

На правах рукописи

НИКИТИНА
Любовь Сергеевна

**МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ СИГНАЛЬНЫХ БЕЛКОВ АПОПТОЗА НА
ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ВАЗОПРЕССИНЕРГИЧЕСКИХ
НЕЙРОНОВ ГИПОТАЛАМУСА**

03.03.01 – Физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2009

Работа выполнена в лаборатории сравнительной сомнологии и нейроэндокринологии Учреждения Российской академии наук Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН

Научный руководитель: кандидат биологических наук
Черниговская Елена Валерьевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Аврова Наталья Федоровна

доктор биологических наук,
Ордян Наталья Эдуардовна

Ведущее научное учреждение: **Учреждение Российской академии наук
Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения РАН**

Защита диссертации состоится «9» февраля 2010 года в 11 часов на заседании диссертационного совета (Д 002.127.01) при Учреждении Российской академии наук Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН по адресу: 194223, г. Санкт-Петербург, пр. М. Тореза, 44

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (194223, г. Санкт-Петербург, пр. М. Тореза, 44).

Автореферат разослан «_____» _____ 2009 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор

М.Н. Маслова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Исследование сигнальных белков апоптоза в настоящее время в основном сфокусировано на анализе механизмов их взаимодействия в процессе регуляции клеточного цикла и апоптоза различных типов клеток. Особенный интерес вызывает роль белков апоптоза в нейронах, пролиферация и массовая программированная гибель которых заканчивается в раннем онтогенезе, но белки апоптоза продолжают синтезироваться в дифференцированных нейронах в течение всей жизни организма. Существование экспрессии сигнальных белков апоптоза в дифференцированных жизнеспособных нейронах позволяют предположить возможность их участия в процессах напрямую с апоптозом не связанных, однако данных об участии белков апоптоза в регуляции нейрональной активности в настоящее время чрезвычайно мало. В частности, было показано, что белки семейства BCL-2 (B-cell lymphoma 2), помимо регуляции митохондриального пути апоптоза [Kroemer et al., 1997], участвуют в регуляции роста аксонов [Jiao et al., 2005], и необходимы для осуществления синаптической пластичности [Fannjiang et al., 2003; Hickman et al., 2008; Jonas et al., 2003]. Транскрипционный фактор p53 (tumor protein 53) также является полифункциональным белком. Помимо регуляции клеточного цикла и апоптоза [Lane, 1993], p53 также участвует в регуляции экспрессии глюкокортикоидных рецепторов [Nishimura et al., 2004].

На основании результатов, полученных Черниговской с соавторами, и исходя из литературных данных, очевидно, что Bcl-2 и p53 экспрессируются в значительном количестве в нейронах ЦНС, в частности, в гипоталамических нейронах у взрослых интактных животных. Показано, что стресс, в том числе дегидратация (специфическое воздействие, вызывающее активацию вазопрессинергических нейросекреторных клеток) приводит к усилению экспрессии в них белков апоптоза (Bcl-2, p53), не вызывая гибель нейронов [Chernigovskaya et al., 2005; Nishimura et al., 2004]. Более того, показано, что нокаут генов, кодирующих p53 и Bcl-2, влияет на специфические функции вазопрессинергических и катехоламинергических нейронов на уровне синтеза и выведения нейрогормонов из тел клеток [Chernigovskaya et al., 2005], что свидетельствует о важной роли белков апоптоза в регуляции функциональной активности нейронов. Очевидно, что белки апоптоза не являются основными регуляторами функциональной активности нейронов. Более вероятно, что Bcl-2 и p53 оказывают модулирующее влияние на биосинтез нейропептидов. Однако непосредственные мишени Bcl-2 и p53 в регуляции функциональной активности нейронов мозга пока не обнаружены.

Показано, что Bcl-2 и p53 активируют ERK1/2 сигнальный каскад (киназный каскад, регулируемый внеклеточными сигналами) [Singh et al., 2007; Wang et al., 1996], который, вовлечен в регуляцию пролиферации и дифференцировки клеток [Pearson et al., 2001]. Кроме того, существуют немногочисленные данные об участии ERK1/2 каскада в регуляции биосинтеза

ряда нейротрансмиттеров [Arima et al., 2002; Ma et al., 2005]. Взаимодействие ERK1/2 каскада с сигнальными белками апоптоза в регуляции функциональной активности нейронов не изучалось.

Вазопрессинергические нейросекреторные нейроны гипоталамуса являются хорошей моделью для изучения возможности и механизмов участия Bcl-2 и p53 в регуляции нейрональной активности в связи с высокой секреторной активностью этих нейронов, позволяющей дифференциально оценивать изменения уровня синтеза и темпов выведения вазопрессина. Механизмы регуляции транспорта и выведения вазопрессинергических секреторных гранул к настоящему времени остаются слабо изученными. Анализ малочисленных литературных данных показал, что одним из белков, непосредственно осуществляющих антероградный транспорт, может быть кинезин [Senda, Yu, 1999]. Непосредственное изучение роли кинезина в реализации антероградного транспорта вазопрессина также практически не проводилось. Механизмы регуляции биосинтеза вазопрессина исследуются уже на протяжении нескольких десятилетий, и на первый взгляд являются хорошо изученными. Одним из ключевых факторов, отвечающих за транскрипцию вазопрессина нейронами гипоталамуса, является цАМФ. Промотор гена вазопрессина содержит CRE (cAMP response element), с которым связывается транскрипционный фактор CREB (cAMP response element binding protein), который в вазопрессинергических нейросекреторных нейронах гипоталамуса регулируется преимущественно протеинкиназой A [Burbach et al., 2001]. На основании экспериментов *in vitro* в различных типах клеток показано, что в фосфорилировании и активации CREB помимо протеинкиназы A, участвуют также другие протеинкиназы, в том числе относящиеся к ERK1/2 каскаду [Johannessen et al., 2004]. Более того, существуют данные об участии ERK1/2 сигнального каскада в регуляции циркадианного ритма экспрессии гена вазопрессина нейронами супрахиазматического ядра [Arima et al., 2002]. Несмотря на то, что протеинкиназа A очевидно не является единственной киназой, регулирующей транскрипцию вазопрессина за счет активации транскрипционного фактора CREB, данных о возможном участии ERK1/2-каскада в регуляции экспрессии вазопрессина нейронами супраоптического ядра гипоталамуса в литературе найдено не было.

Таким образом, очевидна необходимость детального исследования взаимодействия сигнальных белков апоптоза Bcl-2 и p53 с ERK1/2-каскадом и транскрипционным фактором CREB в регуляции функциональной активности вазопрессинергических нейронов гипоталамуса. Актуальность изучения этой проблемы основана на важности понимания механизмов взаимодействия различных белков апоптоза с другими внутриклеточными посредниками в функционировании клетки в физиологических условиях и при патологии.

Целью исследования было изучение механизмов влияния сигнальных белков апоптоза на функциональную активность вазопрессинергических нейронов гипоталамуса крыс. Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Оценить возможность участия, характер и механизмы влияния ERK1/2 сигнального каскада на функциональную активность вазопрессинергических нейронов супраоптического ядра гипоталамуса.
2. Исследовать характер прямого влияния антиапоптозного белка Bcl-2 на активность киназ ERK1/2 сигнального каскада и транскрипционных факторов Elk1 и CREB, а также на синтез и скорость выведения вазопрессина нейронами гипоталамуса.
3. Изучить характер прямого влияния проапоптозного белка p53 на активность киназ ERK1/2 сигнального каскада и транскрипционных факторов Elk1 и CREB, а также на синтез и скорость выведения вазопрессина нейронами супраоптического ядра.

Научная новизна

Впервые была выявлена активация киназ ERK1/2 каскада и транскрипционных факторов Elk1 и CREB в вазопрессинергических нейронах гипоталамуса при водной депривации. Впервые было установлено, что киназы ERK1/2 сигнального каскада участвуют в регуляции синтеза и секреции вазопрессина нейронами супраоптического ядра гипоталамуса. Была показана зависимость распределения транспортного белка кинезина от активности ERK1/2 киназы.

Впервые было установлено активирующее влияние антиапоптозного белка Bcl-2 и транскрипционного фактора CREB на активность синтеза вазопрессина.

Впервые было выявлено активирующее влияние p53 на секрецию вазопрессина нейронами супраоптического ядра гипоталамуса, выразившееся в регуляции транспорта и выведения нейрого르몬а. Было показано, что p53 влияет на интенсивность секреции вазопрессина за счет активации ERK1/2 киназы.

Основные положения, выносимые на защиту

1. ERK1/2 сигнальный каскад вызывает активацию транскрипционных факторов Elk1 и CREB, что приводит к усилению синтеза вазопрессина нейронами гипоталамуса, а также участвует в регуляции секреции вазопрессина, вызывая увеличение синтеза транспортного белка кинезина.
2. Антиапоптозный белок Bcl-2 и транскрипционный фактор CREB участвуют в активации синтеза вазопрессина независимо от ERK1/2 сигнального каскада.
3. Проапоптозный белок p53 оказывает модулирующее активирующее действие на секрецию вазопрессина, и это влияние опосредовано ERK1/2 киназой.

Теоретическая и практическая значимость

Исследование имеет фундаментальное значение для понимания роли сигнальных белков апоптоза Bcl-2 и p53 в модуляции функциональной активности вазопрессинергических нейронов, что открывает новые перспективы в изучении взаимозависимости функциональной активности нейронов и их жизнеспособности. Понимание механизмов взаимодействия различных белков апоптоза с внутриклеточными посредниками лежит также в основе разработки новых подходов к лечению онкологических заболеваний, а также ряда нейродегенеративных заболеваний, патогенез которых связан с нарушением баланса про- и антиапоптозных белков. Более того, к настоящему времени блокаторы Bcl-2 и p53 (HA14-1 и Pifithrin- α соответственно) используются в терапии онкологических заболеваний периферических тканей, в связи с чем необходимо учитывать возможность влияния этих фармакологических агентов на центральную нервную систему. Полученные в работе данные могут быть использованы в курсах лекций для студентов биологических и медицинских факультетов университетов и медицинских институтах.

Апробация работы

Результаты исследования доложены и обсуждены на 1 Съезде физиологов СНГ (Дагомыс, 2005), на XIII международном совещании по эволюционной физиологии (Санкт-Петербург, 2006), на 5 международной конференции по функциональной нейроморфологии «Колосовские чтения-2006» (Санкт-Петербург, 2006), на 6-th ICN (Питтсбург, США 2006), на XX съезде физиологического общества имени И.П. Павлова (Москва, 2007), на Всероссийском симпозиуме с международным участием «Гормональные механизмы адаптации» (Санкт-Петербург, 2007), на Международной конференции «Apoptosis World 2008. From mechanisms to applications» (Люксембург, 2008), на Конференции с международным участием «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга» (С.-Петербург, 2008), на 11-ой Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей «Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2008), на 4th Conference on Advances in Molecular Mechanisms of Neurological Disorders (Лейпциг, Германия, 2009).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 19 работ, 2 из которых – статьи в рецензируемых журналах, 17 тезисов докладов.

Финансовая поддержка работы

Работа выполнена при содействии Российского Фонда Фундаментальных исследований (проекты 05-04-48099 и 08-04-00028)

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения результатов, выводов и списка литературы, включающего 16 отечественных и 165 зарубежных источников. Работа изложена на 159 страницах машинописного текста, иллюстрирована 2 таблицами и 49 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для изучения возможности участия сигнальных белков апоптоза и киназ ERK1/2 сигнального каскада в регуляции функциональной активности вазопрессинергических нейронов гипоталамуса мы провели эксперименты, в которых взрослых крыс линии Вистар подвергали водной депривации. Животных опытной группы (n=11) в течение 3-х дней содержали в клетках со свободным доступом к сухому корму, но без воды. Крысы контрольной группы (n=11) имели свободный доступ к воде и корму. Животных декапитировали по окончании водной депривации.

Для изучения механизмов влияния p53 на активность вазопрессинергических клеток супраоптического ядра были проведены эксперименты *in vivo*. Селективный блокатор p53 Pifithrin- α вводили крысам (n=11) внутрибрюшинно в концентрации 2 мг/кг. Животным контрольной группы (n=11) вводили растворитель блокатора диметилсульфоксид (ДМСО) на физиологическом растворе в концентрации 0,5%. Животных декапитировали через 5 часов после введения растворов.

Для исследования механизмов прямого влияния p53 и Vcl-2 были проведены опыты *in vivo* с внутригипоталамическим введением блокаторов Vcl-2 – HA14-1 и p53 – Pifithrin- α . Для введения блокаторов за 7-10 дней до начала экспериментов наркотизированным крысам (нембутал в дозе 60мг/кг, интраперитонеально) вживляли проводящие канюли в область третьего желудочка мозга (AP1,4; L0,8; H6,5 в мм в соответствии со стереотаксическим атласом [Paxinos, Watson, 1998]). В работе были использованы 3 группы животных (n=15). Крысам контрольной группы вводили растворитель блокаторов (физиологический раствор, содержащий 0,5% ДМСО). Крысам второй группы вводили HA14-1 - блокатор Vcl-2 (0,5 мг/кг). Животные третьей группы были подвергнуты введению Pifithrin- α в дозе 0,25 мг/кг. Фармакологические агенты вводились дважды за 36 часов и за 8 часов до забора материала. Также, через 2 часа после каждого введения блокаторов, у животных всех экспериментальных групп оценивали уровень диуреза в течение двух часов в метаболических камерах. Крыс декапитировали на 8-11 день после имплантации канюль через 8 часов после последнего введения фармакологических агентов.

Для изучения прямого влияния инактивации Vcl-2, p53 или ERK1/2 сигнального каскада на функциональную активность вазопрессинергических

нейронов супраоптического ядра, были выполнены эксперименты *in vitro* с использованием блокаторов HA14-1, Pifithrin- α или UO126 соответственно. Исследования *in vitro* проводились на переживающих срезах гипоталамуса. Животных (n=66) декапитировали, быстро извлекали мозг и в стерильных условиях из гипоталамической области иссекали срезы толщиной около 600 мкм. Для экспериментов с использованием блокаторов HA14-1 и UO126 иссекались фронтальные срезы гипоталамуса, содержащие супраоптические и паравентрикулярные ядра. Для экспериментов с применением блокатора Pifithrin- α иссекались горизонтальные срезы, содержащие супраоптические, паравентрикулярные ядра и гипофиз. Срезы инкубировались в CO₂ инкубаторе в среде ДМЕМ, содержащей 20% инактивированной сыворотки крови лошади и антибиотики (пенициллин в дозе 50 мкг/мл среды и стрептомицин – 100 мкг/мл), в течение 30 минут при температуре 37⁰С, концентрации CO₂ 5% и влажности 95%. Затем среду меняли на инкубационную среду такого же состава, содержащую блокаторы (HA14-1 в дозе 30 мкМ или Pifithrin- α в дозе 10 мкМ или UO 126 в дозе 25 мкМ), или растворители блокаторов (ДМСО в концентрации 0,5%) в качестве контроля. Срезы инкубировались в течение 5 часов.

По окончании всех экспериментов по 5 мозгов или срезов гипоталамуса на группу фиксировали 4% формальдегидом для дальнейшего морфологического исследования. Из другой части мозгов или срезов иссекали супраоптические ядра и заднюю долю гипофиза, которые далее гомогенизировали в буфере, содержащем блокаторы пептидаз и фосфатаз, для последующего биохимического анализа.

Иммуногистохимия

Иммуногистохимическую обработку проводили по стандартной методике: 1. Инкубация с первичными поликлональными антителами кролика к вазопрессину (1: 200), кинезину (1:250) (Abcam), Vcl-2 (1:200) (Santa Cruz Biotechnology Inc.), p53 (1:100), фосфо-CREB(Ser133) (1:100), фосфо-cRaf (Ser338) (1:100), (Cell Signaling) (1:100), фосфо-МЕК1/2(Ser217/221) (1:100), фосфо-ERK1/2(Thr202/Tyr204) (1:120), ERK (1:100), фосфо-Elk1(Ser383) (1:30) фосфо-p90RSK(Ser380) (1:30) (Cell Signaling Technology). 2. Инкубация с вторичными биотинилированными антителами (Vector Labs). 3. Нанесение Стрептавидин-пероксидазного комплекса 1:200 (Vector Labs). 4. Проявление реакции проводилось диаминобензидином.

Конфокальная микроскопия.

Для исследования распределения исследуемых белков апоптоза и участников ERK1/2 сигнального каскада в гипоталамо-гипофизарной нейросекреторной системе срезы гипоталамуса обрабатывали иммуногистохимически с применением первичных поликлональных антител против кролика к вазопрессину, который выявляли с помощью вторичных антител, конъюгированных с Alexa Fluor 568 (Invitrogen). P53, фосфо-ERK1/2(Thr202/Tyr204), фосфо-Elk1(Ser383) и фосфо-CREB(Ser133) выявляли на тех же срезах с помощью первичных мышинных моноклональных антител и

вторичных антител, конъюгированных с Alexa Fluor 488 (Invitrogen). Анализ препаратов проводили на конфокальном микроскопе (Leica).

Вестерн блотт анализ

Содержание исследуемых белков в пробах, содержащих лизат супраоптического ядра или задней доли гипофиза оценивали методом Вестерн-блот. Белки, выделенные из лизатов разгоняли на SDS-PAGE, затем переносили на нитроцеллюлозу. В качестве первичных антител использовали антитела Bcl-2 (1:500, Santa-Cruz Inc.), фосфо-CREB(Ser133) (1:500, Chemicon), kinesin (1:750, Abcam); p53 (1:750), фосфо-ERK1/2 (Thr202/Tyr204).(1:1000), ERK1/2(1:1000), фосфо-Elk1(Ser383) (1:500), фосфо-MEK1/2(Ser217/221) (1:500), фосфо-cRaf(Ser 338) (1:500) – Cell Signaling, GAPDH (1:2000, Abcam). Для визуализации результатов использовали ECL plus–систему (Amersham Biosciences). Денситометрический анализ проводили с помощью программы PhotoM. Уровень экспрессии специфических белков был скорректирован по сигналу GAPDH, выявляемый для определения уровня общего количества белка в пробах.

Метод гибридизации in situ

Метод гибридизации in situ использовали для выявления мРНК вазопрессина. Меченая дигоксигенином мРНК вазопрессина была синтезирована in vitro транскрипционной реакцией с использованием линеализированной ДНК плазмиды (1 мкг), содержащей мРНК вазопрессина, с помощью коммерческого набора, содержащего дигоксигенин-меченые нуклеотиды согласно инструкции производителя (Boehringer Mannheim, Germany). Плазмида, содержащая мРНК вазопрессина, была любезно предоставлена М.В. Глазовой. Гибридизацию проводили согласно принятой методике [Campbell-Thompson et al., 1995]. Срезы ацетиловали в растворе ангидрида уксусной кислоты (0,25%), содержащем 0,1М триэтаноламин, дегидратировали в этиловом спирте и инкубировали в течение 12 часов при температуре 50⁰С в гибридизационном растворе, содержащем меченую дигоксигенином рибопробу к мРНК вазопрессина. Затем срезы промывали в смеси хлорида и цитрата натрия (SSC) и формамида. Для визуализации мРНК вазопрессина, меченного дигоксигенином, срезы инкубировали с антителами к дигоксигенину (разведение 250x на блокирующем растворе). Затем на срезы наносили раствор, содержащий NBT (nitro blue tetrazolium chloride) и BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) и оставляли инкубироваться в темноте во влажных камерах при комнатной температуре до проявления реакции. Для остановки реакции срезы промывали в буфере (100 мМ TRIS-HCl, 1 мМ EDTA, pH=9,5) в течение 15 минут и, после дополнительной промывке в воде, заключали в мовиол.

Морфофункциональный анализ материала

Количественная оценка содержания мРНК вазопрессина, а также вазопрессин-, Bcl-2-, фосфо-ERK(Thr202/Tyr204)-, фосфо-MEK1/2(Ser217/221)-, фосфо-Elk(Ser383)-, фосфо-CREB(Ser133)- и фосфо-cRaf(Ser338)-иммунореактивного вещества в нейросекреторных клетках и волокнах срединного

возвышения и задней доли гипофиза производилась на основании измерения оптической плотности окрашенного вещества на микрофотографиях с помощью компьютерного цифрового анализатора телевизионного изображения [Smolen, 1990; Агроскин, Папаян, 1977] и программного обеспечения PhotoM на полученных от каждого животного 5-8 фотографиях супраоптического ядра и гипофиза. Измерение иммунореактивного вещества проводили на параллельных срезах гипоталамуса. Данные выражались в условных единицах оптической плотности на $\mu\text{км}^2$. Кроме оценки содержания в нейронах иммунореактивного вещества в некоторых случаях проводился подсчет количества нейронов, давших интенсивную иммуногистохимическую реакцию на выявляемые белки. Измерение количества мРНК вазопрессина в нейронах гипоталамуса позволило оценить интенсивность синтеза вазопрессина, а сопоставление этих данных с содержанием вазопрессин-иммунореактивного вещества в перикарионах позволило нам оценить интенсивность выведения вазопрессина из перикарионов. Оценка содержания вазопрессин-иммунореактивного вещества в задней доле гипофиза позволила судить об интенсивности выведения вазопрессина в общий кровоток.

Все полученные данные обрабатывались статистически по t-критерию Стьюдента. При оценке достоверности отличий между группами n = количеству срезов на группу. Данные представлены в виде среднего арифметического по каждой группе животных \pm полуширина доверительного интервала для среднего значения. Достоверными считались отличия при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Локализация проапоптозного белка p53, активных форм ERK1/2 киназы и транскрипционных факторов CREB и Elk1 в вазопрессинергических нейронах супраоптического ядра

С помощью конфокальной микроскопии мы показали, что проапоптозный белок p53, фосфо-ERK1/2 киназа, фосфо-CREB и фосфо-Elk1 выявляются в телах вазопрессинергических нейронов супраоптического ядра. Мы показали колокализацию вазопрессина и фосфо-ERK1/2 в терминальных отделах волокон, образующих заднюю долю гипофиза. Более того, Вестерн Блот анализом было показано, что содержание фосфо-ERK1/2 киназы в задней доле гипофиза значительно выше, чем в супраоптическом ядре (Рис. 1). В совокупности представленные данные мы рассматриваем как предпосылку к исследованию возможности участия ERK1/2 киназы в регуляции синтеза и выведения вазопрессина нейронами супраоптического ядра гипоталамуса.

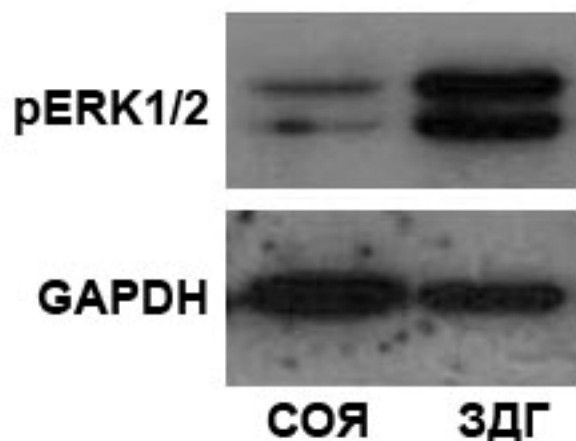


Рис. 1. Вестерн Блотт анализ содержания фосфо-ERK1/2 (pERK1/2) киназы в супраоптическом ядре (СОЯ) и задней доле гипофиза (ЗДГ) интактных крыс. В качестве контроля количества белка в пробах использовали GAPDH.

2. Влияние дегидратации на содержание антиапоптозного белка Bcl-2, проапоптозного белка p53, активных форм MEK1/2 киназы и транскрипционных факторов Elk1 и CREB.

Известно, что длительная водная депривация является адекватной функциональной нагрузкой для вазопрессинергических нейросекреторных нейронов супраоптического ядра, приводящей к усилению синтеза и выведения вазопрессина, и сопровождающейся увеличением содержания проапоптозного белка p53 и антиапоптозного белка Bcl-2 в нейронах супраоптического ядра [Chernigovskaya et al., 2005]. Мы показали, что трехдневная дегидратация также вызывает увеличение содержания Bcl-2 и p53 в нейронах супраоптического ядра (рис. 2А), не приводя к гибели нейронов.

В связи с тем, что внутриклеточные механизмы регуляции функциональной активности вазопрессинергических нейронов супраоптического ядра на данный момент недостаточно изучены, было проанализировано влияние дегидратации на содержание в изучаемых нейронах ряда внутриклеточных посредников, транскрипционных факторов и одного из белков цитоскелета, ответственного за антероградный транспорт органелл в клетке – кинезина.

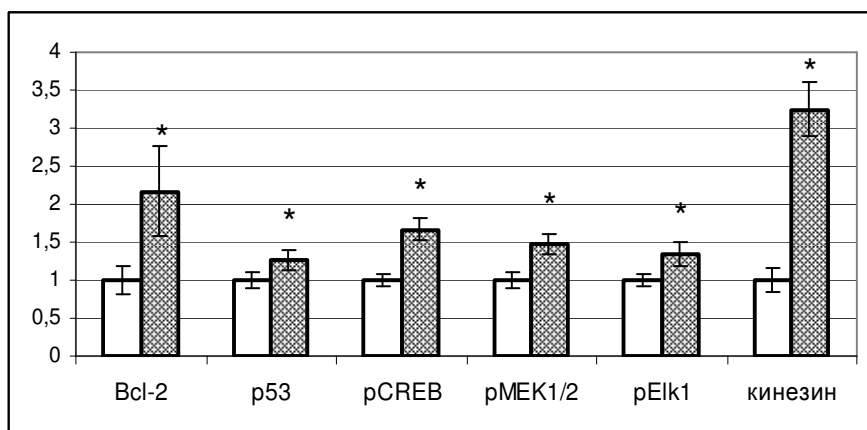
Для того чтобы оценить вклад транскрипционного фактора CREB в регуляцию активности вазопрессинергических нейронов, мы проанализировали влияние дегидратации на его активность. Известно, что основным механизмом активации CREB является его фосфорилирование по серину 133 [Johannessen et al., 2004]. Мы показали, что при дегидратации происходит увеличение содержания фосфо-CREB в нейронах супраоптического ядра (Рис. 2А). Увеличение активности транскрипционного фактора CREB в нейронах супраоптического ядра, сопровождавшее усиление синтеза вазопрессина, подтверждает данные литературы о вовлеченности CREB в регуляцию экспрессии вазопрессина.

Мы показали увеличение содержания фосфо-MEK1/2 киназы ERK1/2-сигнального пути, а также фосфо-Elk1 - транскрипционного фактора, являющегося одной из наиболее известных мишеней ERK1/2-сигнального пути, в

телах нейронов супраоптического ядра при дегидратации (Рис. 2А). Увеличение содержания фосфо-МЕК1/2 киназы наблюдалось не только в телах нейронов супраоптического ядра, но и в их отростках, которые входят в состав задней доли гипофиза (Рис. 2Б). Тот факт, что увеличение транскрипции и транспорта вазопрессина нейронами супраоптического ядра при дегидратации сопровождается активацией в этих нейронах киназ ERK1/2 сигнального пути, позволяет рассматривать возможность его участия в регуляции биосинтеза вазопрессина. Накопление в терминальных отделах аксонов нейронов гипоталамуса активных киназ ERK1/2 каскада и фосфо-Elk1 при активации транспорта и выведения вазопрессина, в совокупности с данными литературы об участии ERK1/2 пути в регуляции активности нейрофиламентов [Julien, Mushynski, 1998; Veeranna et al., 1998; Veeranna et al., 2000], указывает на возможность участия киназ ERK1/2 каскада в регуляции транспорта и выведения вазопрессина. Однако обе гипотезы требуют подтверждения.

Следующим этапом нашей работы было выяснение возможных механизмов транспорта нейросекреторных гранул. Анализ распределения кинезина в вазопрессинергических клетках супраоптического ядра показал, что при дегидратации наблюдается увеличение содержания кинезина в супраоптическом ядре (Рис. 2А), тогда как в задней доле гипофиза кинезина становится меньше (Рис. 2Б). Таким образом, по-видимому, при дегидратации происходит усиление экспрессии кинезина, равно как и вазопрессина, он транспортирует гранулы с вазопрессином в нейрогемальные отделы, где вазопрессин выбрасывается в кровь, а кинезин, возможно, подвергается протеасомной деградации. Данные о перераспределении тяжелых цепей кинезина при дегидратации свидетельствуют об участии этого белка в реализации антероградного транспорта нейросекреторных гранул с вазопрессином.

А



Б

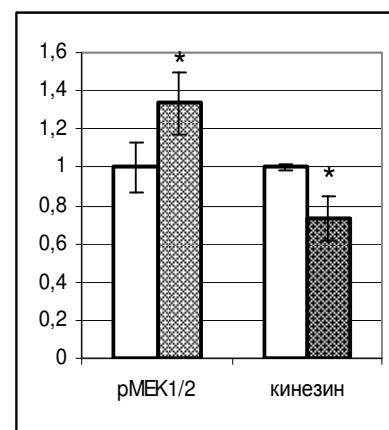


Рис. 2. Содержание Bcl-2, p53, фосфо-CREB (pCREB), фосфо-МЕК1/2 (pMEK1/2), фосфо-Elk1 (pElk1) и кинезина в нейронах Супраоптического ядра (А) и волокнах задней доли гипофиза (Б) интактных (белые столбики) и дегидратированных крыс (серые столбики).

По оси ординат: относительная оптическая плотность, выраженная в условных единицах.

*-достоверность отличия от контроля при $p < 0,05$.

3. Влияние ERK1/2 сигнального каскада на функциональное состояние вазопрессинергических нейронов супраоптического ядра гипоталамуса.

Влияние ERK1/2 каскада на секреторную активность вазопрессинергических нейронов супраоптического ядра исследовали в эксперименте *in vitro* с использованием селективного блокатора ERK1/2 каскада - UO126. Мы показали значительное снижение содержания как мРНК вазопрессина, так и вазопрессина в нейронах супраоптического ядра под действием блокатора UO126 (Рис. 3А), что свидетельствует о торможении синтеза вазопрессина. Мы показали, что инактивация ERK1/2 каскада вызвала снижение содержания фосфо-CREB и фосфо-Elk1 в нейронах супраоптического ядра (Рис. 3Б).

На основании данных литературы [Senda, Yu, 1999] и согласно результатам, полученным нами в экспериментах с дегидратацией, белком, ответственным за транспорт вазопрессина, по-видимому, является кинезин. Кинезин тем более является привлекательной потенциальной мишенью ERK1/2 каскада, поскольку было показано, что ERK1/2 каскад вовлечен в регуляцию активности одного из белков семейства кинезин – MS-KIF18A [Luboshits, Venayahu, 2007]. Инактивация ERK1/2 привела к снижению содержания кинезина в нейронах супраоптического ядра (Рис. 3Б). Зависимость экспрессии кинезина от активности ERK1/2 киназы подтверждает наше предположение о возможности участия ERK1/2 каскада в регуляции антероградного транспорта вазопрессина.

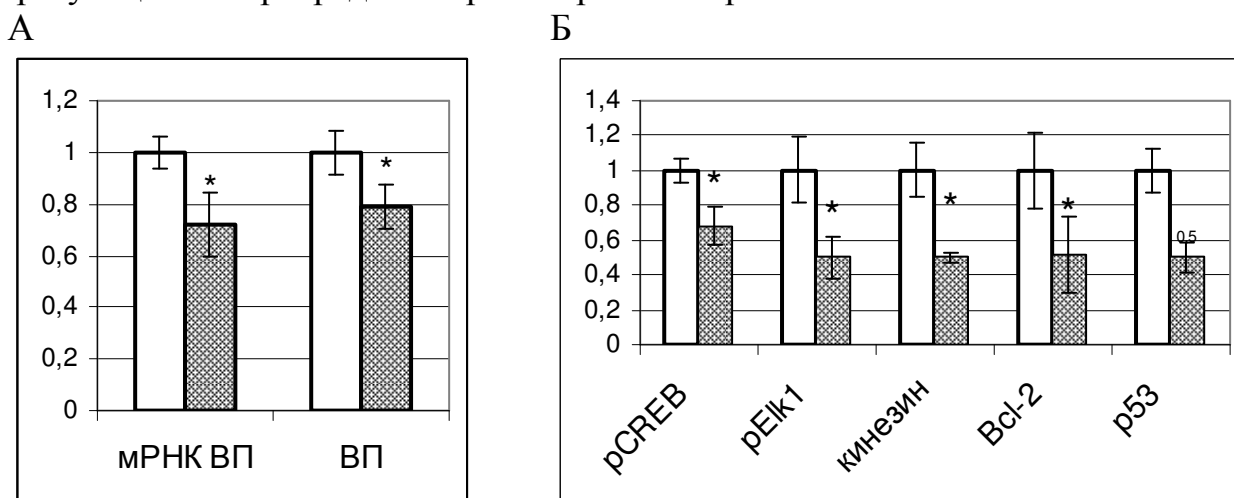


Рис. 3. Содержание матричной РНК вазопрессина (мРНК ВП), вазопрессина (ВП) (А), фосфо-CREB (pCREB), фосфо-Elk1 (pElk1), кинезина, Bcl-2 и p53 (Б) в нейронах супраоптического ядра гипоталамических срезов, инкубированных в среде, содержащей растворитель блокатора (белые столбики) и блокатор ERK1/2 каскада UO126 (серые столбики).

По оси ординат: относительная оптическая плотность, выраженная в условных единицах *-достоверность отличия от контроля при $p < 0,05$.

На основании результатов, полученных в экспериментах *in vivo* с дегидратацией и *in vitro* с введением блокатора MEK1/2 киназы UO126, можно заключить, что ERK1/2 сигнальный каскад принимает участие в регуляции

биосинтеза вазопрессина за счет регуляции активности транскрипционных факторов Elk1 и CREB. ERK1/2 каскад также вовлечен в регуляцию антероградного транспорта вазопрессина.

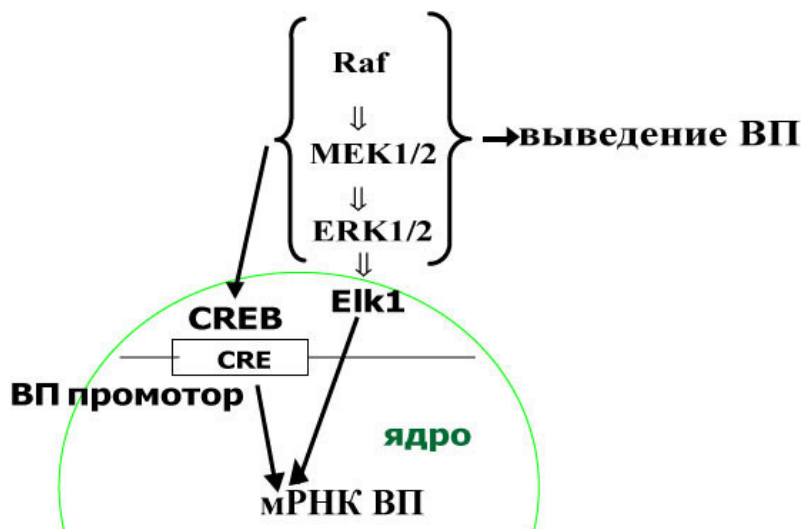


Рис. 4. Схема влияния ERK1/2 каскада на биосинтез вазопрессина.

4. Роль и механизмы участия антиапоптозного белка Bcl-2 в регуляции функционального состояния вазопрессинергических нейронов гипоталамуса

Для изучения характера прямого влияния антиапоптозного белка Bcl-2 на функциональную активность зрелых нейронов мы впервые провели эксперименты *in vivo* и *in vitro* с введением фармакологического блокатора Bcl-2 HA14-1.

Блокатор Bcl-2 был синтезирован для изучения роли и механизмов участия Bcl-2 в апоптозе. HA14-1 специфически ингибирует антиапоптозную активность белка Bcl-2 за счет подавления связывания Bcl-2 с проапоптозным белком Bax [Wang et al., 2000]. Несмотря на то, что воздействие введения HA14-1 на антиапоптозную активность Bcl-2 воспроизводится во всех опубликованных работах, влияние HA14-1 на экспрессию Bcl-2 различается в зависимости от доз этого блокатора и условий его применения [Manero et al., 2006; Zimmermann et al., 2005].

Мы показали увеличение содержания Bcl-2 после внутригипоталамического введения блокатора HA14-1 (Рис 5Б). Возможно, увеличение содержания Bcl-2, показанное в этом эксперименте, связано с компенсаторным увеличением синтеза Bcl-2 через 36 часов после первого введения блокатора и 8 часов после второго.

Введение HA14-1 вызвало увеличение секреторной активности вазопрессинергических нейронов супраоптического ядра как на уровне синтеза (увеличение количества мРНК вазопрессина в телах нейронов), так и на уровне выведения (снижение содержания вазопрессина в задней доле гипофиза и значительное уменьшение уровня диуреза) (Рис 5А, 6).

По данным литературы, одной из мишеней Bcl-2 является транскрипционный фактор CREB [Jiao et al., 2005]. Действительно, мы показали увеличение содержания фосфо-CREB в нейронах супраоптического ядра в ответ на внутригипоталамическое введение блокатора HA14-1 (Рис 5Б). Возможно, активация CREB, в свою очередь, вызвала увеличение активности биосинтеза

вазопрессина нейронами супраоптического ядра. Непосредственный механизм активации CREB антиапоптозным белком Bcl-2 в данных экспериментах пока не ясен. С одной стороны, активация CREB напрямую зависит от уровня кальция в цитоплазме [Dolmetsch et al., 2001], который, регулируется, в том числе, и белком Bcl-2 [Foyouzi-Youssefi et al., 2000]. С другой стороны, CREB является одной из мишеней ERK1/2 каскада [Wang et al., 2003].

Действительно, внутригипоталамическое введение блокатора HA14-1 вызвало увеличение содержания фосфо-МЕК1/2 киназы и фосфо-Elk1 в нейронах супраоптического ядра (Рис 5Б), что свидетельствует об активации ERK1/2 каскада [Pearson et al., 2001].

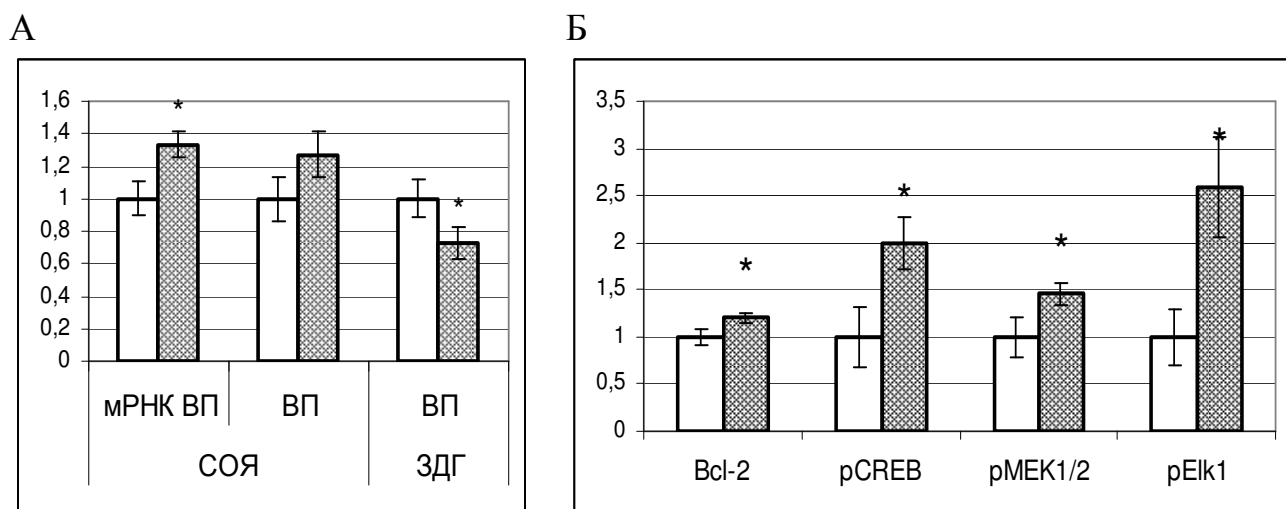


Рис. 5. Содержание матричной РНК вазопрессина (м-РНК ВП), вазопрессина (ВП) (А), Bcl-2, фосфо-CREB (pCREB), фосфо-МЕК1/2 (pМЕК1/2) и фосфо-Elk1 (pElk1) (Б) в нейронах супраоптического ядра (СОЯ) (А, Б) и в задней доле гипофиза (ЗДГ) (А) крыс, подвергнутых внутригипоталамическому введению растворителя блокатора (белые столбики) и HA14-1 (серые столбики).

По оси ординат: относительная оптическая плотность, выраженная в условных единицах.

*-достоверность отличия от контроля при $p < 0,05$.

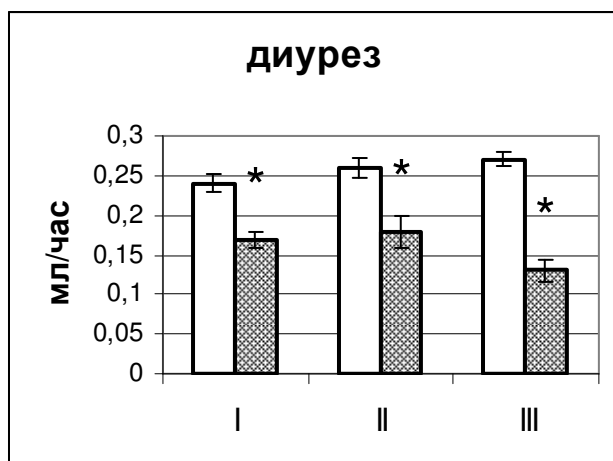


Рис. 6. Уровень диуреза крыс, подвергнутых внутригипоталамическому введению растворителя блокатора (белые столбики) и HA14-1 (серые столбики).

По оси абсцисс: I – измерение через 2 часа после первого введения, II – за 2 часа перед вторым введением, III – через 2 часа после второго введения.

По оси ординат: усредненный объем мочи крыс выраженный в мл/час/на животное

*-достоверность отличия от контроля при $p < 0,05$.

Таким образом, увеличение Vcl-2 в нейронах супраоптического ядра сопровождается активацией ERK1/2 сигнального каскада и транскрипционных факторов Elk1 и CREB, что приводит к повышению экспрессии вазопрессина. Полученные данные свидетельствуют о возможности модулирующего действия Vcl-2 на ERK1/2 каскад.

Для того, чтобы оценить прямое влияние блокатора Vcl-2 HA14-1 на активность изучаемых нейронов при нарушении экспрессии Vcl-2, мы провели эксперимент *in vitro*.

Мы показали, что 5-часовая инкубация срезов с блокатором HA14-1 вызывает значительное снижение содержания Vcl-2 в нейронах супраоптического ядра (Рис. 7Б). При этом мы наблюдали снижение количества мРНК вазопрессина в телах нейронов супраоптического ядра, сопровождавшееся некоторым увеличением содержания иммунореактивного вазопрессина в них (Рис 7А), что свидетельствует об уменьшении уровня синтеза и, предположительно, торможении выведения вазопрессина нейронами супраоптического ядра.

Мы также показали снижение содержания фосфо-CREB в нейронах супраоптического ядра (Рис. 7Б), что согласуется со снижением экспрессии как Vcl-2, так и вазопрессина.

Таким образом, данные наших экспериментов *in vivo* и *in vitro* четко продемонстрировали зависимость синтеза вазопрессина от экспрессии Vcl-2 и активности транскрипционного фактора CREB. Полученные данные подтверждают наше предположение, что в эксперименте *in vivo* эффекты введения блокатора в область гипоталамуса на биосинтез вазопрессина обусловлены компенсаторным увеличением экспрессии Vcl-2.

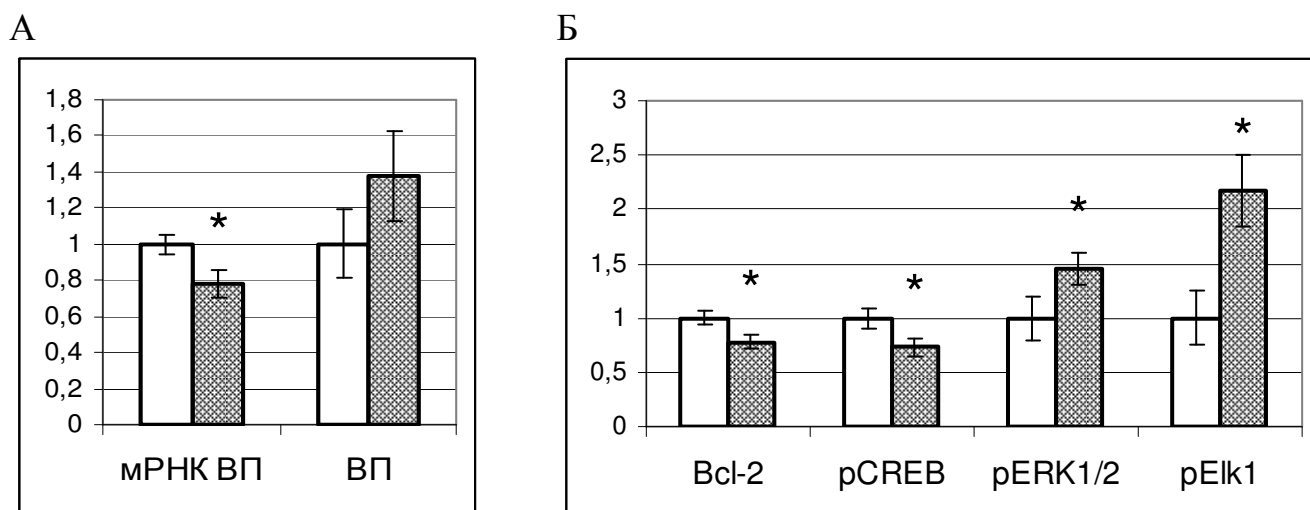


Рис. 7. Содержание матричной РНК вазопрессина (м-РНК ВП), вазопрессина (ВП) (А), Vcl-2, фосфо-CREB (pCREB), фосфо-ERK1/2 (pERK1/2) и фосфо-Elk1 (pElk1) (Б) в нейронах супраоптического ядра гипоталамических срезов, инкубированных в среде, содержащей растворитель блокатора (белые столбики) и блокатор Vcl-2 HA14-1 (серые столбики).

По оси ординат: относительная оптическая плотность, выраженная в условных единицах.

*-достоверность отличия от контроля при $p < 0,05$.

Мы показали значительное увеличение содержания как фосфо-ERK1/2 киназы, так и фосфо-Elk1, в нейронах супраоптического ядра после 5-часовой инкубации с HA14-1 (Рис 7Б). В связи с тем, что в эксперименте *in vitro* уровень синтеза вазопрессина нейронами супраоптического ядра снижался, повышение активности ERK1/2 киназы свидетельствует о вовлечения этого каскада в другие процессы в нейронах супраоптического ядра, не связанные с модуляцией синтеза вазопрессина в условиях недостатка антиапоптозного белка Bcl-2.

Одной из функций ERK1/2 каскада является регуляция выживания и регенерации аксонов [Jiao et al., 2005; Pearson et al., 2001]. В эксперименте *in vitro* мы инкубировали срезы, содержащие медиальный гипоталамус от уровня хиазмы до начала срединного возвышения. При этом аксоны нейронов супраоптического ядра, входящие в состав гипофиза, были повреждены. По-видимому, повреждение нейронов супраоптического ядра в сочетании с подавлением активности антиапоптозного белка Bcl-2 вызвало активацию ERK1/2 каскада.

Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что активность синтеза вазопрессина нейронами супраоптического ядра зависит от активации транскрипционного фактора CREB и содержания антиапоптозного белка Bcl-2. При этом влияние Bcl-2 на биосинтез вазопрессина нейронами супраоптического ядра, скорее всего, не зависит от его влияния на активность ERK1/2 сигнального каскада.

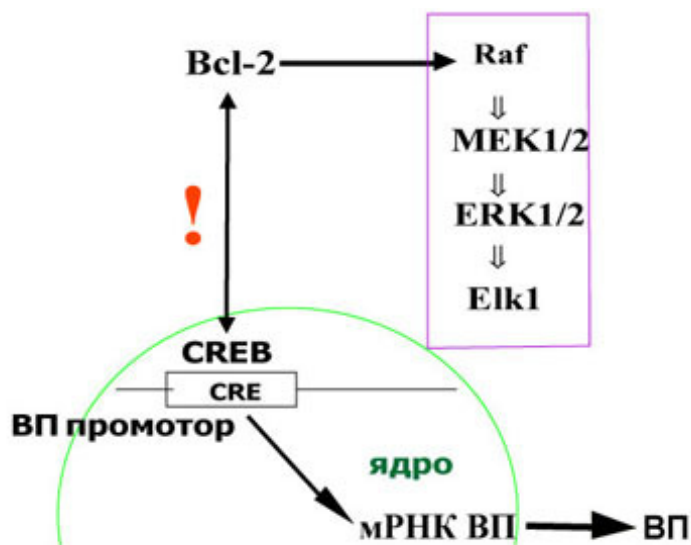


Рис. 8. Схема регуляции биосинтеза вазопрессина антиапоптозным белком Bcl-2 и транскрипционным фактором CREB

5. Влияние p53 на функциональную активность вазопрессинергических нейронов супраоптического ядра.

Для выяснения роли p53 в регуляции биосинтеза вазопрессина нейронами супраоптического ядра гипоталамуса мы провели эксперимент *in vivo* с внутривентрикулярным введением блокатора p53 Pifithrin- α . Системное введение блокатора Pifithrin- α не повлияло на уровень мРНК вазопрессина и вызвало накопление вазопрессина как в телах нейронов супраоптического ядра, так и в их отростках, образующих заднюю долю гипофиза (Рис. 9А), что свидетельствует о

торможении секреции вазопрессина. Полученные данные указывают на участие p53 в регуляции аксонального транспорта и/или экзоцитоза секреторных гранул вазопрессина. В последние годы появились публикации, касающиеся стимулирующего действия p53 на базальную и индуцированную различными фармакологическими агентами активность ERK1/2 каскада [Gulati et al., 2006; Singh et al., 2007]. Известно, что ERK1/2 участвует в фосфорилировании нейрофиламентов – белков цитоскелета, ответственных за формирование структуры аксонов и участвующих в реализации экзоцитоза синаптических везикул [Julien, Mushynski, 1998; Veeranna et al., 1998; Veeranna et al., 2000].

Действительно, мы показали, что инактивация p53 приводит к снижению содержания фосфо-ERK1/2 киназы в телах нейронов супраоптического ядра и их волокнах, входящих в состав задней доли гипофиза (Рис. (9Б)). На основании полученных данных можно предположить, что снижение содержания активной формы ERK1/2 киназы, наблюдаемое нами в супраоптическом ядре и в задней доле гипофиза при подавлении активности p53, может приводить к уменьшению активности ответственных за транспорт в аксонах белков. Таким образом, ERK1/2 каскад, возможно, опосредует влияние p53 на антероградный аксональный транспорт гранул вазопрессина.

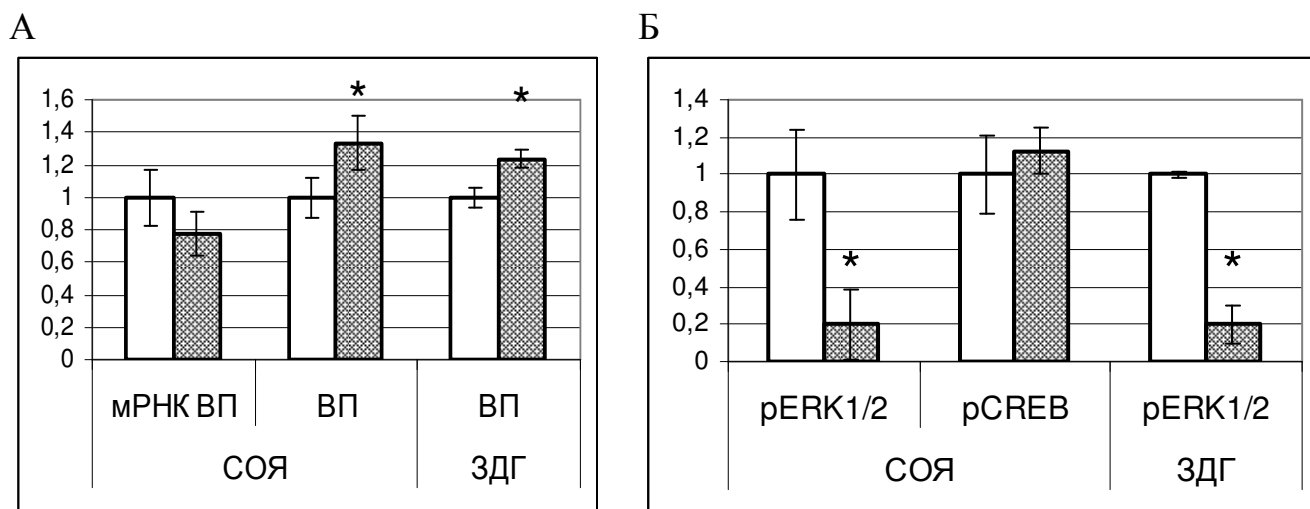


Рис. 9. Содержание матричной РНК вазопрессина (м-РНК ВП), вазопрессина (ВП) (А), фосфо-ERK1/2 (pERK1/2), фосфо-CREB (pCREB) (Б) в нейронах супраоптического ядра (СОЯ) и задней доли гипофиза (ЗДГ) крыс, подвергнутых внутрибрюшинному введению растворителя блокатора (белые столбики) и блокатора p53 Pifithrin-α (серые столбики).

По оси ординат: относительная оптическая плотность, выраженная в условных единицах.

*-достоверность отличия от контроля при $p < 0,05$.

Очевидно, что системное введение блокатора Pifithrin-α вызывает изменение активности p53 не только в нервной системе, но и в периферических тканях. Чтобы оценить непосредственное влияние инактивации p53 на вазопрессинергические нейроны, мы провели эксперимент *in vivo* с внутривентрикулярным введением Pifithrin-α. Мы показали, что инактивация

p53 в этом эксперименте также приводит к повышению содержания вазопрессина в телах нейронов супраоптического ядра, при неизменяющемся уровне синтеза вазопрессина (Рис. 10А) и к увеличению уровня диуреза (Рис. 11), что указывает на торможение выведения вазопрессина из тел гипоталамических клеток. Снижение содержания фосфо-МЕК1/2 киназы в вазопрессинергических нейронах при инактивации проапоптозного белка p53 (Рис. 10Б) также указывают на вовлеченность ERK1/2 киназы в регуляцию транспорта вазопрессина белком p53.

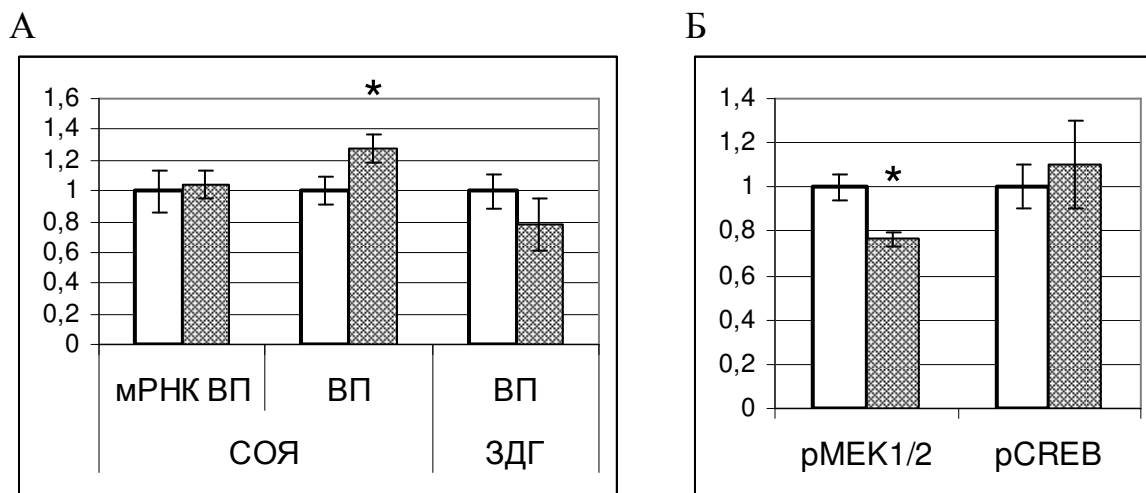


Рис. 10. Содержание матричной РНК вазопрессина (м-РНК ВП), вазопрессина (ВП) (А), фосфо-ERK1/2 (pERK1/2), фосфо-CREB (pCREB) (Б) в нейронах супраоптического ядра (СОЯ) и задней доле гипофиза (ЗДГ) крыс, подвергнутых внутригипоталамическому введению растворителя блокатора (белые столбики) и блокатора p53 Pifithrin-α (серые столбики).

По оси ординат: относительная оптическая плотность, выраженная в условных единицах.

*-достоверность отличия от контроля при $p < 0,05$.

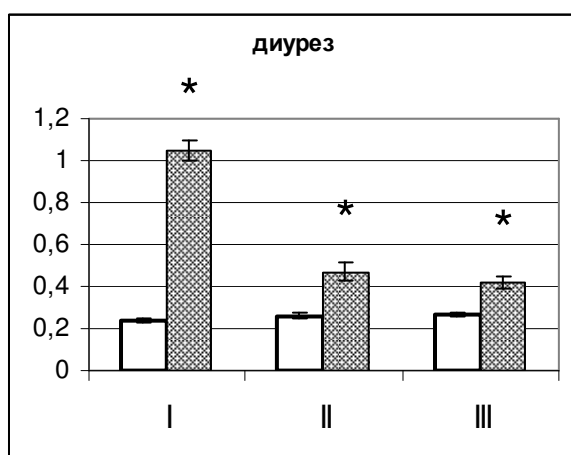


Рис. 11. Уровень диуреза крыс, подвергнутых внутригипоталамическому введению растворителя блокатора (белые столбики) и Pifithrin-α (серые столбики).

По оси абсцисс: I – измерение через 2 часа после первого введения, II – за 2 часа перед вторым введением, III – через 2 часа после второго введения.

По оси ординат: усредненный объем мочи крыс выраженный в мл/час/на животное

*-достоверность отличия от контроля при $p < 0,05$.

Для того чтобы выявить влияние инактивации p53 на секреторную активность нейронов супраоптического ядра и исключить влияния проекций других отделов ЦНС и влияний периферических органов на активность

исследуемых гипоталамических центров, мы провели эксперимент *in vitro*, в котором срезы гипоталамуса инкубировали в среде, содержащей Pifithrin- α . Мы показали увеличение содержания вазопрессина в телах нейронов супраоптического ядра и снижение содержания изучаемого нейrogормона в задней доле гипофиза, что в совокупности с данными о неизменности синтеза вазопрессина свидетельствует о торможении его выведения из тел нейронов супраоптического ядра (Рис 12А). Снижение содержания фосфо-ERK1/2 киназы в задней доле гипофиза, в ответ на инактивацию p53 (Рис. 12Б) подтверждает данные, полученные нами в экспериментах *in vivo* о вовлеченности ERK1/2 киназы в регуляцию транспорта вазопрессина белком p53.

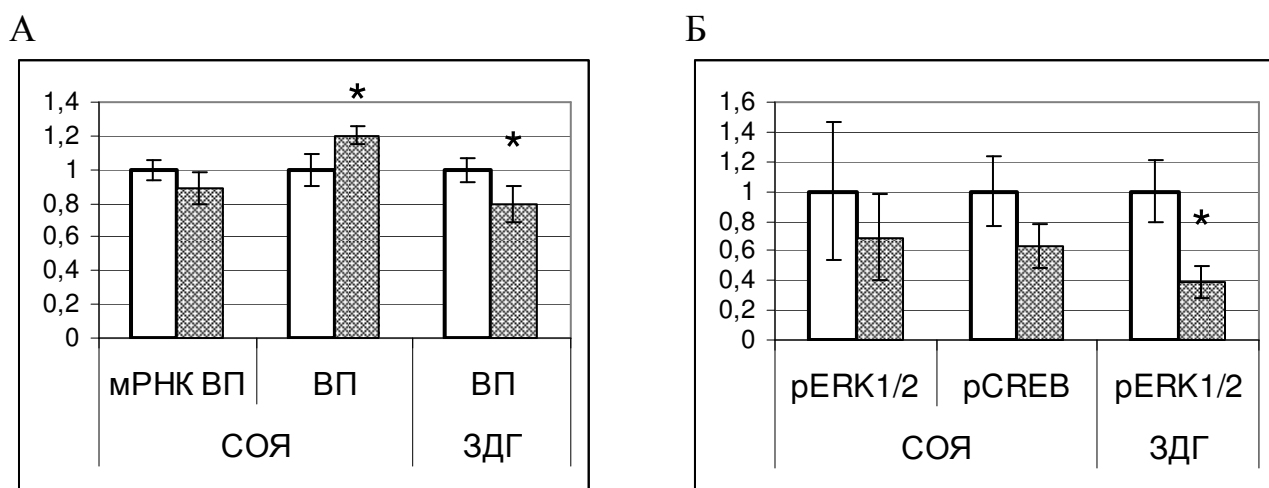


Рис. 12. Содержание матричной РНК вазопрессина (м-РНК ВП), вазопрессина (ВП) (А), фосфо-CREB (pCREB), фосфо-ERK1/2 (pERK1/2) (Б) в нейронах супраоптического ядра (СОЯ) и волокнах задней доли гипофиза (ЗДГ) гипоталамических срезов, инкубированных в среде, содержащей растворитель блокатора (белые столбики) и блокатор p53 Pifithrin- α (серые столбики). По оси ординат: относительная оптическая плотность, выраженная в условных единицах.

*-достоверность отличия от контроля при $p < 0,05$.

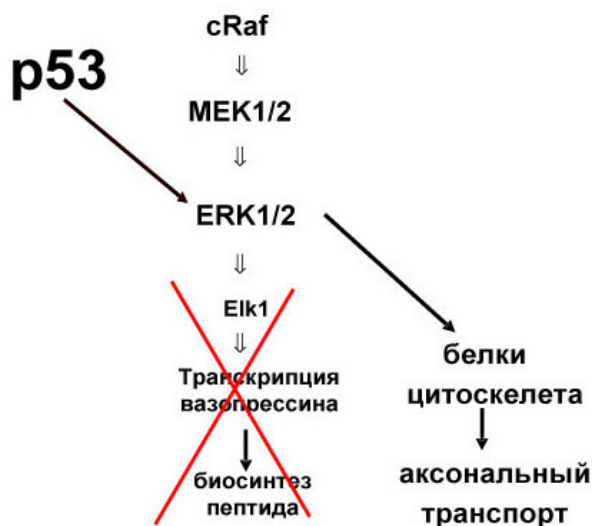


Рис. 13. Схема регуляции секреции вазопрессина проапоптозным белком p53.

Таким образом, на основании данных, полученных в экспериментах с введением блокатора Pifithrin- α , можно заключить, что p53 участвует в регуляции транспорта и/или выведения вазопрессина, и его влияние опосредовано ERK1/2 каскадом.

ВЫВОДЫ

1. Усиление синтеза и выведения вазопрессина нейронами гипоталамуса при дегидратации сопровождается активацией в них ERK1/2 киназы и транскрипционных факторов CREB и Elk1. Снижение активности транскрипционных факторов CREB и Elk1 в вазопрессинергических нейронах гипоталамуса при инактивации ERK1/2 каскада блокатором UO126 сопровождается снижением уровня синтеза вазопрессина, что свидетельствует об активирующем влиянии ERK1/2-зависимых транскрипционных факторов на экспрессию вазопрессина.

2. Увеличение содержания кинезина в супраоптическом ядре и его уменьшение в задней доле гипофиза при дегидратации свидетельствует об участии кинезина в реализации антероградного транспорта вазопрессина. Уменьшение содержания кинезина в супраоптическом ядре, вызванное снижением активности ERK1/2 киназы в результате действия UO126, свидетельствует об участии ERK1/2 сигнального каскада в регуляции антероградного транспорта вазопрессина кинезином.

3. Внутригипоталамическое введение HA14-1 – блокатора антиапоптозного белка Bcl-2 и его добавление в инкубационную среду показали прямую зависимость уровня экспрессии вазопрессина от количества Bcl-2 и от активности транскрипционного фактора CREB в нейронах супраоптического ядра гипоталамуса. Воздействие Bcl-2 на активность синтеза вазопрессина не зависит от активности ERK1/2 киназы и транскрипционного фактора Elk1.

4. В эксперименте *in vitro* с использованием блокатора проапоптозного белка p53 Pifithrin- α и в экспериментах *in vivo* с его внутрибрюшинным и внутригипоталамическим введением показано, что проапоптозный белок p53 оказывает активирующее действие на секрецию вазопрессина, опосредованное ERK1/2 киназой.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах

1. Никитина Л.С., Глазова М.В., Дорофеева Н.А., Черниговская Е.В. Влияние белков апоптоза на функцию вазопрессин-и дофаминергических нейронов гипоталамуса // Ж. эвол. биохим. и физиол. - 2008, - Т.44. - N.3. – С. 311-7.
2. Chernigovskaya E., Nikitina L., Dorofeeva N., Glazova M. Effects of selective Bcl-2 inhibitor HA14-1 treatments on functional activity of magnocellular

vasopressinergic neurons of rat hypothalamus. // *Neurosci Lett.* – 2008. – V.437. – N.1. – P.59-64.

Тезисы докладов

1. Черниговская Е.В., Никитина Л.С., Дорофеева Н.А., Романова И.В., Аристакесян Е.А. Участие сигнальных белков апоптоза в регуляции функциональной активности нейронов мозга крыс. // Научные труды 1 Съезда физиологов СНГ. – Дагомыс. – 2005. – Т.2. - С.53.
2. Никитина Л.С., Дорофеева Н.А. Участие сигнальных белков апоптоза в организации цикла сон-бодрствование за счет регуляции функциональной активности нейронов мозга крыс. // Тезисы третьей российской школы-конференции (с международным участием) «Сон-окно в мир бодрствование». - Ростов-на-Дону. - 2005. - С.73-74.
3. Никитина Л.С., Черниговская Е.В., Романова И.В., Дорофеева Н.А., Алтухова И.М., Оганесян Г.А. Влияние ингибиторов белков апоптоза на нейрональную активность вазопрессин- и дофаминергических систем мозга. // Тезисы докладов 13 международного совещания по эволюционной физиологии. - Санкт-Петербург. – 2006. - С.155-156.
4. Никитина Л.С., Дорофеева Н.А., Глазова М.В., Романова И.В., Черниговская Е.В. Участие белков апоптоза в регуляции активности нейронов мозга. // Тезисы 5 международной конференции по функциональной нейроморфологии «Колосовские чтения-2006». - Санкт-Петербург. - 2006.- С. 66.
5. Черниговская Е.В., Никитина Л.С., Дорофеева Н.А., Глазова М.В., Романова И.В. Механизмы регуляции белками апоптоза вазопрессинергических и катехоламинергических нейронов мозга крыс. // Свободные радикалы, антиоксиданты и старение. – Астрахань. – 2006. - С.38-39.
6. EV Chernigovskaya, LS Nikitina, NA Dorofeeva, MV Glazova, I.V.Romanova Participation of apoptotic proteins in regulation of neuronal activity in rat brain. // Abs. 6-th ICN. - Fron. in Neuroendocrinol. - V.27. – N.1. - P.148.
7. Никитина Л.С., Дорофеева Н.А., Глазова М.В., Черниговская Е.В. Регуляция белками апоптоза вазопрессинергических нейронов гипоталамуса // XX съезд физиологического общества имени И.П. Павлова. - Москва. – 2007. - С.67.
8. Черниговская Е.В., Никитина Л.С., Дорофеева Н.А., Глазова М.В. Взаимодействие белков апоптоза Bcl-2 и p53 и ERK1/2 модуля MAPK сигнального каскада в регуляции активности вазопрессинергических нейронов супраоптического ядра // тезисы Всероссийский симпозиум с международным участием "Гормональные механизмы адаптации". - Санкт-Петербург. – 2007. - С.90-91.
9. Никитина Л.С. ERK1/2 модуль MAPK сигнального каскада опосредует влияние сигнальных белков апоптоза Bcl-2 и p53 на секреторную активность вазопрессинергических нейронов супраоптического ядра гипоталамуса // Всероссийский симпозиум с международным участием "Гормональные механизмы адаптации". - Санкт-Петербург. – 2007. - С. 58.

10. Nikitina L., Glazova M., Dorofeeva N., Chernigovskaya E. Inhibition of Bcl-2 and p53 alter the functional activity of hypothalamic magnocellular neurons and affect the MAPK/ERK pathway. // Abstr. of conf. Apoptosis World 2008. From mechanisms to applications. - 2008. - Luxembourg. - P. 413.
11. Никитина Л.С., Глазова М.В., Дорофеева Н.А., Губарева Е.А. Кириллова О.Д., Черниговская Е.В. Внутриклеточные механизмы регуляции активности вазопрессинергических нейронов гипоталамуса в условиях водной депривации. // Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга: Конференция с международным участием. Тезисы докладов. - 2008. - С.-Петербург. - С.101.
12. Губарева Е.А. Никитина Л.С., Дорофеева Н.А., Кириллова О.Д. Глазова М.В., Черниговская Е.В. Влияние Bcl-2 на активность ERK-модуля MAPK каскада в нейронах супраоптического ядра гипоталамуса крыс. // Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга: Конференция с международным участием. Тезисы докладов. - 2008. - С.-Петербург. - С.36-37.
13. Дорофеева Н.А., Никитина Л.С., Глазова М.В., Кириллова О.Д., Черниговская Е.В. Механизмы взаимодействия Bcl-2 и членов ERK1/2 модуля MAPK сигнального каскада в регуляции секреции вазопрессина. // Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга: Конференция с международным участием. Тезисы докладов. - 2008. - С.-Петербург. - С.43-44.
14. Н.А.Дорофеева, Е.А. Губарева, Л.С.Никитина Внутриклеточные механизмы регуляции секреции вазопрессина при дегидратации. // Фундаментальная и клиническая медицина. Одиннадцатая Всероссийская медико-биологическая конференция молодых исследователей «Человек и его здоровье». Тезисы докладов. - СПб – 2008. - С.109-110.
15. Е.А.Губарева, Н.А.Дорофеева, Л.С.Никитина Влияние Bcl-2 на активность ERK модуля MAPK каскада в нейронах супраоптического ядра гипоталамуса крыс. Фундаментальная и клиническая медицина. Одиннадцатая Всероссийская медико-биологическая конференция молодых исследователей «Человек и его здоровье». Тезисы докладов. - СПб – 2008. - С.95-96.
16. L. Nikitina, N. Dorofeeva, M. Glazova, O. Kirillova E. Chernigovskaya Bcl-2 modulates hypothalamic vasopressinergic neurons activity // Abstracts of 4th ESN Conference on Advances in Molecular Mechanisms of Neurological Disorders.- J. Neurochem. – 2009. – P. 91-92.
17. N. Dorofeeva, L. Nikitina, M. Glazova, E. Chernigovskaya Involvement of p53 and ERK1/2 in the regulation of vasopressin secretion // Abstracts of 4th ESN Conference on Advances in Molecular Mechanisms of Neurological Disorders.- J. Neurochem.-110 (Suppl. 1) – 2009. – P. 93.