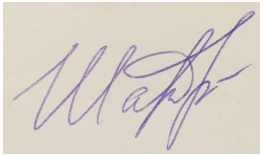
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования

«ЮЖНЫЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

АКАДЕМИЯ БИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ

ИМ. Д. И. ИВАНОВСКОГО

На правах рукописи



Шарифулина Светлана Анатольевна

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ РЕАКЦИЙ НЕРВНОЙ ТКАНИ НА ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ

Специальность: 03.01.02 – Биофизика

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор
А. Б. Узденский

Ростов-на-Дону – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ТЕРМИНОВ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ……..4

ВВЕДЕНИЕ……..……..…..5

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ РЕАКЦИЙ НЕРВНОЙ ТКАНИ НА ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ…… ……11

1.1 Фотодинамический эффект и окислительный стресс……..……11

1.2 Виды клеточной смерти……..17

1.3 Основные эпигенетические механизмы……30

1.3.1 Механизм метилирования ДНК……...……34

1.3.2 Модификации гистонов……...……..…36

1.4 Эпигенетические процессы при фотодинамическом воздействии……..…41

1.5 Белок p53. Ацетилирование p53……45

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....50

2.1 Объекты исследования.....50

2.2 Регистрация импульсной активности механорецепторного нейрона.....52

2.3 Фармакологическая модификация.....54

2.4 Фотодинамическое воздействие.....56

2.5 Флуоресцентно-микроскопическое исследование.....60

2.6 Протеомное исследование ФД-индуцированных эпигенетических изменений в нервной ткани.....62

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....69

3.1 Инактивация и смерть механорецепторного нейрона речного рака и окружающих его глиальных клеток при фотодинамическом воздействии...69

3.2 Роль метилирования ДНК и деацетилирования гистонов в ФД-индуцированной инактивации и смерти механорецепторного нейрона речного рака и окружающих его глиальных клеток ……..…70

3.3 Роль деацетилирования гистонов в ФД-индуцированной инактивации и смерти механорецепторного нейрона речного рака и окружающих его глиальных клеток …….……..…73

3.4 Участие белка p53 в ФД-индуцированной инактивации и смерти механорецепторного нейрона речного рака и окружающих его глиальных клеток …….…….…….……77

3.5 Изменения в экспрессии белков, участвующих в эпигенетической регуляции в брюшной нервной цепочке речного рака при ФД-воздействии……..83

3.6 Изменения в экспрессии белков, участвующих в эпигенетической регуляции в коре головного мозга мыши при ФД-воздействии……..…..87

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ……90

ЗАКЛЮЧЕНИЕ……104

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ……106

ВЫВОДЫ…….108

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ……110

СПИСОК ТЕРМИНОВ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

ФДТ – фотодинамическая терапия

ФД – фотодинамический

МРН – механорецепторный нейрон

РРР – рецептор растяжения рака

ГК – глиальные клетки

ПД – потенциал действия

БЦН – брюшная нервная цепочка

ФС – Фотосенс

ALA – 5-Аминолевулиновой кислоты гидрохлорид

ПИ – пропидиум-иодид

Cy3™ – активный краситель, максимум флуоресценции 532 нм

Cy5™ – активный краситель, максимум флуоресценции 635 нм

NF-κB – ядерный фактор «каппа-би»

Hsp70.1 – белок теплового шока 70.1

АФК – активные формы кислорода

ATG - белок аутофагии

ATG5 – белок аутофагии 5

FIP200 – белок семейства FAK, взаимодействующий с киназами

Ub – убиквитин

VPS - вакуолярный сортировочный белок

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Фотодинамическая терапия (ФДТ) основана на фотоиндуцированной генерации цитотоксического синглетного кислорода и других активных форм кислорода, последующем окислительном стрессе и смерти клеток, окрашенных фотосенсибилизаторами и подвергающихся интенсивному освещению в присутствии кислорода. ФДТ используется для разрушения раковых клеток, включая опухоли головного мозга [Madsen et al, 2006; Kostron, 2010; Agostinis et al., 2011]. Но в последнем случае повреждаются не только злокачественные, но и окружающие их здоровые нейроны и глиальные клетки, что приводит к побочным эффектам и неврологическим расстройствам. Поэтому механизмы регуляции устойчивости нормальной нервной ткани к фотодинамическому (ФД) воздействию должны быть тщательно изучены. Исследование данного вопроса помогло бы оптимизировать режимы фотодинамической терапии при клиническом применении и разработать способы защиты здоровых нервных и глиальных клеток от ФД повреждения.

Реакции клеток на различные воздействия, включая ФДТ и их смерть, регулируются сложной системой внутриклеточной сигнализации, состоящей из тысяч белков [Buytaert et al., 2007; Узденский, 2010]. Если регуляторного потенциала имеющихся белков, недостаточно, то в клетке стимулируется дополнительный белковый синтез. Экспрессия генов контролируется факторами транскрипции и эпигенетическими регуляторами активности генома, такими как метилирование ДНК и ковалентные модификации гистонов, включающие их метилирование, ацетилирование и фосфорилирование. При этом факторы транскрипции, например, белок p53, могут быть вовлечены в эпигенетическую регуляцию [Gaub et al., 2010; Botcheva, 2014; Mishra et al., 2015]. Эпигенетические

модификации регулируют доступ факторов транскрипции и РНК-полимеразы II к генным промоторам. Показано, что метилирование ДНК и модификации гистонов участвуют в синаптической пластичности, формировании памяти [Sultan and Day, 2011], неврологических расстройствах, таких как болезни Альцгеймера, Паркинсона и Хантингтона [Zawia et al., 2009; Gebicke-Haerter, 2012], эпилепсия [Hwang et al., 2013], шизофрения [Harrison and Dexter, 2013], стресс [Stankiewicz et al., 2013], инсульт [Hwang et al., 2013].

Эпигенетические процессы – «надбиохимический» механизм регуляции разнообразных клеточных процессов, включая устойчивость клеток к фотодинамическому повреждению. Но пока участие эпигенетических процессов в нейродегенерации мало изучено. Влияние ФДТ на эпигенетические процессы в клетках и роль эпигенетических процессов в реакциях клеток на ФД воздействие также практически не изучено [Wachowska et al., 2014]. Поэтому исследование роли эпигенетических процессов в реакциях нервных и глиальных клеток на ФД воздействие является актуальной задачей молекулярной фотобиологии, решение которой позволит улучшить эффективность ФДТ и минимизировать повреждение здоровой нервной ткани при ФД воздействии.

В данной работе изучались эпигенетические механизмы регуляции реакций нервной ткани на ФД воздействие на биологические объекты разного уровня организации (нейроны и глиальные клетки речного рака, брюшная нервная цепочка речного рака, кора головного мозга мыши). Изолированный рецептор растяжения рака, состоящий из одиночного механорецепторного нейрона и окружающих его глиальных клеток, является простым, но информативным объектом для изучения роли эпигенетических процессов во взаимодействующих нейронах и клетках глии. Для проведения протеомного анализа, который позволяет одновременно изучать экспрессию десятков и сотен белков, массы этих клеток недостаточно. Поэтому такие исследования мы проводили на двух объектах разного уровня организации – брюшной нервной цепочке рака и коре головного мозга мыши.

Изучение эпигенетических механизмов реакции нервной ткани на ФДТ может рассматриваться как одна из актуальных задач современной экспериментальной молекулярной нейробиологии.

Цель и задачи исследования

Целью работы является изучение эпигенетических механизмов регуляции реакций нервной ткани на фотодинамическое воздействие на биологические объекты разного уровня организации (нейроны и глиальные клетки речного рака, брюшная нервная цепочка речного рака, кора головного мозга мыши).

Задачи работы:

1) исследование роли процессов метилирования ДНК и деацетилирования гистонов в фотоиндуцированной инактивации и смерти механорецепторного нейрона речного рака и окружающих его глиальных клеток;

2) изучение участия белка p53 в фотоиндуцированной инактивации и смерти механорецепторного нейрона речного рака и окружающих его глиальных клеток;

3) изучение изменений в экспрессии белков, участвующих в эпигенетической регуляции в брюшной нервной цепочке речного рака, вызванные фотодинамическим воздействием;

4) изучение изменений в экспрессии белков, участвующих в эпигенетической регуляции в коре головного мозга мыши, вызванные фотодинамическим воздействием;

5) выявление белков, участвующих в эпигенетической регуляции ответа нервной ткани разного уровня организации (изолированные нейроны и глиальные клетки, нервные цепочки речного рака, кора головного мозга мыши) на фотодинамическое воздействие.

Научная новизна

Впервые показано, что метилирование ДНК участвует в фотоиндуцированном некрозе глиальных клеток, но не нейронов речного рака. Деацетилирование гистонов участвует в некрозе и апоптозе глии, но не нейронов речного рака при фотодинамическом воздействии. Показано, что белок p53 участвует в апоптозе глиальных клеток речного рака, вызванном фотодинамическим воздействием. Впервые изучены фотоиндуцированные изменения уровня экспрессии эпигенетических белков в брюшной нервной цепочке речного рака и коре головного мозга мыши. Показано, что при фотодинамическом воздействии изменяется уровень экспрессии эпигенетических белков, регулирующих транскрипцию, ядерный импорт, апоптоз, модификации гистонов, пролиферацию и выживаемость клеток в брюшной нервной цепочке речного рака и коре головного мозга мыши. Выявлено, что изменения уровня эпигенетических белков зависят от временного интервала после фотодинамического воздействия и являются ткане- и видоспецифическими.

Научно-теоретическая и практическая значимость результатов исследования

Полученные результаты об участии эпигенетических механизмов, таких как деацетилирование гистонов и метилирование ДНК, в реакции нервной ткани на ФД воздействие могут быть использованы при разработке селективных способов ФДТ опухолей мозга. Полученные результаты об изменении уровня экспрессии белков, вовлеченных в эпигенетическую регуляцию нервной ткани при ФДТ, могут указать потенциальные белковые маркеры фотоокислительного повреждения нервной ткани и мишени для возможного терапевтического воздействия. Используя ингибиторы или активаторы эпигенетических белков, можно будет, в принципе, усилить фотоповреждение перерожденных клеток и защитить окружающую здоровую ткань.

Результаты работы использованы при выполнении исследований по грантам РФФИ № 08-04-01322, 11-04-01476, 14-04-00741, а также в учебном процессе в спецкурсах по фотобиологии и фотомедицине на кафедре биофизики и биокибернетики физического факультета Южного федерального университета.

Личный вклад автора

Автор лично участвовал в проведении всех экспериментальных исследований, обработке полученных и изложенных в диссертации результатов, их анализе, обсуждении, а также совместно с соавторами участвовал в написании научных статей и апробации результатов исследования на семинарах, конференциях и симпозиумах.

Достоверность научных результатов

Достоверность научных результатов подтверждается воспроизводимостью экспериментальных данных и обусловлена апробацией и надежностью использованных методов исследования, а также согласованностью с результатами независимых исследований других авторов.

Апробация диссертационной работы

Материалы диссертации представлены на всероссийских и международных конференциях: V съезд биофизиков России (Ростов-на-Дону, 2015), IBRO - 9th World Congress International Brain Research Organization, (Brazil, 2015), EMBO/EMBL Symposium Mechanisms of Neurodegeneration, (Germany, 2015), 16th Congress of the European Society for Photobiology, (Portugal, 2015), XII European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, (Bilbao, Spain, 2015), международной конференции Twelfth International Conference on Neuroprotective Agents. The Boar's Head Inn, (Charlottesville, Virginia, USA, 2014), Международном симпозиуме Оптика и биофотоника (Саратов 2014), VII съезде Российского фотобиологического общества (Пос. Шепси, 2014), Международном симпозиуме:

Glia as a target for the treatment of neurodenerative diseases (Нижний Новгород, 2014), V Международной научно-практической конференции: Актуальные проблемы биологии, нанотехнологии и медицины (Ростов-на-Дону, 2013), 15th Congress of the European Society for Photobiology (Belgium, 2013), 38th FEBS Congress: Mechanisms in biology (Санкт-Петербург, 2013), Международной конференции: Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. (Пущино, 2013), научно-практической конференции: Миссия молодежи в науке (Ростов-на-Дону, 2012), XVI Международной конференции по нейрокибернетике (Ростов-на-Дону, 2012), конференции для молодых ученых: Актуальные вопросы биомедицинской инженерии (Ростов-на-Дону, 2012).

На защиту выносятся следующие положения:

1. Метилирование ДНК участвует в некрозе глии, но не нейронов при фотодинамическом воздействии.
2. Деацетилирование гистонов участвует в некрозе и апоптозе глии, но не нейронов при фотодинамическом воздействии.
3. Белок p53 участвует в апоптозе глиальных клеток, вызванном фотодинамическим воздействием.
4. Фотодинамическое воздействие изменяет уровень экспрессии эпигенетических белков, регулирующих транскрипцию, ядерный импорт, апоптоз, модификации гистонов, пролиферацию и выживаемость клеток в брюшной нервной цепочке речного рака и коре головного мозга мыши.
5. Изменения уровня эпигенетических белков зависят от временного интервала после фотодинамического воздействия и являются ткане- и видоспецифическими.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертационной работы имеется 24 публикации: статьи и тезисы российских и международных конференций, 7 из них - в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ РЕАКЦИЙ НЕРВНОЙ ТКАНИ НА ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ

1.1 Фотодинамический эффект и окислительный стресс

Окислительный стресс – центральный механизм повреждения клеток при различных патологических процессах, включая радиационные поражения, инсульты, ишемию, канцерогенез, нейродегенеративные заболевания и т.д. [Chong et al., 2005; Дубинина, 2006]. Одним из мощных индукторов окислительного стресса является фотодинамическое (ФД) воздействие, при котором облучение светом окрашенных клеток в присутствии кислорода вызывает интенсивную генерацию высокотоксичного синглетного кислорода [Узденский, 2010; Almerie et al., 2015]. Фотодинамическая терапия применяется в онкологии для разрушения опухолей [Brown et al., 2004], включая опухоли мозга [Madsen et al., 2006; Kostron, 2010]. Для повышения эффективности и селективности ФД повреждения опухолевой ткани и одновременной защиты окружающих нормальных клеток необходимо найти специфические звенья в клетках, модификация которых помогла бы решить эти противоположные задачи. Поэтому всестороннее изучение фотодинамических процессов на клеточном и молекулярном уровне является актуальной задачей.

Фотохимические превращения молекул, обусловленные поглощенным светом, происходят в электронно-возбужденном состоянии. Поглощая квант света, молекулы переходят на более высокие энергетические уровни: сначала на синглетные уровни со временем жизни порядка 10^{-8}-10^{9} с, далее они могут перейти в долгоживущие триплетные состояния со временем жизни (10^{-4}-10^{2} с), в

результате чего становятся более активными [Владимиров и Потапенко, 2006; Узденский, 2010].

Возбужденные светом молекулы вступают в реакции двух типов. В окислительно-восстановительные реакции первого типа происходит перенос электронов или протонов с образованием промежуточных радикальных продуктов, которые после взаимодействуют с кислородом. В реакциях второго типа молекулы реагируют с кислородом в первую очередь, переводя его в высокоактивную синглетную форму, окисляющую впоследствии биомолекулы [Girotti, 1990]. В реакциях и первого, и второго типа молекулы красителей (фотосенсибилизаторов) повышают чувствительность клеток к световому воздействию, что проявляется как в явлениях биостимуляции, так и в повреждении биоструктур. Ни свет, ни краситель по отдельности не являются фототоксичными. Совместное действие фотосенсибилизатора, света и кислорода и вызывает фотодинамический эффект [Алексеев и др., 2004].

После поглощения фотона *hv* молекула фотосенсибилизатора возбуждается и переходит из основного состояния S в синглетное $^{1}S^{*}$, далее в возбужденное триплетное состояние $^{3}T^{*}$. ФД эффект первого типа можно представить следующими реакциями [Girotti, 2001; Красновский, 2006; Узденский, 2010]:

$$S + hv \rightarrow {}^{1}S^{*} \rightarrow {}^{3}T^{*},$$

далее происходит перенос электронов на субстрат R:

$${}^{3}T^{*} + R \rightarrow S^{\bullet -} + R^{\bullet +},$$

$${}^{3}T^{*} + R \rightarrow S^{\bullet +} + R^{\bullet -}$$

или перенос протонов:

$${}^{3}T^{*}\ H + R \rightarrow S^{\bullet} + RH^{\bullet},$$

$$^{3}T^{*} + R\,H \rightarrow S^{\bullet}H + R^{\bullet}$$

Далее радикалы участвуют в различных реакциях, а в присутствие кислорода они могут инициировать цепное перекисное окисление, которому особенно подвержены ненасыщенные липиды в мембранах:

$$R^{\bullet} + O_2 \rightarrow ROO^{\bullet},$$

$$ROO^{\bullet} + R_1\,H \rightarrow RH + R_1OO^{\bullet}$$

и образование супероксида-аниона и других активных форм кислорода:

$$R^{\bullet -} + O_2 \rightarrow R + O_2^{\bullet -}$$

$$O_2^{\bullet -} + H^{+} \rightarrow HO_2^{\bullet}$$

$$HO_2^{\bullet} + O_2^{\bullet -} + H^{+} \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

В ФД реакциях второго типа сначала происходит перенос энергии от фотовозбужденного красителя на кислород, что переводит кислород в высокоактивное синглетное состояние $^{1}O_2$, а затем синглетный кислород окисляет субстраты в клетках:

$$S + h\nu \rightarrow {}^{1}S^{*} \rightarrow {}^{3}T^{*},$$

$$^{3}T^{*} + O_2 \rightarrow S + {}^{1}O_2,$$

$$^{1}O_2 + RH \rightarrow ROOH$$

и далее запускается цепь перекисных процессов [Узденский, 2010].

$^1O_2$ может повреждать только биоструктуры, находящиеся в непосредственной близости от молекул фотосенсибилизаторов. Поэтому ФД повреждение клетки во многом определяется внутриклеточной локализацией фотосенсибилизатора.

Окислительная способность синглетного кислорода на два порядка выше чем обычного кислорода [Владимиров, Потапенко, 2006]. В белках легче всего фотоокисляются цистеин, гистидин, тирозин, триптофан и фенилаланин. Они играют одну из ключевых ролей в ферментативной активности, поэтому белки так чувствительны к ФД воздействию. Активность теряется вследствие структурного нарушения внутренних сшивок или межмолекулярных сшивок с другими белками, липидами, РНК, ДНК [Girotti, 2001; Узденский, 2010].

В ФД реакциях первого типа радикальные пары, которые появляются при переносе электронов, достаточно стабильны в среде с высокой диэлектрической проницаемостью, где обратный перенос электронов весьма затруднен (в водных растворах). А в липидных средах, которые являются неполярными, растворимость, также как и время жизни $^1O_2$, значительно больше. Это предполагает, что гораздо легче реакции первого типа должны протекать в цитозоле, а ФД реакции второго типа - в липидной фазе биомембран. Это означает, что при использовании гидрофильных фотосенсибилизаторов ФД реакции в основном будут протекать по первому типу, а по второму – при использовании гидрофобных фотосенсибилизаторов.

Однако ФД реакции второго типа намного эффективнее ФД реакций первого типа даже в водной среде из-за гораздо большего коэффициента диффузии $^1O_2$ и более высоким скоростей реакций. Этим объясняется почему большинство фотосенсибилизаторов повреждают биоструктуры именно посредством реакций второго типа. ФД воздействие достаточно быстро снижает уровень кислорода в ткани, то со временем должен уменьшаться вклад реакции второго типа и увеличиваться - первого типа [Ochsner, 1997; Узденский, 2010].

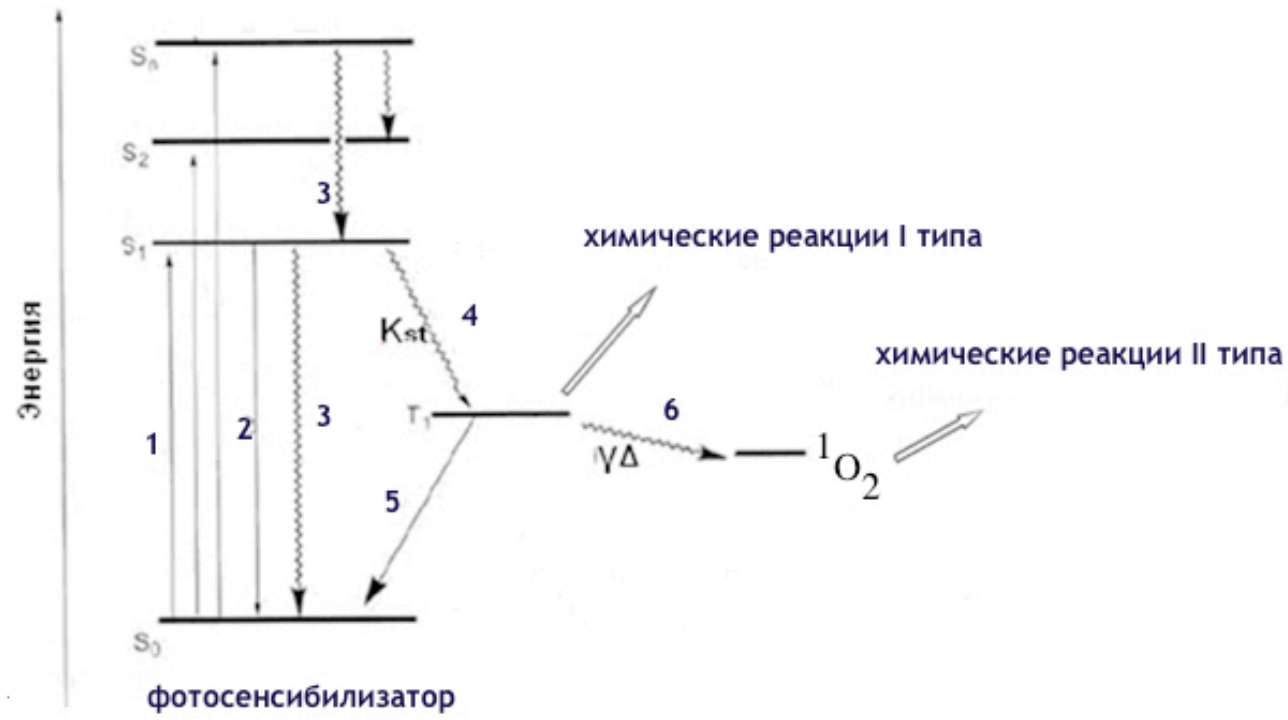


Рисунок 1. Общая схема электронных переходов возбужденных фотосенсибилизаторов и образования синглетного кислорода

1 – поглощение; 2 – флуоресценция; 3 – внутренняя конверсия; 4 – интеркомбинационная конверсия; 5 – фосфоресценция; 6 – переход триплетного кислорода $^3O_2$ *в синглетный кислород* $^1O_2$. K_{st} *– константа синглет-триплетного перехода,* γ_Δ *– квантовый выход генерации синглетного кислорода [адаптировано по Pushpan et al., 2002]*

Основное различие между фотореакциями 1го и 2го типа состоит в разном вкладе синглетного кислорода в эти фотопроцессы. Действительно, в фотореакциях первого типа его роль несущественна. Реакции второго типа, наоборот, определяются преимущественно активностью $^1O_2$. В реальных химических и биологических системах, как правило, оба механизма действуют одновременно, и их относительный вклад сильно зависит от концентрации кислорода, концентрации и природы окисляемых реагентов, природы фотосенсибилизаторов и многих других факторов, причем относительный вклад механизмов первого или второго типа может изменяться в ходе фотохимического процесса [Красновский, 2006; Узденский, 2010].

Синглетный кислород играет основную роль в ФДТ, разрывая атомарные связи с другими атомами, входящими в состав молекулы, и начиная поступательное движение, за время около 1 мкс продвигается на расстояние не более 50 А [Толстых и др., 2002]. При этом происходит разрыв цепочки молекулы, ее разрушение с образованием свободных радикалов и повреждением клеточных мембран, происходящих в течение нескольких минут после начала облучения лазером [Moan et al., 1979, 1981, 1983; Specht et al., 1990; Гейниц и др., 2007].

При поглощении кванта света молекула фотосенсибилизатора, переходя в синглетное и в более долгоживущее триплетное состояние, вызывает резонанс, усиливающий ФД реакцию, либо же находящаяся в триплетном состоянии молекула ФС передает энергию молекуле кислорода, переводя ее в синглетное состояние [Гейниц и др., 2007]. Возбужденные молекулы кислорода и ФС возвращаются в исходное состояние и способны вступать в химические реакции. Весь цикл может быть запущен заново после поступления нового кванта световой энергии. После нескольких циклов ФС может фотодеградировать – «выгорать», т. е. теряет способность участвовать в фотодинамической реакции. Этот эффект называется фотобличингом [McCaughan, 1999; Гейниц и др., 2007].

Таким образом, при фотодинамическом эффекте интенсивная генерация радикальных активных форм кислорода ($O_2^{\bullet -}$, $HO_2^{\bullet}$, H_2O_2 и др.) или синглетного кислорода ($^1O_2$) приводит к окислению и повреждению белков, перекисному окислению липидов клеточных мембран, нарушению клеточных функций, развитию окислительного стресса и, как следствие, к клеточной гибели [Dean et al., 1997; Dröge, 2002; Узденский, 2010].

1.2 Виды клеточной смерти

Согласно современной классификации выделяются три основных типа клеточной смерти : некроз, апоптоз и аутофагия [Golstein и Kroemer, 2006; Melo-Lima et al., 2014].

Некроз

Термин «некроз» был использован более чем столетие назад, чтобы описать все виды патологической или неконтролируемой гибели клеток. Участие лизосомальных ферментов в некрозе клеток впервые предположил де Дуве, полагая, что лизосомальные гидролитические ферменты неизбежно вызывают некротическую гибель клеток при попадании их в цитозоль [de Duve, 1959].

Для некротической смерти клетки характерны следующие ее морфологические изменения: денатурация и агрегация цитоплазматических белков, конденсация хроматина в ядре, сопутствующее ему уменьшение объема ядра, разрыв ядра на мельчайшие базофильные частицы (кариорексис) или лизис в результате действия лизосомальной дезоксирибонуклеазы, гомогенная цитоплазама, разрушение клеточных органелл, набухание митохондрий, разрушение мембран органелл, вызывающее вакуолизацию цитоплазмы, аутолизис - переваривание клетки ферментами, которые высвобождаются из собственных лизосом (рисунок 2) [Артюхов и Башарина, 2012].

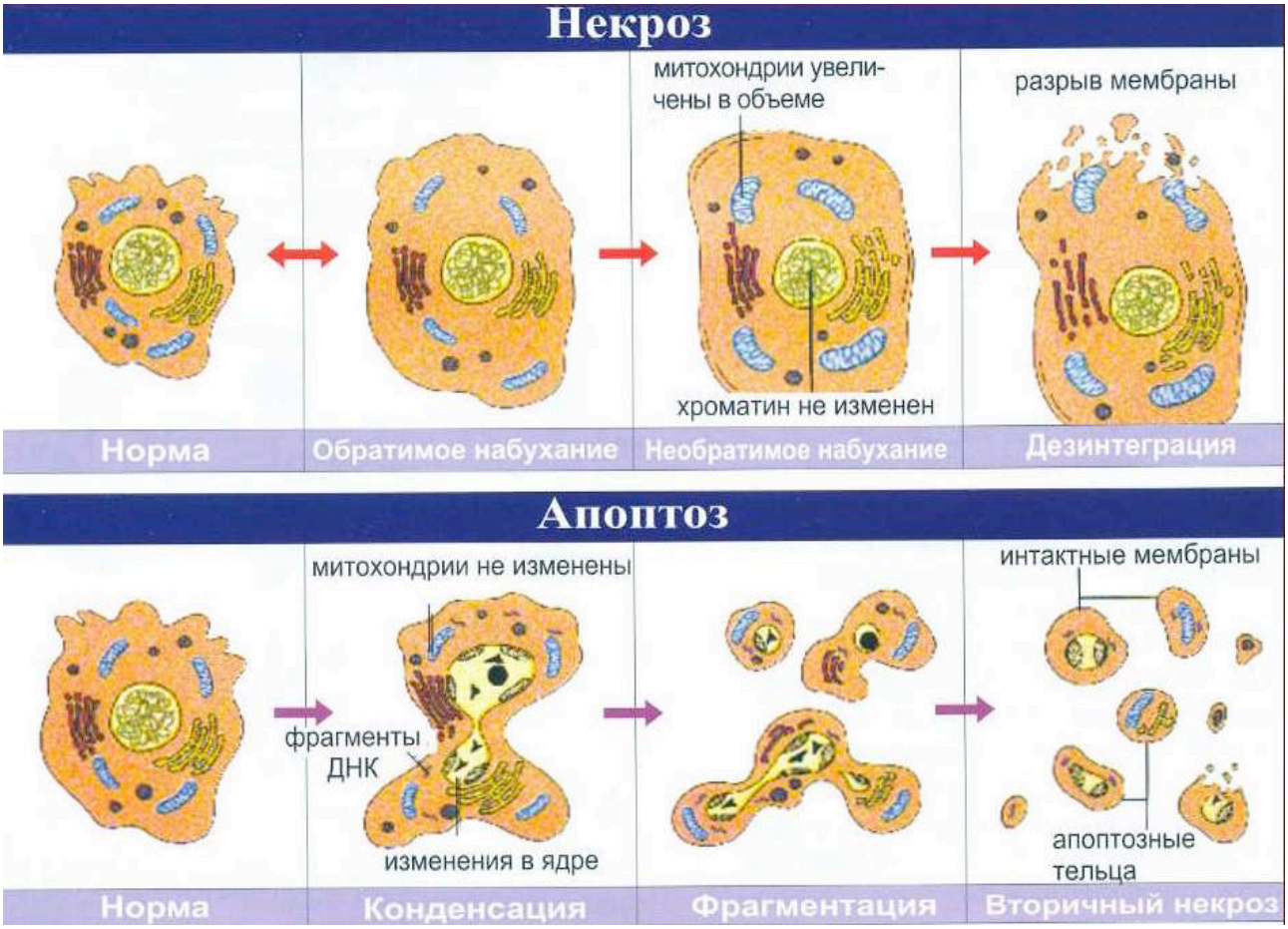


Рисунок 2. Последовательность морфологических изменений при некрозе и апоптозе

[адаптировано по *http://bigslide.ru/medicina/10491-mehanizmi-kletochnoy-smerti.html*]

Некроз является конечным результатом биоэнергетической катастрофы, в результате истощения АТФ до уровня, несовместимого с выживанием клеток. [Xu и Zhang, 2011]. "Запрограммированный некроз" носит название некроптоза. [Christofferson и Yuan, 2010]. Некроптоз задействует сигнальные пути с участием протеинкиназ 1 и 3 (RIP1 и RIP3), MLKL и фосфоглицерат мутазы 5 (PGAM5), служит программой резервного копирования клеточной смерти, когда апоптоз подавляется, и играет ключевую роль в регуляции различных физиологических процессов и патогенеза заболеваний человека, таких как ишемического повреждения головного мозга, нарушениями иммунной системы и рак [Zhang и Liu, 2013].

Апоптоз

Апоптоз является клеточным механизмом запрограммированного самоубийства клетки, регулирующийся эволюционно консервативной генетической программой, в которой участвует комплекс белков клетки, способный как усилить, так и затормозить/заблокировать апоптоз [Kerr et al., 1972]. Основные процессы разрушения в клетке при апоптозе протекают сначала в клеточном ядре, при этом клеточные органеллы остаются достаточно сохранными (рисунок 2). Наиболее характерные апоптотические процессы: межнуклеосомная фрагментация ДНК, конденсация хроматина, сжатие и фрагментация клеточного ядра, «пузырение» поверхностной мембраны. Далее происходит фрагментация клетки на мембранные везикулы с внутриклеточным содержимым – апоптозные тельца, которые фагицитируются в последствии фибробластами, лейкоцитами, эпителиоцитами и другими соседними клетками [Узденский, 2010; Артюхов и Башарина, 2012].

Критическим шагом в запрограммированной гибели клеток является активация каспаз-эффекторов (каспазы 3, 6, 7) каспазой инициатором (каспазы 8, 9 и 10) [Riedl и Salvesen, 2007]. В клетках млекопитающих, инициирование каспазы-эффектора регулируется двумя различными белковыми каскадами: митохондриальный путь и внешний путь [Ashkenasi и Dixi, 1988].

Митохондриальный путь объединяет ряд сигналов, таких как окислительно-восстановительные реакции [Franklin, 2011], повреждение ДНК [Sperka et al., 2012], ER стресс [Puthalakath et al., 2007] и угнетение фактора роста [Deckwerthet al., 1998; Bredesen et al., 2005], или активация про-нейротрофином p75NTR рецептора [Nykjaer et al., 2005]. Этот путь связан с активацией белка *p53* и повышением экспрессии генов, которые кодируют проапоптозные белки – Bax, Bat, Bit, приводящие к пермеабилизации мембраны митохондрии и способствуют выходу цитохрома С из митохондрий, который активирует каспазу-инициатора 9 с помощью APAF1 [Riedl и Salvesen, 2007; Youle и Strasser, 2008], дальнейшей гибели клетки [Green и Reed, 1998] (рисунок 3).

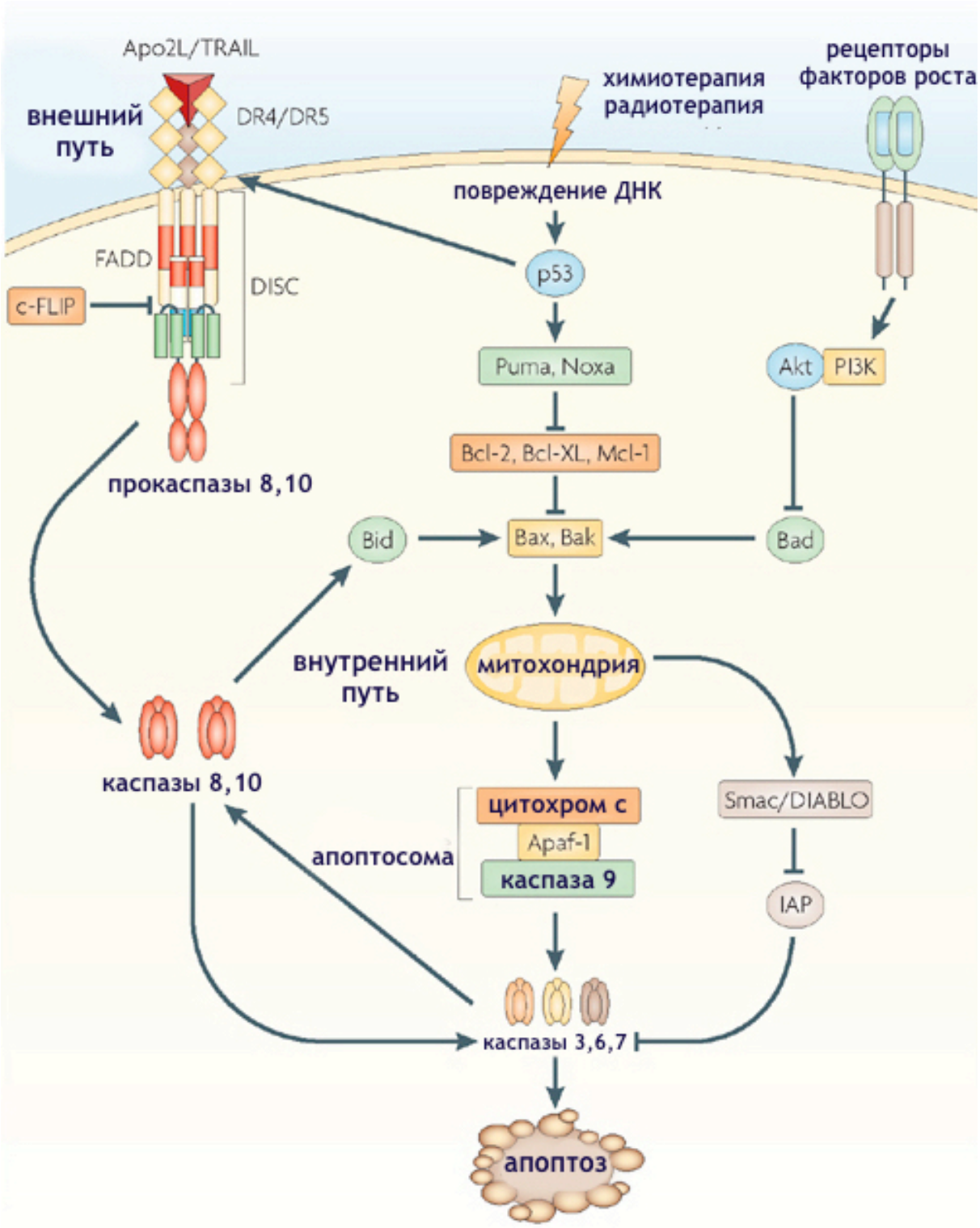


Рисунок 3. Внешний и внутренний пути апоптоза

[адаптировано по Ashkenazi, 2008]

Внешний путь ведет от активизации лиганд-связанных рецепторов смерти (например, Fas / CD95 и TNFR) к каспазам - инициаторам 8 и 10, через формирование сигнального комплекса, вызывающего смерть DISC [Peter и Krammer, 2003]. Вместе с дополнительными регуляторными элементами, в том числе ингибиторами апоптозных белков IAP и cFLIP [Vaux и Silke, 2005], формируется баланс, который определяет склонность клетки к апоптозу.

Внешний путь инициации апоптоза активируется и при нарушении проницаемости ионотропных рецепторов, которые участвуют в регуляции содержания натрия, калия, кальция, хлора во вне- и внутриклеточном пространстве [Голубев и др., 2006]. Этот процесс сопровождается повышенным входом кальция в клетку, активацией протеаз и разрушением структур клетки, увеличением перекисного окисления липидов и окислительным стрессом [Fulda et al., 2001].

Белки семейства Bcl-2 и каспазы играют важную роль в активации, передаче сигнала и запуске апоптоза [Li и Yuan; 2008]. Наиболее близкие к Bcl-2 белки обеспечивают выживание клеток путем ингибирования активации каспаз. Более дальние - способствуют апоптозу. Белки Bc1-2 семейства регулируют апоптоз на уровне митохондрий. Предотвращающие апоптоз представители этого большого семейства включают Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w, A1, Boo; проапоптозные белки - Bax, Bad, Bok, Bcl-xS, Bak, Bid, Bik, Bim, Krk и Mtd. Так, Bax при инициирующих апоптоз сигналах направляется в мембраны митохондрий, где взаимодействует с интегральным белком наружной митохондриальной мембраны VDAC и стимулирует открытие канала, через который происходит высвобождение цитохрома С. Также, Bax образует гетеромерные комплексы с Bcl2, Bcl-x, что может способствовать открытию до этого закрытых каналов [Chao et al., 1998]. Bcl-2 защищает от митохондриального повреждения. Ингибирование Bcl-2 миметического домена BH3, который является ключевым доменом белок-белок взаимодействия, участвующим в функционировании Bcl-2, приводит к активации апоптоза [Danial, 2004].

Такие стимулы апоптоза, как экспрессия Bax или воздействие фактора некроза опухоли (TNF) или Fas-лиганда (FasL), приводят к гибели клетки, даже в присутствии неспецифических ингибиторов каспаз, таких как zVAD-fmk (бензилоксикарбонил-Val-Ala-Asp (OMe)-флуорометилкетон), или антиапоптотических молекулы, таких как Bcl-XL [Jaattela и Tschopp, 2003; Lockshin и Zakeri, 2004]. В этих условиях клетки, которые, как правило, умирают путем апоптоза, проявляют все признаки некроза.

Для реализации апоптоза необходимы целостность плазматической мембраны и достаточный уровень АТФ. Это решающие факторы, определяющие программу клеточной смерти. Если не повреждена мембрана и уровень АТФ достаточно высок, то клетки погибают от апоптоза, если нет – некроза [Dellinger, 1997; Узденский, 2010].

В настоящее время, однако, широко признано, что апоптоз и некроз часто могут быть инициированы в ответ на одни и те же виды воздействия в зависимости от различной степени воздействия [Zong и Thompson 2006; Yamashima, 2012].

Аутофагия

Аутофагия является процессом деградации внутренних компонентов клетки, поглощенных лизосомами. Аутофагия может быть вызвана различными изменениями условий окружающей среды, в том числе голоданием клетки, гипоксией, окислительным стрессом.

В настоящее время определены три типа аутофагии: классическая аутофагия (макроаутофагия), при которой мембранная везикула формируются вокруг компонентов цитозоля и сливается с лизосомами (рисунок 4); шаперон-опосредованная аутофагия, нацеленная на определенную группу белков, содержащих пентапептид KFERQ, при этом не требуется формирование везикул, потому что все субстраты образовывают комплекс с белком теплового шока 70, и микроаутофагию, при которой лизосомы окружают белки-мишени или органеллы [Dunn, 1990; Majeski и Dice, 2004; Kesidou, 2013].

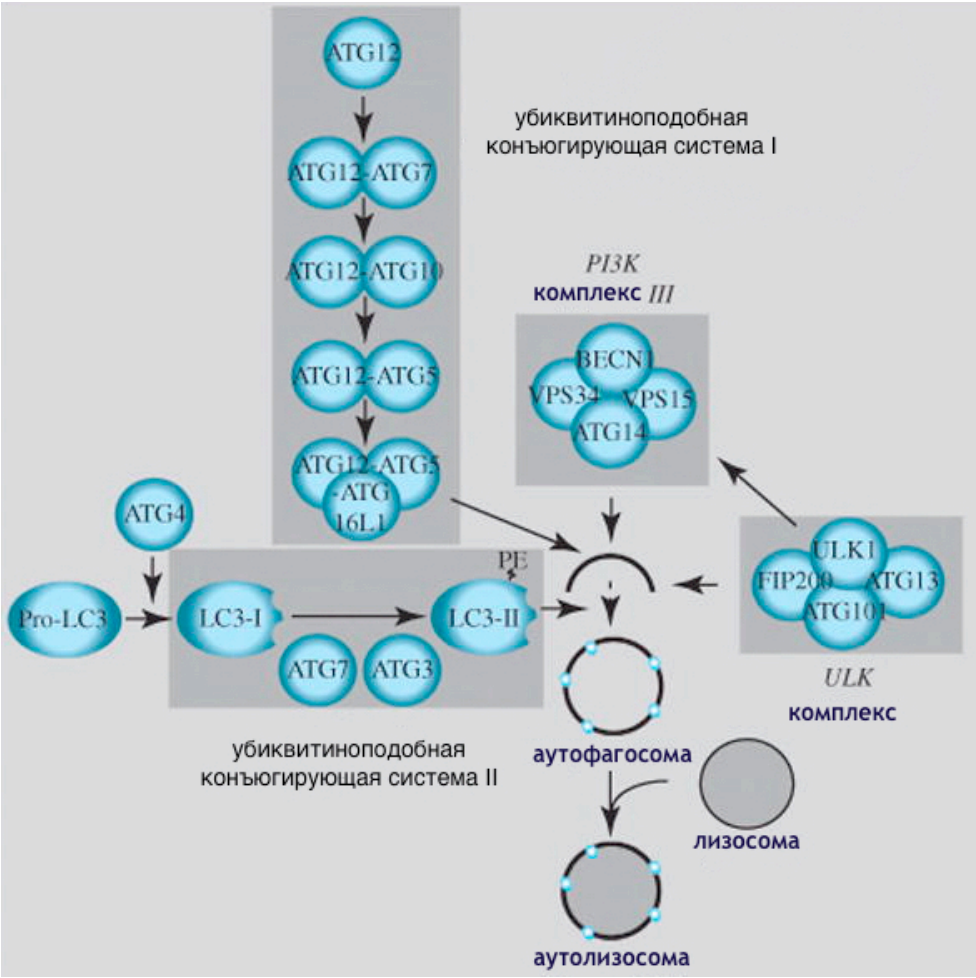


Рисунок 4. Классическая аутофагия млекопитающих

Комплекс ULK и PI3K комплекс III инициируют аутофагию. При активации аутофагии LC3-I соединяется с PE посредством двух убиквитиноподобных конъюгирующих систем. Аутофагосома сливается с лизосомой, превращаясь в аутолизосому, для ликвидации содержимого. ATG - белок аутофагии, FIP200 – белок семейства FAK, взаимодействующий с киназами, Ub – убиквитин, VPS - вакуолярный сортировочный белок. [адаптировано по Lindqvist et al., 2015]

Как и апоптоз, аутофагия – эволюционно-консервативный процесс. При нормальных условиях, аутофагия и апоптоз становятся неактивными путем ингибирования друг друга [González-Polo, 2005]. Atg5, транскрипционный фактор p53 и белки семейства Bcl-2 играют важную роль в балансе между апоптозом и аутофагией [Kesidou, 2013].

Смерть нейронов и глиальных клеток при ФД воздействии

В зависимости от интенсивности и степени воздействия ФД повреждение может вызывать как некроз, так и апоптоз клетки, при этом ключевую роль играет то, какие именно клеточные структуры повреждаются в первую очередь. С медицинской точки зрения наиболее подходящим является режим, при котором происходит разрушение митохондрий, т.к. именно такое воздействие вызывает апоптоз [Morgan, 2001; Узденский, 2010].

Основным типом смерти клеток при ФД воздействии является некроз. Активные формы кислорода (АФК) вызывают окисление линолевой и арахидоновой кислот. Однако молекулярные механизмы повреждения мембраны лизосом, включая механизм участия в этом процессе биохимического каскада μ-калпаина и АФК взаимодействий, до сих пор плохо изучены. Независимые исследования показали возможное участие в таком нарушении белка теплового шока 70,1 (Hsp70.1 или Hsp70, который также называется Hsp72 или HSPA1), который является основным белком семейства Hsp70. Hsp70.1 играет цитопротекторную роль в сохранении целостности мембраны лизосом, участвуя в процессе деградации сфингомиелина или поддержания правильного сворачивания белка. Тем не менее, калпаин-опосредованное расщепление белка Hsp70.1, карбонилированного в результате окислительного стресса, может вызвать разрыв лизосом. Кроме того, дисфункция Hsp70.1 активирует NF-kB-сигналинг, который способствует нейродегенерации [Yamashima, 2012].

Механизм ФД повреждения нейронных и глиальных клеток определяется внутриклеточной локализацией фотосенсибилизатора, это связано с диффузией синглетного кислорода в фотосенсибилизированных клетках. Повреждение

мембран приводит к нарушению ионного гомеостаза, а также функций внутриклеточных органелл. Происходит высвобождение Ca2+ из ФД-поврежденных митохондрий, что инициирует различные процессы в клетке, а также осуществляет их регуляцию, запускает некроз или апоптоз.

Важную роль в выживаемости и смерти нейронов и ГК играют межклеточные и внутриклеточные сигнальные процессы. Их участие в ФД–индуцированной смерти нейронов и глиальных клеток рецептора растяжения рака подробно изучено в нашей лаборатории с помощью ингибиторного анализа. Их обобщенные схемы приведены на рисунках 5 и 6. Некрозу нейронов способствует сигнальный путь Ca2+/кальмодулин/CaMKII и открытие высокопроницаемых митохондриальных пор. В нем также участвуют протеинкиназы B/Akt, GSK_3β и mTOR. Межклеточные молекулярные сигналы NO и GDNF, каскад аденилатциклаза/протеинкиназа A снижают некроз нейронов (рисунок 5). В глиальных клетках, как и в нейронах, различные сигнальные пути участвуют в ФД-индуцированном некрозе. К ним относятся каскады фосфолипаза C/Ca2+, Ca2+/кальмодулин/CaMKII, Ca2+/протеинкиназа C, Akt/mTOR, MEK/p38 и протеинкиназа G. NOS/NO и нейротрофических факторов NGF и GDNF оказывают защитное действие.

Апоптоз глии предотвращается нейротрофическими факторами NGF и GDNF, а также протеинкиназой C и MAP киназой JNK. Инициация этого процесса происходит при участии высокопроницаемых митохондриальных пор и фосфолипазы C, мобилизующих внутриклеточный Ca2+, путей NOS/NO/протеинкиназы G, а также белков GSK_3β и mTOR (рисунок 6).

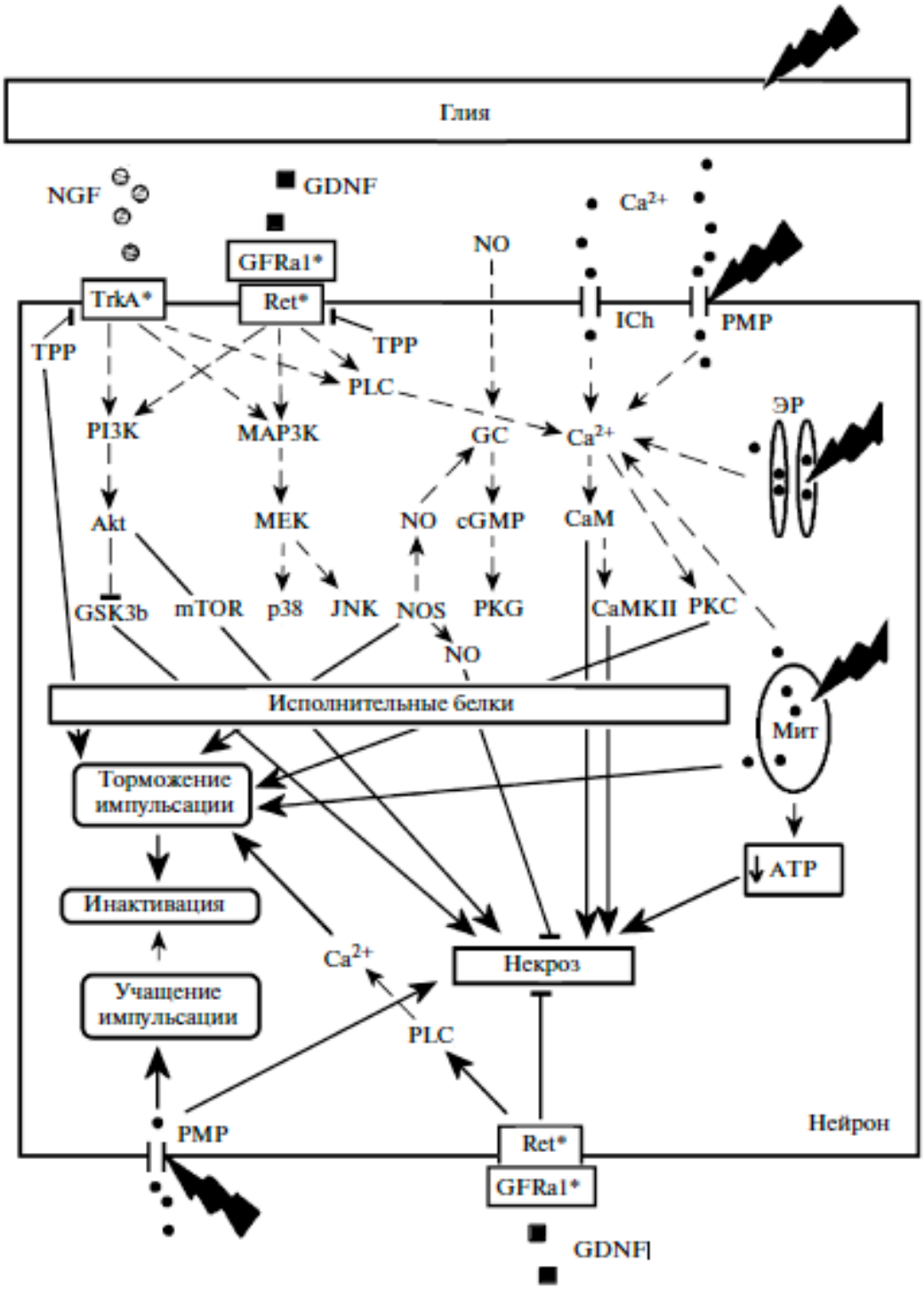


Рисунок 5. Схема основных сигнальных путей, участвующих в реакциях механорецепторных нейронов речного рака на ФД-воздействие. Потенциальные мишени ФД-воздействия обозначены молниями. Штриховыми линиями и стрелками показаны известные из литературы связи между сигнальными белками в различных клетках; сплошными линиями и стрелками обозначены связи, установленные в экспериментах Узденского А.Б. и др [по Узденский и др., 2010, 2014, 2015]

Сокращения к рисунку 5: Мит – митохондрии; ЭР – эндоплазматическая сеть; Akt – протеинкиназа B/Akt; CaM – кальмодулин; CaMKII – кальмодулин-зависимая киназа II; cGMP – циклический гуанозинмонофосфат; GC – гуанилатциклаза; GDNF – нейротрофический фактор из глиальных клеток; GFRa1 – аналог GFRα1, рецептора GDNF, у речного рака; GSK3β – киназа гликогенсинтазы_3β; ICh – ионные каналы; JNK – MAP-киназа; MAP3K – киназа киназы MAP-киназы; MEK – киназа MAP-киназы; NGF – фактор роста нервов; NOS – NO-синтаза; p38 – MAP-киназа; PI3K – фосфатидилинозитол_3_киназа; PKC – протеинкиназа C; PKG – протеинкиназа G; PLC – фосфолипаза C; PMP – поры в плазматической мембране; TrkA* – аналог тирозинкиназы A, рецептора NGF, у речного рака; TPP – тирозинфосфатаза; Ret* – рецепторная тирозинкиназа в составе аналога рецептора GDNF речного рака, mTOR – протеинкиназа – мишень рапамицина у млекопитающих*

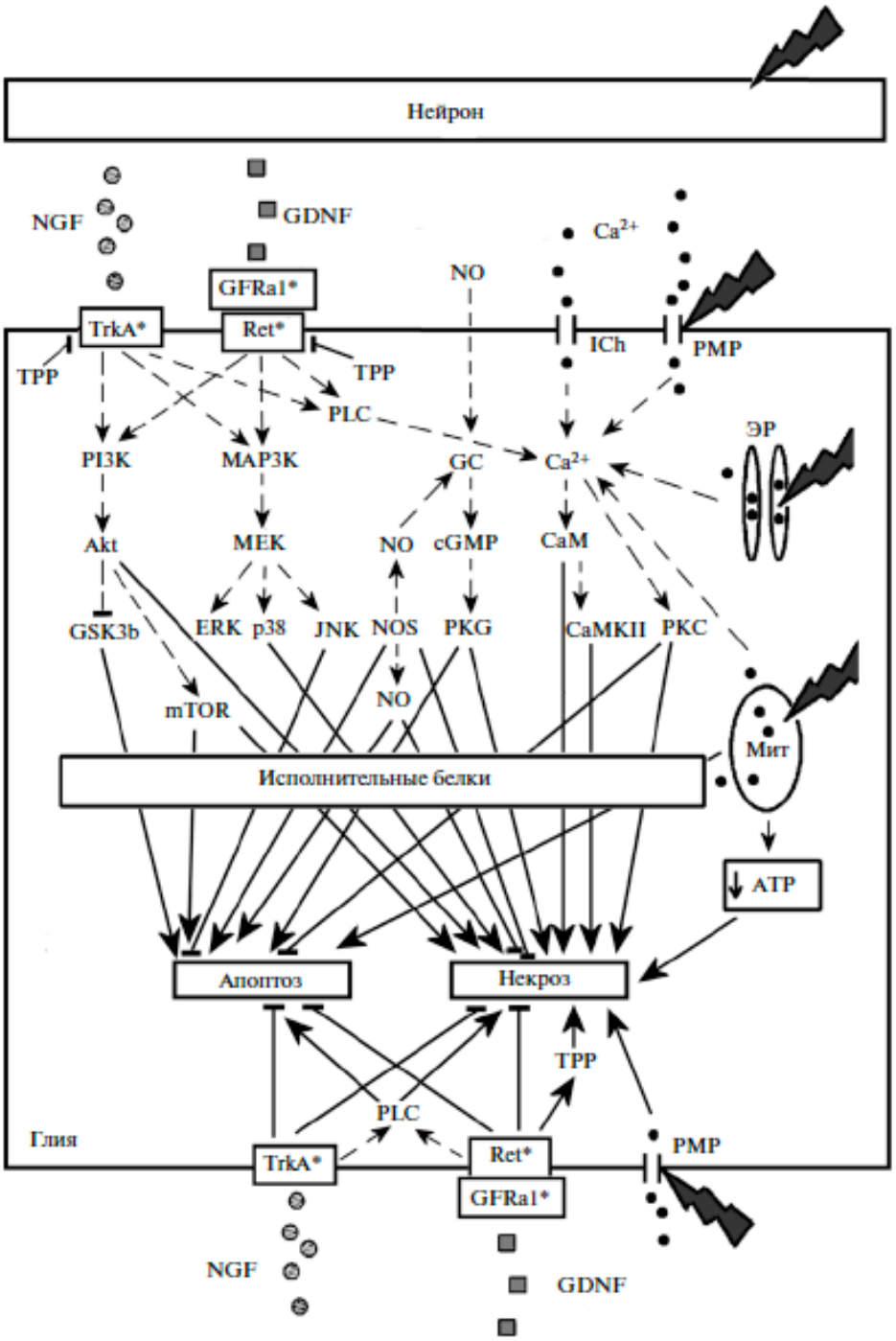


Рисунок 6. Схема основных сигнальных путей, участвующих в реакциях глиальных клеток, окружающих механорецепторные нейроны речного рака, на ФД-воздействие. Потенциальные мишени ФД-воздействия обозначены молниями. Штриховыми линиями и стрелками показаны известные из литературы связи между сигнальными белками в клетках; сплошными линиями и стрелками обозначены связи, установленные в экспериментах Узденского А.Б. и др. *Обозначения те же, что на рисунке 5. [по Узденский и др., 2010, 2014, 2015]*

Таким образом, реакции нервной ткани на различные воздействия, включая ФД воздействие и клеточную смерть, контролируются сложной системой сигнализации, которая состоит из тысячи белков, образующих внутриклеточную регуляторную сеть [Buytaert et al., 2007; Gomperts et al., 2009]. Не только апоптоз, но и некроз контролируются разнообразными сигнальными процессами, причем по-разному в нейронах и в глиальных клетках.

Экспрессия различных белков контролируется транскрипционными факторами и эпигенетическими регуляторами.

1.3 Основные эпигенетические механизмы

Эпигенетическими процессами называют процессы, которые не зависят от последовательности ДНК и влияют на экспрессию генов: метилирование ДНК, ацетилирование гистоновых белков, на которые накручивается нить ДНК для более компактного хранения в ядрах клеток, и реструктуризация хроматина. такие Метилирование ДНК и ковалентные модификации гистонов, включающие их метилирование, ацетилирование и фосфорилирование, играют важную роль в регуляции клеточных функций и выживании клеток.

Эпигенетические механизмы вовлечены в различные различные нейронные функции и неврологических расстройства, таких как синаптическая пластичность и формирование памяти [Sultan и Day, 2011; Nestler, 2013; Fortress и Frick, 2014; Tognini et al., 2015], болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и болезнь Хантингтона [Zawia et al, 2009; Gray, 2011; Gebicke-Haerter, 2012; Nalivaeva et al., 2014; Millan, 2014], шизофрения [Harrison и Dexter, 2013; Akbarian, 2014], эпилепсия [Hwang et al., 2013], острый и хронический стресс [McEwen et al., 2012; Bagot et al., 2014; Tsuji et al., 2014; Hoffmann et al., 2015; Moloney et al., 2015] и инсульт [Qureshi и Mehler, 2010; Thompson et al., 2013; Hwang et al., 2013; Schweizer et al., 2013; Lindgren et al., 2014].

ДНК метилирование – наиболее изученный эпигенетический механизм регуляции уровня экспрессии генов. Процесс ДНК метилирования катализируется ферментом ДНК метилтрансферазой (DNMT), способствующей метильной группы (CH3) на цитозин, стоящий перед гуанином в нуклеотидной последовательности [Tognini et al., 2015] (рисунок 7).

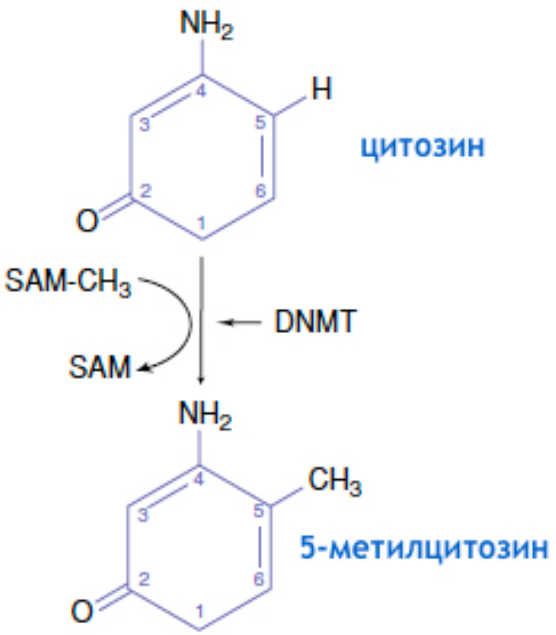


Рисунок 7. Механизм метилирования ДНК.

Метилтрансферазы ДНК (DNMT1, 3a или 3b) катализируют присоединение метильной группы (CH3) от S-аденозил-метионина (SAM) к углероду, расположенному в положении 5 пиримидинового кольца цитозина [адаптировано по Strathdee и Brown, 2002]

Ацетилирование, одна из наиболее распространенных модификаций в эпигенетике, играет ключевую роль в механизме регуляции структуры хроматина и экспрессии генов. Гистондезацетилазы (HDACs) - ферменты, которые регулируют экспрессию генов и механизмы в клетках путем удаления ацетильной группы с гистона и могут действовать как по пути, который зависит от метилирования ДНК, так и по пути, который не зависит от метилирования ДНК [Zhang и Zhong, 2014]. Деацетилирование гистонов усиливает связывание гистонов и уплотняет хроматин, тем самым ограничивая факторам транскрипции доступ к регуляторным областям. В клеточном ядре ДНК плотно упакована в нуклеосомы, каждая из которых состоит из 146 пар оснований ДНК, дважды закрученной вокруг гистонового октамера, построенного из двух молекул каждого из четырех положительно заряженных гистонов: H2A, H2B, H3, и H4 (рисунок 8). Вокруг гистонового "кора" наматывается отрицательно заряженная ДНК. Гистон H1 связывается с ДНК между нуклеосомами. Этот фундаментальный механизм упаковки ДНК обеспечивает построение структуры хроматина и хромосом. Модификации гистонов могут приводить к перестройкам хроматина и изменениям в доступности ДНК для взаимодействия с факторами транскрипции и/или репарации, что приводит к глобальным изменениям в экспрессионной активности генома, репликации и сегрегации хромосом в митозе [Grayson et al., 2010]. Гистоны также могут быть изменены путем метилирования и фосфорилирования - процессы, которые также были вовлечены в процессы обучения, синаптической пластичности и др. [Foti et al., 2013].

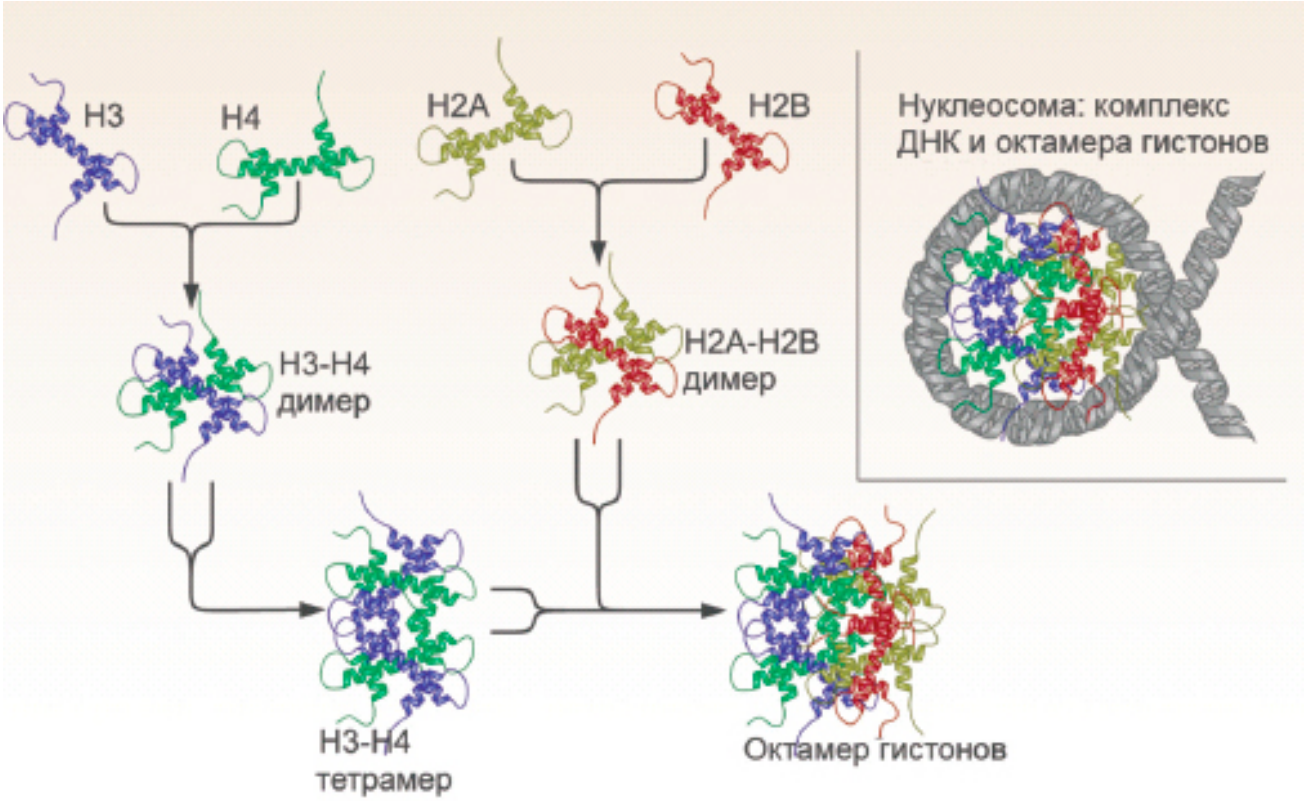


Рисунок 8. Структура нуклеосомы [по https://ru.wikipedia.org/wiki/Нуклеосома]

Эпигенетических механизмы участвуют в формировании нервной системы, эмбриональном и взрослом нейрогенезе, процессах нейронной пластичности, памяти, нейродегенеративных расстройствах, выживании нейронов и глиальных клеток [Konsoula et al., 2012; Harrison et al., 2013; Sharifulina et al., 2014].

1.3.1 Механизм метилирования ДНК

Метилирование ДНК заключается в присоединении метильной группы к цитозину в составе CpG-динуклеотида в позиции C5 цитозинового кольца. Метилированный цитозин может затем окисляться, что в итоге приводит к его деметилированию обратно в цитозин [Haines et al., 2001].

Геномное метилирование ДНК поддерживают 3 метилтрансферазы ДНК (ДНК-метилтрансферазы): DNMT1, DNMT3a и DNMT3b [Bestor, 2000]. Хотя каталитические домены ДНК-метилтрансфераз имеют консервативные мотивовы, каждая DNMT имеет определенную функцию в процессах метилирования ДНК.

DNMT1 демонстрирует предпочтение субстрата для гемиметилированной ДНК по сравнению с неметилированной ДНК [Pradhan et al., 1999; Hermann et al., 2004]. В процессе репликации ДНК DNMT1 связывается с вилкой репликации и передает первоначальные образцы метилирования ДНК на синтезирующуюся нить. DNMT1 несет ответственность за поддержание метилирования во время репликации ДНК, поэтому она выступает в качестве поддерживающей метилтрансферазы (рисунок 9).

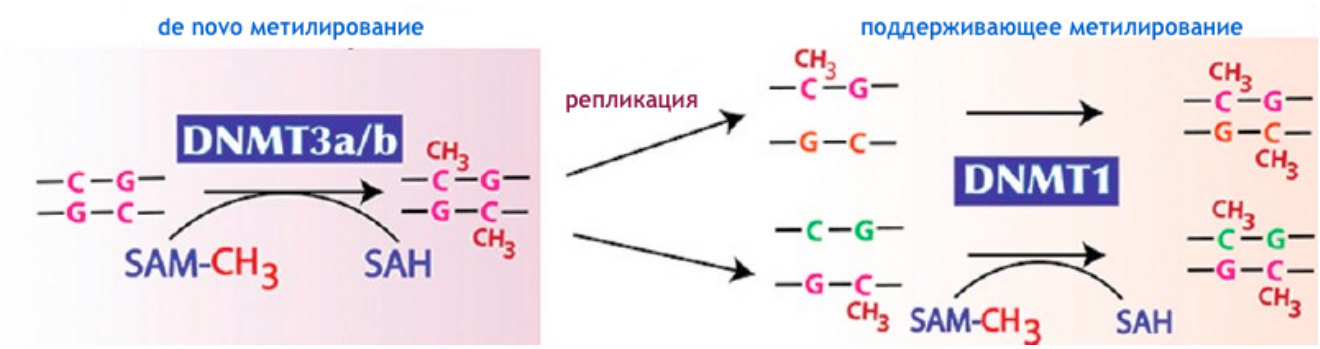


Рисунок 9. Метилирование ДНК

De novo метилирование ДНК катализируется ДНК-метилтрансферазами 3a и 3b. ДНК-метилтрансфераза 1 поддерживает метилированное состояние ДНК, присоединяя метильные группы к одной из цепей ДНК в местах метилирования комплементарной ей цепи [адаптировано по Kumar et al., 2014]

В отличие от этого, у DNMT3a и DNMT3b нет предпочтений к гемиметилированной или неметилированной ДНК, и, наоборот, вовлечены в процессы метилирования ДНК de novo [Okano et al., 1999]. Эти 3 ДНК-метилтрансферазы вместе могут формировать специфические для типа клеток пейзажи метилирования ДНК в геноме млекопитающих. Генетическое устранение любой DNMT у мышей приводит к аномальному метилому, и это является смертельным [Okano et al., 1999]. У людей, дефицит в DNMT3b способствует гипометилированию ДНК и это приводит к иммунодефициту, нестабильности центромеры и синдрому аномалий лица с разной степенью умственной отсталости. [Jin et al., 2008; Weng et al., 2013; Lister и Mukamel, 2015].

1.3.2 Модификации гистонов

В настоящее время наиболее полно исследованы два механизма модификации гистонов: перестройка хроматина с участием АТФ-зависимых гидролаз и ковалентная модификация гистонов по специфическим сайтам. Многосубъединичные АТФ-зависимые гидролазные комплексы могут оказывать влияние на структуру хроматина посредством изменения локализации нуклеосом, а также удаления или замены гистонов и изменения характера взаимодействий между ДНК и гистонами, приводя, к повышению доступности ДНК для взаимодействия с регуляторными белками. Выходящий за пределы нуклеосомы N-концевой хвост гистонов подвергается метилированию, ацетилированию, убиквитинированию, фосфорилированию, сумолированию, АДФ-рибозилированию, и гликозилированию (рисунок 10) [Bernstein et al., 2007; Kouzarides, 2007; Ruthenburg et al., 2007; Margueron и Reinberg 2010]. Эти гистоновые коды обеспечивают связывающие доки для активаторов или репрессоров генов, которые влияют на структуру хроматина и определяют доступность к последовательности ДНК [Bing и Peng, 2014].

Аминокислота	Модификация
Лизин (K)	Метилирование (Me) Ацетилирование (Ac) Убиквитинирование (Ub) Сумоимирование (Su) Рибозилирование (Rib)
Аргинин (R)	Метилирование (Me)
Серин (S) Треонин (T) Цистеин (C)	Фосфорилирование (P)

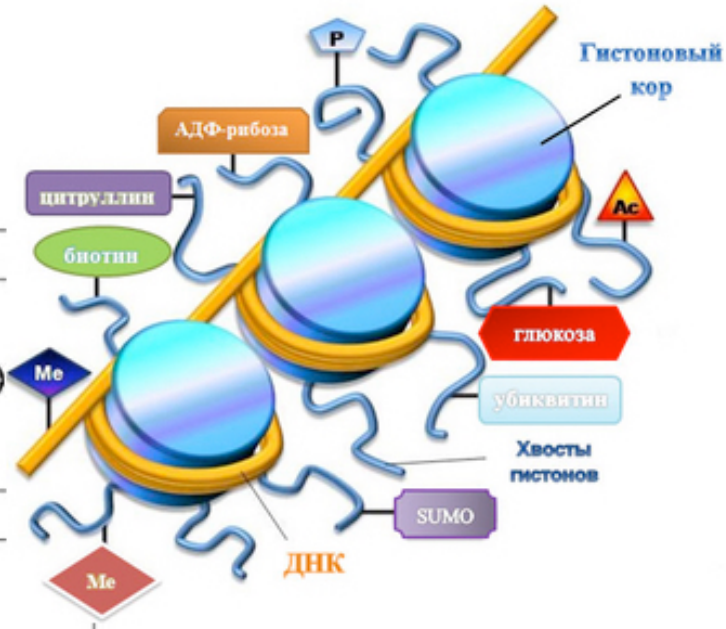


Рисунок 10**.** Эпигенетические модификации гистонов

Me — метильная группа, Ac — ацетильная, P — остаток фосфорной кислоты, SUMO — Small Ubiquitin-like Modifier (убиквитин-подобный модифицирующий белок) [по Лапская, 2013]

Метилирование/деметилирование гистонов

Динамика метилирования и деметилирования гистонов остатка лизина или аргинина катализируется с участием метилтрансфераз гистонов (HMTs) и деметилаз гистонов (HDMS) [Black et al., 2012]. Комплексы PcG и Trithorax (TrxG) являются комплексами хроматина, которые организованы в крупные субъединицы для связывания со специфическими участками ДНК и регуляции посттрансляционными модификациями гистонов [Ringrose и Paro, 2007]. Ezh2 из комплекса PcG PRC2 (Polycomb-repressive complex 2) отвечает за генерацию репрессии H3K27me3, который может быть считан PcG PRC1 комплексом [Schwartz и Pirrotta, 2007]. На молекулярном уровне, с H3K4me3 связан промотор Dlx2 в дифференцированных нейронов. Однако, H3K27me3 и H3K4me3 оказываются связаны с Dlx2 промотором, когда Mll1 истощается, предполагая, ключевую роль в Mll1 в обеспечении активности транскрипции в процессе дифференцировки [Lim et al., 2009; Schuettengruber et al., 2011]. Другая H3K9me3 метилтрансфераза, SUV39H1, может быть деактивирована через запуск BDNF- и NGF- сигнальных каскадов, которые могут способствовать связыванию фактора транскрипции CREB с ДНК [Sen и Snyder, 2011].

Метилирование/деметилирование гистонов необходимо для гарантии экспрессии правильного набора генов [Bing и Peng, 2014].

Ацетилирование/деацетилирование гистонов

Ацетилирование гистонов происходит по остаткам лизина и осуществляется ацетилтрансферазами гистонов (HATs). Известно 5 белков, обладающих HAT-активностью, большинство из которых является также коактиваторами транскрипции: MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2, Tip60, а также p300/CBP [Carrozza et al., 2003]. В результате ацетилирования происходит нейтрализация основного гистонового хвоста, и, как следствие, разрыхление хроматина и облегчение доступа факторов транскрипции к ДНК. Как и метилирования гистонов,

ацетилирование гистонов является обратимым процессом посредством гистондезацетилаз (HDACs).

Белки семейства HDAC можно разделить на четыре класса: Класс I, II, III, и IV в соответствии с их функциями, субклеточной локализацией, характеру экспрессии [de Ruijter, 2003; Zhang и Zhong, 2014]. Классы I (HDACs -1, -2, -3 и -8), II (HDACs -4, -5, -6, -7, -9 и -10) и IV (HDAC) -11 это цинк-зависимые ферменты, в то время как ферменты класса III (Сиртуины) являются цинк-независимыми, но никотинамид-аденин-динуклеотид (NAD) –зависимые (рисунок 11).

Класс I HDACs локализуются в ядре, повсеместно экспрессируются в тканях млекопитающих (за исключением HDAC8, который специфичен для мышц). Эти ферменты участвуют в регуляции генов транскрипции через формирование стабильных транскрипционных комплексов. HDAC2 и HDAC3 играют важную роль в физиологии центральной нервной системы [Bose et al., 2014; Lazo-Gómez et al., 2011; Guan et al., 2009]. HDACs класса II подразделяются на класс IIa (HDAC-4, -5, -7, -9) и класса IIb (HDAC-6 и -10). Эти подклассы могут курсировать между цитозолем и ядром в клетках головного мозга. HDAC4 локализуются в дендритах. Класс III HDACs (SIRT 1-7) представляет собой класс NAD + зависимых ферментов, которые локализуются как в ядре, так и в цитоплазме: SIRT 1, SIRT 6 и SIRT 7 локализованы в ядре, в то время как SIRT 2 преимущественно в цитозоле и SIRT 3, SIRT 4 и SIRT 5 находятся исключительно в митохондриях. Класс IV HDAC (HDAC-11) конструктивно отличается от других групп, а также локализован в цитоплазме и ядре. HDAC11 является членом белкового комплекса «выживания моторного нейрона", играя функциональную роль в сплайсинге мРНК [Joshi et al., 2013]. HDACs также могут деацетилировать не гистоновые белки (супрессор p53 является одним из негистоновых целей ацетилирования / деацетилирования) [Darcy et al., 2010; Mathiyalagan et al., 2014; Zhang и Zhong, 2014].

класс HDAC	фермент	локализация	активный домен
Class I	HDAC 1	Я	цинк-содержащий каталитический домен на N-конце
	HDAC 2	Я	
	HDAC 3	Я	
	HDAC 8	Я/Ц	
Class II	HDAC 4	Я/Ц	цинк-содержащий каталитический домен на C-конце
	HDAC 5	Я/Ц	
	HDAC 6	Ц	
	HDAC 7	Я/Ц	
	HDAC 9	Я/Ц	
	HDAC 10	Ц	
Class III	SIRT 1	Я	коэнзим никотинамидадениндинуклеотид-зависимой активный сайт
	SIRT 2	Ц	
	SIRT 3	Я/Ц	
	SIRT 4	Ц	
	SIRT 5	Ц	
	SIRT 6	Я	
	SIRT 7	Я	
Class IV	HDAC 11	Я/Ц	цинк-содержащий каталитический домен на N- и C-конце

Рисунок 11. Классификация гистондеацетилаз

HDAC - гистондеацетилаза, SIRT – сиртуин, Я –ядро, Ц – цитоплазма

[адаптировано по Kaushik, 2015]

Фосфорилирование гистонов

Фосфорилирование гистонов играет важную роль в процессах конденсации хроматина и регуляции клеточного цикла. Наиболее эффективно фосфорилированию подвергается гистон H3, в котором фосфатная группа присоединяется к остаткам серина и треонина, находящимся в определенных участках первичной структуры. Данная модификация приводит к изменению заряда аминокислот и таким образом влияет на связывание факторов транскрипции и перестройки хроматина [Dong и Bode, 2006]. Фосфорилирование остатка серина 10 в составе гистона H3 играет ключевую роль в активации транскрипции генов немедленного ответа c-jun, c-fos и c-myc [Nowak и Corces, 2004; Santos-Rosa и Caldas, 2005].

Убиквитирование гистонов

Модификации убиквитированием подвержены остатки лизина, находящиеся в составе гистонов H2A и H2B, при участии убиквитина или же малого убиквитиноподобного модификатора (SUMO). Убиквитин и SUMO могут выполнять противоположные функции, конкурируя за одни и те же сайты связывания. Убиквитирование гистонов с участием убиквитина, как правило, приводит к усилению экспрессии генов, тогда как убиквитирование с участием SUMO вызывает прямо противоположный эффект [Bergink et al., 2006].

1.4 Эпигенетические процессы при фотодинамическом воздействии

При фотоокислительном повреждении в клетках развивается сложный комплекс метаболических и сигнальных процессов, направленных, как на противодействие окислительному стрессу и защиту клеток, так и на реализацию программы клеточной смерти, некроза или апоптоза. В этих процессах участвуют разнообразные сигнальные пути [Almeida и Manadas, 2004; Castano и Demidova,

2005; Узденский, 2010, 2013]. Система внутриклеточной сигнализации очень сложна и включает тысячи белков [Gomperts et al., 2009]. Для понимания ее работы при разных функциональных процессах, патологии или внешних воздействиях необходимо одновременно изучить изменения экспрессии и активности множества клеточных белков. Большим прогрессом последних лет явилась разработка методов геномики и протеомики, позволяющих одновременно оценить экспрессию сотен и тысяч клеточных белков [Говорун и Арчаков, 2002; Ивахно и Корнелюк, 2006].

Эти подходы в последние годы успешно используются для изучения механизмов ФД воздействия на различные клетки и ткани. Так, с помощью геномного анализа была продемонстрирована повышенная экспрессия мРНК, кодирующих ряд защитных белков: шаперона Hsp27, циклооксигеназы 2, гем-оксигеназы-1 в опухолевых клетках, фотосенсибилизированных Фотофрином [Wang et al., 2002; Nowis et al., 2006].

В клетках карциномы А-431, ФД воздействие повышало уровень шаперона Hsp-70 и экспрессию генов *c-fos* и *c-jun*, повышающих защитный потенциал клеток [Verwanger et al., 2002]. С помощью ДНК-микрочипов показано, что ФД воздействие повышает экспрессию фактора роста VEGF. Это способствует ангиогенезу и повторному росту рака легких, что значительно снижает эффективность ФД терапии [Usuda et al., 2007]. В работе Ruhdorfer et al. (2007) показано, что после ФД терапии в клетках карциномы А-431 сильней всего экспрессировались гены раннего ответа *c-jun* и *c-fos*. В то же время снижалась экспрессия генов, кодирующих белки c-myc, который контролирует пролиферацию, Fas, который участвует в апоптозе, и компонент внеклеточного матрикса фибронектин. Wild et al. [2005] с помощью микрочипов Affymetrix GeneChip исследовали профили экспрессии мРНК в трех клеточных линиях после ФД воздействия 5-аминолевулиновой кислоты с дозой, убивающей 50% клеток. Они выявили 40 генов, экспрессия которых повышалась сильней всего. Из них были выделены гены фосфатазы двойной специфичности DUSP1 и ген *FOS*,

которые демонстрировали стабильное повышение экспрессии. Экспрессия каспазы 8 и активной формы каспазы 3 отмечалась только в нормальных, но не опухолевых клетках. Соответственно, ФД воздействие вызывало апоптоз в нормальных клетках и некроз в опухолевых. Использование олигонуклеотидных микрочипов показало, что ФД воздействие стимулирует иммунный ответ клеток, выражающийся в сверхэкспрессии генов, кодирующих различные цитокины [Kammerer et al., 2011].

Использование иммунофлуоресцентных микрочипов дает прямую информацию об экспрессии сотен различных клеточных белков. В наших предыдущих работах [Узденский, 2011] с помощью микрочипов Panorama Ab Microarray Cell Signaling, выявляющих экспрессию 224 структурных и сигнальных белков было показано, что сублетальное ФД воздействие на клетки глиобластомы D54Mg повышало экспрессию протеинкиназы PKCγ и вызывало фосфорилирование протеинкиназы Raf. Также фосфорилировались протеинкиназы FAK и Pyk2, активируемые при установлении адгезионных контактов, снижалась экспрессия дистрофина, калпонина и винкулина, участвующих в формировании платформы для актинового цитоскелета в точках адгезионных контактов. Еще изменялись белки тубулинового цитоскелета tau, MAP-1B, MAP2 и CNP. Снижение уровня ряда циклинов, сверочных белков и белка c-Myc указывает на ингибирование пролиферации. Антиапоптозная реакция клеток глиобластомы выражалась в повышении экспрессии защитного белка Bcl-x_L и снижении уровня каспазы 9. Сходные изменения были обнаружены в постоперационной ткани глиомы мозга человека, подвергнутой ФД действию Фотосенса. Но в этом случае не наблюдалось изменений экспрессии адгезионных протеинкиназ FAK и Pyk2, а также белков, регулирующих клеточный цикл и тубулиновый цитоскелет. С помощью сигнальных протеомных микрочипов в фотосенсибилизированных препаратах БНЦ рака также обнаружена противоапоптозная реакция с повышением экспрессии Bcl-x_L и понижением уровня каспазы 9, повышением уровня PKCγ, фосфорилированием Raf и FAK и

снижением уровня дистрофина. Но экспрессия белков, участвующих в регуляции клеточного цикла и тубулинового цитоскелета не изменялась [Узденский, 2011].

Сигнальные процессы обычно управляют текущим метаболизмом клетки, осуществляемом имеющимися в клетке белками. Но если для полноценного клеточного ответа имеющихся в клетках белков недостаточно, то необходим синтез дополнительных и новых белков. В этом случае включается экспрессия генов, как отдельных, так и их групп, отвечающих за комплексные реакции клеток. Управление наборами генов, кодирующих комплексы из десятков и сотен белков, которые участвуют в тех или иных клеточных функциях, обеспечивается наличием у них общих нуклеотидных последовательностей, распознаваемых факторами транскрипции. На более высоком уровне активация или инактивация экспрессии генов может осуществляться с помощью эпигенетических механизмов, обеспечивающих доступность различных генов для РНК полимераз. Эпигенетическая регуляция играет важную роль в различных физиологических процессах, включая эмбриональное развитие, дифференцировку клеток, иммунные процессы, функционирование органов, стресс, старение, а также в реакциях клеток и организма на внешние воздействия и различные болезни от инфаркта и инсульта до рака и нейродегенеративных заболеваний.

Эпигенетические механизмы высоко консервативны на разных ступенях эволюционного процесса от беспозвоночных до человека [Эллис, 2010]. Но эпигенетические процессы в нервной ткани, в частности, в глиальных клетках пока слабо изучены. Мы нашли только несколько публикаций об эпигенетических процессах в глие [Shen и Casaccia-Bonnefil, 2008; Dong et al., 2010; Yu et al., 2010; Iwamoto, et al., 2011; de León-Guerrero, 2011].

Окислительный стресс вызывает разнообразные изменения эпигенетических механизмов, связанные с развитием таких патологий, как злокачественное перерождение [Ziech et al., 2011; Tsai и Baylin, 2011], болезни Альцгеймера, Паркинсона [Zawia, 2009] и др. Но в литературе пока нет публикаций о роли

эпигенетических процессов в реакциях клеток на фотодинамическое воздействие. Настоящее исследование в определенной степени восполняет этот пробел.

1.5 Белок p53. Ацетилирование p53

Эпигенетические модификации играют важную роль в процессе нормального развития клеток, при котором факторы транскрипции выступают в качестве посредника перестройка эпигенома [Tsankov et al., 2015].

Белок p53 является фактором транскрипции и опухолевым супрессором, играет ключевую роль в регуляции основных клеточных функций, включая ответ на стресс, репарацию ДНК, гибель клетки. p53 индуцирует апоптоз клеток с необратимыми повреждениями ДНК. В нормальных клетках уровень этого белка низок, но p53 активируется при повреждении ДНК, механических повреждениях, окислительном стрессе и ионизирующем облучении. В нейронах повышается уровень экспрессии p53 при ишемии, эпилепсии или нейродегенеративные заболевания [Morrison et al., 2003; Culmsee и Mattson, 2005; Yu и Zhang, 2005; Checler и Alves da Costa, 2014; Wang et al., 2014].

Стресс (повреждение ДНК, активация онкогенов, гипоксия) способствует повышению активности p53, вызывая посттрансляционные модификации и тетрамеризацию p53 (рисунок 12).

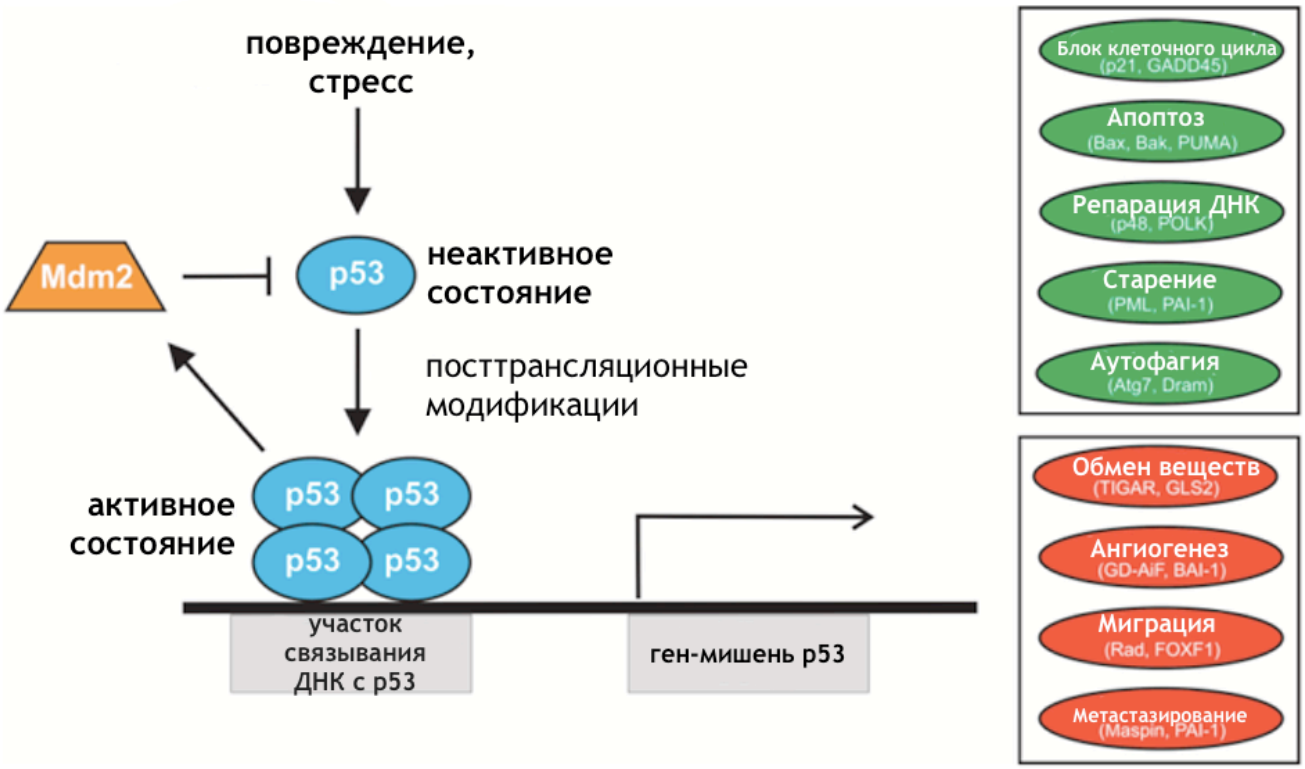


Рисунок 12. Активации транскрипции p53

В нормальном состоянии низкий уровень p53 обеспечивается его основным антагонистом, Mdm2, E3 убиквитинлигазы, транскрипционной мишенью p53. p53 функционирует как фактор транскрипции, связываясь с участком ДНК.

p53 влияет на важные клеточные процессы, связанные с подавлением роста опухоли, в том числе на индукцию (обозначено зеленым) старения, апоптоза, репарации ДНК, а также на торможение (обозначено красным) метаболизма, ангиогенеза, миграцию клеток. [адаптировано по Reed и Quelle, 2014]

Полученные несколько лет назад данные о том, что С-концевое ацетилирование p53 усиливает выживаемость нейронов, но, как правило, вызывает смерть опухолевых клеток, делают возможным построение стратегий, направленных на осуществление ацетилирования p53 (т.е. HDAC ингибирование), что может быть полезными для предотвращения дегенерации нормальных нервных клеток, подавляя при этом рост опухоли [Brochier et al., 2013; Reed и Quelle, 2014].

Исследования p53 показывают, что стресс-индуцированное ацетилирование С-конца p53 приводит к различных молекулярным и биологическим последствиям. В таблице 1 приведены основные эффекты различных воздействий на клетки и на состояние p53 ацетилирования. Эти корреляции значительно зависят от многих переменных, включая (1) тип клеточного стресса (например, повреждение ДНК, гипоксия, активация онкогена и т.д.); (2) степень повреждения клеток; (3) тип клеток (например, эпителиальные или нервные, нормальные или опухолевые); (4) анализ эндогенного p53 или сверхэкспрессируется; и (5) или не выполняются исследования в культивируемых клетках или в естественных условиях у мышей (таблица 1).

Также как и ацетилирование p53 его деацетилирование играет важную роль в регулировании транскрипционной активности p53 и его участии в механизмах выживания клеток после стрессового воздействия. HDAC1 или SIRT1 [Luo et al., 2000, 2001] могут деацетилировать p53 и значительно подавлять p53-зависимую транскрипцию, что может привести к снижению уровня p53-индуцированного апоптоза после повреждения ДНК или окислительного стресса. HDAC1 деацетилирует p53 по лизинам K320, K373 и K382, SIRT1 действует более конкретно на K382. Интересно, что Mdm2 облегчает Hdac1-опосредованное деацетилирование p53 путем привлечения HDAC1 к p53 комплексу [Ito et al., 2002]. Другие HDAC (2, 3 и 6) также могут негативно регулировать ацетилирование p53, но эти механизмы практически не изучены.

Таблица 1. Ключевые модификации p53 человека, связанные с определенными молекулярными и клеточными событиями. А - степень и тип повреждения клеток может оказывать влияние на степень и характер ацетилирования p53, тем самым указывая свои биологические эффекты. Например, сильное повреждение ДНК связано с более полным ацетилированием p53 и индукцией апоптоза. **Б** - p21-опосредованное ингибирование циклин-зависимых киназ (Cdk), в том числе циклин D-Cdk4, E-Cdk и A-Cdk2 комплексов [адаптировано по Reed и Quelle , 2014]

Сайты ацетилирования p53	**HATs**	**Фосфорилирование p53**	**Клеточный стимул**	**Ген-мишень p53**	**Молекулярный фенотип**	**Биологические последствия**
-	**-**	T377, S378	Митогены	Увеличение Mdm2,Pirh2	p53 убиквити-лирование и деградация	Выживаемость клеток и пролиферация
C-конец	P300/ CBP, PCAF	N-конец (S15, T18, S20, S33, S37)	Повреждение ДНК, др. генотоксический стресс **А**	Увеличение p21,GADD45; Уменьшение Noxa, Pidd	Ингибирование Mdm2-p53 взаимодействия и активности Cdk **Б**	Нарушение регуляции клеточного цикла, репарация ДНК
K120 K320 K382	MOZ, PCAF, p300	S15, S20	Повреждение ДНК, активация онкогенов (Ras)	Увеличение p21	Локализация MOZ-p53 комплексов в PML-NB	Клеточное старение
K120, C-конец	Tip60, MOF, p300/ CBP	S46	Повреждение ДНК, др. генотоксический стресс **А**	Увеличение Bax, Fas, Nox, PUMA	слабое связывание p53 с промоторами апоптоза	Апоптоз

Данные о роли p53 в механизмах гибели клеток при ФД воздействии различных клеточных линий противоречивы. Некоторые авторы показали, что p53 повышает уровень ФД-индуцированного некроза [Weller et al., 1997; Tong et al, 2000], тогда как другие показали увеличение уровня p53-индуцированного апоптоза [Fisher et al., 1999; Heinzelmann-Schwarz et al., 2003; Zawacka-Pankau et al., 2008].

Таким образом, роль белка p53 и его ацетилирования в ФД-индуцированной смерти нейронных и глиальных клеток остается на данный момент мало изученной, также как роль эпигенетических механизмов в реакциях нервной ткани на ФДТ.

Совсем небольшое количество работ посвящено изучению участия эпигенетических механизмов в выживаемости и гибели клеток при фотодинамическом воздействии [Wachowska et al., 2014, 2015; Marczynska et al., 2015]. Данных об участии этих механизмов в реакциях нервной ткани на ФДТ практически нет. Поэтому проведенное исследование роли процессов метилирования ДНК, деацетилирования гистонов нейронов и глии, изучение участия белка p53 в выживаемости и гибели нервных и глиальных клетках, а также изменений в экспрессии белков, участвующих в эпигенетической регуляции в нервной ткани при ФДТ, является актуальной задачей современной фотобиологии.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования

Часть исследований была проведена на абдоминальном рецепторе растяжения речного рака (РРР) *Astacus leptodactilus*, окруженного оболочкой из сателлитных глиальных клеток, который является классическим объектом нейрофизиологии. Его электрофизиология, морфология и биохимия детально описаны [Florey и Florey, 1955; Giacobini, 1969; Ильинский, 1975; Акоев и Алексеев, 1985]. Два симметричных рецептора растяжения, состоящие из двух рецепторных мышц и механорецепторных нейронов (МРН), чьи дендриты соединены с мышцами (рисунок 13А). Быстро адаптирующийся нейрон отвечает на растяжение рецепторной мышцы непродолжительным импульсным разрядом, чего не происходит при постоянном растяжении мышцы. Медленно адаптирующийся нейрон способен генерировать потенциалы действия (ПД) 10-12 часов с частотой, зависящей от степени растяжения рецепторной мышцы, на которой находится МРН. Крупные тела МРН (50-100 мкм) хорошо видны под микроскопом (рисунок 13Б). Нейроны окружены многослойной оболочкой из сателлитных клеток глии, которые не образуют миелин [Машанский и др., 1974]. Аксон перерезался на расстоянии 120-130 мм от сомы нейрона. При исследовании эпигенетической регуляции в нервной ткани речного рака при ФД-воздействии для протеомного анализа использовались выделенные брюшные нервные цепочки (БНЦ) речного рака Astacus leptodactilus, состоящие из 6 ганглиев. На БНЦ и МРН ранее был получен значительный материал о механизмах реакций нейронов и глиальных клеток на ФД воздействие [Uzdensky, 2002, 2005, 2007, 2008, 2013].

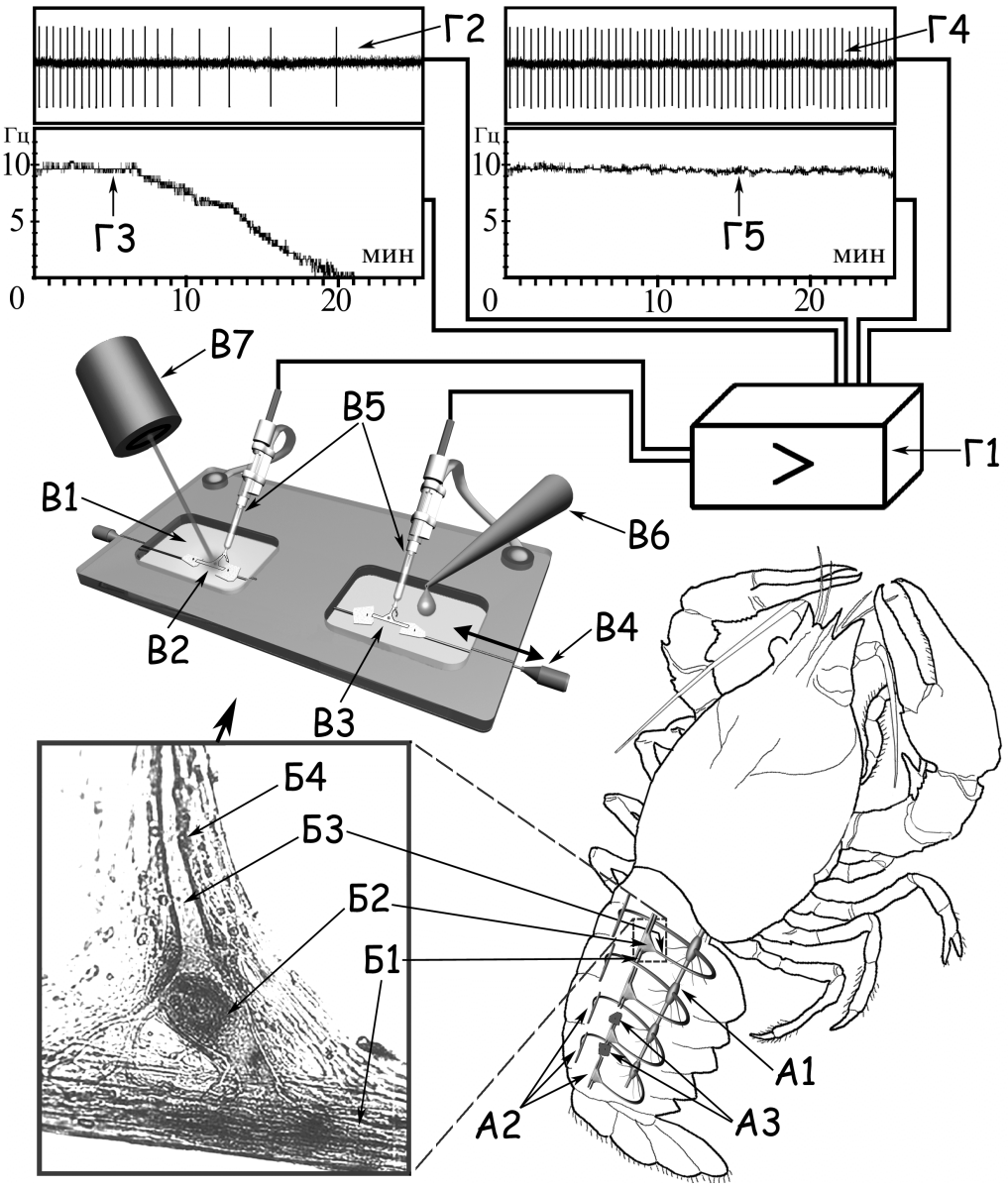


Рисунок 13. Схема эксперимента по изучению ФД-воздействия на МРН и ГК. *Рак: А1 – брюшная нервная цепочка, А2 – РРР, А3 – вырезаемые кусочки панциря, на которых крепится РРР. Препарат: Б1 – механорецепторная мышца, Б2 – МРН, Б3 – аксон, Б4 – оболочка из сателлитных ГК. Установка: В1 – кювета, В2 – опытный РРР, В3 – контрольный РРР, В4 – регулятор растяжения рецепторной мышцы, В5 – присасывающиеся электроды, В6 – добавление фотосенсибилизатора или модификатора, В7 – лазер. Биопотенциалы: Г1 – усилитель, Г2, Г4– импульсная активность опытного и контрольного МРН, Г3, Г5 – частотограмма опытного и контрольного МРН [по: Лобанов, 2007]*

В опытах по изучению ФД-индуцированных эпигенетических изменений в коре головного мозга использовались мыши-самцы CD-I весом 20-25 г., полученные из лаборатории животноводства в Институте биоорганической химии РАН (Москва, Россия). Мышей анестезировали тиопенталом натрия (40 мг/кг, внутрибрюшинно). После эксперимента все животные умерщвлялись тиопенталом натрия (120 мг / кг, внутрибрюшинно). Протокол ухода за животными соответствовал принципам Руководства по уходу и использованию лабораторных животных, изданного US NIH (№ 85-23, пересмотрено в 1985 г.). Все эксперименты с животными были выполнены в соответствии с этическими принципами и нормативными документами, рекомендованными Европейским научным фондом (ESF) и декларацией о гуманном отношении к животным.

2.2 Регистрация импульсной активности механорецепторного нейрона

Выделенные рецепторы растяжения помещали в плексигласовую кювету, оборудованную приспособлением для растяжения мышц, позволяющее экспериментатору задавать уровень импульсной активности нейрона, с 2 мл физиологическим раствором Ван-Харревельда (mM: NaCl-205; KCl – 5,4; $NaHCO_2$ – 0,24; $MgCl_2$ – 5,4; $CaCl_2$ – 13,5; pH 7.2-7.4).

ПД отводились внеклеточно от аксонов с помощью стеклянных присасывающихся электродов, усиливались и оцифровывались с помощью аналого-цифрового преобразователя L-761 (L-Card, Москва, Россия), при этом непрерывно регистрировалась их частота (рисунок 14). Каждая серия экспериментов включала: контроль, воздействие, ФД воздействия, ФД воздействие с модификатором. Все эксперименты проводились при температуре 23 ± 4 ◦ C.

В экспериментах для повышения точности использовали симметричные контралатеральные нейроны.

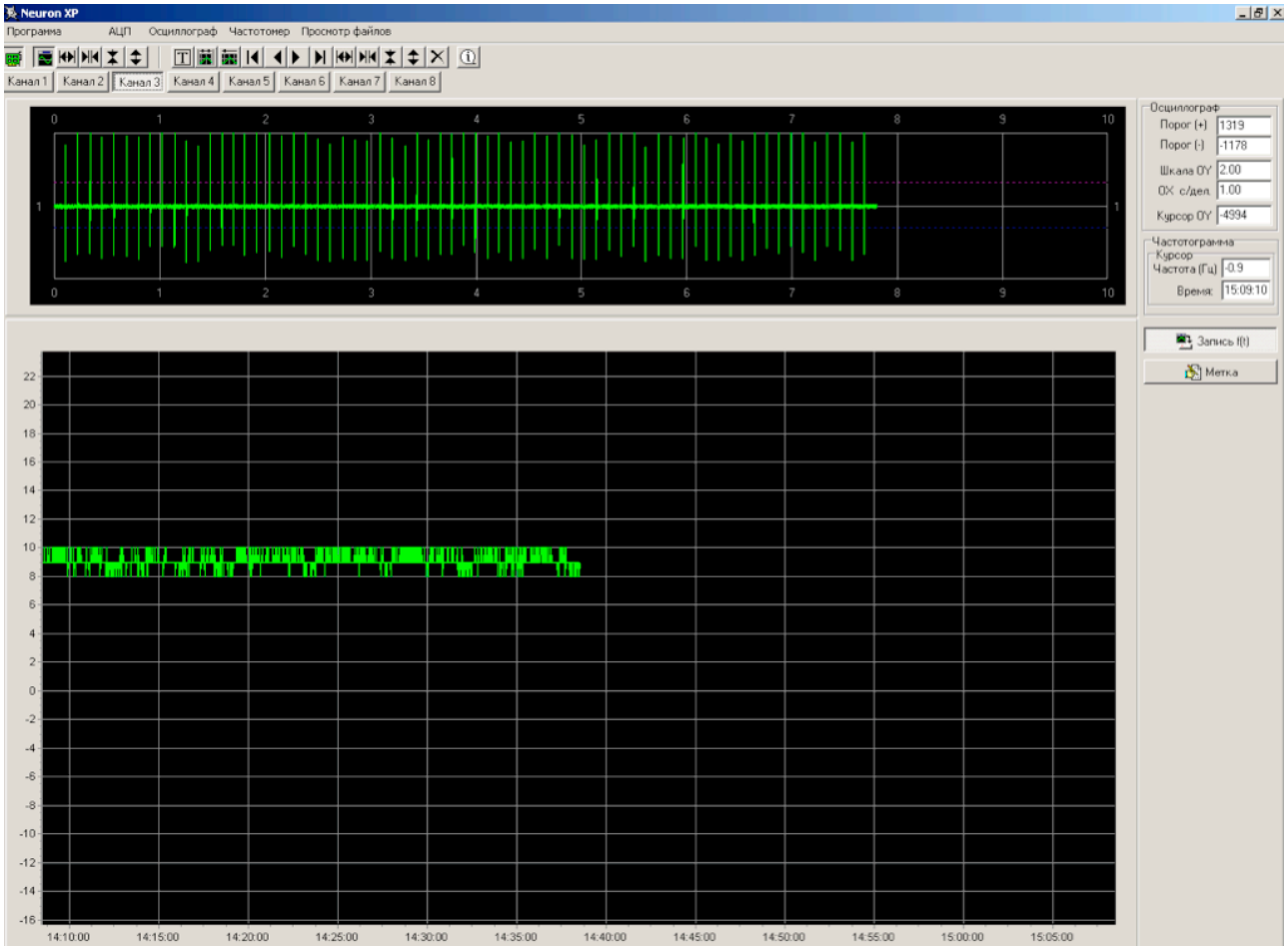


Рисунок 14. Пример импульсной активности и частотограмма контрольного нейрона

2.3 Фармакологическая модификация

За 25 минут до начала облучения в кювету с МРН добавляли фармакологические агенты и изучали изменения в импульсной активности нейрона при ФД-воздействии. Соль вальпроевой кислоты (VPA, 0.5 мМ), трихостатин А (TSA, 100 нМ), субергидроксамовая кислота (SBHA, 5 мкМ), 5-азацитидин (5-Aza, 10 мкМ), 5-аза-2'-деоксицитидин (децитабин, 10 мкМ), WR-1065 (100 мкМ), пифитрин-α (PFT-α, 0,5 мкМ) были получены в Sigma-Aldrich-Rus (Москва); RITA (10 мкМ), теновин-1 (10 мкМ), нутлин-3 (1 мкМ) были получены в Tocris Bioscience, Великобритания (рисунок 15, 16, 17).

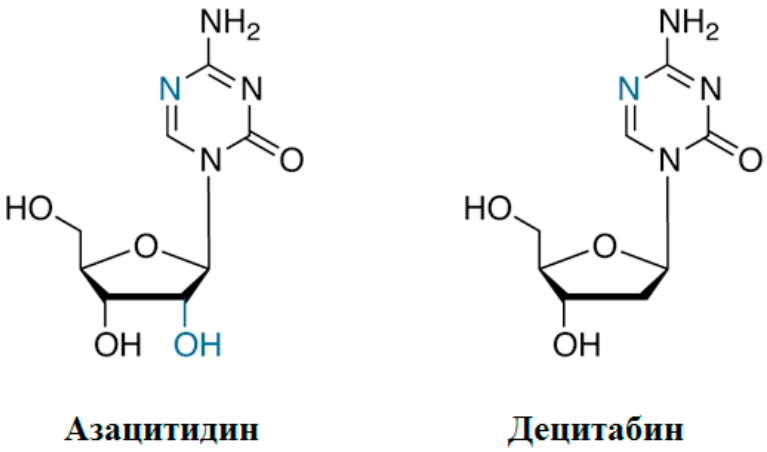


Рисунок 15. Химические формулы ингибиторов ДНК-метилтрансфераз: 5 - азацитидин и децитабин [по Лапская, 2013]

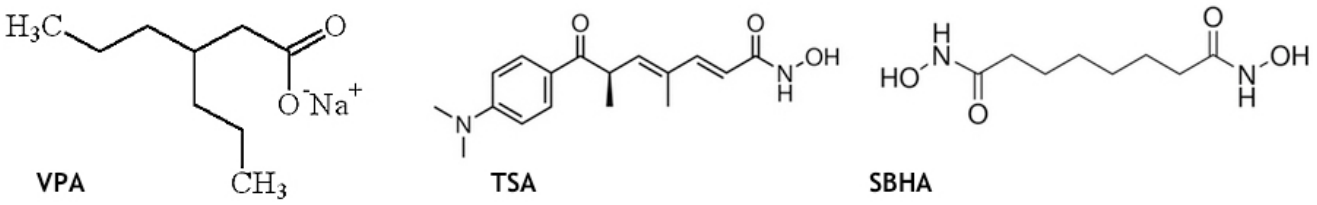


Рисунок 16. Химические формулы HDAC ингибиторов: соль вальпроевой кислоты [из Aiken et al., 2000], трихостатин А [из Finnin et al., 1999], субергидроксамовая кислота [по http://www.sigmaaldrich.com]

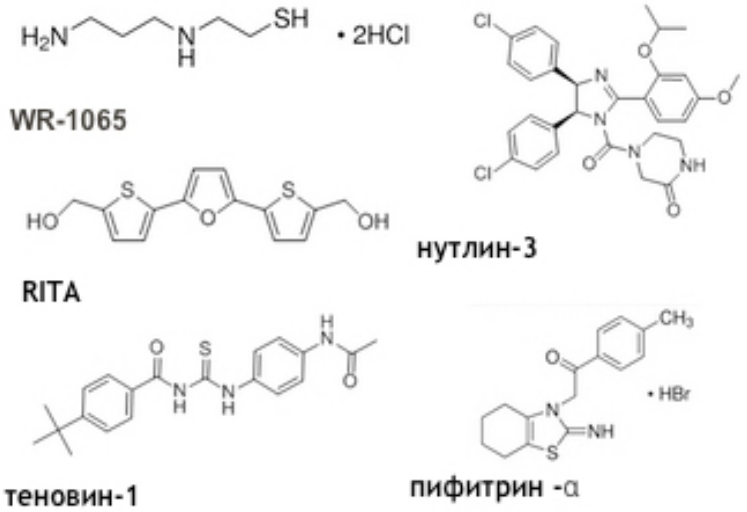


Рисунок 17. Химические формулы активаторов p53: WR-1065, RITA, теновин-1, нутлин-3 и ингибитора p53: пифитрин-α [по http://www.axonmedchem.com/product/]

2.4 Фотодинамическое воздействие

Механорецепторный нейрон речного рака

В начале эксперимента путем растяжения механорецепторной мышцы устанавливали исходный уровень частоты ПД около 8-12 Гц. После 30-минутной контрольной записи частоты импульсной активности нейрона в кювету добавляли фотосенсибилизатор - Фотосенс ($AlPcS_n$, n=3,1; 75 нМ) (ФС) (НИОПИК, Москва), продолжая непрерывно регистрировать импульсную активность нейрона. Фотосенс представляет собой смесь сульфированных алюмофталоцианинов, которые различаются по гидрофобности и локализуются в различных структурах клетки (рисунок 18). Гидрофильный AlPcS4 адсорбируется на поверхности клетки и далее попадает в лизосомы, более липофильные AlPcS2 и AlPcS3 попадают в основном в структуры мембраны, плазматическую мембрану и внутриклеточные органеллы.

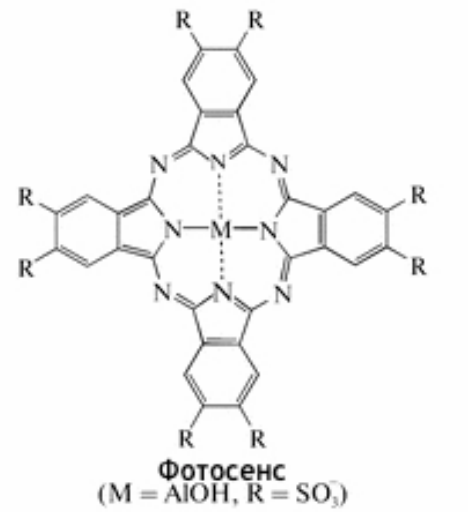


Рисунок 18. Химическая формула Фотосенса
[адаптировано по Kotel’nikov et al., 2013]

После 30-минутной инкубации клетки облучались гелий-неоновым лазером (632,8 нм, 0,3 Вт/см2) в течение 30 минут. Диаметр лазерного луча 3 мм, таким образом, подвергались облучению тело нейрона и значительная часть аксона. Время жизни нейрона Т измерялось от начала облучения до прекращения импульсной активности. ФС и фармакологический модификатор находились в кювете во время и после облучения.

Брюшная нервная цепочка речного рака

Выделялось выделяли под контролем бинокулярного микроскопа порядка 10 БЦН достаточно крупных речных раков для каждой серии экспериментов (контрольная группа без ФД воздействия, БНЦ через 2 и 11 часов после ФДТ). Препараты БНЦ инкубировали с 1 мМ ФС в течение 1 часа в физиологическом растворе Харревельда, и после отмывки от ФС подвергали ФД воздействию, облучая в течение 500 секунд диодным лазером (670 нм, 0.1 Вт/см^2, доза облучения 50 Дж/см^2). Лазерное облучение проводилось М.С. Колосовым. Контрольные нервные цепочки из 10 раков инкубировались так же, но не подвергались ФД воздействию. После ФД воздействия препараты инкубировали в растворе Харревельда 2 или 11 часов в темноте при комнатной температуре (рисунок 19). Ткани были взвешены, заморожены в жидком азоте, затем хранились при -85°С.

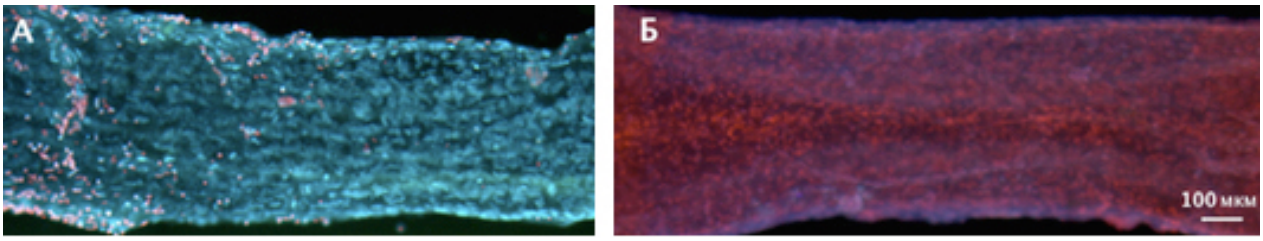


Рисунок 19. Пример влияния ФДТ (Б) на морфологию ядер глиальных клеток в брюшной нервной цепочке речного рака.

(А) – контроль без ФДТ. Препарат флуорохромировался пропидиум-иодидом, который придает красную флуоресценцию некротическим ядрам, и Hoechst 33342, который придает зеленую флуоресценцию живым или фрагментированным клеткам

Кора головного мозга мыши

Через четыре часа после введения 5-Аминолевулиновой кислоты гидрохлорида (рисунок 20) - ALA (100 мг/кг, внутрибрюшинно) животных анестезировали и фиксировали в стереотаксической раме. После удаления перикрания, мозг облучали 20 минут с помощью гелий неонового лазера (633 нм, 15 мВт / см^2; общая световая доза - 18 Дж/см^2). После 1 часа или 4 часов мышей перфузировали солевым раствором и умерщвляли. Срезы коры головного мозга (7х7х2 мм^3) были быстро взвешены, заморожены в жидком азоте, а затем помещались в морозильную камеру при -85°С.

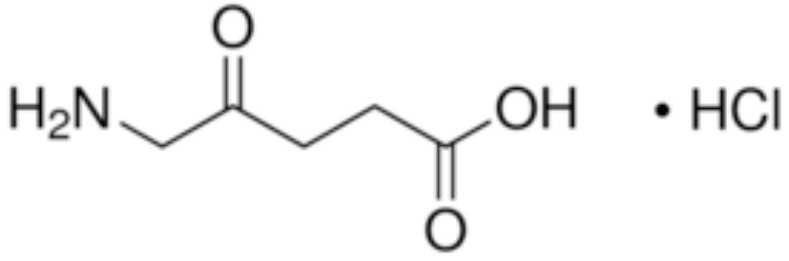


Рисунок 20. Химическая формула 5-Аминолевулиновой кислоты гидрохлорида [по Fujino et al., 2015]

2.5 Флуоресцентно-микроскопическое исследование

Через 8 часов (это время необходимо для развития апоптоза) после прекращения облучения проводилась визуализация некроза и апоптоза клеточных ядер методом двойного флуорохромирования нейроглиального препарата МРН пропидиум-иодидом (ПИ) (100 мкМ) (Sigma-Aldrich-Rus, Москва, Россия), проникающим только в ядра некротических, но не живых клеток, с поврежденной плазматической мембраной, и придающим им красную окраску, и флуорохромом Hoechst-33342 (100 мкМ) (Sigma-Aldrich-Rus, Москва, Россия), проникающим в живые клетки, придавая сине-зеленую флуоресценцию, визуализирующим морфологию ядерного хроматина и выявляющим апоптозные клетки с фрагментированными ядрами. Препараты рецепторов растяжения промывались, фиксировались 0,1% раствором глутаральдегида, заключались в глицерин и изучались на флуоресцентном микроскопе ЛЮМАМ И-3, оснащенным цифровой камерой Nikon Coolpix 995 (рисунок 21). Контролем служили препараты, не подвергавшиеся ФД воздействию. При исследовании ФД-индуцированного повреждения глиальных клеток процент ядер, окрашенных ПИ и флуоресцирующих красным светом, подсчитывался на стандартной площади 10000 мкм^2. Количество фрагментированных апоптозных ядер глии, флуоресцирующие зеленым светом, подсчитывались на проксимальном участке аксона длиной 2 мм.

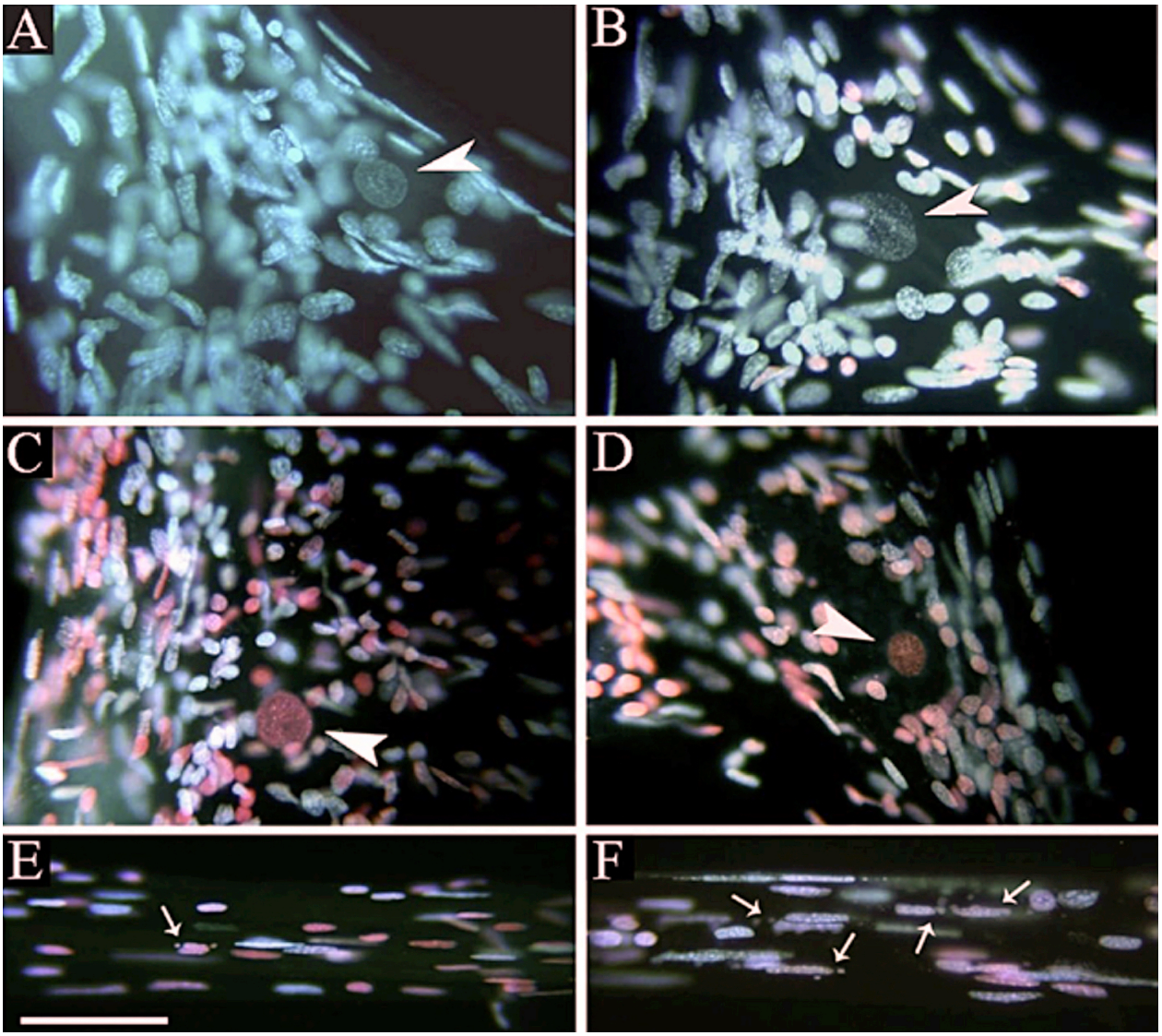


Рисунок 21. Пример влияния децитабина (B), ФДТ (C и E) и ФДТ + децитабин (D и F) на морфологию ядер механорецепторного нейрона и окружающих его глиальных клеток

(A) Контроль, (E) и (F) показывают фрагментированные апоптотические ядра сателлитных глиальных клеток на проксимальном участке аксона. Препарат флуорохромировался. ПИ, который придает красную флуоресценцию некротическим ядрам, и Hoechst 33342, который придает зеленую флуоресценцию живым или фрагментированным клеткам. Большие стрелки (A–D) указывают на ядра нейрона, маленькие (E, F) - на фрагментированные ядра глии. Масштабный отрезок 50 мкм. [Sharifulina et al., 2014]

2.6 Протеомное исследование ФД-индуцированных эпигенетических изменений в нервной ткани

Использовались эпигенетические микрочипы Panorama Ab Microarray Gene Regulation Kits (GRAA2), CelLytic™ NuCLEAR™ Extraction Kit (NXTRACT), реагента Брэдфорда (Sigma-Aldrich-Rus, Москва, Россия). Монофункциональные активные красители Cy3™ и Cy5™ были предоставлены GE Healthcare (Великобритания). Использовалась система тестирования REVEAL Polyvalent HRP-DAB.

Экстракция клеточных белков

Образцы замороженной ткани гомогенизировали 1 минуту ультразвуковым гомогенизатором Sonics Vibracell (Sonics and Materials Inc., США) в буфере А на льду. Этот буфер представляет собой Extraction/Labeling Buffer, поставляемый фирмой Sigma-Aldrich (USA) в наборе реактивов Panorama Antibody Microarray Gene Regulation (GRAA2) и дополненный смесью ингибиторов протеаз и фосфатаз, необходимых для сохранения белков, и их фосфорилированных форм, а также нуклеазой бензоназы, которая разрушает нуклеиновые кислоты. Длительность ультразвукового воздействия составила 3 секунды с десяти перерывом. Проводилось 20 циклов. После гомогенизации образцы центрифугировали в течение 20 минут на центрифуге Eppendorf 5417 C/R при 10000 g и 4 ^{o}C. Затем отбирали супернатант, содержащий цитоплазматические белки, а из осадка, содержащего обломки клеток и клеточные ядра, экстрагировали ядерные белки с помощью Extraction Buffer, входящего в состав набора реактивов NXTRACT - CelLytic™ NuCLEAR™ Extraction Kit (Sigma-Aldrich, USA). Для этого осадок ресуспендировали и инкубировали 30 мин с данным буфером. Затем его центрифугировали 10 мин при 20000 g и 4 ^{o}C на той же центрифуге. Полученный супернатант, содержащий ядерные белки,

смешивали с полученной ранее цитоплазматической фракцией в соотношении 1:1 и определяли концентрацию белка по методу Бредфорд. Затем все пробы разбавлялись с помощью Dilution and Equilibration Buffer (компонент NXTRACT) так, чтобы в них было по 1 мг/мл белка.

Флуоресцентное мечение белков

Все образцы нервной ткани разделялись на две пробы по 200 мкл, которые инкубировались в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте с флуоресцентными красителями Cy3 и Cy5 в концентрации 1 мг/мл и, наоборот, с помощью Cy5 и Cy3, соответственно. Эти красители флуоресцируют в разных спектральных диапазонах: λ_{max} = 532 нм и 635 нм, что позволяет различать пробы по их флуоресценции. После флуорохромирования несвязавшийся краситель удалялся с помощью поставляемых в наборе колонок SigmaSpin, которые центрифугировали 4 мин при 4000 об/мин. Затем с помощью реагента Бредфорд контролировали содержание общего белка в пробах. Для получения достаточно интенсивного сигнала отношение молярных концентраций краситель/белок должно превышать 2. Двойное мечение опытного и контрольного образцов флуорохромами Cy3 и Cy5 и, наоборот, Cy5 и Cy3, позволяет избежать проблем с перекрестной специфичностью антител и осуществить полный самоконтроль эксперимента. Поскольку на каждом микрочипе антитела нанесены в дубликате, то для каждого изучаемого белка получается по 4 значения отношения концентрации этого белка в экспериментальных пробах к таковому в контрольных, среднее из которых характеризует его относительную экспрессию.

Протеомные микрочипы

Начиная с 2010 года, фирма Sigma-Aldrich (Sent-Louis, USA) включила в свой каталог протеомные микрочипы Panorama Antibody Microarray Gene Regulation (GRAA2), определяющих 112 белков, участвующих в эпигенетическом управлении генной экспрессией и перестройках хроматина. Наборы GRAA2 состоят из комплекта реактивов и двух одинаковых микрочипов - предметных

стекол, покрытых нитроцеллюлозной мембраной, на которых в дубликате - по две микрокапли для каждого антитела - иммобилизованы 224 микрокапель со 112 антителами против белков, участвующих в эпигенетической регуляции. Микрокапли организованы в 4x4 блока по 14 капель (или пятен) для 7 антител в дубликате. Кроме них, в правом нижнем углу каждого блока нанесены микрокапли с бычьим сывороточным альбумином (негативный контроль) и с альбумином, конъюгированным с флуорохромами Cy3 и Cy5 (позитивный контроль) [Kopf et al., 2007].

Гибридизация

После флуорохромирования и опытный, и контрольный образцы, окрашенные Cy3 и Cy5, соответственно, добавлялись в одинаковых концентрациях (по 10 мкг/мл) в пробирку, содержащую 5 мл буфера Array Incubation Buffer (входящего в поставляемый набор реактивов). То же делали с противоположно мечеными образцами, окрашенными флуорохромами Cy5 и Cy3, соответственно. Для гибридизации микрочипы помещались в кюветы quadriPERM Cell Culture Vessel (компонент набора реактивов, поставляемого с данными микрочипами), содержащие 5 мл первой смеси, а другой - в такую же кювету, содержащую 5 мл второй смеси с противоположно окрашенными пробами. Кюветы защищали от света алюминиевой фольгой и инкубировали 40 мин при комнатной температуре на орбитальном шейкере. Затем микрочипы трижды промывались фосфатным буфером, содержащим TWEEN-20, и трижды - деионизованной водой по 5 мин в каждой среде при постоянном перемешивании на орбитальном шейкере. После высушивания в течение ночи при комнатной температуре микрочипы были готовы к сканированию.

Сканирование образцов и анализ данных

Уровни экспрессии белков оценивали по интенсивности их флуоресценции в пятнах с иммобилизованными антителами. Для этого микрочипы сканировали на сканере GenePix 4100A (Molecular Devices, USA) на длинах волн: 532 и 635 нм,

соответствующих максимумам флуоресценции Cy3 и Cy5 (рисунок 22). Последующее сравнение средней или медианной интенсивности флуоресценции в флуоресцирующих пятнах (микрокапли) опытных и контрольных образцов, позволяет говорить о различной экспрессии изучаемых белков.

Для сканирования препаратов и их анализа использовали программы GenePix Pro 6.0 и Acuity 4.0. После просмотра пятен и исключения непригодных (слабый сигнал с отношением интенсивности флуоресценции сигнал/фон < 2, случайные загрязнения), а также пятен с негативными и позитивными контролями из измеренных значений флуоресценции вычитали локальные фоновые значения, т.е. медианную интенсивность флуоресценции в кольце вокруг каждого пятна. В качестве наилучшего метода нормализации мы использовали Lowess-нормализацию, которая приводит к нормальному распределению (рисунок 23, 24), необходимому для правильной интерпретации результатов. Результаты выражены в виде двоичных логарифмов отношений медианных значений интенсивности флуоресценции экспериментального и контрольного образцов (формула 1), из которых вычитались медианные значения интенсивности фоновой флуоресценции в кольцах, окружающих микрокапли с антителами:

$$M = \log_2 \frac{I_{M.med} - I_{\Phi(M),med}}{I_{K,med} - I_{\Phi(K),med}} \qquad (1)$$

При этом значение $M = 1$ соответствует двукратному изменению или 100% различию, а $M = 0.58$ - 50% различию. Четыре полученных значения в двух параллелях на одном стекле и двух параллелях – на другом.

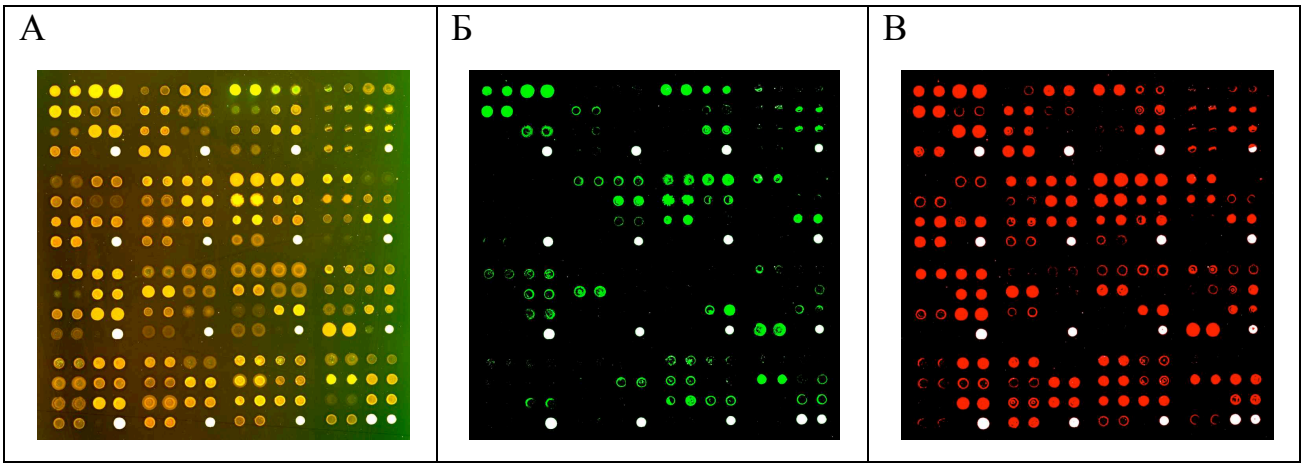


Рисунок 22. Пример флуоресцентного изображения протеомного микрочипа The Panorama Antibody Microarray - Gene Regulation (GRAA2), флуорохромированного красителями Cy3 и Cy5 (А)

На (Б) приведено распределение зеленой флуоресценции Cy3 на этом чипе, а на (В) - распределение красной флуоресценции Cy5 на этом чипе. Микрочип содержит 112 микрокапель с иммобилизованными антителами, организованными в 4x4 блока, содержащих по 14 микрокапель с 7 антителами (в дубликате). В правом нижнем углу каждого блока нанесены микрокапли с бычьим сывороточным альбумином (негативный контроль) и с альбумином, конъюгированным с флуорохромами Cy3 и Cy5 (позитивный контроль)

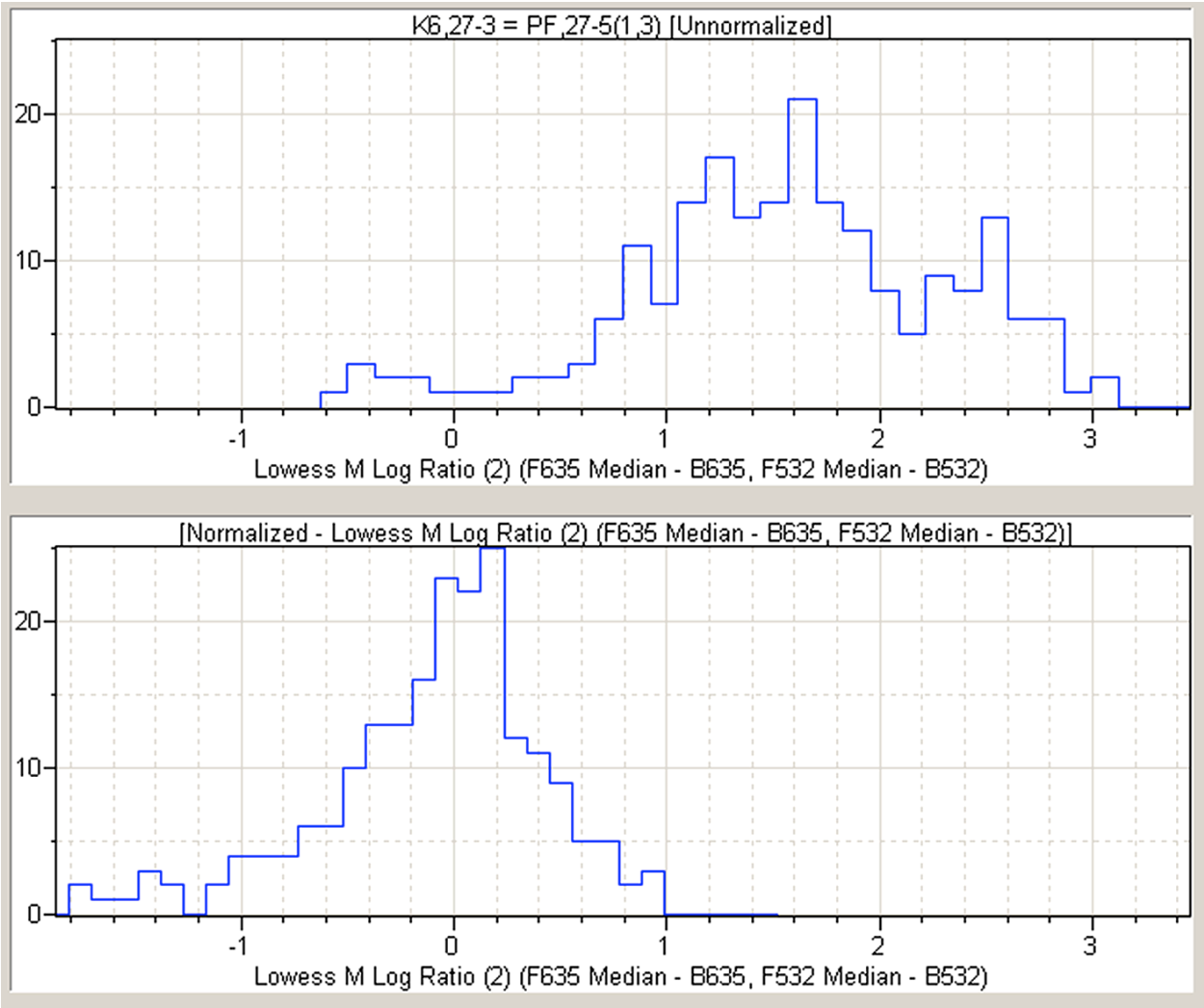


Рисунок 23. Результаты нормализации данных

Гистограммы распределения двоичных логарифмов отношения медианных значений интенсивностей флуоресценции Cy5 и Cy3 в микрокаплях микрочипа, содержащих антитела к разным белкам до и после Lowess-нормализации

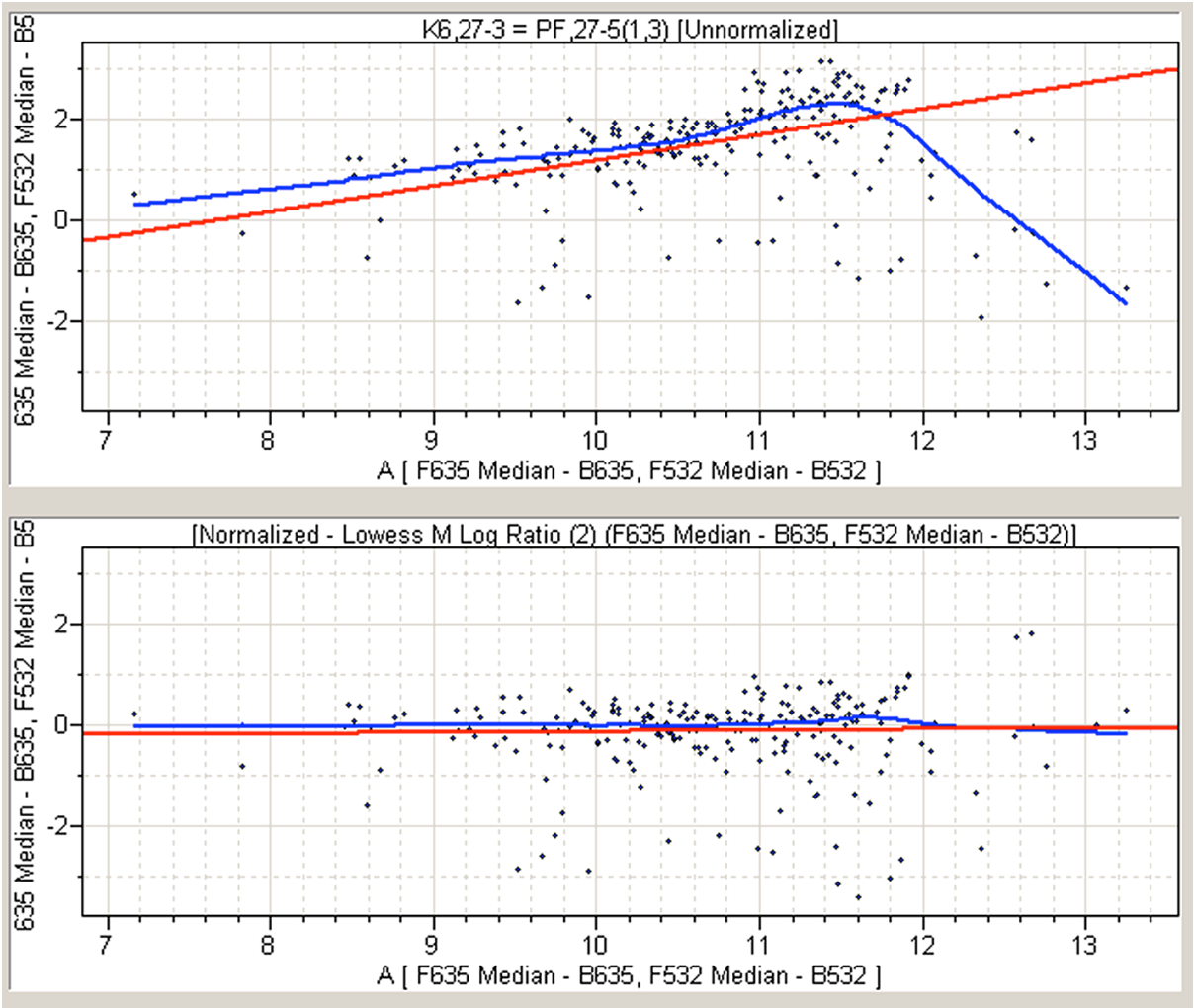


Рисунок 24. Диаграммы рассеяния двоичных логарифмов отношения медианных значений интенсивностей флуоресценции Cy5 и Cy3 в микрокаплях микрочипа, содержащих антитела к разным белкам до и после Lowess-нормализации (точки)

Красная линия – линейная регрессия, синяя – кривая Lowess fit

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Инактивация и смерть механорецепторного нейрона речного рака и окружающих его глиальных клеток при фотодинамическом воздействии

Исследовали четыре экспериментальные группы: (1) контроль; (2) влияние активатора или ингибитора в темноте; (3) влияние ФД воздействия и (4) влияние сочетанного ФД воздействия и ингибитора или активатора изучаемого белка. Ни Фотосенс (75 нМ), ни лазерное облучение сами по себе не меняли нейронную импульсную активность выживаемость механорецептора.

Тем не менее, их совместное действие, т.е. фотодинамическое воздействие, за 20–30 минут приводило к необратимому прекращению потенциалов действия, к некрозу нейронов и ГК, а также апоптоз у ГК, но не нейронов (рисунок 25-29). Фрагментирование ядер, характерное для апоптоза, никогда не наблюдалось в нейронах.

Фотодинамическое воздействие вызывало статистически значимое прекращение импульсной активности нейрона через 16 ± 3 мин. после начла облучения ($p < 0{,}001$, рисунок 25-29,а). ФД-индуцированный некроз ядер нейронов наблюдался в 99% случаях по сравнению с контролем ($p < 0{,}001$, рисунок 25-29,б). Фотодинамическое воздействие статистически значимо увеличивало некроз ядер глиальных клеток, окружающих МРН, 65 ± 17 % по сравнению с контролем ($p < 0{,}001$, рисунок 25-29,г). Также при этом происходило статистически значимое увеличение уровня апоптоза ядер клеток глии в 14 ± 5 ($p < 0{,}01$, рисунок 25-29,в).

Таким образом, фотодинамическое воздействие приводило к прекращению нейронной импульсной активности, а через 8 часов к некрозу нейронов и глиальных клеток и апоптозу клеток глии.

3.2 Роль метилирования ДНК и деацетилирования гистонов в ФД-индуцированной инактивации и смерти механорецепторного нейрона речного рака и окружающих его глиальных клеток

В темноте ингибиторы ДНК-метилтрансферазы 5-азацитидин (10 мкм) и децитабин (10 мкм) статистически значимо не влияли на продолжительность импульсной активности нейрона (рисунок 25а, 26а) и на уровень некроза нейронов (рисунок 25б, 26б). Тем не менее, 5-азацитидин более чем в 2 раза увеличивал уровень некроза ГК ($p<0,05$; рисунок 25г), похожая тенденция наблюдалась и в изменении уровня апоптоза глии ($p>0,05$; рисунок 25в).

5-азацитидин и децитабин не влияли на ФД-индуцированные изменения в активности и уровень некроза нейронов (рисунок 25а и 26б, 25а и 26б, соответственно). 5-азацитидин и децитабин снижали уровни ФД-индуцированного некроза клеток глии в 1,3 и 2,0 раза ($p<0,05$; рисунок 25г; $p<0,01$; рисунок 26г, соответственно).

Данное исследование показало, что ингибиторы DNMT 5-азацитидин и децитабин защищают глиальные клетки, но не нейроны речного рака от ФД-индуцированного некроза, что позволяет предположить участие DNMT в ФД-индуцированном некрозе глии. Деметилирование ДНК, вызванное 5-азацитидином или децитабином, активирует экспрессию молчащих генов через деконденсацию хроматина, что позволяет факторам транскрипции связываться с ДНК промоторами и активирует транскрипцию генов [Alcazar et al., 2012; Karpf и Jones, 2002].

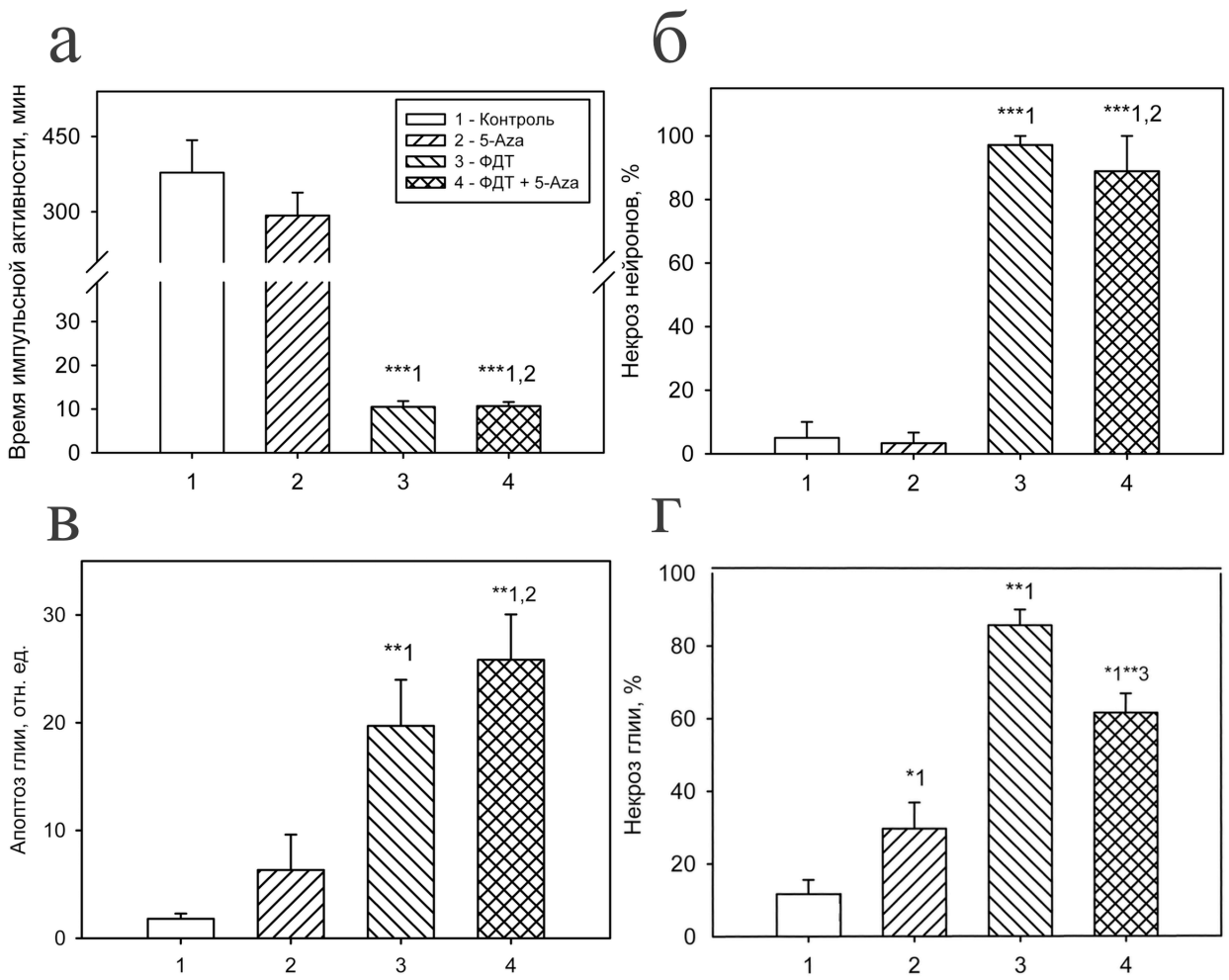


Рисунок 25. (а-г) Влияние ингибитора ДНК-метилтрансферазы 5-азацитидина (5-аза, 10мкМ) на продолжительность импульсной активности нейрона, уровень некроза нейронов и глиальных клеток, и уровень апоптоза глиальных клеток в темноте и при ФДТ с 75 нм Фотосенса. 1 - контроль, 2 - влияние 5-азацитидина в темноте, 3 - ФДТ, 4 - ФДТ в присутствии 5-азацитидина. * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 [Sharifulina et al., 2014]

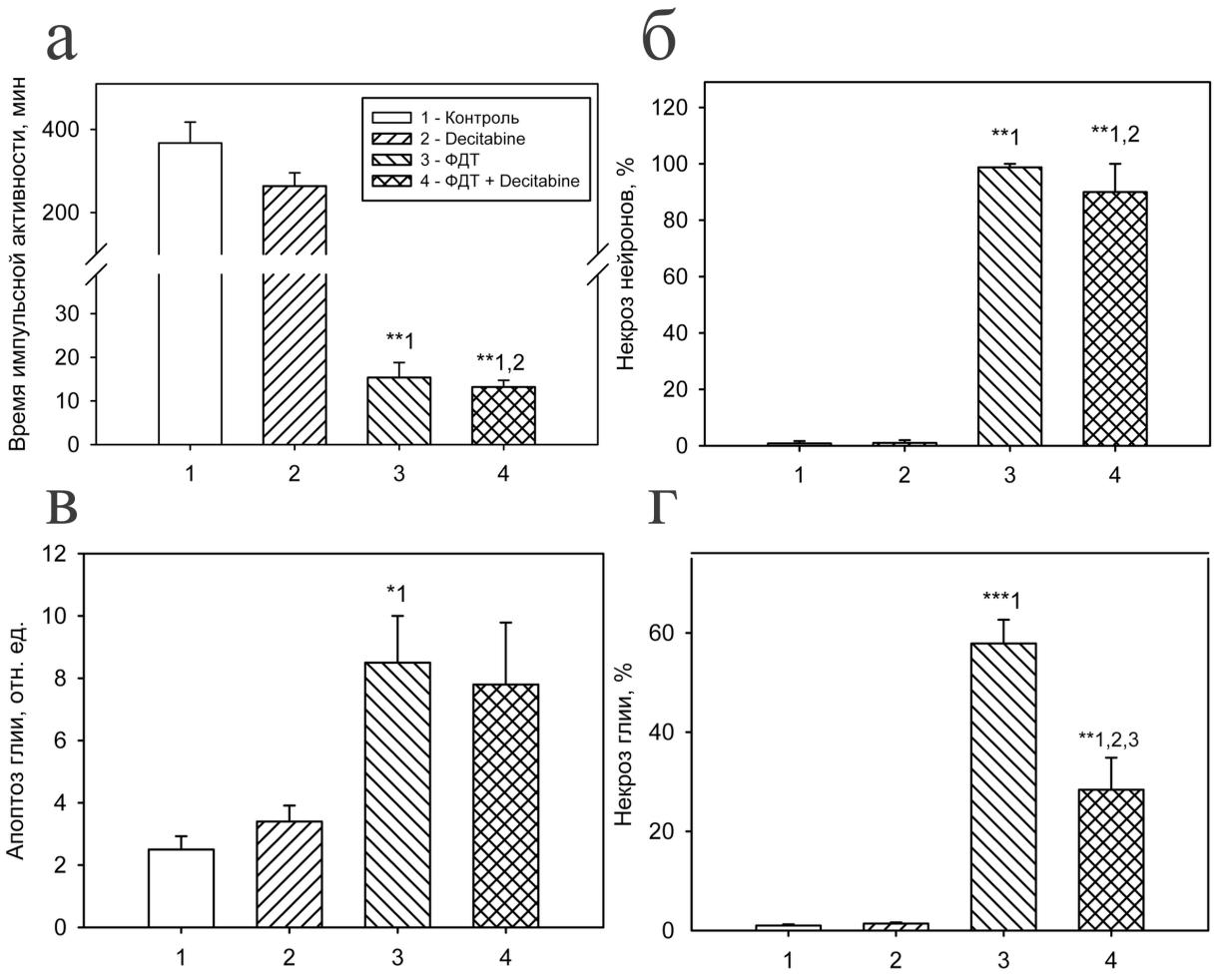


Рисунок 26. (а–г) Влияние ингибитора ДНК метилтрансферазы децитабина (10 мкм) на продолжительность импульсной активности нейрона , уровень некроза нейронов и глиальных клеток, и уровень апоптоза глиальных клеток в темноте и при ФДТ с 75 нм Фотосенса. 1 - контроль, 2 - влияние децитабина в темноте, 3 - ФДТ, 4 - ФДТ в присутствии децитабина. * p <0,05, ** p <0,01 [Sharifulina et al., 2014]

3.3 Роль деацетилирования гистонов в ФД-индуцированной инактивации и смерти механорецепторного нейрона речного рака и окружающих его глиальных клеток

Ингибиторы гистондеацетилазы - натриевая соль вальпроевой кислоты (VPA, 0,5 мМ), трихостатин А (TSA, 100 нм) и SBHA (5 мкМ) не влияли на некроз нейронов и глии и апоптоз глиальных клеток в темноте (рисунок 27, 28 и 29, соответственно). Тем не менее, VPA и SBHA снижали продолжительность импульсной активности изолированного нейрона рецептора растяжения примерно на 20% и 19%, соответственно ($p < 0,05$; рисунок 27а, 29а). VPA, TSA и SBHA не влияли на уровень ФД-индуцированного некроза нейрона (рисунок 27б, 28б, 29б), но они статистически значимо снижали уровень фотоиндуцированного некроза клеток глии в 2,3, 1,6 и 1,2 раза ($p < 0,01$; рисунок 27г, 28г, 29г, соответственно). Они также защищали клетки глии от ФД-индуцированного апоптоза и снижали его уровень в 2,4; 2,7 и 2,3 раз ($p < 0,05$; рисунок 27в, $p < 0,01$; рисунок 28в, $p < 0,05$; рисунок 29в, соответственно).

Деацетилирование гистонов ингибирует экспрессию генов. HDAC ингибиторы натриевая соль вальпроевой кислоты, трихостатин А, SBHA и другие демонстрируют нейропротекторные свойства при нейродегенеративных заболеваниях, защищают нейроны и при окислительном [Biermann et al., 2011; Harrison и Dexter, 2013; Kanai et al., 2004; Zhang et al., 2012]. Данное исследование показало, что VPA, TSA, SBHA защищают от ФД-индуцированной гибели глиальные клетки, но не нейроны.

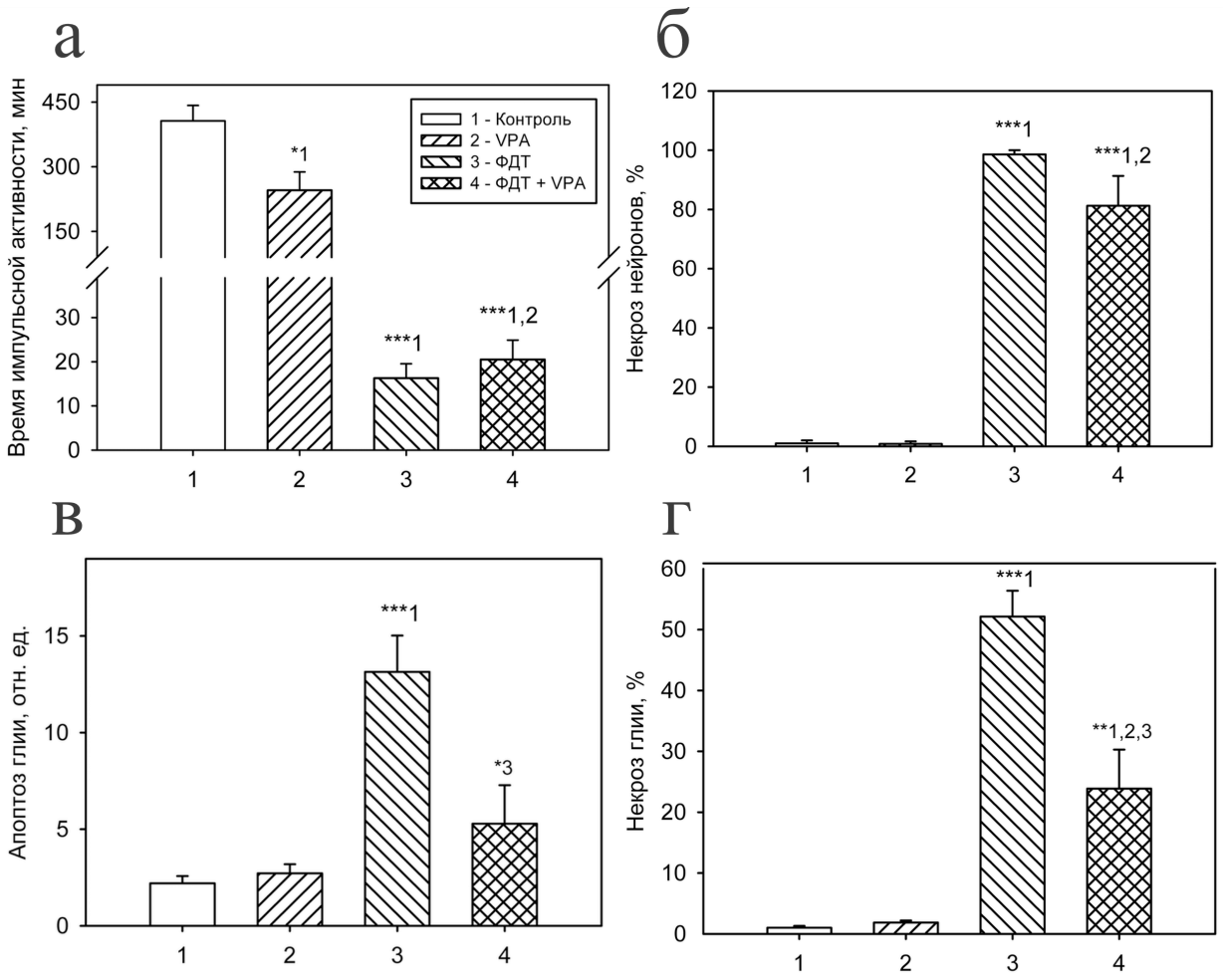


Рисунок 27. (а–г) Влияние ингибитора гистондеацетилаз натриевой соли вальпроевой кислотой, (VPA, 0,5 мМ) на продолжительность импульсной активности нейрона , уровень некроза нейронов и глиальных клеток, и уровень апоптоза глиальных клеток в темноте и при ФДТ с 75 нм Фотосенса. 1 - контроль, 2 - влияние VPA в темноте, 3 - ФДТ, 4 - ФДТ в присутствии VPA. * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 [Sharifulina et al., 2014]

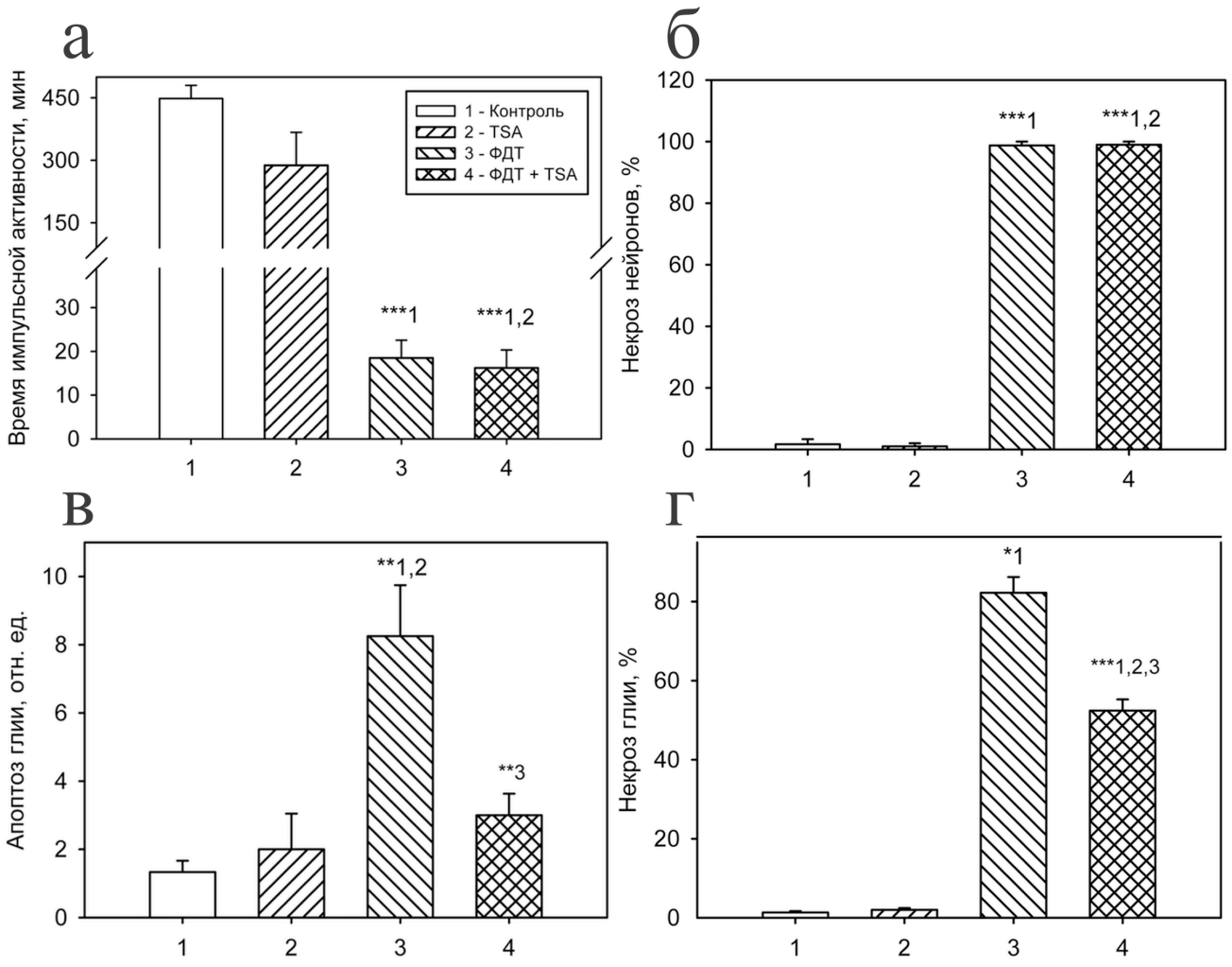


Рисунок 28. (а–г) Влияние ингибитора гистондеацетилаз трихостатина А (TSA, 100 нМ) на продолжительность импульсной активности нейрона , уровень некроза нейронов и глиальных клеток, и уровень апоптоза глиальных клеток в темноте и при ФДТ с 75 нм Фотосенса. 1 - контроль, 2 - влияние TSA в темноте, 3 - ФДТ, 4 - ФДТ в присутствии TSA. * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 [Sharifulina et al., 2014]

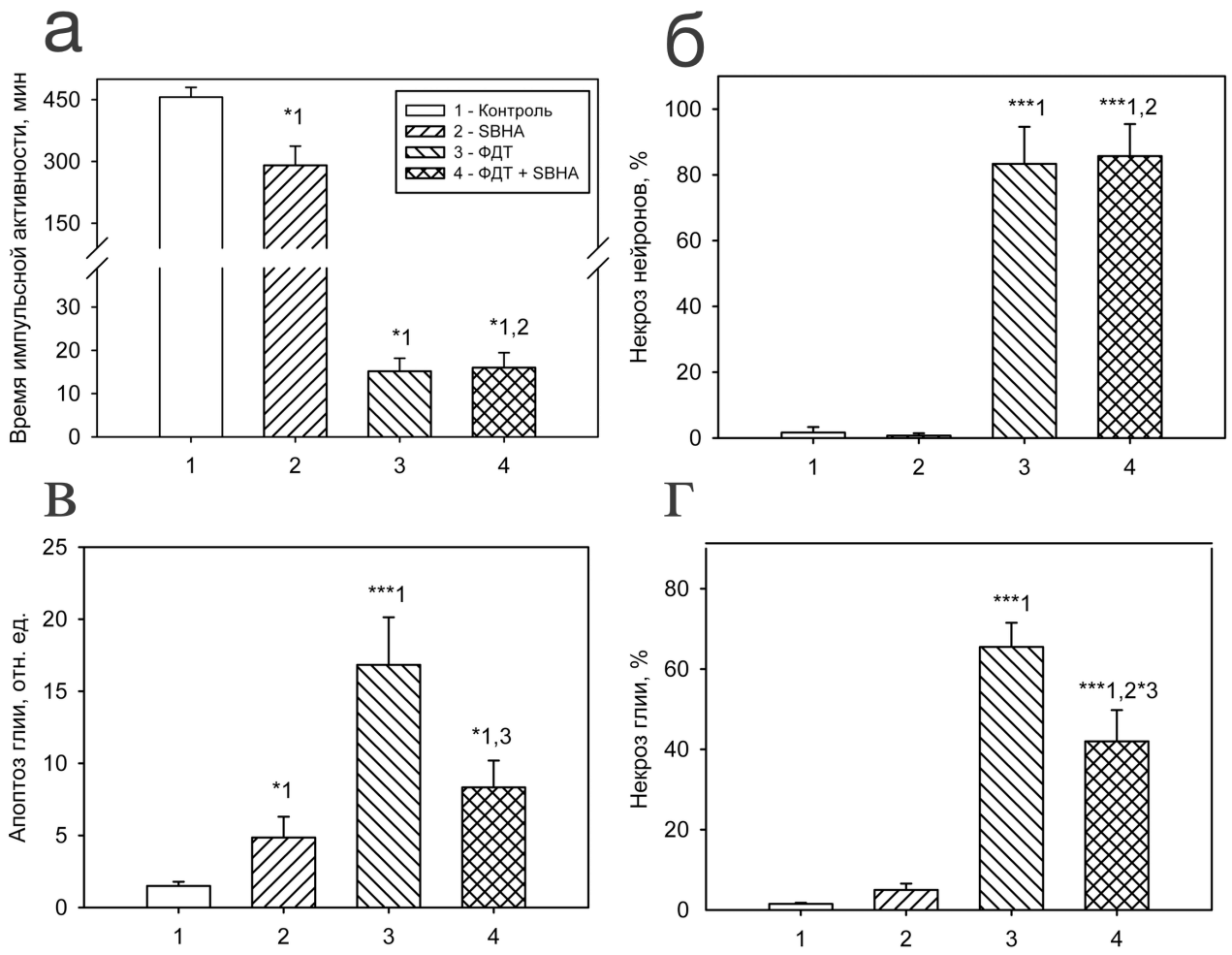


Рисунок 29. (а–г) Влияние ингибитора гистондеацетилаз SBHA (5 мкМ) на продолжительность импульсной активности нейрона , уровень некроза нейронов и глиальных клеток, и уровень апоптоза глиальных клеток в темноте и при ФДТ с 75 нм Фотосенса. 1 - контроль, 2 - влияние SBHA в темноте, 3 - ФДТ, 4 - ФДТ в присутствии SBHA. * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 [Sharifulina et al., 2014]

3.4 Участие белка p53 в ФД-индуцированной инактивации и смерти механорецепторного нейрона речного рака и окружающих его глиальных клеток

В темноте активаторы p53 теновин-1 (10 мкм) и WR-1065 (100 мкм) сокращали продолжительность импульсной активности нейронов в 4,7 и 1,5 раз ($p < 0,001$; рисунок 30а и $p < 0,05$; рисунок 32а, соответственно). Это указывает на участие p53 в снижении нейронной активности. Теновин-1, но не другие модуляторы p53, в темноте увеличивал уровень некроза нейронов и глиальных клеток в 20 и 16 раз, соответственно ($p < 0,01$ и $p < 0,05$, рисунок 30б, 30г). Активация p53 посредством теновин-1, WR-1065 или нутлин-3 в темноте увеличивала уровень апоптоза глии в 37,8, 6,8 и 18,4 раз ($p < 0,01$; рисунок 30в, $p < 0,05$; рисунок 32в, 33в, соответственно). Ингибирование p53 посредством PFT в темноте статистически значимо увеличивало время биоэлектрической реакции нейрона при ФДТ в 1,7 раза ($p < 0,05$, рисунок 34а).

Уровни ФД индуцированного некроза нейронов и глии были снижены в присутствии теновин-1 в 1,4 и 1,8 раза ($p < 0,01$ и $p < 0,001$, рисунок 30б, 30г, соответственно). WR-1065 увеличивал ФД-индуцированной некроз клеток глии, но не нейронов, в 1,4 раза ($p<0,05$; рисунок 32г). Теновин-1, нутлин-3 и RITA статистически значимо повышали уровень ФД - индуцированного апоптоза глии в 2,2; 3,3 и 5,3 раз ($p < 0,05$, рисунок 30в, 30в и $p < 0,01$; рисунок 31в, соответственно).

PFT снижал уровень некроза нейрона и глии в 1,3 и 1,4 раза и в два раза уровень ФД-индуцированного апоптоза клеток глии ($p < 0,05$, рисунок 34б, 34г, 34в, соответственно).

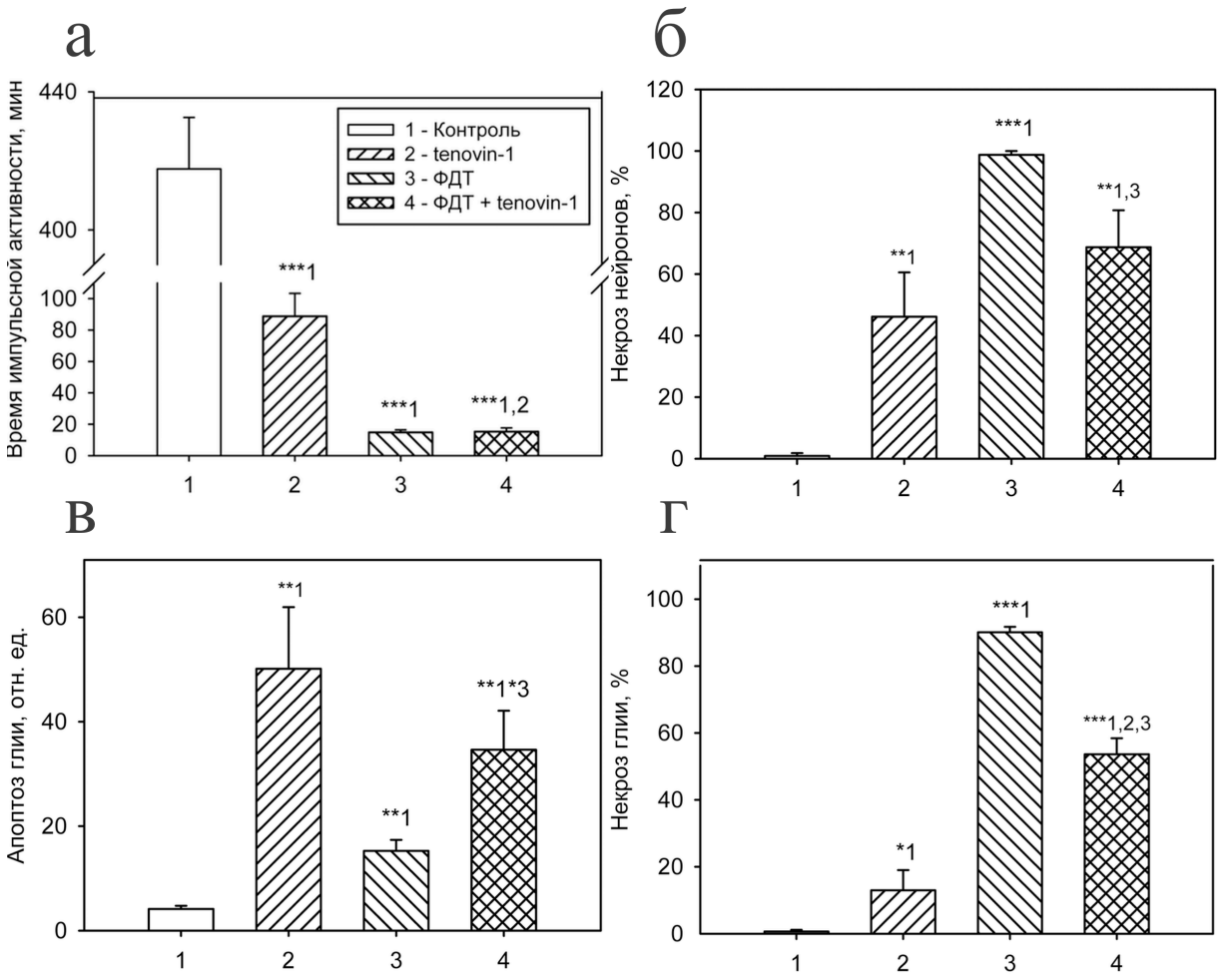


Рисунок 30. (а–г) Влияние активатора p53 теновина-1 (10 мкМ) на продолжительность импульсной активности нейрона , уровень некроза нейронов и глиальных клеток, и уровень апоптоза глиальных клеток в темноте и при ФДТ с 75 нм Фотосенса. 1 - контроль, 2 - влияние теновина-1 в темноте, 3 - ФДТ, 4 - ФДТ в присутствии теновина-1. * p <0,05, *** p <0,001 [Sharifulina и Uzdensky, 2015]

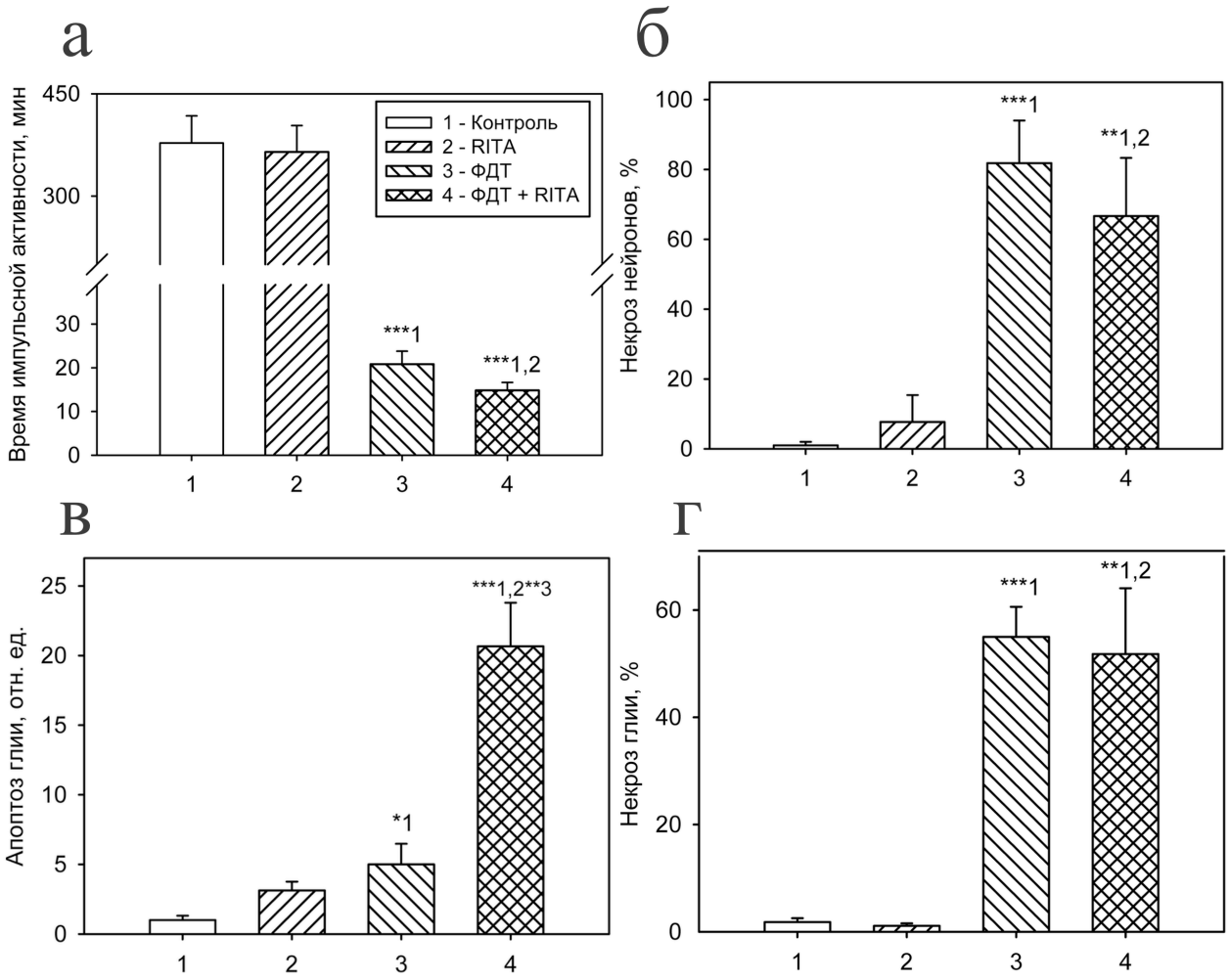


Рисунок 31. (а–г) Влияние активатора p53 RITA (10 мкМ) на продолжительность импульсной активности нейрона , уровень некроза нейронов и глиальных клеток, и уровень апоптоза глиальных клеток в темноте и при ФДТ с 75 нм Фотосенса. 1 - контроль, 2 - влияние RITA в темноте, 3 - ФДТ, 4 - ФДТ в присутствии RITA. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 [Sharifulina и Uzdensky, 2015]

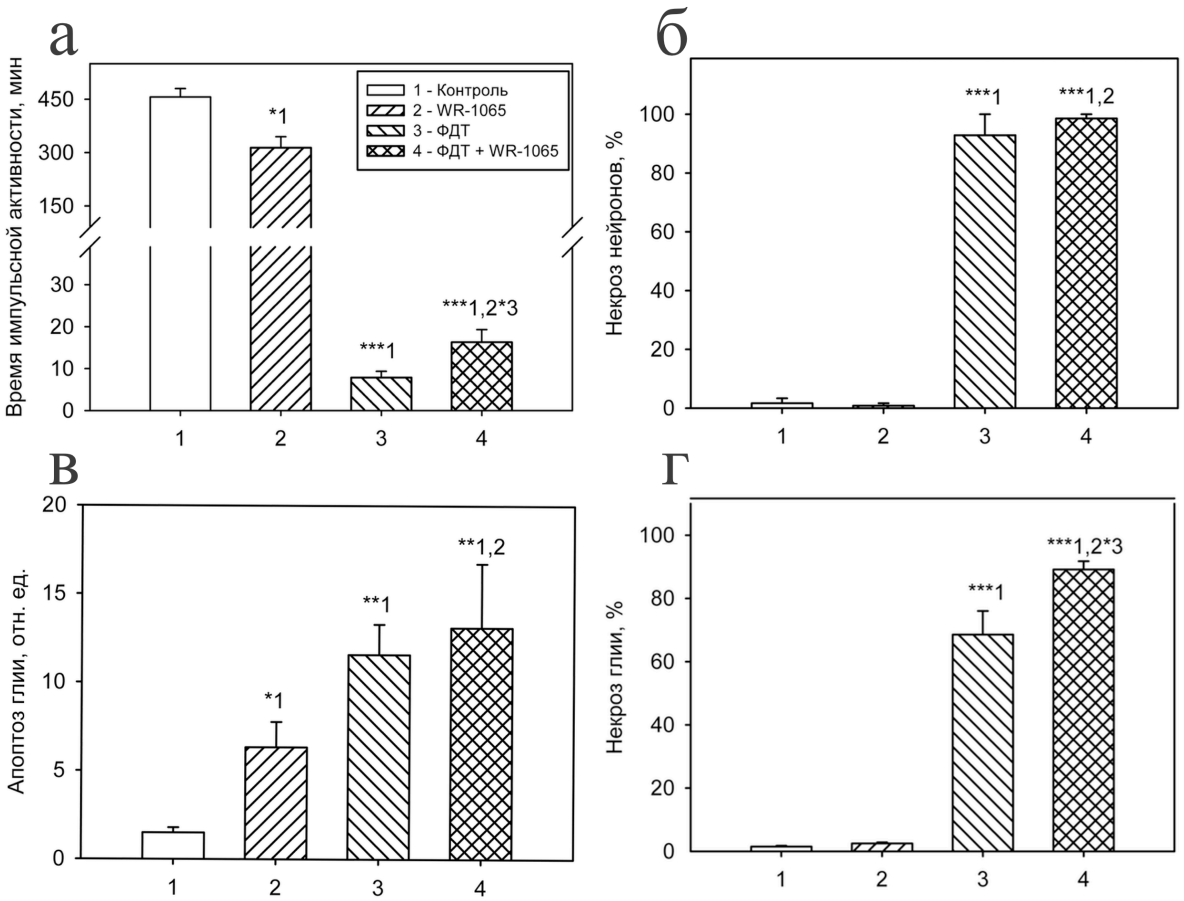


Рисунок 32. (а – г) Влияние активатора p53 WR-1065 (100 мкМ) на продолжительность импульсной активности нейрона , уровень некроза нейронов и глиальных клеток, и уровень апоптоза глиальных клеток в темноте и при ФДТ с 75 нм Фотосенса. 1 - контроль, 2 - влияние WR-1065 в темноте, 3 - ФДТ, 4 - ФДТ в присутствии WR-1065. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 [Sharifulina и Uzdensky, 2015]

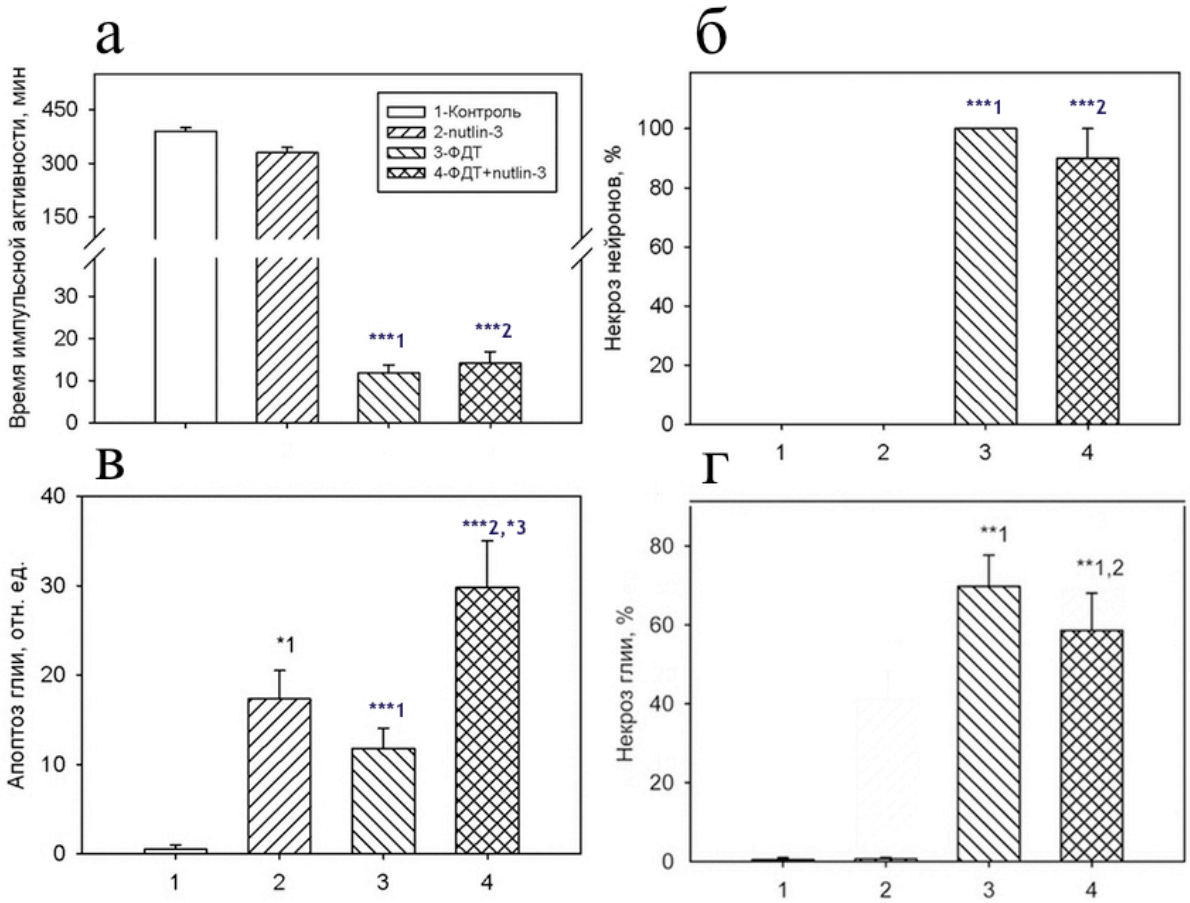


Рисунок 33. (а–г) Влияние активатора p53 нутлина-3 (1 мкМ) на продолжительность импульсной активности нейрона , уровень некроза нейронов и глиальных клеток, и уровень апоптоза глиальных клеток в темноте и при ФДТ с 75 нм Фотосенса. 1 - контроль, 2 - влияние нутлина-3 в темноте, 3 - ФДТ, 4 - ФДТ в присутствии нутлина-3. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 [Sharifulina и Uzdensky, 2015]

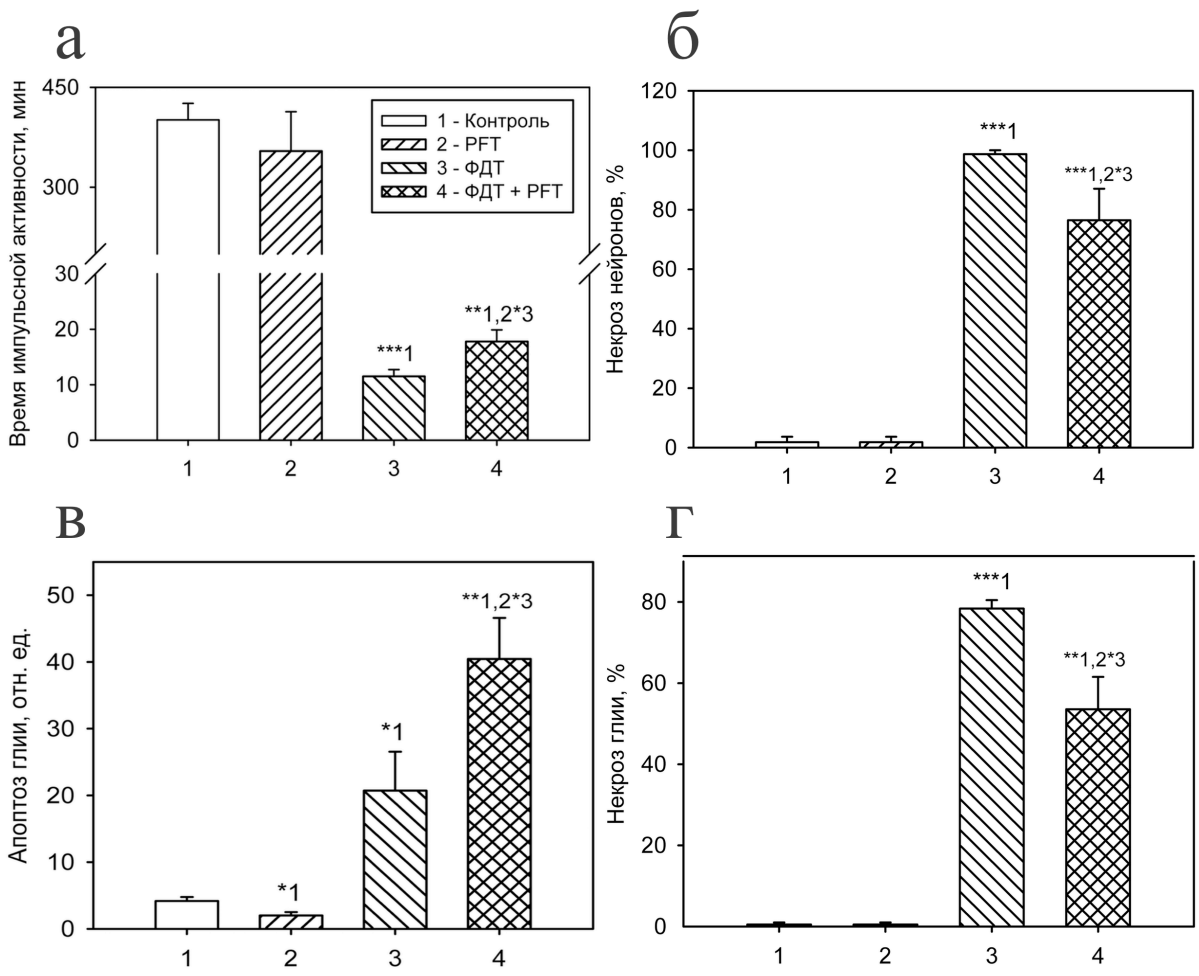


Рисунок 34. (а–г) Влияние ингибитора p53 пифитрина-α (PFT, 0,5 мкМ) на продолжительность импульсной активности нейрона , уровень некроза нейронов и глиальных клеток, и уровень апоптоза глиальных клеток в темноте и при ФДТ с 75 нм Фотосенса. 1 - контроль, 2 - влияние пифитрина-α в темноте, 3 - ФДТ, 4 - ФДТ в присутствии пифитрина-α. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 [Sharifulina и Uzdensky, 2015]

Данные результаты показали, что в темноте активация p53 теновином-1 или WR-1065 индуцировали апоптоза ГК, в то время как его ингибирование PFT снижала уровень апоптоза, что указывает на участие p53 в апоптозе глии. Также полученные данные показывают, что p53 регулирует и некроз нейронов и ГК, что может быть связано с ингибированием теновином-1 деацетилазы SIRT2, необходимой для запрограммированного некроза.

3.5 Изменения в экспрессии белков, участвующих в эпигенетической регуляции в брюшной нервной цепочке речного рака при ФД-воздействии

Опыты на БНЦ рака проводились через 2 и 11 часов после ФД воздействия. Через 2 часа более, чем на 30% повышались уровни белков, оказывающих негативное влияние на процессы транскрипции и белкового синтеза (таблица 2): гистондеацетилаз HDAC-1, HDAC-11 и HDRP/MITR (HDAC-9), которые снимают активирующее влияние ацетилирования гистонов на экспрессию генов; белка KAISO, который связывается с метилированным цитозином и подавляет транскрипцию, аргингинметилтрансфераз PRMT5, PRMT6, регулирующие транскрипционную регрессию. Увеличение уровня HDAC-1, HDAC-11, KAISO и PRMT5 наблюдалось и через 11 часов после ФДТ, также как и фосфорилированного гистона H2AX, что указывает на экспрессию белков, ответственных за репарацию двухнитевых разрывов ДНК. Через 2 часа после ФДТ повышался уровень белков, регулирующих пролиферацию: E2F4, c-Myc, усиливающего активность ацетилтрансфераз гистонов, и AP-1/c-Jun, участвующий в ответе клетки на внешнее воздействие. Белок AP-1, как транскрипционный фактор, участвует в регуляции окислительного статуса. Активация c-Jun происходит в ответ на повреждения ДНК и стрессовые воздействия [Lopez-Bergami et al., 2010]. Повышение через 2 часа после ФДТ экспрессии импортинов-α5/7 свидетельствует об импорте цитоплазматических белков в ядро.

Снижение уровня ингибиторов транскрипции SIR2, MeCP2, MBD2ab, SUV39H1 и MTA1 свидетельствует о противоположной тенденции в процессах транскрипционной регрессии (таблица 2, продолжение). Одновременно происходило снижение уровня активатора транскрипции - Brm, помогающего транскрипционным факторам получить доступ к нуклеотидным последовательностям ДНК.

Таблица 2. Более 30% увеличение (опыт/контроль) экспрессии эпигенетических белков в брюшной нервной цепочке рака через 2 и 11 часов после ФД воздействия

		2 часа после ФДТ		**11 часов после ФДТ**	
Наименование белка	Функциональная активность	**Опыт/ контроль**	SD	**Опыт/ контроль**	SD
AP-1/ c-Jun	Фактор транскрипции. Участвует в регуляции баланса между выживанием и гибелью клеток при различных воздействиях	**2,98**	0,57	1,13	0,4
c-Myc	Фактор транскрипции, усиливает активность ацетилтрансфераз гистонов	**1,46**	0,23	1,24	0,09
E2F4	Фактор транскрипции. Контролирует клеточное деление	**1,34**	0,07	1,12	0,09
импортин-α 5/7	Транспорт белков в ядро	**1,42**	0,03	1,22	0,5
PRMT5	Аргингинметилтрансфераза. Регулирует сигналинг, транскрипцию. Ингибирует p53, контролирует процессы выживания и пролиферации клеток	**1,43**	0,01	**1,37**	0,07
PRMT6	Аргингинметилтрансфераза. Регулирует сигналинг, транскрипцию.	**1,41**	0,03	1,14	0,08
HDRP/MITR (HDAC9)	Гистондеацетилаза. Снимает активирующее влияние ацетилирования гистонов на экспрессию генов	**1,35**	0,15	1,17	0,04
HDAC-11	Гистондеацетилаза. Снимает активирующее влияние ацетилирования гистонов на экспрессию генов	**1,34**	0,07	**1,42**	0,25
HDAC-1	Гистондеацетилаза. Снимает активирующее влияние ацетилирования гистонов на экспрессию генов	**1,49**	0,05	**1,57**	0,1
KAISO	Связывается с метилированным цитозином и подавляет транскрипцию	**1,38**	0,04	**1,31**	0,01
Phospho Histone H2AX (pSer139)	Маркер разрывов ДНК и стимулятор репарации	**1,35**	0,06	**1,42**	0,1
Ac&Ph Histone H3 (pSer10, Ac-Lys9)	Стимулирует транскрипцию генов	1,03	0,08	**1,36**	0,1
CENP-E	Связан с центромерой. Регулятор митоза.	1,18	0,02	**1,45**	0,02
AURORA-B	Серин/треонинкиназа. Регулятор митоза. Участвует в фосфорилировании гистона H3	1,21	0,34	**1,45**	0,03

Таблица 2. Продолжение. Более 30% уменьшение (контроль/опыт) экспрессии эпигенетических белков в брюшной нервной цепочке рака через 2 и 11 часов после ФД воздействия

		2 часа после ФДТ		**11 часов после ФДТ**	
Наименование белка	Функциональная активность	**Контроль/ опыт**		**Контроль/ опыт**	
Brm/snf2a	Активатор транскрипции	**1,35**	0,06	1,18	0,22
FOXC2	Фактор транскрипции. участвует в росте клеток, пролиферации, дифференцировки	**1,32**	0,13	1,06	0,02
SUV39H1	Регулятор митоза. Метилирует гистон Н3	**1,55**	0,04	1,18	0,09
MTA1/ MTA1L1	Белок метастазирования. Ингибитор транскрипции через взаимодействие с HDAC-1	**1,35**	0,05	1,16	0,04
SIR 2	Гистондеацетилаза. Снимает активирующее влияние ацетилирования гистонов на экспрессию генов	**1,40**	0,08	1,20	0,02
MeCP2	Метил-CpG-связывающий белок Ингибирует транскрипцию, привлекая HDAC	**1,32**	0,06	1,12	0,03
MBD2ab	Метил-CpG-связывающий белок Ингибирует транскрипцию, привлекая HDAC	**1,67**	0,28	1,23	0,03
MBD4	Метил-CpG-связывающий белок Ингибирует транскрипцию, привлекая HDAC	1,17	0,4	**1,79**	0,11
HDAC-10	Гистондеацетилаза. Снимает активирующее влияние ацетилирования гистонов на экспрессию генов	1,24	0,09	**1,65**	0,16
HDAC-4	Гистондеацетилаза. Снимает активирующее влияние ацетилирования гистонов на экспрессию генов	1,26	0,05	**1,91**	0,21

Через 2 часа после ФДТ понижались уровни белков, ингибирующих транскрипцию: MeCP2, MBD2ab, связывающихся с метилированными цитозинами в промоторных участках генов и ингибирующих транскрипцию, привлекая гистондеацетилазы, удаляющие ацетильные группы с гистонов, белка метастазирования, MTA1, который взаимодействуя с HDAC1, участвует в процессах репрессии транскрипции, гистондеацетилазы SIR2, снимающей активирующее влияние ацетилирования гистонов на экспрессию генов, метилтрансферазы SUV39H1, метилирующей гистон H3 с образованием метки репрессии; фактора транскрипции FOXC2, который играет важную роль в регуляции экспрессии генов, участвующих в росте клеток, пролиферации, дифференцировке (таблица 2).

Через 11 часов после ФДТ на БНЦ повышались уровни белков, связанных с делением клетки: регулятора митоза CENP-E, связанного с центромерой, серин/треонинкиназы AURORA-B, связанной с центромерой и участвующей в фосфорилировании гистона H3, а также уровень ацетилированного по лизину 9 и фосфорилированного по серину 10 гистона H3, что приводит к ингибированию процессов экспрессии генов. Одновременно понижались уровни белков, оказывающих негативное влияние на процессы транскрипции и белкового синтеза: гистондеацетилаз HDAC-4, HDAC-10, и белка MBD4, привлекающего гистондеацетилазы, удаляющие ацетильные группы с гистонов.

Таким образом, ФД воздействие вызывает изменения в уровне экспрессии белков, участвующих в регуляции транскрипции (HDAC-1,-9,-10,-11, Sir2, MTA1, KAISO, PRMT5,6); ядерном транспорте (Importin alpha5/7); репарации ДНК (Phospho Histone H2AX (pSer139)); пролиферации и выживаемости клеток (AP-1/c-Jun, E2F4, FOXC2). Изучение белков, регулирующих экспрессию генов и перестройки хроматина в нервной ткани при ФДТ, также проводилось на еще одном модельном объекте более сложной организации клеток - на мозге мыши.

3.6 Изменения в экспрессии белков, участвующих в эпигенетической регуляции в коре головного мозга мыши при ФД-воздействии

Через 1 час после ФД воздействия на мозг мыши, как и в случае БНЦ, повышались уровни белков, оказывающих негативное влияние на процессы транскрипции и белкового синтеза (таблица 3): гистондеацетилаз HDAC-1, HDAC-11, белка KAISO. Увеличение через 1 час после ФДТ уровня фосфорилированного гистона H2AX, что указывает на экспрессию белков, ответственных за репарацию двухнитевых разрывов ДНК. Также происходило повышение уровня регулятора митоза CENP-E. Повышался уровень диметилирования гистона H3, что говорит об активации процессов сайленсинга генов. Уровень же аргингинметилтрансферазы PRMT5 повышался только через 4 часа после ФДТ, также как и белков AP-1/c-Jun, E2F4, регулирующих пролиферацию и выживаемость клетки, и отвечающего за транспорт белков в ядро импортин-α 5/7.

Понижение уровней белков PABP, который участвует в терминации транскрипции, и PML, который участвует в репликации и репарации ДНК и регулирует апоптоз, наблюдалось только через 1 час после ФДТ (таблица 3). Через 1 и 4 часа после ФДТ происходило понижение уровней белков, также как и в БНЦ через 2 часа после ФДТ, ингибирующих транскрипцию: MTA1, FOXC2. Также происходило снижение уровня метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы ABH1, что свидетельствует об ингибировании процессов репарации ДНК, и ДНК-метилтрансферазы G9a, свидетельствующее об эпигенетическом сайленсинге. Только через 4 часа после ФДТ снижался уровень активатора транскрипции Brm и гистондеацетилаз SIR 2, HDAC-10, что аналогично их снижению уровня в БНЦ (таблица 3).

Таблица 3. Более 30% увеличение (опыт/контроль) уровня эпигенетических белков в коре головного мозга мыши через 1 и 4 часа после ФДТ

		1 час после ФДТ		**4 часа после ФДТ**	
Наименование белка	Функциональная активность	**Опыт/ контроль**	SD	**Опыт/ контроль**	SD
Phospho Histone H2AX (pSer139)	Маркер разрывов ДНК и стимулятор репарации	**1,37**	0,04	1,21	0,02
CENP-E	Связан с центромерой, Регулятор митоза	**1,35**	0,7	1,06	0,3
Dimethylated histone H3 (H3K9me2)	Приводит к эпигенетическому сайленсингу	**1,35**	0,02	1,2	0,05
HDAC-1	Гистондеацетилаза. Снимает активирующее влияние ацетилирования гистонов на экспрессию генов	**1,33**	0,13	1,3	0,22
HDAC-11	Гистондеацетилаза. Снимает активирующее влияние ацетилирования гистонов на экспрессию генов	**1,36**	0,02	1,28	0,02
KAISO	Связывается с метилированным цитозином и подавляет транскрипцию	**1,31**	0,06	1,27	0,01
PRMT5	Аргингинметилтрансфераза. Регулирует сигналинг, транскрипцию. Ингибирует p53, контролирует процессы выживания и пролиферации клеток	1,26	0,08	**1,37**	0,01
AP-1/c-Jun	Фактор транскрипции. участвует в регуляции баланса между выживанием и гибелью клеток при различных воздействиях	1,08	0,04	**5,43**	2,37
E2F4	Фактор транскрипции. Контролирует клеточное деление	1,1	0,04	**1,3**	0,3
импортин-α 5/7	Транспорт белков в ядро	1,23	0,09	**1,34**	0,04

Таблица 3. Продолжение. Более 30% уменьшение (контроль/опыт) уровня эпигенетических белков в коре головного мозга мыши через 1 и 4 часа после ФДТ

		1 час после ФДТ		**4 часа после ФДТ**	
Наименование белка	Функциональная активность	**Контроль /опыт**	SD	**Контроль /опыт**	SD
PABP	Poly(A)-связывающийся белок. Участвует в терминации транскрипции	**1,38**	0,07	1,14	0,06
PML	Участвует в репликации и репарации ДНК, регулирует апоптоз	**1,41**	0,15	1,27	0,16
FOXC2	Фактор транскрипции. участвует в росте клеток, пролиферации, дифференцировки	**1,44**	0,08	**1,41**	0,16
ABH1	Деметилирует 3-метилцитозин ДНК. Участвуют в репарации ДНК	**1,5**	0,22	**1,5**	0,3
MTA1/MTA1L 1	Белок метастазирования. Ингибитор транскрипции через взаимодействие с HDAC-1	**1,93**	0,34	**1,47**	0,11
G9a	Метилтрансфераза гистонов Приводит к эпигенетическому сайленсингу	**1,75**	0,05	**1,5**	0,29
Brm/snf2a	Активатор транскрипции	1,27	0,08	**1,38**	0,07
SIR 2	Гистонодеацетилаза. Снимает активирующее влияние ацетилирования гистонов на экспрессию генов	1,2	0,11	**1,3**	0,05
HDAC-10	Гистондеацетилаза. Снимает активирующее влияние ацетилирования гистонов на экспрессию генов	**1,51**	0,09	**1,41**	0,16

Таким образом, ФДТ воздействие в мозге мыши, как и в БНЦ, вызывало изменения уровня эпигенетических белков, регулирующих транскрипцию, репарацию ДНК, ядерный импорт, пролиферацию и выживание клеток. В отличие от БНЦ изменялись уровни белков PABP и PML, участвующих в терминации транскрипции и регуляции апоптоза, а также ABH1, регулирующего репарацию ДНК, метилтранферазы G9a и диметилированной формы гистона H3, приводящих к эпигенетического сайленсингу.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Метилирование ДНК является основным эпигенетическим процессом управления транскрипцией генов. Гены, регулируемые метилированием ДНК, участвуют в регуляции клеточного выживания, пролиферации и апоптозе [Baylin, 2005; Robertson и Jones, 2000]. Функционирование и выживаемость нейронов также контролируется метилированием ДНК [Zawia et al, 2009]. Ингибиторы DNMT 5-азацитидин и децитабин защищали глиальные клетки речного рака, но не нейроны от ФД-индуцированного некроза (таблица 4), что говорит об участии DNMT в ФД-индуцированном некрозе ГК. Но механизм действия этих препаратов может быть более сложным. ДНК-деметилирование, вызванное 5-азацитидином или децитабином, активирует экспрессию молчащих генов через деконденсацию хроматина. Это активизирует экспрессию генов [Haaf, 1995]. Например, децитабин помимо ингибирования ДНК-метилтрансферазы, вызывает истощение DNMT1 и активирует экспрессию генов-супрессоров опухолевого роста таких как p16INK4a, p15INK4b, hMLH1, ВХЛ, APC, PRB, и BRCA1 [Alcazar et al., 2012]. И 5-азацитидин, и децитабин демонстрировали общую цитотоксичность, связанную с метилированием ДНК. Например, в клетках PC12 децитабин достоверно увеличивал продукцию активных форм кислорода (ROS), индуцированное окислительным стрессом, что вело к апоптозу [Kong et al., 2012]. В нормальных лимфоцитах децитабин также как и HDAC ингибиторы - бутират или SAHA, стимулировал выработку АФК и апоптоз. Сочетание этих ингибиторов обуславливало синергетический эффект [Brodská, 2011].

Таблица 4. Влияние ингибиторов ДНК-метилтрансфераз на продолжительность импульсной активности нейронов и выживаемость МРН и клеток глии после инкубации в темноте, и после дополнительного фотодинамического воздействия. Только достоверные изменения (p <0,05) показаны

Ингибиторы ДНК-метилтрансфераз	Время импульсной активности нейрона	Некроз нейронов	Некроз глии	Апоптоз глии
В темноте				
5-азацитидин (10мкМ)	-	-	↑	-
децитабин (10 мкм)	-	-	-	-
ФДТ				
5-азацитидин (10мкМ)	-	-	↓	-
децитабин (10 мкм)	-	-	↓	-

Результаты исследований показали, что 5-азацитидин, но не децитабин, ингибирует проапоптотический белок p53 и активирует каспазы, вызывающие апоптоз опухолевых клеток [Venturelli et al., 2013].

Результаты нашего исследования, показавшие повышение ФД-индуцированного апоптоза ГК в присутствии 5-азацитидина, согласуются с этими данными. Но в отличие от пронекротического эффекта 5-азацитидина на ГК в темноте, 5-азацитидин и децитабин, оказывают антинекротический эффект для фотосенсибилизированных глиальных клеток. Это может быть связано с увеличением экспрессии некоторых генов, которые еще не идентифицированы.

Деацетилирование гистонов ингибирует экспрессию гена. Ацетилирование гистонов зависит от баланса между ацетилазами и деацетилазами гистонов [Konsoula и Barile, 2012]. В нейродегенеративных заболеваний, таких как боковой амиотрофический склероз, болезнь Альцгеймера и Паркинсона, этот баланс нарушен [Pahan, 2006]. HDAC ингибиторы - вальпроат, трихостатин А, бутират натрия и др. демонстрируют нейропротекторные свойства при нейродегенеративных заболеваниях. Они также защищают нейроны от глутамат токсичности и окислительного стресса [Kanai et al., 2004; Harrison, 2013]. Влияние на выживаемость клеток этих препаратов связано с ингибированием гистодеацетилаз и транскрипционной активацией экспрессии белков, обладающих нейропротекторным действием, таких как BDNF, GDNF, HSP70, BLC 2, Bcl-XL и т.д. [Zhou et al., 2011].

Вальпроат, трихостатин А перспективны для лечения различных нейродегенеративных заболеваний [Harrison, 2013; Pahan, 2006]. В наших экспериментах вальпроат и трихостатин А подавляли ФД-индуцированную гибель глиальных клетках, но не нейронов (таблица 5). ФД-индуцированной сдвиг баланса между ацетилазами и деацетилазами гистонов в сторону деацетилирования гистонов участвует как в некрозе, так и в апоптозе глиальных клеток. Апоптоз регулируется сложной сигнальной системой, которая находится под контролем эпигенетических механизмов. В отличие от глиальных клеток, апоптоз ядер нейронов рецептора растяжения речного рака не наблюдался. Программа апоптоза в такой клетке внутренне заблокирована [Uzdensky et al, 2002, 2005, 2007]. Эпигенетические регуляторы стимулируют транскрипцию генов, возможно, этот процесс более интенсивен в ГК, чем в нейроне, в котором необходимые гены уже экспрессированы.

Таблица 5. Влияние ингибиторов гистондеацетилаз на продолжительность импульсной активности нейронов и выживаемость МРН и клеток глии после инкубации в темноте, и после дополнительного фотодинамического воздействия. Только достоверные изменения (p <0,05) показаны

Ингибиторы гистондеацетилаз	Время импульсной активности нейрона	Некроз нейронов	Некроз глии	Апоптоз глии
В темноте				
Вальпроат (0,5 мМ)	↓	-	-	-
трихостатина А (100 нМ)	-	-	-	-
SBHA (5 мкМ)	↓	-	-	↑
ФДТ				
Вальпроат (0,5 мМ)	-	-	↓	↓
трихостатина А (100 нМ)	-	-	↓	↓
SBHA (5 мкМ)	-	-	↓	↓

Таким образом, в фотосенсибилизированном МРН эпигенетические процессы, такие как метилирование ДНК и деацетилирование гистонов принимают участие в ФД-индуцированном некрозе глии, но не нейронов. Деацетилирование гистонов также вовлечено в регулирование апоптоза глии.

Одним из регуляторов апоптоза является белок p53. Он индуцирует экспрессию различных про-апоптотических белков. Тем не менее, повреждение ДНК не характерно для фотодинамического повреждения клеток, потому что большинство фотосенсибилизаторов не локализуются в ядре. Тем не менее, участие p53 в ФДТ гибели клеток было продемонстрирована рядом авторов [Tong et al., 2000; Heinzelmann-Schwarz et al., 2003; Zawacka-Pankau, 2008]. p53 может регулировать выживаемость и смерть клеток через альтернативные, ДНК-независимые пути передачи сигналов. Это может быть активация сигнальных путей, связанных с Ca2 +/калпаин, AMPK, JNK и p38 MAP-киназами, или ингибированием Akt / MDM2; ASK1 / JNK; Sirtuin и других сигнальных путей [Culmsee и Mattson, 2005; Berliocchi et al., 2005]. Результаты данной работы показали различные роли p53 в ФД-индуцированной гибели изолированного нейрона и окружающих глиальных клеток (таблица 6). В темноте активация p53 теновином или WR-1065 индуцировала апоптоз ГК, в то время как его ингибирование посредством PFT имело антиапоптозный эффект, что свидетельствует о вовлечении p53 в апоптоз клеток глии.

Данные об участии p53 в ФД-индуцированной смерти клеток достаточно противоречивы в литературе. Некоторые авторы показали, что p53 усиливает ФД-индуцированный некроз клеток [Zawacka-Pankau et al., 2008; Komandirov et al., 2011], в то время как другие демонстрировали p53-индуцированное снижение апоптоза [Heinzelmann-Schwarz et al., 2003]. Эти эффекты могут быть связаны с ФД-индуцированной сверхэкспрессией p53 [Tong, et al., 2000]. Таким образом, p53 играет проапоптотическую роль при ФД воздействии. Повышение апоптоза ГК в присутствии ингибитора p53 пифитрина-α противоречит его нейропротекторной активности [Zawacka-Pankau et al., 2008].

Таблица 6. Влияние различных p53 модуляторов на продолжительность импульсной активности нейронов и выживаемость МРН и клеток глии после инкубации в темноте, и после фотодинамического воздействия. Только достоверные изменения (p <0,05) показаны

Модуляторы p53	Время импульсной активности нейрона	Некроз нейронов	Некроз глии	Апоптоз глии
В темноте				
Активаторы				
Tenovin-1 (10 μM)	↓	↑	↑	↑
WR-1065 (100 μM)	↓	-	-	↑
RITA (10 μM)	-	-	-	-
Nutlin-3 (1 μM)	-	-	-	↑
Ингибитор				
Pifithrin-α (0.5 μM)	-	-	-	↓
ФДТ				
Активаторы				
Tenovin-1 (10 μM)	-	↓	↓	↑
WR-1065 (100 μM)	↑	-	↑	-
RITA (10 μM)	-	-	-	↑
Nutlin-3 (1 μM)	-	-	-	↑
Ингибитор				
Pifithrin-α (0.5 μM)	↑	↓	↓	↑

Наши данные, указывающие на анти-некротическую активность теновин-1, коррелируют с нахождениями Нараян и др. [Narayan et al., 2012], в которых показано, что SIRT2 требуется для запрограммированного некроза и его ингибирование теновином-1 защищает клетки от пронекротического воздействия, таких как ишемический инсульт или инфаркт миокарда. Анти-некротический эффект p53 может быть, по крайней мере частично, связан с ослаблением активации каспаз [El-Gibaly et al., 2004].

Таким образом, эксперименты с различными модуляторами активности p53 показали вовлечение p53 в апоптоз глиальных клеток, вызванных ФДТ и в темновых условиях. p53 регулирует не только апоптоз, но и некроз нейрона и глиальных клеток. Его химические модуляторы также влияют на изменения в импульсной активности нейронов и некроз нейронов и глии, вызванных ФДТ или в темноте (таблица 6).

Согласно данным нашего исследования ФДТ влияет на экспрессию белков, участвующих в эпигенетической регуляции транскрипции, репарации ДНК, транспорте ядерных белков, пролиферации и клеточном выживании в БНЦ и в коре головного мозга мыши. Эти изменения зависят от интервала времени после ФДТ. Изменения в экспрессии некоторых белков происходили только после 1 или 2 часа после ФДТ, другие - через 4 и 11 ч; экспрессия некоторых белков увеличивалась или уменьшалась в обоих временных интервалах.

В БНЦ в отличие от коры головного мозга мыши происходило фотоиндуцированное увеличение активности ацетилтранфераз гистонов, о чем свидетельствует повышение уровня фактора транскрипции c-Myc. Снижение уровня метил-CpG-связывающих белков MeCP2, MBD2ab, MBD4, которые взаимодействуют с гистондеацетилазами, наблюдалось только в БНЦ при ФДТ и указывает на процессы подавления транскрипции.

Через 11 часов после ФДТ в БНЦ также наблюдалось повышение уровня фосфорилирования гистона H3, одновременно фосфорилированного по серину

10 и ацетилированного по лизину 9, что указывает на активацию транскрипции. Возможно, это было связано с одновременным 42-процентным повышением экспрессии серин/треонинкиназы AURORA-B, которая участвует в фосфорилировании гистона H3. Уровень белка SUV39H1, метилирующего гистон H3 по лизину 9, снижался на 55 % через 11 часов после ФД воздействия. Метилирование гистона H3 по лизину 9, осуществляемое SUV39H1, подавляет транскрипцию различных генов. Поэтому снижение уровня SUV39H1 может положительно влиять на генную экспрессию.

Метилирование аргинина в белках, осуществляемое аргинин-метилтрансферазами (PRMT) играет важную роль в сигнальной трансдукции, регуляции транскрипции, сплайсинге и т.д. [Krause et al., 2007]. В частности, метилирование аргинина в гистонах может играть как положительную, так и негативную роль в регуляции транскрипции. В наших экспериментах экспрессия аргинин-метилтрансферазы PRMT5 повышалась на 37-43% через 2 и 11 часов и PRMT6 на 41 % через 2 часа после ФД. Хотя известно, что PRMT5 может метилировать гистон H3 по аргинину 8, а гистон H4 - по аргинину 3, и это подавляет экспрессию многих генов, последние данные указывают на более многообразные эффекты действия этого фермента. Например, он ограничивает активность ERK, одного из центральных белков клеточной сигнализации [Choi et al., 2003].

Увеличение на 42 % уровня импортина α4/5 в БНЦ, транспортирующего белки в ядро через ядерные поры, которое наблюдалось через 2 часа после фотосенсибилизации, вероятно, указывало на активацию метаболических процессов, связанную с усилением транскрипции.

На основании полученных данных можно построить схему защитных и повреждающих процессов в брюшной нервной цепочке речного рака при ФДТ (рисунок 35).

Рисунок 35. Схема защитных и повреждающих процессов, протекающих в брюшной нервной цепочке речного рака при фотодинамическом воздействии

Транскрипция эпигенетически регулируется модификациями гистонов. Через 1 час после ФДТ мы наблюдали изменения в экспрессии разнообразных эпигенетических белков, ведущих к общему подавлению транскрипционной активности и в коре головного мозга мыши. Метилирование ДНК зависит от активности белков Kaiso, HDAC [Yoon et al., 2003]. Это подавляет транскрипцию генов-мишеней, участвующих в некоторых сигнальных путях (например, Wnt). 38% снижение уровня экспрессии PABP, который участвует в терминации транскрипции [Kahvejian et al., 2001], и 44% снижение экспрессии фактора транскрипции FOXC2 также указывает на негативную регуляцию транскрипции генов в фотосенсибилизированной коре головного мозга мыши. FOXC2 непосредственно регулирует экспрессию некоторых генов, участвующих в ангиогенезе [Kume, 2008]. 38% подавление фактора реконструкции хроматина hBrm / hsnf2a, который активирует транскрипцию, указывает на подавление транскрипционной активности в коре головного мозга мыши.

Ацетилирование гистонов стимулирует транскрипцию и экспрессию генов. ФДТ вызывало повышение регуляции HDAC-1 и HDAC-11 на 28-36%, снижение уровня экспрессии HDAC-10 на 41-51% после 1-4 часа после ФДТ. Разница между ответами различных HDACs на ФДТ может быть связана с их различной локализацией и функциями в нервной системе. HDAC-1 и -11 широко экспрессируются в мозге млекопитающих, включая кору головного мозга. HDAC-1 локализуется в клеточных ядрах, в то время как HDAC-11 имеет двойную, ядерную и цитоплазматическую, локализацию [Chen et al., 2012]. HDAC-1 известен как молекулярный переключатель между выживанием и смертью нейронов. Его взаимодействие с HDAC-9 способствует выживаемости нейронов, в то время как взаимодействие с HDAC -3 приводит к гибели клеток [Bardai et al., 2012]. HDAC-10 находится в ядрах и цитоплазме дофамин- и норадреналин- нейронов [Kume, 2008]. HDAC-10 может присутствовать в аксонах этих нейронов, которые распространяются по

всему мозгу, или в глиальных клетках. Его функции в нервных клетках до сих пор неизвестны. Тем не менее, как показано на раковых клетках человека, снижение уровня экспрессии HDAC-10 может индуцировать экспрессию тиоредоксин-взаимодействующий белок (TXNIP), накопление АФК и апоптоз [Lee et al., 2010].

Через 4 ч после ФДТ мы наблюдали 30% снижение уровня NAD-зависимой гистондеацетилазы SIR2, которая участвует в клеточном метаболизме и регулирует активность транскрипции. Sirt1, гомолог у млекопитающих SIR2, как известно, регулирует устойчивость клеток к окислительному стрессу и предотвращает апоптоз [Alcendor et al., 2007]. Снижение уровня экспрессии SIR-2 в наших экспериментах может указывать на медленное снижение сопротивления нервной ткани мозга ФДТ-индуцированному окислительному стрессу.

Изменения в репарации ДНК и регуляции транскрипции были среди ранних ответов нервной ткани мозга на фотодинамическое воздействие. ФДТ не вызывает разрывы ДНК сама по себе, поскольку сенсибилизатор не проникает в ядро клетки. Тем не менее, ФД стимулирует апоптотическую фрагментацию ДНК.

Данные эксперименты показали значительное снижение уровня экспрессии MTA1 / MTA1L1 на 93 и 47% через 1 и 4 ч после ФДТ, соответственно. Этот белок участвует в репарации ДНК, регуляции устойчивости клеток и ранних стадиях апоптоза [Li et al., 2010]. Уровень PML, который также участвует в репарации ДНК, был снижен на 41% через 1 ч после ФДТ. Индукция PML является предшественником фрагментации ДНК в нейронах на 1 ч после ишемического повреждение [Hayashi et al, 2001]. 50% снижение экспрессии митохондриального белка hABH1 наблюдалось через 1 и 4 ч после ФДТ. Этот белок деметилирует 3-метилоцитозин в митохондриальной ДНК и РНК. hABH увеличивает выживаемость глиальных клеток [Sundheim et al., 2008]. Наблюдаемое подавление MTA1 / MTA1L1,

PML и hABH1 указывает на угнетение репарации ДНК. В результате, увеличивалась экспрессия (на 37%) фосфорилированный гистон H2AX (γH2AX), который участвует в репарации ДНК. Это свидетельствует о разрывах ДНК. Уровень γH2AX, как известно, увеличивается под действием УФ-излучения и на ранних стадиях апоптоза, но снижается постепенно в течение прогрессии апоптоза [Tanaka et al., 2007]. ФД-индуцированное повышение экспрессии γH2AX свидетельствует о возникновении двухнитевых разрывов ДНК.

Изменение в экспрессии белка, участвующего в регуляции клеточного цикла составило 35%. E (CENP-E), который участвует в митозе, обладал избыточной экспрессией через 1 ч после ФДТ. Через 4 ч после ФДТ мы наблюдали 30% повышение регуляции фактора транскрипции E2F4, который контролирует пролиферацию нервных клеток [Persengiev et al., 1999]. Эти данные согласуются с изменениями в уровне экспрессии метилтрансферазы PRMT5, которая метилирует аргинин в цитоплазматических белках и тем самым регулирует передачу сигнала, транскрипцию, сплайсинг и РНК транспорт. Будучи связанными с хроматин-комплексом hSWI / SNF, PRMT5 негативно регулируют транскрипцию генов. Уровень импортина α5 / 7 был увеличен на 34%. Этот белок участвует в импорте транскрипционных факторов, таких как NF-kB, в повышении транскрипции генов, участвующих в антиапоптотической защите и клеточной пролиферации [Fagerlund et al., 2008].

Таким образом, ФДТ вызывает изменения в уровне экспрессии белков, участвующие в эпигенетической стимуляции пролиферации клеток в коре головного мозга. Поскольку нейроны не способны к пролиферации, этот процесс может быть связан с распространением глиальных клеток, называемых также реактивный глиоз.

C-Jun, составляющий активную часть фактора транскрипции 1 (AP-1), участвует в регуляции клеточной пролиферации, дифференцировки и ответах

к стрессовым факторам и апоптозе. Избыточная экспрессия C-Jun участвует в апоптозе в нервных клетках [Behrens et al., 1999]. Более чем 5-кратное увеличение экспрессии AP-1 / C-Jun через 4 часа после ФДТ было наиболее значительным среди изученных белков. Это может указывать на запуск апоптотических процессов в коре головного мозга мыши.

На основании полученных данных можно построить схему защитных и повреждающих процессов в коре головного мозга мыши при ФДТ (рисунок 36). Таким образом, эпигенетические процессы вовлечены в механизмы повреждения нервной ткани при окислительном стрессе.

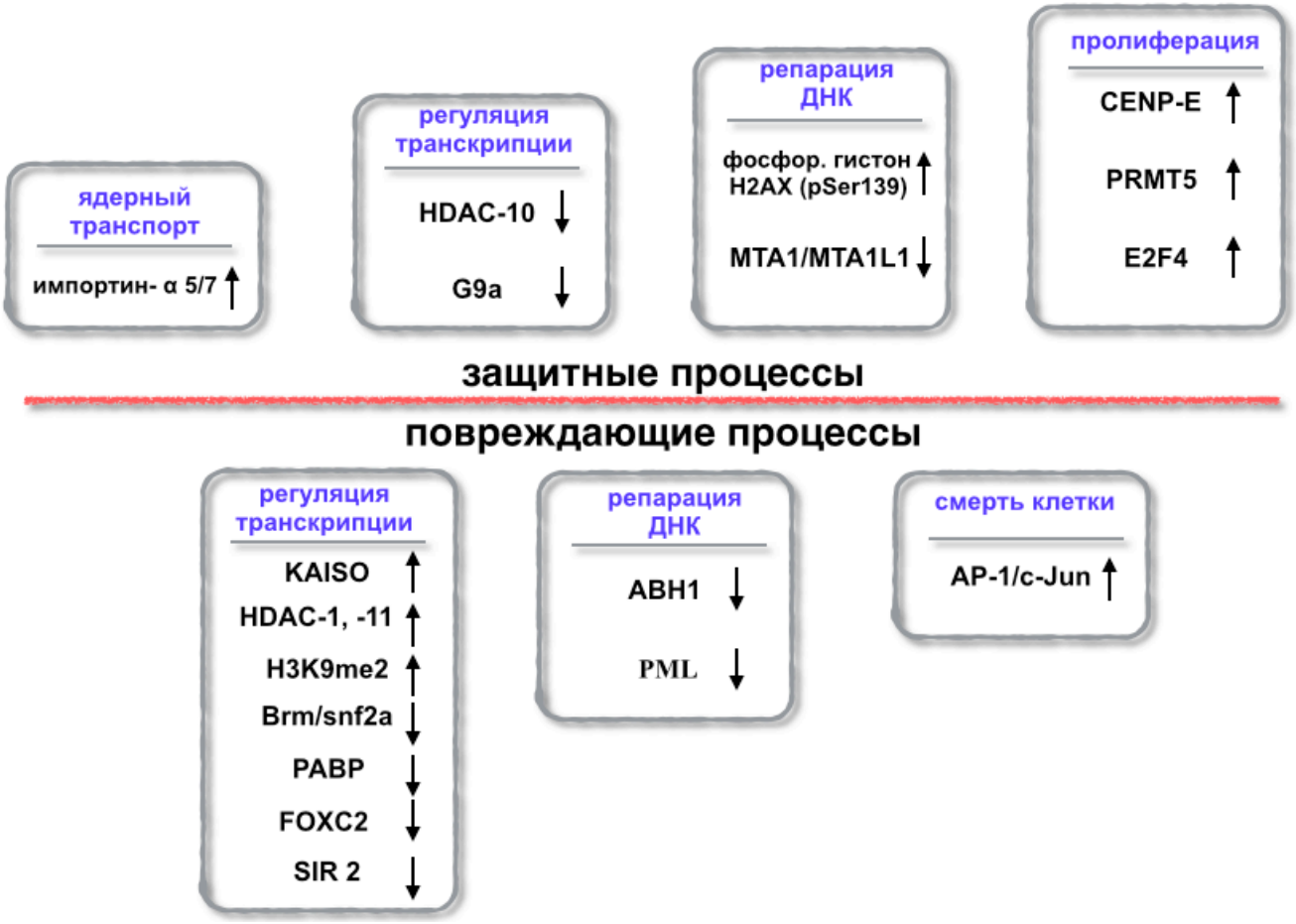


Рисунок 36. Схема защитных и повреждающих процессов, протекающих в коре головного мозга мыши при фотодинамическом воздействии

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эпигенетические процессы повреждения нервной ткани при окислительном стрессе пока мало изучены [Cyr и Domann, 2011], их роль в ФД повреждении мозга практически неизвестна. Мы исследовали эпигенетические механизмы, участвующие в регуляции реакции нервной ткани на ФДТ на биологических объектах разного уровня организации - механорецепторном нейроне речного рака, брюшной нервной цепочке речного рака, коре головного мозга мыши. Мы показали, что ингибирование метилирования ДНК посредством 5-азацитидина и децитабина защищает ГК, но не нейроны рака от ФД-индуцированного некроза, т.е. метилирование ДНК вовлечено в некроз ГК при ФДТ. Деацетилирование гистонов ингибирует экспрессию генов [Konsoula и Barile, 2012]. В наших экспериментах ингибиторы гистондеацетилаз вальпроат, трихостатин А и SBHA подавляли ФД-индуцированную гибель ГК, но не нейронов. Т.е. деацетилирование гистонов вовлечено в процессы некроза и апоптоза ГК при ФДТ. Одним из стимуляторов апоптоза, в ответ на повреждение ДНК, выступает белок p53. Как фактор транскрипции, он индуцирует экспрессию различных проапоптотических белков [Checler и Alves da Costa, 2014]. В нашей работе показано, что белок p53 вовлечен в апоптоз глиальных клеток при фотодинамическом воздействии.

Согласно данным нашего исследования ФДТ влияет на экспрессию белков, участвующих в эпигенетической регуляции транскрипции, репарации ДНК, транспорте ядерных белков, модификации гистонов, выживании клеток в БНЦ и коре головного мозга мыши. В БНЦ в отличие от коры головного мозга мыши происходило фотоиндуцированное увеличение активности ацетилтранфераз гистонов. Снижение уровня метил-CpG-связывающих белков

MeCP2, MBD2ab, MBD4, которые взаимодействуют с гистондеацетилазами, наблюдалось только в БНЦ при ФДТ и указывает на процессы подавления транскрипции.

Таким образом, эпигенетических механизмы участвуют в регуляции выживаемости и смерти глиальных клеток, но не нейронов при ФДТ.

Фотодинамическое воздействие вызывает изменения в уровне экспрессии эпигенетических белков, которые участвуют в регуляции транскрипции, ядерном импорте, апоптозе, модификации гистонов, репарации ДНК, пролиферации и выживаемости клеток в БНЦ и коре головного мозга мыши. ФД-индуцированные изменения уровня эпигенетических белков в БНЦ и коре головного мозга мыши зависят от временного интервала после фотодинамического воздействия и являются ткане- и видоспецифическими.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Изучение механизмов нейродегенерации и нейропротекции нормальной нервной ткани при фотодинамическом воздействии является актуальной задачей молекулярной фотобиологии, поскольку при ФДТ повреждаются не только злокачественные, но и окружающие их здоровые нейроны и глиальные клетки, что приводит к побочным эффектам и неврологическим расстройствам. Полученные нами данные об участии метилирования ДНК в фотоиндуцированном некрозе глиальных клеток, но не нейронов, деацетилирования гистонов в некрозе и апоптозе глии, но не нейронов речного рака при ФДТ, а также участии белка p53 в фотоиндуцированном апоптозе глиальных клеток речного рака могут быть использованы при оптимизации режимов ФДТ при клиническом применении.

Анализ литературы показывает, что роль эпигенетических процессов в регуляции нейропротекции более сложна, чем это предполагалось ранее. Например, некоторые изоформы гистондеацетилаз обладают защитными эффектами, а другие могут способствовать гибели клеток. Кроме того, большинство гистондеацетилаз способны перемещаться в цитоплазму клеток мозга при действии неблагоприятных факторов, где они влияют на функцию разнообразных белков не эпигенетическим образом. В дальнейших исследованиях необходимо изучить характер взаимодействия разных классов гистондеацетилаз и метилтрансфераз при фотоиндуцированном окислительном стрессе, полученные данные могут быть использованы при разработке селективных способов защиты здоровой нервной ткани при ФД повреждении.

Комплексная оценка когерентных изменений в массиве белков показывает их участие в эпигенетических процессах, что существенно

увеличивает понимание внутренней логики клеточных процессов и повышает надежность и обоснованность биологически ценных выводов [Hosack et al., 2003; Zhu et al., 2007]. Дальнейшие исследования изменений уровня экспрессии белков, вовлеченных в эпигенетическую регуляцию нервной ткани при ФДТ, должны быть направлены на изучение динамики экспрессии этих белков. Поскольку факторы транскрипции, контролирующие экспрессию эпигенетических белков, до сих пор мало изучены, в последующих исследованиях планируется выявить сигнальные пути, регулирующие экспрессию, транспорт, деградацию белков, участвующих в эпигенетических механизмах ответной реакции нервной ткани на фотодинамическое воздействие. Полученные результаты могут указывать на возможные маркеры для диагностики и лечения фотоокислительного повреждения головного мозга. Используя ингибиторы или активаторы эпигенетических белков, можно будет, в принципе, усилить фотоповреждение перерожденных клеток и защитить окружающую здоровую ткань.

ВЫВОДЫ

1. Ингибирование метилирования ДНК посредством 5-азацитидина и децитабина снижает уровень некроза глиальных клеток, но не нейронов рецептора растяжения рака, подвергнутых фотодинамическому воздействию, и при этом не влияет на апоптоз клеток глии. Следовательно, метилирование ДНК участвует в фотоиндуцированном некрозе, но не апоптозе глиальных клеток.

2. Ингибирование гистондеацетилаз посредством вальпроата, трихостатина А и SBHA снижает уровень фотоиндуцированного некроза и апоптоза глиальных клеток, но не некроза нейронов при ФДТ. Следовательно, деацетилирование гистонов участвует в ФД-индуцированном некрозе и апоптозе глиальных клеток рецептора растяжения речного рака.

3. Активирование белка p53 посредством теновина-1, RITA, нутлина-3 и WR-1065 повышает уровень фотоиндуцированного апоптоза глиальных клеток. Следовательно, белок p53 вовлечен в апоптоз глиальных клеток, вызванный фотодинамическим воздействием.

4. Фотодинамическое воздействие на брюшную нервную цепочку речного рака и кору мозга мыши вызывает изменения экспрессии эпигенетических белков, направленные на подавление транскрипционной активности: повышение уровня гистондеацетилаз HDAC-1 и -11, KAISO, PRMT5 и понижение уровня активатора транскрипции Brm. Снижение экспрессии гистондеацетилаз HDAC-10 и Sir2, репрессора транскрипции MTA1 способствует повышению транскрипционной активности.

5. Фотодинамическое воздействие на брюшную нервную цепочку речного рака и кору мозга мыши повышает экспрессию фактора транскрипции E2F4 и

белка CENP-E, регулирующих пролиферацию. Но при этом снижается уровень регулятора пролиферации FOXC2.

6. Фактор транскрипции AP-1/c-Jun, регулирующий выживание и смерть клеток, сверхэкспрессируется в нервной цепочке рака и мозге мыши через 2-4 часа после ФДТ.

7. Фотодинамическое воздействие на брюшную нервную цепочку речного рака и кору мозга мыши вызывает повышение экспрессии маркера репарации ДНК гистона H2AX, фосфорилированного по серину 139. В репарации ДНК в брюшной нервной цепочке не участвует белок ABH1, уровень которого в коре головного мозга мыши снижается при фотодинамическом воздействии.

8. Изменения уровня эпигенетических белков зависят от временного интервала после фотодинамического воздействия и являются ткане- и видоспецифическими.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

Акоев, Г.Н. Функциональная организация механорецепторов / Г.Н. Акоев, Н.П. Алексеев. – Ленинград: Наука, 1985. – 146 с.

Алексеев, Ю.В. Фотодинамическая терапия acne vulgaris с фотосенсибилизатором хлоринового ряда и УФ-излучением / Ю.В. Алексеев, Н.Н. Потекаев, Ю.Б. Макарова // Лазерная медицина. – 2004. – Т. 8. – № 3. – С. 133-134.

Артюхов, Г.В. Молекулярная биофизика: механизмы протекания и регуляции внутриклеточных процессов : учебное пособие / Г.В. Артюхов, О.В. Башарина. – Воронеж : ИПЦ ВГУ, 2012. – 219 с.

Владимиров, Ю.А. Физико-химические основы фотобиологических процессов / Ю.А. Владимиров, А.Я. Потапенко. – Москва: Дрофа, 2006. – 285 с.

Гейниц, А.В. Фотодинамическая терапия. История создания метода и ее механизмы / А.В. Гейниц, А.Е. Сорокатый, Д.М. Ягудаев, Р.С. Трухманов // Лазерная медицина. – 2007. – Т. 11. – № 3. – С. 42-46.

Говорун, В.М. Методы протеомики в современной биомедицинской науке / В.М. Говорун, А.И. Арчаков // Биохимия. – 2002. – № 67. – С. 1341-1359.

Голубев, А.М. Апоптоз при критических состояниях / А.М. Голубев, Е.Ю. Москалева, С.Е. Северин, Т.П. Веснянко, А.Н. Кузовлев, А.С. Алкадарский, Г.Г. Порошенко // Общая реаниматология. – 2006. – Т. 2. – № 5-6. – С. 184 – 190.

Дубинина, Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (Жизнь и смерть, созидание и разрушение) / Е.Е. Дубинина. – Санкт-Петербург: Медицинская пресса, 2006. – 400 с.

Ивахно, С. Количественная протеомика и ее применение в системной биологии / С. Ивахно, А. Корнелюк // Биохимия. – 2006. – № 71. – С. 1312 – 1327.

Ильинский, О.Б. Физиология сенсорных систем. Часть III. Физиология механорецепторов / О.Б. Ильинский. – Ленинград: Наука, 1975. – 560 с.

Красновский, А.А. (мл.) Фотодинамическая регуляция биологических процессов: первичные механизмы / А.А. Красновский (мл.). Проблемы регуляции в биологических системах. – Москва – Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», 2006. – 480 с.

Лапская, Ю. Пилюли для эпигенома / Ю. Лапская // Биомолекула. – 2013. – Режим доступа: http://biomolecula.ru/content/1355.

Лобанов, А.В. Нейтрофин NGF защищает глиальные клетки, но не нейроны рецептора растяжения рака Astacus astacus от фотоокислительного стресса / А.В. Лобанов, А.Б. Узденский // Ж Эвол Биохим Физиол. – 2007. – Т. 43. – С. 443-449.

Лобанов, А.В. Роль неироглиальных взаимодействий и кальциевой сигнальной системы в реакциях нейронов и глиальных клеток речного рака на фотодинамическое воздействие: автореф. дисс. на соискание ученой степени канд. биол. наук. – Ростов-на-Дону. – 2007. – 27 с.

Машанский, В.Ф. Гистохимическое и электронно-микроскопическое изучение нейронно-глиальных отношений в рецепторе растяжения речного рака / В.Ф. Машанский, С.Л. Загускин, Г.М. Федоренко // Цитология. – 1974. – Т. 16. – С. 770-773.

Толстых, П.И. Антиоксиданты и лазерное излучение в терапии ран и трофических язв / П.И. Толстых, Г.И. Клебанов, А.Б. Шехтер, М.П. Толстых. – Москва: ЭКО, 2002. – 240 с.

Узденский, А.Б. Клеточно-молекулярные механизмы фотодинамической терапии / А.Б. Узденский. – Санкт-Петербург: Наука, 2010. – 327 с.

Узденский, А.Б. Реакции нейронов и глиальных клеток рака на фотодинамическое воздействие: сигнальная регуляция, ультраструктурные изменения и нейроглиальные взаимодействия / А.Б. Узденский, А.В. Рудковский, Г.М. Федоренко, Е.В. Бережная, И.А. Ищенко, В.Д. Ковалева, М.А. Командиров, М.А. Негинская, А.М. Хайтин, С.А. Шарифулина // Биологические мембраны. – 2013. – Т. 30. № 5–6. – С. 334–349.

Узденский, А.Б. Реакции нейронов и глиальных клеток рака на фотодинамическое воздействие: факторы транскрипции и эпигенетическая регуляция / А.Б. Узденский, Е.В. Бережная, В.Д. Ковалева, М.А. Негинская, М.В. Рудковский, С.А. Шарифулина // Биологические мембраны. – 2015. – Т. 32. № 5–6. – С. 437–445.

Узденский, А.Б. Протеомный анализ сигнальных процессов в клетках глиобластомы человека, подвергнутых сублетальному фотодинамическому воздействию / А.Б. Узденский, А. Юзенине, Й. Моан // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. – 2011. – Т. 2. – С. 615-620.

Эллис, С.Д. Эпигенетика / С.Д. Эллис, Т. Дженювейн, Д.М. Рейнберг. – Москва: Техносфера, 2010. – 495 с.

Agostinis, P. Photodynamic therapy of cancer: anupdate / P. Agostinis, K. Berg, K.A. Cengel, T.H. Foster, A.W. Girotti, S.O. Gollnick, S.M. Hahn, M.R. Hamblin, A. Juzeniene, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, P. Mroz, D. Nowis, J. Piette, B.C. Wilson, J. Golab // C A Cancer J Clin. – 2011. – No. 61. – P. 250–281.

Aiken S.P. Treatment of epilepsy: existing therapies and future developments / S.P. Aiken, W.M. Brown. // Frontiers in Bioscience. – 2000. – V. 5 – E. 124-152. – Режим доступа: https://www.bioscience.org/2000/v5/e/aiken/aiken.pdf.

Akbarian, S. Epigenetic mechanisms in schizophrenia / S. Akbarian // Dialogues Clin Neurosci. – 2014. – V. 16. – No. 3. – P. 405-417.

Alcazar, O. Epigenetic regulation by decitabine of melanoma differentiation in vitro and in vivo / O. Alcazar, S. Achberger, W. Aldrich, Z. Hu, S. Negrotto, Y. Sauntharajah, P. Triozzi // Int J Cancer. – 2012. – V. 131. – No. 1. – P. 18-29.

Alcendor, R.R. Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart / R.R. Alcendor, S. Gao, P. Zhai, D. Zablocki, E. Holle, X. Yu, B. Tian, T. Wagner, S.F. Vatner, J. Sadoshima // Circ Res. – 2007. – V. 100. – No. 10. – P. 1512–1521.

Almeida, R.D. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy / R.D. Almeida, B.J. Manadas, A.P. Carvalho, C.B. Duarte // Biochim Biophys Acta. – 2004. – V. 1704. – No. 2. – P. 59 – 86.

Almerie, M.Q. Photodynamic diagnosis for detection of peritoneal carcinomatosis / M.Q. Almerie, G. Gossedge, K.E. Wright, D.G. Jayne // J Surg Res. – 2015. – V. 195. – No. 1. – P. 175-187.

Ashkenasi, A. Death receptors: signalling and modulation / A. Ashkenasi, V. M. Dixi // Science. – 1988. – V. 281. – No. 5381. – P. 1305—1308.

Ashkenazi, A. Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists / A. Ashkenazi // Nat Rev Drug Discov. – 2008. – V. 7. – No. 12. – P. 1001-1012.

Bagot, R.C. Epigenetic signaling in psychiatric disorders: stress and depression / R.C. Bagot, B. Labonté, C.J. Peña, E.J. Nestler // J Pharmacol Sci. – 2014. – V. 125. – No. 4. – P. 347-354.

Bardai, F.H. Histonedeacetylase-1 (HDAC1) is a molecular switch between neuronal survival and death / F.H. Bardai, V. Price, M. Zaayman, L. Wang, S.R. D'Mello // J Biol Chem. – 2012. – V. 287. – No. 42. – P. 35444–35453.

Baylin, S.B. DNA methylation and gene silencing in cancer / S.B. Baylin // Nat Clin Pract Oncol. – 2005. – V. 2. – Режим доступа: doi:10.1038/ncponc0354.

Behrens, A. Wagner, Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation / A. Behrens, M. Sibilia, E.F. Wagner // Nat Genet. – 1999. – V. 21. – No. 3. – P. 326–329.

Bergink, S. The DNA repair-ubiquitin-associated HR23 proteins are constituents of neuronal inclusions in specific neurodegenerative disorders without hampering DNA repair / S. Bergink, L.A. Severijnen, N. Wijgers, K. Sugasawa, H. Yousaf, J.M. Kros, J. van Swieten, B.A. Oostra, J.H. Hoeijmakers, W. Vermeulen, R. Willemsen // Neurobiol Dis. – 2006. – V. 23. – No. 3. – P. 708-716.

Berliocchi, L. Ca2+ signals and death programmes in neurons / L. Berliocchi, D. Bano, P. Nicotera // Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. – 2005. – V. 360. – No. 1464. – P. 2255-2258.

Bernstein, B.E. The mammalian epigenome / B.E. Bernstein, A. Meissner, E.S. Lander // Cell. – 2007. – V. 128. – No. 4. – P. 669-681.

Bestor, T.H. The DNA methyltransferases of mammals / T.H. Bestor // Hum Mol Genet. – 2000. – V. 9. – No. 16. – P. 2395-2402.

Biermann, J. Histone deacetylase inhibitors sodium butyrate and valproic acid delay spontaneous cell death in purified rat retinal ganglion cells / J. Biermann, J. Boyle, A. Pielen, W.A. Lagrèze // Mol Vis. – 2011. – V. 5. – No. 17. – P. 395-403.

Bing Y. Unlocking epigenetic codes in neurogenesis / Y. Bing, J. Peng // Genes Dev. – 2014. – V. 28. – No. 12. – P. 1253–1271.

Black, J.C. Histone lysine methylation dynamics: establishment, regulation, and biological impact / J.C. Black, C. Van Rechem, J.R. Whetstine // Mol Cell. – 2012. – V. 48. – No. 4. – P. 491-507.

Bose, P. Histone deacetylase inhibitor (HDACI) mechanisms of action: Emerging insights / P. Bose, Y. Dai, S. Grant // Pharmacol Ther. – 2014. – V. 143. – No. 3. – P. 323-336.

Botcheva, K. p53 binding to human genome: crowd control navigation in chromatin context / K. Botcheva // Front Genet. – 2014. – No. 5. – P. 447.

Bredesen, D.E. Receptors that mediate cellular dependence / D.E. Bredesen, P. Mehlen, S. Rabizadeh // Cell Death Differ. – 2005. – V. 12. – No. 8. – P. 1031–1043.

Brochier, C. Specific acetylation of p53 by HDAC inhibition prevents DNA damage-induced apoptosis in neurons / C. Brochier, G. Dennis, M.A. Rivieccio, K. McLaughlin, G. Coppola R.R. Ratan, B. Langley // J Neurosci. – 2013. – V. 33. – No. 20. – P. 8621–8632.

Brodská, B. Generation of reactive oxygen species during apoptosis induced by DNA-damaging agents and/or histone deacetylase inhibitors / B. Brodská, A. Holoubek // Oxid Med Cell Longev. – 2011. – V. 2011. – P. 253529-253546.

Brown, S.B. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment / S.B. Brown, E.A. Brown, I. Walker // Lancet Oncology. – 2004. – V. 5. No. 8. – P. 497-508.

Buytaert, E. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy / E. Buytaert, M. Dewaele, P. Agostinis // Biochim Biophys Acta. – 2007. – V. 1776. – No. 1. – P. 86-107.

Carrozza, M.J. The diverse functions of histone acetyltransferase complexes / M.J. Carrozza, R.T. Utley, J.L. Workman, J. Côté // Trends Genet. – 2003. – V. 19. – No. 6. – P. 321-329.

Castano, A.P. Mechanisms in photodynamic therapy: Part two – cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death / A.P. Castano, T.N. Demidova, M.R. Hamblin // Photodiagn Photodyn Ther. – 2005. – V. 2. – No. 1. – P. 1-23.

Chao, D.T. BCL-2 family: regulators of cell death / D.T. Chao, S.J. Korsmeyer // Annual review of immunology. – 1998. – No. 16. – P. 395–419.

Checler, F. p53 in neurodegenerative diseases and brain cancers / F. Checler, C. Alves da Costa // Pharmacol Ther. – 2014. – V. 142. – No. 1. – P. 99-113.

Chen, Y.T. Expressionpatterns of histone deacetylases in experimental stroke and potential targets for neuroprotection / Y.T. Chen, X.F. Zang, J. Pan, X.L. Zhu, F. Chen, Z.B. Chen, Y. Xu // Clin Exp Pharmacol Physiol. – 2012. – V. 39. – No. 9. – P. 751–758.

Choi, K.S. Hypoxia-induced angiogenesis during carcinogenesis / K.S. Choi, M.K. Bae, J.W. Jeong, H.E. Moon, K.W. Kim // J Biochem Mol Biol. – 2003. – V. 36. – No. 1. – P. 120-127.

Chong, Z.Z. Oxidative stress in the brain: Novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease / Z.Z. Chong, F. Li, K. Mai // Progr Neurobiol. – 2005. – No. 75. – P. 207–246.

Christofferson, D.E. Necroptosis as an alternative form of programmed cell death / D.E. Christofferson, J. Yuan // Curr Opin Cell Biol. – 2010. – V. 22. – No. 2. – P. 263-268.

Culmsee, C. p53 in neuronal apoptosis / C. Culmsee, M.P. Mattson // Biochem Biophys Res Communs. – 2005. – V. 331. – No. 3. – P. 761-777.

Cyr, A.R. The redox basis of epigenetic modifications: from mechanisms to functional consequences / A.R. Cyr, F.E. Domann // Antioxid Redox Signal. – 2011. – V. 15. – No. 2. – P. 551-589.

Danial, N.N. Cell death: critical control points / N.N. Danial, S.J. Korsmeyer // Cell. – 2004. – No. 116. – P. 205–219.

Darcy, M.J. Regional and subcellular distribution of HDAC4 in mouse brain / M.J. Darcy, K. Calvin, K. Cavnar, C.C. Ouimet // J Comp Neurol. – 2010. – V. 518. – No. 5. – P. 722-740.

Dean, R.T. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation / R.T. Dean, S. Fu, R. Stocker, M.J. Davies // Biochem J. – 1997. – No. 324. – Pt 1. – P. 1-18.

Deckwerth, T.L. Placement of the BCL2 family member BAX in the death pathway of sympathetic neurons activated by trophic factor deprivation / T.L.

Deckwerth, R.M. Easton, C.M. Knudson, S.J. Korsmeyer, E.M. Johnson Jr // Exp Neurol. – 1998. – V. 152. – No. 1. – P. 150–162.

Dellinger, R.P. Tumor necrosis factor in septic shock and multiple system trauma / R.P. Dellinger // Crit Care Med. – 1997. – V. 25. – No. 11. – P. 1771-1773.

Dong, E. Valproate induces DNA demethylation in nuclear extracts from adult mouse brain / E. Dong, Y. Chen, D.P. Gavin, D.R. Grayson, A. Guidotti // Epigenetics. – 2010. – V. 5. – No. 8. – P. 730-735.

Dong, Z. The role of histone H3 phosphorylation (Ser10 and Ser28) in cell growth and cell transformation / Z. Dong, A.M. Bode // Mol Carcinog. – 2006. – V. 45. – No. 6. – P. 416-421.

Dröge, W. Free radicals in the physiological control of cell function / W. Dröge // Physiol Rev. – 2002. – V. 82. – No. 1. – P. 47-95.

Dunn Jr, W.A. Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole / W.A. Dunn Jr // J Cell Biol. – 1990. – No. 110. – P. 1923–1933.

de Duve, C. Lysosomes, a new group of cytoplasmic particles / C. de Duve // Subcellular Particles. – 1959. – P. 128-159.

El-Gibaly, A.M. Improvement of rat liver graft quality by pifithrin-alpha-mediated inhibition of hepatocyte necrapoptosis / A.M. El-Gibaly, C. Scheuer, M.D. Menger, B. Vollmar // Hepatology. – 2004. – V. 39. No. 6. – P. 1553-1562.

Fagerlund, R. NF-kappaB p52, RelB and c-Rel are transported into the nucleus via a subset of importin alpha molecules / R. Fagerlund, K. Melen, X. Cao, I. Julkunen // Cell Signal. – 2008. – V. 20. – No. 8. – P. 1442–1451.

Finnin, M.S.Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors / M.S. Finnin, J.R. Donigian, A. Cohen, V.M. Richon, R.A. Rifkind, P.A. Marks, R. Breslow, N.P. Pavletich // Nature. – 1999. – V. 401. – No. 6749. – P. 188-193.

Fisher, A.M. Increased photosensitivity in HL60 cells expressing wild-type p53 / A.M. Fisher, K. Danenberg, D. Banerjee, J.R. Bertino, P. Danenberg, C.J. Gomer // Photochem Photobiol. – 1997. – V. 66. – No. 2. – P. 265-270.

Fisher, A.M. Photodynamic therapy sensitivity is not altered in human tumor cells after abrogation of p53 function / A.M. Fisher, A. Ferrario, N. Rucker, S. Zhang, C.J. Gomer // Cancer Res. – 1999. – V. 59. – No. 2. – P. 331–335.

Florey, E. Microanatomy of the abdominal stretch receptors of the crayfish (Astacus fluviatilis, leptodactylis) / E. Florey, E. Florey // J Gen Physiol. – 1955. – V. 39. – No. 1. – P. 69-85.

Fortress, A.M. Epigenetic regulation of estrogen-dependent memory / A.M. Fortress, K.M. Frick // Front Neuroendocrinol. – 2014. – V. 35. – No. 4. – P. 530-549.

Foti, S.B. HDAC inhibitors dysregulate neural stem cell activity in the postnatal mouse brain / S.B. Foti, A. Chou, A.D. Moll, A.J. Roskams // Int J Dev Neurosci. – 2013. – V. 31. – No. 6. – P. 434-447.

Franklin, J.L. Redox regulation of the intrinsic pathway in neuronal apoptosis / J.L. Franklin// Antioxid Redox Signal. – 2011. . – V. 14. – No. 8. – P. 1437–1448.

Fujino, M. 5-Aminolevulinic acid regulates the inflammatory response and alloimmune reaction / M. Fujino, Y. Nishio, H. Ito, T. Tanaka, X.K. Li // Int Immunopharmacol. – 2015. – Режим доступа: doi: 10.1016/j.intimp.2015.11.034.

Fulda, S. Cell type specific involvment of death receptors and mitochondrial pathways in drug induced apoptosis / S. Fulda, E. Meyer, C. Friesen, S.A. Susin, G. Kroemer, K.M. Debatin // Oncogene. – 2001. – V. 20. – No. 9. – P. 1063—1075.

Gaub, P. HDAC inhibition promotes neuronal outgrowth and counteracts growth cone collapse through CBP/p300 and P/CAF-dependent p53 acetylation / P.

Gaub, A. Tedeschi, R. Puttagunta, T. Nguyen, A. Schmandke, S. Di Giovanni // Cell Death Differ. – 2010. – V. 17. – No. 9. – P. 1392-1408.

Gebicke-Haerter, P.J. Epigenetics of schizophrenia / P.J. Gebicke-Haerter // Pharmacopsychiatry. – 2012. – V. 45. – No. 1. – P. 42-48.

Giacobini, E.E. Chemical studies of individual neurons / E.E. Giacobini // Neurosci Res V II Invertebrate nerve cell. New York: Acad. Press. – 1969. – P. 111-202.

Girotti, A.W. Photodynamic lipid peroxidation in biological systems / A.W. Girotti // Photochem Photobiol. – 1990. – V. 51. – No. 4. – P. 497-509.

Girotti, A.W. Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms / A.W. Girotti // J Photochem Photobiol B. – 2001. – V. 63. – No. 1-3. – P. 103-113.

Golstein, P. Cell death by necrosis: towards a molecular definition / P. Golstein, G. Kroemer // Trends Biochem Sci. – 2006. – V. 32. – No. 1. – P. 37-43.

Gomperts, B. Signal Transduction / B. Gomperts, I. Kramer, P. Tatham. – Amsterdam, Boston: Elsevier/Academic Press, 2009. – 810 p.

González-Polo, R.A. The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death / R.A. González-Polo, P. Boya, A.L. Pauleau, A. Jalil, N. Larochette, S. Souquère, E.L. Eskelinen, G. Pierron, P. Saftig, G. Kroemer // J Cell Sci. – 2005. – V. 15. – No. 118. – Pt 14. – P. 3091-3102.

Gray, S.G. Epigenetic treatment of neurological disease / S.G. Gray // Epigenomics. – 2011. – V. 3. – No. 4. – P. 431-450.

Grayson, D.R. Is there a future for histone deacetylase inhibitors in the pharmacotherapy of psychiatric disorders? / D.R. Grayson, M. Kundakovic, R.P. Sharma // Mol Pharmacol. – 2010. – V. 77. – No. 2. – P. 126-135.

Green, D.R. Mitochondria and apoptosis / D.R. Green, J.C. Reed // Science. – 1998. – V. 281. – No. 5381. – P. 1309-1312.

Guan, J.S. HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity / J.S. Guan, S.J. Haggarty, E. Giacometti, J.H. Dannenberg, N. Joseph, J. Gao,

T.J. Nieland, Y. Zhou, X. Wang, R. Mazitschek, J.E. Bradner, R.A. DePinho, R. Jaenisch, L.H. Tsai // Nature. – 2009. – V. 459. – No. 7243. – P. 55-60.

Haaf, T. The effects of 5-azacytidine and 5-azadeoxycytidine on chromo-some structure and function: implications for methylation-associated cellularprocesses / T. Haaf // Pharmacol Ther. – 1995. – No. 65. – P. 19–46.

Haines, T.R. Allele-specific non-CpG methylation of the Nf1 gene during early mouse development / T.R. Haines, D.I. Rodenhiser, P.J. Ainsworth // Dev Biol. – 2001. – V. 240. – No. 2. – P. 585-598.

Harrison, I.F. Epigenetic targeting of histone deacetylase: therapeutic potential in Parkinson's disease? / I.F. Harrison, D.T. Dexter // Pharmacol Ther. – 2013. – V. 140. – No. 1. – P. 34-52.

Hayashi, T. Induction of PML immunoreactivity in rat brain neurons after transient middle cerebral artery occlusion / T. Hayashi, C. Sasaki, M. Iwai, K. Sato, W.R. Zhang, K. Abe // Neurol Res. – 2001. – V. 23. – No. 7. – P. 772–776.

Heinzelmann-Schwarz, V. Role of p53 and ATM in photodynamic therapy-induced apoptosis / V. Heinzelmann-Schwarz, A. Fedier, R. Hornung, H. Walt, U. Haller, D. Fink // Lasers Surg Med. – 2003. – V. 33. – No. 3. – P. 182-189.

Hermann, A. The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites / A. Hermann, R. Goyal, A. Jeltsch // J Biol Chem. – 2004. – V. 279. – No. 46. – P. 48350-48359.

Hoffmann, A. Molecular epigenetic switches in neurodevelopment in health and disease / A. Hoffmann, C.A. Zimmermann, D. Spengler // Front Behav Neurosci. – 2015. – V. 13. – No. 9. – Режим доступа: doi:10.3389/fnbeh.2015.00120.

Hosack, D.A. Identifying biological themes within lists of genes with EASE / D.A. Hosack, G. Dennis Jr, B.T. Sherman, H.C. Lane, R.A. Lempicki // Genome Biol. – 2003. – V. 4. – No. 10. – Режим доступа: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC328459/.

Hwang, J.Y. Epigenetic mechanisms in stroke and epilepsy / J.Y. Hwang, K.A. Aromolaran, R.S. Zukin // Neuropsychopharmacology. – 2013. – V. 38. – No. 1. – P. 167-182.

Ito, A. Mdm2-HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation / A. Ito, Y. Kawaguchi, C.H. Lai, J.J. Kovacs, Y. Higashimoto, E. Appella, T.P. Yao // EMBO J. – 2002. – V. 21. – No. 22. – P. 6236–6245.

Iwamoto, K. Neurons show distinctive DNA methylation profile and higher inter-individual variations compared with non-neurons / K. Iwamoto, M. Bundo, J. Ueda, M.C. Oldham, W. Ukai, E. Hashimoto, T. Saito, D.H. Geschwind, T. Kato // Genome Res. – 2011. – V. 21. – No. 5. – P. 688-696.

Jaattela, M. Caspase-independent cell death in T lymphocytes / M. Jaattela, J. Tschopp // Nat Immunol. – 2003. – V. 4. – No. 5. – P. 416–423.

Jin, B. DNA methyltransferase 3B (DNMT3B) mutations in ICF syndrome lead to altered epigenetic modifications and aberrant expression of genes regulating development, neurogenesis and immune function / B. Jin, Q. Tao, J. Peng, H.M. Soo, W. Wu, J. Ying, C.R. Fields, A.L. Delmas, X. Liu, J. Qiu, K.D. Robertson // Hum Mol Genet. – 2008. – V. 17. – No. 5. – P. 690-709.

Joshi, P. The functional interactome landscape of the human histone deacetylase family / P. Joshi, T.M. Greco, A.J. Guise, Y. Luo, F. Yu, A.I. Nesvizhskii, I.M. Cristea // Mol Syst Biol. – 2013. – V. 9. – Режим доступа: doi:10.1038/msb.2013.26.

Kahvejian, A. The mRNA closed-loop model: the function of PABP and PABP-interacting proteins in mRNA translation / A. Kahvejian, G. Roy, N. Sonenberg // Cold Spring Harb Symp Quant Biol. – 2001. – V. 66. – P. 293–300.

Kammerer, R. Induction of immune mediators in glioma and prostate cancer cells by non-lethal photodynamic therapy / R. Kammerer, A. Buchner, P. Palluch, T. Pongratz, K. Oboukhovskij, W. Beyer, A. Johansson, H. Stepp, R.

Baumgartner, W. Zimmermann // PLoS One. – 2011. – V. 6. – No. 6. – Режим доступа: doi: 10.1371/journal.pone.0021834.

Kanai, H. Valproic acid inhibits histone deacetylase activity and suppresses excitotoxicity-induced GAPDH nuclear accumulation and apoptotic death in neurons / H. Kanai, A. Sawa, R.W. Chen, P. Leeds, D.M. Chuang // Pharmacogenomics J. – 2004. – V. 4. – No. 5. – P. 336-344.

Karpf, A.R. Reactivating the expression of methylation silenced genes in human cancer / A.R. Karpf, D.A. Jones // Oncogene. – 2002. – V. 21. – No. 35. – P. 5496-5503.

Kaushik, D. Histone deacetylase inhibitors in castration-resistant prostate cancer: molecular mechanism of action and recent clinical trials / D. Kaushik, V. Vashistha, S. Isharwal, S.A. Sediqe, M.F. Lin // Ther Adv Urol. – 2015. – V. 7. – No. 6. – P. 388-395.

Kerr, J.F. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics / J.F. Kerr, A.H. Wyllie, A.R. Currie // Br J Cancer. – 1972. – No. 26. – P. 239–257.

Kesidou, E. Autophagy and neurodegenerative disorders / E. Kesidou, R. Lagoudaki, O. Touloumi, K.N. Poulatsidou, C. Simeonidou // Neural Regen Res. – 2013. – V. 8. – No. 24. – P. 2275-2283.

Komandirov, M.A. On the role of phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase B/Akt, and glycogen synthase kinase-3 in photodynamicinjury of crayfish neurons and glial cells / M.A. Komandirov, E.A. Knyazeva, Y.P. Fedorenko, M.V. Rudkovskii, D.A Stetsurin, A.B. Uzdensky // J Mol Neurosci. – 2011. – No. 45. – P. 229–235.

Kong, M. 5'-Aza-dC sensitizes paraquat toxic effects on PC12 cell / M. Kong, M. Ba, H. Liang, L. Ma, Q. Yu, T. Yu, Y. Wang // Neurosci Lett. – 2012. – V. 524. – No. 1. – P. 35-39.

Konsoula, Z. Epigenetic histone acetylation and deacetylation mechanisms in experimental models of neurodegenerative disorders / Z. Konsoula, F.A.

Barile // J Pharmacol Toxicol Methods. – 2012. – V. 66. – No. 3. – P. 215-220.

Kopf, E. Antibody arrays - an emerging tool in cancer proteomics / E. Kopf, D. Zharhary // Int J Biochem Cell Biol. – 2007. – V. 39. – No. 7-8. – P. 1305-1317.

Kostron, H. Photodynamic diagnosis and therapy and the brain / H. Kostron // Meth Mol Biol. – 2010. – No. 635. – P. 261–280.

Kotel'nikov, A.I. Troshin Photodynamic activity of a hybrid nanostructure based on a polycationic fullerene derivative and phthalocyanine dye photosens / A.I. Kotel'nikov, A.Yu. Rybkin, N.S. Goryachev, A.Yu. Belik, A.B. Kornev, P.A. // Doklady Physical Chemistry. – 2013. – V. 452, – No. 2. – P. 229-232.

Kouzarides, T. Chromatin modifications and their function / T. Kouzarides // Cell. – 2007. – V. 128. – No. 4. – P. 693-705.

Krause, C.D. Protein arginine methyltransferases: evolution and assessment of their pharmacological and therapeutic potential / C.D. Krause, Z.H. Yang, Y.S. Kim, J.H. Lee, J.R. Cook, S. Pestka // Pharmacol Ther. – 2007. – V. 113. – No. 1. – P. 50-87.

Kumar, R. Biological function of activation-induced cytidine deaminase (AID) / R. Kumar, L.J. DiMenna, J. Chaudhuri, T. Evans // Biomed J. – 2014. – V. 37. – No. 5. – P. 269-283.

Kume, T. FOXC2 transcription factor: a newly described regulator of angiogenesis / T. Kume // Trends Cardiovasc Med. – 2008. – V. 18. – No. 6. – P. 224–228.

Kwok, J.B. Role of epigenetics in Alzheimer's and Parkinson's disease / J.B. Kwok // Epigenomics. – 2010. – V. 2. – No. 5. – P. 671-682.

Lazo-Gómez, R. Histone deacetylases and their role in motor neuron degeneration / R. Lazo-Gómez, U.N. Ramírez-Jarquín, L.B. Tovar-Y-Romo, R. Tapia // Front Cell Neurosci. – 2013. – V. 7. – P. 243-265.

Lee, J.H. Inhibition of histone deacetylase 10 induces thioredoxin-interacting protein and causes accumulation of reactive oxygen species in SNU-620

human gastric cancer cells / J.H. Lee, E.G. Jeong, M.C. Choi, S.H. Kim, J.H. Park, S.H. Song, J. Park, Y.J. Bang, T.Y. Kim // Mol Cells. – 2010. – V. 30. – No. 2. – P. 107–112.

de León-Guerrero, S.D. In sickness and in health: the role of methyl-CpG binding protein 2 in the central nervous system / S.D. de León-Guerrero, G. Pedraza-Alva, L. Pérez-Martínez // Eur J Neurosci. – 2011. – V. 33. – No. 9. – P. 1563-1574.

Li, D.Q. Requirement of MTA1 in ATR-mediated DNA damage checkpoint function / D.Q. Li, K. Ohshiro, M.N. Khan, R. Kumar // J Biol Chem. – 2010. – V. 285. – No. 26. – P. 19802–19812.

Li, J. Caspases in apoptosis and beyond / J. Li, J. Yuan // Oncogene. – 2008. – No. 27. – P. 6194–6206.

Lim, D.A. Chromatin remodelling factor Mll1 is essential for neurogenesis from postnatal neural stem cells / D.A. Lim, Y.C. Huang, T. Swigut, A.L. Mirick, J.M. Garcia-Verdugo, J. Wysocka, P. Ernst, A. Alvarez-Buylla // Nature. – 2009. – V. 458. – No. 7237. – P. 529-533.

Lindgren, A. ERRATUM: corrected figure legend: stroke genetics: a review and update / A. Lindgren // J Stroke. – 2014. – V. 16. – No. 3. – P. 114-123.

Lindqvist, L. Current questions and possible controversies in autophagy / L. Lindqvist, A. Simon, E. Baehrecke // Cell death discovery. – 2015. – V. 1. – Режим доступа: doi:10.1038/cddiscovery.2015.36.

Lister, R. Turning over DNA methylation in the mind / R. Lister, E.A. Mukamel // Front Neurosci. – 2015. – V. 9. – No. 252. – Режим доступа: doi: 10.3389/fnins.2015.00252.

Lockshin, R.A. Caspase-independent cell death / R.A. Lockshin, Z. Zakeri // Curr Opin Cell Biol. – 2002. – V. 14. – No. 6. – P. 727-733.

Lopez-Bergami, P. c-Jun regulates phosphoinositide-dependent kinase 1 transcription: implication for Akt and protein kinase C activities and melanoma tumorigenesis / P. Lopez-Bergami, H. Kim, A. Dewing, J. Goydos,

S. Aaronson, Z. Ronai // J Biol Chem. – 2010. – V. 285. – No. 2. – P. 903-913.

Luo, J.Y. Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis / J.Y. Luo, F. Su, D.L. Chen, A. Shiloh, W. Gu // Nature. – 2000. – V. 408. – No. 6810. – P. 377–381.

Luo, J.Y. Negative control of p53 by SIR2 alpha promotes cell survival under stress / J.Y. Luo, A.Y. Nikolaev, S. Imai, D.L. Chen, F. Su, A. Shiloh, L. Guarente, W. Gu // Cell. – 2001. – V. 107. – No. 2. – P. 137–148.

Madsen, S.J. Photodynamic therapy of newly implanted glioma cells in the rat brain / S.J. Madsen, E. Angell-Petersen, S. Spetalen, S.W. Carper, S.A. Ziegler, H. Hirschberg // Lasers Surg Med. – 2006. – No. 38. – P. 540–548.

Majeski, A.E. Mechanisms of chaperone-mediated autophagy / A.E. Majeski, J.F. Dice // Int J Biochem Cell Biol. – 2004. – V. 36. – No. 12. – P. 2435–2444.

Marczynska, J. Chlorin e6-mediated photodynamic effect diminishes therapeutic potential of 5-aza-2'-deoxycytidine-based whole-tumour-cell vaccine in mice bearing squamous cell carcinoma SCCVII / J. Marczynska, M. Banas, K. Guzik, M. Koltun, P. Majewski, J. Cichy, M. Krzykawska-Serda, A. Makarska, M. Kwitniewski // J Photochem Photobiol B. – 2015. – V. 153. – P. 455-462.

Margueron, R. Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information / R. Margueron, D. Reinberg // Nat Rev Genet. – 2010. – V. 11. – No. 4. – P. 285-296.

Mathiyalagan, P. Chromatin modifications remodel cardiac gene expression / P. Mathiyalagan, S.T. Keating, X.J. Du, A. El-Osta // Cardiovasc Res. – 2014. – V. 103. – No. 1. – P. 7-16.

McCaughan Jr, J.S. Photodynamic therapy / J.S. McCaughan Jr // Drugs and Aging. – 1999. – V. 15. – No. 1. – P. 49–68.

McEwen, B.S. Stress and anxiety: structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress / B.S. McEwen, L. Eiland, R.G. Hunter, M.M. Miller // Neuropharmacology. – 2012. – V. 62. – No. 1. – P. 3-12.

Melo-Lima, S. Necroptosis is associated with low procaspase-8 and active RIPK1 and -3 in human glioma cells / S. Melo-Lima, M. Celeste Lopes, F. Mollinedo // Oncoscience. – 2014. – V. 1. – No. 10. – P. 649-664.

Millan, M.J. The epigenetic dimension of Alzheimer's disease: causal, consequence, or curiosity? / M.J. Millan // Dialogues Clin Neurosci. – 2014. – V. 16. – No. 3. – P. 373-393.

Mishra, A. p53 tumor suppression network in cancer epigenetics / A. Mishra, D.J. Brat, M. Verma // Methods Mol Biol. – 2015. – No. 1238. – P. 597-605.

Moan, J. Cellular uptake and photodynamic effect of hematoporphyrin / J. Moan, T. Christensen // J Photobiochem Photobiophys. – 1981. – V. 2. – No. 4-5. – P. 291–299.

Moan, J. Photodynamic effects on cells in vitro exposed to hematoporphyrin derivative and light / J. Moan, J. McGhie, P.B. Jacobsen // J Photochem Photobiol. – 1983. – V. 37. – No. 6. – P. 599–604.

Moan, J. The mechanism of photodynamic inactivation of human cells in vitro in the presence of haematoporphyrin / J. Moan, E.O. Pettersen, T. Christensen // Brit J Cancer. – 1979. – V. 39. – No. 4. – P. 398–407.

Moloney, R.D. Early-life stress-induced visceral hypersensitivity and anxiety behavior is reversed by histone deacetylase inhibition / R.D. Moloney, R.M. Stilling, T.G. Dinan, J.F. Cryan // Neurogastroenterol Motil. – 2015. – V. 27. – No. 12. – P. 1831-1836.

Morgan, J. Mitochondria-based photodynamic anti-cancer therapy / J. Morgan, A.R. Oseroff // Adv Drug Deliv Rev. – 2001. – V. 49. – No. 1-2. – P. 71-86.

Morrison, R.S. p53-dependent cell death signaling in neurons/ R.S. Morrison, Y. Kinoshita, M.D. Johnson, W. Guo, G.A. Garden // Neurochem Res. – 2003. – V. 28. – No. 1. – P. 15–27.

Nalivaeva, N.N. Amyloid-clearing proteins and their epigenetic regulation as a therapeutic target in Alzheimer's disease / N.N. Nalivaeva, N.D. Belyaev, C. Kerridge, A.J. Turner // Front Aging Neurosci. – 2014. – V. 6. – Режим доступа: doi:10.3389/fnagi.2014.00235.

Narayan, N. The NAD-dependent deacetylase SIRT2 is required for programmed necrosis / N. Narayan, I.H. Lee, R. Borenstein, J. Sun, R. Wong, G. Tong, M.M. Fergusson, J. Liu, I.I. Rovira, H.L. Cheng, G. Wang, M. Gucek, D. Lombard, F.W. Alt, M.N. Sack, E. Murphy, L. Cao, T. Finkel // Nature. – 2012. – V. 492. – No. 7428. – P. 199-204.

Nestler, E.J. Cellular basis of memory for addiction / E.J. Nestler // Dialogues Clin Neurosci. – 2013. – V. 15. – No. 4. – P. 431-443.

Nowak, S.J. Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation / S.J. Nowak, V.G. Corces // Trends Genet. – 2004. – V. 20. – No. 4. – P. 214-220.

Nowis, D. Heme oxygenase-1 protects tumor cells against photodynamic therapy-mediated cytotoxicity / D. Nowis, M. Legat, T. Grzela, J. Niderla, E. Wilczek, G.M. Wilczynski, E. Głodkowska, P. Mrówka, T. Issat, J. Dulak, A. Józkowicz, H. Waś, M. Adamek, A. Wrzosek, S. Nazarewski, M. Makowski, T. Stokłosa, M. Jakóbisiak, J. Gołab // Oncogene. – 2006. – V. 25. – No. 24. – P. 3365-3374.

Nykjaer, A. p75NTR—live or let die / A. Nykjaer, T.E. Willnow, C.M. Petersen // Curr Opin Neurobiol. – 2005. – V. 15. – No. 1. – P. 49–57.

Ochsner, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumors / M. Ochsner // J Photochem Photobiol B Biol. – 1997. – V. 39. – No. 1. – P. 1-18.

Okano, M. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development / M. Okano, D.W. Bell, D.A. Haber, E. Li // Cell. – 1999. – V. 99. – No. 3. – P. 247-257.

Pahan, K. Lipid-lowering drugs / Pahan K. // Cell Mol Life Sci. – 2006. – V. 63. – No. 10. – P. 1165-1178.

Persengiev, S.P. E2F4 actively promotes the initiation and maintenance of nerve growth factor-induced cell differentiation / S.P. Persengiev, I.I. Kondova, D.L. Kilpatrick // Mol Cell Biol. – 1999. – V. 19. – No. 9. – P. 6048–6056.

Peter, M.E. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond / M.E. Peter, P.H. Krammer // Cell Death Differ. – 2003. – V. 10. – No. 1. – P. 26–35.

Pradhan, S. Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation / S. Pradhan, A. Bacolla, R.D. Wells, R.J. Roberts // J Biol Chem. – 1999. – V. 274. – No. 46. – P. 33002-33010.

Pushpan, S.K. Porphyrins in photodynamic therapy - a search for ideal photosensitizers / S.K. Pushpan, S. Venkatraman, V.G. Anand, J. Sankar, D. Parmeswaran, S. Ganesan, T.K. Chandrashekar // Curr Med Chem Anticancer Agents. – 2002. – V. 2. – No. 2. – P. 187-207.

Puthalakath, H. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim / H. Puthalakath, L.A. O'Reilly, P. Gunn, L. Lee, P.N. Kelly, N.D. Huntington, P.D. Hughes, E.M. Michalak, J. McKimm-Breschkin, N. Motoyama, T. Gotoh, S. Akira, P. Bouillet, A. Strasser // Cell. – 2007. – V. 129. – No. 7. – P. 1337-1349.

Qureshi, I.A. The emerging role of epigenetics in stroke: II. RNA regulatory circuitry / I.A. Qureshi, M.F. Mehler // Arch Neurol. – 2010. – V. 67. – No. 12. – P. 1435-1441.

Reed, S.M. p53 acetylation: regulation and consequences / S.M. Reed, D.E. Quelle // Cancers (Basel). – 2014. – V. 7. – No. 1. – P. 30-69.

Riedl, S.J. The apoptosome: signalling platform of cell death / S.J. Riedl, G.S Salvesen // Nat Rev Mol Cell Biol. – 2007. – V. 8. – No. 5. – P. 405–413.

Ringrose, L. Polycomb/Trithorax response elements and epigenetic memory of cell identity / L. Ringrose, R. Paro // Development. – 2007. – V. 134. – No. 2. – P. 223-232.

Robertson, K.D. DNA methylation: past, present and future directions / K.D. Robertson, P.A. Jones // Carcinogenesis. – 2000. – V. 21. – No. 3. – P. 461–467.

Ruhdorfer, S. Gene expression profiling of the human carcinoma cell line A-431 after 5-aminolevulinic acid-based photodynamic treatment / S. Ruhdorfer, R. Sanovic, V. Sander, B. Krammer, T. Verwanger // Int J Oncol. – 2007. – V. 30. – No. 5. – P. 1253-1262.

de Ruijter, A.J. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family / A.J. de Ruijter, A.H. van Gennip, H.N. Caron, S. Kemp, A.B. van Kuilenburg // Biochem J. – 2003. – V. 370. – Pt 3. – P. 737-749.

Ruthenburg, A.J. Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules / A.J. Ruthenburg, H. Li, D.J. Patel, C.D. Allis // Nat Rev Mol Cell Biol. – 2007. – V. 8. – No. 12. – P. 983-994.

Santos-Rosa, H. Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer / H. Santos-Rosa, C. Caldas // Eur J Cancer. – 2005. – V. 41. – No. 16. – P. 2381-2402.

Schuettengruber, B. Trithorax group proteins: switching genes on and keeping them active / B. Schuettengruber, A.M. Martinez, N. Iovino, G. Cavalli // Nat Rev Mol Cell Biol. – 2011. – V. 12. – No. 12. – P. 799-814.

Schwartz, Y.B. Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes / Y.B. Schwartz, V. Pirrotta // Nat Rev Genet. – 2007. – V. 8. – No. 1. – P. 9-22.

Schweizer, S. Epigenetic mechanisms in cerebral ischemia / S. Schweizer, A. Meisel, S. Märschenz // J Cereb Blood Flow Metab. – 2013. – V. 33. – No. 9. – P. 1335-1346.

Sen, N. Neurotrophin-mediated degradation of histone methyltransferase by S-nitrosylation cascade regulates neuronal differentiation / N. Sen, S.H. Snyder // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2011. – V. 108. – No. 50. – P. 20178-20183.

Sharifulina, S.A. Epigenetic regulation of death of crayfish glial cells but not neurons induced by photodynamic impact / S.A. Sharifulina, M.A. Komandirov, A.B. Uzdensky // Brain Res Bull. – 2014. – No. 102. – P. 15-21.

Sharifulina, S.A. Photodynamic injury of isolated crayfish neuron and surrounding glial cells: the role of p53 / S.A. Sharifulina, A.B. Uzdensky // Proc. SPIE. – 2015. – V. 9448. – Режим доступа: doi: 10.1117/12.2179569.

Shen, S. Post-translational modifications of nucleosomal histones in oligodendrocyte lineage cells in development and disease / S. Shen, P. Casaccia-Bonnefil // J Mol Neurosci. – 2008. – V. 35. – No. 1. – P. 13-22.

Specht, K.G. Depolarization of mouse myeloma cell membranes during photodynamic action / K.G. Specht, M.A. Rodgers // J Photochem Photobiol – 1990. – V. 51. – No. 3. – P. 319–324.

Sperka, T. DNA damage checkpoints in stem cells, ageing and cancer / T. Sperka, J. Wang, K.L. Rudolph // Nat Rev Mol Cell Biol. – V. 13. – No. 9. – P. 579–590.

Stankiewicz, A.M. Epigenetics of stress adaptations in the brain / A.M. Stankiewicz, A.H. Swiergiel, P. Lisowski // Brain Res Bull. – 2013. – No. 98. – P. 76-92.

Strathdee, G. Aberrant DNA methylation in cancer: potential clinical interventions / G. Strathdee, R. Brown // Expert Rev Mol Med. – 2002. – V. 4. – No. 4. – P. 1-17.

Sundheim, O. AlkB demethylases flip out in different ways / O. Sundheim, V.A. Talstad, C.B. Vågbø, G. Slupphaug, H.E. Krokan // DNA Repair (Amst). – 2008. – V. 7. – No. 11. – P. 1916-1923.

Sultan, F.A. Epigenetic mechanisms in memory and synaptic function / F.A. Sultan, J.J. Day // Epigenomics. – 2011. – V. 3. – No. 2. – P. 157-181.

Tanaka, T. Cytometry of ATM activation and histone H2AX phosphorylation to estimate extent of DNA damage induced by exogenous agents / T. Tanaka, X. Huang, H.D. Halicka, H. Zhao, F. Traganos, A.P. Albino, W. Dai, Z. Darzynkiewicz // Cytometry A. – 2007. – V. 71. – No. 9. – P. 648–661.

Thompson, J.W. Ischemic preconditioning alters the epigenetic profile of the brain from ischemic intolerance to ischemic tolerance / J.W. Thompson, K.R. Dave, J.I. Young, M.A. Perez-Pinzon // Neurotherapeutics. – 2013. – V. 10. – No. 4. – P. 789-797.

Tognini, P. Dynamic DNA methylation in the brain: a new epigenetic mark for experience-dependent plasticity / P. Tognini, D. Napoli, T. Pizzorusso // Front Cell Neurosci. – 2015. – V. 9. – No. 331. – Режим доступа: doi:10.3389/fncel.2015.00331.

Tong, Z. The role of the p53 tumor suppressor in the response of human cells to photofrin-mediated photodynamic therapy / Z. Tong, G. Singh, A.J. Rainbow // Photochem Photobiol. – 2000. – V. 71. – No. 2. – P. 201–210.

Tsai, H.C. Cancer epigenetics: linking basic biology to clinical medicine / H.C. Tsai, S.B. Baylin // Cell Res. – 2011. – V. 21. – No. 3. – P. 502-517.

Tsankov, A.M. Transcription factor binding dynamics during human ES cell differentiation / A.M. Tsankov, H. Gu, V. Akopian, M.J. Ziller, J. Donaghey, I. Amit, A. Gnirke, A. Meissner // Nature. – 2015. – V. 518. – No. 7539. – P. 344-349.

Tsuji, M. Epigenetic regulation of resistance to emotional stress: possible involvement of 5-HT1A receptor-mediated histone acetylation / M. Tsuji, K. Miyagawa, H. Takeda // Dialogues Clin Neurosci. – 2014. – V. 16. – No. 3. – P. 281-295.

Usuda, J. Photodynamic therapy for lung cancers based on novel photodynamic diagnosis using talaporfin sodium (NPe6) and autofluorescence bronchoscopy / J. Usuda, H. Tsutsui, H. Honda, S. Ichinose, T. Ishizumi, T. Hirata, T. Inoue, K. Ohtani, S. Maehara, K. Imai, Y. Tsunoda, M. Kubota, N. Ikeda, K.

Furukawa, T. Okunaka, H. Kato // Lung Cancer. – 2007. – V. 58. – No. 3. – P. 317-323.

Uzdensky, A. Involvement of adenylate cyclase and tyrosine kinase signaling pathways in response of crayfish stretch receptor neuron and satellite glia cell to photodynamic treatment / A. Uzdensky, M. Kolosov, D. Bragin, O. Dergacheva, O. Vanzha, L. Oparina // Glia. – 2005. – V. 49. – No. 3. – P. 339–348.

Uzdensky, A. Involvement of Ca2+- and cyclic adenosine monophosphate-mediated signaling pathways in photodynamic injury of isolated crayfish neuron and satellite glial cells / A. Uzdensky, A. Lobanov, M. Bibov, Y. Petin // J Neurosci Res. – 2007. – V. 85. – No. 4. – P. 860–870.

Uzdensky, A. Photodynamic inactivation of isolated crayfish mechanoreceptor neuron / A. Uzdensky, D. Bragin, M. Kolosov, O.Y. Dergacheva, G.M. Fedorenko, A. A. Zhavoronkova // Photochem Photobiol. – 2002. – V. 76. – No. 4. – P. 431–437.

Uzdensky, A. Protection effect of GDNF and neurturin on photosensitized crayfish neurons and glial cells / A. Uzdensky, M. Komandirov, G. Fedorenko, A. Lobanov // J Mol Neurosci. – 2013. – V. 49. – No. 3. – P. 480-490.

Uzdensky, A.B. Signal transduction and photodynamic therapy / A.B. Uzdensky // Curr Sign Transd Ther. – 2008. – V. 3. – No. 1. – P. 55–74.

Vaux, D.L. IAPs, RINGs and ubiquitylation / D.L. Vaux, J. Silke // Nat Rev Mol Cell Biol. – 2005. – V. 6. – No. 4. – P. 287–297.

Venturelli, S. Differential induction of apoptosis and senescence by the DNA methyltransferase inhibitors 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine in solid tumor cells / S. Venturelli, A. Berger, T. Weiland, F. Essmann, M. Waibel, T. Nuebling, S. Häcker, M. Schenk, K. Schulze-Osthoff, H.R. Salih, S. Fulda, B. Sipos, R.W. Johnstone, U.M. Lauer, M. Bitzer // Mol Cancer Ther. – 2013. – V. 12. – No. 10. – P. 2226-2236.

Verwanger, T. Gene expression pattern following photodynamic treatment of the carcinoma cell line A-431 analysed by cDNA arrays / T. Verwanger, R. Sanovic, F. Aberger, A.M. Frischauf, B. Krammer // Int J Oncol. – 2002. – V. 21. – No. 6. – P. 1353-1359.

Wachowska, M. 5-Aza-2'-deoxycytidine potentiates antitumour immune response induced by photodynamic therapy / M. Wachowska, M. Gabrysiak, A. Muchowicz, W. Bednarek, J. Barankiewicz, T. Rygiel, L. Boon, P. Mroz, M.R. Hamblin, J. Golab // Eur J Cancer. – 2014. – V. 50. – No. 7. – P. 1370-1381.

Wachowska, M. Epigenetic remodeling combined with photodynamic therapy elicits anticancer immune responses / M. Wachowska, M. Gabrysiak, J. Golab // Oncoimmunology. – 2014. – V. 3. – Режим доступа: doi:10.4161/onci.28837.

Wachowska, M. Targeting epigenetic processes in photodynamic therapy-induced anticancer immunity / M. Wachowska, A. Muchowicz, J. Golab // Front Oncol. – 2015. – V. 5. – P. 176-205.

Wang, D.B. p53 and mitochondrial function in neurons / D.B. Wang, C. Kinoshita, Y. Kinoshita, R. Morrison // Biochem Biophys Acta. – 2014. – V. 1842. – No. 8. – P. 1186-1197.

Wang, H.P. Up-regulation of Hsp27 plays a role in the resistance of human colon carcinoma HT29 cells to photooxidative stress / H.P. Wang, J.G. Hanlon, A.J. Rainbow, M. Espiritu, G. Singh // Photochem Photobiol. – 2002. – № 76. – C. 98-104.

Weller, M. Hypericin C-induced apoptosis of human malignant glioma cells is light-dependent, independent of bcl-2 expression,and does not require wild-type p53 / M. Weller, M. Trepel, C. Grimmel, M. Schabet, D. Bremen, S. Krajewski, J.C. Reed // Neurol Res. – 1997. – V. 19. – No. 5. – P. 459-470.

Weng, Y.L. DNA modifications and neurological disorders / Y.L. Weng, R. An, J. Shin, H. Song, G.L. Ming // Neurotherapeutics. – 2013. – V. 10. – No. 4. – P. 556-567.

Wild, P.J. RNA expression profiling of normal and tumor cells following photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in vitro / P.J. Wild, R.C. Krieg, J. Seidl, R. Stoehr, K. Reher, C. Hofmann, J. Louhelainen, A. Rosenthal, A. Hartmann, C. Pilarsky, A.K. Bosserhoff, R. Knuechel // Mol Cancer Ther. – 2005. – V. 4 . – No. 4. – P. 516-528.

Xu, M. Death and survival of neuronal and astrocytic cells in ischemic brain injury: a role of autophagy / M. Xu, H. L. Zhang // Acta Pharmacol Sin. – 2011. – V. 32. – No. 9. – P. 1089–1099.

Yamashima, T. Hsp70.1 and related lysosomal factors for necrotic neuronal death / T. Yamashima // J Neurochem. – 2012. – V. 120. – No. 4. – P. 477-494.

Yoon, H.G. N-CoR mediates DNA methylation-dependent repression through amethyl CpG binding protein Kaiso / H.G. Yoon, D.W. Chan, A.B. Reynolds, J. Qin, J.Wong // Mol Cell. – 2003. – V. 12. – No. 3. – P. 723–734.

Youle, R.J. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death / R.J. Youle, A. Strasser // Nat Rev Mol Cell Biol. – 2008. – V. 9. – No. 1. – P. 47–59.

Yu, J. The transcriptional targets of p53 in apoptosis control / J. Yu, L. Zhang // Biochem Biophys Res Commun. – 2005. – V. 331. – No. 3. – P. 851-858.

Yu, Y. Shaping the oligodendrocyte identity by epigenetic control / Y. Yu, P. Casaccia, Q.R. Lu // Epigenetics. – 2010. – V. 5. – No. 2. – P. 124-128.

Zawacka-Pankau, J. The p53-mediated cytotoxicity of photodynamic therapy of cancer: recent advances / J. Zawacka-Pankau, J. Krachulec, I. Grulkowski, K.P. Bielawski, G. Selivanova // Toxicol Appl Pharmacol. – 2008. – V. 232. – No. 3. – P. 487-497.

Zawia, N.H. Epigenetics, oxidative stress, and Alzheimer disease / N.H. Zawia, D.K. Lahiri, F. Cardozo-Pelaez // Free Radic Biol Med. – 2009. – V. 46. – No. 9. – P. 1241-1249.

Zhang, J. Histone deacetylase inhibitors and cell death / J. Zhang, Q. Zhong // Cell Mol Life Sci. – 2014. – V. 71. – No. 20. – P. 3885-3901.

Zhang, Q.C. Histone deacetylase inhibitor trichostatin A enhances anti-tumor effects of docetaxel or erlotinib in A549 cell line / Q.C. Zhang, S.J. Jiang, S. Zhang, X.B. Ma // Asian Pac J Cancer Prev. – 2012. – V. 13. – No. 7 – P. 3471-3476.

Zhang, Y.Y. Connections between various trigger factors and the RIP1/ RIP3 signaling pathway involved in necroptosis / Y.Y. Zhang, H. Liu // Asian Pac J Cancer Prev. – 2013. – V. 14. – No. 12. – P. 7069-7074.

Zhou, Q. Histone deacetylase inhibitors SAHA and sodium butyrate block G1-to-S cell cycle progression in neurosphere formation by adult subventricular cells / Q. Zhou, C.L. Dalgard, C. Wynder, M.L. Doughty // BMC Neurosci. – 2011. – V. 12. – No.1. – Режим доступа: doi:10.1186/1471-2202-12-50.

Zhu, J. GO-2D: identifying 2-dimensional cellular-localized functional modules in Gene Ontology / J. Zhu, J. Wang, Z. Guo, M. Zhang, D. Wang, Y. Li, D. Wang, G. Xiao // BMC Genomics. – 2007. – V. 8. – Режим доступа: doi:10.1186/1471-2164-8-30.

Ziech, D. Reactive oxygen species (ROS)--induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis / D. Ziech, R. Franco, A. Pappa, M.I. Panayiotidis // Mutat Res. – 2011. – V. 711. – No. 1-2. – P. 167-173.

Zong, W.X. Necrotic death as a cell fate / W.X. Zong, C.B.Thompson // Genes Dev. – 2006. – V. 20. – No. 1. – P. 1-15.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю - Узденскому Анатолию Борисовичу, а также Демьяненко С. В., Командирову М. А., Рудковскому М. В. и Колосову М. С. за оказанную помощь в выполнении диссертационной работы.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа была поддержана грантами РФФИ № 08-04-01322, 11-04-01476, 14-04-00741.