На правах рукописи

Шарифулина Светлана Анатольевна

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ РЕАКЦИЙ НЕРВНОЙ ТКАНИ НА ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ

Специальность – 03.01.02 Биофизика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Воронеж - 2016

Работа выполнена в Академии биологии и биотехнологии
ФГАОУ ВО “Южный Федеральный Университет”

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Узденский Анатолий Борисович

Официальные оппоненты:

Пинелис Всеволод Григорьевич
доктор медицинских наук, профессор,
ФГБУ «Научный центр здоровья детей»
(г. Москва), лаборатория нейробиологии и
фундаментальных основ развития мозга,
главный научный сотрудник

Розенкранц Андрей Александрович
кандидат биологических наук,
ФГБОУ ВО «Московский государственный
университет имени М.В.Ломоносова»,
кафедра биофизики биологического
факультета, ведущий научный сотрудник

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки
Институт физиологии им. И.П. Павлова
Российской академии наук, г. Санкт-
Петербург

Защита диссертации состоится 15 апреля 2016 г. в 15:30 часов на заседании диссертационного совета Д 212.038.03 на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет» по адресу: 394006, г. Воронеж, Университетская пл., 1, ауд. 59.

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

Автореферат разослан “19” февраля 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук Грабович Маргарита Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. 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 нейродегенерации и нейропротекции нормальной нервной ткани при фотодинамическом (ФД) воздействии должны быть тщательно изучены. Исследование данного вопроса помогло бы оптимизировать режимы ФДТ при клиническом применении и разработать способы защиты здоровых нервных и глиальных клеток от ФД повреждения.

Реакции клеток на различные воздействия, включая ФДТ, регулируются сложной системой внутриклеточной сигнализации, состоящей из тысяч белков (Buytaert et al., 2007; Gomperts et al., 2009;. Узденский, 2010). Но 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), острый и хронический 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 (Chestnut et al., 2011). 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; Yamayoshi 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.

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.

Практическая значимость. 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 спецкурсе по фотобиологии и фотомедицине на кафедре биофизики и биокибернетики физического факультета Южного федерального университета.

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 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, 2015, 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).

Публикации. По теме диссертационной работы имеется 24 публикации, 7 из них в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

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.

Структура и объем работы. Диссертационная работа включает 136 страниц машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, результатов, обсуждения результатов, выводов и списка литературы, включающего 227 отечественных и зарубежных источника. Работа включает 36 рисунков и 6 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. (1) изолированные абдоминальные рецепторы растяжения речного рака *Astacus leptodactilus,* состоящие из изолированных механорецепторных нейронов (МРН), укрепленных на рецепторных мышцах и окруженных оболочкой из сателлитных глиальных клеток (ГК). Изолированный МРН способен генерировать потенциалы действия (ПД) 10-12 часов с частотой, зависящей от степени растяжения рецепторной мышцы. (2) Брюшные нервные цепочки (БНЦ) речного рака *Astacus leptodactilus*, состоящие из 6 ганглиев, соединенных коннективами. (3) Кора головного мозга использовались мышей-самцов CD-I весом 20-25 г.

Регистрация импульсной активности МРН. Выделенные рецепторы растяжения помещали в плексигласовую кювету с 2 мл физиологического раствора Ван-Харревельда для холоднокровных животных (мМ: 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 электродов, усиливались и оцифровывались с помощью аналого-цифрового преобразователя L-761 (L-Card, Москва, Россия). Их частота непрерывно регистрировалась. Эксперименты проводились при температуре 23±4◦ С.

Фармакологическая модификация. Каждая серия экспериментов включала 4 группы: (1) контроль, (2) воздействие модулятора активности фермента, (3) ФД воздействие, (4) ФД воздействие в присутствии модулятора. ингибитора или активатора. Растворы модуляторов добавляли в кювету с рецептором растяжения рака за 25 минут до начала облучения, продолжая регистрировать импульсную активность нейронов. Использовали следующие модуляторы: ингибиторы гистондеацетилаз натриевая 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) (Все они поставлены Sigma-Aldrich-Rus (Москва). RITA (10 мкМ), теновин-1 (10 мкМ) и нутлин-3 (1мкМ) были поставлены фирмой Tocris Bioscience, Великобритания.

Фотодинамическое воздействие на МНР. После 30-минутной контрольной записи импульсной активности нейрона в кювету добавлялся фотосенсибилизатор -

сульфированный алюмофталоцианин Фотосенс (AlPcSn, n=3,1; 75 нМ) (ФС) (НИОПИК, Москва). После 30-минутной инкубации клетки облучали диодным лазером (670 нм, 0,1 Вт/см2, 50 Дж/см2) в течение 30 минут.

Фотодинамическое воздействие на БНЦ. В каждой серии экспериментов (контрольная группа без ФД воздействия, опытные группы через 2 и 11 часов после ФДТ) выделялось по 10 БЦН. Препараты БНЦ инкубировали с 1 мкМ фотосенса в течение 1 часа, и подвергали ФД воздействию, облучая их в течение 500 секунд диодным лазером (670 нм, 0.1 Вт/см^2, 50 Дж/см^2).

Фотодинамическое воздействие на кору головного мозга мыши. Через 4 часа после внутрибрюшинного введения гидрохлорида 5-аминолевулиновой кислоты (ALA, 100 мг/кг,) мозг мыши облучали 20 минут с помощью гелий неонового лазера (633 нм, 15 мВт/см^2; общая световая доза - 18 Дж/см^2). Срезы коры (7х7х2 мм^3) готовились через 1 или 4 ч после ФДТ.

Флуоресцентно-микроскопическое исследование некроза и апоптоза нейронов и ГК.

Визуализация некроза и апоптоза ядер МРН и ГК в рецепторе растяжения проводилась через 8 часов после прекращения облучения (время, необходимое для развития апоптоза) методом двойного флуорохромирования препарата МРН пропидиум-иодидом (ПИ) (100 мкМ) (Sigma-Aldrich-Rus, Москва, Россия), проникающим только в

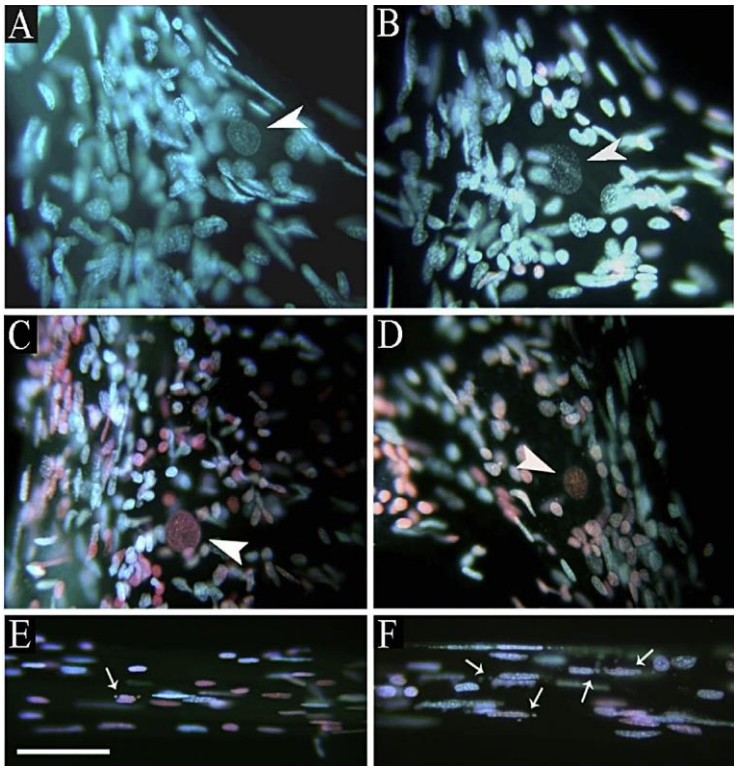

Рис. 1. Влияние ингибирования ДНК-метилтрансфераз децитабином и фотодинамического воздействия на морфологию ядер рецепторного нейрона и окружающих глиальных клеток. (A) Контроль; (B) Темновое действие децитабина; (C и E) фотодинамическое воздействие; (D и F) фотодинамическое воздействие + децитабин. На (E) и (F) фрагментированные апоптотические ядра глиальных клеток на проксимальном участке аксона. Ядра живых клеток флуоресцируют сине-зеленым, ядра некротических клеток флуоресцируют красным. Большие стрелки (A–D) - ядра нейрона, маленькие (E, F) - фрагментированные ядра глии. Масштаб 50 мкм.

некротические клетки с поврежденной мембраной, и флуорохромом Hoechst-33342 (100 мкМ) (Sigma-Aldrich-Rus, Москва, Россия), визуализирующим морфологию ядерного хроматина и выявляющим апоптозные клетки с фрагментированными ядрами. Препараты фотографировались на флуоресцентном микроскопе ЛЮМАМ И-3 (ЛОМО, Санкт-Петербург), оснащенном цифровой камерой NikonCoolpix 995, или NIKON Eclipse FN1 (Япония).

Протеомное исследование ФД-индуцированных эпигенетических изменений в нервной ткани проводилось с помощью микрочипов Panorama Ab Microarray Gene Regulation Kits (GRAA2, Sigma-Aldrich-Rus, Москва, Россия). Образцы ткани гомогенизировали на льду с помощью ультразвукового гомогенизатора Sonics Vibracell (Sonics and Materials Inc., США). Затем образцы центрифугировали на центрифуге Eppendorf 5417 C/R при 10000 g и 4 ^{o}C. Концентрацию белка по методу Бредфорд. Пробы разбавлялись так, чтобы в них было по 1 мг/мл белка. Все образцы инкубировались в течение 30 мин в темноте с флуоресцентными красителями Cy3 и Cy5 (GE Healthcare, Великобритания) в концентрации 1 мг/мл или, наоборот, с помощью Cy5 и Cy3, соответственно. Эти красители флуоресцируют в разных спектральных диапазонах, что позволяет различать образцы по их флуоресценции. После флуорохромирования несвязавшийся краситель удалялся с помощью поставляемых в наборе колонок SigmaSpin, которые центрифугировали при 4000 об/мин. Затем с помощью реагента Бредфорд снова контролировали содержание общего белка в пробах. 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. Микрочипы сканировались на сканере GenePix 4100A (Molecular Devices, USA) на длинах волн 532 и 635 нм, соответствующих максимумам флуоресценции флуорохромов Cy3 и Cy5. Флуоресцентные изображения микрочипов (Рис.2) анализировали с помощью программы GenePix Pro 6.0, осуществляющей захват данных со сканера и их первичный анализ. Подробное описание методики протеомного исследования ФД-индуцированных эпигенетических изменений в нервной ткани описано в работе (Demyanenko et al., 2014).

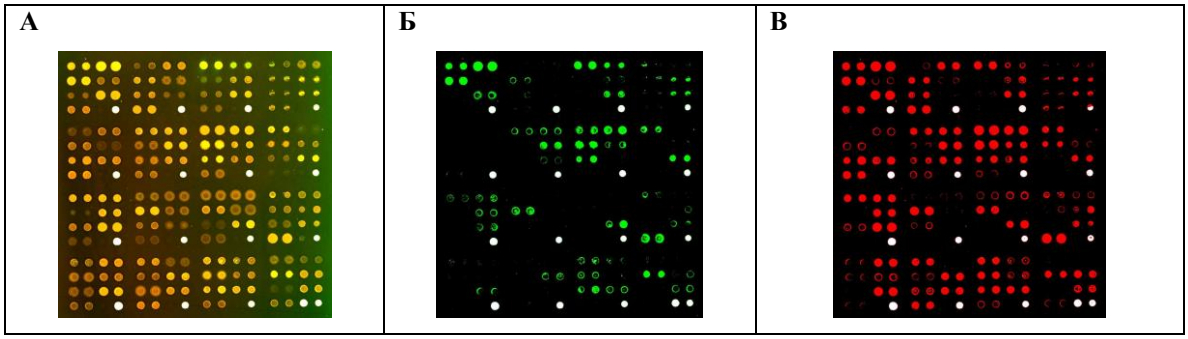

Рис. 2. Флуоресцентное изображения микрочипа The Panorama Antibody Microarray - Gene Regulation (GRAA2), флуорохромированного красителями Cy3 и Cy5 (А). (Б) - распределение зеленой флуоресценции Cy3, (В) - распределение красной флуоресценции Cy5

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Роль метилирования ДНК и деацетилирования гистонов в ФД-индуцированной инактивации и смерти нейронов и глиальных клеток речного рака

Лазерное облучение и ФС по-отдельности не меняли нейронную активность и выживаемость МНР и ГК. Но их совместное действие, т.е. ФДТ, приводило к снижению нейронной активности, некрозу нейронов и ГК и апоптозу ГК (табл. 1, 2). Ингибирование ДНК-метилтрансфераз с помощью 5-азацитидана более чем в 2 раза увеличивало уровень некроза глии (табл.1). Ингибирование ДНК-метилтрансфераз с помощью 5-азацитидина и децитабина снижало уровни ФД-индуцированного некроза клеток глии в 1,4 и 2,0 раза (табл.1, 2).

Таблица 1. Влияние ингибитора ДНК-метилтрансферазы 5-азацитидина (5-Aza, 10мкМ) на продолжительность импульсной активности нейрона, уровень некроза нейронов и ГК, и уровень апоптоза ГК в темноте и при ФДТ с 75 нм ФС. * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001

Параметр	Контроль	5-азацитидин	ФДТ	ФДТ + 5-азацитидин
	а	б	в	г
Нейрон				
Продолжительность импульсации МРН, мин	385 ± 38	302 ± 22	10 ± 1***1	14 ± 2.1 ***1,2
Некроз нейрона, %	1.1 ± 0.3	1 ± 0.6	93± 3***1	86 ±8***1,2
Глия				
Некроз глии, %	6 ± 1.2	28 ± 2.1*1	82 ± 3***1	56 ± 4***1 *3
Апоптоз глии, отн. ед.	1.6 ± 0.2	4.5 ± 2	21 ± 4 **1	25 ± 3.8 ***1,2

Таблица 2. Влияние ингибитора ДНК метилтрансферазы децитабина (10 мкм) на продолжительность импульсной активности нейрона, уровень некроза нейронов и ГК, и уровень ГК в темноте и при ФДТ с 75 нм ФС. * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001

Параметр	Контроль	децитабин	ФДТ	ФДТ + децитабин
	а	б	в	г
Нейрон				
Продолжительность импульсации МРН, мин	378 ± 32	296 ± 27	14 ± 2**1	12 ± 1.6 **1,2
Некроз нейрона, %	0.8 ± 0.05	0.7 ± 0.04	91± 2.5**1	89 ± 7**1,2
Глия				
Некроз глии, %	1 ± 0.2	1 ± 0.3	57 ± 4***1	25.5 ± 6**1,2,3
Апоптоз глии, отн. ед.	2.1 ± 0.6	2.9 ± 0.7	8,3 ± 0,8 *1	7.8 ± 1.3

Ингибирование ДНК-метилтрансфераз с помощью 5-азацитидина и децитабина защищало ГК, но не МРН от ФД-индуцированного некроза. Это говорит об участии ДНК-метилтрансфераз в ФД-индуцированном некрозе глии. Деметилирование ДНК 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).

Ингибирование гистондеацетилаз посредством VPA, TSA и SBHA не влияло на некроз нейронов и глии и апоптоз глиальных клеток в темноте (табл. 3,4,5), также на уровень ФД-индуцированного некроза нейрона. VPA, TSA и SBHA защищали ГК, но не нейроны, от ФД-индуцированной гибели.

Таблица 3. Влияние ингибитора гистондеацетилаз VPA (0,5 мМ) на продолжительность импульсной активности нейрона, уровень некроза нейронов ГК и уровень апоптоза ГК в темноте и при ФДТ с 75 нм ФС. * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001

Параметр	Контроль	VPA	ФДТ	ФДТ + VPA
	а	б	в	г
Нейрон				
Продолжительность импульсации МРН, мин	417 ± 21	263 ± 23*1	16 ± 2.2***1	21 ± 3.6 ***1,2
Некроз нейрона, %	0.9 ± 0.05	0.7 ± 0.02	92.6 ± 3***1	80.4 ± 6.5***1,2
Глия				
Некроз глии, %	1 ± 0.3	1 ± 0.1	52 ± 3.5***1	21 ± 7**3
Апоптоз глии, отн. ед.	1.8 ± 0.3	2 ± 0.5	13.5 ± 1 ***1	3.8 ± 1.1**1,2,3

Таблица 4. Влияние ингибитора гистондеацетилаз трихостатина А (TSA, 100 н М) на продолжительность импульсной активности нейрона , уровень некроза нейронов и ГК, и уровень апоптоза ГК в темноте и при ФДТ с 75 нм ФС. * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001

Параметр	Контроль	TSA	ФДТ	ФДТ + TSA
	а	б	в	г
Нейрон				
Продолжительность импульсации МРН, мин	482 ± 24	471 ± 26	17 ± 3**1	15 ± 4**1,2
Некроз нейрона, %	1 ± 0.07	1.8 ± 0.8	91 ± 3**1	90 ± 4**1,2
Глия				
Некроз глии, %	1 ± 0.1	1.5 ± 0.2	81.5 ± 3***1	49 ± 2.5***1,2,3
Апоптоз глии, отн. ед.	0.6 ± 0.05	1,1 ± 0.8	8.2 ± 1.7 *1	2.8 ± 0.5**3

Таблица 5. Влияние ингибитора гистондеацетилаз SBHA (5 мкМ) на продолжительность импульсной активности нейрона , уровень некроза нейронов и ГК, и уровень апоптоза ГК в темноте и при ФДТ с 75 нм ФС. * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001

Параметр	Контроль	SBHA	ФДТ	ФДТ + SBHA
	а	б	в	г
Нейрон				
Продолжительность импульсации МРН, мин	452 ± 18	289 ± 28*1	15 ± 2**1	15.5 ± 2**1,2
Некроз нейрона, %	1 ± 0.05	0.8 ± 0.05	82 ± 9***1	83.5 ± 7***1,2
Глия				
Некроз глии, %	1 ± 0.2	2.5 ± 0.5	63 ± 5***1	41 ± 7***1,2*3
Апоптоз глии, отн. ед.	2 ± 0.04	5 ± 1.1 *1	16.8 ± 4 ***1	7.9 ± 2.3*1,3

Ингибиторы гистондеацетилаз - VPA, TSA и SBHA снижали ФД-индуцированный апоптоз и некроз ГК. Это указывает на участие гистоновых деацетилаз в ФД-индуцированной смерти нейронов и глиальных клеток. Эти ингибиторы HDAC также демонстрируют нейропротекторные свойства при нейродегенеративных заболеваниях (Biermannetal., 2011; Harrison, Dexter, 2013; Zhang, et al., 2012).

Итак, эпигенетические процессы метилирования ДНК и деацетилирования гистонов, участвуют в ФД-индуцированном некрозе глиальных клеток, но не нейронов. Деацетилирование гистонов также участвует в апоптозе ГК.

2. Роль белка p53 в ФД-индуцированной инактивации и смерти нейронов и глиальных клеток речного рака

В ответ на повреждения ДНК повышается уровень активности белка p53, называемый «стражем генома», что приводит к инициации транскрипции различных генов, участвующих в регуляции клеточного цикла, репарации ДНК, запуске апоптоза при нерепарируемых повреждениях ДНК. Проведенные опыты показали, что в темновых условиях активация p53 теновином-1, нутлином-3 или WR-1065 индуцировала апоптоз ГК (табл.6,8,9), тогда как ингибитор p53 пифитрин-α снижал уровень апоптоза ГК (табл. 10).

Таблица 6. Влияние активатора p53 теновина-1 (10 мкМ) на продолжительность импульсной активности нейрона (время жизни), уровень некроза нейронов и ГК, и уровень апоптоза ГК в темноте и при ФДТ с 75 нм ФС. * p <0,05, *** p <0,001

Параметр	Контроль	теновин-1	ФДТ	ФДТ + теновин-1
	1	2	3	4
Нейрон				
Продолжительность импульсации МРН, мин	420 ± 18	92 ± 9 ***1	17 ± 2***1	18 ± 2 ***1,2
Некроз нейрона, %	0	46 ± 10 **1	84 ± 3***1	71 ± 8**1,3
Глия				
Некроз глии, %	1.5±0.2	17.5 ± 2.1*1	87 ± 2***1	53 ± 3***1,2,3
Апоптоз глии, отн. ед.	1.7 ± 0.3	48 ± 9**1	12 ±1.8 **1	36 ± 4 ***1*3

Таблица 7. Влияние активатора p53 RITA (10 мкМ) на продолжительность импульсной активности нейрона (время жизни), уровень некроза нейронов и ГК, и уровень апоптоза ГК в темноте и при ФДТ с 75 нм ФС. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

Параметр	Контроль	RITA	ФДТ	ФДТ + RITA
	1	2	3	4
Нейрон				
Продолжительность импульсации МРН, мин	420 ± 12	408 ± 8	21 ± 2***1	16 ± 3 ***1,2
Некроз нейрона, %	0	7 ± 2	81 ± 7***1	67 ± 12**1,2
Глия				
Некроз глии, %	1,2 ± 0.1	1.1 ± 0.3	59 ± 4***1	51 ± 11**1,2
Апоптоз глии, отн. ед.	1.9 ± 0.2	4.1 ± 0.2	7.4 ±1 *1	23 ± 2 ***1,2**3

Таблица 8. Влияние активатора p53 WR-1065 (100 мкМ) на продолжительность импульсной активности нейрона , уровень некроза нейронов и ГК, и уровень апоптоза ГК в темноте и при ФДТ с 75 нм ФС. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

Параметр	Контроль	WR-1065	ФДТ	ФДТ + WR-1065
	1	2	3	4
Нейрон				
Продолжительность импульсации МРН, мин	452 ± 12	309 ± 9*1	9.8 ± 1.2***1	19 ± 2 ***1,2 *3
Некроз нейрона, %	0	0	87 ± 6***1	89 ± 3***1,2
Глия				
Некроз глии, %	1.1 ±0.1	1.3 ± 0.1	69 ± 6***1	87 ± 3***1,2 *3
Апоптоз глии, отн. ед.	1.1 ± 0.1	7.2 ± 0.9*1	13 ±2 **1	14.5 ± 2 *1,2

Таблица 9. Влияние активатора p53 нутлина-3 (1 мкМ) на продолжительность импульсной активности нейрона , уровень некроза нейронов и ГК, и уровень апоптоза ГК в темноте и при ФДТ с 75 нм ФС. *p<0.05,***p<0.001

Параметр	Контроль	нутлин-3	ФДТ	ФДТ + нутлин-3
	1	2	3	4
Нейрон				
Продолжительность импульсации МРН, мин	423 ± 18	386 ± 7	11.2 ±0.9***1	13.1 ± 3.1***1,2
Некроз нейрона, %	0	0	94 ± 3***1	91 ± 4***1,2
Глия				
Некроз глии, %	0.9 ±0.1	0.6 ± 0.1	72 ± 8***1	59 ± 11***1,2
Апоптоз глии, отн. ед.	1.0 ± 0.1	17.1 ± 3.6*1	12.6 ±2.3 **1	29 ± 7 **1,2*3

Таблица 10. Влияние ингибитора p53 пифитрина-α (PFT, 0,5 мкМ) на продолжительность импульсной активности нейрона , уровень некроза нейронов и ГК, и уровень апоптоза ГК в темноте и при ФДТ с 75 нм ФС. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

Параметр	Контроль	PFT	ФДТ	ФДТ + PFT
	1	2	3	4
Нейрон				
Продолжительность импульсации МРН, мин	426 ± 4	395 ± 8	9 ± 1.1***1	18 ± 2 **1,2 *3
Некроз нейрона, %	0	0	96 ± 2***1	72 ± 3***1,2*3
Глия				
Некроз глии, %	0	0	79 ± 2***1	53 ± 4**1,2 *3
Апоптоз глии, отн. ед.	3.4 ± 0.3	1.1 ± 0.1*1	22 ±5 *1	43 ± 4**1,2 *3

При ФД воздействии активаторы p53 теновин-1, RITA и нутлин-3 усиливали ФД-индуцированный апоптоз ГК (табл.6,7,9). Следовательно, белок p53 участвовал в апоптозе ГК после инкубации в темноте и после окислительного стресса, вызванного ФДТ. Проапоптозное влияние p53, вероятно, было связано не с повреждением ДНК, а

с перемещением его в митохондрии и стимуляцией выхода цитохрома с (Morrison et al., 2003.

Достоинством рецептора растяжения рака является возможность по-отдельности изучать изменения в идентифицированных одиночных нейронах и окружающих глиальных клетках. Однако, массы этих клеток недостаточно для проведения протеомного анализа, который позволяет одновременно изучать экспрессию десятков и сотен белков. Поэтому такие исследования мы проводили на двух объектах – брюшной нервной цепочке рака и коре головного мозга мыши.

3. Изменения уровня экспрессии белков, участвующих в эпигенетической регуляции в брюшной нервной цепочке речного рака, после ФД-воздействия

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 (табл. 11): 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. Одновременно происходило снижение уровня активатора транскрипции - Brm, помогающего транскрипционным факторам получить доступ к нуклеотидным последовательностям ДНК.

Таблица 11. Более 30% увеличение (опыт/контроль) или уменьшение (контроль/опыт) уровня 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
		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 H3	**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	Гистонодеацетилаза.. Снимает активирующее влияние ацетилирования гистонов на экспрессию генов	**1,40**	0,08	1,20	0,02
MeCP2	Метил-CpG-связывающий белок Ингибитор транскрипции, привлекая HDAC	**1,32**	0,06	1,12	0,03
MBD2ab	Метил-CpG-связывающий белок Ингибитор транскрипции, привлекая HDAC	**1,67**	0,28	1,23	0,03
MBD4	Метил-CpG-связывающий белок Ингибитор транскрипции, 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

В этот же срок 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 H3K9me3 — метки репрессии; фактора транскрипции FOXC2, который играет важную роль в регуляции экспрессии генов, участвующих в росте клеток, пролиферации, дифференцировке (табл. 11).

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, которые снимают активирующее влияние ацетилирования гистонов на экспрессию генов, 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.

4. Изменения уровня экспрессии белков, участвующих в эпигенетической регуляции в коре головного мозга мыши при ФД-воздействия

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 (табл. 12): гистондеацетилаз HDAC-1, HDAC-11, белка KAISO.

Таблица 12. Более 30% увеличение (опыт/контроль) или 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	**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
		Контроль /опыт		**Контроль /опыт**	
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/MTA1L1	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

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. 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 эпигенетическому 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.

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 происходило изменение уровня 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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эпигенетические процессы повреждения нервной ткани при окислительном стрессе пока мало изучены (Cyr et al., 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, как известно, ингибирует экспрессию генов. (Konsoula and Barile, 2012; Struhl, 1998). В наших экспериментах ингибиторы гистондеацетилаз вальпроат, трихостатин А и SBHA подавляли ФД-индуцированную гибель ГК, но не нейронов. Цитопротекторная активность этих веществ может быть связана с активацией транскрипции таких нейропротекторных белков, как BDNF, GDNF, HSP70, Blc-2, Bcl-x и др. (Chuang et al.,2009; Zhang et al., 2012). Т.е. деацетилирование гистонов вовлечено в процессы некроза и апоптоза ГК при ФДТ. Одним из стимулятором апоптоза, в ответ на повреждение ДНК, выступает белок p53. Как фактор транскрипции, он индуцирует экспрессию различных проапоптотических белков (Checler, 2014). В нашей работе показано, что p53 вовлечен в апоптоз ГК. Полученные нами данные сведены в схему

Таким образом, эпигенетических механизмы участвуют в регуляции выживаемости и смерти ГК, но не нейронов при ФДТ. Изменения уровней экспрессии эпигенетических белков при ФДТ в здоровой нервной ткани были показаны на БНЦ и коре головного мозга мыши.

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, 2003; Zhu et al., 2007). 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. На основании полученных данных можно построить схему защитных и повреждающих процессов в коре головного мозга мыши при ФДТ (Рис. 3). 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.

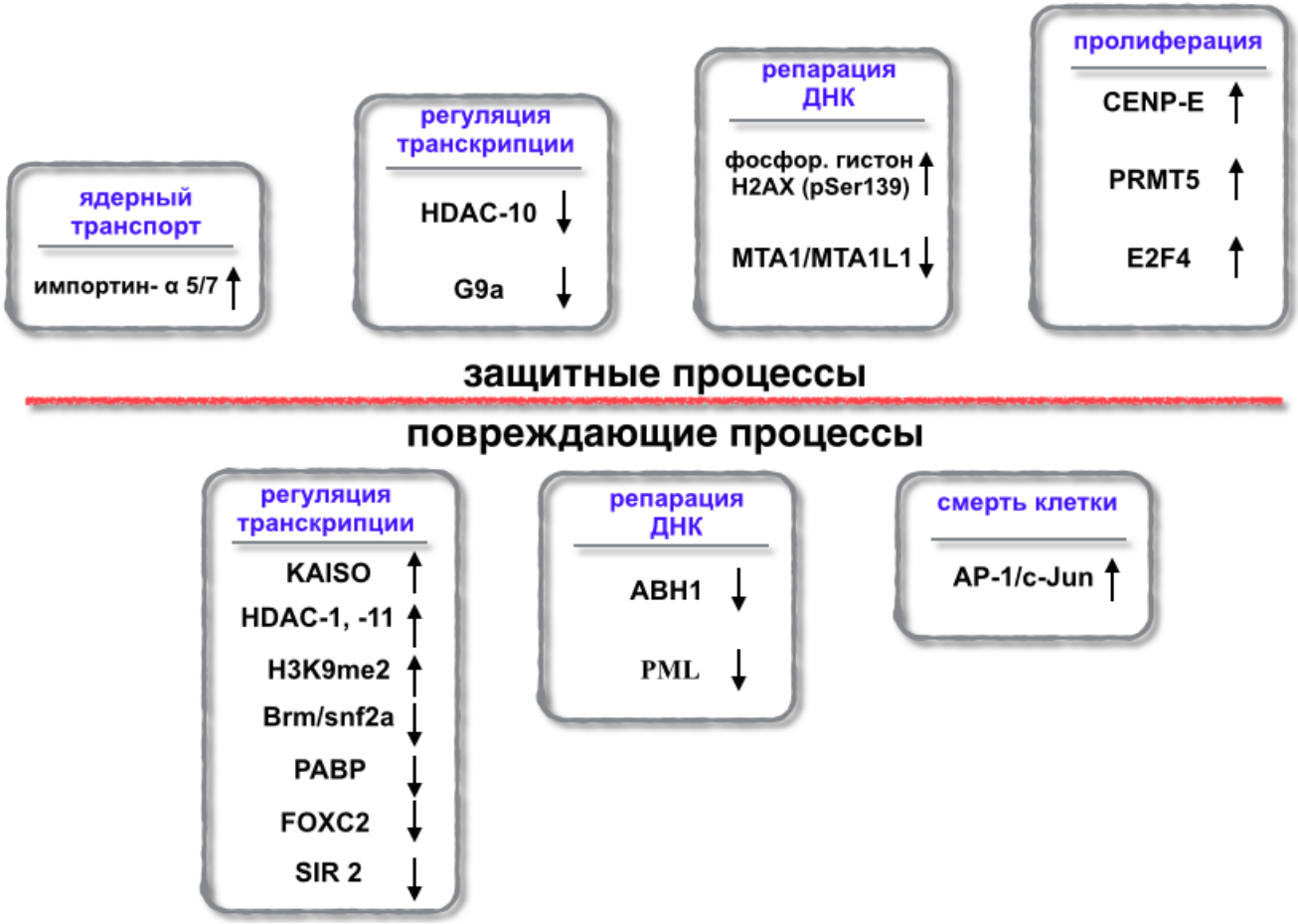

Рис. 3. Схема защитных и повреждающих процессов, протекающих в коре головного мозга мыши при фотодинамическом воздействии.

Полученные результаты могут найти применение в поиске новых маркеров и мишеней для диагностики и лечения окислительного повреждения мозга.

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 основных работ, опубликованных по теме диссертации в журналах, рекомендованных ВАК РФ

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

2. Anatoly B. Uzdensky, Elena Berezhnaya, Vera Kovaleva, Marya Neginskaya, Mikhail Rudkovskii, **Svetlana Sharifulina.** Photodynamic therapy: a review of applications in neurooncology and neuropathology // J. Biomed. Opt. 2015. 20(6). P. 061108-1-061108-7.
3. **S. Sharifulina**, M. Komandirov, A. Uzdensky The role of DNA methylation and histone deacetylation in reactions of glial cells to photodynamic treatment // Glia. 2015. V.63, S1, E112-E113.
4. **S.A. Sharifulina,** A.B. Uzdensky. Photodynamic injury of isolated crayfish neuron and surrounding glial cells: the role of p53 // Proc. SPIE 9448, SFM 2014: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XVI; Laser Physics and Photonics XVI; and Computational Biophysics. 2015. P. 94480L1-94480L7.
5. **Sharifulina S.A.,** Komandirov M.A., Uzdensky A.B. Epigenetic regulation of death of crayfish glial cells but not neurons induced by photodynamic impact // Brain Res Bull. 2014.V.102. P.15-21.
6. Demyanenko S.V., Uzdensky A.B., **Sharifulina S.A.**, Lapteva T.O., Polyakova L.P. PDT-induced epigenetic changes in the mouse cerebral cortex: A protein microarray study // Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects. 2014. V. 1840 (1). P. 262-270.
7. Узденский А.Б., Рудковский А.В., Федоренко Г.М., Бережная Е.В., Ищенко И.А., Ковалева В.Д., Командиров М.А., Негинская М.А., Хайтин А.М., **Шарифулина С.А.** Реакции нейронов и глиальных клеток рака на фотодинамическое воздействие: сигнальная регуляция, ультраструктурные изменения и нейроглиальные взаимодействия // Биологические мембраны, 2013, том 30, № 5–6, с. 334–349.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

8. **Шарифулина С.А.,** Узденский А.Б. Участие эпигенетических механизмов в ФД-индуцированной гибели глиальных клеток, но не нейронов речного рака // В: Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Пущино. 2015, т.2. 579-583.
9. **Шарифулина С.А.,** Рудковский А.В., Узденский А.Б. Участие p53 в гибели механорецепторного нейрона и глиальных клеток рака при аксотомии и фотодинамическом воздействии // В: Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Пущино. 2015, т.2. 575-579.
10. Узденский А.Б., Рудковский А.В., Бережная Е.В., Ковалева В.Д., Ищенко И.А., Командиров М.А., Негинская М.А., **Шарифулина С.А.,** Хайтин А.М. Сигнальная регуляция смерти нейронов и глиальных клеток при фотодинамическом воздействии // В: Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Пущино. 2013. Т.2. С. 611-616.
11. Демьяненко С.В., **Шарифулина С.А.,** Узденский А.Б. Протеомное исследование эпигенетических изменений при фотоокислительном повреждении коры мозга мышей // В: Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Пущино. 2013. Т. 2. С.528-533.
12. **Шарифулина С.А.,** Узденский А.Б. Участие процессов метилирования ДНК и деацетилирования гистонов в реакциях нейронов и глиальных клеток рака на фотодинамическое воздействие. Материалы V Съезда Биофизиков России. Ростов-на-Дону. 2015. Т. 2. С. 196.
13. **Шарифулина С.А**., Рудковский М.В., Узденский А.Б. Участие белка p53 в смерти нейронов и глиальных клеток, вызванной аксотомией и фотодинамическим воздействием. Материалы V Съезда Биофизиков России. Ростов-на-Дону. 2015. Т.2. С. 197.
14. Berezhnaya E., **Sharifulina S**., Neginskaya M., Kovaleva V., Rudkovskii M., Uzdensky A. Involvement of transcription factors NF-kappaB, AP-1, p53 and STAT-3 in photooxidative death of glial and neuronal cells // 16th Congress of the European Society for Photobiology. Programme and book of abstracts. Portugal. 2015. P.60.

15. **S. Sharifulina**, A. Uzdensky. Epigenetic regulation of death of glial cells but not neurons induced by photodynamic injury // IBRO - 9th World Congress International Brain Research Organization. Rio de Janeiro. 2015. http://ibro2015.org. 1098.
16. Uzdensky A.B., Berezhnaya E.V., Kovaleva V.D., Komandirov M.A., Neginskaya M.A., Khaitin A.M., Rudkovskii M.V., **Sharifulina S.A.** Protection of the crayfish mechanoreceptor neuron and surrounding glial cells from photooxidative injury by modulators of diverse signal transduction pathways // Materials of 12th International Conference on Neuroprotective Agents. The Boar's Head Inn, Charlottesville. USA. 2014. P. 40.
17. **Шарифулина С.А.**, Узденский А.Б. Эпигенетическая регуляция смерти глиальных клеток, но не нейронов рака при фотодинамическом воздействии // По материалам VII съезда Российского фотобиологического общества. Пос. Шепси. 2014. С. 73.
18. **Sharifulina S.A.,** Komandirov M.A., Uzdensky A.B. Epigenetic regulation of the death of neurons and glial cells during photodynamic treatment. // Proceedings of the International Scientific School 'Frontiers in Modern Neuroscience' and International Symposium 'Glia as a target for the treatment of neurodenerative diseases'. Nizhny Novgorod. 2014. P. 35-36.
19. **Шарифулина С.А**., Узденский А.Б. Участие эпигенетических регуляторов ДНК-метилтрансферазы и гистондеацетилазы в реакциях нейронов и глиальных клеток на фотоокислительный стресс // Материалы V Международной научно-практической конференции Актуальные проблемы биологии, нанотехнологии и медицины . Ростов-на-Дону. 2013. С. 140-141.
20. Demyanenko S.V., **Sharifulina S.A.,** Uzdensky A.B. ALA-PDT-induced epigenetic changes in mouse cerebral cortex // 15th Congress of the European Society for Photobiology. Programme and book of abstracts. Belgium. 2013. P. 91-92.
21. Uzdensky A.B., Rudkovskii M.V, Berezhnaya E.V., Komandirov M.A., Kovaleva V.D., Neginskaya M.A., **Sharifulina S.A.** Intercellular and intracellular signaling modulate PDT-induced death of neurons and glial cells // FEBS Journal 280 (Suppl. 1). 2013. P. 425.
22. Колосов М. С., Бибов М. Ю., Демьяненко С. В., **Шарифулина С. А.,** Узденский А. Б. Протеомный анализ реакции нервной ткани рака на фотодинамически-индуцированный окислительный стресс // Материалы XVI Международной конференции по нейрокибернетике, том 1, Секционные доклады. Ростов- на–Дону. 2012. С. 20-23.
23. Колосов М. С., Бибов М. Ю., Демьяненко С. В., **Шарифулина С. А**., Узденский А. Б. Фотоиндуцированные изменения белкового спектра нервной ткани рака // Материалы всероссийской молодежной конференции “Актуальные вопросы биомедицинской инженерии”. Ростов-на-Дону. 2012. С. 114-117.
24. **Sharifulina S.A.,** Kolosov M. S., Bibov M. Y., Demyanenko S.V., Uzdensky A. B. Proteomic study of epigenetic changes in expression of proteins in crayfish nervous tissue under photodynamic treatment // Materials of International Summer school : «Neurogenetics. Unraveling behavior and brain mechanisms using modern technologies». Zvenigorod. 2012. P. 23-24.

Список сокращений

ФДТ – фотодинамическая терапия
МРН – механорецепторный нейрон
ПД - потенциал действия
БЦН – брюшная нервная цепочка
ФС – Фотосенс
ALA - гидрохлорид 5-аминолевулиновой кислоты
ПИ – пропидиум-иодид
Cy3™ - активный краситель, максимум флуоресценции 532 нм
Cy5™ - активный краситель, максимум флуоресценции 635 нм
ГК – глиальные клетки