

ДЗРЕЯН ВАЛЕНТИНА АЛЕКСАНДРОВНА

**АЦЕТИЛИРОВАНИЕ И ДЕАЦЕТИЛИРОВАНИЕ ФАКТОРОВ
ТРАНСКРИПЦИИ p53 И E2F1 КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ
НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ПОСЛЕ АКСОТОМИИ**

1.5.4 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

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

Ростов–на–Дону – 2022

Работа выполнена в лаборатории "Молекулярная нейробиология" Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Южный федеральный университет»

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Демьяненко Светлана Викторовна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор

Плотников Егор Юрьевич

Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», отдел функциональной биохимии биополимеров, лаборатория структуры и функции митохондрий, заведующий лабораторией

доктор биологических наук

Семина Екатерина Владимировна

Образовательно-научный кластер «Институт медицины и наук о жизни (МЕДБИО)» Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», заместитель руководителя по развитию и проектной деятельности

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук

Защита диссертации состоится «___» _____ 202_ года в _____ часов на заседании Диссертационного совета 21.2.058.07 на базе ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1; и на сайте www.rsmu.ru

Автореферат разослан «___» _____ 202_ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор



Кягова Алла Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Посттрансляционному ацетилированию/деацетилированию с помощью гистонацетилтрансфераз (НАТ) и деацетилаз гистонов (HDAC) подвергаются не только гистоны, но и негистоновые белки, такие как шапероны, сигнальные белки, факторы транскрипции. Через ацетилирование/деацетилирование регулируется активность негистоновых белков, белок-белковые взаимодействия, их клеточная локализация, что определяет рост, дифференцировку, миграцию и выживание клеток как в норме, так и при патологии (Demyanenko et al., 2021; Chao et al., 2016).

Травмы периферических нервов (ТПН) – одна из распространенных причин инвалидизации и смертности населения и, как следствие, одна из актуальных проблем здравоохранения не только в России, но и во всем мире (Rishal, Fainzilber, 2014; Navarro et al., 2007). Ситуация ухудшается отсутствием эффективных нейропротекторов, способных защитить нервные клетки, особенно в первые часы после повреждения. Разработка новых подходов к поиску эффективных нейропротекторов требует более глубокого и всестороннего изучения внутриклеточных процессов регуляции выживания и смерти нервных клеток после повреждения.

В настоящей работе изучаются процессы ацетилирования/деацетилирования негистоновых белков при аксональном повреждении, которое имеет место быть при бытовых и спортивных травмах, дорожно – транспортных происшествиях, ошибках медперсонала при проведении инъекций и т.д (Abe, Cavalli, 2008; Casas et al., 2015), а также сопровождает ранние стадии нейродегенеративных расстройств, таких как болезнь Альцгеймера, Паркинсона и бокового амиотрофического склероза (Gandhi, Abramov, 2015; Batulan et al., 2006). Растущий объем знаний о биохимических процессах, череду которых вызывает аксотомия, указывают на важную роль посттрансляционных модификаций факторов транскрипции и сигнальных белков в реакциях посттравматических нейронов и глии. Однако, влияние ацетилирования/деацетилирования на функции белков при травматическом повреждении нервов практически не изучено.

Изучение ацетилирования/деацетилирования негистоновых белков началось в связи с успехами клинического использования ингибиторов HDACs в терапии различных форм рака и было обусловлено поиском причин цитотоксичности неселективных ингибиторов HDAC (HDACi) (Chao et al., 2016; Lakshmaiah et al., 2014). Были идентифицированы негистоновые субстраты HDACs и НАТs, которые являются супрессорами опухолей, медиаторами передачи сигналов, стероидными рецепторами, факторами транскрипции и ко-регуляторами, а также структурными белками, шаперонами и белками ядерного импорта (Spange et al., 2009; Mrakovcic et al., 2019). Количество идентифицированных белков, активность которых регулируется ацетилированием/деацетилированием на сегодняшний день наверняка ниже фактического количества, представляющего ацетилом *in vivo*. Исследований, направленных на изучение ацетилирования/деацетилирования негистоновых белков в условиях нейродегенерации крайне мало, а исследования этих процессов при травмах периферических нервов – практически отсутствуют.

HDACs и НАТs широко представлены в нервной системе, однако роль разных изоформ HDACs в выживании и смерти нейронов и глии неоднозначна. Некоторые HDAC опосредуют процессы выживания, в то время как другие участвуют в нейротоксических реакциях клеток, а третьи могут проявлять как нейропротекторные, так и патологические свойства в зависимости от типа клеток, их внутриклеточной локализации и характера посттрансляционных модификаций ферментов (Demyanenko et al., 2020a; 2020b). Показано, что ингибиторы HDACs (HDACi) оказывают нейропротекторный эффект в опытах с моделированием повреждения спинного мозга (Kameda et al., 2018; Wong, Zou, 2014), а также при аксотомии зрительного нерва (Schmitt et al., 2016; Weng et al., 2016). Исследование изоформ HDAC и НАТ, которые способны взаимодействовать с факторами транскрипции и сигнальными белками в посттравматических нервных клетках будет способствовать разработке субстрат и тканеспецифичных нейропротекторов на основе ингибиторов HDAC. Выполненные на двух экспериментальных моделях аксотомии беспозвоночных и млекопитающих исследования позволили не только установить сам факт взаимодействия

HDAC и HAT с негистоновыми белками, но и оценить в каких клетках – нейронах или глии, в каких компартментах клеток и в какой период после травмы происходит ацетилирование/деацетилирование регуляторных белков, как это влияет на апоптоз и регенерацию, а также насколько эволюционно древним является данный механизм регуляции активности белков.

Цель работы. Исследование процессов ацетилирования и деацетилирования факторов транскрипции E2F1 и p53 в нейронах и глиальных клетках периферической нервной системы беспозвоночных и млекопитающих в различные периоды после аксотомии периферических нервов.

Задачи:

1. Провести протеомное исследование изменения уровня сигнальных и нейрональных белков в аксотомированных ганглиях брюшной нервной цепочки речного рака на ранних сроках после аксотомии. Установить потенциальные терапевтические мишени – белки, уровень которых повышался в ответ на аксотомию в первые часы.

2. Исследовать уровень и внутриклеточную локализацию эпигенетических и сигнальных белков, содержание которых повышалось в аксотомированных ганглиях речного рака в первые часы после повреждения: гистондеацетилаз I класса HDAC1, HDAC2 и HDAC3, факторов транскрипции E2F1 и p53 и их ацетилированных форм, а также каспазы 3 и ее активной формы в нейронах и глиальных клетках периферической нервной системы беспозвоночных и млекопитающих на разные сроки после аксотомии.

3. Изучить белок-белковые взаимодействия ацетилированных форм факторов транскрипции E2F1 и p53 с различными изоформами HDAC I класса после перерезки седалищного нерва крысы.

4. Оценить деацетилазную активность HDAC I класса в аксотомированных спинномозговых ганглиях крысы.

5. Оценить влияние ингибирования гистондеацетилаз HDAC I класса вальпроатом натрия на содержание и внутриклеточную локализацию факторов транскрипции p53 и E2F1 и их ацетилированных форм

6. Изучить влияние ингибирования фактора транскрипции E2F1 на уровень апоптоза в аксотомированных ганглиях крысы.

Научная новизна. В настоящей работе впервые проведено исследование экспрессии и внутриклеточной локализации гистондеацетилаз HDAC1, HDAC2 и HDAC3, а также факторов транскрипции E2F1 и p53 в нейронах и глиальных клетках аксотомированных ганглиев речного рака и крысы в острейший и ранний восстановительный периоды после перерезки седалищного нерва. Изучены белок-белковые взаимодействия факторов транскрипции E2F1 и p53 с различными изоформами HDAC I класса. Полученные данные позволили определить, какая изоформа HDAC I класса способна деацетилировать белки-регуляторы апоптоза E2F1 и p53 в клетках ганглиев в разные периоды времени после аксотомии.

После выявления пар белков «субстрат-фермент» определена деацетилазная активность изоформ HDAC I класса в отношении конкретного белка. Это позволило при помощи доступных ингибиторов HDAC I класса перейти к установлению зависимости между ацетилированием регуляторного белка и его активностью в отношении нижестоящих мишеней, а также апоптозом клеток ганглиев после аксонального повреждения.

Научно-практическая значимость. Проведенные исследования позволили выявить два основных фактора транскрипции p53 и E2F1, которые подвергаются посттрансляционному ацетилированию в клетках периферической нервной системы беспозвоночных и млекопитающих в ранний период после аксотомии, что в значительной степени определяет судьбу клетки. В работе показаны сайты ацетилирования, клеточная и внутриклеточная локализация ацетилированных белков и определены изоформы ферментов деацетилирующих p53 и E2F1. Удалось оценить влияние ацетилирования на внутриклеточную локализацию p53 и E2F1 и апоптоз клеток аксотомированных ганглиев беспозвоночных и млекопитающих.

Эти знания лягут в основу теоретической базы, которая может быть далее использована для разработки новых селективных ингибиторов HDAC в качестве потенциальных нейропротекторов, защищающих нейроны и глиальные клетки на ранних сроках после аксонального стресса.

Сфокусированность проекта на механизмах ацетилирования/деацетилирования негистоновых белков, позволит по-новому взглянуть на функции гистонацетилтрансфераз и деацетилаз гистонов, которые могут быть более обширными, чем регуляция транскрипции. Результаты работы оригинальны и научно значимы, поскольку процессы ацетилирования/деацетилирования регуляторных белков находятся в самом начале пути изучения.

Положения, выносимые на защиту:

1. Выраженные изменения белкового профиля в аксотомированных ганглиях БНЦ рака наблюдаются уже через 1 час после перерезки нервов. Экспрессия 48 сигнальных белков повышается, а 31 белка – снижается. Через 3 часа наблюдается повышение уровня 49 сигнальных белков, а уровни 37 белков снижаются. При этом, в аксотомированных ганглиях одновременно экспрессируются белки, участвующие как в нейродегенерации, среди которых изучаемые нами белки HDAC1, HDAC2, p53, E2F1, каспаза 3, а также ряд других белков (Bcl-10, SMAC/DIABLO, AIF и другие), так и в нейропротекции (Bcl-x, Mcl-1, p21WAF-1, MDM2, протеинкиназа ERK5 и рецептор эстрогенов).

2. В аксотомированных ганглиях дорзальных корешков спинного мозга крысы наиболее ранние и специфичные изменения наблюдаются со стороны гистондеацетилаз HDAC1, HDAC2 и HDAC3, экспрессия которых увеличивается уже через 1 и 4 часа после перерезки седалищного нерва. Экспрессия фактора транскрипции E2F1 в аксотомированных нейронах ганглиев повышается через 4 часа, а проапоптотических белков p53, активированной каспазы 3 – через 24 часа. Уровень ацетилированного E2F1 (K120) и ацетилированного p53 (K373) снижаются в цитоплазме нейронов ганглиев через 24 часа после аксотомии.

3. Нейротравма вызывает транслокацию HDAC1, факторов транскрипции p53 и E2F1 из ядра в цитоплазму в первые 24 часа после аксотомии и, наоборот, транслокацию HDAC3 из цитоплазмы в ядро через 4 часа после повреждения.

4. Аксотомия седалищного нерва ассоциирована с повышением экспрессии и активности HDAC1 в аксотомированных ганглиях крыс, что приводит к снижению ацетилированного p53 (K373) и ацетилированного E2F1 (K120) в цитоплазме нейронов.

5. Введение ингибитора HDAC I класса вальпроата натрия отменяет вызванную аксотомией транслокацию p53 и E2F1 из ядра в цитоплазму и увеличивает уровень ацетилирования p53 и E2F1 по K373 и K120, соответственно в нейронах ганглиев, защищая их клетки от апоптоза.

6. Ингибирование активности E2F1 оказывает выраженное нейропротекторное действие: полностью устраняет вызванную аксотомией повышенную экспрессию белков p53 и активной каспазы 3, защищая аксотомированные ганглии от апоптоза.

Личный вклад автора. Личное участие автора заключалось в постановке и проведении экспериментальных исследований, в получении всех видов изображений, систематизации, обработке и интерпретации всех полученных данных. Планирование исследований, обсуждение и обобщение полученных результатов осуществлялось совместно с д.б.н., ведущим научным сотрудником лаборатории «Молекулярная нейробиология» С. В. Демьяненко. Проведение операционных процедур по аксотомии и выделению ганглиев осуществлялось совместно с младшим научным сотрудником лаборатории «Молекулярная нейробиология» М.А. Питиновой.

Степень достоверности. Выводы и положения, выносимые на защиту, основаны на статистически значимых данных. Статистический анализ проводили в SigmaPlot 12.5. Все эксперименты были выполнены минимум в 3-х независимых биологических повторах. Статистическую оценку различий между экспериментальными группами проводили с помощью t-теста, а также 1-Way ANOVA и 2- Way ANOVA. Высокая степень достоверности результатов достигалась благодаря достаточному количеству животных в

экспериментальных группах, верификацией полученных данных альтернативными методами, использованию сертифицированного научного оборудования и реагентов, что позволило сопоставлять полученные результаты с результатами других авторов.

Апробация, внедрение, публикации. Материалы диссертации представлены на всероссийских и международных конференциях: Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, Россия, 2019, 2021), Научно-практической конференции с международным участием «Генетика — фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции» (Ростов на Дону, Россия, 2019), Международном симпозиуме «Оптика и биофотоника» «Saratov Fall Meeting» (Саратов, Россия, 2016, 2017, 2021), XIV интернациональной конференции «International Conference on Neuroprotective agents» (Колорадо, США, 2018), XVIII международной конференции «Биомембраны-2018» (Долгопрудный, Россия, 2018), XXVI Европейской конференции по апоптозу «Cell death in disease: from small molecules to translational medicine» (Санкт-Петербург, Россия, 2018), VI Съезде биохимиков России (Сочи, Дагомыс, Россия, 2019), Международном молодежном научном форуме «Ломоносов» (Москва, Россия, 2021, 2022), IX Международной школе молодых учёных по молекулярной генетике на тему: «Геномика 21 века – от исследования геномов к генетическим технологиям» (виртуальная конференция, 2021), Российской научно-практической конференции с международным участием «Обмен веществ при адаптации и повреждении» (Ростов-на-Дону, Россия, 2019, 2020, 2021), VII Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста» (Рязань, Россия, 2021), Международном Конгрессе: VII съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы (Санкт-Петербург, Россия, 2019), XXI Зимней молодежной школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии (Россия, Гатчина, 2019, 2020), на заседании лаборатории «Молекулярная нейробиология» (Ростов-на-Дону, Россия, 2022).

Результаты научных исследований вошли в отчеты по грантам Минобрнауки России № 6.6324.2017/8.9 и №6.4851.2017/6,7.

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 40 работ, из них: 27 публикаций в научных рецензируемых изданиях, входящих в перечень ВАК, индексируемых в Web of Science и Scopus, и 13 публикаций в сборниках материалов научных конференций.

Конкурсная поддержка работы. Проведенные исследования поддержаны стипендией Президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам, осуществляющим перспективные научные исследования и разработки по приоритетным направлениям модернизации российской экономики, на 2022–2024 годы (СП-5690.2021.4), а также проектами Минобрнауки России (№ 6.6324.2017/8.9 и №6.4851.2017/6,7).

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 157 страницах, включает 3 таблицы и 37 рисунков. Список литературы содержит 189 источников, из них 188 зарубежных.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Модели нейротравмы, используемые в настоящей работе – аксотомированные ганглии брюшной нервной цепочки (БНЦ) самцов речного рака *Astacus leptodactylus* и ганглии корешков спинного мозга крысы (DRG, dorsal root ganglion), полученные путем перерезки седалищного нерва (Рис. 1). Ганглии БНЦ получали из самцов речного рака из притоков Дона *Astacus leptodactylus* (размер ≥ 4 -6 см). Опыты с перерезкой седалищного нерва проводились на взрослых крысах-самцах (*Wistar*, беспородные), весом 200–250 г. Контрольные БНЦ пересекали на переднем и заднем концах, а в подопытных коннективы разрезались по краям и между ганглиями, так что получалось 6 двусторонне аксотомированных ганглиев. Перерезку седалищного нерва и изоляцию DRG осуществляли согласно стандартному протоколу, описанному Savastano et al. (Savastano et al., 2014).

Исследования выполнены с соблюдением "Правил лабораторной практики в Российской Федерации" (приказ № 708н от 23.08.2010), а также в соответствии с требованиями, сформулированными в Директивах Совета Европейского сообщества 86/609/ЕЕС об использовании животных для экспериментальных исследований (24.11.1986).

План исследования. Первый этап работы: протеомное исследование изменения уровня сигнальных и нейрональных белков в аксотомированных ганглиях БНЦ речного рака на ранних сроках после аксотомии, с целью выявить белки, уровень которых повышался в ответ на аксотомию в первые часы. Для дальнейшего исследования выбраны следующие белки, уровень которых после аксотомии заметно возрастал: p53, E2F1, каспаза 3, гистондеацетилаз HDAC1, HDAC2 и HDAC3. Далее проведен анализ уровня экспрессии исследуемых белков с помощью ПЦР в реальном времени, а также содержания и внутриклеточной локализации выявленных белков и их ацетилированных форм в поврежденных ганглиях в разные сроки после аксотомии. Второй этап работы: анализ белок-белковых взаимодействий ацетилированных форм факторов транскрипции p53 и E2F1 с различными изоформами HDAC I класса после перерезки седалищного нерва крысы. Определена деацетилазная активность HDAC1 в отношении конкретного белка в иммунопреципитате цитоплазматической фракции аксотомированных спинномозговых ганглиев крысы. Неселективный ингибитор HDAC I класса вальпроат натрия и химический ингибитор E2F1 HLM006474 использованы для изучения механизмов участия исследуемых белков, процессов ацетилирования и деацетилирования в гибели клеток ганглиев, а также возможности нейропротекции после нейротравмы.

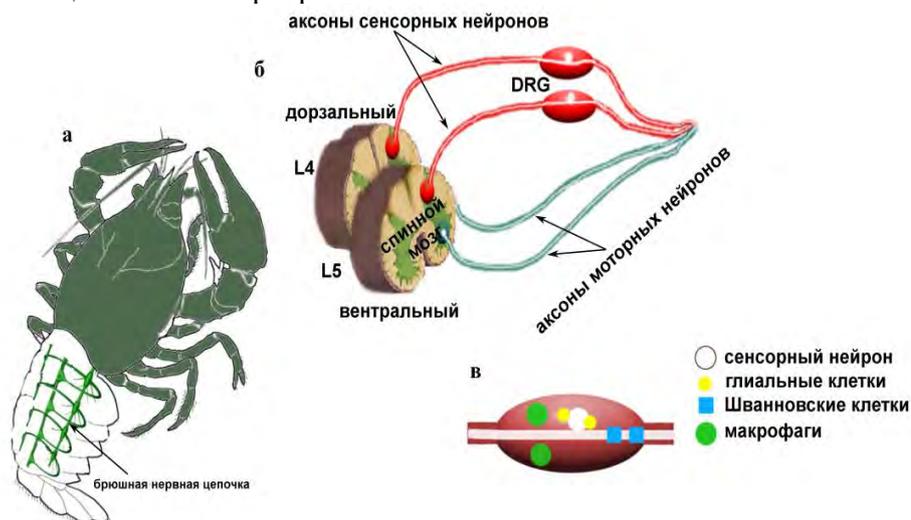


Рисунок 1. Экспериментальные модели аксотомии. а – ганглии брюшной нервной цепочки; б – дорзальные ганглии крысы; в – строение дорзальных ганглиев (Rodkin et al., 2021)

Основные методы

Для протеомного исследования экспрессии сигнальных белков в ганглиях БНЦ рака использовались наборы реактивов и протеомные микрочипы «The Panorama Antibody Microarray - Cell Signaling» (CSAA1, SigmaAldrich). Ганглии, полученные из 10 аксотомированных БНЦ (опыт), или 10 изолированных БНЦ (контроль) гомогенизировали на холоде с помощью ультразвукового гомогенизатора Vibra-Cell VCX 130 (Sonics, США) в лизирующем буфере «Extraction/Labeling Buffer» (E0655, SigmaAldrich), содержащем нуклеазу бензоназу и ингибиторы протеаз и фосфатаз. После центрифугирования в надосадочной жидкости, содержащей цитоплазматические фракции, с помощью реактива Bradford спектрофотометрически определялась концентрация белка. Затем подопытный и контрольный лизаты (1 мг/мл) окрашивались в одном варианте с помощью флуорохромов Cy3 и Cy5, а в другом – наоборот, с помощью Cy5 и Cy3. После удаления несвязавшегося красителя в растворах меченых белков инкубировали протеомные микрочипы. После 40-минутной гибридизации, отмывки и высушивания микрочипы сканировали на флуоресцентном сканере GenePix 4100A (Molecular Devices, USA) на длинах волн, соответствующих максимумам флуоресценции Cy3 и Cy5: 532 и 635 нм. Опыты повторяли 2

раза и полученные данные усредняли. Использовали критерий Стьюдента и уровень значимости 95%. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение.

Выделение суммарной мРНК и ПЦР в реальном времени. Суммарную РНК выделяли из DRG через 1, 4, 24 часа и 7 суток после перерезки седалищного нерва с использованием коммерческого набора Реагент ExtractRNA (Евроген, Москва, Россия). кДНК получали путем обратной транскрипции с использованием набора реагентов MINT Reverse Transcriptase (Евроген, Москва, Россия), а количественную ПЦР проводили с помощью qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Москва, Россия). Уровень экспрессии каждой мРНК рассчитывали с использованием порогового цикла (CT), а количественное определение мРНК проводили сравнительным методом $2^{-\Delta\Delta C_t}$ с использованием β -актина в качестве эталонного гена. Праймеры были синтезированы в ЗАО «Евроген» (Москва, Россия).

Иммуноблоттинг. Цитоплазматическая и ядерная фракции были получены с помощью набора реактивов для экстракции CellLytic™ NuCLEAR™ Extraction Kit (NXTRACT, Sigma). Образцы, содержащие 10–20 мкг белка в 15 мкл, подвергали электрофоретическому разделению в полиакриламидном геле (7–12%) в присутствии додецилсульфата натрия в ячейке mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad, США). После разделения белки подвергли электропереносу на PVDF-мембрану (polyvinyl difluoride membrane 162–0177, Bio-Rad) с использованием системы Trans-Blot® Turbo Transfer System (Bio-Rad, США). После промывки PBS мембрану последовательно инкубировали 1 час в блокирующем буфере (TBS 1% Casein Blocker, Bio-Rad) и в течение ночи при 4°C с первичными кроличьими антителами против исследуемых белков, а затем в течение часа с вторичными антителами против IgG-пероксидазы кролика (A6154, Sigma-Aldrich, 1:1000) и Peroxidase labelled anti-mouse antibody (NIF825, Amersham; 1:5000). Детекцию белков проводили с использованием Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad).

Для подтверждения факта межбелкового взаимодействия между HDAC1/ацетилованный p53 (lys373) и HDAC1/ацетилованный E2F1(lys120) была проведена **ко-иммунопреципитация (Ко-ИП)**. Ко-иммунопреципитацию проводили с помощью набора компании Sileks с использованием магнитных частиц с белком G (SileksMag-Protein G, кат. номер K0182) в соответствии с рекомендациями производителя. Для визуализации белок-белкового взаимодействия, полученный иммунопреципитат подвергали иммуноблоттингу. В полученном иммунопреципитате определяли **гистондеацетилазную активность**. Исследование проводили с использованием коммерческого набора твердофазного иммуноферментного анализа для HDAC1 (USCN Life Science, Ухань, Китай). В каждую лунку добавляли по 100 мкл иммунопреципитата или стандарта и инкубировали 2 часа при 37°C, затем из каждой лунки удаляли жидкость и добавляли по 100 мкл реагента А для детекции и инкубировали 1 час при 37°C. Далее, удаляли жидкость, и лунки трижды промывали промывным раствором. Реагент обнаружения Б (100 мкл) добавляли в лунки и инкубировали в течение 30 минут при 37°C. Жидкость удаляли из каждой лунки и промывали промывочным раствором пять раз. Добавляли раствор субстрата (90 мкл) с последующей инкубацией в течение 20 минут при 37°C. После добавляли стоп-раствор (50 мкл) и планшеты считывали на многолуночном планшет-ридере при 450 нм. Активность HDAC1 выражали как значения относительной оптической плотности (ОП) на нанограмм белка в образце.

Визуализацию апоптотических клеток проводили с помощью **анализа TUNEL** (метка концов dUTP, опосредованная терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазой (TdT), который маркирует разрывы цепей ДНК с использованием набора для обнаружения гибели клеток in situ, TMR red (#12156792910, Roche). Индекс апоптоза (AI) рассчитывали для TUNEL-положительных клеток при 20-кратном увеличении по формуле: AI = количество TUNEL-положительных клеток/общее количество клеток (окрашенных Hoechst 33342) \times 100. Совместную локализацию E2F1 (зеленый сигнал) с маркером апоптоза (красный сигнал) оценивали с использованием программного обеспечения ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) с подключаемым плагином JACoP. На изображении вычислялся коэффициент Мандерса M1, отражающий долю пикселей с красным сигналом, содержащих зеленый сигнал, к общему сигналу красного канала.

Метод двойной иммунофлуоресцентной микроскопии был использован для оценки экспрессии и распределения HDAC1 и факторов транскрипции p53 и E2F1 и их ацетилированных форм в нейронах и глиальных клетках дорзальных ганглиев крыс. Срезы инкубировали в течение ночи при 4°C с первичными кроличьими антителами против гистондеацетилазы HDAC1 (SigmaAldrich SAB1400121, 1:500) или против p53 (Sigma Aldrich SAB4503000), или против E2F1 (Sigma Aldrich SAB4500682), или против ацетилированного E2F1 (K120) (STJ97800 St John's Laboratory Ltd), или против ацетилированного p53 (K373) (SigmaAldrich 06-916), а также против NeuN (маркер нейронов) (SigmaAldrich MAB377, 1:1000). После промывки в PBS срезы инкубировали 1 час с флуоресцентно-мечеными вторичными анти-кроличьими CF488A (SAB4600045, 1:1000) или анти-мышинными антителами CF555 (SAB4600302, 1:1000). Затем срезы монтировались на предметных стеклах в 60% глицерин/PBS. Ядра всех нейронов и глиальных клеток визуализировали с помощью Hoechst 33342 (кат. № 14533). Срезы DRG фотографировали с использованием флуоресцентного микроскопа Olympus BX-51, оснащенного цифровой камерой OrcaFlash 4.0 V3 (Hamamatsu, Япония), при длине волны возбуждения приблизительно 535 нм для анти-мышинного IgG1 (γ 1), меченного CF555, 488 нм для анти-кроличьего IgG (H + L), меченного CF488A, и 365 нм для Hoechst-33342. Флуоресценцию регистрировали при длинах волн >580 нм и >460 нм соответственно.

Визуализация белок-белковых взаимодействий была проведена с помощью технологии Duolink® PLA (анализ бесконтактного лигирования) (Sigma-Aldrich). Покровные стекла с помещенными на них срезами, фиксировали, пермеабелизовали и блокировали согласно инструкции. Образцы инкубировали с первичными антителами в течение ночи. Далее проводили инкубацию с зондами. Когда оба белка находились ближе, чем 40 нм, зонды PLA генерировали сигнал, указывающий на взаимодействие. После этапов лигирования и амплификации срезы монтировались на предметных стеклах с использованием специальной среды Duolink® in situ mounting medium с DAPI (для окрашивания ядер) (SigmaAldrich, Cat. No. DUO82040). Сигналы PLA распознавались как дискретные флуоресцентные пятна в различных местах исследуемых клеток и показаны красным цветом, представляя интересующий белок-мишень. Ядра, окрашенные DAPI – синим цветом. Сигналы PLA регистрировались с помощью флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse FN1 (Япония) и анализировались с помощью программного обеспечения Image J.

Фармакологическая модификация. Изучение механизмов участия исследуемых белков, процессов ацетилирования и деацетилирования в гибели клеток ганглиев, а также возможности нейропротекции после нейротравмы (перерезки седалищного нерва) с помощью неселективного ингибитора HDAC I класса вальпроата натрия и химического ингибитора E2F1 HLM006474 проведено на взрослых самцах крыс Вистар (2–2,5 мес; 200–250 г). Неселективный ингибитор I класса вальпроат натрия (VPA, Sigma-Aldrich) (300 мг/кг в 1,5 мл физиологического раствора) вводили внутривентриально сразу после аксотомии и далее в течение 7 дней (АТ+VPA). Животным группы сравнения вводили физиологический раствор по той же схеме (АТ). Химический ингибитор E2F1 HLM006474, сокращенно 6474 (Sigma-Aldrich), вводили внутривентриально (100 мг/кг) сразу после аксотомии и ежедневно в течение следующих 7 дней (аксотомия+6474). Животным контрольной группы вводили ДМСО по той же схеме (ДМСО+ аксотомия).

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

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Протеомное исследование изменений экспрессии сигнальных белков в аксотомированных ганглиях брюшной нервной цепочки рака

Полученные данные об относительных изменениях экспрессии сигнальных белков в ганглиях брюшной нервной цепочки рака через 1 или 3 часа после перерезки коннектив между всеми 6 ганглиями по сравнению с контрольными нервными цепочками, показали, что выраженные изменения белкового профиля в аксотомированных ганглиях БНЦ рака наблюдались уже через 1 час после перерезки нервов. Экспрессия 48 сигнальных белков

повышалась, а 31 белок – снижалась. Через 3 часа наблюдалось повышение уровня 49 сигнальных белков, а уровни 37 белков снижались (Demuyanenko et al., 2019). Эти белки выполняют разные функции, а изменения их уровней представляют собой интегральную биохимическую характеристику процесса аксотомии. Одним из наиболее важных эффектов в аксотомированных ганглиях БНЦ рака было одновременное повышение уровня разных проапоптотических белков: Bcl-10, SMAC/DIABLO, AIF, исполнительные каспазы 3, 6 и 7; проапоптотические сигнальные белки p75, MAP киназы p38 и JNK; факторы транскрипции, регулирующие экспрессию белков апоптоза: E2F1, p53, c-Myc и GADD153/CHOP-10 и провоспалительная каспаза 11. Одновременно повышалась экспрессия противоапоптотических белков, таких как Bcl-x, Mcl-1, p21WAF-1, MDM2, протеинкиназа ERK5 и рецептор эстрогенов. Увеличивался уровень гистондеацетилаз HDAC1, HDAC2 и гистоацетилтрансфераз NAT1 и PCAF. Более подробно результаты описаны в работе (Demuyanenko et al., 2019).

По результатам протеомного исследования для дальнейшего изучения были выбраны белки, уровень которых после аксотомии заметно возрастал: p53, E2F1, каспаза 3, гистондеацетилазы HDAC1, HDAC2 и HDAC3.

Влияния аксотомии на содержание сигнальных и эпигенетических белков в ганглиях брюшной нервной цепочки рака

Содержание белков в цитоплазматической и ядерной фракциях ганглий БНЦ рака оценивали с помощью вестерн-блот анализа. В целом, данные вестерн-блот анализа соответствовали данным протеомных исследований (Табл. 1).

Увеличение уровня исследуемых белков, таких как p53, E2F1, HDAC1 и HDAC2 наблюдалось в первые 4 часа после аксотомии. Сверхэкспрессия E2F1 была ранним результатом нейротравмы. Двусторонняя аксотомия вызывала повышение уровня белка E2F1 в цитоплазматической и ядерной фракциях через 4 часа после перерезки коннектив, соединяющих ганглии. При этом в цитоплазматической, но не ядерной фракции уровень E2F1 достоверно повышался уже через 1 час после аксотомии. Проведенные исследования выявили 1.5-кратное повышение уровня проапоптотического белка p53 в ганглиях БНЦ через 4 часа после аксотомии. Это подтверждает результаты протеомных экспериментов и свидетельствует об инициации апоптоза в аксотомированных ганглиях. Уровень каспазы 3, ключевого белка апоптотических каскадов, демонстрировал такую же тенденцию через 4 часа после аксотомии ганглиев БНЦ (увеличение в 1.86 раз), но эти изменения не были достоверными. Тем не менее, нужно учитывать данные о 80–83% увеличении уровня каспазы 3 через 1–3 часа после аксотомии в протеомном эксперименте. Уровень HDAC1 в суммарной фракции аксотомированных ганглиев повышался относительно контроля через 4 часа после перерезки коннектив, соединяющих ганглии. Через 1 час мы не наблюдали значительного увеличения экспрессии HDAC1. Уровень HDAC2 повышался через 4 часа в ядерной фракции поврежденных ганглиев.

Таблица 1. Суммарные данные анализа изменений экспрессии ряда сигнальных и эпигенетических белков в БНЦ речного рака на разные сроки после аксотомии. Показаны только значимые изменения ($p < 0,05$): ↑ увеличение, ↓ уменьшение, = отсутствие изменений, - отсутствие данных.

Белок	Роль в клетке	Фракция DRG	1ч	4ч
HDAC1	эпигенетическая регуляция, репрессор транскрипции	суммарная	=	↑
HDAC2	эпигенетическая регуляция, репрессор транскрипции	ядерная	=	↑
E2F1	фактор транскрипции, проапоптотический белок	ядерная	=	↑
		цитоплазматическая	↑	↑
p53	фактор транскрипции, проапоптотический белок	суммарная	=	↑
Каспаза 3	продукт частичного протеолиза каспазы 3, апоптоз	суммарная	=	↑

Участие проапоптотических белков E2F1, p53 и каспазы 3 в гибели клеток аксотомированных DRG крыс

По результатам протеомного исследования для дальнейшего изучения на млекопитающих были выбраны белки, уровень которых после аксотомии заметно возрастал: p53, E2F1, каспаза 3, гистондеацетилаз HDAC1, HDAC2 и HDAC3.

Проведенные исследования выявили 1.5-кратное повышение уровня проапоптотического белка p53 в ганглиях БНЦ речного рака через 4 часа после аксотомии. Это подтверждает результаты протеомных экспериментов (Demyanenko et al., 2019) и свидетельствует об инициации апоптоза в аксотомированных ганглиях. Уровень проапоптотического белка p53 в ядерной и цитоплазматической фракциях поврежденных DRG крыс изменялся по-разному по сравнению с неповрежденными контралатеральными DRG (Табл. 2): не изменялся в ядерной фракции DRG в течение первых 4 ч после перерезки седалищного нерва, но уменьшался вдвое через 24 ч. При этом уровень p53 в цитоплазматической фракции значительно увеличивался через 24 ч после перерезки седалищного нерва, но не через 1 или 4 часа. Хотя увеличение уровня мРНК белка наблюдается уже через 4 часа (Рис. 2в). Результаты иммунофлуоресцентного анализа также свидетельствуют о транслокации p53 из ядра в цитоплазму через 24 часа после аксотомии (Рис. 3). В этот же период времени происходило усиление апоптоза клеток DRG (Рис. 4).

Таблица 2. Суммарные данные анализа изменений экспрессии ряда сигнальных и эпигенетических белков в DRG крысы на разные сроки после перерезки седалищного нерва. Показаны только значимые изменения ($p < 0,05$): ↑ увеличение, ↓ уменьшение, = отсутствие изменений, - отсутствие данных.

Белок	Роль в клетке	Фракция DRG	1ч	4ч	24ч	7д
HDAC1	эпигенетическая регуляция, репрессор транскрипции	суммарная	↑	↑	=	=
		ядерная	=	↓	=	=
		цитоплазматическая	=	↑	=	=
HDAC2	эпигенетическая регуляция, репрессор транскрипции	ядерная	=	↑	↑	-
HDAC3	эпигенетическая регуляция, репрессор транскрипции	ядерная	=	↑	=	-
		цитоплазматическая	↑	↓		
AcH4	ацетилированный гистон H4, ядерный субстрат гистондеацетилаз	ядерная	=	=	=	↓
AcH3K9	ацетилированный гистон H3 по лизину 9, ядерный субстрат гистондеацетилаз	ядерная	=	=	↓	↓
AcE2F1K120	ацетилированный E2F1 по лизину 120, фактор транскрипции	цитоплазматическая	=	=	↓	-
E2F1	фактор транскрипции, проапоптотический белок	ядерная	=	↑	=	-
		цитоплазматическая	=	↑	=	-
p53	фактор транскрипции, проапоптотический белок	ядерная	=	=	↓	-
		цитоплазматическая	=	=	↑	-
Acр53K373	ацетилированный p53 по лизину 373, фактор транскрипции	цитоплазматическая	=	=	↓	-
Каспаза 3	исполнительная каспаза, апоптоз	суммарная	=	=	=	=
Активная каспаза 3	продукт частичного протеолиза каспазы 3, апоптоз	суммарная	=	=	↑	↑

Накопление p53 в цитоплазме может быть связано с высокой скоростью синтеза в цитоплазме, нарушениями деградации, а также с ядерным экспортом белка (Ma et al., 2017). Учитывая тот факт, что ацетилирование белка p53 необходимо для стабилизации, ядерной локализации, и активация транскрипции, активность p53 может быть специфически изменена путем регулирования активности HDACs. Накопление белка в цитоплазме поврежденных ганглиев могло быть также связано с усилением синтеза белка. Потенциальными сигналами для синтеза p53 при аксотомии являются такие факторы транскрипции, как E2F1, c-Мус, p38, гиперэкспрессия которых была продемонстрирована в аксотомизированных ганглиях БНЦ раков в протеомном исследовании (Demyanenko et al., 2019).

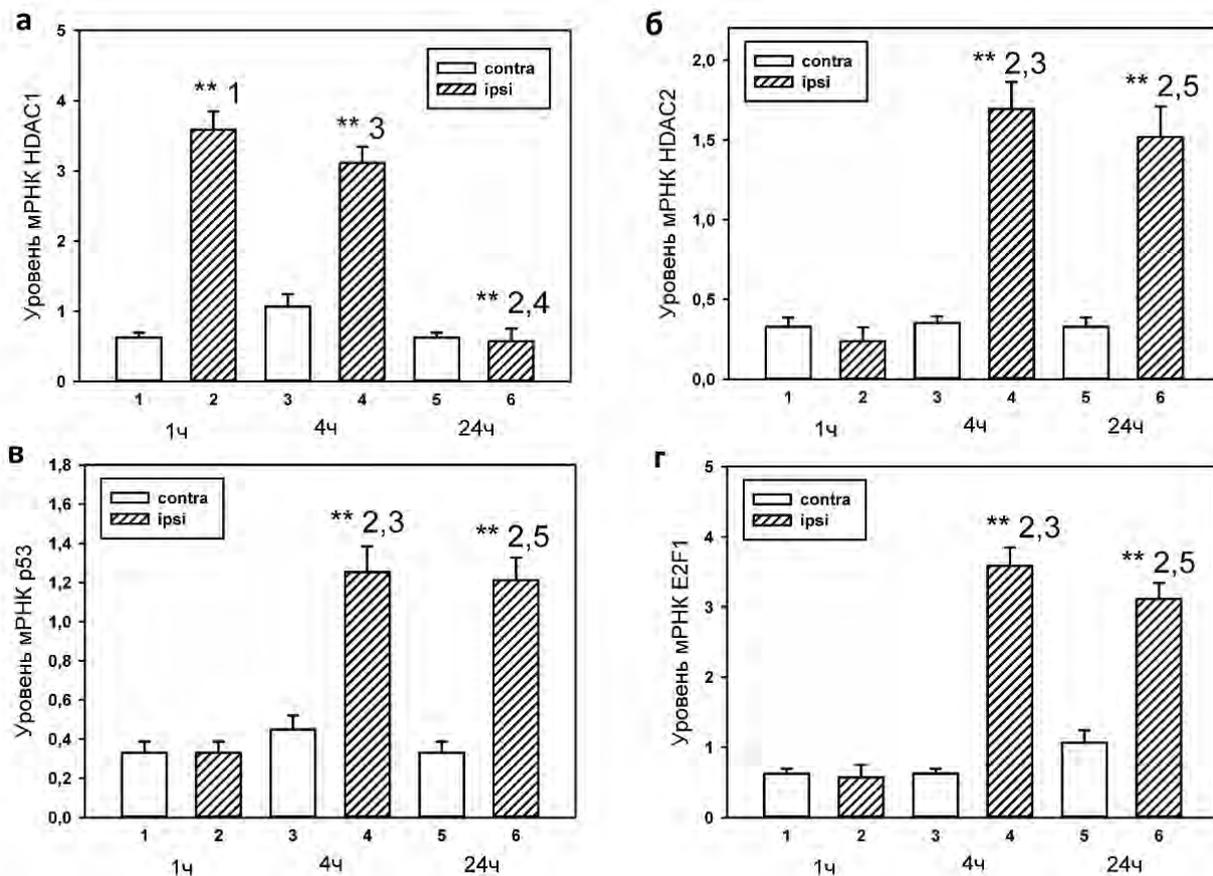


Рисунок 2. Результаты ПЦР в реальном времени: уровень мРНК HDAC1 (а), HDAC2 (б), p53 (в) и E2F1 (г) в DRG крысы на разные сроки после аксотомии. Уровень экспрессии каждой мРНК рассчитывали с использованием порогового цикла (CT). 2-Way ANOVA. n=3 **p < 0.01

Наши исследования, показали, что аксотомия вызывает значительное увеличение уровня p53 в цитоплазме нейронов (Рис. 3), что указывает на дополнительную нетранскрипционную активность p53, индуцированную аксотомией, вызывающей ядерно-цитоплазматическую транслокацию p53. Независимая от транскрипции проапоптотическая активность p53 связана с его транслокацией в митохондрии с нарушением биоэнергетических процессов, высвобождением цитохрома c и AIF, которые вызывают активацию ключевой проапоптотической протеазы – каспазы 3, что в конечном итоге приводит к апоптозу. Через 24 часа после перерезки седалищного нерва крысы уровень активированной (cleaved) каспазы 3 в поврежденном ипсилатеральном ганглии достоверно повышался в 1.5 раза относительно контрольного контралатерального ганглия (Табл. 2). Это свидетельствует о развитии апоптотических процессов в глиальных клетках, т. к. по данным TUNEL анализа в это время апоптоз заметно увеличивался в глии, но не в нейронах (Рис. 4).

Экспрессия p53, каспазы 3 и других проапоптотических белков контролируется транскрипционным фактором E2F1 (Polager, Ginsberg, 2009). Вестерн блот анализ показал, что сверхэкспрессия E2F1 наблюдалась уже через 4 часа после перерезки седалищного нерва, как в ядерной, так и в цитоплазматической фракциях аксотомированных DRG крысы. Это предшествовало активации каспазы 3 и изменениям уровня p53 в аксотомированных ганглиях крысы (Табл. 2). Максимальный уровень мРНК белка наблюдается через 4 часа после аксотомии и остается повышенным в течение первых 24 часов после травмы (Рис. 2г). Вероятно, повышенное содержание белка в цитоплазме складывается как за счет экспорта белка из ядра, так и за счет увеличения экспрессии самого гена.

Иммуноблоттинг выявил сверхэкспрессию E2F1 уже через 4 часа после перерезки седалищного нерва как в цитоплазматической, так и ядерной фракциях ганглиев (Табл. 2), а также уже через 1 час в аксотомированных ганглиях речного рака (Табл. 1). Эти результаты согласуются с данными опытов с протеомными микрочипами, в которых 1.8-кратное повышение экспрессии E2F1 в аксотомированных ганглиях БНЦ речного рака наблюдалось уже через 1 и 3 часа после аксотомии (Demyanenko et al., 2019).

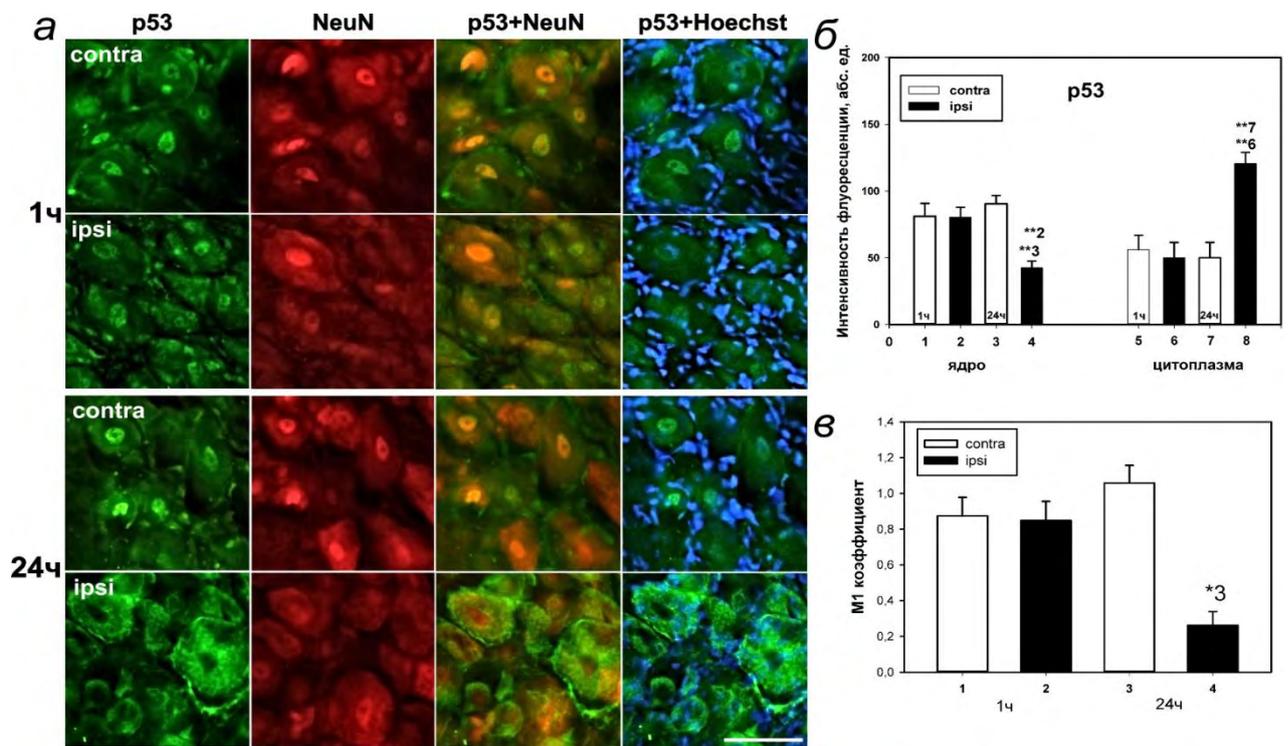


Рисунок 3. Флуоресцентная микроскопия: (а) экспрессия p53 в нейронах DRG крысы через 1 и 24 часа после перерезки седалищного нерва. Масштабный отрезок 50 мкм (б) зависимость средней интенсивности флуоресценции p53 в ядрах и цитоплазме нейронов ипсилатерального (ipsi) и контрольного контралатерального (contra) DRG через 1 и 24 часа после перерезки седалищного нерва. (в) коэффициент M1 колокализации p53 и маркера ядер нейронов NeuN в контралатеральном и ипсилатеральном ганглиях DRG крысы через 1 и 24 часа после перерезки седалищного нерва. 2-Way ANOVA. $M \pm SEM$. $n=6$. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Важное наблюдение состоит в том, что уровень экспрессии E2F1 в наших экспериментах повышался как в цитоплазме, так и в ядрах нейронов (Рис. 5). В ядре E2F1, очевидно, действует как фактор транскрипции.

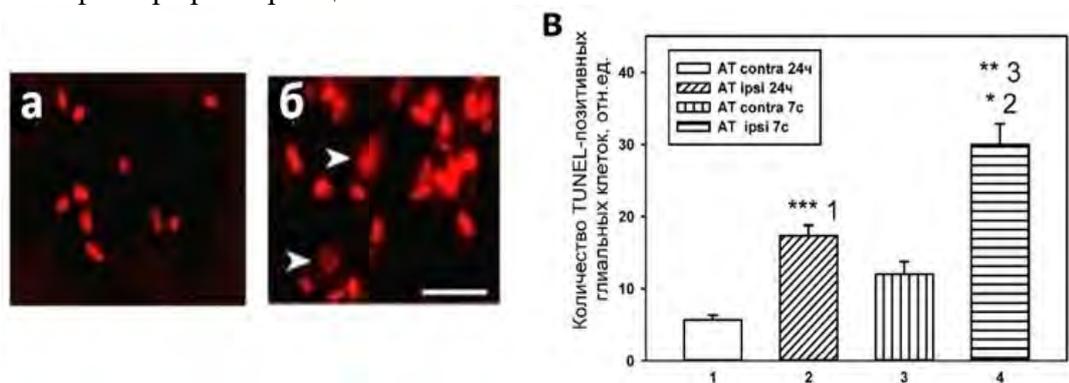


Рисунок 4. Репрезентативное изображение TUNEL-анализа, показывающее множественный апоптоз глиальных клеток и единичных нейронов DRG через 7 суток после аксотомии (а) по сравнению с неповрежденными ганглиями (б). Апоптотические клетки показаны красным цветом. Стрелками отмечены нейроны. Масштабный отрезок: 100 мкм. (в) Количество TUNEL-положительных апоптотических глиальных клеток в ганглии 5-го дорсального корешка спинного мозга через 1 и 7 суток после перерезки седалищного нерва (ipsi) по сравнению с симметричными контралатеральными ганглиями (contra). $n = 9$; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$

Известно, что он регулирует экспрессию проапоптотических белков, таких как каспазы 3, 7, 8 и 9, SMAC/DIABLO, Araf-1, p53, p73, белки семейства Bcl-2 и тем самым стимулирует апоптоз. Как показано в протеомном исследовании, в аксотомированных ганглиях БНЦ рака одновременно с E2F1 повышались уровни этих проапоптотических белков. Это свидетельствует об участии E2F1 в апоптозе нейронов. В случае цитоплазматической локализации одна из возможных функций E2F1 – его взаимодействие с митохондриями и регуляция их функций, например, путем непосредственного взаимодействия с белком Bcl-xL на наружной митохондриальной мембране и регулирования ее пермеабилитации. Видно, что

динамика экспрессии E2F1 в аксотомированных ганглиях, достигая своего максимума к 4 часам после аксотомии, постепенно уменьшается (Рис. 5).

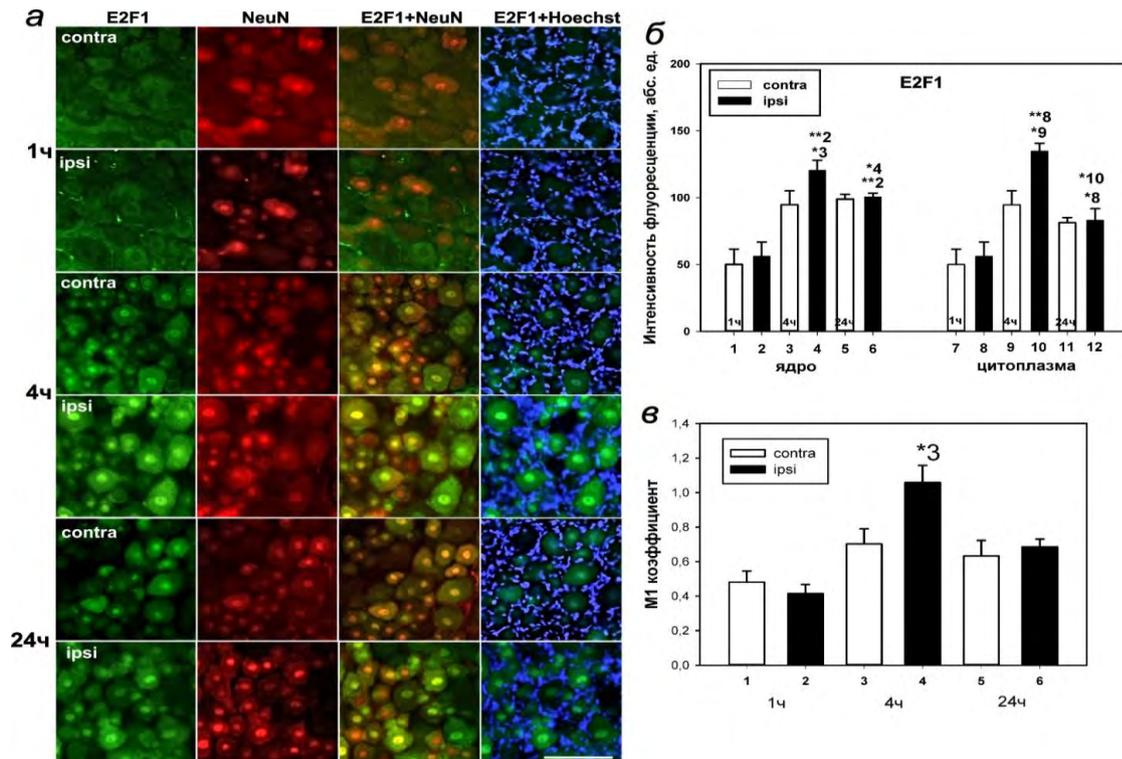


Рисунок 5. Флуоресцентная микроскопия: (а) экспрессия E2F1 в нейронах DRG крысы через 1, 4 и 24 часа после перерезки седалищного нерва. Масштабный отрезок 50 мкм (б) зависимость средней интенсивности флуоресценции E2F1 в ядрах и цитоплазме нейронов ипсилатерального (ipsi) и контрольного контралатерального (contra) DRG через 1, 4 и 24 часа после перерезки седалищного нерва. (в) коэффициент M1 колокализации E2F1 и маркера ядер нейронов NeuN в контрольном контралатеральном и ипсилатеральном ганглиях DRG крысы через 1, 4 и 24 часа после перерезки седалищного нерва. OneWay ANOVA. M±SEM. n=6. *p < 0.05; **p < 0.01

Это говорит, во-первых, о скором E2F1-зависимом ответе в нейронах, развивающемся при аксональном стрессе, во-вторых, указывает на роль E2F1 в запуске апоптоза, после чего его содержание в клетке стремится к минимуму. Внутрив брюшинное введение низкомолекулярного ингибитора E2F1 HLM006474, сокращенно здесь 6474, крысам в течение 7 суток полностью устраняло индуцированную аксотомией повышенную экспрессию проапоптотически активных белков каспазы 3 и p53 (Рис. 6), защищая аксотомированные клетки DRG от апоптоза (Рис. 7). Следовательно, фактор транскрипции E2F1 может быть вовлечен в индуцированное аксотомией повреждение нейронов DRG и глиальных клеток. В совокупности эти результаты позволяют предположить, что ингибитор 6474 действует *in vivo*, и использование этого соединения может иметь клиническое применение при лечении нейротравмы и ее последствий.

Второй важный вывод, основанный на результатах исследования: повышение экспрессии E2F1 через 4 часа после повреждения сопровождается повышением экспрессии p53, а также активацией каспазы 3 с последующим развитием глиального апоптоза через 24 часа и развитие апоптоза нейронов через 7 дней после аксотомии седалищного нерва крысы. Последовательное увеличение экспрессии E2F1 и p53 также показано с помощью протеомного анализа аксотомированных ганглиев раков. Мы предполагаем, что в условиях аксотомии фактор транскрипции E2F1 может участвовать в активации p53 в качестве нижестоящего фактора-мишени, который, в свою очередь, вызывает вторичные изменения экспрессии генов и белков, запускающих апоптоз.

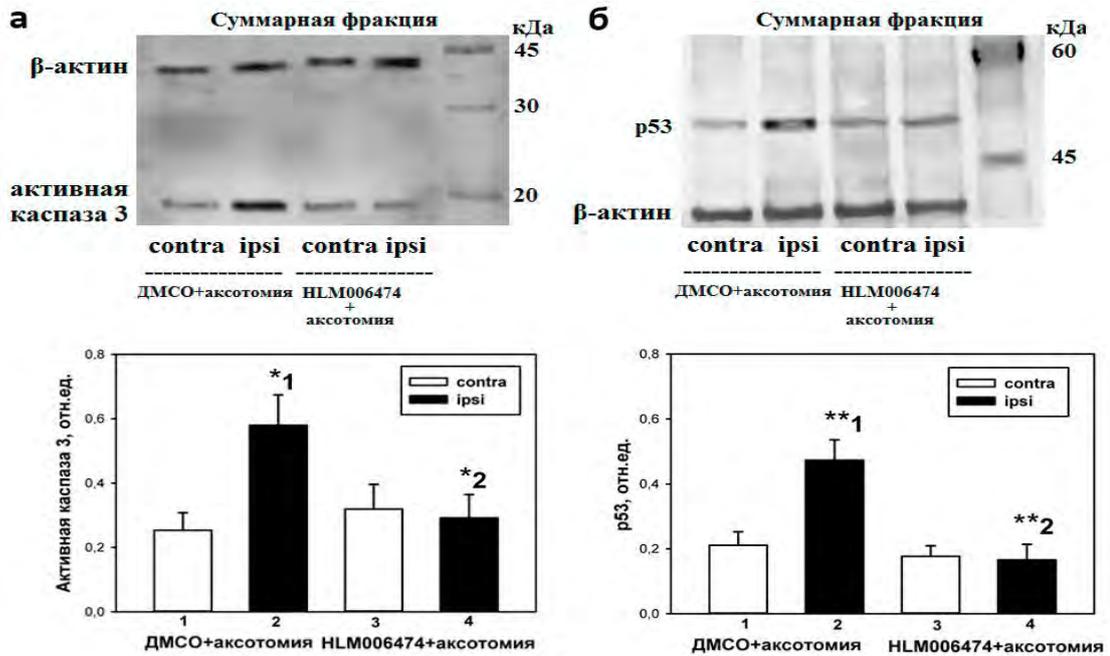


Рисунок 6. Влияние ингибитора E2F1 HLM006474 на уровень активной каспазы 3 (а) и p53 (б) в общей фракции аксотомированного правого дорзального ганглия (ipsi) по сравнению с неповрежденным контралатеральным (левым) ганглием (contra) через 7 дней после аксотомии. 2-Way ANOVA. М ± SEM; *p<0,05; n=7.

Таким образом, повышение экспрессии E2F1 может быть ключевым событием в инициации апоптоза нейронов и отдаленных глиальных клеток в аксотомированных DRG и подготавливает последующие изменения других белков, в частности p53, и общий ответ клеток ганглий в ответ на повреждение.

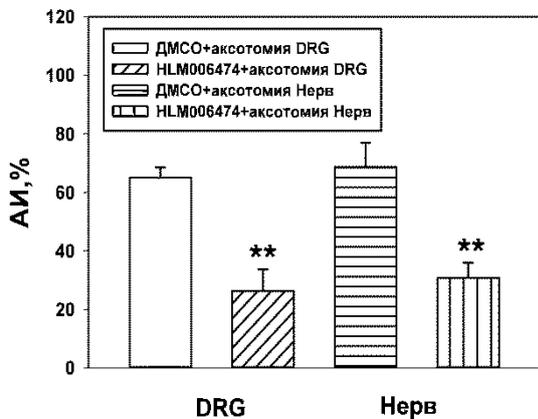


Рисунок 7. Влияние химического ингибитора E2F HLM006474 на индекс апоптоза (%) как в поврежденном ипсилатеральном DRG, так и в поврежденном ипсилатеральном нерве (HLM006474+аксотомия) по сравнению с контрольной группой (ДМСО+аксотомия). Крысам ежедневно вводили ДМСО или HLM006474 в течение 7 дней, после аксотомии. Масштабный отрезок: 100 мкм. t-тест. М ± стандартная ошибка среднего; **p<0,01

Нам также было важно определить, в каких клетках, нейронах или глии экспрессируется этот белок. Интересно отметить, что E2F1 был локализован как в нейронах DRG, так и в глиальных клетках. Однако коэффициент колокализации E2F1 с GFAP, который окрашивает в основном глиальные клетки, существенно не изменился по сравнению с интактными ганглиями, а увеличение экспрессии E2F1 в аксотомированных ганглиях было связано с ростом белка в нейронах DRG. Наши данные представляют собой первое успешное применение ингибитора E2F HLM006474 *in vivo*, а его нейропротекторная эффективность свидетельствует о том, что E2F1 является важной терапевтической мишенью, поскольку проведенный ингибиторный анализ продемонстрировал участие фактора транскрипции E2F1 в запуске повреждения нейронов DRG и глиальных клеток при аксотомии. E2F1 и p53 можно рассматривать как потенциальные мишени для терапии повреждений нервов, а их ингибиторы следует изучать как перспективные нейропротекторные препараты.

Учитывая многообразие функций E2F1 и p53 в клетках, актуальным остается исследование механизмов регуляции этих белков в процессах нейродегенерации и

нейропротекции, к тому же стоит обратить внимание и на дополнительные пути регуляции с участием гистондеацетилаз.

Участие HDAC1, HDAC2 HDAC3 в гибели клеток аксотомированных DRG крыс

Иммуноблоттинг DRG крыс показал значительное снижение уровня ацетилирования лизина 9 в гистоне H3 (AcH3K9) по сравнению с контралатеральными ганглиями через 24 часа и 7 дней после перерезки седалищного нерва (Табл. 2). Уровень ацетилирования гистона H4 (AcH4) снижался позже, через 7, но не через 1 день после аксотомии (Табл. 2). Такое деацетилирование гистонов может быть результатом активности гистондеацетилаз (HDACs). Так как активация гистондеацетилаз и деацетилирование гистонов приводят к подавлению белкового синтеза, то можно рассматривать изменения экспрессии данных белков как начальные этапы патологического процесса.

Сверхэкспрессия HDAC1 была ранним результатом нейротравмы. Действительно, уровень HDAC1 в суммарной фракции аксотомированных DRG повышался относительно контроля уже через 1 и 4 часа после перерезки седалищного нерва (Табл. 2, Рис. 8). Через 24 часа разницы не наблюдалось. Через 7 дней после аксотомии мы также не наблюдали значительной сверхэкспрессии HDAC1. При этом повышенный уровень HDAC1 был отмечен как в нейронах позвоночных животных, на примере крысы, так и в нервных клетках беспозвоночных (речной рак *Astacus leptodactylus*). Это свидетельствует о том, что, вероятно, механизм регуляции активности белков путем их ацетилирования и деацетилирования является эволюционно древним и высококонсервативным.

Поскольку HDAC1 может локализоваться как в ядре, так и в цитоплазме и деацетилировать не только гистоны, но и некоторые цитоплазматические белки, мы исследовали отдельно экспрессию HDAC1 в ядерной и цитоплазматической фракциях DRG. При этом, в ядерной фракции поврежденных ипсилатеральных ганглиях DRG уровень HDAC1 значительно повышался через 1 час после аксотомии, но снижался через 4 часа по сравнению с контролем (Табл. 2). В цитоплазматической фракции аксотомизированных DRG уровень HDAC1 увеличивался через 4 часа по сравнению с неповрежденными ганглиями, но не через 1 час или 24 часа (Рис. 8). Это свидетельствует о перераспределении HDAC1 из ядра в цитоплазму через 4 часа после перерезки седалищного нерва (Рис. 8б).

Иммунофлуоресцентная микроскопия показала, что HDAC1 локализован в основном в нейронах DRG, а не в глиальных клетках, многочисленные ядра которых были визуализированы Hoechst33342 (Рис. 8а). Экспрессия HDAC1 в ядрах аксотомированных нейронов DRG увеличивалась через 1 час после аксотомии, но снижалась через 4 часа (Рис. 8в). Коэффициент совместной локализации HDAC1 с нейрональным маркером NeuN, который окрашивает в основном ядра нейронов, также увеличивался через 1 час, но снижался через 4 часа после перерезки седалищного нерва (Рис. 8б). Более слабая иммунофлуоресценция HDAC1 наблюдалась в цитоплазме нейронов ипсилатеральных ганглиев DRG через 1 час после аксотомии по сравнению с ядерной флуоресценцией.

Однако одновременно со снижением HDAC1 в ядрах ипсилатеральных ганглиев DRG уровень HDAC1 в цитоплазме нейронов увеличивался через 4 ч после аксотомии. Это подтверждает факт перераспределения HDAC1 из ядра в цитоплазму. Возможно, активация HDAC1 в цитоплазме в основном способствовала общему увеличению уровня HDAC1 в поврежденных ганглиях DRG.

Уровень HDAC2 в ядерной фракции аксотомированных DRG повышался относительно контроля уже через 4 и 24 часа после перерезки седалищного нерва (Табл. 2). Содержание HDAC3 в цитоплазматической фракции поврежденных DRG значительно сверхэкспрессируется уже через 1 час после аксотомии (Табл. 2). В ядерной фракции аксотомированных DRG уровень HDAC3 увеличивался через 4 часа после перерезки седалищного нерва по сравнению с неповрежденными ганглиями крыс, что свидетельствует о перераспределении HDAC3 из цитоплазмы в ядро через 4 часа после аксотомии седалищного нерва крысы.

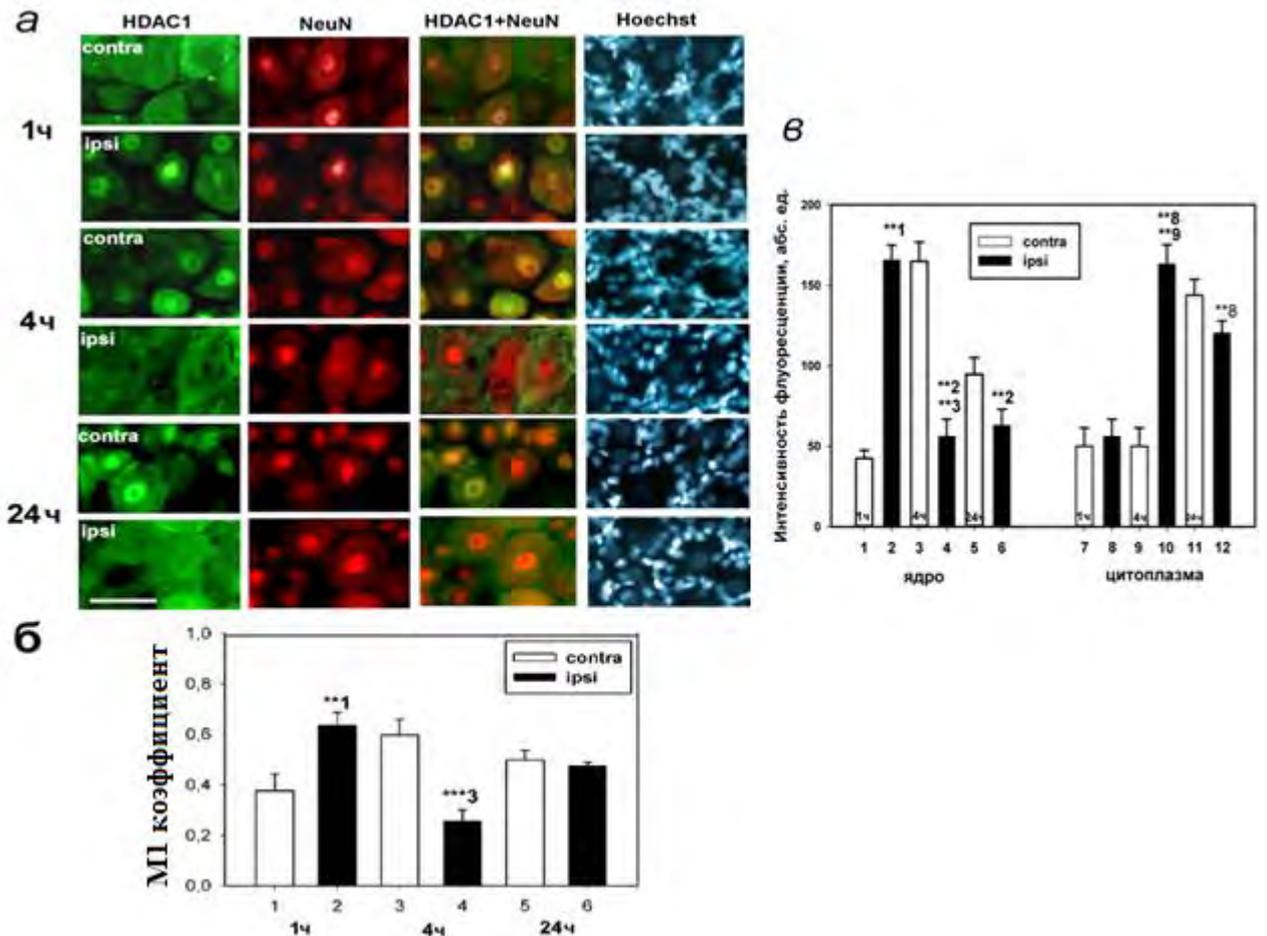


Рисунок 8. Флуоресцентная микроскопия: (а) экспрессия HDAC1 (зеленая флуоресценция) в нейронах DRG крысы через 1 и 24 часа после перерезки седалищного нерва. Масштабный отрезок 50 мкм (б) зависимость средней интенсивности флуоресценции HDAC1 в ядрах и цитоплазме нейронов ипсилатерального и контрольного конралатерального DRG через 1,4 и 24 часа после перерезки седалищного нерва. (в) коэффициент M1 колокализации HDAC1 и маркера ядер нейронов NeuN в контрольном конралатеральном и аксотомированном ипсилатеральном ганглиях DRG крысы через 1, 4 и 24 часа после перерезки седалищного нерва. Обозначения: Ipsi – аксотомированный ипсилатеральный ганглий, contra – конралатеральный контрольный ганглий. NeuN – маркер ядер нейронов; HDAC1+NeuN – наложение. Hoechst – флуоресценция Hoechst 33342, который визуализирует ядра всех клеток, нейронов и глии. 2-Way ANOVA. M±SEM. n=6. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.01

Эти изменения происходят задолго до развития апоптоза. Так как активация гистондеацетилаз и деацетилирование гистонов приводят к подавлению белкового синтеза, то можно рассматривать повышение уровня гистондеацетилаз HDAC1, HDAC2 и HDAC3 как начальные этапы патологического процесса. Вероятно, эти белки готовят последующие изменения других белков и общую реакцию клеток DRG ганглиев на перерезку седалищного нерва.

Для изучения механизмов участия исследуемых белков, процессов ацетилирования и деацетилирования в гибели клеток ганглиев, а также возможности нейропротекции после нейротравмы (перерезки седалищного нерва) был использован неселективный ингибитор HDAC I класса вальпроат натрия (300 мг/кг).

Эффект вальпроата натрия выражался в следующем (Табл. 3):

1. Вальпроат натрия оказывал значительное проапоптотическое действие. Он в 6.6 раз снижал уровень апоптоза в ипсилатеральных (правых) аксотомированных DRG ганглиях и в 4.4 раза в неповрежденных конралатеральных (левых) ганглиях (Рис. 9).

2. Введение препарата предотвращало вызванное аксотомией снижение уровня ацетилирования гистонов H3 и H4, которое могло приводить к снижению белкового синтеза в клетке.

3. Вальпроат натрия отменял, вызванное аксотомией снижение уровня ацетилированного E2F1 (K120) и ацетилированного p53 (K373) после аксотомии.

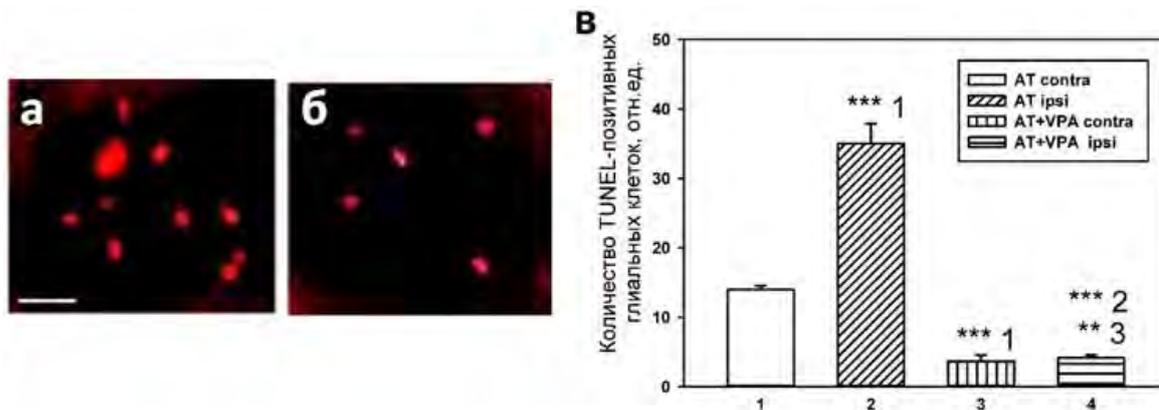


Рисунок 9. Влияние вальпроата натрия на апоптоз в аксотомированных спинномозговых ганглиях крыс. (а) апоптоз клеток поврежденных ганглиев без ингибитора. (б) апоптоз клеток поврежденных ганглиев в присутствии ингибитора. Масштабный отрезок: 100 мкм. (в) Влияние вальпроата натрия на апоптоз клеток (метод TUNEL) в неповрежденных контралатеральных (contra) и аксотомированных ипсилатеральных (ipsi) DRG ганглиях крысы через 7 суток после перерезки седалищного нерва. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

4. Введение ингибитора HDAC в течение 7 дней после перерезки седалищного нерва снижает уровень E2F1 и p53 в цитоплазме, но увеличивает в ядре, что свидетельствует о перераспределении белков между ядром и цитоплазмой, на что также указывает коэффициент колоколизации с ядерным маркером. Таким образом, ингибирование вальпроатом натрия отменяет вызванную аксотомией транслокацию p53 и E2F1 из ядра в цитоплазму нейронов DRG. Это говорит о том, что, во-первых, уровень ацетилирования белка зависит от деацетилазной активности HDAC1, во-вторых, влияет на внутриклеточную локализацию белка.

5. О нейропротекторном свойстве препарата также говорило то, что через 7 дней после перерезки седалищного нерва вальпроат натрия повышал уровень маркера регенерации нервов GAP-43 как в поврежденном ипсилатеральном, так и в неповрежденном контралатеральном ганглии.

Ацетилирование/деацетилирование p53 и E2F1 при аксотомии

Белок E2F1

Согласно последним исследованиям E2F1 является одним из негистоновых субстратов некоторых гистондеацетилаз (HDACs). Иммуноблоттинг показал, что уровень ацетилированного E2F1 (K120) снижается через 24 часа после перерезки седалищного нерва крысы (Табл. 2), что говорит в пользу деацетилирования белка под действием HDAC1, которая также обнаружена в цитоплазматической фракции аксотомированных DRG (Рис. 8). Наши эксперименты показали повышенную регуляцию E2F1 в модельных объектах аксотомии как беспозвоночных, так и позвоночных животных: в билатерально аксотомированных ганглиях БНЦ речного рака, а также в аксотомированных спинномозговых ганглиях крыс (Табл. 1,2) на ранних сроках после аксотомии. Важно отметить, что цитоплазматическая локализация E2F1 наблюдалась в обоих случаях: в нейронах позвоночных животных, на примере крысы (Рис. 5), так и в нервных клетках беспозвоночных, таких как речной рак *Astacus leptodactylus*. Это свидетельствует о том, что, вероятно, механизм регуляции активности белков путем их ацетилирования и деацетилирования является эволюционно древним и высококонсервативным.

В нашей работе показано, повышение уровня ацетилированного E2F1 (K120) под действием неселективного ингибитора гистондеацетилаз, вальпроата натрия (Табл. 3). Введение ингибитора HDAC в течение 7 дней после перерезки седалищного нерва снижает уровень E2F1 в цитоплазме, но увеличивает в ядре, что свидетельствует о перераспределении белка, на что также указывает коэффициент колоколизации с ядерным маркером. При этом ацетилированная форма E2F1 по лизину K120 увеличивается в цитоплазме под действием ингибитора. Важно отметить, что цитоплазматическая локализация E2F1 наблюдалась как: в нейронах позвоночных животных, на примере крысы,

так и в нервных клетках беспозвоночных, таких как речной рак *Astacus leptodactylus* (табл. 1). Это говорит в пользу того, что, вероятно, механизм регуляции активности белков путем их ацетелирования и деацетелирования является эволюционно древним и высококонсервативным.

Таблица 3. Влияние вальпроата натрия (VPA) на экспрессию сигнальных белков в DRG крыс после перерезки седалищного нерва. Показаны только значимые изменения ($p < 0,05$): ↑ увеличение, ↓ уменьшение, = отсутствие изменений.

Белок	Фракция DRG	VPA7д
AcH4	ядерная	↑
AcH3K9	ядерная	↑
p53	ядерная	↑
	цитоплазматическая	↓
E2F1	ядерная	↑
	цитоплазматическая	↓
GAP-43	суммарная	↑
Acp53K373	цитоплазматическая	↑
AcE2F1K120	цитоплазматическая	↑

Белок p53

Нами было показано, что перерезка седалищного нерва в первые 24 ч после аксотомии вызывает транслокацию HDAC1 из ядра в цитоплазму (Рис. 8), где она может, по всей видимости, деацетилировать различные негистоновые белки, в том числе белок p53, гиперэкспрессия которого также наблюдалась в цитоплазматической фракции аксотомированных DRG крысы (Рис. 3). Деацетилирование p53 может привести к изменению его субклеточной локализации и, как следствие, его активности. Именно поэтому HDAC стали многообещающими мишенями для терапевтических вмешательств при патологических состояниях, включая нейродегенеративные патологии. Наши результаты показали, что уровень ацетилированной формы белка p53 (K373) снижался в цитоплазматической фракции ганглиев через 24 часа после аксотомии (Табл. 2). Однако, ацетилирование p53 по лизину K373 увеличивается в цитоплазме под действием ингибитора гистондеацетилаз (Табл. 3). Кроме того, введение ингибитора HDAC в течение 7 дней после перерезки седалищного нерва снижает уровень p53 в цитоплазме, но увеличивает в ядре, что свидетельствует о перераспределении белка, на что также указывает коэффициент колокализации с ядерным маркером. Вероятно, защитный эффект вальпроата натрия связан с регуляцией экспрессии и внутриклеточной локализации p53 путем подавления деацетилирования p53 с помощью HDAC1. Такие результаты наталкивают на мысль о деацетилазной активности гистондеацетилаз I класса в отношении E2F1 и p53 в цитоплазме клеток DRG. Чтобы подтвердить или опровергнуть эту гипотезу и изучить возможное взаимодействие между HDAC1, HDAC2 или HDAC3 и E2F1 или p53, мы провели ко-иммунопреципитацию, данные которой показали, что HDAC1, но не HDAC2 и HDAC3, действительно взаимодействует с ацетилированными формами E2F1 и p53 в цитоплазме клеток аксотомированных ганглиев (Рис. 10). Для подтверждения белок-белковых взаимодействий между p53 или E2F1 с HDAC1, мы использовали технологию Duolink PLA (метод близкого лигирования) с последующим считыванием результатов с помощью флуоресцентной микроскопии (Рис. 11), результаты которой подтвердили нашу теорию.

Исследования на модели перерезки седалищного нерва крысы показали, что аксотомия вызывает значительное увеличение активности HDAC1 по отношению к E2F1 и p53 через 24 часа после аксотомии (Рис. 12). Повышение активности HDAC1, по-видимому, связано с последующим снижением ацетилирования факторов транскрипции E2F1 и p53. Подобное увеличение активности HDAC1 и возникающее в результате этого гипoaцетилирование белка p53 также наблюдалось на нескольких моделях повреждения зрительного нерва.

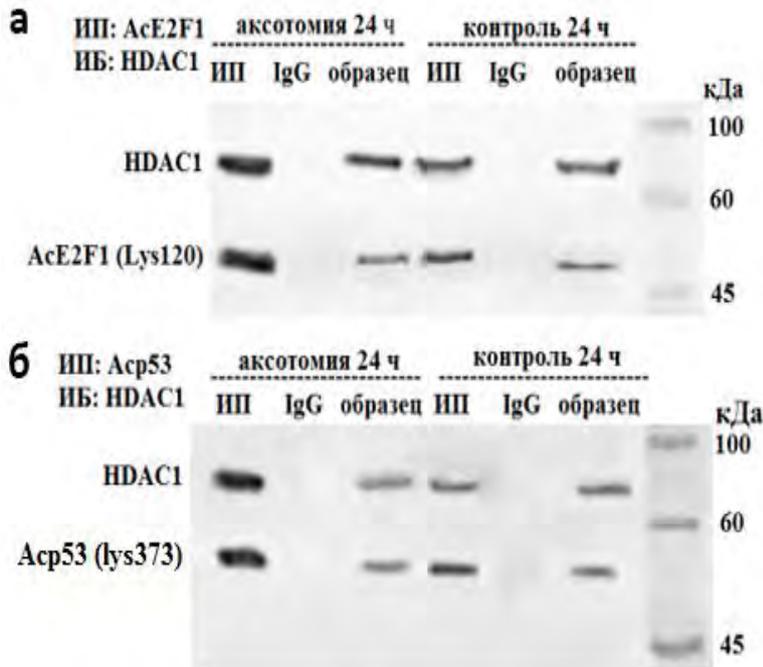


Рисунок 10. Результат иммуноблоттинга для коиммунопреципитации эндогенных AcE2F1 и HDAC1 (а) или Acp53 и HDAC1 (б) в цитоплазматической фракции DRG через 24 часа после аксотомии. Эндогенные белки Acp53 или AcE2F1 были иммунопреципитированы (ИП) антителами против Acp53 (K373) или AcE2F (K120), соответственно.

Такие повторяющиеся результаты на различных моделях повреждения периферических нервов убедительно свидетельствуют в пользу того, что HDAC-зависимый механизм вовлечен в начальные события, которые приводят к гибели нервных клеток. Ранее сообщалось о возможности деацетилирования p53 гистондеацетилазами HDAC1 и HDAC2 в онкотрансформированных клетках (Ryu et al., 2017). Однако, о способности HDAC1 и HDAC2 деацетилировать p53 после аксотомии периферических нервов не упоминалось и показано нами впервые.

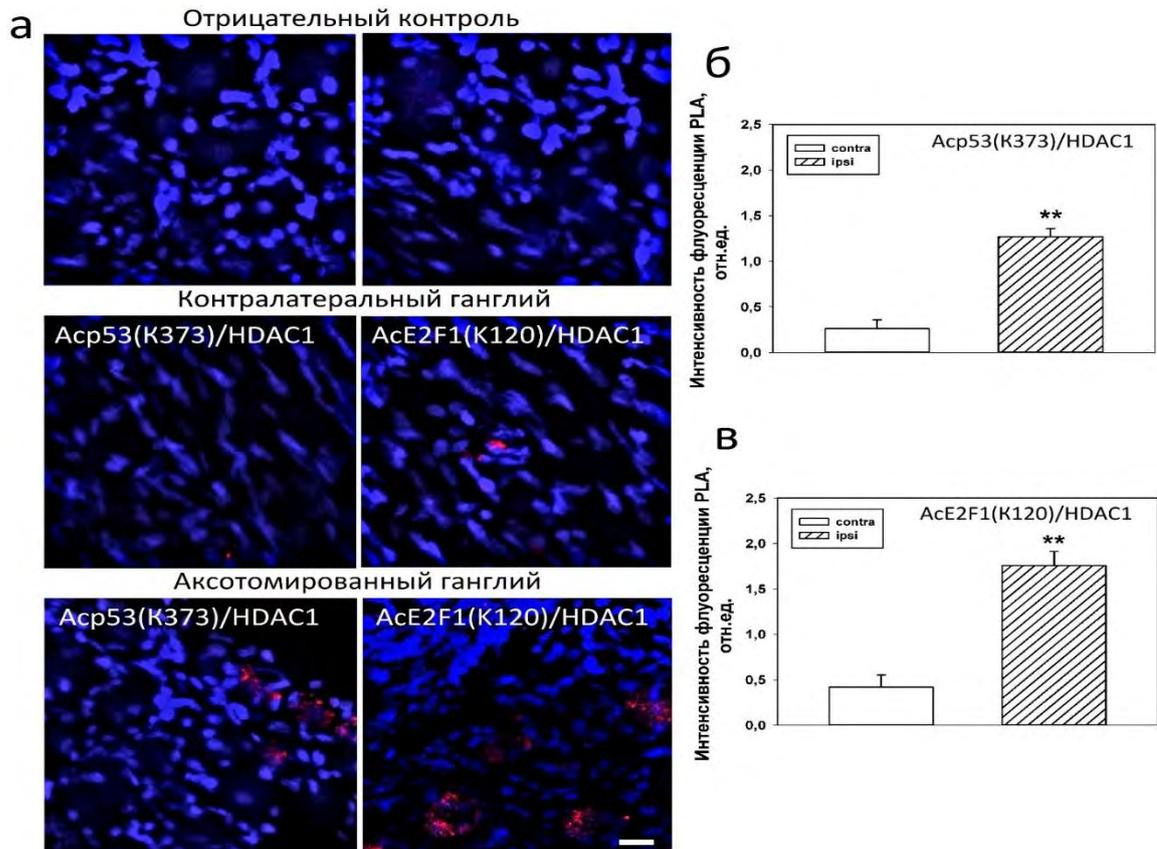


Рисунок 11. Результаты Duolink in situ PLA: а) Репрезентативные изображения Duolink in situ PLA, показывающие, что существует прямое физическое взаимодействие между Acp53 (K373) /HDAC1 и AcE2F (K120)/ HDAC1. б) Интенсивность флуоресценции сигналов PLA (красные точки), представляющие взаимодействие Acp53 (K373) и HDAC1 в аксотомированных ганглиях по сравнению с контралатеральными ганглиями. в) Интенсивность флуоресценции сигналов PLA (красные точки). Ядра, окрашенные DAPI - синий цвет. М ± SEM; **p<0,01; n=3. Масштабный отрезок: 10 мкм.

HDAC1 опосредует деацетилирование E2F1 и p53 в DRG после аксотомии, что может приводить к снижению транскрипционной активности p53, усилению его взаимодействия с митохондриями и апоптозу клеток. Таким образом, стратегии, направленные на усиление ацетилирования p53 по лизину K373 могут способствовать разработке соединений, которые будут проявлять нейропротекторные эффекты в периферической нервной системе при нейротравмах.

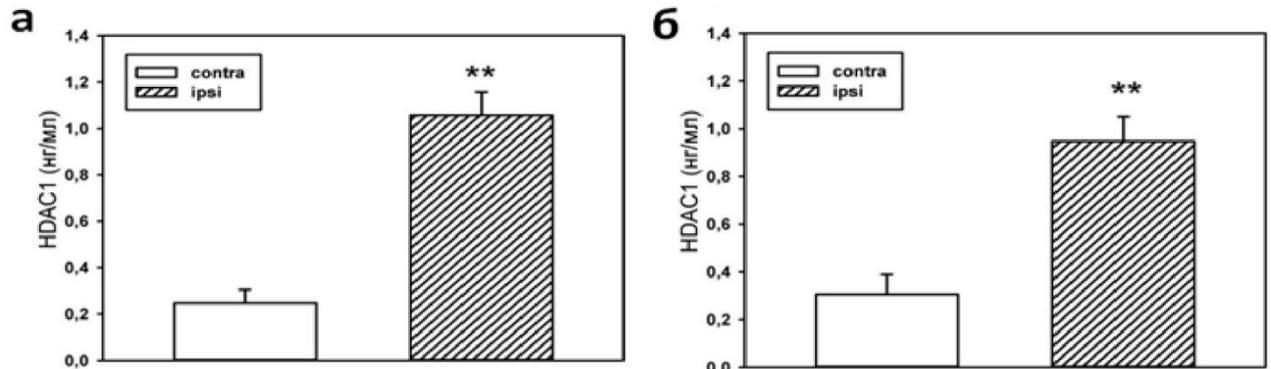


Рисунок 12. Активность HDAC1 в иммунопреципитате белка ацетилированного E2F1 (а) и ацетилированного p53 (б) в цитоплазматической фракции аксотомированного правого дорзального ганглия (ipsi) по сравнению с неповрежденным контралатеральным (левым) ганглием (contra) на разные сроки после аксотомии. $M \pm SEM$; * $p < 0,05$; $n=3$.

Из вышесказанного следует, что в аксотомированных ганглиях дорзальных корешков спинного мозга крысы наблюдается повышение уровня гистондеацетилаз HDAC1, HDAC2 и HDAC3. Аксотомия приводит к снижению уровня ацетилирования гистонов H3 и H4, а также накоплению проапоптотических белков: E2F1, p53 и активной каспазы 3. Перерезка седалищного нерва вызывает транслокацию HDAC1 и факторов транскрипции p53 и E2F1 из ядра в цитоплазму и, наоборот, транслокацию HDAC3 из цитоплазмы в ядро. В результате аксотомии HDAC1 перемещается в цитоплазму нейронов DRG, где опосредует деацетилирование факторов транскрипции E2F1 и p53, что может приводить к нарушению их транскрипционной активности и усилению проапоптотического взаимодействия с митохондриями.

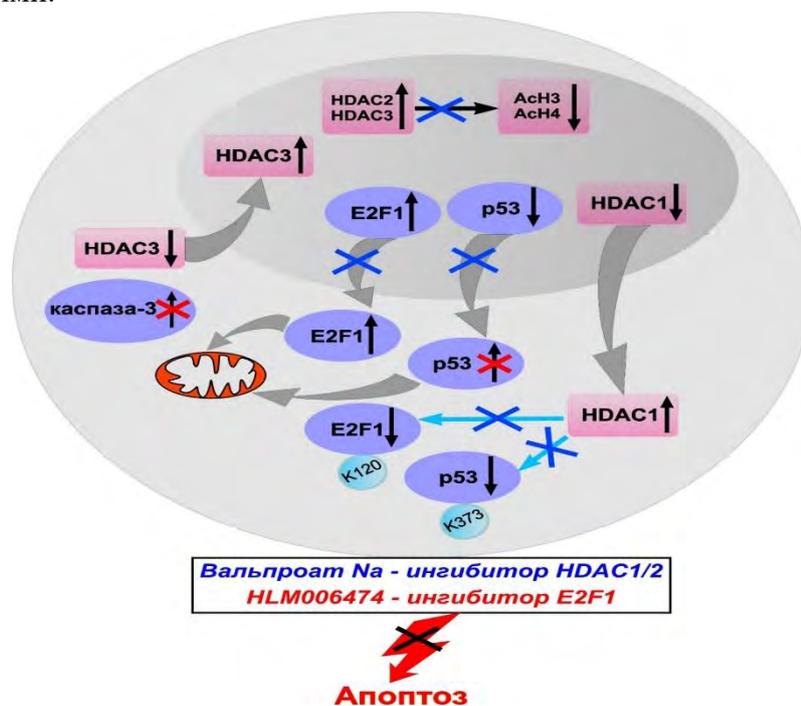


Рисунок 13. Эпигенетические процессы, приводящие к гибели сенсорных нейронов DRG крысы после аксотомии. Красные – эпигенетические белки, синие – сигнальные белки. Стрелками \downarrow/\uparrow обозначено снижение или повышение уровня белка. Влияния вальпроата натрия обозначено синим крестиком, ингибитора E2F1 – красным.

Нейропротекторный эффект ингибитора HDACs вальпроата натрия связан с восстановлением уровня ацетилирования гистонов H3 и H4. Вальпроат натрия также отменял, вызванное аксотомией снижение уровня ацетилированного E2F1 (K120) и ацетилированного p53 (K373). Введение ингибитора HDAC в течение 7 дней после перерезки седалищного нерва снижает уровень E2F1 и p53 в цитоплазме, но увеличивает в ядре, что свидетельствует о перераспределении белков между ядром и цитоплазмой. При этом ацетилированные формы E2F1 и p53 увеличиваются в цитоплазматической фракции под действием ингибитора. О нейропротекторном свойстве препарата также говорит то, что через 7 дней после перерезки седалищного нерва вальпроат натрия повышает уровень маркера регенерации нервов GAP-43 как в поврежденном ипсилатеральном, так и в неповрежденном контралатеральном ганглии. Ингибирование гистондеацетилаз защищает глиальные клетки DRG ганглиев крыс от апоптоза, вызванного аксотомией. Ингибирование E2F1 полностью устраняет вызванную аксотомией повышенную экспрессию проапоптотических белков каспазы 3 и p53, защищая тем самым клетки аксотомированных DRG от апоптоза. Описанные результаты проиллюстрированы на рисунке 13. Таким образом, селективное ингибирование HDAC1 и нижележащих сигнальных путей является основой для разработки новых терапевтических стратегий нейропротекции при повреждении нервов периферической нервной системы.

ВЫВОДЫ

1. Выраженные изменения белкового профиля в аксотомированных ганглиях БНЦ рака наблюдаются уже через 1 час после перерезки нервов. Экспрессия 48 сигнальных белков повышается, а 31 белка – снижается. Через 3 часа наблюдается повышение уровня 49 сигнальных белков, а уровни 37 белков снижаются. При этом, в аксотомированных ганглиях одновременно экспрессируются белки, участвующие как в нейродегенерации (Bcl-10, SMAC/DIABLO, AIF, исполнительные каспазы 3, 6 и 7, p75, MAP киназы p38 и JNK, E2F1, p53, с-Мус и GADD153/CHOP-10, провоспалительная каспаза 11) так и в нейропротекции (Bcl-x, Mcl-1, p21WAF-1, MDM2, протеинкиназа ERK5 и рецептор эстрогенов).

2. В аксотомированных ганглиях дорзальных корешков спинного мозга крысы наиболее ранние и специфичные изменения наблюдаются со стороны гистондеацетилаз HDAC1, HDAC2 и HDAC3, экспрессия которых увеличивается уже через 1 и 4 часа после перерезки седалищного нерва. Экспрессия фактора транскрипции E2F1 в аксотомированных нейронах ганглиев повышается через 4 часа, а проапоптотических белков p53, активированной каспазы 3 – через 24 часа. Уровень ацетилированного E2F1 (K120) и ацетилированного p53 (K373) снижаются в цитоплазме нейронов ганглиев через 24 часа после аксотомии.

3. Нейротравма вызывает транслокацию HDAC1, факторов транскрипции p53 и E2F1 из ядра в цитоплазму в первые 24 часа после аксотомии и, наоборот, транслокацию HDAC3 из цитоплазмы в ядро через 4 часа после повреждения.

4. Аксотомия седалищного нерва ассоциирована с повышением экспрессии и активности HDAC1 в аксотомированных ганглиях крыс, что приводит к снижению ацетилированного p53 (K373) и ацетилированного E2F1 (K120) в цитоплазме нейронов.

5. Введение ингибитора HDAC I класса вальпроата натрия отменяет вызванную аксотомией транслокацию p53 и E2F1 из ядра в цитоплазму и увеличивает уровень ацетилирования p53 и E2F1 по K373 и K120, соответственно в нейронах ганглиев, защищая их клетки от апоптоза.

6. Ингибирование активности E2F1 оказывает выраженное нейропротекторное действие: полностью устраняет вызванную аксотомией повышенную экспрессию белков p53 и активной каспазы 3, защищая аксотомированные ганглии от апоптоза.

СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах

1. Dzreyan V.A. E2F1 Expression and Apoptosis Initiation in Crayfish and Rat Peripheral Neurons and Glial Cells after Axonal Injury / V.A.Dzreyan, M.A.Eid, S.V.Rodkin, M.A.Pitinova, S.V.Demyanenko // International journal of molecular science. – 2022. – V. 23(8), № 4451. – P. 1–22 [*Wos, Scopus, Q – 1, IF: 5,59*]
2. Eid M.A. Sirtuins 1 and 2 in the Acute Period After Photothrombotic Stroke: Expression, Localization and Involvement in Apoptosis/ M.A.Eid, V.A.Dzreyan, S.V.Demyanenko // Frontiers in physiology. – 2022. – V. 13, № 782684. – P. 1–12 [*Wos, Scopus, Q – 1, IF: 5,59*]
3. Demyanenko S.V. Histone Deacetylases and Their Isoform-Specific Inhibitors in Ischemic Stroke. S.V.Demyanenko, V.A.Dzreyan, S.A.Sharifulina // Biomedicines. – 2021. – V. 9, № 1445. – P. 1–20 [*Wos, Scopus, Q – 1, IF: 6,08*]
4. Rodkin S.V. The Role of p53-Dependent Signaling Pathways in Survival and Death of Neurons and Glial Cells after Peripheral Nerve Injury / S.V.Rodkin, V.A.Dzreyan, S.V.Demyanenko, A.B.Uzdensky // Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. – 2021. – V. 15(4). – P. 334–347 [*Scopus, Q – 4, IF: 1,2*]
5. Dzreyan V.A. HDAC1 Expression, Histone Deacetylation, and Protective Role of Sodium Valproate in the Rat Dorsal Root Ganglia After Sciatic Nerve Transection / V.A.Dzreyan, S.V.Rodkin, V.V.Nikul, M.A.Pitinova, A.B.Uzdensky // Molecular neurobiology. – 2021. – V. 58, № 1. – P. 217–228 [*Wos, Scopus, Q – 1, IF: 5,59*]
6. Dzreyan V.A. The Expression of E2F1, p53, and Caspase 3 in the Rat Dorsal Root Ganglia After Sciatic Nerve Transection / V.A.Dzreyan, S.V.Rodkin, V.V.Nikul, M.A.Pitinova, A.B.Uzdensky // Journal of molecular neuroscience. – 2021. – V. 71(4). – P. 826–835 [*Wos, Scopus, Q – 2, IF:3,10*]
7. Demyanenko S.V. The Role of p53 Protein in the Realization of the Exogenous Heat Shock Protein 70 Anti-Apoptotic Effect during Axotomy / S.V.Demyanenko, M.A.Pitinova, V.A.Dzreyan, Y.N.Kalyuzhnaya, M.A.Eid, A.Y.Abramov, M.B.Evgen'ev, D.G.Garbus // Cells. – 2021. – V. 11(1), № 93. – P. 1 – 17 [*Wos, Scopus, Q – 1, IF:6,6*]
8. Demyanenko S.V. Expression of Histone Deacetylases HDAC1 and HDAC2 and Their Role in Apoptosis in the Penumbra Induced by Photothrombotic Stroke / S.V.Demyanenko, V.A.Dzreyan, M.A.Neginskaya, A.B.Uzdensky // Molecular neurobiology. – 2020. – V. 57(1). – P. 226–238 [*Wos, Scopus, Q – 1, IF: 5,59*]
9. Rodkin S.V. 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 / S.V.Rodkin, A.M.Khaitin, M.A.Pitinova, V.A.Dzreyan, V.V.Guzenko, M.V.Rudkovskii, S.A.Sharifulina, A.B.Uzdensky // Journal of molecular neuroscience. – 2020. – V. 70(4). – P. 532–541 [*Wos, Scopus, Q – 2, IF:3,10*]
10. Demyanenko S.V. Overexpression of HDAC6, but not HDAC3 and HDAC4 in the penumbra after photothrombotic stroke in the rat cerebral cortex and the neuroprotective effects of α -phenyl tropolone, HPOB, and sodium valproate / S.V.Demyanenko, V.A.Dzreyan, A.B.Uzdensky // Brain research bulletin. – 2020. – V. 162. – P. 151–165 [*Wos, Scopus, Q – 2, IF:4,07*]
11. Demyanenko S.V. The Expression and Localization of Histone Acetyltransferases HAT1 and PCAF in Neurons and Astrocytes of the Photothrombotic Stroke-Induced Penumbra in the Rat Brain Cortex / S.V.Demyanenko, V.A.Dzreyan, A.B.Uzdensky // Molecular neurobiology. – 2020. – V. 57(7). – P. 3219–3227 [*Wos, Scopus, Q – 1, IF: 5,59*]
12. Demyanenko S.V. Axotomy-Induced Changes of the Protein Profile in the Crayfish Ventral Cord Ganglia / S.V.Demyanenko, V.A.Dzreyan, A.B.Uzdensky // Journal of molecular neuroscience. – 2019. – V. 68(4). – P. 667–678 [*Wos, Scopus, Q – 2, IF:3,10*]
13. Demyanenko S.V. Class II histone deacetylases in the post-stroke recovery period-expression, cellular, and subcellular localization-promising targets for neuroprotection / S.V.Demyanenko, E.V.Berezhnaya, M.A.Neginskaya, S.V.Rodkin, V.A.Dzreyan, M.A.Pitinova // Journal of cellular biochemistry. – 2019. – V. 120(12). – P. 19590–19609 [*Wos, Scopus, Q – 2, IF: 4,43*]

Тезисы в рецензируемых журналах

14. Uzdensky A.B. Upregulation of histone acetyltransferases HAT1 and PCAF in the penumbra after photothrombotic stroke in the rat brain cortex / A.B.Uzdensky, S.V.Demyanenko, V.A.Dzreyan // International Journal of Stroke. – 2020. – 15(1S): 623. [*Wos, Scopus, Q – 1*]
15. Uzdensky A.B. Expression of HDAC3 and HDAC6 in the photothrombosis-induced penumbra in the rat brain cortex and neuroprotective effect of tubastatin A / A.B.Uzdensky, S.V.Demyanenko, V.A.Dzreyan // International Journal of Stroke. – 2020. – 15(1S): 623. [*Wos, Scopus, Q – 1*]
16. Uzdensky A.B. Methylation and acetylation of histone H3 in neurons and astrocytes in photothrombotic stroke-induced penumbra / A.B.Uzdensky, S.V.Demyanenko, V.A.Dzreyan, V.V.Guzenko // International Journal of Stroke. – 2020. – 15(1S): 628. [*Wos, Scopus, Q – 1*]
17. Uzdensky A.B. Histone acetylation and apoptosis in penumbra after photothrombotic stroke in the rat cerebral cortex / A.B.Uzdensky, S.V.Demyanenko, V.A.Dzreyan // Europ. J. Clin. Invest. – 2019. – 49:88. [*Wos, Scopus, Q – 1*]
18. Uzdensky A.B. Neurotrauma: expression of signaling proteins in the rat dorsal root ganglia after sciatic nerve transection / A.B.Uzdensky, S.V.Demyanenko, V.A.Dzreyan // Europ. J. Clin. Invest. – 2019. – 49: 178–179 [*Wos, Scopus, Q – 1*]

19. Demyanenko S.V. Epigenetic processes in the ischemic penumbra after photothrombotic stroke in the rat cerebral cortex / S.V.Demyanenko, V.A.Dzreyan, V.V.Guzenko, A.B.Uzdensky // Cell Death Discovery. – 2019. – 5. – ECDO14. [*Wos, Scopus, Q – 2*]
20. Демьяненко С.В. Метилирование и ацетилирование гистона H3 в нейронах и астроцитах пенумбры после фототромботического инсульта / С.В.Демьяненко, В.А.Дзряян, В.В.Гузенко, М.А.Негинская, А.Б.Узденский // Acta Naturae. – 2019. – Т. 2: 234. [*Wos, Scopus, Q – 2*]
21. Дзряян В.А. Экспрессия сигнальных белков в спинномозговых ганглиях крысы после перерезки седалищного нерва / В.А.Дзряян, В.В.Гузенко, В.В.Никул, Е.В.Бережная, М.А.Негинская, А.Б.Узденский // Acta Naturae. – 2019. – Т. 1: 127. [*Wos, Scopus, Q – 2*]
22. Демьяненко С.В. Нейропротекторное действие тубастатин А, ингибитора гистондеацетилазы HDAC6, в восстановительный период после ишемического инсульта у мышей / С.В.Демьяненко, В.А.Дзряян, В.В.Гузенко, В.В.Никул, М.А.Негинская // Acta Naturae. – 2019. – Т. 2: 229. [*Wos, Scopus, Q – 2*]
23. Демьяненко С.В. Нейропротекторное действие T56-LIMK1, ингибитора LIM киназы и активатора кофилина, в ишемической пенумбре после фототромботического инсульта / С.В.Демьяненко, В.А.Дзряян, В.В.Гузенко, Е.В.Бережная, А.Б.Узденский // Acta Naturae. – 2019. – Т2: 235. [*Wos, Scopus, Q – 2*]
24. Родькин С.В. Белок p53 опосредует вызванную аксотомией смерть нейронов и глиальных клеток рака / С.В.Родькин, А.М.Хайтин, М.А.Питинова, В.А.Дзряян, С.А.Шарифулина, В.В.Гузенко, А.Б.Узденский // Acta Naturae. – 2019. – Т1: 125. [*Wos, Scopus, Q – 2*]
25. Узденский А.Б. Изменения белкового профиля в двусторонне аксотомированных ганглиях речного рака / А.Б.Узденский, С.В.Демьяненко, В.А.Дзряян // Acta Naturae. – 2019. – Т1: 126. [*Wos, Scopus, Q – 2*]
26. Demyanenko S.V. Epigenetic alterations in ischemic penumbra in the rat cerebral cortex induced by photothrombotic stroke / S.V.Demyanenko, V.A.Dzreyan, V.V.Guzenko, A.B.Uzdensky // J. of Bioenerg. and Biomembr. – 2018. – 50(6): 534-534. [*Wos, Scopus, Q – 2*]
27. Dzreyan V.A. Neurotrauma: Expression of signaling proteins in axotomized crayfish ganglia / V.A.Dzreyan, V.V.Guzenko, E.V.Berezhnaya, M.A.Neginskaya, A.B.Uzdensky // J. of Bioenerg. and Biomembr. – 2018. – 50(6): 71. [*Wos, Scopus, Q – 2*]

Материалы конференций

1. Дзряян В.А. Участие гистондеацетилаз HDAC1 и HDAC2 в гибели клеток спинномозговых ганглиев крысы после перерезки седалищного нерва / В.А.Дзряян, С.В.Родькин, М.А.Питинова, В.В.Гузенко // Обмен веществ при адаптации и повреждении - дни клинической лабораторной диагностики на Дону: XIX Российская научно-практическая конференция с международным участием, Ростов-на-Дону, 8 июня 2021 года. – Ростов-на-Дону: Ростовский государственный медицинский университет, 2021. – С. 9-13. [*РИНЦ*]
2. Дзряян В.А. Нейротравма: экспрессия сигнальных белков и нейропротекторная роль вальпроата натрия в спинномозговых ганглиях крысы после перерезки седалищного нерва / В.А.Дзряян, С.В.Родькин, А.Б.Узденский // Российский нейрохирургический журнал им. профессора А.Л. Поленова. – 2021. – Т. 13. – № S1. – С. 209. [*РИНЦ*]
3. Дзряян В.А. Ранние изменения экспрессии и локализации проапоптотических и эпигенетических белков в клетках периферической нервной системы крыс после повреждения / В.А.Дзряян, С.В.Родькин, М.А.Питинова // Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста: Сборник докладов VII Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов, Рязань, 07 октября 2021 года / Редколлегия: Р.Е. Калинин, И.А. Сучков, И.А. Федотов, Ю.В. Абаленихина. – Рязань: Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, 2021. – С. 67-69. [*РИНЦ*]
4. Родькин С.В. Влияние аксотомии на экспрессию и внутриклеточную локализацию E2F1 в нейронах ганглиев крысы и рака и рецепторов растяжения рака / С.В.Родькин, В.А.Дзряян, М.А.Питинова, А.М.Хайтин, А.Б.Узденский // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Сб. статей. Под ред. В.П. Зинченко, А.В. Бережнова. – Серпухов. – 2021. – Т2. – С. 431-437 [*РИНЦ*]
5. Дзряян В.А. Содержание сигнальных белков и нейропротекторная роль вальпроата натрия в спинномозговых ганглиях крысы после аксотомии седалищного нерва / В.А.Дзряян, С.В.Родькин, А.Б.Узденский // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Сб. статей. Под ред. В.П. Зинченко, А.В. Бережнова. – Серпухов. – 2021. – Т1. – С. 63-69 [*РИНЦ*]
6. Дзряян В.А. Содержание сигнальных белков в спинномозговых ганглиях крысы после аксотомии седалищного нерва / В.А.Дзряян, В.В.Гузенко, С.В.Родькин [и др.] // Материалы XXI Зимней молодежной школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии: Тезисы докладов Молодежной конференции, пос. Репино, 24–29 февраля 2020 года. – Гатчина: НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ, 2020. – С. 68-69. [*РИНЦ*]
7. Дзряян В.А. Экспрессия сигнальных белков и нейропротекторная роль вальпроата натрия в спинномозговых ганглиях крысы после перерезки седалищного нерва / В.А.Дзряян, В.В.Гузенко, С.В.Родькин [и др.] // Обмен веществ при адаптации и повреждении - дни клинической лабораторной диагностики на Дону: XIX Российская научно-практическая конференция с международным участием, Ростов-на-Дону, 20 ноября 2020 года. – Ростов-на-Дону: Ростовский государственный медицинский университет, 2020. – С. 10-16. [*РИНЦ*]
8. Дзряян В.А. Изменения экспрессии сигнальных белков в ганглиях дорзальных корешков спинного мозга крысы после повреждения периферического нерва / В.А.Дзряян, В.В.Гузенко, С.В.Родькин [и др.] // Обмен веществ при адаптации и повреждении - дни клинической лабораторной диагностики на Дону: XVIII Российская научно-практическая конференция с международным участием, Ростов-на-Дону, 31 мая 2019 года. – Ростов-на-Дону: Ростовский государственный медицинский университет, 2020. – С.17. [*РИНЦ*]

9. Дзряян В.А. Нейротравма: смерть нейронов и экспрессия сигнальных белков в ганглиях дорзальных корешков спинного мозга крысы после перерезки седалищного нерва / В.А.Дзряян, В.В.Гузенко, В.В.Никул, М.А.Питинова, С.В.Родькин, М.Ю.Бибов, Е.В.Бережная, М.А.Негинская, А.Б.Узденский // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Сб. статей. Под ред. В.П. Зинченко, А.В. Бережнова. – Серпухов. – 2019. – Т2. – С. 766-771 [РИНЦ]
10. Дзряян В.А. Экспрессия сигнальных и структурных белков в нервной ткани речного рака после аксотомии / В.А.Дзряян, В.В.Гузенко, М.А.Негинская // Материалы XX Зимней молодежной школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии, Рощино, 25 февраля – 02 марта 2019 года. – Рощино: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константина Нациоанального исследовательского центра «Курчатовский институт», 2019. – С. 115-116. [РИНЦ]
11. Демьяненко С.В. Селективные ингибиторы гистоновых деацетилаз – новый класс препаратов для терапии инсульта / С.В.Демьяненко, В.А.Дзряян, В.В.Никул, А.Б.Узденский // Генетика – фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции: Материалы VIII научно-практической конференции с международным участием, Ростов-на-Дону, 26–29 сентября 2019 года. – Ростов-на-Дону - Таганрог: Издательство Южного федерального университета, 2019. – С. 160-161. [РИНЦ]
12. Дзряян В.А. Экспрессия сигнальных белков в ганглиях дорсальных корешков крысы после перерезки седалищного нерва / В.А.Дзряян, В.В.Гузенко, С.В.Родькин [и др.] // Генетика – фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции: Материалы VIII научно-практической конференции с международным участием, Ростов-на-Дону, 26–29 сентября 2019 года. – Ростов-на-Дону - Таганрог: Издательство Южного федерального университета, 2019. – С. 161-162. [РИНЦ]
13. Demyanenko S.V. Expression of epigenetic proteins and histone modifications in penumbra in the rat cerebral cortex after Photothrombotic stroke / S.V.Demyanenko, V.A.Dzreyan, V.V.Guzenko, A.B.Uzdensky // VII International Congress and Associate Symposiums of Vavilov Society of Geneticists and Breeders on the 100th Anniversary of The Department of Genetics of Saint Petersburg State University: Сборник тезисов Международного Конгресса, Санкт-Петербург, 18–22 июня 2019 года. – Санкт-Петербург: ООО "Издательство ВВМ", 2019. – P. 321. [РИНЦ]