации. Смерть клеток выявлялась двойным флуорохромированием йодидом пропидия (20 мкМ) и Hoechst 33342 (20 мкМ)

(Lobanov, Uzdensky, 2005). Йодид пропидия придает красную флуоресценцию ядрам некротических клеток с поврежденной плазматической мембраной. Hoechst 33342 придает голубую флуоресценцию ядерному хроматину живых клеток и фрагментированным ядрам апоптотических клеток. Флуоресцентные изображения были получены с помощью флуоресцентного микроскопа Axio Lab.A1 (Carl Zeiss, Германия). Доля некротических клеток и количество апоптотических клеток подсчитывались на проксимальном сегменте аксона длиной 2 мм.

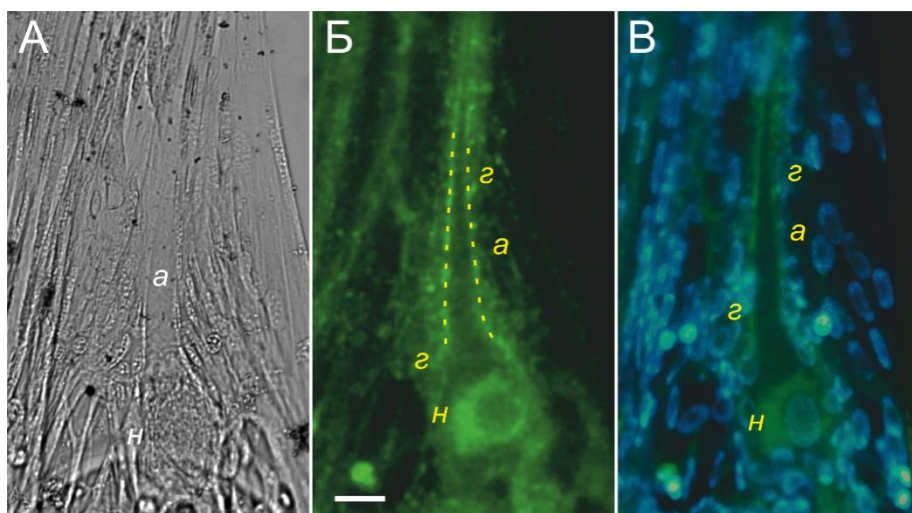


Рис. 1. Визуализация ионов Ca^{2+} в PPP. А – фото в проходящем свете). Б – препарат, окрашенный Fluo-4. В – наложение Fluo-4 и Hoechst 33342. *н* – нейрон, *а* – аксон, *г* – глия. Пунктир - линия измерения интенсивности в глиальной оболочке. Масштабный отрезок – 20 мкм.

Ингибиторный анализ. Для изучения роли Ca^{2+} в выживании нейронов и УГК, интактные и аксотомированные препараты инкубировались 8 часов с модуляторами кальциевого сигнального пути, после чего оценивался уровень некроза и апоптоза УГК и сравнивался с контролем. Использовались тройная или трехкратно уменьшенная внеклеточная концентрация Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_o$), кальциевый ионофор иономицин (500 нМ), блокатор кальциевых каналов Cd^{2+} (100 мкМ $CdCl_2$), ингибитор высокопроницаемой митохондриальной поры (МРТР) циклоспорин А (5 мкМ), ингибиторы рианодиновых рецепторов рианодин (10 мкМ) и дантролен (20 мкМ), ингибитор Ca^{2+} -АТФазы эндоплазматического/саркоплазматического ретикулума (SERCA) тапсигаргин (5 мкМ), ингибитор Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов мауротоксин (10 нМ), ингибитор кальмодулина флуфеназин (2 мкМ), ингибитор кальмодулинкиназы II KN-93 (2 мкМ) и ингибитор протеинкиназы С стауроспорин (1 нМ).

Статистическая обработка производилась с использованием t-критерия Стьюдента и метода ANOVA (RM).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Морфология препарата «МРН-ганглий»

Полностью изолированный по нашей методике комплекс «МРН-ганглий» содержит пару механорецепторных нейронов, крепящихся на своих рецепторных мышцах и посылающих аксоны в соответствующий ганглий брюшной нервной цепочки (*Г*) в составе *n. dorsalis* (Рис. 2).

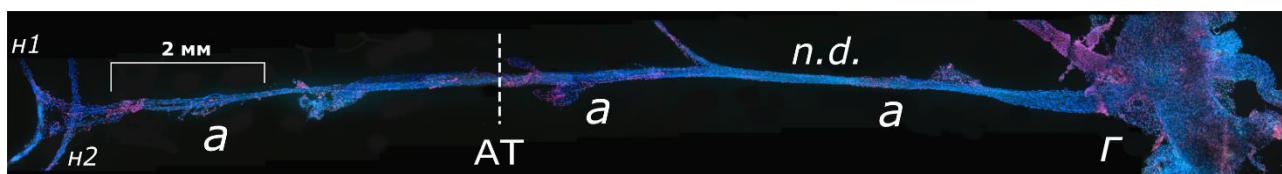


Рис. 2. Панорамная фотография системы МРН-ганглий. *n1* - быстро адаптирующийся МРН, *n2* – медленно адаптирующийся МРН, *a* – аксон МРН, *Г* – ганглий брюшной нервной цепочки. *n.d.* – фрагмент *n.dorsalis*, включающий аксон МРН. АТ – место перерезки аксона. Указан проксимальный сегмент аксона длиной 2 мм, на котором оценивался уровень смерти УГК.

Для того, чтобы удостовериться в целостности аксона и отсутствии нарушений проведения потенциала действия в изолированном препарате, проводилась одновременная регистрация импульсной активности около сомы и вблизи ганглия. В спокойном состоянии в обеих локациях регистрировалась регулярная импульсация с одинаковой частотой 2–3 Гц. Быстрое растяжение рецепторной мышцы вызывало одинаковые всплески частоты импульсации с последующим постепенным возвращением к исходной частоте (Рис. 3). Это говорит о том, что в препарате не нарушалось проведение потенциалов действия от МРН к ганглию брюшной нервной цепочки.

2. Изменение электрической активности МРН вследствие аксотомии

Для выявления влияния АТ на характер импульсации нейрона, аксон перерезался на расстоянии от 2 мм (минимально возможное расстояние) до 5 мм от сомы во время регистрации потенциала действия вблизи сомы. Импульсация в результате перерезки не прерывалась и не меняла частоту и

амплитуду, т.е. АТ не влияла на характер электрической активности МРН (Рис. 4).

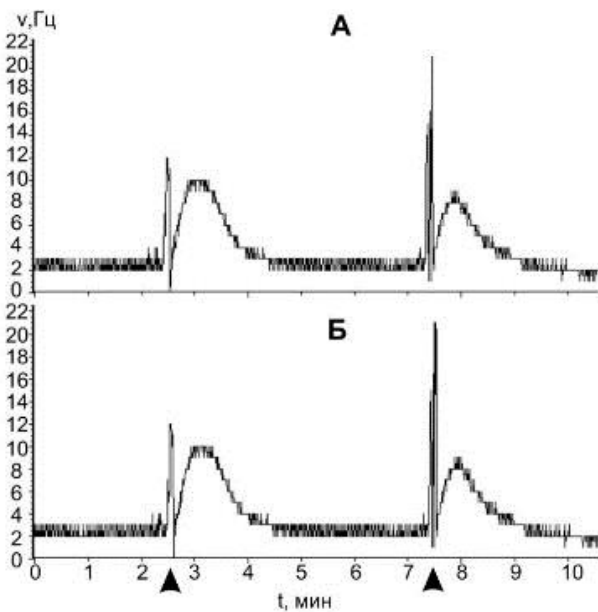


Рис. 3. Одинаковое изменение частоты импульсации при растяжении механорецепторной мышцы: (А) вблизи сомы МРН; (Б) вблизи ганглия брюшной нервной цепочки. Стрелки указывают моменты растяжения механорецепторной мышцы.

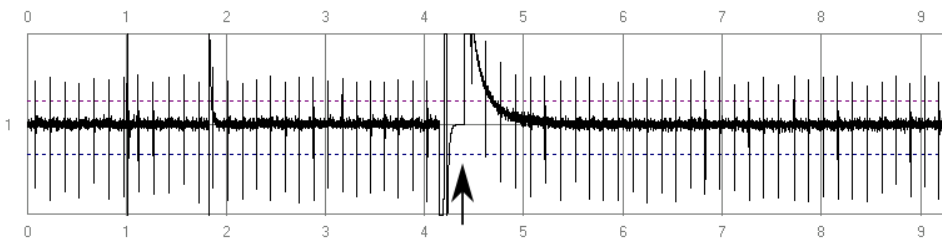


Рис. 4. Частота и амплитуда импульсации МРН сохраняются при АТ. Стрелка указывает момент перерезки.

Сравнение объединенных выборок контрольных Int и АТ показало, что аксотомия достоверно снижала среднюю продолжительность импульсной активности («время жизни») МРН на 18% (Таблица 1). Следовательно, аксотомия ускоряет функциональную инактивацию нейронов.

3. Смерть удаленных глиальных клеток вследствие аксотомии

Для изучения динамики развития некроза и апоптоза Int и АТ препараты РРР инкубировались 4, 8, 12 и 15 часов. В Int препаратах апоптоз достигал максимума за 8 часов и далее не развивался, а в АТ препаратах продолжал усиливаться. Таким образом, 8 часов оказались достаточным временем для развития апоптоза в контрольных препаратах. Некроз глии становился значимым после 12-часовой инкубации. В АТ препаратах он был достоверно выше, чем в интактных (Рис. 5). Это свидетельствует о том, что АТ стимулирует смерть удаленных глиальных клеток.

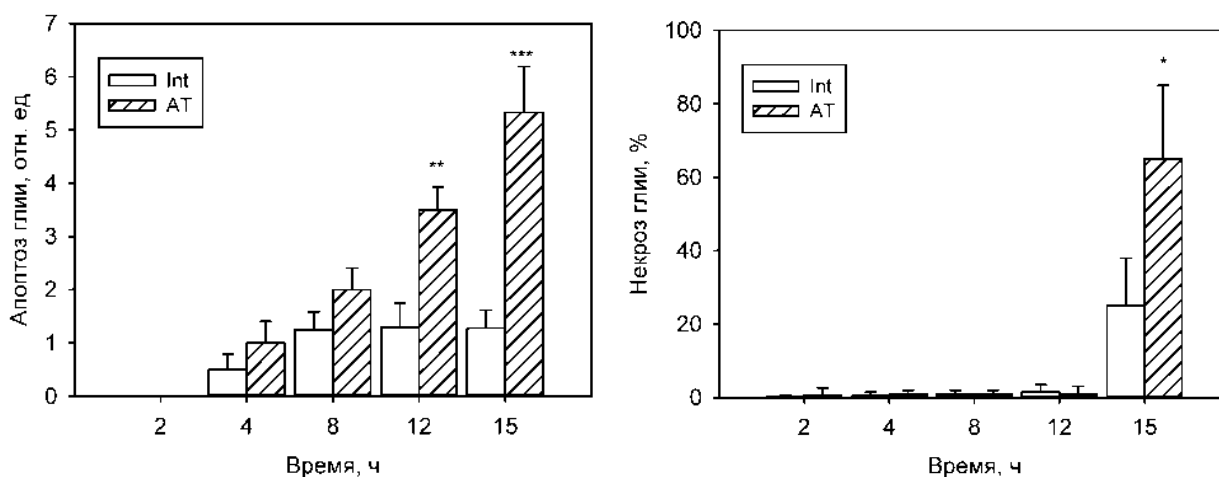


Рис. 5. Динамика смерти сателлитной глии в интактных (Int) и аксотомированных (AT) МРН в условиях инкубации. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

Чтобы узнать, как АТ влияет на развитие некроза и апоптоза УГК в условиях постоянства внешней среды, Int и АТ препараты медленно перфузировали раствором Харревельда. Спустя 16 ч апоптоз не наблюдался, а уровень некроза глии в Int и АТ препаратах статистически не различался. Определено, что 8-часовая длительность инкубации в растворе Харревельда оптимальна для изучения АТ-индуцированной смерти (некроза и апоптоза) УГК и роли в ней кальций-зависимого сигнального пути.

При сравнении объединенных (по различным сериям экспериментов) выборок контрольных АТ и Int препаратов, инкубированных 8 часов, выявлено, что аксотомия повышает некроз сателлитной глии, окружающей как сому, так и аксон нейрона. Влияние аксотомии в отсутствие модуляторов на апоптоз в контрольных препаратах было незначительным (Рис. 7, Таблица 2). При этом некроз нейронов не наблюдался.

4. Кальциевая динамика в нейроне и глие после аксотомии

Для изучения влияния аксотомии на уровень Ca^{2+} в нейроне и глие РРР были проведены опыты с флуоресцентным кальциевым зондом Fluo-4. Аксотомия быстро повышала уровень Ca^{2+} в цитозоле, проксимальном сегменте аксона и в УГК, окружающих сому и проксимальный сегмент аксона более чем вдвое за 40 мин (Рис. 6). Таким образом, аксотомия вызывает повышение уровня Ca^{2+} в глие не только вблизи разреза аксона, но и на расстоянии от него.

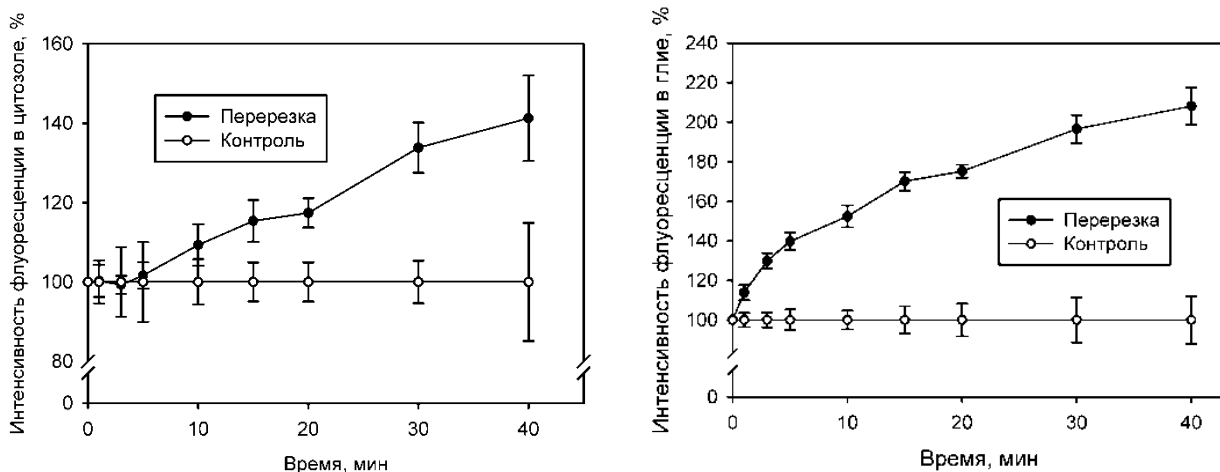


Рис. 6. Динамика уровня кальция в PPP, наблюдаемая с применением зонда Fluo-4. Слева - в цитозоле МРН. Справа - в глиальной оболочке МРН.

5. Роль ионов Ca^{2+} в изменениях импульсной активности МРН после аксотомии

Роль различных путей изменения цитозольной концентрации Ca^{2+} в функциональной инактивации МРН при аксотомии. Для выяснения роли входа ионов Ca^{2+} из внеклеточной среды, Int и АТ препараты инкубировались в присутствии кальциевого ионофора иономицина. Он сокращал среднюю продолжительность импульсации Int и АТ препаратов МРН до 120 и 60 мин, соответственно ($p < 0,05$; Рис. 7, Таблица 1). Таким образом, вход Ca^{2+} в цитозоль ускоряет функциональную инактивацию нейрона.

Для выяснения влияния входа ионов Ca^{2+} через кальциевые каналы плазматической мембраны, они блокировались ионами Cd^{2+} . В присутствии $CdCl_2$ средняя продолжительность импульсации повышалась в Int и АТ препаратах до 460 мин. и 370 мин, соответственно ($p < 0,05$; Рис.7, Таблица 1). Это свидетельствует об участии Ca^{2+} -каналов плазматической мембраны в функциональной инактивации МРН.

Для выяснения роли выхода Ca^{2+} из митохондрий в цитозоль через высокопроницаемые митохондриальные поры, препараты PPP инкубировались в присутствии циклоспорина А (5 мкМ). В АТ-препаратах она снижал среднюю продолжительность импульсации нейронов до 160 мин (Рис. 7, Таблица 1). Это

может указывать на то, что МРТР участвуют в поддержании импульсной активности аксотомированных нейронов.

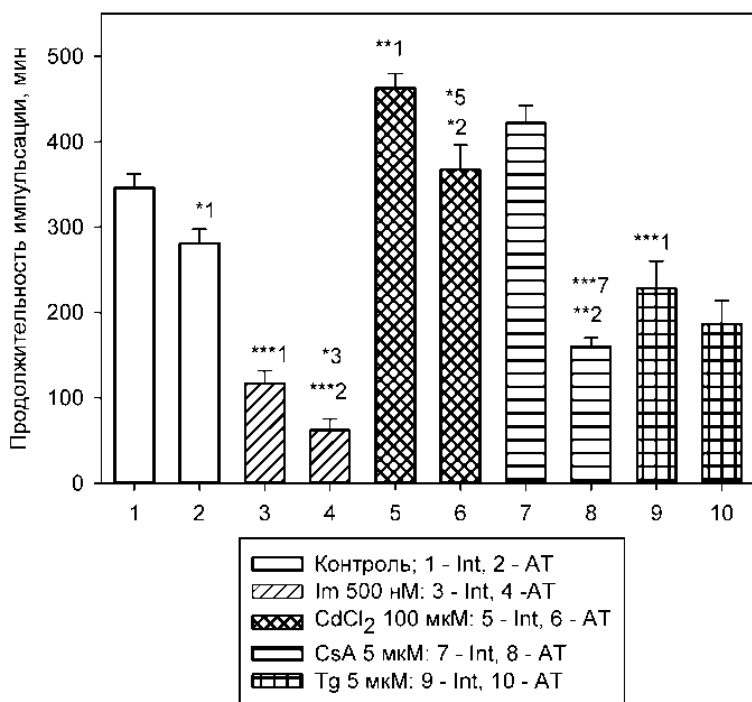


Рис.7 Влияние аксотомии и модуляторов кальциевых каналов на продолжительность импульсной активности механорецепторного нейрона. Int – интактные препараты, АТ – аксотомированные препараты. Im – иономицин; CsA – циклоспорин А; Tg – тапсигаргин. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Для выяснения роли откачивания Ca^{2+} из цитозоля в ЭР с помощью Ca^{2+} -АТФазы эндоплазматического ретикулума (SERCA), препараты РРР инкубировались в присутствии 5 мкМ ее ингибитора тапсигаргина (Tg). Он достоверно снижал продолжительность импульсации в Int (до 230 мин) и демонстрировал тенденцию к ее снижению после аксотомии, что говорит о протекторной роли SERCA для МРН (Рис. 7, Таблица 1).

Ингибиторы рианодин-чувствительных кальциевых каналов эндоплазматического ретикулума дантролен (20 мкМ) и рианодин (10 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 С стауроспорин (1 нМ) не оказали достоверного влияния на продолжительность импульсации нейронов (Таблица 1).

Следовательно, основными факторами функциональной инактивации МРН при АТ являются проникновение Ca^{2+} в цитозоль через плазматическую мембрану и недостаточный выход Ca^{2+} из митохондрий через МРТР, а

высвобождение депонированных в ЭР ионов Ca^{2+} , кальций-зависимые калиевые каналы и кальций-регулируемые белки не играют существенной роли в поддержании нейронной импульсации в условиях нарушенной и ненарушенной целостности аксона.

Таблица 1. Влияние аксотомии на продолжительность импульсации МРН в присутствии модуляторов кальциевого сигнального пути. 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 $[\text{Ca}^{2+}]_i$	Длительность импульсации (мин)	
		Int	АТ
Контроль (К)		340±20 (49)	280±20 *Int (48)
Модуляторы механизмов регуляции уровня внутриклеточного Ca^{2+}			
Иономицин (500 нМ)	Ca^{2+} ионофор, $[\text{Ca}^{2+}]_i \uparrow$	120±20 (9) ***К	60±10 (9) ***К*Int
Ингибиторы Ca^{2+} каналов			
CdCl_2 (100 мкМ)	Ca^{2+} каналы плазмалеммы, $[\text{Ca}^{2+}]_i \downarrow$	460±20 (7) **К	370±30 (7) *К*Int
Циклоспорин А (5 мкМ)	МРТР, $[\text{Ca}^{2+}]_i \downarrow$	420±20 (6)	160±10 (6) **К ***Int
Тапсигаргин (5 мкМ)	Ca^{2+} -АТФаза ЭР, $[\text{Ca}^{2+}]_i \uparrow$	230±30 (11) ***К	190±30 (5)
Рианодин (10 мкМ)	рианодиновые рецепторы, $[\text{Ca}^{2+}]_i \downarrow$	260±40 (5)	300±40 (5)
Дантролен (20 мкМ)		290±50 (7)	270±40 (7)
Ингибиторы Ca^{2+}-зависимых каналов и сигнальных белков			
Мауротоксин (10 нМ)	Ca^{2+} -зависимые K^+ каналы, $[\text{K}^+]_i \uparrow$	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)

6. Роль Ca^{2+} в АТ-индуцированной смерти удаленной глии

Роль внеклеточного Ca^{2+} . Для изучения влияния внеклеточной концентрации Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_o$) на смерть УГК, препараты инкубировались в растворе ван Харревельда с трехкратно увеличенной или трехкратно уменьшенной концентрацией хлорида кальция ($3[\text{Ca}^{2+}]_o$ и $[\text{Ca}^{2+}]_o/3$). $3[\text{Ca}^{2+}]_o$ повышала апоптоз УГК в аксотомированных препаратах и снижала уровень

некроза во всех препаратах (Рис. 8, Таблица 2,3). $[Ca^{2+}]_o/3$ в два раза повышала некроз УГК в области ядра МРН ($p < 0,005$). Таким образом, $[Ca^{2+}]_o$ является фактором, защищающим эти клетки от некроза и, в то же время, стимулирующим апоптоз.

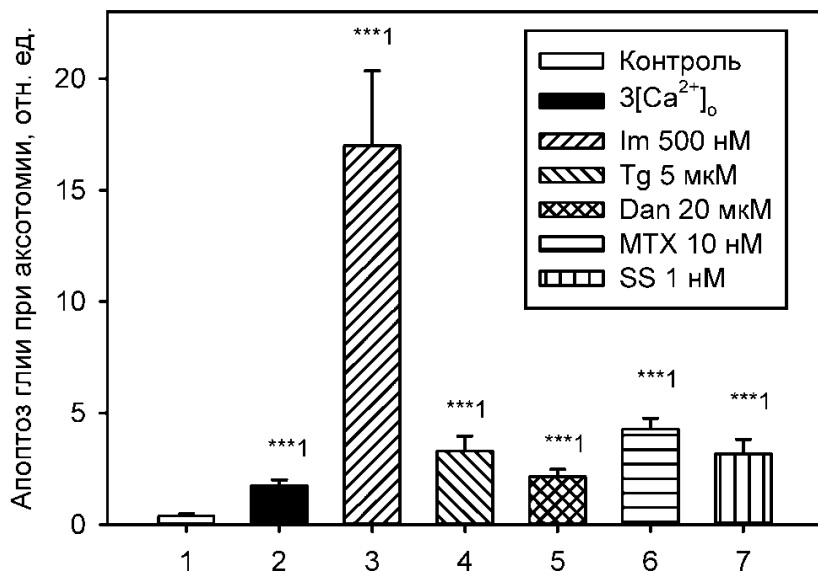


Рис. 8. Влияние модуляторов кальций-зависимого сигнального пути на апоптоз глиальных клеток при аксотомии. Int – интактные МРН, АТ – аксотомированные МРН. Im – иономицин; Tg – тапсигаргин; Dan – дантролен; MTX – мауротоксин; SS – стауроспорин. *** $p < 0,005$.

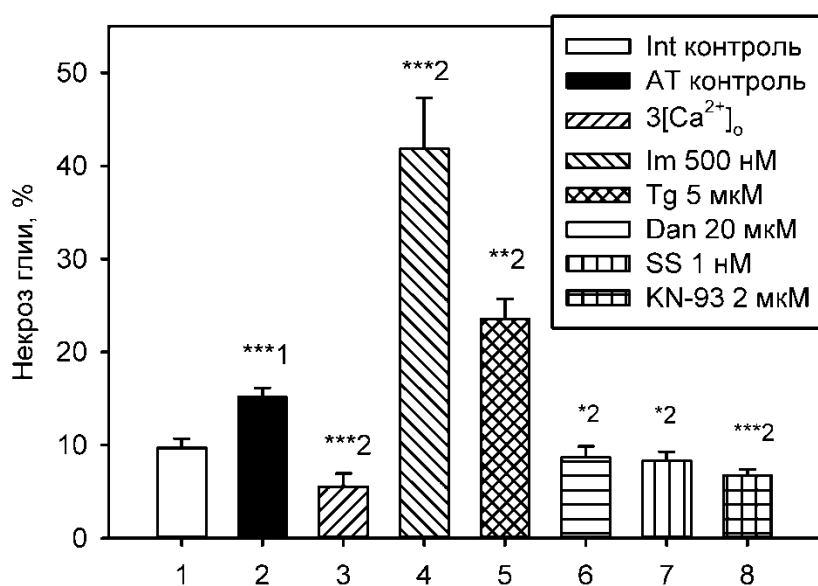


Рис. 9. Влияние модуляторов кальций-зависимого сигнального пути на некроз смерти глиальных клеток при аксотомии. Слева – влияние на апоптоз, справа - на. Int – интактные МРН, АТ – аксотомированные МРН. Im – иономицин; Tg – тапсигаргин; Dan – дантролен; SS – стауроспорин. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$

Роль повышения Ca^{2+} в цитозоле. Для оценки роли повышения уровня Ca^{2+} в цитозоле УГК был использован Ca^{2+} ионофор иономицин. Он на порядок повышал апоптоз УГК, окружающих аксон МРН, и в три раза повышал уровень их некроза. Таким образом, повышение концентрации Ca^{2+} в цитозоле стимулирует оба вида клеточной смерти.

Роль кальциевых каналов. Для изучения роли кальциевых каналов плазматической мембраны использовался их неспецифический блокатор - ионы Cd^{2+} . Инкубация PPP в присутствии $CdCl_2$ не оказала достоверного влияния на смерть УГК (Таблица 2,3). Таким образом, вход Ca^{2+} через кальциевые каналы плазматической мембраны в цитозоль не участвует в некрозе УГК.

Для изучения роли SERCA в АТ-индуцированной смерти УГК мы использовали ее ингибитор тапсигаргин. Ингибирование SERCA Tg не влияло на апоптоз УГК в Int, но повышало некроз на 30%. В аксотомированных препаратах тапсигаргин в 8 раз увеличивал уровень апоптоза и на 60% повышал уровень некроза УГК (Рис. 8). Это указывает на то, что работа SERCA по откачиванию Ca^{2+} из цитозоля в ЭР снижает некроз и АТ-индуцированный апоптоз УГК.

Ингибитор МРТР циклоспорин А достоверно снижал некроз УГК в области сомы в Int и АТ-препаратах. Таким образом, выход Ca^{2+} в цитозоль через МРТР является фактором смерти части УГК при АТ.

Для изучения роли рианодиновых рецепторов, их блокировали с помощью рианодина и дантролена. При инкубации с рианодином не наблюдалось достоверного изменения уровня некроза и апоптоза УГК. Дантролен в АТ-препаратах снижал некроз УГК, но повышал их апоптоз (Рис. 8, Таблица 2,3). Это может говорить о том, выход Ca^{2+} из ЭР в цитозоль УГК через рианодиновые рецепторы является про-некротическим фактором, но в то же время защищает клетку от апоптоза.

Для изучения роли кальций-активируемых калиевых каналов использовался их блокатор мауротоксин. Она на порядок повышал апоптоз УГК во всех препаратах, но не влиял на некроз (Рис. 8, Таблица 2,3). Видимо, эти калиевые каналы имеют антиапоптотическую функцию.

Роль Ca^{2+} -зависимых сигнальных белков в АТ-индуцированной смерти УГК. Ингибитор протеинкиназы С стауроспорин повышал уровень апоптоза, но снижал уровень некроза УГК после АТ. Таким образом, протеинкиназа С защищает УГК от апоптоза, но участвует в их некрозе. Ингибитор

кальмодулина флуфеназин не оказывал достоверного влияния на смерть УГК ни в Int-, ни в АТ-препаратах. То есть, кальмодулин не играет существенной роли в смерти УГК. Ингибитор кальмодулинкиназы II KN-93 снижал некроз УГК в области аксона, но не оказывал влияния на апоптоз УГК. Видимо, кальмодулинкиназа II участвует в некрозе, но не апоптозе УГК. Результаты ингибиторного анализа представлены на Рис. 7-8 и в Таблицах 2 и 3.

Таблица 2. Влияние аксотомии и модуляторов кальций-зависимого сигнального пути на апоптоз сателлитной глии МРН, расположенной вдали от места повреждения. Int – интактные МРН, АТ – аксотомированные МРН. В скобках – количество опытов. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

Модулятор	Мишень и действие на $[Ca^{2+}]_i$	Апоптоз глии, отн. ед	
		Int	АТ
Контроль (К)		0.2±0.1 (43)	0.4±0.1 (54)
Изменение внеклеточной концентрации Ca^{2+}			
(1/3) $[Ca^{2+}]_o$	$[Ca^{2+}]_i \downarrow$	0.3±0.2(7)	0.6±0.2(7)
3 $[Ca^{2+}]_o$	$[Ca^{2+}]_i \uparrow$	0.3±0.2(8)	1.8±0.3(8) ***Int ***К
Модуляторы механизмов регуляции уровня внутриклеточного Ca^{2+}			
Иономицин (500 нМ)	Ca^{2+} ионофор, $[Ca^{2+}]_i \uparrow$	7.4±0.7(8) ***К	17±3.4(8) **Int***К
Ингибиторы Ca^{2+} каналов			
CdCl ₂ (100 мкМ)	Ca^{2+} каналы плазмалеммы, $[Ca^{2+}]_i \downarrow$	0(7)	0(11)
Циклоспорин А (5 мкМ)	МРТР, $[Ca^{2+}]_i \downarrow$	0(6)	0(6)
Тапсигаргин (5 мкМ)	Ca^{2+} -АТФазы ЭР, $[Ca^{2+}]_i \uparrow$	0.3±0.2(7)	3.3±0.7(7) **Int***К
Рианодин (10 мкМ)	рианодиновые	0(6)	0(6)
Дантролен (20 мкМ)	рецепторы, $[Ca^{2+}]_i \downarrow$	0.6±0.4 (6)	2.1±0.3(7) *Int***К
Ингибиторы Ca^{2+}-зависимых каналов и сигнальных белков			
Мауротоксин (10 нМ)	Ca^{2+} -зависимые K^+ каналы	2.5±0.7(8) ***К	5±2(8) *Int***К
Стауроспорин (1 нМ)	протеинкиназа С	1.2±0.3(6) ***К	3.2±0.7(6) *Int***К
Флуфеназин (2 мкМ)	кальмодулин	0.5±0.2(11)	0.6±0.2(15)
KN-93 (2 мкМ)	кальмодулинкиназа II	0(9)	0(9)

Таблица 3. Влияние аксотомии и модуляторов кальций-зависимого сигнального пути на некроз сателлитной глии МРН, расположенной вдали от места повреждения. Int – интактные МРН, АТ – аксотомированные МРН. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

Модулятор	Мишень и действие на $[Ca^{2+}]_i$	Некроз глии, %	
		Int	АТ
Контроль (К)		10±1(43)	15±1(54) ***Int
Изменение внеклеточной концентрации Ca^{2+}			
(1/3) $[Ca^{2+}]_o$	$[Ca^{2+}]_i \downarrow$	9±1(7)	16±2(7) *Int
3 $[Ca^{2+}]_o$	$[Ca^{2+}]_i \uparrow$	1±1(8) ***К	6±1(8) *Int ***К
Модуляторы механизмов регуляции уровня внутриклеточного Ca^{2+}			
Иономицин (500 нМ)	Ca^{2+} ионофор, $[Ca^{2+}]_i \uparrow$	25±2(9) ***К	42±5(7) **Int***К
Ингибиторы Ca^{2+} каналов			
CdCl ₂ (100 мкМ)	Ca^{2+} каналы плазмалеммы, $[Ca^{2+}]_i \downarrow$	9±1 (7)	12±1 (11) *Int
Циклоспорин А (5 мкМ)	МРТР, $[Ca^{2+}]_i \downarrow$	7±1(6)	13±2(6) *Int
Тапсигаргин (5 мкМ)	Ca^{2+} -АТФазы ЭР, $[Ca^{2+}]_i \uparrow$	13±1 (7) *К	24±2 (7) ***Int**К
Рианодин (10 мкМ)	Рианодиновые рецепторы, $[Ca^{2+}]_i \downarrow$	6±1 (6)	13(6) ***Int
Дантролен (20 мкМ)		6±1 (6)	9±2(7) *К
Ингибиторы Ca^{2+}-зависимых каналов и сигнальных белков			
Мауротоксин (10 нМ)	Ca^{2+} -зависимые K^+ каналы	12±1 (8)	15±1(8) *Int
Стауроспорин (1 нМ)	протеинкиназа С	6±1 (6)	8±1(6) *Int*К
Флуфеназин (2 мкМ)	кальмодулин	7±1(11)	19±2 (15) ***Int
KN-93 (2 мкМ)	кальмодулинкиназа II	7±1(9) ***К	7±1 (9) ***К

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Аксотомия МРН повышала уровень Ca^{2+} в нейроне и УГК, ускоряла функциональную инактивацию МРН и стимулировала смерть удаленных глиальных клеток. Прекращение импульсации МРН при АТ было связано с входом Ca^{2+} в цитозоль МРН через Ca^{2+} каналы плазматической мембраны и недостаточным выведением Ca^{2+} из митохондрий через МРТР.

К гипотетическим механизмам АТ-индуцированного повышения уровня Ca^{2+} можно отнести ретроградную волну Ca^{2+} от места повреждения (соответствующий градиент Ca^{2+} не мог обнаруживаться при более длительных интервалах между регистрациями флуоресценции зонда), а также вторичный вход Ca^{2+} в цитозоль из внеклеточного пространства через плазмалемму и снижение активности SERCA. АТ-индуцированное нарушение Ca^{2+} гомеостаза УГК стимулирует их смерть: некроз или апоптоз.

Иономицин, повышающий уровень Ca^{2+} в цитозоле, резко повышал оба типа смерти УГК во всех препаратах. Это указывает на центральную роль повышения цитозольного Ca^{2+} в цепи событий, ведущей к клеточной смерти. Аксотомия приводит к входу Na^+ в аксоплазму и последующей инверсии работы $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменника (Mandolesi et al., 2004). Это ведет к выходу Na^+ из аксона и вторичному входу Ca^{2+} в аксон, что, наряду с высвобождением Ca^{2+} из ЭР и его входом через Ca^{2+} каналы плазмалеммы, может служить основой АТ-индуцированной ретроградной кальциевой волны в аксоне (Rishal, 2014). С другой стороны, повышение $[\text{Ca}^{2+}]_o$ приводит к снижению уровня Na^+ нейроне (Moser et al., 1996). Вероятно, эти процессы параллельно происходят в глиальной оболочке, стимулируя апоптоз.

Повышение некроза УГК при аксотомии было связано с повышением уровня Ca^{2+} в цитозоле, нехваткой внеклеточного Ca^{2+} , недостаточной работой SERCA по закачке Ca^{2+} в ЭР и участием РКС и СаМКП. Стимуляция апоптоза УГК при аксотомии была связана с действием внеклеточного Ca^{2+} , проникновением Ca^{2+} через плазматическую мембрану в цитозоль, недостаточной откачкой Ca^{2+} в ЭР через SERCA, выходом Ca^{2+} из ЭР через RyR, притоком ионов калия через Ca^{2+} -зависимые K^+ каналы и работой РКС. В данной работе выявлены кальций-зависимые факторы выживания УГК после аксотомии МРН: 1) $[\text{Ca}^{2+}]_o$ необходим для развития апоптоза УГК при аксотомии; 2) работа SERCA защищает УГК от АТ-индуцированного апоптоза. Ингибирование Ca^{2+} -зависимых калиевых каналов мауротоксином стимулировало апоптоз, но не некроз УГК в обоих типах препаратов. В целом,

на сегодняшний день антиапоптотические свойства данных каналов превалируют, а проапоптотические свойства эти каналы проявляют в определенных типах клеток (Mohr, 2019). Существует предположение, что блокада Ca^{2+} -зависимых калиевых каналов нарушает митохондриальный гомеостаз клеток, в итоге приводя к апоптозу (Kondratskyi et al., 2015).

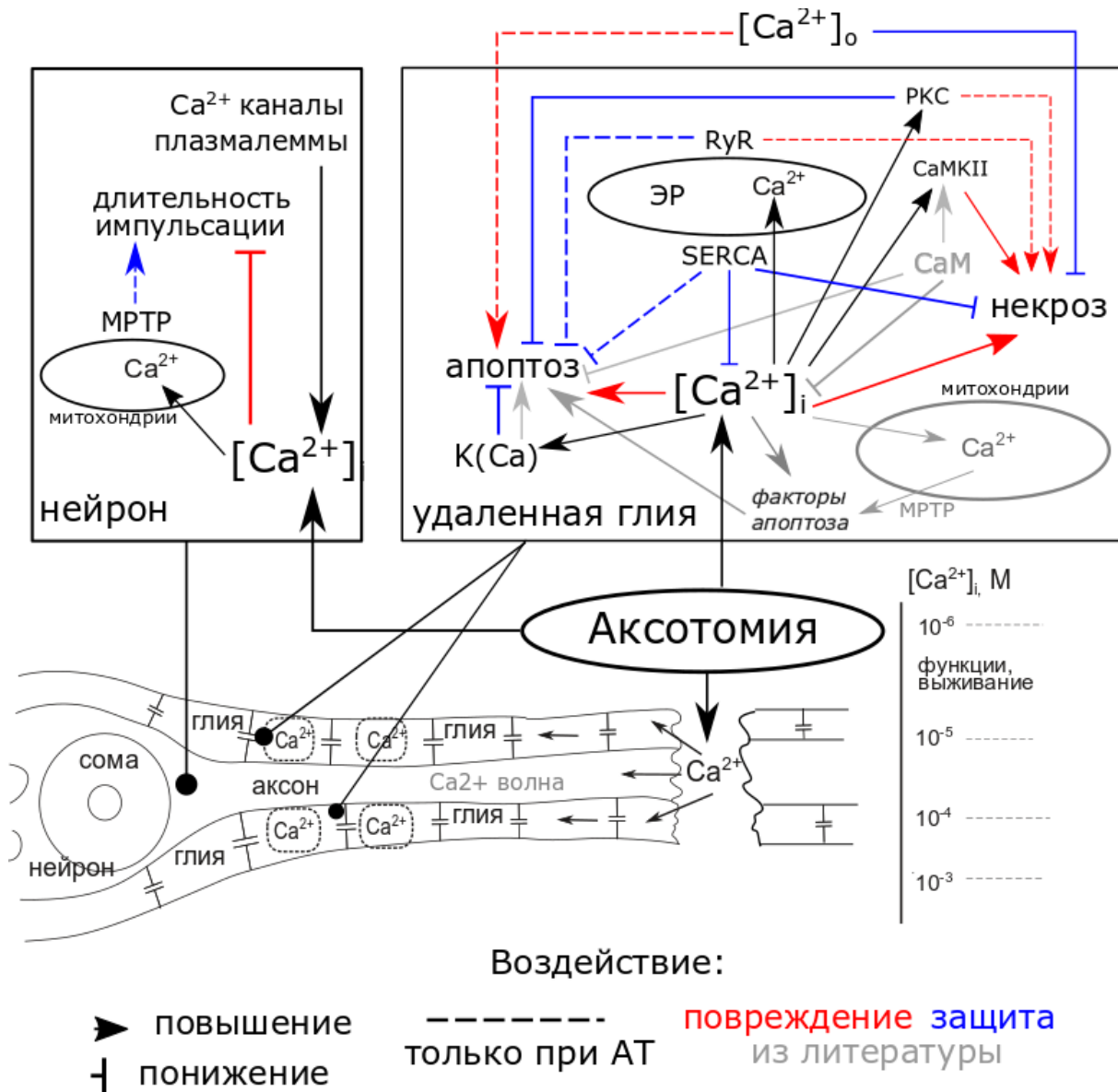


Рис. 9. Схема участия ионов Ca^{2+} , Ca^{2+} каналов и белков Ca^{2+} -зависимого пути в смерти или выживании УГК РРР после АТ на основе полученных экспериментальных данных. АТ провоцирует вход Ca^{2+} в аксолемму и повышение уровня Ca^{2+} в цитозоле нейрона и глии, при этом сокращая время активности нейрона. В то же время выход Ca^{2+} из митохондрий через МРТП продлевает время импульсации МРН. Повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ стимулирует апоптоз и некроз УГК, при этом работа кальциевой АТФазы ЭР (SERCA), выкачивающей Ca^{2+} из цитозоля, защищает УГК от некроза и апоптоза. Протеинкиназа С (PKC) и кальмодулинкиназа II (CaMKII) участвуют в некрозе УГК, однако PKC препятствует апоптозу УГК. Будучи активированными ионами Ca^{2+} , Ca^{2+} -зависимые K^+ каналы K(Ca) защищают УГК от апоптоза. $[\text{Ca}^{2+}]_o$ стимулирует апоптоз, но снижает некроз УГК.

Таким образом, цитозольный K^+ является существенным антиапоптотическим фактором в УГК. Эти же Ca^{2+} -зависимые калиевые каналы участвуют в апоптозе УГК, индуцированном ингибитором РКС стауроспорином. Известно, что в клетках глиобластомы эти каналы управляют важным элементом апоптоза – апоптотическим уменьшением объема клетки, сопровождающимся также повышением цитозольного Ca^{2+} (McFerrin, 2012). Таким образом, в аксотомированном рецепторе растяжения рака РКС, наряду с Ca^{2+} -зависимыми калиевыми каналами, выполняет противоапоптотическую функцию. Механизмы действия данных каналов и РКС, вероятно, связаны друг с другом. При этом, стауроспорин, блокируя РКС, достоверно снижал некроз УГК при АТ. Видимо, РКС также участвует в некрозе УГК, но по иному механизму, чем в случае апоптоза.

Результаты экспериментов обобщены в концептуальной схеме (Рис. 9). Полученные данные об участии механизмов кальциевой регуляции в АТ-индуцированной смерти УГК указывают на некоторые возможные направления поиска новых и развития существующих терапевтических методов нейропротекции.

ВЫВОДЫ

1. Аксотомия способствует функциональной инактивации 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 функциональной инактивации 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 основных работ, опубликованных по теме диссертации в журналах, рекомендованных ВАК РФ

1. Узденский А.Б. Реакции нейронов и глиальных клеток речного рака на фотодинамическое воздействие: сигнальная регуляция, ультраструктурные изменения и нейроглиальные взаимодействия / А.Б. Узденский, М.В. Рудковский, Г.М. Федоренко, Е.В. Бережная, И.А. Ищенко, В.Д. Ковалева, М.А. Командиров, М.А. Негинская, **А.М. Хайтин**, С.А. Шарифулина // Биологические Мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии. – 2013. – Т. 30, № 5. – С. 334–349.
2. Uzdensky A. Protection of the Crayfish Mechanoreceptor Neuron and Glial Cells from Photooxidative Injury by Modulators of Diverse Signal Transduction Pathways / A. Uzdensky, E. Berezhnaya, **A. Khaitin**, V. Kovaleva, M. Komandirov, M. Neginskaya, M. Rudkovskii, S. Sharifulina // Molecular Neurobiology. – 2015. – V. 52, N. 2. – P. 811–825.
3. **Khaitin A.M.** The method of isolation of the crayfish abdominal stretch receptor maintaining a connection of the sensory neuron to the ventral nerve cord ganglion / A.M. Khaitin, Rudkovskii M. V., A.B. Uzdensky // Invertebrate Neuroscience. – 2015. – V. 15, N. 176. – P. 1–10
4. **Khaitin, A.** Ca²⁺ mediates axotomy-induced necrosis and apoptosis of satellite glial cells remote from the transection site in the isolated crayfish mechanoreceptor / **A. Khaitin**, M. Rudkovskii, A. Uzdensky // Mol. Cell. Neurosci. 2018. – V. 88. – P. 7–15.
5. **Khaitin, A.** Different ways of intracellular Ca²⁺ concentration shift in the survival of crayfish stretch receptor and satellite glia after axotomy / **A. Khaitin**, M. Rudkovskii, A. Uzdensky // Glia. – 2017. – V. 65, N. S1. P. – E160.
6. Rudkovskii, M. The role of different signaling proteins in the axotomy-induced apoptosis of glial cells in the crayfish stretch receptor/ M. Rudkovskii, **A. Khaitin**, M. Komandirov, V. Kovaleva, A. Uzdensky // Glia. – 2017. – V. 65, N. S1, P. E274.
7. **Haytin, A.** On the role of Ca²⁺ in apoptosis and necrosis of distant glial cells surrounding the axotomized sensory neuron in the crayfish stretch receptor / **A. Haytin**, M. Rudkovskii, A. Uzdensky // Glia. – 2015, – V. 63, N. S1, – P. E208.
8. **Khaitin A.M.** Axotomy-induced ultrastructural alterations and Ca²⁺-dependent necrosis and apoptosis of the crayfish mechanoreceptor neuron and glial cells / **A.M. Khaitin**, M.V. Rudkovskii, A.G. Fedorenko, A.B. Uzdensky // J. Bioenerg. Biomembr. – 2018. – V. 50, N. 6, – P. 548-549.
9. Rudkovskii M. V. The effect of axotomy on firing and ultrastructure of the crayfish mechanoreceptor neurons and satellite glial cells. / Rudkovskii M. V, Fedorenko A.G., **Khaitin A.M.**, Pitinova M.A., Uzdensky A.B. // Mol. Cell. Neurosci. – 2020. – V. 107 – P.103534.
10. Uzdensky A. Mitochondrial permeability transition pores but not ryanodine-sensitive endoplasmic reticulum calcium channels are involved in photodynamic injury of sensory neurons and satellite glial cells in the crayfish stretch receptor: T03-38B / A. Uzdensky, **A. Khaitin**, I. Ischenko // 11th European Meeting on Glial Cell Function in Health and Disease, Berlin, Germany. Glia. 2013. - V.61, N. S86, App. 1.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Хайтин А.М.** Изучение влияния риаодина и циклоспорина а на динамику Ca²⁺ в механорецепторных нейронах речного рака при фотодинамическом воздействии / **А. Хайтин**, И. Ищенко, А. Узденский // Материалы XVI международной конференции по нейрокибернетике. Ростов-на-Дону. - 2015. – Т. 1. - С. 61–64.
2. Узденский А.Б. Сигнальная регуляция смерти нейронов и глиальных клеток при фотодинамическом воздействии / Узденский А.Б., Рудковский М.В., Бережная Е.В., Ковалева В.Д., Ищенко И.А., Командиров М.А., Негинская М.А., Шарифулина, С.А., **Хайтин, А.М.** // Международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация». Пущино. – 2013. – Т. 30. – Вып. 5. – С. 334–349.
3. Бережная Е.В. Роль сигнальных процессов в фотодинамическом повреждении нейронов и глии / Е.В. Бережная, М.А. Негинская, С.А. Шарифулина, В.Д. Ковалева, **А.М. Хайтин**, И.А. Ищенко, М.А. Командиров, М.В. Рудковский, А.Б. Узденский // XXII съезд Физиол.

общества имени И. П. Павлова. Тезисы докладов. Волгоград. – 2013. – С.59.

4. Uzdensky A. Protection of the Crayfish Mechanoreceptor Neuron and Glial Cells from Photooxidative Injury by Modulators of Diverse Signal Transduction Pathways / A. Uzdensky, E. Berezhnaya, **A. Khaitin**, V. Kovaleva, M. Komandirov, M. Neginskaya, M. Rudkovskii, S. Sharifulina // Twelfth International Conference on Neuroprotective Agents. The Boar's Head Inn, Charlottesville, Virginia, USA. – 2014. – P. 40.

5. **Хайтин А.М.** Роль аксотомии и изменения концентрации Ca^{2+} в смерти глиальных клеток в рецепторе растяжения рака / **А.М. Хайтин**, М.В. Рудковский, А.Б. Узденский // Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины: VI Международная научно-практическая конференция. Ростов-на-Дону. – 2015. – С. 288–289.

6. **Хайтин А.М.** Участие Ca^{2+} в смерти глиальных клеток при аксотомии механорецепторного нейрона рака / **А.М. Хайтин**, М.В. Рудковский, А.Б. Узденский, // V съезд биофизиков России. Материалы докладов. Ростов-на-Дону. – 2015. – Т. I. - С. 373.

7. **Хайтин А.М.** Участие Ca^{2+} в смерти глиальных клеток в рецепторе растяжения рака вследствие аксотомии / **А.М. Хайтин**, М.В. Рудковский, А.Б. Узденский // Международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация». Материалы докладов. Пущино. – 2015. – Т.1. – С. 210–214.

8. **Khaitin A.M.** The role of calcium-dependent signal pathway in glial cell death after axotomy of the crayfish stretch receptor / **A.M. Khaitin**, M.V. Rudkovskii, A.B. Uzdensky // Biomembranes 2016: Mechanisms of Aging and Age-Related Diseases. International Conference. Book of abstracts. Dolgoprudny. – 2016. – P.106.

9. **Khaitin A.M.** The Influence of Crayfish Stretch Receptor Axotomy on Glial Cell Death: Calcium-Dependent Signal Pathway / **A.M. Khaitin** et al.// EMBO Conference “Imaging the Brain”. Abstract Book. Warsaw, Poland. – 2016. – P. 54.

10. **Хайтин А.М.** Влияние различных путей входа ионов кальция в цитозоль на импульсную активность механорецепторного нейрона рака после аксотомии / **А.М. Хайтин**, М.В. Рудковский // Международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация». Материалы докладов. Пущино. – 2017. – Т.1. – С. 98–102.

11. **Khaitin A.M.** Axotomy-induced death of glial cells remote from the transection site in the isolated crayfish stretch receptor: Ultrastructural alterations and signaling pathways/ **A.M. Khaitin**, M.V. Rudkovskii, A.G. Fedorenko, A.B. Uzdensky // Fourteenth International Conference on Neuroprotective agents. Estes Park, Colorado, USA. – 2018. – P. 37.

12. **Хайтин А.М.** Роль ионов кальция в смерти сателлитных глиальных клеток, отдаленных от места повреждения аксона при аксотомии / **А.М. Хайтин**, М.А. Питинова // Современные методы физиологических исследований. 5-я научно-практическая конференция по молекулярной нейробиологии и физиологии. – 2018. С. 18–19.

13. **Хайтин А.М.** Участие кальций-зависимых белков и ионных каналов в индуцированной аксотомией смерти глиальных клеток / **А.М. Хайтин**, М.А. Питинова, С.В. Родькин // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Пущино. – 2019. – Т. 2. – С. 516–520.

14. **Хайтин А.М.** Участие кальциевой сигнализации в выживании и смерти нейронов и удаленных глиальных клеток после аксотомии рецептора растяжения рака / **А.М. Хайтин**, М.В. Рудковский, А.Б. Узденский // VI съезд биофизиков России. – 2019. – Т.1. – С. 326.

15. **Хайтин А.М.** Ультраструктурные изменения и участие ионов Ca^{2+} в некрозе и апоптозе нейронов и глиальных клеток в рецепторе растяжения рака после аксотомии / **А.М. Хайтин**, М.В. Рудковский, А.Г. Федоренко, А.Б. Узденский // Acta Naturae. – 2019. – Т.1, Спецвыпуск, – С. 126.