

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования

«ЮЖНЫЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
АКАДЕМИЯ БИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ
ИМ. Д. И. ИВАНОВСКОГО

На правах рукописи



Бережная Елена Викторовна

ИЗМЕНЕНИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА И РОЛЬ ФАКТОРОВ
ТРАНСКРИПЦИИ NF- κ B, AP-1 И NIF-1 ПРИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОМ
ПОВРЕЖДЕНИИ НЕЙРОНОВ И ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 Фотодинамическая терапия	11
1.1.1 Механизм действия фотодинамической терапии	11
1.1.2 Фотосенсибилизаторы. Радахлорин и фотосенс	13
1.1.3 Применение ФДТ. Лечение опухолей мозга	15
1.2 Митохондрии и окислительный стресс	18
1.2.1 Основные биоэнергетические процессы	18
1.2.2 Окислительный стресс	23
1.2.3 Система антиоксидантной защиты клетки	27
1.2.4 Факторы транскрипции, активирующиеся в ответ на окислительный стресс	29
1.2.5 Митохондрии и гибель клетки	32
1.3 Клеточные механизмы повреждения ткани при ФДТ	34
1.3.1 Генерация АФК при ФД воздействии	34
1.3.2 Клеточные мишени ФДТ	36
1.3.3 Повреждение митохондрий при ФД воздействии	38
1.3.4 Роль факторов транскрипции NF- κ B, AP-1 и NIF-1 при ФД воздействии	39
1.3.5 Фотоиндуцированная клеточная гибель	41
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	43
2.1 Объекты исследования	43
2.2 Химические реактивы и оборудование	43
2.3 Культура клеток	45

2.4	Схема эксперимента с фотодинамическим воздействием на культуру клеток.....	46
2.5	Схема эксперимента с фотодинамическим воздействием на МРН	47
2.6	Определение изменений концентрации внутриклеточного кальция.....	48
2.7	Измерение скорости продукции супероксид-аниона	48
2.8	Метод регистрации аутофлуоресценции НАД(Ф)Н.....	50
2.9	Определение митохондриального потенциала	53
2.10	Метод определения содержания восстановленного глутатиона.....	55
2.11	Метод определения скорости перекисного окисления липидов	56
2.12	Обработка изображений и статистический анализ.....	56
	ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	59
3.1	Изменение концентрации внутриклеточного кальция при фотодинамическом воздействии радахлорина.....	59
3.2	Изменение продукции супероксид-аниона при ФД воздействии радахлорина	62
3.3	Исследование уровня восстановленного глутатиона в клетках при ФД воздействии радахлорина с помощью монохлорбимана	65
3.4	Исследование перекисного окисления липидов в клетках при ФД воздействии радахлорина с помощью C11 BODIPY [581/591].....	65
3.5	Исследование биоэнергетического статуса клеток при ФД воздействии радахлорина по аутофлуоресценции НАД(Ф)Н.....	68
3.6	Исследование изменения митохондриального потенциала клеток при ФД воздействии радахлорина с помощью родамина 123	79
3.7	Влияние модуляторов NF- κ B, AP-1 и NIF-1 на выживаемость клеток при фотодинамическом воздействии фотосенса.....	82
	ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	89
4.1	Фотоиндуцированный окислительный стресс в нейронах и глиальных клетках	89
4.2	Повреждение митохондрий при ФД воздействии радахлорина	91

4.3 Участие факторов транскрипции NF-κB, AP-1 и NIF-1 в гибели нейронов и глиальных клеток при ФД воздействии	94
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	99
ВЫВОДЫ	102
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	103

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АФК – активные формы кислорода
ИК – интеркомбинационная конверсия
МРН – механорецепторный нейрон
ПД – потенциал действия
ПОЛ – перекисное окисление липидов
РХ – радахлорин
СОД – супероксиддисмутазы
ФД – фотодинамический
ФДТ – фотодинамическая терапия
ФС – фотосенсибилизатор
ЦТК – цикл трикарбоновых кислот
ЦЭТ – цепи электронного транспорта
ЭПР – эндоплазматический ретикулум
[Ca²⁺]_i – концентрации внутриклеточного кальция
BER – эксцизионная репарация оснований
CsA – циклоспорин А
DHE – дигидроэтидиум
GSH – восстановленная форма глутатиона
GSH-Px – глутатионпероксидаза
GSSG – окисленная форма глутатиона
mPTP – высокопроницаемая митохондриальная пора
NER – эксцизионная репарация нуклеотидов
PARP – поли(АДФ-рибоза)-полимеразы
PI – иодид пропидия
ΔΨ_m – митохондриальный трансмембранный потенциал

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Фотодинамический (ФД) эффект представляет собой способ селективного повреждения клеток, окрашенных красителем-фотосенсибилизатором, под действием света в присутствии кислорода. ФД эффект лежит в основе фотодинамической терапии (ФДТ), которая используется в онкологии для разрушения опухолей мозга в качестве вспомогательной терапии при хирургическом вмешательстве [1–3]. Ряд работ [4–7] свидетельствует о повышении выживаемости и снижении риска неврологических заболеваний при применении ФДТ в нейроонкологии. Перспективными фотосенсибилизаторами (ФС), которые широко исследуются в странах СНГ, в том числе для лечения опухолей мозга, являются фотосенс и радахлорин [2].

Однако при ФД воздействии на нервную ткань повреждаются также и здоровые клетки, окружающие опухоль, поэтому важно исследовать реакцию нормальных нейронов и глиальных клеток на ФДТ [3]. Гибель клеток при ФД воздействии происходит в результате окислительного стресса, инициатором которого является синглетный кислород и другие активные формы кислорода (АФК), которые образуются при воздействии света на ФС [8]. Точные механизмы клеточной смерти различаются в зависимости от типа клеток, используемого фотосенсибилизатора, его локализации, накопления, способности генерировать АФК и т.д. [9, 10]. В ответ на окислительный стресс в клетке запускается ряд сигнальных процессов, направленных как на защиту клетки, так и ведущих к её гибели [11]. Важную роль при этом играют митохондрии, которые сами при этом являются источником АФК и при патологических состояниях, связанных с окислительным стрессом, могут запускать как апоптоз, так и некроз [12]. Также при окислительном стрессе активируется ряд факторов транскрипции, в частности, NF-κB, AP-1 и HIF-1, регулирующих экспрессию генов, которые кодируют белки, участвующие в регуляции выживаемости клетки [13–16]. Однако в литературе мало сведений о клеточных механизмах повреждения здоровых

нейронов и глиии при фотоиндуцируемом окислительном стрессе. Вследствие этого, для повышения эффективности ФД воздействия актуально исследовать изменения митохондриального метаболизма и роль факторов транскрипции NF-κB, AP-1 и HIF-1 в нейронах и глиальных клетках при ФД воздействии радахлорина и фотосенса. Удобными объектами для изучения данных вопросов являются первичная сокультура нейронов и астроцитов коры мозга крысы и механорецептор речного рака, в котором нейроны и глиальные клетки точно идентифицированы.

Цель работы:

Исследовать изменения митохондриального метаболизма нейронов и астроцитов первичной сокультуры коры мозга крысы при фотоиндуцируемом окислительном стрессе и роль факторов транскрипции NF-κB, AP-1 и HIF-1 в выживаемости нейронов и глиальных клеток механорецептора растяжения речного рака при фотодинамическом воздействии.

Задачи исследования:

- Изучить развитие окислительного стресса в нейронах и астроцитах первичной сокультуры коры мозга крысы при ФД воздействии по показателям динамики генерации АФК, уровню восстановленного глутатиона и скорости перекисного окисления липидов.
- Изучить изменения митохондриального метаболизма клеток по показателям изменения митохондриального потенциала и аутофлуоресценции НАД(Ф)Н при ФД воздействии.
- Изучить роль факторов транскрипции NF-κB, AP-1 и HIF-1 в гибели нейронов и глиальных клеток речного рака при ФД воздействии.

Научная новизна результатов исследования

- В настоящей работе впервые показано, что ФД воздействие радахлорина увеличивает скорость генерации супероксид-аниона и перекисного окисления липидов в нейронах и астроцитах первичной сокультуры коры мозга крысы и повышает уровень восстановленного глутатиона в астроцитах.

— Продемонстрировано, что ФД воздействие радахлорина активирует фермент PARP, который вызывает снижение депо НАДН и способствует деполяризации митохондрий.

— Впервые показано, что фактор транскрипции NF-κB участвует в некрозе нейронов и апоптозе глиальных клеток механорецептора речного рака при ФД воздействии фотосенса, но защищает глиальные клетки от фотоиндуцированного некроза.

— Продемонстрировано, что фактор транскрипции AP-1 участвует в апоптозе глиальных клеток механорецептора речного рака, вызванном ФД воздействием фотосенса.

— Показано, что активатор фактора транскрипции HIF-1 защищает глиальные клетки механорецептора речного рака от некроза и апоптоза, вызванных ФД воздействием фотосенса, а ингибиторы HIF-1 способствуют фотоиндуцированному апоптозу глии.

Научно-практическая значимость

Полученные данные о том, что ФД воздействие вызывает окислительный стресс в нейронах и астроцитах коры мозга крысы, который проявляется в увеличении скорости генерации супероксид-аниона и перекисного окисления липидов, повышает уровень восстановленного глутатиона в астроцитах и ведёт к изменениям митохондриального метаболизма и гибели клеток, которая регулируется в том числе факторами транскрипции NF-κB, AP-1 и HIF-1, дополняют известные клеточно-молекулярные механизмы, связанные с генерацией АФК и фотоповреждением клеток, и могут иметь общебиологическое значение. Установленная в работе фотоиндуцированная активация PARP, влекущая за собой истощение НАДН депо и митохондриальную деполяризацию, свидетельствует о возможном участии PARP в повреждении нервных и глиальных клеток при ФД воздействии. Данные об активации PARP при ФД воздействии и об участии факторов транскрипции NF-κB, AP-1 и HIF-1 в фотоиндуцированной гибели клеток могут быть использованы для модуляции клеточной гибели и защиты нормальных клеток при ФДТ нервной ткани.

Результаты работы получены при выполнении грантов РФФИ № 11-04-01476, 14-04-32270, 14-04-00741 и 16-34-01145, а также использованы в спецкурсе по фотобиологии и фотомедицине в Южном федеральном университете.

Основные положения, выносимые на защиту

Фотодинамическое воздействие ускоряет генерацию супероксид-аниона и перекисное окисление липидов в культивируемых нейронах и астроцитах и увеличивает уровень восстановленного глутатиона в астроцитах.

Одним из механизмов повреждения нейронов и астроцитов при фотодинамическом воздействии является активация фермента PARP, которая ведет к истощению НАДН депо и последующей деполяризации митохондрий.

Фактор транскрипции NF-κB участвует в фотоиндуцированном некрозе нейронов и апоптозе глиальных клеток механорецептора рака, но защищает глиальные клетки от некроза.

Фактор транскрипции AP-1 участвует в фотоиндуцированном апоптозе глиальных клеток механорецептора рака.

Фактор транскрипции NIF-1 защищает глиальные клетки механорецептора рака от фотоиндуцированного некроза и участвует в фотоиндуцированном апоптозе.

Апробация диссертационной работы

Основные положения работы представлены на всероссийских и международных конференциях: XVI Международная конференция по нейрокибернетике (Ростов-на-Дону, 2012), «Актуальные вопросы биомедицинской инженерии» (Ростов-на-Дону, 2012), «Современные проблемы биофизики сложных систем. Информационно-образовательные процессы» (Воронеж, 2013), «Миссия молодежи в науке» (Ростов-на-Дону, 2013), Международная научная школа «Горизонты современных нейронаук» (Нижний Новгород, 2014), Saratov Fall Meeting SFM'14 (Саратов, 2014), зимняя школа «Современная биология и Биотехнологии будущего – 2015» (Звенигород, 2015), «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2015), «Биология – наука 21 века» (Пушино, 2016), 10th FENS Forum of Neuroscience (FENS 2016)

(Копенгаген, 2016), 13th International Conference on Neuroprotective Agents (ICNA 2016) (Бильбао, 2016), V Съезд физиологов СНГ, V Съезд биохимиков России, конференция ADFLIM (Дагомыс, Сочи, 2016), а также на семинаре в Институте Неврологии Университетского Колледжа Лондона.

Публикации

По теме диссертационной работы имеется 28 публикации, 9 из них в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Фотодинамическая терапия

Фотодинамическая терапия (ФДТ) – это метод селективного разрушения патологической ткани при добавлении специального красителя, фотосенсибилизатора (ФС), под действием света определенной длины волны, соответствующей поглощению фотосенсибилизатора, в присутствии кислорода [3, 8]. При облучении видимым светом с длиной волны, которая соответствует используемому ФС, происходит локальное образование синглетного кислорода $^1\text{O}_2$ при переносе энергии с ФС на кислород, растворенный в ткани, и генерация активных форм кислорода (АФК), включая супероксид, перекись водорода и гидроксил радикалы [1, 17] (Рисунок 1.1). Образованные АФК ведут к клеточной гибели в облученной ткани [10, 18, 19] (Рисунок 1.1).

1.1.1 Механизм действия фотодинамической терапии

Таким образом, три основных компоненты ФДТ – это фотосенсибилизатор (ФС), фоточувствительное вещество, которое поглощает свет определенной длины волны и переходит в возбужденное состояние, способное передавать энергию на кислород; источник света, который способен проникать сквозь ткань и возбуждать фотосенсибилизатор и молекулярный кислород, который генерирует высокоактивные продукты с цитотоксическим действием [3, 10, 20].

При поглощении света молекула ФС переходит из основного синглетного состояния FC^0 в возбужденное синглетное состояние $^1\text{FC}^*$, из которого в течение 10^{-9} – 10^{-8} с она возвращается в исходное состояние в результате высвечивания кванта флуоресценции или безызлучательного перехода (Рисунок 1.1). Также молекула ФС может переходить из возбужденного синглетного состояния FC^0 в триплетное состояние ^3FC в результате интеркомбинационной конверсии (ИК),

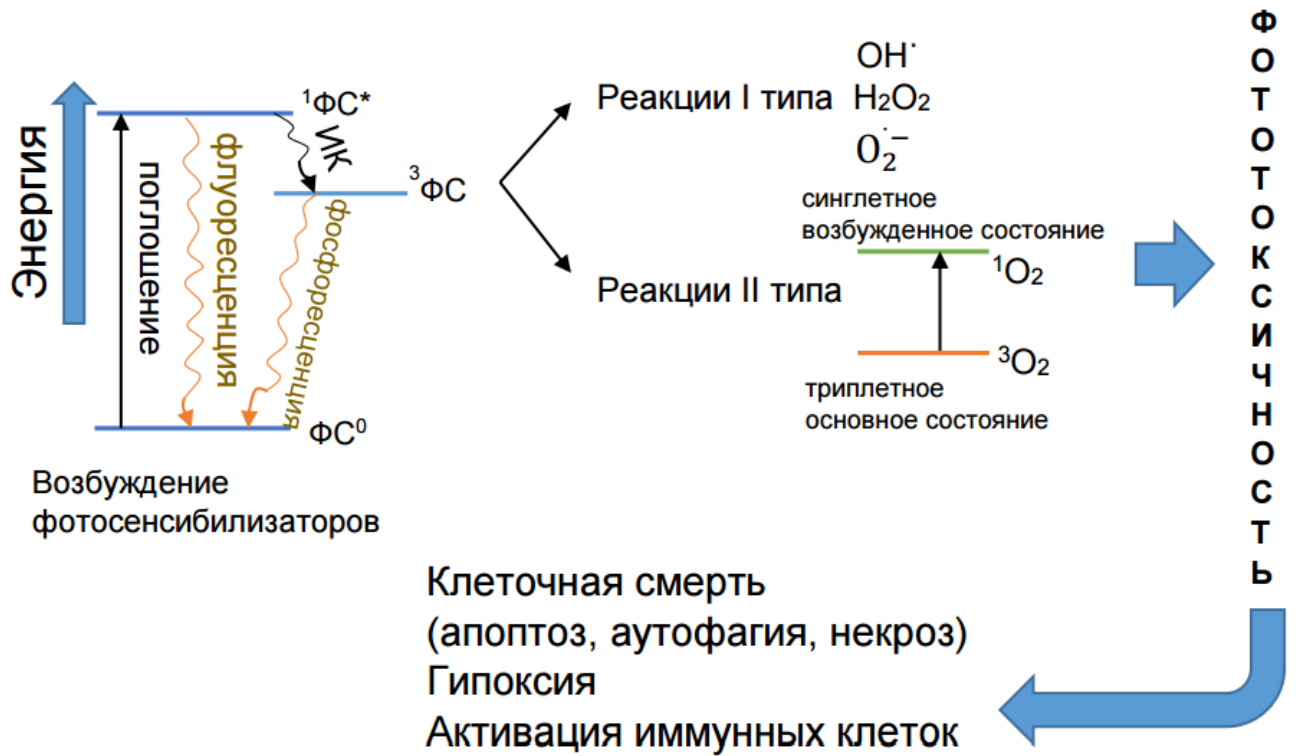


Рисунок 1.1 – Схема процессов, протекающих при фотодинамическом воздействии, включая схему Яблонского

ИК, интеркомбинационная конверсия; ФС^0 , основное синглетное состояние фотосенсибилизатора; $^1\text{ФС}^$, возбужденное синглетное состояние фотосенсибилизатора; $^3\text{ФС}$, триплетное состояние фотосенсибилизатора*

время жизни которого значительно выше (10^{-4} – 10^{-2} с) из-за запрета на переходы между триплетными и синглетными состояниями. За это время энергия может передаться соседним молекулам с образованием высокоактивных химических продуктов, ведущих к повреждению и гибели клетки [3].

Окснер описал два возможных пути, по которым могут развиваться фотореакции при ФДТ [21] (Рисунок 1.1.). В реакциях первого типа при переносе электронов с ФС образуются свободные радикалы, которые взаимодействуют с кислородом, образуя АФК и радикалы липидов. В реакциях второго типа при переносе энергии с ФС на кислород происходит генерация синглетного кислорода $^1\text{O}_2$, который затем окисляет биомолекулы (белки, нуклеиновые кислоты и липиды) и ведёт к цитотоксичности.

При облучении ФС светом оптимальной длиной волны образуется максимальное количество $^1\text{O}_2$, который проникает максимально глубоко [22, 23]. Полезно рассматривать спектр поглощения ФС относительно инактивации клетки [24–26]. Этот спектр описывает относительную эффективность различных длин волн для возникновения биологического ответа и, как было показано для ряда ФС, совпадает по форме со спектром возбуждения ФС [23, 27, 28]. Было показано, что ФС, не связанные с клеткой и находящиеся в жидкости вокруг неё, не эффективны [23].

Терапевтическое действие ФДТ зависит не только от продукции $^1\text{O}_2$ и АФК, которые ведут к апоптозу и/или некрозу опухолевых клеток, но также и от повреждения микрососудов, которое ведёт к уменьшению поступления кислорода и питательных веществ [29, 30]. Кроме того, фотоиндуцированный апоптоз и/или некроз запускает иммунную реакцию организма, вызывая высвобождение воспалительных и иммунных белков, таких как цитокины и антитела [31–33].

1.1.2 Фотосенсибилизаторы. Радахлорин и фотосенс

Первые фотосенсибилизаторы представляли собой гематопорфирин и его производные, представляющие собой смесь порфиринов [25]. Позже их назвали

фотосенсибилизаторами первого поколения [34]. Главным побочным эффектом гематопорфирина была светочувствительности кожи [24]. В 1980-х был синтезирован ряд новых фотосенсибилизаторов, которые были названы фотосенсибилизаторами второго поколения [23, 25]. Учёные исследовали их физикохимические свойства, накопление в тканях и клетках, локализацию, фотодеградацию и фотодинамическое воздействие, как *in vitro*, так и *in vivo* [35, 36].

В результате были сформулированы свойства, которыми должен обладать идеальный ФС для использования в клинике: 1) представлять собой отдельное чистое водорастворимое соединение, которое легко получить; 2) иметь возможность лёгкой доставки к месту облучения (опухолевым тканям); 3) обладать высокой аффинностью к опухолевым клеткам; 4) иметь пик поглощения в области 600-800 нм; 5) иметь высокий квантовый выход синглетного кислорода; 6) легко выводиться из здоровых тканей и быть нетоксичным при отсутствии облучения; 7) не разлагаться по действием ферментов [9, 24].

Ни один из фотосенсибилизаторов не удовлетворяет всем требованиям и поиск новых фотосенсибилизаторов – актуальная проблема в области ФДТ. На данный момент, в клинике одобрено использование следующих фотосенсибилизаторов: 1) предшественники порфирина, такие как ALA и его эфиры (Левулан, Метвикс), которые используются для удаления широкого круга новообразований, включая опухоли мозга, кожи, мочевого пузыря и пищевода; 2) галогенаты, включая ветерпорфин (Визудин), который применяется в офтальмологии, и темпорфин (Фоскан), который используется для симптоматического лечения опухолей головы и шеи; 3) фталоцианины и металлофталоцианины, которые используются для лечения бактериальных инфекций; 4) хлорины, соединения с ароматическими гетероциклами, такие как растапорфин (Пурлитин), который исследовался для лечения ретинопатии при диабете, глаукомы и возрастной макулярной дегенерации, и натрий талапорфин (Аптоцин), который одобрен для лечения рака толстого кишечника, печеночно-клеточного рака и доброкачественной гиперплазии простаты [1, 3, 8].

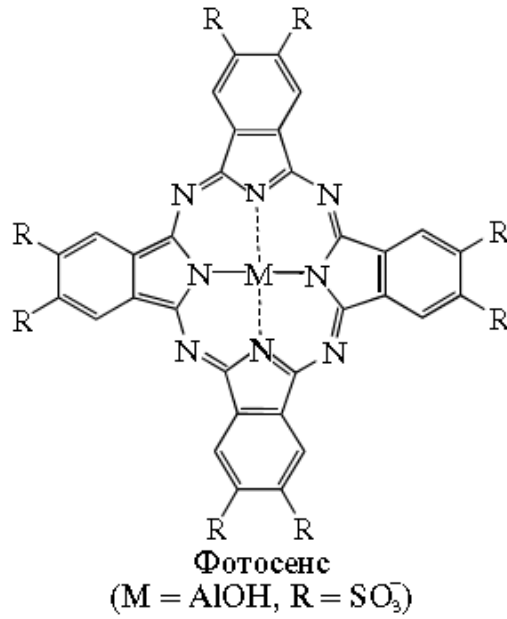
Перспективными ФС являются фотосенс и радахлорин, которые широко исследуются в странах СНГ, в частности, для лечения опухолей мозга [2]. Фотосенс одобрен для использования в клинике и представляет собой смесь сульфированных алюмофталоцианинов, с максимумом поглощения на 676 нм [37, 38]. На рисунке 1.2а представлена его структурная формула. Квантовый выход синглетного кислорода для сульфированных алюмофталоцианинов составляет примерно 0,38, они водорастворимы и накапливаются преимущественно в лизосомах [39–41].

Радахлорин, известный также как бремахлорин, проходит преклинические испытания в Голландии для использования в Европейском союзе [42]. Он частично одобрен в Южной Корее и используется в России для лечения различных раковых и кожных заболеваний [43]. Максимум поглощения радахлорина в воде – 655 нм; в его состав входят три компонента, хлорин еб, хлорин рб и пурпурин 5 [44, 45]. При лечении рака они ведут к повреждению сосудов, сигнальных систем и внутриклеточных структур [46, 47]. Формула основного компонента радахлорина, хлорина еб, составляющего 80-90% всей смеси, представлена на рисунке 1.2б, его квантовый выход достигает 0,7 [48]. Радахлорин амфифилен и накапливается преимущественно в митохондриях, лизосомах и эндоплазматическом ретикулуме [47].

1.1.3 Применение ФДТ. Лечение опухолей мозга

ФДТ применяется в клинике для лечения злокачественных и доброкачественных кожных новообразований (старческий кератоз, базалиома, плоскоклеточный рак *in situ*); поражений кожи, не связанных с новообразованиями (псориаз); рака ротовой полости, глотки и гортани на ранних стадиях; пищевода Барретта и неоперабельного холангиоцеллюлярного рака; опухолей желудочно-кишечного тракта за пределами пищевода; перитонеального канцероматоза или саркоматоза; рака простаты и мочевого пузыря; немелкоклеточного рака легкого и мезотелиомы, и экстрамамиллярного рака

а



б

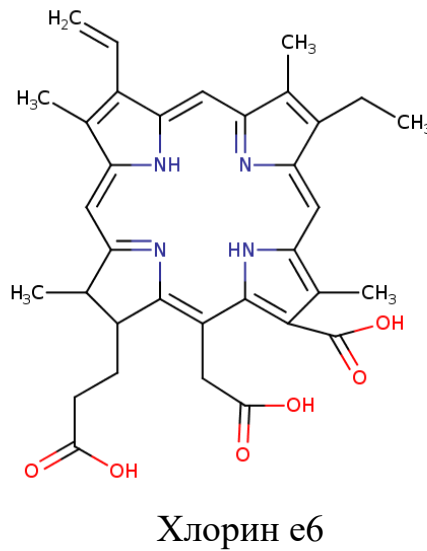


Рисунок 1.2 – Структурные формулы фотосенса (а) и хлорина е6 (б)

[по <http://moldb.wishartlab.com/molecules/HMDB59948/image.png> и Котельников и др., 2013]

Педжета [1]. Также возможно использование ФДТ для лечения бактериальных инфекций, как альтернативный способ или дополнение к традиционному использованию антибиотиков [49, 50].

В настоящее время активно проводятся клинические испытания методов на основе ФД эффекта (ФД диагностики, резекции на основе флуоресцентной навигации и ФДТ) для применения в качестве сопутствующей терапии при лечении злокачественных опухолей мозга [4, 5, 51]. Предпосылками для более широкого применения ФДТ в нейроонкологии являются результаты многих клинических исследований в этой области, которые свидетельствуют о повышении выживаемости и снижении риска неврологических заболеваний [4–7, 37]. В частности, Кострон в 1996 описал результаты применения ФДТ после хирургического удаления опухолей мозга в ходе 1 и 2 фаз клинических испытаний у 310 больных [52]. Согласно этим данным, при использовании ФДТ после хирургического вмешательства медианная выживаемость возрастает. Ещё девять успешных клинических испытания ФДТ при лечении опухолей мозга описаны в обзоре [53].

Одним из ключевых вопросов повышения эффективности ФДТ является селективность накопления ФС в опухолях мозга. Известно, что ФС накапливаются во всём организме, но накопление в опухолевых тканях больше и при этом они способны проникать через гематоэнцефалический барьер [54]. Было показано, что селективность накопления ФС в опухолевых тканях мозга варьируется от 3:1 до 50:1 по сравнению с нормальными тканями [4, 55]. В связи с этим и трудностью отделения нормальных клеток мозга от глиомы при хирургическом вмешательстве распространение получили такие методы, как фотодинамическая диагностика и резекция на основе флуоресцентной навигации, которые направлены на удаление опухолей мозга с максимальной аккуратностью [56, 57]. Подтверждение использования этих методов для лучшей визуализации опухолей при удалении опухолей мозга продемонстрировано в клинических испытаниях [58, 59].

На данный момент при ФДТ опухолей мозга используются различные ФС, такие как производные гематопорфирина (фотофрин, фотосан, фотогем, вертепорфин), производные 5-аминолевулиновой кислоты (аласенс, левулан, метвикс) и производные хлорина еб (МАСЕ, фоскан, mTHPC, фотолон, фотодитазин). Особое внимание уделяется водорастворимым производным хлорофилла, хлоринам и бактериохлоринам, и синтетическим ФС, фталоцианинам, этиопурпуринам и бензохлоринам [60]. В Европе активно используется mTHPC на основе хлорина еб, эффективность которого продемонстрирована во второй фазе клинических исследований Костроном и Циммерманом [5, 61]. Эффективность ФС на базе хлорина еб при удалении опухолей мозга также показана в ряде исследований в России и Белоруссии [6, 7, 44, 62].

При ФДТ здоровые клетки, окружающие опухоль мозга, также подвергаются фотоиндуцируемому окислительному стрессу. В связи с этим, важно исследовать реакцию здоровых нейронов и глиальных клеток на ФД воздействие перспективных отечественных ФС, фотосенса и радахлорина.

1.2 Митохондрии и окислительный стресс

Митохондрии играют важную роль в функционировании клетки при физиологических условиях и в реакции клетки на внешние воздействия [12, 63, 64]. Их главная функция – синтез АТФ. Также они способны накапливать кальций при превышении его локальной цитозольной концентрации и при определённых условиях это может вызывать открытие высокопроницаемой митохондриальной поры, которое может вести к гибели клетки [65, 66]. Изменения в митохондриальном кальции могут регулировать цикл трикарбоновых кислот [67]. Цепь переноса электронов в митохондриях – это основное место генерации супероксид анионов ($\bullet\text{O}_2^-$), чрезмерная продукция которого может вести к окислительному стрессу [68]. Все эти процессы тесно взаимосвязаны с митохондриальным мембранным потенциалом ($\Delta\Psi_m$) [12]. С помощью депо

АТФ/АДФ митохондрии могут влиять на гликолиз, активность Ca^{2+} - и Na^+ - K^+ -АТФаз на плазматической мембране и, следовательно, на активность Na^+ -связанных транспортеров на плазматической мембране [12]. Изменения митохондриального метаболизма наблюдаются при течении многих заболеваний, сопровождаемых развитием окислительного стресса, включая нейродегенеративные заболевания и ишемию [63]. Повреждение митохондрий и нарушение их функционирования играют важную роль в выживаемости клеток и могут вести, как к некрозу, так и к запуску апоптотической гибели клетки [69, 70].

1.2.1 Основные биоэнергетические процессы

Ключевые биоэнергетические процессы, протекающие в митохондриях, – это цикл Кребса или цикл трикарбоновых кислот (ЦТК) и дыхательная цепь переноса электронов (рисунок 1.3). Ферменты ЦТК расщепляют углеродный субстрат ацетил-КоА, который получается в результате распада пирувата, жирных кислот и аминокислот, с образованием CO_2 и восстановлением НАД^+ до НАДН и ФАД^+ до ФАДН_2 [71, 72]. Эти промежуточные продукты являются восстановителями в дыхательной цепи, которая состоит из ряда систем ферментов, связанных между собой и описываемых как комплекс I, II, III, и IV [73]. Комплекс I НАДН дегидрогеназа, комплекс II сукцинат дегидрогеназа, комплекс III (убихинон-цитохром С редуктаза) и комплекс IV (цитохром С оксидаза) представляют собой сложные трансмембранные системы ферментов из множества белковых субъединиц [74]. Интересно, что белки комплекса II полностью кодируются в ядре, тогда как другие комплексы представляют собой смесь белков, некоторые из которых кодируются ядерной ДНК, а другие – митохондриальной ДНК [75, 76]. Структурные характеристики каждого из комплексов были изучены, но роль и значение некоторых вспомогательных компонентов остаётся непонятной, можно только предположить, что они выполняют модулирующую функцию [75, 76].

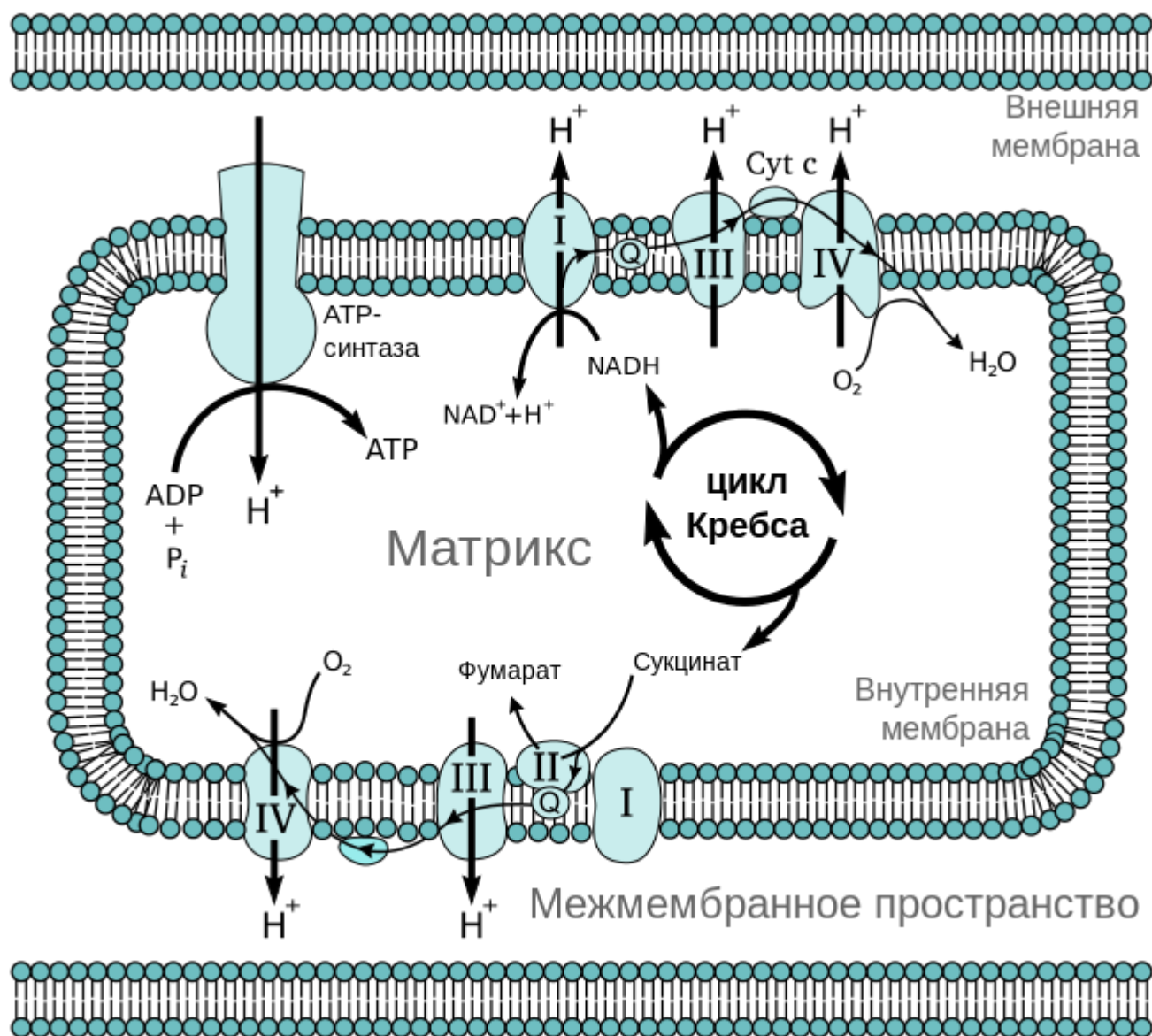


Рисунок 1.3 – Основные биоэнергетические процессы в митохондриях
 [по https://ru.wikipedia.org/wiki/Митохондриальный_матрикс]

При функционировании цепи электронного транспорта (ЦЭТ) энергия переносится между промежуточными звеньями цепи, при этом энергия движется от восстановленного к окисленному состояниям, постепенно снижаясь [73]. Электроны переносятся от НАДН и ФАДН₂ к комплексам I и II, соответственно, и каждый из них затем передаёт электроны на убисемихинон, который отдаёт электроны на комплекс III [77]. После этого цитохром C передаёт электроны на комплекс IV, который осуществляет перенос электронов на кислород с образованием воды [73]. Комплексы I, II и III содержат негемовое железо; комплекс IV содержит медь, тогда как комплексы III, IV и цитохром C содержат гем [76]. Всё это играет важную роль для катализа реакций окисления и восстановления. Реакции, происходящие в комплексах I, III, IV связаны с переносом протонов через внутреннюю мембрану митохондрий, из матрикса в межмембранное пространство, и являются ключевыми для установления электрохимического протонного градиента, протон движущей силы, в основном выражаемой в виде митохондриального трансмембранного потенциала, который обычно составляет от -150 до -180 мВ по сравнению с цитозолью [71]. Мембранный митохондриальный потенциал обуславливает основные биоэнергетические функции митохондрий, от образования АТФ до накопления кальция, т.к. он представляет собой движущую силу, которая обуславливает движение протонов или кальция внутрь митохондрий по электрохимическому градиенту и градиенту потенциала [71, 77]. Приток протонов, в основном, осуществляется через протонный канал F₁F₀-АТФ синтазы, АТФаза, перемещающая протоны, который движутся в обратном направлении по протонному градиенту [78]. Движение протонов внутрь митохондрии, деполяризующее мембрану, запускает молекулярный мотор и происходит фосфорилирование АДФ с образованием АТФ [79]. Затем АТФ транспортируется из митохондрий при помощи аденин-нуклеотид транслоказы (АНТ), электрогенного транспортера, который обменивает АДФ на АТФ [73, 80]. Движение АТФ также немного деполяризуют митохондрии [78].

Перемещение протонов дыхательными комплексами свидетельствует о том, что скорость дыхания регулируется протонными градиентами, дыхание ускоряется при деполяризации мембраны вследствие сокращения энергии необходимой для передвижения протонов и замедляется при повышении мембранного потенциала или гиперполяризации [81]. Это подтверждается действием разобщителей, таких как FCCP, CCCP и DNP, которые переносят протоны через мембрану, снижают мембранный потенциал и ведут к повышению скорости дыхания, тогда как ингибирование потока протонов через АТФ синтазу (при помощи олигомицина, который эффективно блокирует протонный канал АТФ синтазы) повышает митохондриальный потенциал и снижает скорость дыхания [77]. Таким образом, скорость митохондриального дыхания и скорость синтеза АТФ связаны протонным градиентом, несмотря на то, что по сути это отдельные процессы. Активность цитохром С оксидазы так же может регулироваться соотношением АТФ и АДФ с помощью конформационных изменений одной из субъединиц белкового комплекса [82].

Митохондриальный мембранный потенциал в норме поддерживается клеточным дыханием. Потеря потенциала может отражать несколько различных механизмов, таких как ингибирование дыхания, неспособность предоставить субстрат или какой-либо другой разобщающий механизм, который шунтирует цепь протонов и, таким образом, убирает разность потенциалов [81].

Помимо синтеза АТФ, митохондриальный потенциал регулирует захват кальция митохондриями. Возможное функциональное значение этого процесса – регуляция митохондриального метаболизма. Было установлено, что кальций может активировать ферменты ЦТК [83]. Были также продемонстрированы изменения в митохондриальном метаболизме в ответ на изменения цитозольной концентрации кальция [84, 85] при помощи измерения аутофлуоресценции НАДН и флавопротеинов в ответ на кальциевый сигнал в различных типах клеток. Таким образом, митохондрии захватывают кальций при повышении его концентрации в цитозоле и это ведёт к активации ЦТК и, следовательно, смещению редокс статуса кофакторов в сторону восстановленных форм. Также недавно было

показано, что захват кальция митохондриями ведёт к повышенному образованию АТФ [86]. Важность этого механизма регулирования окислительного фосфорилирования по сравнению с соотношением АТФ и АДФ не ясна. Таким образом, перенос кальция из цитозоля в митохондрии при кальциевых волнах называют важнейшим механизмом, который связывает потребность в АТФ с повышением продукции АТФ, т.к. в большинстве систем интенсивная работа связан с повышением цитозольной концентрации кальция.

1.2.2 Окислительный стресс

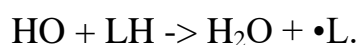
Окислительный стресс – это окислительное повреждение клетки в результате дисбаланса между прооксидантами и антиоксидантами, вызванного либо чрезмерной продукцией АФК, либо угнетением системы антиоксидантной защиты [87]. Окислительный стресс сопровождает развитие многих заболеваний, в том числе нейродегенерацию, атеросклероз, диабет и пр. [88, 89].

Важную роль при развитии окислительного стресса играют митохондрии. Митохондрии представляют собой среду для переноса электронов на кислород, поэтому неудивительно, что на различных этапах этого процесса, могут образовываться АФК [78]. Однако сведения о местах генерации свободных радикалов в цепи переноса электронов противоречивы. Общепринято, что главное место продукции радикалов находится на комплексе III, однако есть данные о генерации свободных радикалов на комплексе I [90]. В целом, утечка электронов, по-видимому, повышается при гиперполяризации митохондрий и понижается при деполяризации [91]. Повышение потенциала замедляет дыхание и способствует утечке электронов в отдалённых участках цепи; ингибирование дыхания дальше места продукции радикалов, по-видимому, должно вести к повышению продукции АФК, тогда как разобщители снижают утечку электронов, повышая скорость дыхания, ослабляя потенциал и способствуя переносу электронов на кислород на комплексе IV и продукции воды [71].

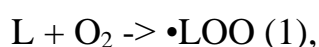
Таким образом, в результате взаимодействия неспаренных электронов с кислородом в митохондриях образуются супероксид-анионы ($\bullet\text{O}_2^-$). Они легко преобразуются в другие формы радикалов, такие как пероксид водорода H_2O_2 , гидроксил ионы ($\bullet\text{OH}$) и пероксинитрит ONOO^- . Общепринято, что основное действие продукции АФК вредно, хотя недавно было предположено, что митохондриальная продукция АФК может играть важную физиологическую сигнальную роль [92]. Тем не менее, АФК могут вести к перекисному окислению липидов (ПОЛ) и повреждению клеточных мембран и ДНК, а митохондрии представляют собой не только главный источник АФК, но также главную мишень повреждений, вызванных АФК, в том числе митохондриальной ДНК, которая не связана с гистонами и меньше защищена от повреждений, чем ядерная ДНК [11, 93].

Перекисное окисление липидов

Важный вклад в повреждение клетки при окислительном стрессе вносит перекисное окисление липидов (ПОЛ). ПОЛ представляет собой цепную реакцию окисления ненасыщенных жирных кислот липидов биомембран с образованием свободных радикалов, которая состоит из стадии инициации, стадии развития реакции и стадии терминации (обрыв цепи) [94]. ПОЛ чаще всего инициируется в результате проникновения гидроксил радикала в мембрану и его взаимодействия с полиненасыщенными жирными кислотами (LH).

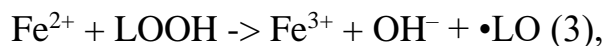


Далее, липидный радикал ($\bullet\text{L}$) взаимодействует с молекулярным кислородом, растворенным в среде, с образованием липопероксид-радикала ($\bullet\text{LOO}$) (1). Полученный $\bullet\text{LOO}$ вступает в реакцию с соседней молекулой липида, в результате которой образуется гидропероксид липида LOOH и новый липидный радикал ($\bullet\text{L}$) (2). Эти две реакции составляют основу ПОЛ [94].



В присутствии металлов переменной валентности (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+}) может происходить разветвление цепей в результате их взаимодействия с

гидропероксидами липидов (3). Образующиеся радикалы при этом могут инициировать новые цепи окисления липидов (4).



Конечные продукты перекисного липидов – малоновый диальдегид и гидропероксид кислоты. Развитие ПОЛ останавливается, когда свободные радикалы взаимодействуют между собой или с различными антиоксидантами, например, витамином Е, с образованием стабильной окисленной формы [95].

Окислительные повреждения белков

АФК могут вести к фрагментации пептидной цепи, изменению электрического заряда белков, сшивкам между белками и окислению отдельных аминокислот [96]. В первую очередь в белках окисляются остатки цистеина и метионина [97]. Метионин может окисляться до сульфоксида метионина и ортоизомера тирозина, а сульфгидрильные группы могут окисляться и образовывать дисульфидные мостики [97]. Окислительные повреждения белков ведут к их конформационным изменениям, потере активности и деградации. Наиболее чувствительны к окислению ферменты, которые содержат металлы вблизи их активных центров [96].

Окислительное повреждение ДНК. Роль PARP

Помимо липидов при развитии окислительного стресса также повреждаются и другие макромолекулы, включая ДНК. Как и в случае, ПОЛ, окислительное повреждение ДНК, как правило, наблюдается при взаимодействии $\bullet\text{OH}$ с пуриновыми и пиримидиновыми основаниями и сахарной частью цепи ДНК и представляет собой либо присоединение к двойным связям в основаниях ДНК, либо отщепление атома водорода от метильной группы тимина или любой С-Н связи 2-деоксирибозы [98, 99]. В результате реакций присоединения образуются С4-ОН-, С5-ОН- и С8-ОН-аддукт радикалы гуанина и аденина и С5-ОН- и С6-ОН-аддукт радикалы тимина и цитозина [100]. При отщеплении атома водорода от метильной группы тимина образуется аллильный радикал. Эти промежуточные радикалы подвергаются дальнейшим окислительным и

восстановительным реакциям, в результате которых образуется множество повреждений ДНК, включая основные производные пуринов, 8-оксогуанин (8-оксоГ) и 2,6-диамино-4-гидрокси-5-формаимидопиримидин (FapyGua) и окисленные пиримидины, цитозин гликоль и тимин гликоль [99]. 8-оксоГ самое стабильное из этих модификаций и может связываться, как с нормальным цитозином, так и аденином во время ДНК репликации. В случае ошибочного встраивания аденина напротив 8-оксоГ, могут наблюдаться трансверсии от G:C к T:A [100].

Чрезмерное образования АФК помимо выше упомянутых модификаций оснований и дезоксирибозы ДНК может вести к ДНК сшифкам, образованию сайтов без оснований, одноцепочечным (SSB) и двуцепочечным разрывам ДНК (DSB) [98]. SSB могут возникать непосредственно в результате распада окисленного сахара, либо, как промежуточные продукты, в результате функционирования эксцизионной репарации ДНК путем удаления поврежденных азотистых оснований (BER) [101]. Неправильная репарация SSB (SSBR) может приводить к неврологическим заболеваниям [102]. SSB может вести к DSB при репликации или функционировании транскрипционных комплексов на или в непосредственной близости от SSB [103].

Окислительные повреждения ДНК могут оказывать мутагенный эффект, вести к генетической нестабильности, цитотоксичности, клеточной гибели и патологическим процессам, таким как канцерогенез [98]. Два основных механизма, участвующие в репарации окислительных повреждений ДНК, - это эксцизионная репарация оснований (BER) и эксцизионная репарация нуклеотидов (NER). Также есть сведения об участии в этом процессе репарации ошибочно спаренных нуклеотидов (mismatch repair, MMR) [98].

BER и NER включают в себя множество стадий и ферментов. Одна из групп ферментов, участвующих в репарации SSB ДНК, в частности, в качестве компонентов BER комплекса, и играющая важную роль в окислительном стрессе, представляет собой поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP) [104]. Также есть данные об участии этой группы в NER [105].

Поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP) – это ферменты, катализирующие перенос АДФ-рибозы на белки мишени (поли-АДФ-рибозилирование), при этом поли-АДФ-рибоза синтезируется с потреблением НАД⁺ [106]. Существует, как минимум 18 членов семейства PARP, которые кодируются разными генами и обладают консервативным каталитическим доменом [104]. Наиболее изучены две изоформы PARP, PARP-1 и PARP-2. Кроме участия в репарации ДНК эта группа ферментов играет важную роль и в других клеточных процессах [107]. Было показано, что при активации PARP модифицирует множество ядерных белков, которые участвуют в метаболизме нуклеиновых кислот, изменении структуры хроматина, регуляции транскрипции, синтезе и репарации ДНК [108].

Интересна роль PARP в гибели клеток [69, 109]. В ответ на окислительный стресс может происходить гиперактивация PARP, ведущая к потреблению НАД⁺ и истощению НАДН, падению митохондриального потенциала и уровня АТФ и последующей некротической гибели клетки в результате биоэнергетического кризиса [109]. Было показано, что данный механизм играет важную роль в гибели нейронов при экзайтотоксичности и ишемии [110, 111]. Развитие апоптоза, а именно каспаза 3, наоборот, инактивирует PARP, который при этом может способствовать высвобождению апоптоз-индуцирующего фактора (AIF) из митохондрий и каспаз-независимой форме апоптоза [107, 109, 110]. Генетическое удаление *Parp1* и ингибирование данного фермента оказывает защитное действие *in vivo*, включая различные модели ишемии головного мозга, что подтверждает значение данного пути, известного как «партанатос», в развитии патологических процессов [112].

1.2.3 Система антиоксидантной защиты клетки

Для защиты от разрушительного действия свободных радикалов и развития окислительного стресса в клетках существует сложная система антиоксидантной защиты. Она включает в себя ферменты и низкомолекулярные соединения, такие как витамины С и Е, β-каротин, мочевая кислота и глутатион [95]. Основные

ферменты системы антиоксидантной защиты – это супероксиддисмутазы (СОД), каталаза и глутатионпероксидаза (GSH-Px) [113].

Супероксиддисмутазы, использующие в качестве коферментов медь и цинк (Cu/Zn СОД) или марганец (Mn СОД), катализируют дисмутацию супероксида, образывающегося в клетках при физиологически условиях, в кислород и менее активный пероксид водорода [114]. Эта реакция защищает клетки не только от окислительных повреждений, вызванных ($\bullet\text{O}_2^-$), но и от действия высокореактивного радикала пероксинитрита ONOO^- , который легко образуется в присутствии NO и $\bullet\text{O}_2^-$. Образующийся в результате функционирования СОД H_2O_2 не обладает высокой активностью, однако он может диффундировать на значительные расстояния и в присутствии переходных металлов вести к образованию высокореактивного $\bullet\text{OH}$ [87]. Каталаза и глутатионпероксидаза, в которой глутатион выступает акцептором электронов, нейтрализуют H_2O_2 с образованием воды и, в случае каталазы, кислорода [89]. Каталаза играет важную роль при низких концентрациях H_2O_2 , тогда как функционирование GSH-Px имеет большее значение при высоких концентрациях пероксида водорода [114]. В детоксикации H_2O_2 также участвуют такие ферменты, как пероксиредоксин и тиоредоксин, которые присутствуют в цитоплазме и митохондриях в больших концентрациях [95].

Действие низкомолекулярных антиоксидантов зависит от их локализации. Так, липофильный витамин Е препятствует ПОЛ, участвуя в реакции обрыва цепи. Витамин С водорастворим и может вступать в реакцию с рядом АФК, включая $\bullet\text{O}_2^-$ и $\bullet\text{OH}$. Также витамин С участвует в восстановлении связанного с мембраной окисленного витамина Е в его начальную форму. В свою очередь восстановление витамина С связано с окислением другого важного антиоксиданта, глутатиона [114].

Среди компонентов системы антиоксидантной защиты клетки особую роль играет глутатион. Как упомянуто выше, с одной стороны, он является низкомолекулярным антиоксидантом, а, с другой стороны, является важным компонентом ферментативной части системы антиоксидантной защиты. Он

может как непосредственно взаимодействовать с АФК, так и участвовать в реакциях ферментативной антиоксидантной системы в качестве донора электронов, входя в состав таких ферментов, как глутатионпероксидаза, глутатионтрансфераза и глутаредоксин [115]. При этом глутатион переходит из восстановленной формы (GSH) в окисленную (GSSG). Восстановление окисленного глутатиона катализируется глутатионредуктазой и сопровождается окислением НАДФН до НАДФ⁺, который в свою очередь восстанавливается в пентозофосфатном пути окисления глюкозы [116]. Уровень восстановленного глутатиона является одним из показателей развития окислительного стресса в клетке: его снижение свидетельствует о преобладании прооксидантных процессов в клетке [115].

1.2.4 Факторы транскрипции, активирующиеся в ответ на окислительный стресс

При нарушении баланса между антиоксидантами и АФК в клетке запускаются сигнальные процессы, направленные на восстановление редокс-баланса, за счёт активации или репрессии генов, которые кодируют защитные ферменты, факторы транскрипции и структурные белки [93]. Факторы транскрипции представляют собой белки, которые регулируют транскрипцию различных генов (процесс синтеза мРНК на матрице ДНК), связываясь со специфичными участками ДНК. Развитие окислительного стресса, а именно повышение генерации АФК и смещение соотношения GSH/GSSG в сторону окисленного глутатиона ведут к активации ряда редокс-чувствительных факторов транскрипции, таких как NF-κB, AP-1 и HIF-1, которые регулируют экспрессию генов, участвующих в ответе клетки на внешние воздействия [117–119].

АФК активируют факторы транскрипции, запуская различные сигнальные каскады. Среди мишеней АФК – тирозинкиназные рецепторы (рецепторы факторов роста), протеин-тирозинфосфатазы и серин/треонин киназы [93, 120]. ERK, JNK и p38 киназы, которые входят в состав семейства MAPK киназ и участвуют в клеточной пролиферации, дифференциации и апоптозе, также

регулируются окислителями. Также окислительный стресс ведёт к обратимому S-глутатионилированию цистеиновых остатков в ДНК-связывающем домене c-Jun, некоторых субъединицах AP-1 и ингибиторной κB киназе (IKK киназе). Было показано, что глутаредоксин и тиоредоксин играют важную роль в регуляции сигнальных путей с участием NF-κB и AP-1, p38 и JNK [121–123].

Фактор транскрипции NF-κB

Факторы транскрипции NF-κB представляют собой семейство белков, RelA (p65), RelB, c-Rel, p50 (предшественник p105), p52 (предшественник p100) и Relish, которые содержат высококонсервативный домен RHR (гомологичный участок Rel), отвечающий за связывание с ДНК и димеризацию [124, 125]. При активации NF-κB белки образуют гомо- или гетеродимеры, которые связываются с ДНК и запускают транскрипцию генов [124]. NF-κB может активироваться в ответ на внешние стрессовые воздействия, в том числе на условия окислительного стресса, такие как АФК и свободные радикалы [126]. В неактивном состоянии NF-κB находится в цитоплазме в комплексе с ингибиторным белком IκB [125]. Фосфорилирование IκB ведёт к его протеосомальной деградации и высвобождению белков NF-κB, которые после этого образуют димер, проникают в ядро и запускают транскрипцию генов [127]. Киназы, которые участвуют в данном процессе, чувствительны к прооксидантам и передают сигнал NF-κB [14, 128]. В то же время, восстановители способствуют связыванию NF-κB с ДНК, тогда как окислители ингибируют этот процесс [123, 129]. Так, тиоредоксин с одной стороны ингибирует деградацию IκB в цитоплазме, но способствует связыванию NF-κB с ДНК в ядре [130]. Активация NF-κB в результате окислительного стресса ведёт к экспрессии генов белков, участвующих в антиоксидантной защите и иммунном ответе [14]. NF-κB также участвует в ангиогенезе, пролиферации, дифференциации, а также гибели клеток [125]. Часть эффектов NF-κB при окислительном стрессе обусловлена NF-κB-зависимой активацией фактора транскрипции HIF-1 [131, 132].

Фактор транскрипции AP-1

Фактор транскрипции AP-1 представляет собой семейство димер-образующих белков с ДНК-связывающими доменами типа «основная лейциновая застежка-молния» (bZIP). Семейство белков AP-1 включает в себя подсемейства белков Jun (c-Jun, JunB, JunD), Fos (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra2), Maf (c-Maf, MafB, MafA, MafG/F/K, Nrl) и ATF (ATF2, LRF1/ATF3, B-ATF, JDP1, JDP2), которые распознают либо элемент ответа на 12-О-тетрадеканоилфорбол-13-ацетат (TRE, TPA response element), либо элемент ответа на цАМФ (CRE, cAMP response element) [133]. AP-1 так же, как и NF-κB, активируются в ответ на внешние воздействия и запускает транскрипцию генов раннего ответа [118, 134]. Активность AP-1 регулируется редокс статусом клетки, так в присутствии пероксида водорода некоторые ионы металлов могут вести к активации AP-1. Так же, как и в случае с NF-κB, повышение соотношения GSH/GSSG способствует связыванию AP-1 с ДНК, тогда как окисленная форма глутатиона GSSG ингибирует его [123, 129]. Активация AP-1 ведёт к экспрессии генов белков, участвующих в иммунном ответе и контролирующих выживаемость и гибель клеток [133].

Фактор транскрипции HIF-1

Фактор транскрипции HIF-1 представляет собой семейство гетеродимерных факторов транскрипции, содержащих bHLH-PAS ("спираль-петля-спираль" (helix-loop-helix) и зона гомологии Per-ARNT-Sim) домен и активирующихся при гипоксии [135]. HIF-1 состоит из α - и β -субъединиц, которые конститутивно экспрессируются в клетке. α -субъединица содержит кислородзависимый домен деградации, при связывании с которым внутриклеточных пролин гидролаз (PHD) происходит протеосомная деградация этой субъединицы [136]. Гипоксия ведёт к стабилизации α -субъединицы, сборке и активации HIF-1 [135]. Также показано, что при окислительном стрессе АФК могут вести к стабилизации α -субъединицы посредством ингибирования PHD [16, 119, 137]. Активация HIF-1 ведёт к экспрессии генов белков, участвующих в апоптозе и дифференциации клеток, ангиогенезе и ингибировании митохондриального дыхания [136]. Показано, что

при ишемии повышение экспрессии и активации HIF-1 оказывает защитное действия, снижая зону инфаркта [138].

Таким образом, выживаемость клеток при окислительном стрессе регулируется сложной системой сигнальных механизмов, важную роль среди которых играют факторы транскрипции NF-κB, AP-1 и HIF-1.

1.2.5 Митохондрии и гибель клетки

Развитие окислительного стресса ведёт к гибели клетки. Важную роль в этом процессе играют митохондрии. Серьёзные повреждения митохондрий ведут к ингибированию цепи переноса электронов, коллапсу митохондриального потенциала и обращению F₀F₁-АТФ-синтазы, что может вести к биоэнергетическому коллапсу и последующему некрозу [71, 139]. При меньших повреждениях митохондрии способны инициировать запрограммированную гибель клетки, апоптоз [69, 139]. Данный процесс известен в литературе, как внутренний путь активации апоптоза, и запускается в ответ на стресс [140]. При это происходит пермеабелизация внешней мембраны митохондрий и в цитоплазму высвобождается ряд белков. Так, цитохром С высвобождается из митохондриального межмембранного пространства, связывается с Araf-1 и активирует прокаспазу-9, инициируя каскад саморазрушения. Во многих клетках, однако, существуют другие белки, игибирующие апоптоз, возможная роль которых – защита от случайной активации апоптоза. Поэтому для активации апоптоза необходим ещё один белок, diablo или smac, который ингибирует ингибитор и, таким образом, способствует активации апоптотического пути. Прокаспазы также находятся в межмембранном пространстве до активации и участия в запуске апоптоза, так, прокаспазы 9 и фактор, индуцирующий апоптоз (AIF) были обнаружены там. Интересно, что несколько из митохондриальных белков, играющих важную роль в апоптозе, также участвуют в выполнении обычных функций митохондрий. Так, цитохром С и AIF участвуют в

окислительно-восстановительных реакциях, хотя конкретная роль последнего пока не ясна [141].

Высокопроницаемая митохондриальная пора

Запуск гибели клетки митохондриями может сопровождаться открытием трансмембранной высокопроницаемой митохондриальной поры (mPTP). mPTP открывается в митохондриальной мембране при определенных, обычно патологических, условиях, обладает большой проводимостью и, вероятно, формируется благодаря конформационным изменениям нескольких конститутивных белков митохондриальной мембраны [142]. Точная структура митохондриальной поры не ясна, хотя она, по-видимому, включает АНТ на внутренней митохондриальной мембране, потенциалзависимый анионный канал VDAC на внешней мембране и циклофилин D в матриксе, который обуславливает чувствительность комплекса к циклоспоринолу А, ингибитору поры [75]. Также с порой могут быть связаны другие белки, такие как Vcl-2 и периферический бензодиазепиновый рецептор.

Специфические условия открытия mPTP помимо окислительного стресса включают в себя высокий митохондриальный кальций, истощение запасов АТФ, высокое количество неорганического полифосфата и митохондриальную деполяризацию [66]. Проводимость блокируется ионами магния, АТФ, АДФ, циклоспорином А (CsA), санглиферинем и модуляторами АНТ [142]. На данный момент неизвестно, играет ли высокопроницаемая пора нормальную физиологическую роль в митохондриальном гомеостазе или её открытие представляет собой только патологический процесс. Исследования митохондриальных мембран с помощью патч-клампа указывают на то, что канал может существовать в различных конформациях, включая режим низкой проводимости [143], и последствия открытия поры для клетки могут определяться её проводимостью [70]. Поэтому последствия кратковременного открытия поры низкой проводимости должны отличаться от необратимого открытия поры с высокой проводимостью, которое неминуемо вызывает набухание митохондрий, высвобождение цитохрома С, активацию каспаз и апоптоз [144] или ослабление

митохондриального потенциала, потребление и истощение запасов АТФ и энергетический крах клетки с последующим некрозом [65].

Таким образом, митохондриальный метаболизм играет важную роль, как в развитии окислительного стресса, так и в реакции клетки на него. При недостаточности защитных механизмов (функционирования системы антиоксидантной защиты и активации сигнальных путей, включая факторы транскрипции NF-κB, AP-1 и NIF-1, которые контролируют экспрессию генов как защитных белков, так и регуляторов клеточной гибели) для предотвращения развития окислительного стресса митохондрии могут либо запускать апоптоз, либо при больших повреждениях вести к биоэнергетическому коллапсу и некротической гибели клетки.

1.3 Клеточные механизмы повреждения ткани при ФДТ

Как упомянуто ранее, светоактивация ФС ведёт к образованию АФК, в частности синглетного кислорода и/или в меньшей степени гидроксильных радикалов и пероксидов. Однако информации о конкретных клеточных механизмах, которые ведут к гибели опухолевых и нормальных клеток при ФДТ, мало.

1.3.1 Генерация АФК при ФД воздействии

Большинство фотодинамических реакций протекает по второму типу, где основным повреждающим фактором является синглетный кислород [145]. Синглетный кислород образуется, в основном, при взаимодействии ФС в возбужденном триплетном состоянии и молекулярного кислорода, некоторые ФС могут вести к образованию $^1\text{O}_2$ также в возбужденном синглетном состоянии [146].

Синглетный кислород обладает высокой реакционной способностью и, в связи с этим, коротким временем жизни. При взаимодействии с органическими

субстратами, $^1\text{O}_2$ образует нестабильные циклические перекиси. Все основные химические составляющие клетки, аминокислоты (триптофан, гистидин, метионин, тирозин, цистеин, фенилаланин), нуклеотидные основания (преимущественно гуанин) и фосфолипиды, окисляются при воздействии $^1\text{O}_2$ [147]. Такие химические модификации ведут к биологическим повреждениям и, в итоге, к клеточной смерти. Синглетный кислород взаимодействует с ненасыщенными углеродными связями в биомолекулах с образованием гидропероксидов среди прочих первичных продуктов окисления [148]. Взаимодействие $^1\text{O}_2$ с мембранными липидами, белками и нуклеиновыми кислотами ведет к повреждениям клеточной мембраны, потере функциональности жизненно важных белков и необратимым повреждениям ДНК. Все эти реакции могут вести к клеточной гибели.

Несмотря на то, что синглетный кислород является важнейшим повреждающим фактором при ФД воздействии, ФДТ при протекании реакции второго типа также сопровождается образованием других АФК, таких как супероксид-анион, перекись водорода и гидроксильные радикалы [29]. ФС в возбужденном триплетном состоянии переходит в анионный радикал, вступая в реакцию с другими ФС, а также с различными биомолекулами, включая НАДН, витамин С, цистеин, метионин, тирозин, урацил, гуанин и пр. Образованный анион-радикал взаимодействует с молекулярным кислородом, что приводит к образованию супероксид-аниона. Кроме этого, супероксид-анион может теоретически образовываться при переносе энергии от ФС в триплетном состоянии, но этот процесс термодинамически не выгоден по сравнению с переносом энергии на синглетный кислород [145].

Супероксид-анион может вступать в окислительные реакции или реакции переноса электрона со многими биологическими молекулами и непосредственно взаимодействовать с рядом клеточных структур, таких как полиненасыщенные жирные кислоты, спирты, аминокислоты, белки и ферменты [149]. Кроме этого, супероксид-анион взаимодействует с аскорбиновой кислотой и α -токоферолом, при этом одной из самых главных биологически значимых реакций является его

взаимодействие с сульфгидрильными соединениями с образованием RS радикалов и перекиси водорода [87]. В целом, считается, что реактивность супероксид-аниона в большей степени ограничена. И его самая важная роль в фотоповреждениях заключается в образовании высокоактивного гидроксильного радикала по реакции Фентона [150]. Последние могут вести к образованию вторичных радикалов и цепным реакциям, которые, в частности, участвуют в ПОЛ и повреждении ДНК.

Несмотря на то, что факторы, которые влияют на протекание ФД воздействия по первому или второму типу, известны, благодаря сложности биологической среды, неопределённой локализации ФС и его связывания с тканями и клеточными компонентами, а также из-за колебаний уровней кислорода в клетках и даже клеточных органеллах невозможно предсказать, какой тип реакции будет преобладать при ФД воздействии [145]. Так реакция второго типа типична для систем, насыщенных кислородом, а первый тип реакций преобладает при гипоксии. Также тип преобладающей реакции может зависеть от гидро- или липофильности ФС и типа клеток.

В целом, оба типа реакции ведут к окислительному стрессу клеток с их последующей гибелью. Однако важно изучать механизмы фотоиндуцированного стресса для того, чтобы модулировать фотодинамический эффект для его более эффективного использования и достигать наилучшего результата при наилучшем сочетании подходящего ФС и условий облучения.

1.3.2 Клеточные мишени ФДТ

Было показано, что синглетный кислород, который образуется вне клеток, не приводит к разрывам ДНК при внеклеточной локализации ФС [151, 152]. В работах Й. Моана [153, 154] показано, что $^1\text{O}_2$ за своё короткое время жизни диффундирует меньше, чем на 0.05 мкм от места своего образования до того, как вступит в реакцию с какой-либо из клеточных мишеней. Следовательно, ФД повреждение происходит близко к клеточной локализации ФС при облучении, и

внутриклеточная локализация ФС определяет место первичного повреждения и оказываемое воздействие [23]. В связи с этим, много работ посвящено изучению внутриклеточного распределения различных ФС *in vitro* [47, 155, 156].

Фотодинамический эффект разных ФС сильно варьируется даже для ряда молекул с похожей структурой и небольшие различия их физикохимических свойств изменяют их накопление и внутриклеточное распределение [24, 157]. Даже, в случае, когда разные ФС накапливаются в одних и тех же органеллах их эффективность может значительно отличаться [157]. На клеточную локализацию влияют такие факторы, как агрегация и липофильность ФС, способ их доставки, временной промежуток между введением ФС и облучением, а также тип клеток и опухоли [158]. Липофильные красители обычно локализуются в мембранах, а гидрофильные – в лизосомах [159]. Показано, что гидрофильные ФС намного менее эффективны, чем липофильные при одинаковом количестве образующегося синглетного кислорода [25].

Таким образом, эффективность ФС, механизм клеточной смерти и повреждение конкретных клеточных структур зависит от его локализации в клетке [13]. В зависимости от ФС, дозы воздействия и экспериментального протокола, могут повреждаться микротрубочки, лизосомы, митохондрии, плазматическая мембрана и ядро [13]. Считается, что ФС, связывающиеся с митохондриями, вызывают фотоиндуцированный апоптоз, тогда как ФС, которые накапливаются в плазматической мембране или лизосомах, ведут к другим типам клеточной гибели [18, 160].

В связи с канцерогенными и мутагенными рисками, важно оценить влияние ФДТ на ДНК. Первым было изучено влияние на ДНК гематопорфирина *in vitro* в 1980 [151]. Несмотря на то, что гематопорфирин не связывается с ДНК, при облучении в следствие генерации синглетного кислорода наблюдаются повреждения ДНК (в частности, одноцепочечные разрывы). При этом их на порядок меньше, чем при традиционных методах лечения рака, таких как радиотерапия [25]. Позже похожие данные были получены также и для ряда других ФС (Фотофрин II, TPPS4, 3THPP, p-TMPyPn2 и др.), при этом количество

одноцепочечных разрывов не коррелировало с мутагенностью ФС и варьировалось в зависимости от типа клеток [161–163]. Также несмотря на многочисленные работы, демонстрирующие повреждения ДНК при ФДТ, они по имеющимся данным не коррелируют с гибелью клеток [164]. Таким образом было показано, что ФДТ может непосредственно или косвенно повреждать ДНК вблизи с местом накопления ФС, в связи с чем доля поврежденной ДНК невелика [161, 163]. Однако в связи с тем, что мутагенность и повреждение ДНК в разных типах клетках человека при ФД воздействии сильно различается, необходимо учитывать этот факт при проведении ФДТ.

1.3.3 Повреждение митохондрий при ФД воздействии

Митохондрии являются одними из важнейших мишеней ФДТ, связанных с цитотоксичностью. При фотодинамическом воздействии с митохондриями связываются такие ФС, как гематопорфирины, производная ALA, Pc4, родамин 123 и др. [13].

В ранних исследованиях механизмов действия порфиринов было показано, что они связываются с митохондриями, дозозависимо ингибируют компоненты цепи переноса электронов, такие как сукцинатдегидрогеназа и цитохром С оксидаза, и нарушают митохондриальный электрохимический градиент *in vitro* и *in vivo* [165–168]. При этом падение градиента в митохондриях не связано с потерей целостности митохондриальной мембраны, а обусловлено действием на митохондриальные ферменты, участвующие в окислительном фосфорилировании [168]. Также в митохондриях клеток при действии порфиринов наблюдалось выраженное ингибирование пируват киназы, F₀F₁-АТФ-синтазы, слабое ингибирование активности моноаминоксидазы, при этом активности лактат дегидрогеназы, аденилатциклазы и глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы не менялись [167, 169]. В соответствии с ФД воздействием порфиринов на митохондриальные ферменты цепи переноса электронов и окислительного фосфорилирования, при ФД воздействии на клетки опухоли также наблюдается понижение уровней АТФ,

вырабатывающихся в митохондриях, которое при этом коррелирует с выживаемостью клеток [170]. Уменьшении уровней АТФ, связанное с ингибированием митохондриального метаболизма при ФДТ с порфиринами, также наблюдалось в работах *in vivo* с использованием ЯМР [171–174].

Было обнаружено, что при ФД воздействии предшественник ALA, PPIX, действует на митохондрии через митохондриальный белок TSPO, который, возможно, является частью митохондриальной поры [13]. Участие TSPO в фотодинамическом эффекте также продемонстрировано для ФС на базе пиррофеофорбидов [13]. Салет и Морено в 1997 году показали на изолированных митохондриях печени крысы, что ФД воздействие гематопорфирина может инактивировать открытие высокопроницаемой митохондриальной поры [175]. Вильсон и соавторы показали возможное связывание фотофрина с кардиолипинами на внутренней мембране митохондрий [176].

Известно, что митохондрии играют ключевую роль в запуске апоптотической смерти клетки. В ряде работ показана активация каскада каспаз при действии ФДТ [13]. Кессель и Луо показали, что ФС, которые связываются с митохондриями, преимущественно ведут к смерти путём апоптоза, тогда как те, которые локализуются в плазматической мембране и лизосомах, ведут к другим формам клеточной гибели [177].

Таким образом, митохондрии являются важной мишенью ФД воздействия и изучение изменений их метаболизма при фотоиндуцированном окислительном стрессе является актуальной задачей.

1.3.4 Роль факторов транскрипции NF- κ B, AP-1 и NIF-1 при ФД воздействии

ФДТ активирует множество сигнальных путей, которые участвуют в ответе клетки на окислительный стресс и другие внешние воздействия. Фотоиндуцированный стресс индуцирует высвобождение вторичных мессенджеров, включая продукцию NO и высвобождение Ca^{2+} из ЭПР [13]. В результате в клетке активируются протеинкиназы, часть из которых ведёт к

апоптозу, тогда как другие способствуют выживаемости клетки [178]. Ответ клеток на ФД воздействие, включая активацию сигнальных белков, варьируется и зависит от дозы облучения, ФС, условий оксигенации и типа клеток. Сложное взаимодействие процессов, запускающихся в клетке в ответ на фотоиндуцированный стресс, определяет её дальнейшую судьбу при ФДТ [18].

Было показано, что окислительный стресс при ФД воздействии может активировать факторы транскрипции NF-κB, AP-1 и NIF-1, которые играют важную роль в канцерогенезе и окислительном стрессе [179–181]. Так, ФДТ активирует гены раннего ответа (*c-fos*, *c-jun*) и ведёт к продолжительной экспрессии c-Jun и c-Fos, компонентов AP-1 [13, 180]. Митра и соавторы показали, что ФД воздействие вызывает гиперэкспрессию NIF-1 [182]. Также есть данные, что сублетальное ФД воздействие повышает экспрессию NIF-1α в тканях мозга мышей [183].

Активация NF-κB может происходить в результате действия АФК и TNFα, при этом гипоксия может способствовать данному процессу [15]. Сильный окислительный стресс, напротив, может ингибировать NF-κB [15]. Активация NF-κB ведёт к транскрипции ряда генов и, в основном, стимулирует выживание клеток, ингибируя апоптоз, и способствует ангиогенезу и пролиферации клеток, воздействуя на иммунную систему [15]. Однако есть данные и о проапоптотическом действии NF-κB. Помимо этого, NF-κB важен для иммунного ответа, который препятствует рецидиву опухоли [184]. AP-1, как и NF-κB, регулирует транскрипцию генов белков, участвующих в выживаемости, апоптозе и противовоспалительном ответе клеток [118, 133]. Активация NIF-1 ведёт к экспрессии генов белков, ингибирующих митохондриальное дыхание, участвующих в апоптозе, ангиогенезе и метастазировании [136].

Ингибирование NIF-1, NF-κB и AP-1 при ФДТ опухолей может повышать эффективность воздействия [15, 185]. С другой стороны, активация факторов транскрипции NF-κB и AP-1 при ФДТ может играть положительную роль, ведя к активации иммунной системы [184, 186].

Таким образом, исследование роли NF-κB, AP-1 и NIF-1 в выживаемости здоровых нервных и глиальных клеток при фотоиндуцированном окислительном стрессе является актуальной задачей.

1.3.5 Фотоиндуцированная клеточная гибель

В зависимости от параметров фотоиндуцированного окислительного стресса в клетке запускаются процессы, которые ведут к некрозу, апоптозу, аутофагии или выживаемости клетки [18]. Важное значение при этом играют физикохимические свойства ФС, его субклеточная локализация и локальная концентрация, концентрация кислорода и интенсивность и длина волны света, который используется для облучения [9].

Как упомянуто ранее, при одинаковых условиях ФС, которые накапливаются в митохондриях, индуцируют апоптоз при определенном уровне окислительного стресса. В частности, апоптоз может запускаться не только окислительными повреждениями, индуцируемыми АФК, но также супероксид-анионом, который образуется в результате повреждения компонент цепи переноса электронов [187]. ФС, которые накапливаются в лизосомах, напротив, либо отдаляют, либо блокируют апоптоз, создавая условия для некротической гибели клеток. Слабое окислительное повреждение при использовании ФС, которые локализуются в плазматической мембране, вызывает апоптоз, тогда как обширные повреждения ведут к потере целостности клеточной мембраны и, следовательно, некрозу [188, 189]. ФС, которые накапливаются в мембранах ЭПР и комплекса Гольджи ведут к некрозу [20].

Один и тот же ФС при облучении в нормальных условиях может вести к некрозу, тогда как при гипоксии он будет вызывать апоптоз [190]. Преобладание некроза при высокой интенсивности фотодинамического воздействия ведёт к некрозу из-за инактивации жизненно важных ферментов и других компонентов сигнальных путей, ведущих к апоптозу [9]. Т.е. сублетальные фотоиндуцированные повреждения ведут к апоптозу, тогда как сильные

повреждения препятствуют образованию АТФ и развитию клеточной гибели по апоптотическому пути и, следовательно, запускают некроз [191].

Таким образом, тип смерти при ФДТ зависит от количества, локализации и типа генерируемых АФК, которые определяют уровень окислительного повреждения. Тип фотоиндуцированной гибели оказывает сильное влияние на клиническую картину после ФДТ. ФДТ с преобладающей апоптотической гибелью клеток минимизирует побочные эффекты и при равной эффективности считается предпочтительным. Поэтому модулирование гибели клеток при ФДТ в воздействии является важной задачей.

Таким образом, фотодинамическая терапия широко используется в онкологии, в том числе для удаления опухолей мозга. Однако при этом здоровые клетки, окружающие опухоль, также подвергаются фотоиндуцируемому окислительному стрессу. При ФДТ опухолей мозга минимизация повреждения здоровой ткани особенно важна. В связи с этим, важно исследовать реакцию здоровых нейронов и глиальных клеток на фотодинамическое воздействие перспективных отечественных фотосенсибилизаторов, фотосенса и радахлорина.

Важную роль в ответе клеток на окислительный стресс играют митохондрии и факторы транскрипции NF-κB, AP-1 и NIF-1. Однако их роль в фотоиндуцируемом окислительном стрессе, развивающимся в нервных и глиальных клетках, изучена мало. В связи с этим, важно изучить окислительный стресс, протекающий при фотодинамическом воздействии радахлорина, в первичной сокультуре нейронов и астроцитов коры мозга крысы по показателям генерации АФК, перекисного окисления липидов и уровня восстановленного глутатиона, изучить изменения митохондриального метаболизма в первичной сокультуре нейронов и астроцитов коры мозга крысы при фотодинамическом воздействии радахлорина по показателям митохондриального потенциала и уровня НАДН, а также исследовать роль факторов транскрипции NF-κB, AP-1 и NIF-1 в повреждении нейронов и глиальных клеток механорецептора речного рака при фотодинамическом воздействии фотосенса.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования

В данной работе механизмы фотодинамического воздействия на нервные и глиальные клетки исследовались на двух модельных объектах – изолированном механорецепторе растяжения речного рака *Astacus leptodactylus* и первичной сокультуре нейронов и астроцитов коры мозга крысы. Механорецептор речного рака представляет собой простую экспериментальную модель, состоящую из двух одиночных механорецепторных нейронов, окруженных оболочкой из сателлитных глиальных клеток [192]. Его электрофизиология, морфология, биохимия и реакции на лазерное облучение и ФД воздействие хорошо изучены [193]. В нем точно известно, какие глиальные клетки контактируют с данными нейронами, нейрональная активность стабильна и точно регистрируется.

Первичная сокультура нейронов и астроцитов коры мозга крысы получается в результате механического и протеолитического диспергирования коры мозга крысы и последующего помещения полученной клеточной суспензии в планшет с лунками с питательной средой и покровными стёклами, где после прикрепления к поверхности последних клетки начинают размножаться. Полученная культура клеток представляет собой удобную модельную систему для изучения различных процессов, протекающих в клетках коры мозга крысы.

2.2 Химические реактивы и оборудование

Для культивирования клеток использовались МЕМ, нейробазальная среда, суплементы, антибиотики, поли-D-лизин, трипсин-ЭГТА, коллагеназа (Invitrogen) [194]. Для выделения механорецептора речного рака и поддержания его жизнедеятельности использовался физиологический раствор Ван-Харревельда (мМ: NaCl – 205; KCl – 5,4; NaHCO₃ – 0,24; MgCl₂ – 5,4; CaCl₂ – 13,5; pH 7.2–7.4) [195]. В качестве фотосенсибилизатора использовались фотосенс (75 нМ;

НИОПИК, Москва) и радахлорин (200-400 нМ; ООО «Рада-фарма», Москва) (рисунок 1.1). Также в исследовании использовались следующие химреактивы: разобщитель окислительного фосфорилирования, FCCP (Sigma-Aldrich, США); блокатор высокопроницаемых митохондриальных пор, циклоспорин А (Sigma-Aldrich, США); ингибитор дыхательной цепи, NaCN (Sigma-Aldrich, США); ингибитор фермента PARP, DPQ (Tocris, Великобритания); модуляторы фактора транскрипции HIF-1, KG-548, FM19G11 и DMOG (Sigma-Aldrich, США); модуляторы фактора транскрипции NF-κB, партенолид (Alomone Labs, Израиль), бетулиновая кислота (Sigma-Aldrich, США) и CAPE (Tocris, Великобритания); ингибитор фактора транскрипции AP-1, SR11302 (Tocris, Великобритания).

Для исследования окислительного стресса, вызванного ФД воздействием, в первичной сокультуре нейронов и астроцитов коры мозга крысы применялись различные флуоресцентные зонды: Fluo-4 AM, дигидроэтидиум (DHE), C11 BODIPY 581/591, монохлорбиман (mcb) и родамин 123 (Invitrogen Molecular Probes). Все красители разводились в диметилсульфоксиде (DMSO, Sigma-Aldrich, США). Кальциевые зонды, как правило, трудно проникают в клетку и чувствительны к внеклеточному кальцию, поэтому на практике, чтобы избежать этих недостатков, используются их ацетоксиметильные эфиры (AM). Они нечувствительны к внеклеточному кальцию и легко проникают в клетку, где эфирные группы гидролизуются внутриклеточными эстеразами и красители вновь становятся чувствительными к ионам кальция [196, 197]. Однако при загрузке клеток данными зондами существенной проблемой является растворимость ацетоксиметильных эфиров [196]. Отсутствие равномерного распределения AM эфиров ведёт к неравномерному распределению интенсивности флуоресценции зонда между отдельными клетками и областями в исследуемом образце, поэтому используют специальные диспергирующие агенты, облегчающие загрузку AM зондов. Одним из наиболее часто используемых таких агентов является плуроник F-127 (Invitrogen Molecular Probes), неионный поверхностно активный полиол, способствующий растворению водонерастворимых красителей и прочих веществ в физиологических средах [197]. Он добавлялся в клетки в каждом эксперименте с

AM красителями для их лучшего проникновения так, чтобы его конечная концентрация в среде составляла 0.005%. Функциональное состояние митохондрий исследовалось по аутофлуоресценции НАД(Ф)Н. Перед началом каждого эксперимента клетки отмывались средой Хенкса, состоящей из 156 мМ NaCl, 3 мМ KCl, 2 мМ MgSO₄, 1,25 мМ KH₂PO₄, 2 мМ CaCl₂, 10 мМ глюкозы и 10 мМ HEPES, pH = 7,35. Получение изображений проводилось *in vitro* с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Olympus (Япония), оборудованного флюоритовыми объективами 20x и 40x. Красители возбуждались светом ксеноновой лампы, проходящим через монохроматор (Cairn Research, Kent, Великобритания), контролируемый компьютерной программой Andor IQ (Великобритания) с временными интервалами 5 или 10 с. Флуоресцентные изображения регистрировались с помощью CCD камеры (Retiga, QImaging, Surrey, BC, Канада) и оцифровывались с разрешением 12 бит при помощи программы Andor IQ. Флуоресцентные изображения клеток, окрашенных красителем C11 BODIPY 581/591, были получены с интервалом 5 с на конфокальном микроскопе Zeiss 710 CLSM (Carl Zeiss, Германия).

2.3 Культура клеток

Смешанная сокультура первичных кортикальных нейронов и астроцитов была приготовлена, как описано ранее [194]. Клетки были получены из 2–4 дневных крысят линии Спрагу Даулей колонии Университетского Колледжа Лондона. Эксперименты были проведены в полном соответствии с актом по работе с лабораторными животными [198]. Выделенную кору погружали в бескальциевый раствор Хенкса на ледяной бане с содержанием гентамицина 20 мкг/мл. Затем ткань измельчали ножницами и подвергали трипсинизации (0,1%; 10 минут при 37°C). После этого трижды проводили отмывку от трипсина при помощи центрифугирования (400 g, 3 мин) и полученную смесь ресуспензировали в культуральной среде (нейробазальная среда с суплементом B27 и 2мМ L-глутамин). Затем клетки наносились на покровные стёкла, обработанные поли-D-

лизином, и помещались в инкубатор на 6 часов, после чего добавлялась культуральная среда. Культура клеток находилась в инкубаторе при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂ и 95% воздуха. Культуральную среду меняли дважды в неделю, и клетки, культивируемые в течение 10-20 дней, использовались в экспериментах *in vitro*.

2.4 Схема эксперимента с фотодинамическим воздействием на культуру клеток

Режимы ФД воздействия варьировались в зависимости от эксперимента. Для облучения использовался диодный лазер с мощностью 0,1 мВт, излучающий на 654 нм. Минимальная концентрация фотосенсибилизатора подбиралась эмпирически по кальциевому ответу (fluo-4 AM) так, чтобы наблюдалась реакция культуры клеток на фотодинамическое воздействие при облучении в течение 30 с, но не происходило патологического повышения уровня кальция, при котором клетки перестают реагировать на воздействие. Так, при 200 нМ радахлорина наблюдались кальциевые осцилляции в нейронах уже после облучения в течение 10 с, при этом клетки не умирали при облучении в течение 5 мин. Меньшие концентрации (100 нМ) ФС не вызывали значительной реакции в культуре клеток, а использование 700 нМ вело почти к мгновенной гибели клеток. Таким образом, в работе использовался радахлорин в концентрации от 200 до 400 нМ, а общая доза ФД воздействия в зависимости от типа эксперимента варьировалась с помощью изменения длительности облучения от 10 с до 5 мин.

При измерении флуоресценции НАД(Ф)Н, fluo-4 и родамина 123 в начале эксперимента записывалась базальная интенсивность в течение нескольких минут (от 3 до 5 мин), затем в записи делалась пауза и добавлялся радахлорин (200 нМ). После этого интенсивность флуоресценции регистрировалась ещё в течение некоторого времени (до 5 мин) для того, чтобы исключить артефакты и реакцию непосредственно на добавление ФС, и производилось облучение препарата, в течение которого флуоресценция не регистрировалась, чтобы избежать засветку

камеры. После облучения для оценки ФД воздействия интенсивность флуоресценции записывалась в течение 3-5 мин.

В флуоресцентных исследованиях с помощью дигидроэтидиума (DHE) и C11 BODIPY 581/591 радахлорин (200 и 400 нМ) добавлялся до начала эксперимента, чтобы исключить преждевременное окисление красителей.

В опыте с монохлорбиманом (mcb, 50 мкМ) культура клеток подвергалась ФД воздействию и выдерживалась в CO₂-инкубаторе 3 часа до обработки зондом для того, чтобы уровень глутатиона успел измениться.

2.5 Схема эксперимента с фотодинамическим воздействием на МРН

Механорецептор речного рака выделялся под контролем бинокулярного светового микроскопа Zeiss (Германия) согласно методике [192]. Далее рецептор переносился в специальную ванночку, где его активность отводилась внеклеточно с помощью присасывающего стеклянного электрода. Регистрация потенциалов действия проводилась с помощью усилителя, АЦП и компьютерной программы Neuron XP. После выхода импульсной активности на стационарный режим проводилась контрольная запись ПД и в ванночку добавлялся фотосенс (75 нМ) и в экспериментальной группе опытов один из модуляторов NF-κB (бутулиновая кислота 5 мкМ, CAPE 30 мкМ, партенолид 20 мкМ), AP-1 (SR11302 10 мкМ) и NIF-1 (KG-548 53 мкМ; FM19G11 3,7 мкМ; DMOG 1 мМ). Через 30 минут после добавления фотосенсибилизатора механорецептор облучался в течение 30 минут с помощью диодного лазера (670 нм, 0,4 Вт/см²), при этом регистрировалось время прекращения импульсной активности МРН.

Через 8 часов после окончания воздействия для оценки показателей клеточной смерти нейронов и глиальных клеток проводилось флуоресцентное окрашивание клеток с помощью PI (20 мкМ) и Hoechst-33342 (10 мкМ). После этого клетки фиксировались в 0,2% растворе глутаральдегида. Голубая флуоресценция ядер клеток, придаваемая Hoechst-33342, позволяет оценить общее количество клеток МРН речного рака. Пропидий иодид проникает только в

ядра клеток с поврежденной мембраной и позволяет оценить количество некротических клеток. Флуоресцентные изображения контрольного препарата механорецептора речного рака и препарата после ФД воздействия, окрашенных пропидий иодидом и Hoechst-33342 представлены на рисунке 2.1.

Таким образом, некроз нейронов оценивался по окраске их ядер (красное/голубое), а некроз глиальных клеток по проценту некротических глиальных клеток, окружающих сому нейрона. Апоптоз глиальных клеток измеряли по количеству фрагментированных ядер на 2 мм аксона.

2.6 Определение изменений концентрации внутриклеточного кальция

Для измерения концентрации внутриклеточного кальция ($[Ca^{2+}]_i$) при исследовании ФД воздействия нельзя было использовать Fura-2 AM в связи с совпадением спектров возбуждения красителя и радихлорина, поэтому использовался Fluo-4 AM [199]. Клетки инкубировали 40 минут при комнатной температуре с 5 мкМ зонда в культуральной среде. Затем их отмывали средой Хенкса и помещали на инвертированный флуоресцентный микроскоп, оснащенный 20-кратным флюоритовым объективом.

Концентрация внутриклеточного кальция $[Ca^{2+}]_i$ измерялась в одиночных клетках по интенсивности флуоресцентного сигнала Fluo-4. Флуоресценция красителя возбуждалась на длине волны $\lambda_{\text{возб}} = 490$ нм и регистрировалась при $\lambda_{\text{рег}} = 515$ нм. При связывании Fluo-4 с Ca^{2+} интенсивность его флуоресценции возрастает больше, чем в 100 раз.

Флуоресцентные изображения клеточной культуры получались с временным интервалом 10 с.

2.7 Измерение скорости продукции супероксид-аниона

Для измерения скорости продукции супероксид-аниона использовался флуоресцентный краситель, дигидроэтидиум (DHE) [200, 201]. Для этого в начале

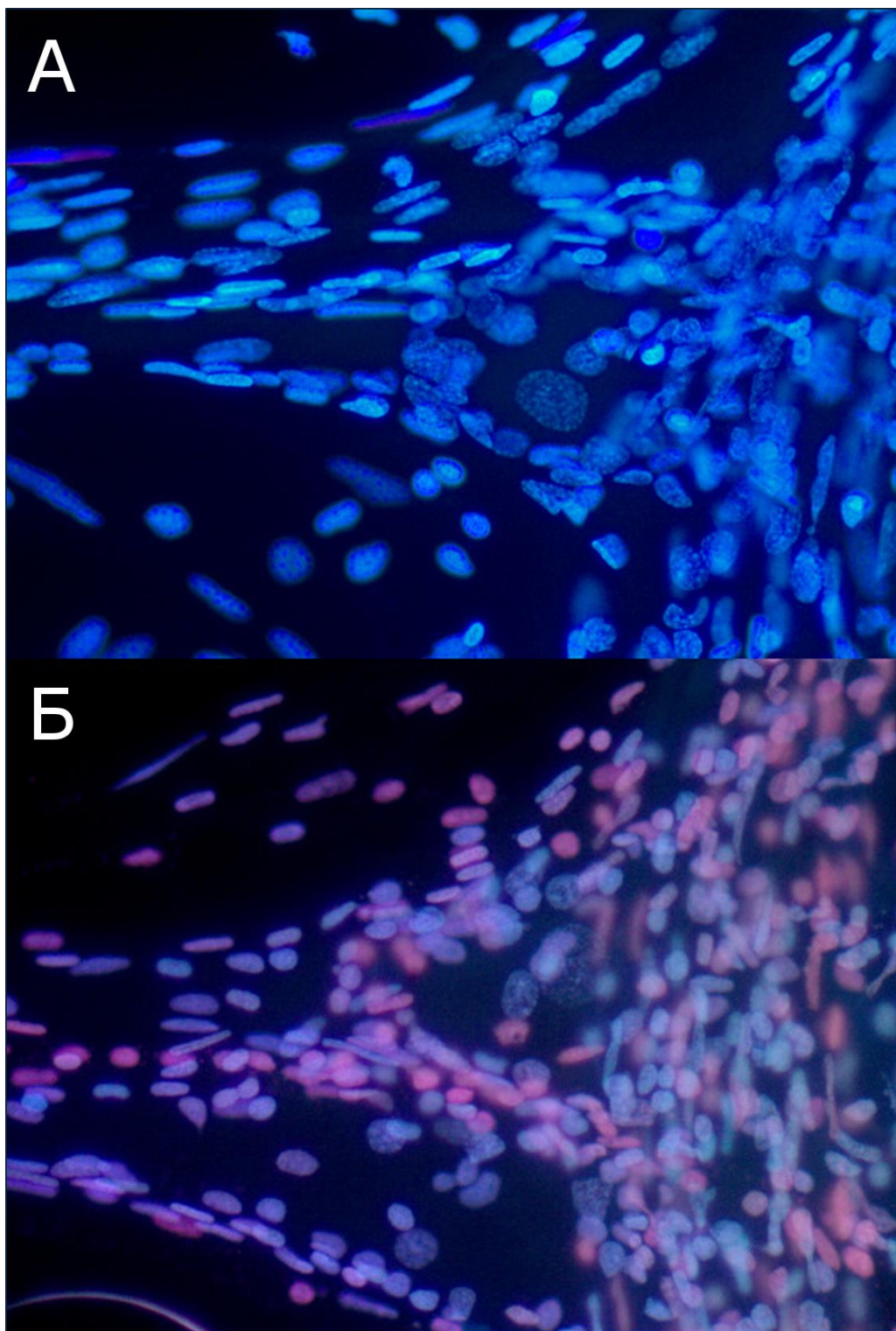


Рисунок 2.1 – Флуоресцентные изображения контрольного препарата механорецептора (А) и препарата после ФД воздействия (Б), окрашенных пропидий иодидом и Ноеchst-33342

эксперимента клеточная среда отмывалась средой Хенкса и в неё без преинкубации добавлялось 2 мкМ дигидроэтидиума. Краситель находился в среде в течение всего эксперимента.

Дигидроэтидиум представляет собой липофильную производную этидиум бромид. Он свободно проникает в клетку и окисляется там супероксид-анионом до этидиум бромид. В цитозоле ДНЕ флуоресцирует в синей области спектра (возбуждение при $\lambda_{\text{возб}} = 380$ нм и флуоресценция при $\lambda_{\text{рег}} = 420$ нм), однако в окисленном состоянии этот зонд связывается с ДНК и окрашивает клеточное ядро в красный цвет (возбуждение при $\lambda_{\text{возб}} = 530$ нм и флуоресценция при $\lambda_{\text{рег}} = 605$ нм). Таким образом, в ходе эксперимента интенсивность флуоресценции восстановленной формы дигидроэтидиума ($\lambda_{\text{возб}} = 380$ нм) уменьшалась, а флуоресцентный сигнал красителя в окисленном состоянии увеличивался ($\lambda_{\text{возб}} = 530$) (рисунки 2.2А, 2.3). По изменению отношения интенсивностей флуоресцентных сигналов восстановленной и окисленной форм дигидроэтидиума ([530/380]), т.е. по тангенсу угла кривой на графике на рисунке 2.2Б, можно судить о скорости продукции супероксид-аниона.

Флуоресцентные изображения клеточной культуры получались с временным интервалом 5 с.

2.8 Метод регистрации аутофлуоресценции НАД(Ф)Н

По изменению аутофлуоресценции НАД(Ф)Н можно судить о функциональном состоянии митохондрий [202]. Изменение содержания НАД(Ф)Н в клетках регистрировали на инвертированном флуоресцентном микроскопе с 40-кратным увеличением, используя $\lambda_{\text{возб}} = 360$ нм и $\lambda_{\text{рег}} = 440$ нм. Для того чтобы отделить аутофлуоресценцию митохондриального НАДН от цитозольного НАДН и НАДФН, сначала перенос электронов по ЦЭТ максимизировался с помощью разобщителя окислительного фосфорилирования FCCP (1 мкМ), а затем блокировался при ингибировании ЦЭТ с помощью NaCN (1 мМ). Эти воздействия не влияют на редокс состояние цитозольного НАД⁺/НАДН и НАДФ⁺/НАДФН.

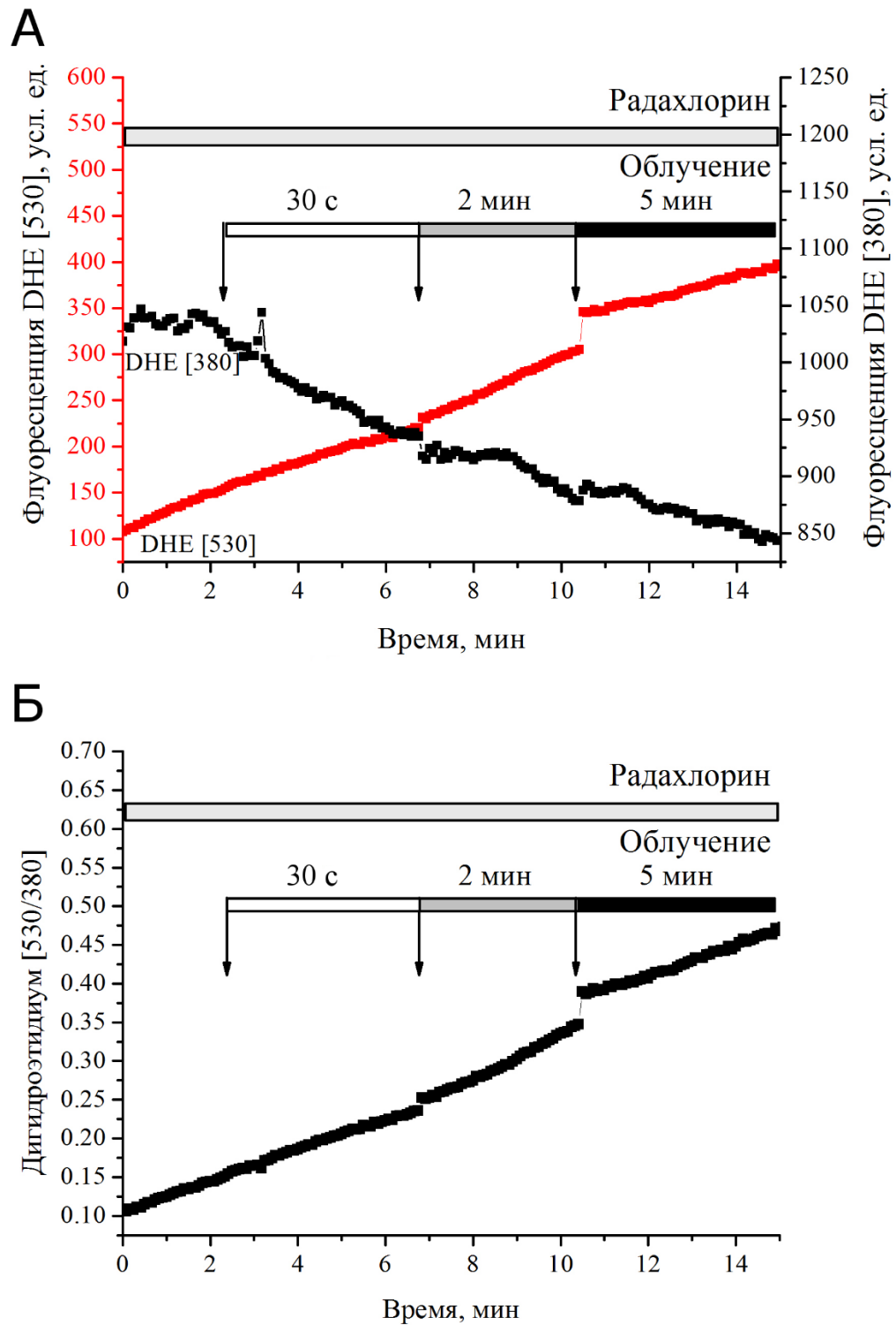


Рисунок 2.2 – Изменение флуоресценции восстановленной (А, черная кривая) и окисленной (А, красная кривая) форм дигидроэтидиума (DHE) при ФД воздействии радахлорина 200 нМ (облучение в течение 30 с, 2 мин и 5 мин) на первичную сокультуру нейронов и астроцитов крысы. Изменение отношения интенсивностей флуоресценции окисленной и восстановленной форм DHE (Б), угол наклона кривой, отражает скорость генерации супероксид-аниона

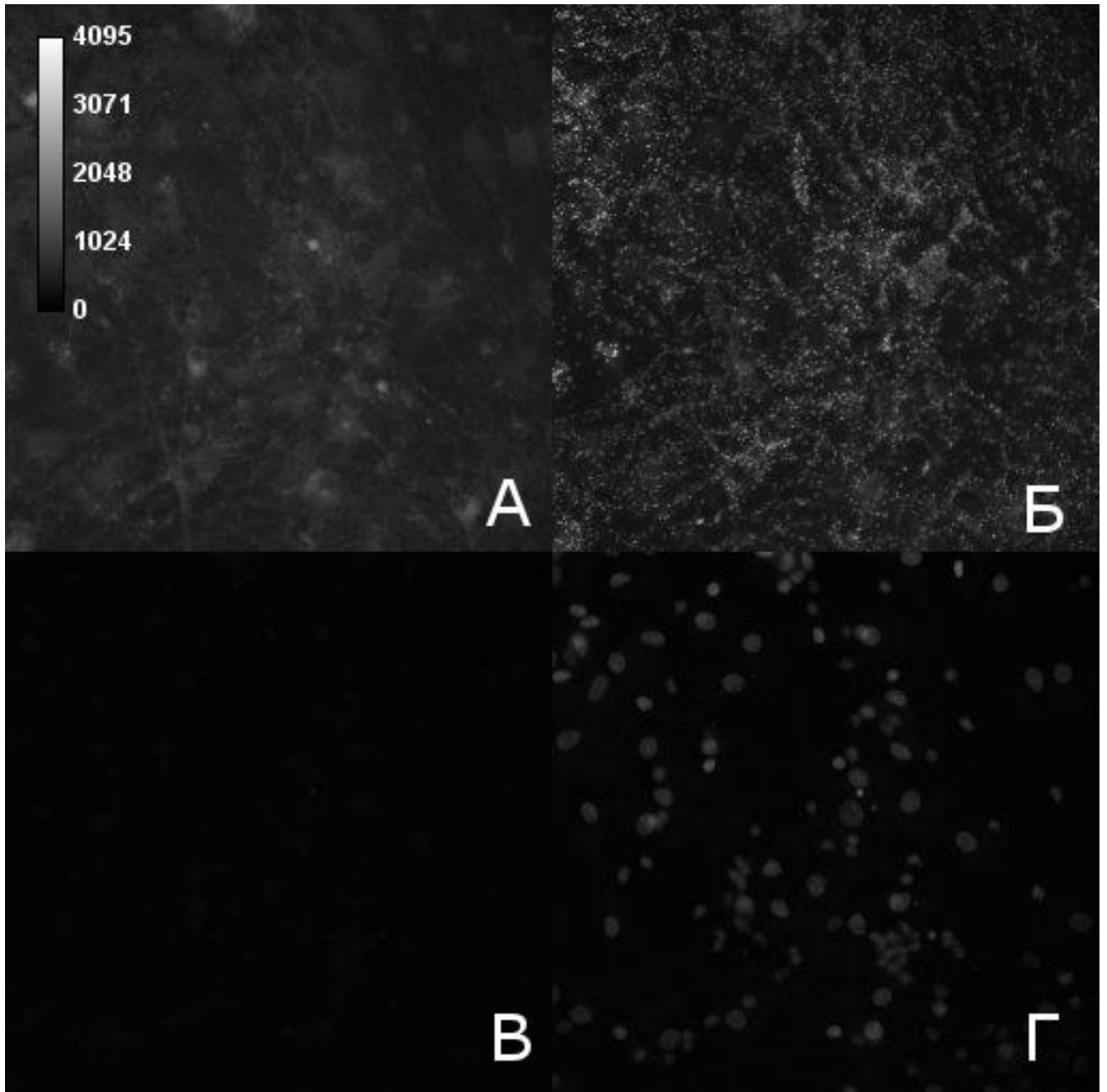


Рисунок 2.3 – Флуоресцентные изображения первичной сокультуры нейронов и астроцитов коры мозга крысы, окрашенной дигидроэтидиемом

A, B – начальная флуоресценция восстановленной и окисленной форм дигидроэтидиума ($\lambda_{\text{возб}} = 380$ нм и $\lambda_{\text{возб}} = 530$), соответственно; B, Г – флуоресценция восстановленной и окисленной форм дигидроэтидиума ($\lambda_{\text{возб}} = 380$ нм и $\lambda_{\text{возб}} = 530$) в клетках в конце эксперимента, соответственно

Таким образом, разница между значениями флуоресценции НАД(Ф)Н после добавления FCCP и фоновым сигналом флуоресценции соответствует уровню цитозольного НАДН и НАДФН, который характеризует активность пентозофосфатного пути (рисунок 2.4). Ингибирование дыхания при помощи 1 мМ NaCN блокирует потребление митохондриального НАДН дегидрогеназами, что приводит к увеличению уровня НАДН в митохондриях до максимального. Разница между значениями флуоресценции в ответ на FCCP и NaCN была принята за митохондриальную концентрацию НАДН, НАДН депо (рисунок 2.4). Усреднённая флуоресценция НАД(Ф)Н, полученная после добавления NaCN, соответствует максимальному уровню митохондриального НАДН (100%), тогда как усреднённый флуоресцентный сигнал НАД(Ф)Н после добавления FCCP соответствует минимальному уровню НАДН (0%) (рисунок 2.4). Сигнал НАД(Ф)Н, нормированный как описано выше, представляет собой редокс состояние НАДН в ходе эксперимента, рассчитанное в процентах (рисунок 2.4).

Скорость увеличения флуоресценции НАД(Ф)Н после добавления NaCN соответствует скорости образования НАДН, которая характеризует эффективность цикла трикарбоновых кислот (рисунок 2.4).

Для выяснения механизмов изменения показателей НАД(Ф)Н в ходе экспериментов культура клеток непосредственно перед началом эксперимента инкубировалась в течение 20 мин с ингибитором PARP, DPQ (20 мкМ).

Флуоресцентные изображения клеточной культуры получались с временным интервалом 5 с.

2.9 Определение митохондриального потенциала

Для регистрации митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$) клетки инкубировались 15 минут при комнатной температуре в культуральной среде в присутствии родамина 123 (Rh123; 1 мкг/мл, 2,6 мкМ) [203]. Затем клетки отмывали средой Хенкса и помещали на инвертированный флуоресцентный микроскоп, оснащенный 20-кратным объективом.

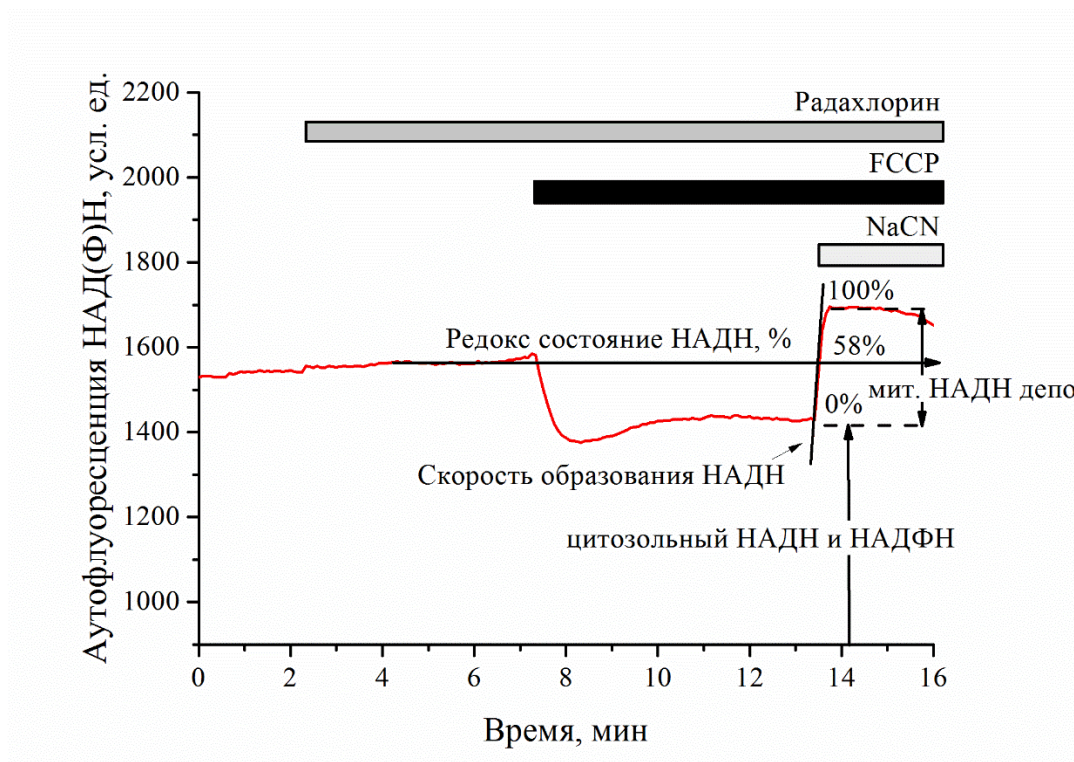


Рисунок 2.4 - Аутофлуоресценция НАД(Ф)Н в первичной сокультуре нейронов и астроцитов коры мозга крысы с добавлением радахлорина (200 нМ)

$\Delta\Psi_m$ измерялся в одиночных клетках с помощью родамина 123. Флуоресценция красителя возбуждалась на длине волны $\lambda_{\text{возб}} = 490$ нм и регистрировалась при $\lambda_{\text{рег}} = 515$ нм.

Накопление Rh123 в поляризованных митохондриях ведёт к низкому флуоресцентному сигналу красителя в цитозоле за счет перераспределения; в ответ на митохондриальную деполяризацию Rh123 высвобождается из митохондрий в цитозоль и интенсивность флуоресценции возрастает. Таким образом, увеличение сигнала Rh123 при данной концентрации свидетельствует о деполяризации митохондрий. Поэтому в большинстве экспериментов флуоресценция Rh123 калибровалась: в конце каждого опыта добавлялся 1 мкМ FCCP, при котором достигались максимальные значения флуоресцентного сигнала Rh123 (при минимальном $\Delta\Psi_m$), принимаемые за 100%, базовая флуоресценция при этом приравнивалась к 0%.

Флуоресцентные изображения клеточной культуры получались с временным интервалом 10 с. Для исследования механизмов изменения митохондриального потенциала в некоторых опытах культура клеток инкубировалась в течение 20 мин с ингибитором высокопроницаемой митохондриальной поры (mPTP), циклоспорином А (CsA, 1 мкМ) или ингибитором PARP, DPQ (20 мкМ).

2.10 Метод определения содержания восстановленного глутатиона

Для оценки изменения уровня восстановленного глутатиона (GSH) использовался флуоресцентный зонд монохлорбиман (mcb, 50 мкМ) [204]. Для этого культуру клеток, облученную в присутствии радахлорина, и клетки, подвергшиеся лазерному воздействию без фотосенсибилизатора, выдерживали 4 ч в CO₂-инкубаторе. После чего культура инкубировалась в культуральной среде с mcb в течение 60 мин при комнатной температуре.

Перед получением изображений клетки отмывались в среде Хенкса, после чего их помещали на инвертированный флуоресцентный микроскоп, оснащенный

20-кратным объективом. Флуоресценцию mcb-GSH аддукта возбуждали ксеноновой лампой $\lambda_{\text{возб}} = 380$ нм и регистрировали при $\lambda_{\text{рег}} = 400$ нм. С каждого покровного стекла делалось по пять фотографий при одинаковых настройках камеры.

2.11 Метод определения скорости перекисного окисления липидов

Изменение скорости перекисного окисления липидов осуществлялось с помощью флуоресцентного красителя C11 BODIPY 581/591 [205]. В начале эксперимента клетки отмывали средой Хенкса и добавляли флуоресцентный краситель с концентрацией 2 мкМ. Регистрация флуоресценции C11 BODIPY 581/591 производилась на конфокальном микроскопе с 40-кратным объективом. Краситель возбуждался двумя лазерами с $\lambda_{\text{возб}} = 488$ нм и 561 нм для его окисленной и восстановленной форм, соответственно. Флуоресцентные сигналы регистрировались при $\lambda_{\text{рег}} = 525$ нм и 626 нм, соответственно. В ходе эксперимента краситель окислялся и флуоресценция восстановленной формы C11 BODIPY 581/591 ($\lambda_{\text{возб}} = 488$ нм) уменьшалась, а флуоресцентный сигнал окисленной формы возрастал ($\lambda_{\text{возб}} = 561$ нм) (рисунок 2.5А). По изменению отношения интенсивностей флуоресцентных сигналов восстановленной и окисленной форм красителя, т.е. угла наклона кривой на графике на рисунке 2.5Б можно судить о скорости перекисного окисления липидов.

Флуоресцентные изображения клеточной культуры получались с временным интервалом 5 с.

2.12 Обработка изображений и статистический анализ

Все изображения обрабатывались с помощью программы ImageJ. Нейроны, астроциты и глиальные клетки при обработке различали морфологически. Математическая обработка полученных флуоресцентных сигналов проводилась с помощью MS Excel. Статистический анализ (однофакторный дисперсионный

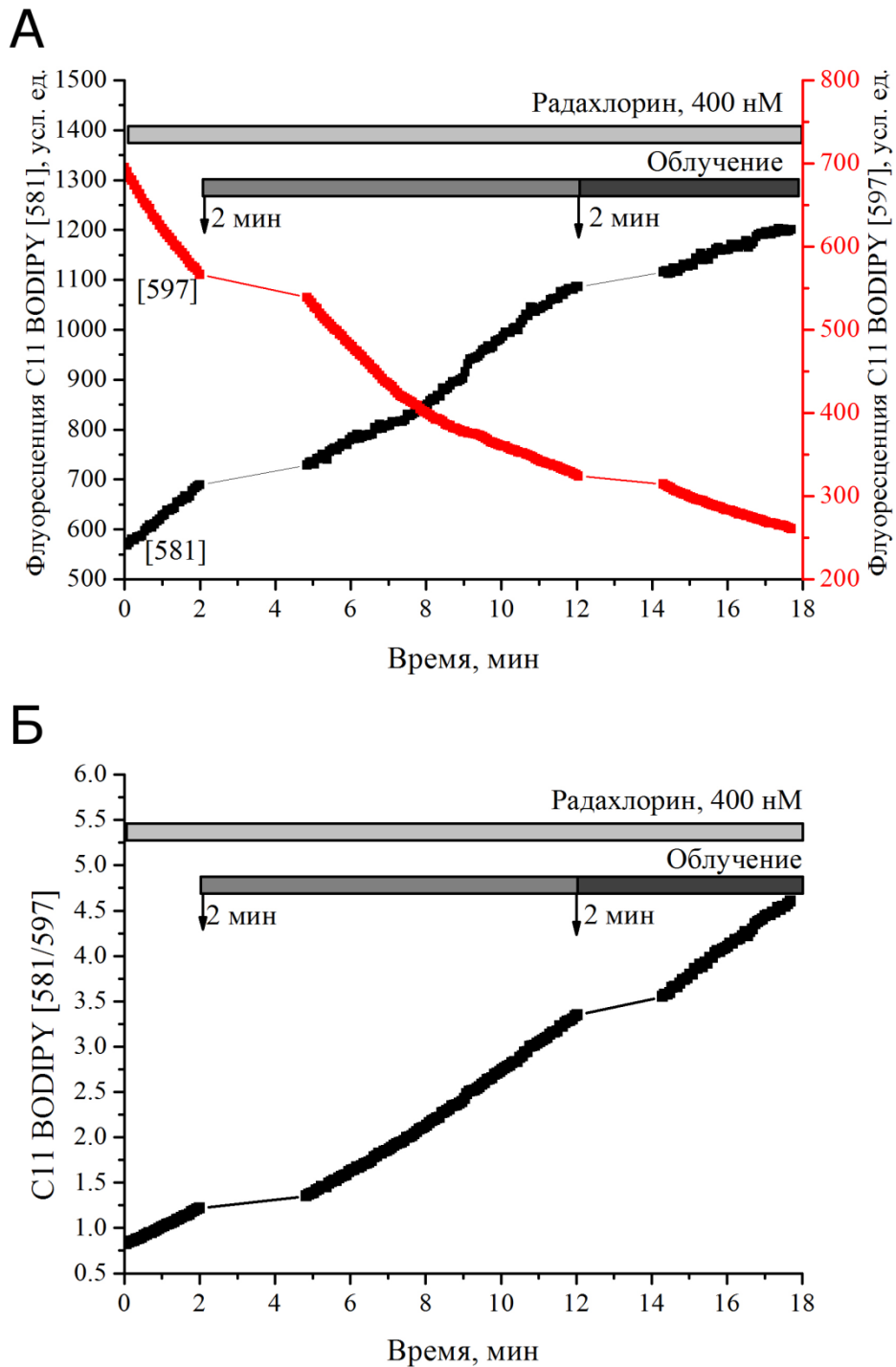


Рисунок 2.5 – Изменение флуоресценции восстановленной (А, черная кривая) и окисленной (А, красная кривая) форм C11 BODIPY [581/597] при ФД воздействии радахлорина 400 нМ (облучение в течение 2 мин и 4 мин) на первичную сокультуру нейронов и астроцитов крысы.

Изменение отношения интенсивностей флуоресценции окисленной и восстановленной форм C11 BODIPY [581/597] (Б), угол наклона кривой, отражает скорость перекисного окисления липидов

анализ, one-way ANOVA; однофакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, one-way repeated measures ANOVA; *t*-критерий Стьюдента, *t*-test) и построение графиков осуществляли с помощью программ Origin 8.1 (Microcal Software Inc, США) и SigmaPlot (США). Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Результаты представляли в виде среднее значение \pm стандартная ошибка.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Изменение концентрации внутриклеточного кальция при фотодинамическом воздействии радахлорина

В ряде работ [191, 206] показано, что кальций играет важную роль в ответах клеток на фотодинамическое воздействие. В данной работе показано, что ФД воздействие радахлорина (200 нМ) индуцирует спонтанные кальциевые осцилляции в нейронах и астроцитах первичной сокультуры клеток коры мозга крысы, при этом кальциевый ответ в астроцитах выражен слабее и проявляется при больших дозах облучения (рисунки 3.1, 3.2). Так при фотодинамическом воздействии радахлорина (200 нМ; облучение в течение 10 с, 30 с, 1 мин и 5 мин) на нейроны ($n = 131$) и астроциты ($n = 151$) в первичной сокультуре коры мозга крысы в нейронах наблюдались спонтанные осцилляции концентрации внутриклеточного кальция ($[Ca^{2+}]_i$) (рисунки 3.1А, 3.2). В астроцитах изменение $[Ca^{2+}]_i$ наблюдалось только при больших дозах облучения (облучение в течение 1 и 5 мин) и, вероятно, сопровождало разрушение клеточной мембраны и гибель клеток (рисунки 3.1Б, 3.2). Меньшие концентрации (100 нМ) ФС не вызывали значительной реакции в культуре клеток, а использование 700 нМ вело к резкому повышению уровня кальция, который не изменялся со временем и, по-видимому, свидетельствовал о гибели клеток (показано в диссертации Негинской М.А.).

Один из возможных механизмов, повышающий уровень кальция в клетках при ФД воздействии, – продукция АФК. Поэтому кальциевый сигнал, наблюдаемый при ФД воздействии 200 нМ радахлорина в течение 10 с, 30 с, 1 мин и 5 мин, должен соответствовать воздействию, при котором уже повышается продукция АФК, но ещё не наступает мгновенная гибель клетки. Такое воздействие позволяет изучить механизмы, лежащие в основе повреждения нервных и глиальных клеток в результате развивающегося фотоиндуцированного окислительного стресса. Поэтому для исследования характеристик окислительного стресса и изменений митохондриального метаболизма в работе

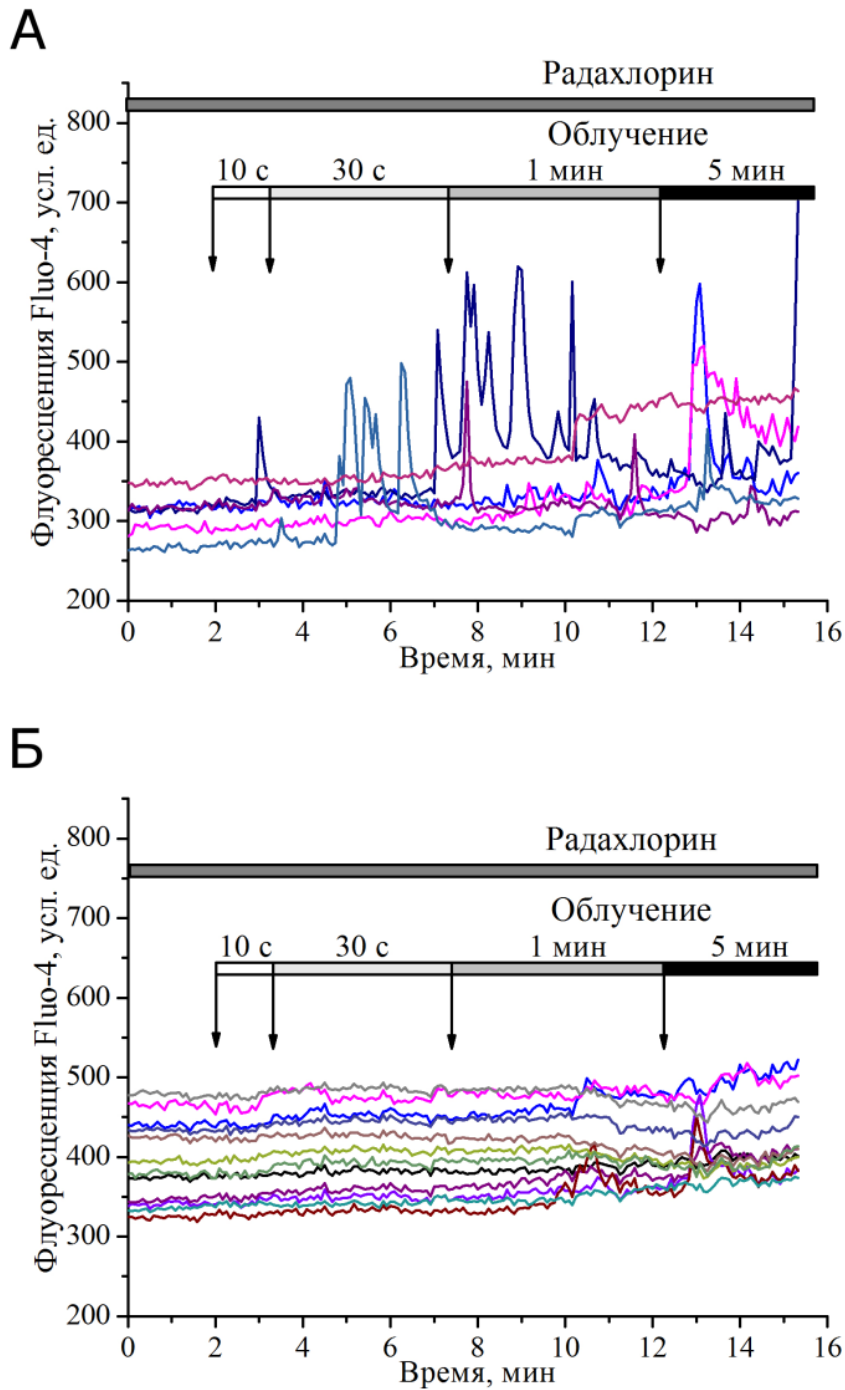


Рисунок 3.1 – Изменения $[Ca^{2+}]_i$ при ФД воздействии радахлорина 200 нМ (облучение в течение 10 с, 30 с, 1 мин и 5 мин) на нейроны (А) и астроциты (Б) в первичной сокультуре коры мозга крысы, полученные по измерению интенсивности флуоресценции F₄₅₀₋₄

На графиках представлены репрезентативные кривые, отражающие изменения в отдельных клетках. Вдоль оси абсцисс отложено время регистрации интенсивности флуоресценции зонда в программе Andor IQ. Во время облучения регистрация прерывалась для избежания засветки камеры

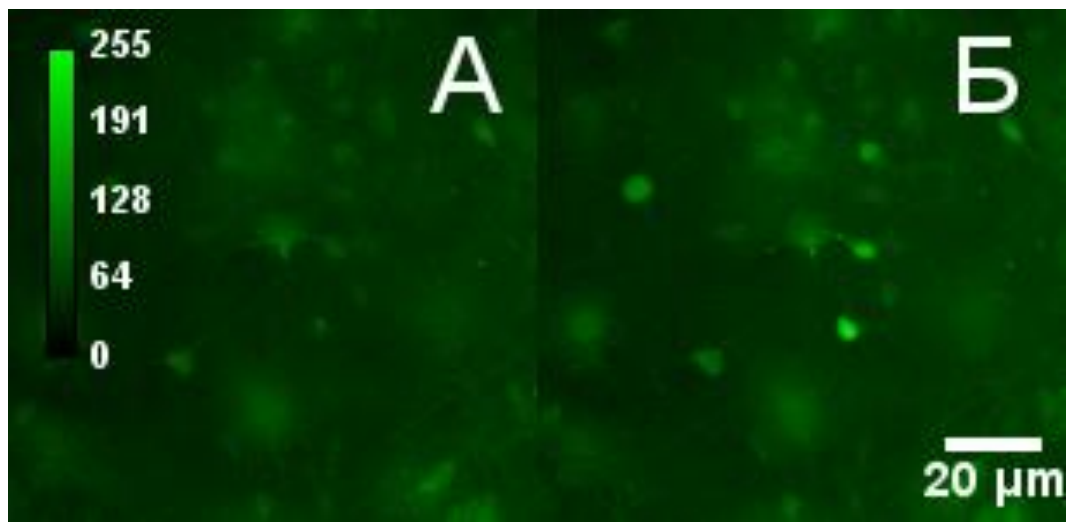


Рисунок 3.2 – Флуоресцентные изображения изменения $[Ca^{2+}]_i$ при ФД
воздействии радахлорина 200 нМ на нейроны и астроциты в первичной
сокультуре коры мозга крысы, полученные с помощью Fluo-4

А – до облучения; Б – после облучения

применялся радахлорин в концентрации от 200 до 400 нМ, а общая доза ФД воздействия в зависимости от типа эксперимента варьировалась с помощью изменения длительности облучения от 10 с до 5 мин.

3.2 Изменение продукции супероксид-аниона при ФД воздействии радахлорина

В основе ФД эффекта лежит окислительный стресс, вызванный генерацией АФК в результате возбуждения фотосенсибилизатора светом определенной длины волны в присутствии кислорода. В работе изучена скорость образования супероксид-аниона при ФД воздействии радахлорина (200 нМ, облучение в течение 30 с, 2 мин и 5 мин) на нейроны ($n = 42$) и астроциты ($n = 122$) в первичной сокультуре коры мозга крысы с помощью флуоресцентного зонда дигидроэтидиума (рисунки 3.3, 3.4). В нейронах ($n = 42$) скорость образования супероксид-аниона при ФД воздействии достоверно ($p < 0,05$, repeated measures ANOVA) увеличивалась уже после 30 с облучения и составляла $140 \pm 10\%$ и $160 \pm 10\%$ относительно базального уровня через 30 с и 2 мин, соответственно, тогда как в астроцитах ($n = 122$) она достоверно увеличилась ($p < 0,05$) только после 2 мин облучения и составляла $150 \pm 10\%$ относительно базального уровня (рисунки 3.3, 3.4). Тенденция к уменьшению роста скорости образования супероксид-аниона после 5 мин облучения ($120 \pm 4\%$ и $150 \pm 10\%$ относительно базального уровня в астроцитах ($n = 122$) и нейронах ($n = 42$), соответственно) может быть связана с окислением большей части дигидроэтидиума. Зависимость скорости образования супероксид-аниона от дозы при ФД воздействии радахлорина на нейроны и астроциты представлена на рисунке 3.5.

Таким образом, так же, как и в случае кальциевого ответа, генерация АФК была выше в нейронах, что может быть связано с взаимным расположением нейронов и астроцитов в культуре или различием в механизмах их ответов на ФД воздействие. Нейроны в сокультуре расположены над астроцитами, в связи с чем доза ФД воздействия в них может быть выше. Корреляция между фотоиндуцируемыми кальциевыми осцилляциями и генерацией супероксид-

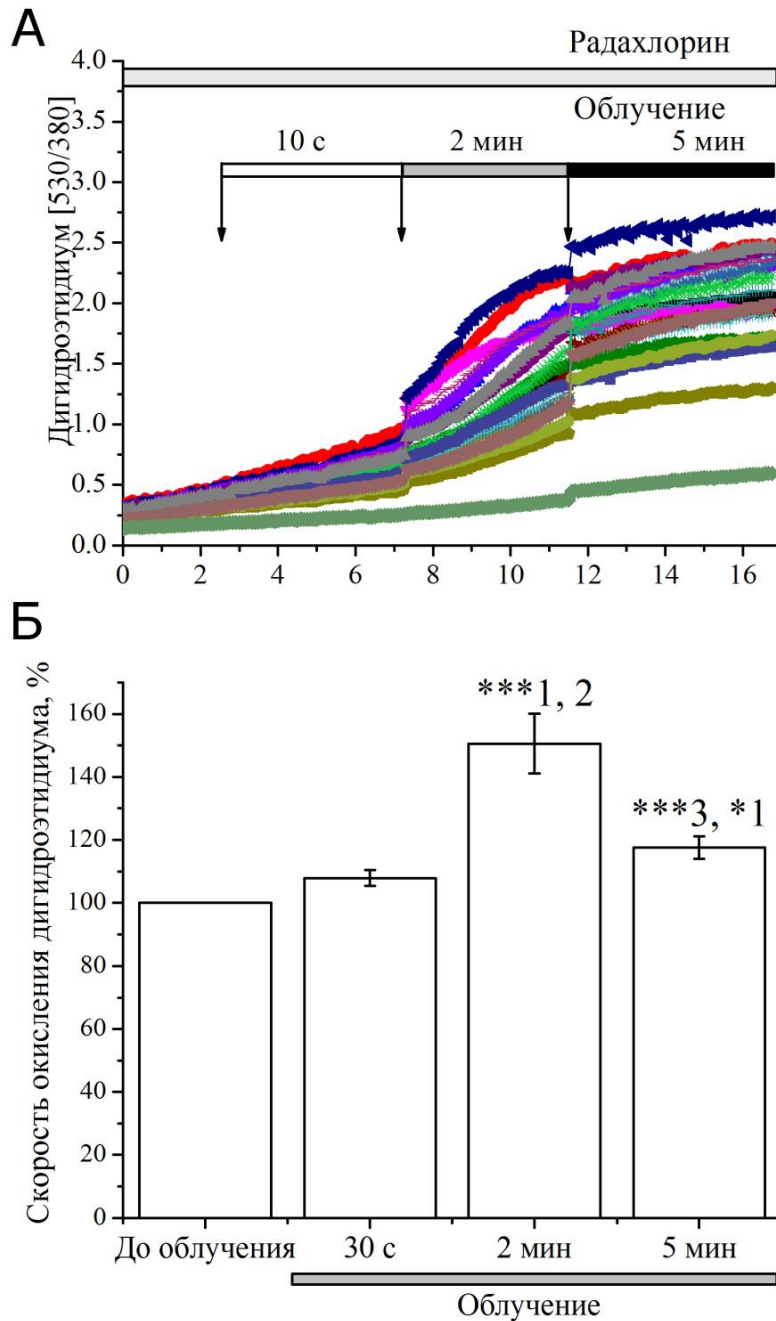


Рисунок 3.3 Изменение скорости образования супероксид-аниона при ФД воздействии радахлорина 200 нМ (облучение в течение 30 с, 2 мин и 5 мин) на астроциты ($n = 122$) в первичной сокультуре коры мозга крысы, полученные по измерению отношения интенсивностей флуоресценции окисленной и восстановленной форм дигидроэтидиума ($\lambda_{\text{возб}} = 530$ нм и $\lambda_{\text{возб}} = 380$ нм)

На графике А представлены репрезентативные кривые, отражающие изменения в отдельных клетках. Вдоль оси абсцисс отложено время регистрации интенсивности флуоресценции зонда в программе Andor IQ, во время облучения регистрация прерывалась для избежания засветки камеры. На графике Б за 100% взята скорость образования супероксид-аниона до облучения (базальный уровень), данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка. * - $p < 0,05$, *** - $p < 0,001$

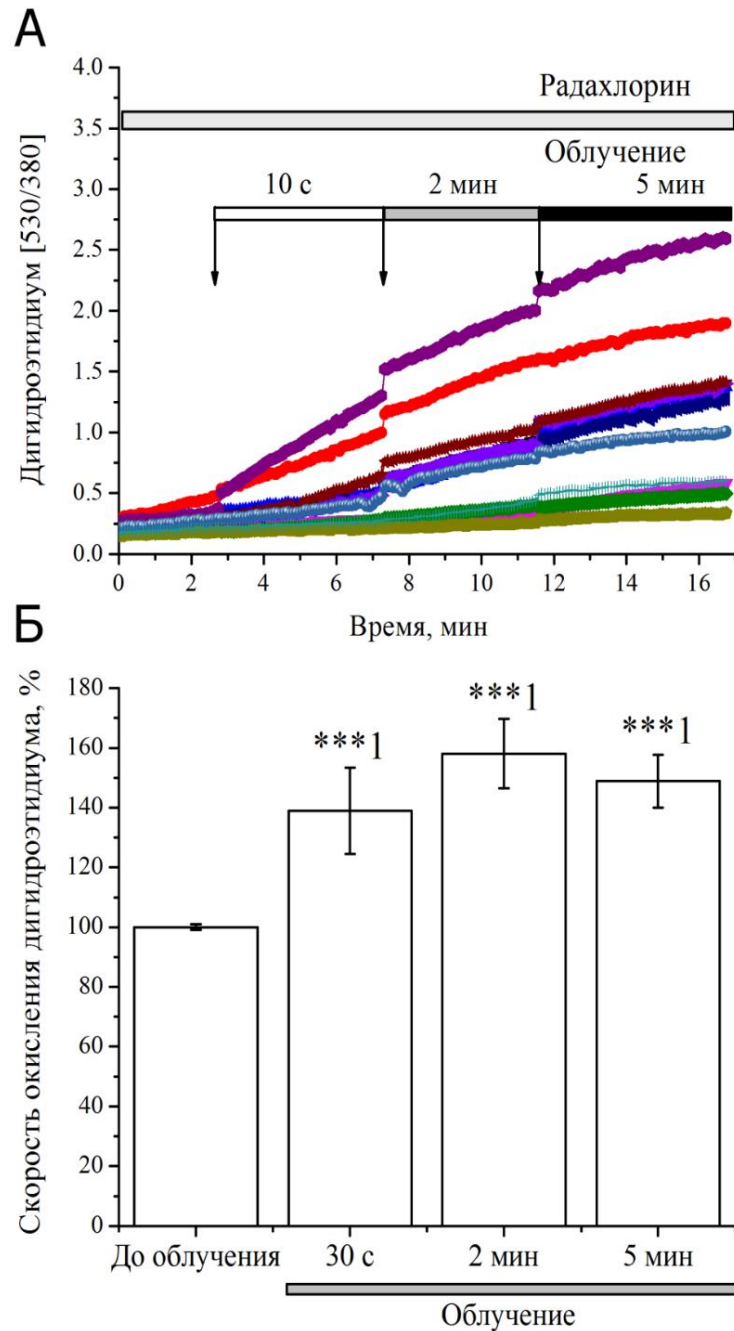


Рисунок 3.4 – Изменение скорости образования супероксид-аниона при ФД воздействии радахлорина 200 нМ (облучение в течение 30 с, 2 мин и 5 мин) на нейроны ($n = 42$) в первичной сокультуре коры мозга крысы, полученные по измерению отношения интенсивностей флуоресценции окисленной и восстановленной форм дигидроэтидиума ($\lambda_{\text{возб}} = 530$ нм и $\lambda_{\text{возб}} = 380$ нм)

На графике А представлены репрезентативные кривые, отражающие изменения в отдельных клетках. Вдоль оси абсцисс отложено время регистрации интенсивности флуоресценции зонда в программе Andor IQ, во время облучения регистрация прерывалась для избежания засветки камеры. На графике Б за 100% взята скорость образования супероксид-аниона до облучения (базальный уровень), данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка. * - $p < 0,05$, *** - $p < 0,001$

аниона в нейронах и астроцитах подтверждает возможную взаимосвязь наблюдаемых кальциевых осцилляций с АФК.

3.3 Исследование уровня восстановленного глутатиона в клетках при ФД воздействии радахлорина с помощью монохлорбимана

Для изучения окислительного стресса в нейронах и астроцитах первичной сокультуры коры мозга крысы, вызванного генерацией АФК при ФД воздействии радахлорина (200 нМ) в течение 4 мин, 4 часа после облучения в клетках был оценен уровень восстановленного глутатиона (GSH) с помощью флуоресцентного зонда монохлорбимана (рисунок 3.6). Контролем служила культура клеток, в которой уровень GSH измерялся 4 часа после облучения без добавления ФС. В нейронах уровень GSH достоверно не отличался в контроле ($n = 121$; 2050 ± 70) и после ФД воздействия радахлорина (t -test, $n = 195$; 2160 ± 60) (рисунок 3.6). В астроцитах ФД воздействие радахлорина достоверно увеличивало уровень GSH (t -test, $p < 0,001$; $n = 231$; 2000 ± 60) по сравнению с облучением культуры без добавления ФС ($n = 144$; 1480 ± 40) (рисунок 3.6).

Полученные данные об уровне GSH свидетельствуют о том, что использованный режим ФД воздействия не приводит за 4 часа к подавлению антиоксидантной защиты в клетке и преобладанию прооксидантных процессов. Увеличение уровня GSH в астроцитах может свидетельствовать об адапционном ответе на окислительный стресс, проявляющийся либо в повышении активности глутатионредуктазы, либо в увеличении синтеза глутатиона.

3.4. Исследование перекисного окисления липидов в клетках при ФД воздействии радахлорина с помощью C11 BODIPY [581/591]

В рамках изучения окислительного стресса в сокультуре первичных нейронов ($n = 18$) и астроцитов ($n = 28$) коры мозга крысы при ФД воздействии

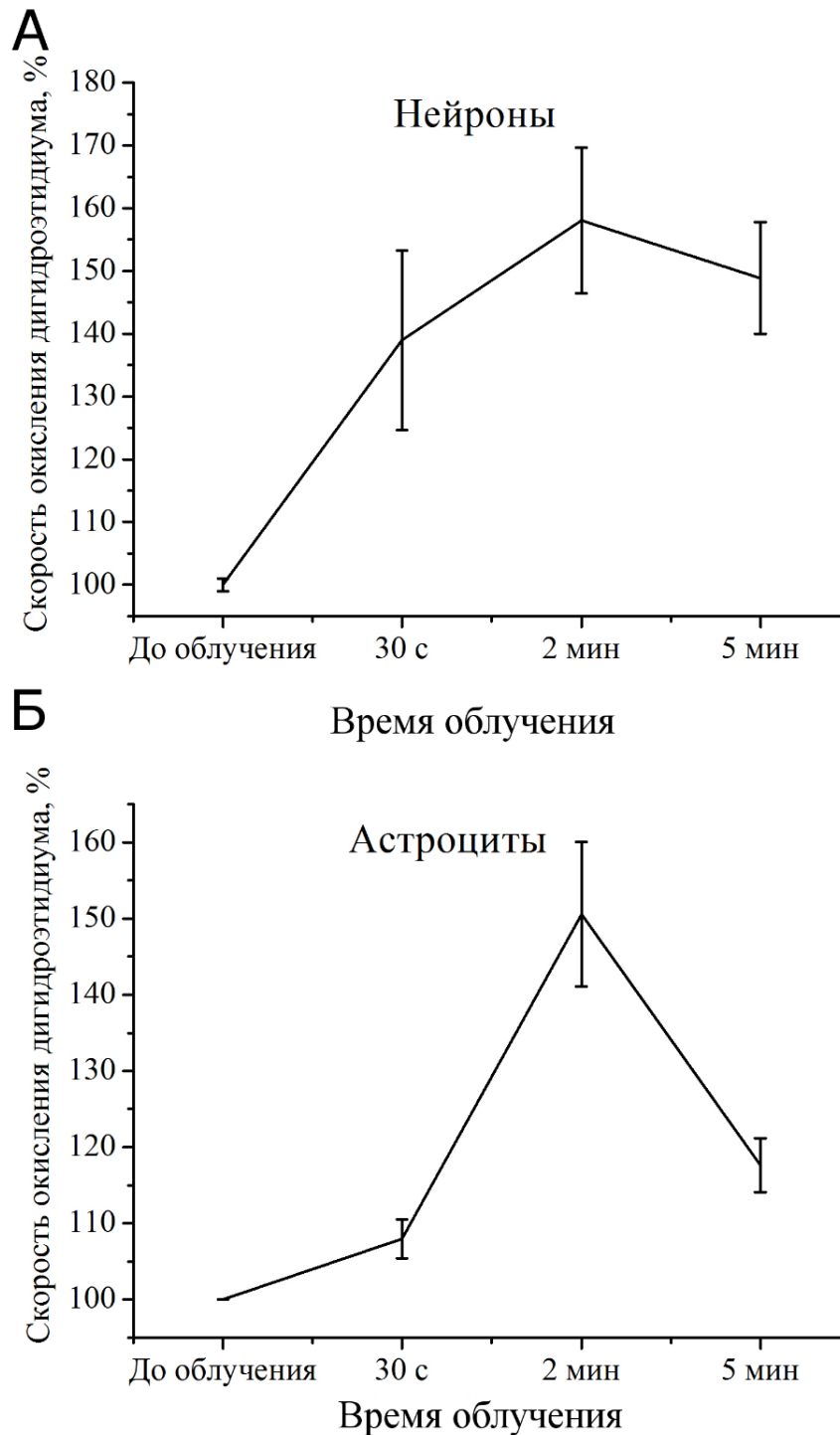


Рисунок 3.5 – Зависимости скорости образования супероксид-аниона от дозы при ФД воздействии радахлорина 200 нМ (доза варьировалась путём изменения времени облучения, составлявшего 30 с, 2 мин и 5 мин) на нейроны ($n = 42$) (А) и астроциты ($n = 122$) (Б) в первичной сокультуре коры мозга крысы, полученные по измерению отношения интенсивности флуоресценции окисленной и восстановленной форм дигидроэтидиума ($\lambda_{\text{возб}} = 530$ нм и $\lambda_{\text{возб}} = 380$ нм)

Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка

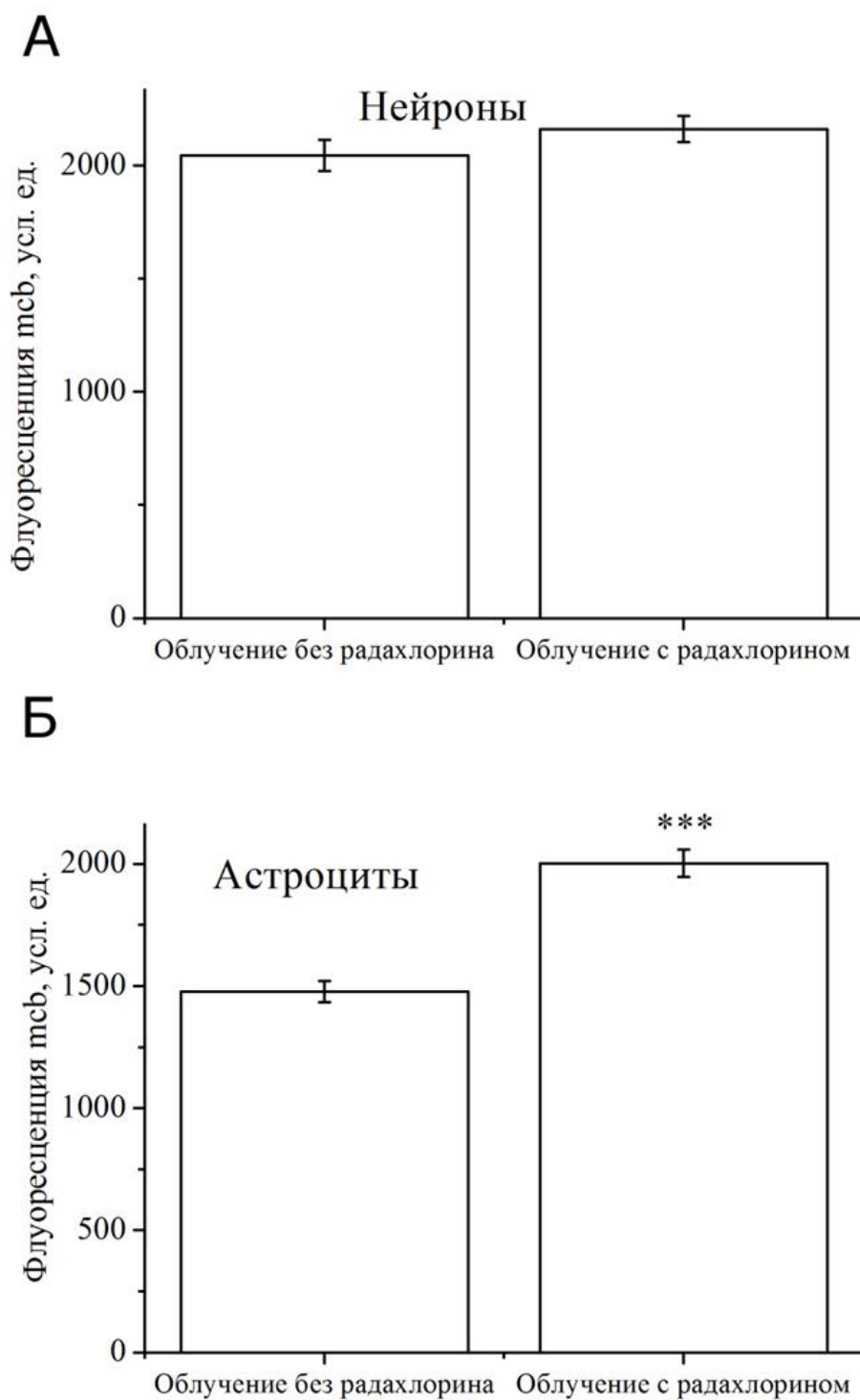


Рисунок 3.6 – Изменение уровня GSH при ФД воздействии радахлорина 200 нМ (облучение в течение 4 мин) на нейроны (А) и астроциты (Б) в первичной сокультуре коры мозга крысы, полученные по измерению интенсивности флуоресценции монохлорбимана (mcb) через 4 часа после воздействия *** - $p < 0,001$. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка

радахлорина (200 нм, облучение в течение 2 мин и 4 мин) было исследовано перекисное окисление липидов с помощью флуоресцентного зонда C11 BODIPY [581/591] (рисунки 3.7–3.9).

В нейронах ($n = 18$) и астроцитах ($n = 28$) скорость перекисного окисления липидов достоверно ($p < 0,05$, repeated measures ANOVA) увеличивалась только после 4 мин облучения и составляла $120 \pm 10\%$ ($p < 0,05$, repeated measures ANOVA) и $280 \pm 70\%$ ($p < 0,01$, repeated measures ANOVA), соответственно, относительно базального уровня, тогда как после облучения в течение 2 мин в нейронах ($n = 18$; $p = 0,148$; 114 ± 7) и астроцитах ($n = 28$; $p = 0,374$; 140 ± 20) наблюдались только недостоверные тенденции к её росту (рисунки 3.7, 3.8). Зависимость скорости перекисного окисления липидов от дозы при ФД воздействии радахлорина на нейроны и астроциты в первичной сокультуре коры мозга крысы представлена на рисунке 3.9.

Таким образом, повышение больше выражено в глиальных клетках ($120 \pm 10\%$ и $280 \pm 70\%$ в нейронах и астроцитах, соответственно). При этом, т.к. генерация супероксид-аниона при ФД воздействии выше в нейронах, возможно наблюдаемые изменения уровня глутатиона и скорости перекисного окисления липидов в нейронах и астроцитах связаны с лучшим функционированием антиоксидантной системы в первых.

3.5 Исследование биоэнергетического статуса клеток при ФД воздействии радахлорина по аутофлуоресценции НАД(Ф)Н

Для того, чтобы предотвратить окислительный стресс, в клетке запускаются защитные механизмы, которые потребляют энергию. В связи с этим, в данной работе изучались изменения биоэнергетического статуса клеток при ФД воздействии радахлорина. Образование АТФ в митохондриях функционально связано с ЦЭТ и окислительным фосфорилированием. цикле Кребса образуется НАДН, который передает электроны комплексу I, обеспечивая функционирование дыхательной цепи. Измерение аутофлуоресценции НАД(Ф)Н позволяет

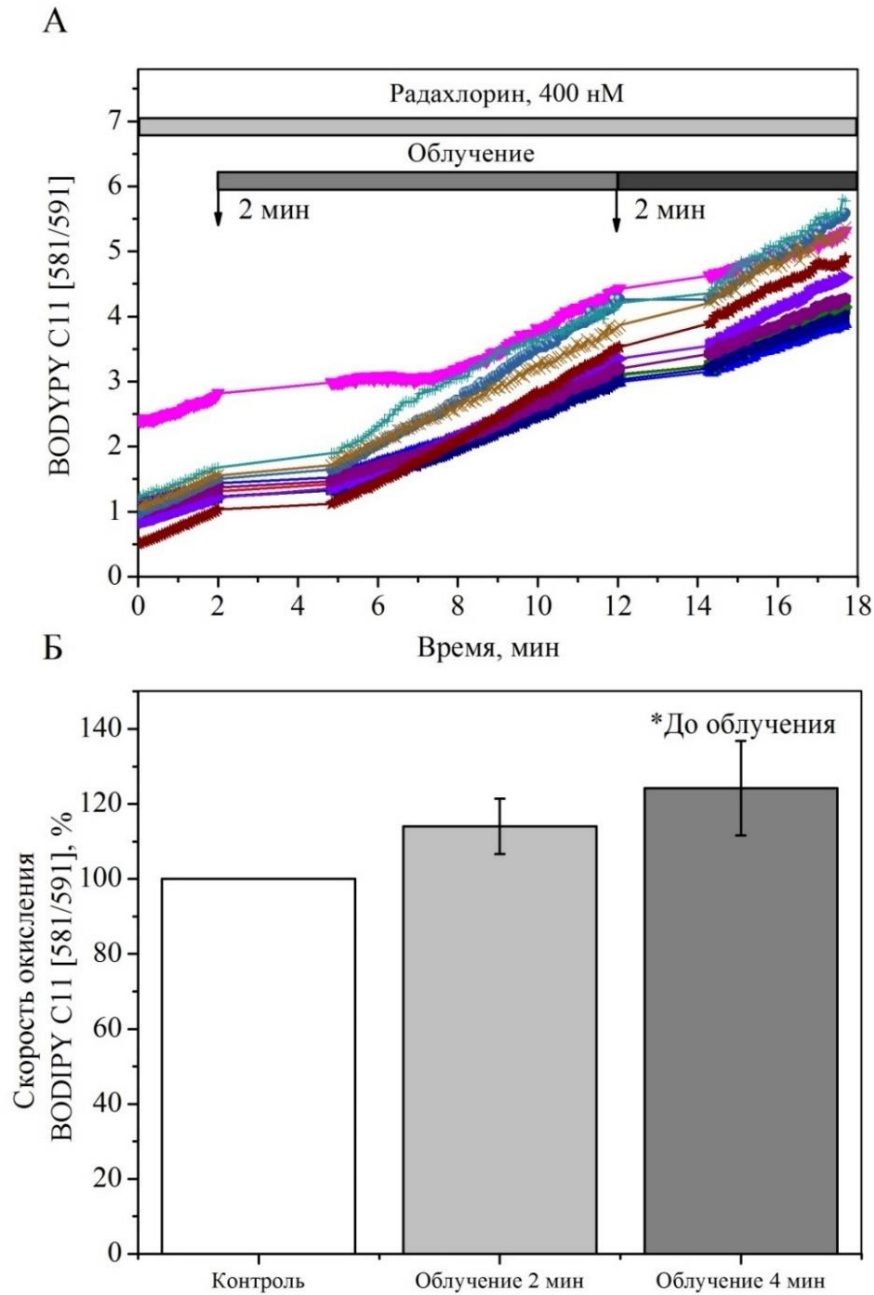


Рисунок 3.7 – Изменение скорости перекисного окисления липидов при ФД воздействии радахлорина 400 нМ (облучение в течение 2 и 4 мин) на нейроны в первичной сокультуре коры мозга крысы, полученные по измерению отношения интенсивностей флуоресценции окисленной и восстановленной форм C11

BODIPY [581/591] ($\lambda_{\text{возб}} = 488$ нм и $\lambda_{\text{возб}} = 561$ нм)

На графике А представлены репрезентативные кривые, отражающие изменения в отдельных клетках. Вдоль оси абсцисс отложено время регистрации интенсивности флуоресценции зонда в программе Andor IQ, во время облучения регистрация прерывалась для избежания засветки камеры. На графике Б за 100% взята скорость перекисного окисления липидов до воздействия, данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка. * - $p < 0,05$

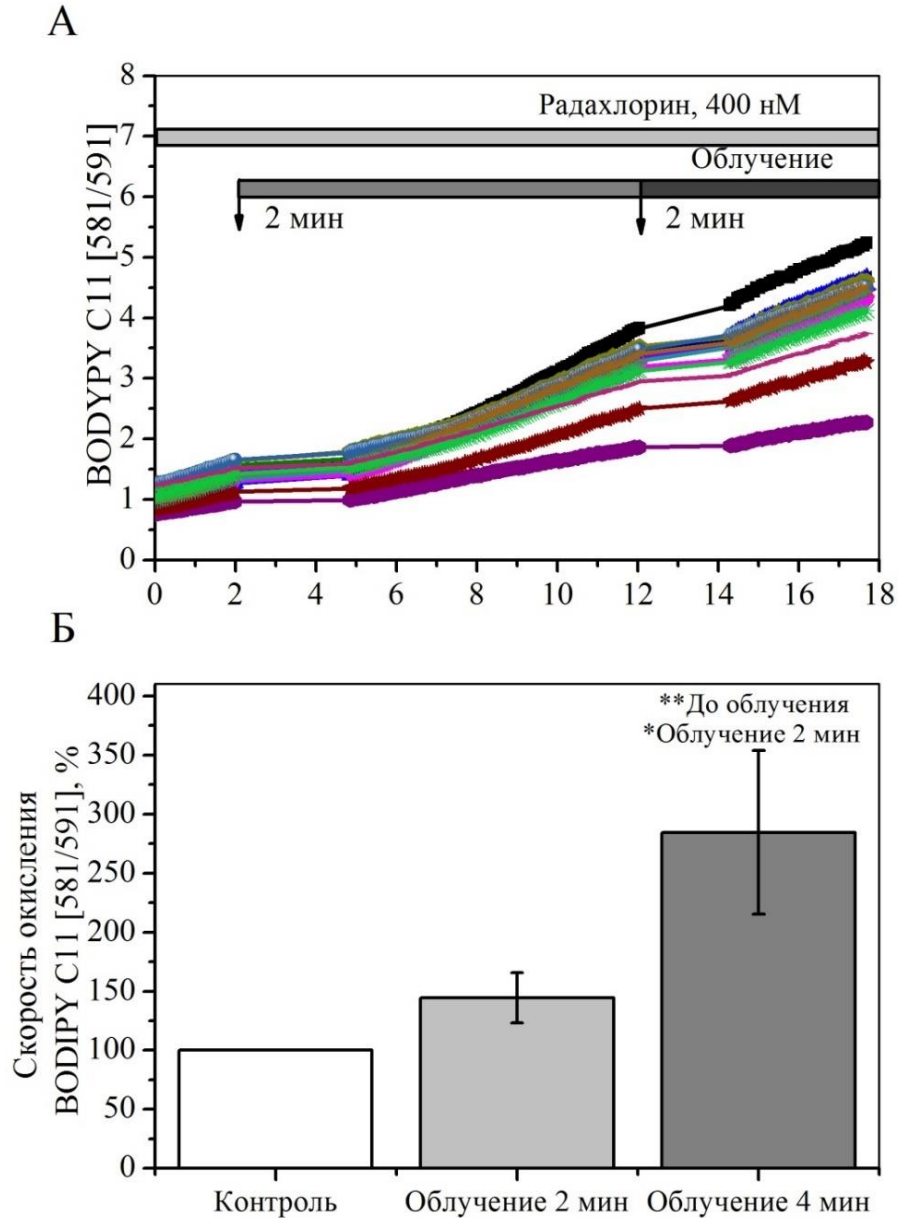


Рисунок 3.8 – Изменение скорости перекисного окисления липидов при ФД воздействии радахлорина 400 нМ (облучение в течение 2 и 4 мин) на астроциты в первичной сокультуре коры мозга крысы, полученные по измерению отношения интенсивностей флуоресценции окисленной и восстановленной форм C11 BODIPY [581/591] ($\lambda_{\text{возб}} = 488$ нМ и $\lambda_{\text{возб}} = 561$ нМ)

На графике А представлены репрезентативные кривые, отражающие изменения в отдельных клетках. Вдоль оси абсцисс отложено время регистрации интенсивности флуоресценции зонда в программе Andor IQ, во время облучения регистрация прерывалась для избежания засветки камеры. На графике Б за 100% взята скорость перекисного окисления липидов до воздействия, данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка. * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$

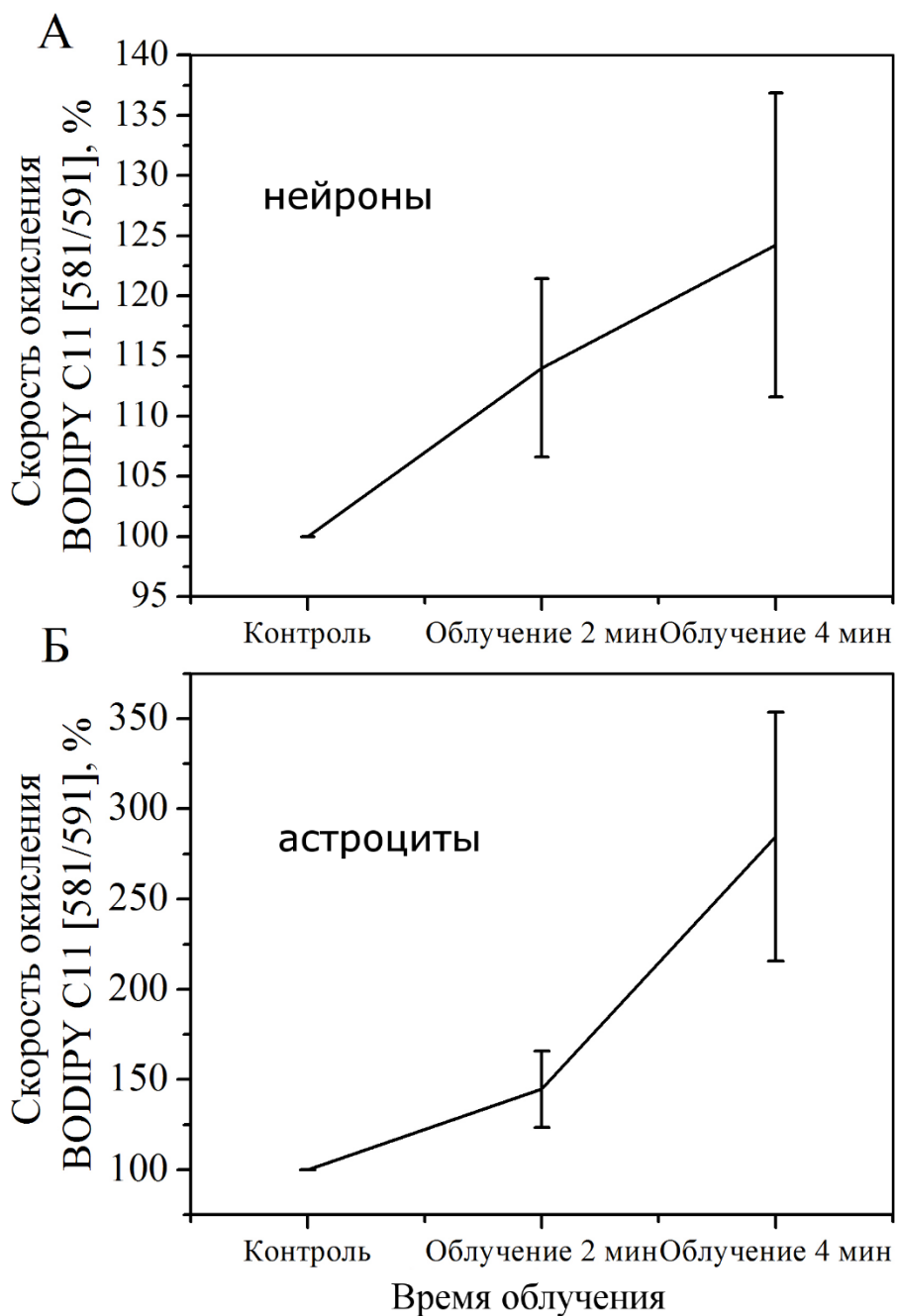


Рисунок 3.9 – Зависимости скорости перекисного окисления липидов от дозы при ФД воздействии радахлорина 400 нМ (доза варьировалась путём изменения времени облучения, составлявшего 2 мин и 4 мин) на нейроны (А) и астроциты (Б) в первичной сокультуре коры мозга крысы, полученные по измерению отношения интенсивностей флуоресценции окисленной и восстановленной форм C11 VODIPY [581/591] ($\lambda_{\text{возб}} = 488$ нм и $\lambda_{\text{возб}} = 561$ нм)

Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка

прижизненно оценить активность митохондрий по процессам восстановления НАДН в цикле трикарбоновых кислот и окисления НАДН в комплексе I [202]. Поэтому для оценки функционального состояния митохондрий в данной работе исследовалась аутофлуоресценция НАД(Ф)Н при воздействии радехлорина (200 нМ) в темновых условиях и при облучении.

Для того, чтобы отделить аутофлуоресценцию митохондриального НАДН от флуоресценции цитозольного НАДН и НАДФН, сначала перенос электронов по ЦЭТ максимизировался с помощью разобщителя окислительного фосфорилирования FCCP (1 мкМ), а затем блокировался при ингибировании ЦЭТ с помощью NaCN (1 мМ). Эти воздействия не влияют на редокс состояние цитозольного НАД⁺/НАДН и НАДФ⁺/НАДФН. Редокс состояние митохондриального НАД⁺/НАДН, которое определяется в процентах от разности между уровнями аутофлуоресценции НАД(Ф)Н при максимизации и ингибировании переноса электронов, отражает баланс между активностью ЦЭТ и скоростью восстановления НАД⁺ в цикле Кребса. В темноте в присутствии радехлорина наблюдалась тенденция к увеличению аутофлуоресценции НАД(Ф)Н и редокс состояния НАДН (для оценки изменений рассчитывалась скорость изменения аутофлуоресценции НАД(Ф)Н, т.е. тангенс наклона кривых, до и после воздействия), что может свидетельствовать об ингибировании переноса электронов в ЦЭТ и клеточного дыхания (n = 51, рисунки 3.10, 3.11). При ФД воздействии радехлорина аутофлуоресценцию НАД(Ф)Н было трудно измерять вследствие частого открепления клеток от предметного стекла при добавлении FCCP и NaCN. При этом после облучения клеток (n = 42) в течение 1 мин аутофлуоресценция НАД(Ф)Н, а соответственно и редокс состояние НАДН, достоверно снижались по сравнению с темновыми условиями (p < 0,01, repeated measures ANOVA) и после последующего облучения клеток в течение 3 мин (n = 42) это снижение сохранялось в виде тенденции (рисунки 3.11, 3.12). Кроме того, уровень аутофлуоресценции НАД(Ф)Н после добавления NaCN для ингибирования дыхания и максимизации уровня митохондриального НАДН значительно ниже, чем базальный уровень (рисунок 3.12), что может

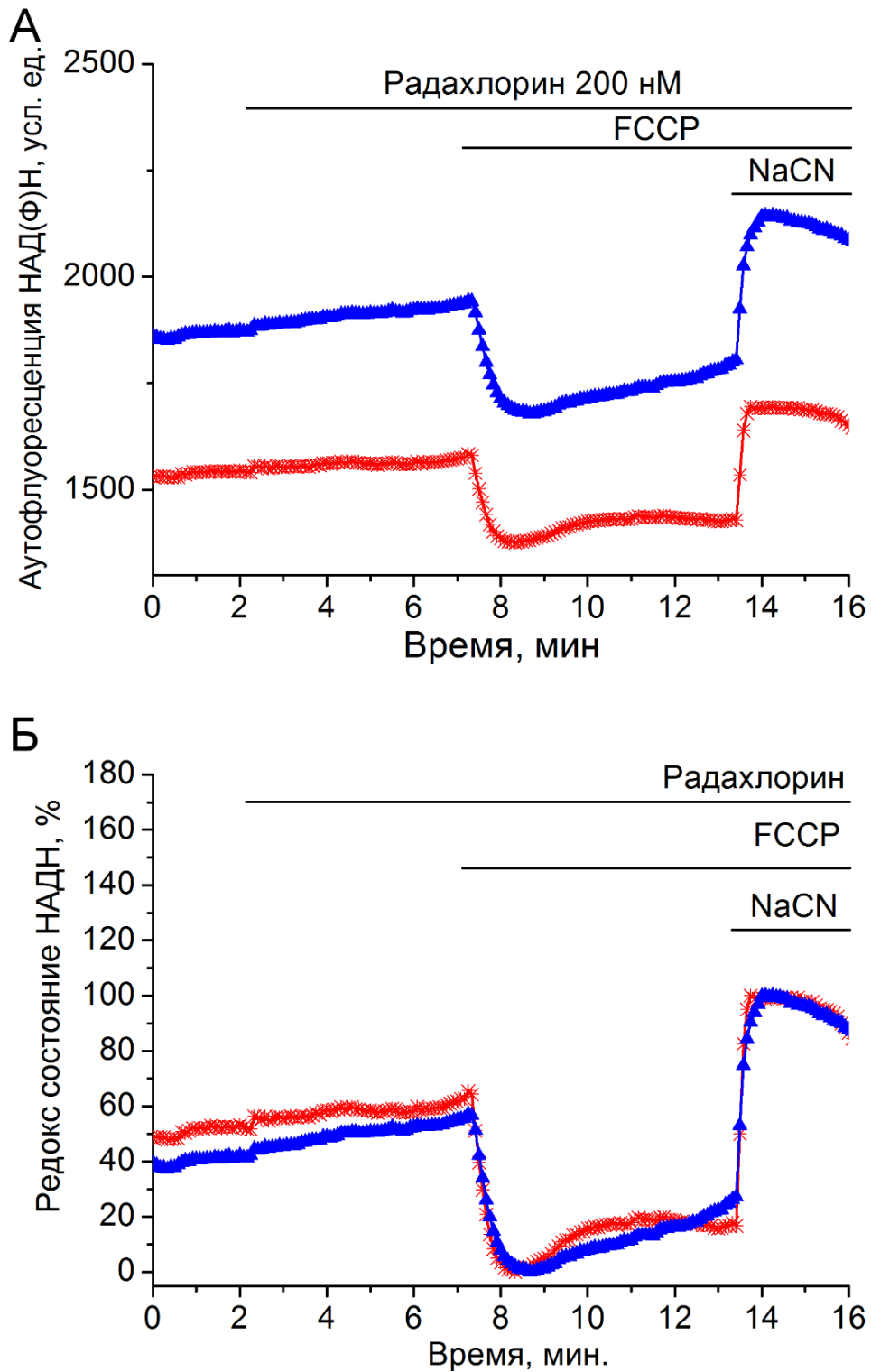


Рисунок 3.10 – Аутофлуоресценция НАД(Ф)Н (А) и редокс состояние НАДН (Б) при воздействии радахлорина 200 нМ (в темновых условиях) на клетки в первичной сокультуре нейронов и астроцитов коры мозга крысы

На графиках представлены репрезентативные кривые, отражающие изменения в отдельных клетках. В конце эксперимента для максимальной активации митохондриального дыхания и его ингибирования добавлялись FCCP (1 мкМ) и NaCN (1 мМ), соответственно

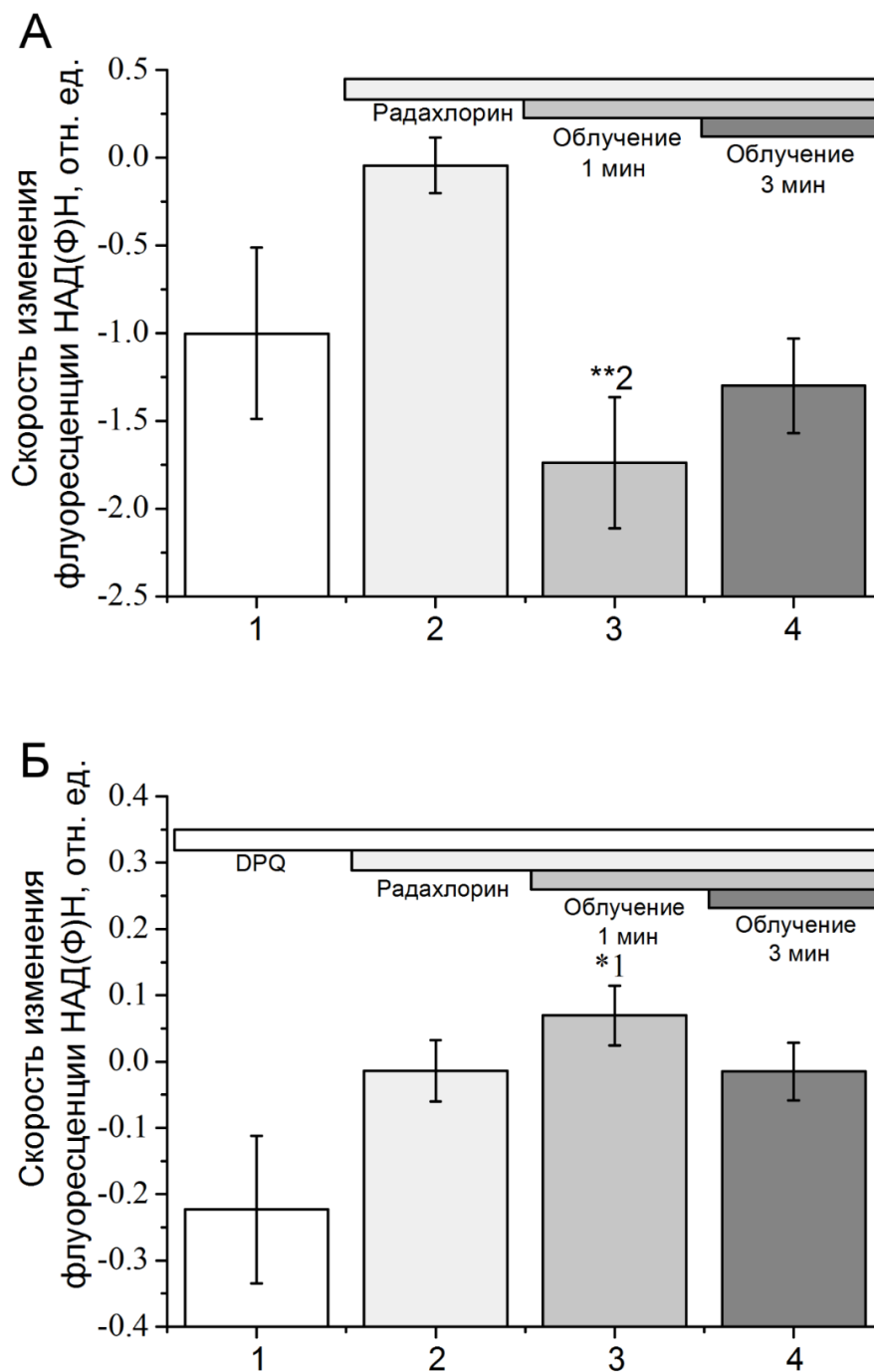


Рисунок 3.11 – Скорость изменения аутофлуоресценции НАД(Ф)Н при воздействии радахлорина 200 нМ (в темновых условиях и при облучении в течение 1 мин и 3 мин) на клетки в первичной сокультуре нейронов и астроцитов коры мозга крысы без (А) и в присутствии (Б) ингибитора PARP DPQ (20 мкМ)

* - $p < 0,05$; *repeated measures ANOVA*. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка

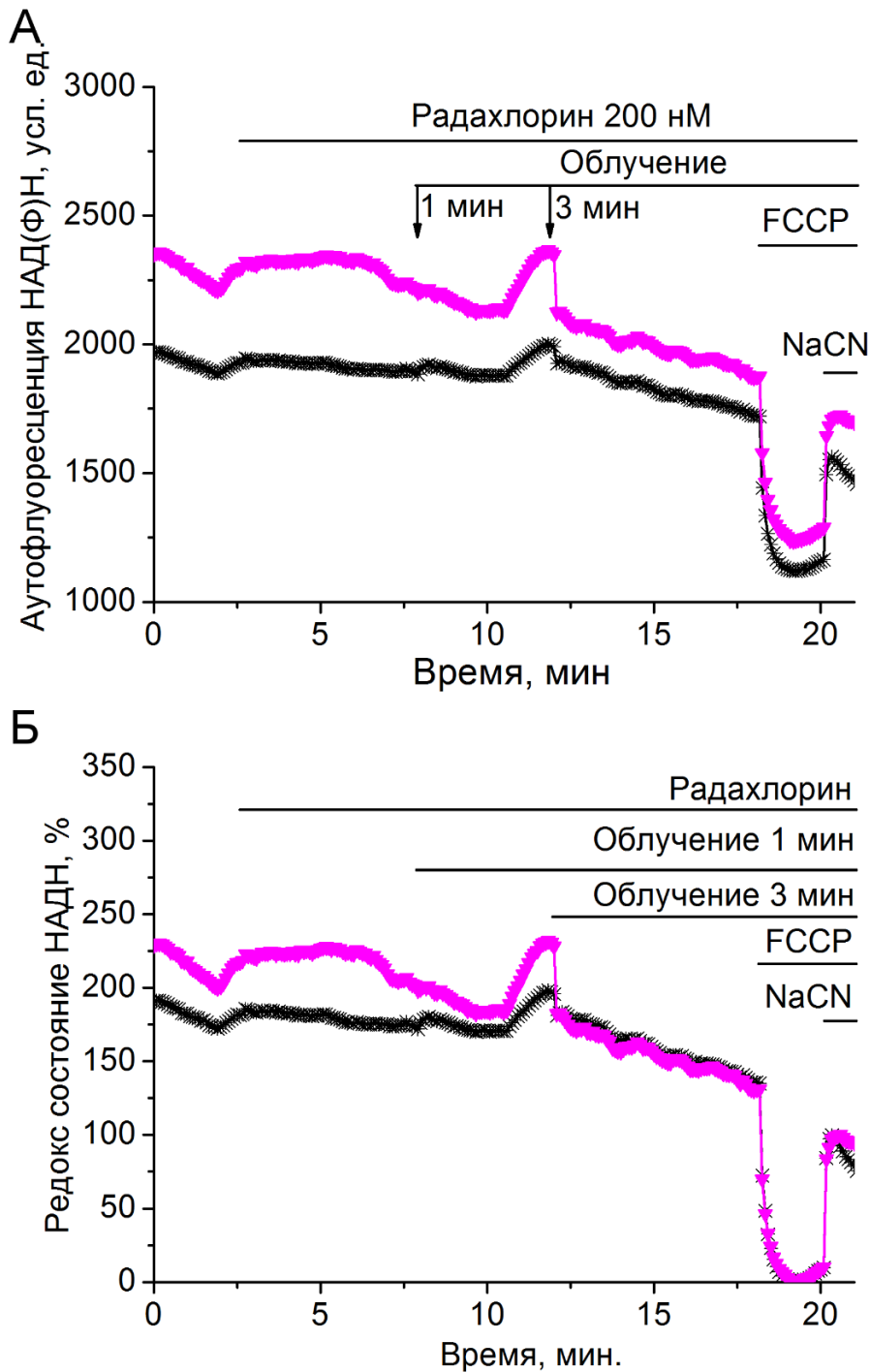


Рисунок 3.12 – Аутофлуоресценция НАД(Ф)Н (А) и редокс состояние НАДН (Б) при воздействии радахлорина 200 нМ (в темновых условиях и при облучении в течение 1 и 3 мин) на клетки в первичной сокультуре нейронов и астроцитов коры мозга крысы

На графиках представлены репрезентативные кривые, отражающие изменения в отдельных клетках. Вдоль осей абсцисс отложено время регистрации интенсивности флуоресценции зонда в программе Andor IQ, во время облучения регистрация прерывалась для избежания засветки камеры. В конце эксперимента для максимальной активации митохондриального дыхания и его ингибирования добавлялись FCCP (1 мкМ) и NaCN (1 мМ), соответственно

свидетельствовать либо об ингибировании продукции НАДН, либо о сокращении митохондриального депо НАДН (рисунок 3.13). Интересно, что данный эффект и снижение аутофлуоресценции НАД(Ф)Н при ФД воздействию радахлорина блокировались в присутствии ингибитора PARP DPQ (20 мкМ), что может свидетельствовать о снижении митохондриального депо НАДН вследствие уменьшения его производства из-за ограниченного количества НАД⁺ (n = 6, рисунок 3.14).

По измерению аутофлуоресценции НАД(Ф)Н при воздействии радахлорина (200 нМ) в различных условиях были изучены также скорость образования митохондриального НАДН, объём митохондриального НАДН депо и уровень НАДФН в клетках (n = 57) первичной сокультуры нейронов и астроцитов коры мозга крысы (рисунки 3.13).

Исследование митохондриального депо НАДН по разнице аутофлуоресценции НАД(Ф)Н при последовательном добавлении FCCP (1 мкМ) и NaCN (1 мМ) подтвердило, что облучение в присутствии радахлорина достоверно ($p < 0,01$, one-way ANOVA) снижает митохондриальное НАДН депо в клетках первичной культуры нейронов и астроцитов (n = 42) по сравнению с воздействием радахлорина в темновых условиях (НАДН депо в темновых условиях 450 ± 70 усл. ед.; НАДН депо при фотодинамическом воздействии 190 ± 20 усл. ед.; рисунок 3.13Б). Однако данное снижение не ингибируется в присутствии DPQ (20 мкМ) (НАДН депо = 82 ± 5 усл. ед., рисунок 3.13Б). Возможно, это связано с изначально более низким митохондриальным депо НАДН в клетках, которые инкубировались с DPQ (20 мкМ).

Ингибирование клеточного дыхания при помощи NaCN (1 мМ) после добавления разобщителя FCCP (1 мкМ) позволяет оценить скорость образования НАДН в цикле трикарбоновых кислот по скорости увеличения аутофлуоресценции НАД(Ф)Н. ФД воздействие радахлорина в присутствии DPQ и без достоверно не влияло на этот показатель по сравнению с воздействием радахлорина в темновых условиях, хотя при облучении без DPQ наблюдалась тенденция к увеличению скорости образования НАДН в ЦТК по сравнению с

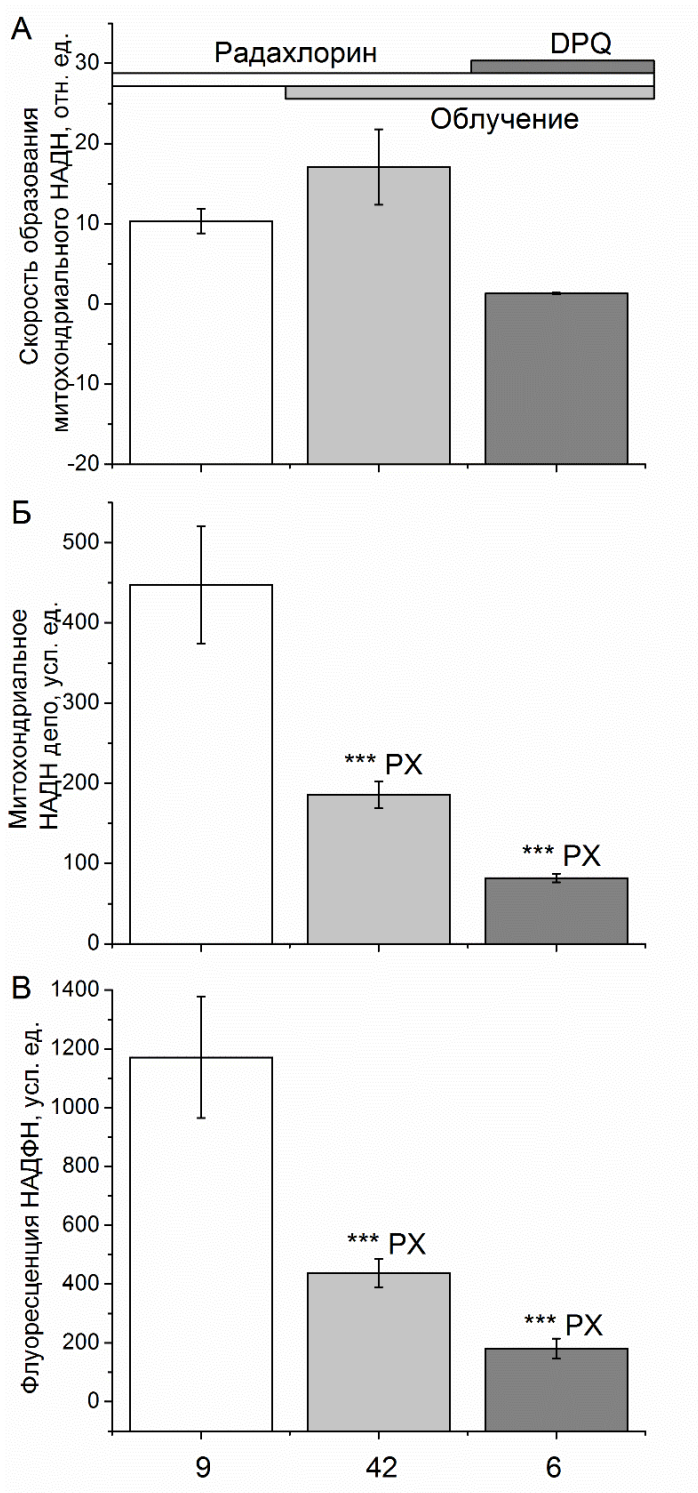


Рисунок 3.13 – Скорость образования митохондриального НАДН (А), митохондриальное НАДН депо (Б) и уровень НАДФН (В) при воздействии радахлорина 200 нМ (в темновых условиях и при облучении) без и в присутствии ингибитора PARP DPQ (20 мкМ) на клетки в первичной сокультуре нейронов и астроцитов коры мозга крысы

PX – радахлорин. *** - $p < 0,001$, one-way ANOVA. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка

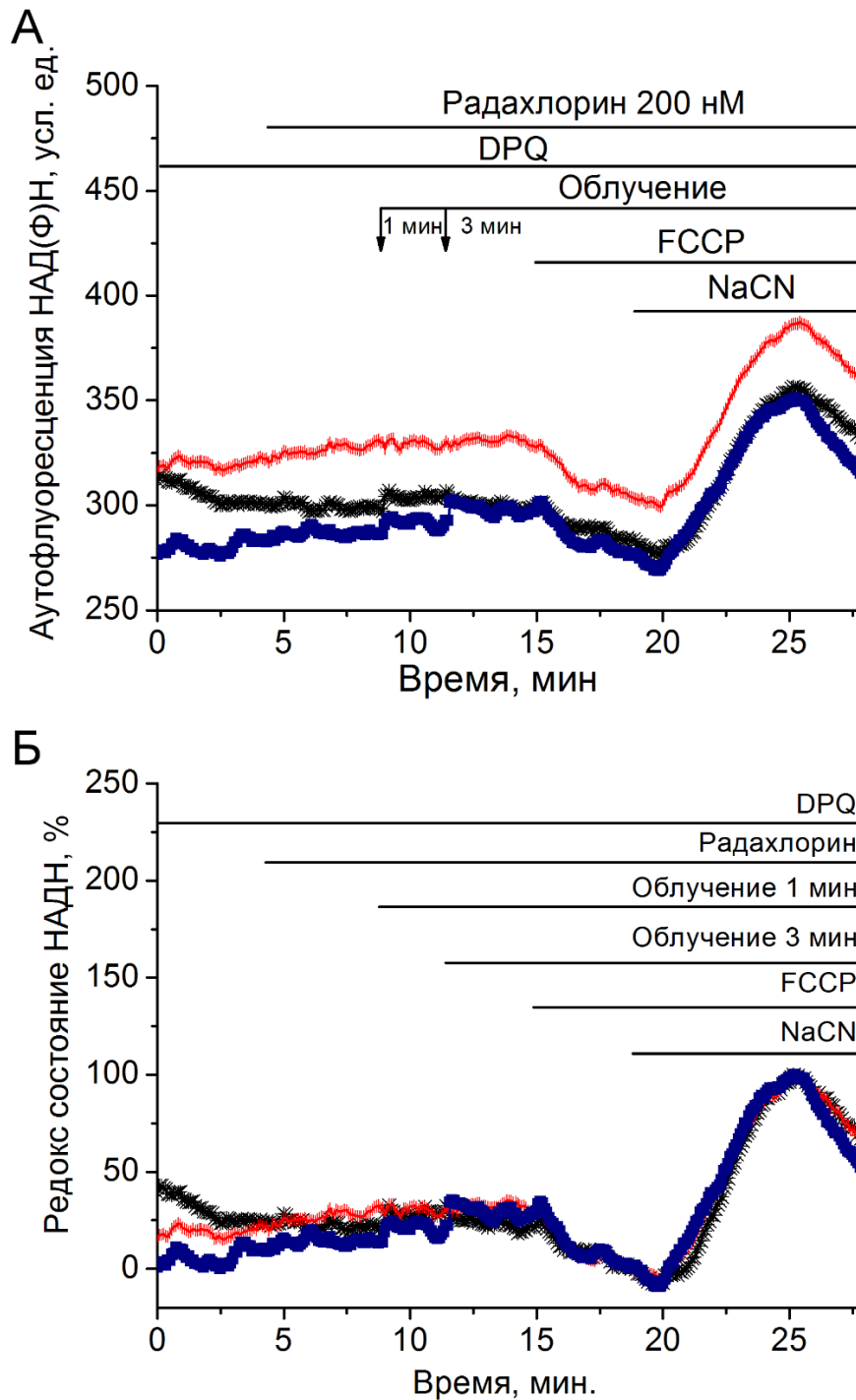


Рисунок 3.14 – Аутофлуоресценция НАД(Ф)Н (А) и редокс состояние НАДН (Б) при воздействии радахлорина 200 нМ (в темновых условиях и при облучении в течение 1 и 3 мин) на клетки в первичной сокультуре нейронов и астроцитов коры мозга крысы в присутствии ингибитора PARP DPQ (20 мкМ)

На графиках представлены репрезентативные кривые, отражающие изменения в отдельных клетках. Вдоль осей абсцисс отложено время регистрации интенсивности флуоресценции зонда в программе Andor IQ, во время облучения регистрация прерывалась для избежания засветки камеры. В конце эксперимента для максимальной активации митохондриального дыхания и его ингибирования добавлялись FCCP (1 мкМ) и NaCN (1 мМ), соответственно

воздействием радахлорина в темновых условиях, а при облучении в присутствии DPQ эта скорость недостоверно снижалась (one-way ANOVA, рисунок 3.13А). Таким образом, по-видимому, наблюдаемое снижение аутофлуоресценции НАД(Ф)Н не вызвано снижением активности ферментов ЦТК.

При разобщении дыхания с помощью FCCP (1 мкМ) аутофлуоресценция митохондриального НАДН постепенно снижается до нуля и наблюдаемый при этом остаточный флуоресцентный сигнал соответствует флуоресценции НАДФН и немитохондриального НАДН. НАДФН образуется в результате альтернативного пути окисления глюкозы, пентозофосфатного пути, и участвует в защите клеток от окислительного стресса, способствуя восстановлению глутатиона. ФД воздействие радахлорина в присутствии DPQ (20 мкМ) и без достоверно снижало флуоресценцию НАДФН и немитохондриального НАДН по сравнению с воздействием радахлорина в темноте, что свидетельствует о развитии фотоиндуцируемого окислительного стресса в клетках ($p < 0,001$, one-way ANOVA, рисунок 3.13В).

Таким образом, ФД воздействие изменяет митохондриальный метаболизм. Одним из важных показателей митохондриального метаболизма является митохондриальный мембранный потенциал ($\Delta\Psi_m$). В связи с этим, в работе изучалось изменение $\Delta\Psi_m$ при воздействии радахлорина в темновых условиях и при облучении.

3.6 Исследование изменения митохондриального потенциала клеток при ФД воздействии радахлорина с помощью родамина 123

Для исследования влияния радахлорина (200 нМ) в темновых условиях и при облучении на митохондриальный потенциал ($\Delta\Psi_m$) клеток первичной сокультуры нейронов и астроцитов мозга крысы в работе использовалась прижизненная регистрация флуоресценции с помощью зонда родамин 123 в режиме гашения флуоресценции, когда при падении $\Delta\Psi_m$ интенсивность флуоресценции возрастает (рисунок 3.15). В темновых условиях радахлорин

приводил к гиперполяризации митохондриальной мембраны (рисунок 3.15А). Полученный результат и тенденция к увеличению уровня НАД(Ф)Н в клетках при воздействии радахлорина в темноте могут говорить о том, что ФС сам по себе воздействует на митохондрии, замедляя дыхание и ингибируя окислительное фосфорилирование.

ФД воздействие вызывало митохондриальную деполяризацию в нейронах и астроцитах первичной сокультуры коры мозга крысы, которая перед добавлением разобщителя окислительного фосфорилирования FCCP (1 мкМ) составляла $20 \pm 4\%$ ($n = 8$, рисунок 3.15). АФК представляют собой одну из главных причин открытия высокопроницаемой митохондриальной поры (mPTP), которое может вести к изменению митохондриального потенциала [207]. Ингибитор mPTP (CsA, 1 мкМ) ингибировал митохондриальную гиперполяризацию, наблюдающуюся при добавлении радахлорина в темновых условиях, но не снижал, а наоборот увеличивал митохондриальную деполяризацию, вызванную ФД воздействием радахлорина ($\Delta\Psi_m = 50 \pm 4$, $n = 8$; * - $p < 0,001$, t-test; рисунок 3.15Б, 3.15Г).

АФК могут вести к повреждению ДНК и стимулировать активацию механизмов репарации ДНК [208]. В связи с этим и результатами, полученными при изучении аутофлуоресценции НАД(Ф)Н, было исследовано изменение митохондриального потенциала в присутствии ингибитора фермента PARP, DQP (20 мкМ). Инкубация клеток с DQP (20 мкМ, 20 мин) значительно снижала митохондриальную деполяризацию, вызванную ФД воздействием радахлорина ($\Delta\Psi_m = 13 \pm 1$, $n = 14$; * - $p < 0,001$, t-test; рисунок 3.15В, 3.15Г).

Таким образом, изменения митохондриального потенциала при ФД воздействии согласуются с данными, полученными при измерении аутофлуоресценции НАД(Ф)Н, и свидетельствуют о фотоиндуцированной активации фермента PARP, который способствует снижению уровня НАДН, ингибированию дыхания и снижению уровня АТФ в клетке.

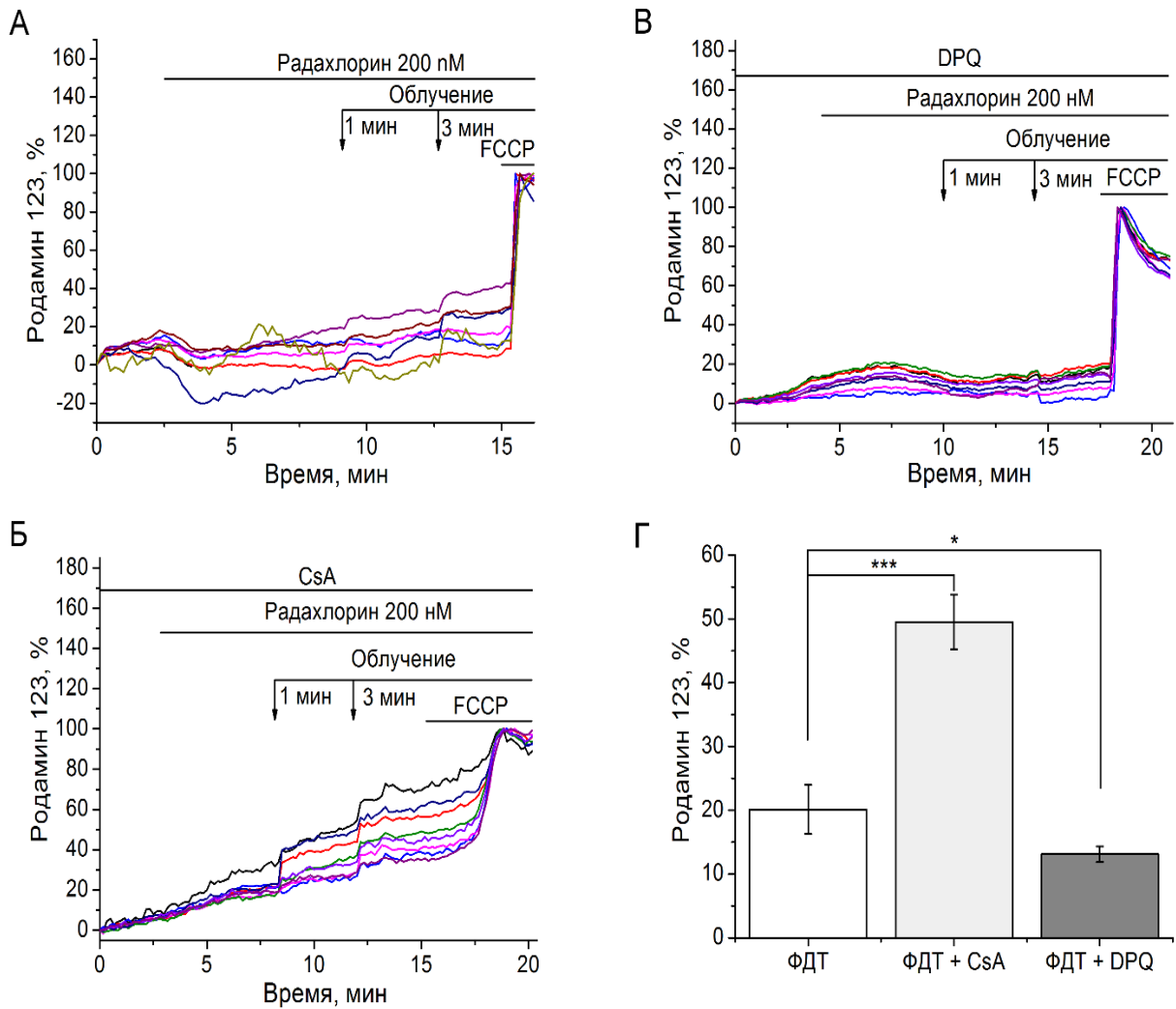


Рисунок 3.15 – ФД воздействие радахлорина 200 нМ (в темновых условиях и при облучении в течение 1 и 3 мин) на клетки в первичной сокультуре нейронов и астроцитов коры мозга крысы снижает митохондриальный мембранный потенциал ($\Delta\Psi_m$), измеренный по интенсивности флуоресценции родамина 123.

А, Радахлорин (200 нМ) в темновых условиях вызывает гиперполяризацию митохондрий, а при облучении ведёт к митохондриальной депольаризации. Б, CsA (1 мкМ) ингибирует эффект радахлорина в темновых условиях, но не при облучении. В, Ингибитор PARP, DPQ (20 мкМ), частично ингибирует митохондриальную депольаризацию, вызванную ФД воздействием радахлорина. Г, уровни митохондриальной депольаризации после ФД воздействия перед добавлением FCCP в % в присутствии ингибиторов CsA (n=8) и DPQ (n=14) и без (n=8). На графиках А-В представлены репрезентативные кривые, отражающие изменения в отдельных клетках. Вдоль осей абсцисс отложено время регистрации интенсивности флуоресценции зонда в программе Andor IQ, во время облучения регистрация прерывалась для избежания засветки камеры. Флуоресцентные сигналы нормировались добавлением FCCP (1 мкМ): за 0% принималась начальная интенсивность флуоресценции, за 100% - интенсивность после добавления FCCP. t-test, * - $p < 0,001$, *** - $p < 0,05$.

3.7 Влияние модуляторов NF- κ B, AP-1 и NIF-1 на выживаемость клеток при фотодинамическом воздействии фотосенса

Окислительный стресс, развивающийся в клетке при ФД воздействии, ведёт к повреждению клетки, реакция на которое регулируется сложной системой сигнальных путей. В результате процессов, запускающихся в ответ на ФД воздействие, клетка либо выживает, либо умирает. Важную роль в регуляции выживаемости клеток при фотоиндуцируемом окислительном стрессе играют факторы транскрипции NF- κ B, AP-1 и NIF-1.

Гибель клеток происходит, в основном, путём некроза или апоптоза. Мы исследовали показатели клеточной гибели нейронов и глиальных клеток механорецептора речного рака, продолжительность импульсной активности, некроз нейронов и некроз и апоптоз глиальных клеток, при ФД воздействии фотосенса (75 нМ) без и в присутствии модуляторов NF- κ B, AP-1 и NIF-1. Каждая серия экспериментов состояла из 4 групп опытов. В первую группу входили контрольные препараты без воздействия, во вторую – препараты с добавлением одного из модуляторов NF- κ B, AP-1 и NIF-1 в темновых условиях, в третью – препараты с ФД воздействием без добавления модуляторов, и в четвёртую – препараты с ФД воздействием в присутствии одного из модуляторов NF- κ B, AP-1 и NIF-1.

В нашей лаборатории показано, что облучение без фотосенсибилизатора и фотосенсибилизатор в темновых условиях не влияют на выживаемость нейронов и глиальных клеток, тогда как ФД воздействие фотосенса достоверно снижает длительность импульсной активности, увеличивает некроз нейронов и глиальных клеток, а также апоптоз глиальных клеток [209]. При этом апоптоз механорецепторных нейронов не наблюдался нами ни при каких условиях.

Для исследования роли фактора транскрипции NF- κ B в выживаемости нейронов и глиальных клеток при ФД воздействии, мы активировали NF- κ B с помощью бетулиновой кислоты (5 мкМ) и ингибировали с помощью партенолида (20 мкМ) и CAPE (30 мкМ) (рисунок 3.16).

Активация NF-κB с помощью бетулиновой кислоты (5 мкМ) не влияла на продолжительность импульсной активности при облучении и в темновых условиях, при этом она также не изменяла фотоиндуцированный некроз нейронов и глиальных клеток в темноте, но вела к увеличению и снижению некроза нейронов и глиальных клеток, соответственно, при облучении ($p < 0.05$, one-way ANOVA, рисунок 3.16А, 3.16Б, 3.16Г, соответственно). Как в темноте, так и при ФД воздействии добавление бетулиновой кислоты достоверно увеличивало апоптоз глиальных клеток ($p < 0.05$, one-way ANOVA, рисунок 3.16В). Таким образом, активация NF-κB с помощью бетулиновой кислоты способствовала фотоиндуцируемому некрозу нейронов и апоптозу глиальных клеток в темноте и при облучении, но при этом защищала глиальные клетки от некроза при ФД воздействии.

Ингибирование NF-κB с помощью CAPE (30 мкМ) не влияло на показатели выживаемости нейронов и глиальных клеток в темновых условиях (рисунок 3.16). Однако при облучении в присутствии фотосенса (75 нМ) оно вело к увеличению продолжительности импульсации и снижению некроза нейронов, что согласуется с данными полученными при добавлении бетулиновой кислоты и свидетельствует о пронекротическом действии NF-κB на нейроны при ФД воздействии ($p < 0.05$, one-way ANOVA, рисунок 3.16А, 3.16Б). Добавление CAPE не влияло на некроз глиальных клеток при облучении в присутствии фотосенса, но снижало апоптоз глиальных клеток, что также согласуется с действием бетулиновой кислоты ($p < 0.05$, one-way ANOVA, рисунок 3.16В, 3.16Г). Таким образом, ингибирование NF-κB с помощью CAPE оказывало защитное действие на нейроны механорецептора речного рака и снижало апоптоз глиальных клеток при ФД воздействии.

Ингибирование NF-κB с помощью партенолида (20 мкМ) не влияло на показатели выживаемости нейронов и глиальных клеток в темновых условиях (рисунок 3.16). Оно также не влияло на фотоиндуцируемый апоптоз глиальных клеток и продолжительность импульсации при ФД воздействии, однако защищало нейроны механорецептора от некроза и оказывало пронекротическое действие на глиальные клетки ($p < 0.05$, one-way ANOVA, рисунок 3.16). Действие

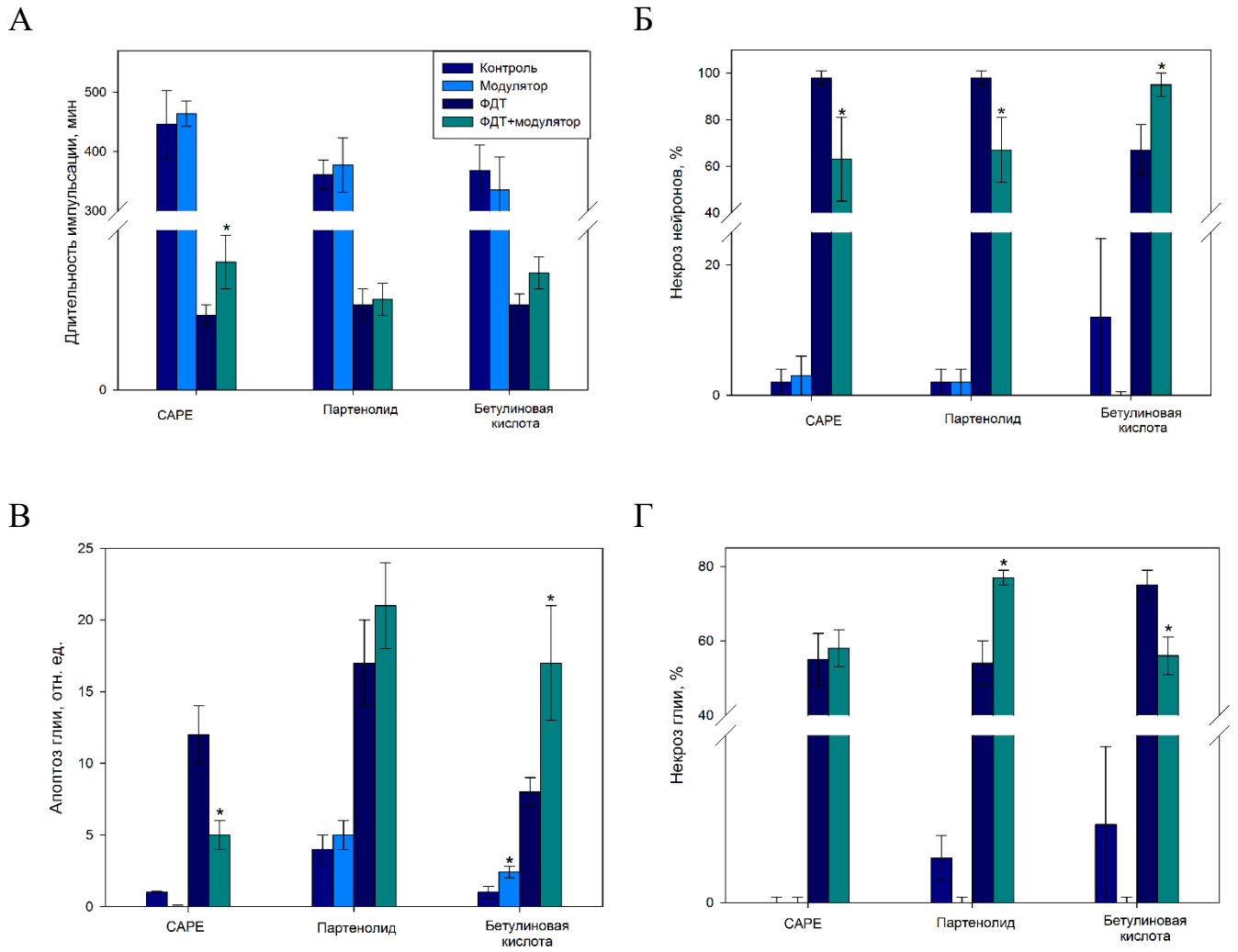


Рисунок 3.16 – Влияние активатора NF-κB бетулиновой кислоты (5 мкМ) и ингибиторов NF-κB, партенолида (20 мкМ) и CAPE (30 мкМ), на длительность импульсации (А), некроз нейронов (Б), уровень апоптоза (В) и некроза (Г) глиальных клеток механорецептора речного рака в темновых условиях при ФД воздействии фотосенса (75 нМ)

* – $p < 0,05$, one-way ANOVA, отличия указывались между группами «Модулятор» и «Контроль» и между группами «ФДТ + модулятор» и «ФДТ»

партенолида на показатели выживаемости нейронов и глиальных клеток механорецептора, в целом, согласовывалось с действием других модуляторов NF-κB, CAPE и партенолида. Однако бетулиновая кислота не влияла на продолжительность импульсации при ФДТ, CAPE не оказывало действие на фотоиндуцированный некроз глиальных клеток, а партенолид также не влиял на продолжительность импульсации и апоптоз глиальных клеток. Наблюдаемые различия в действиях ингибиторов могут быть обусловлены различием механизмов активации и ингибирования NF-κB. Различия в действии NF-κB на некроз нейронов и глиальных клеток может быть связан с различием соответствующих сигнальных путей в данных типах клеток.

В целом, можно заключить, что NF-κB активируется в нейронах и глиальных клетках в ответ на фотоиндуцируемый окислительный стресс и способствует некрозу нейронов и апоптозу глиальных клеток, но при этом защищает глию от фотоиндуцируемого некроза.

Для изучения роли фактора транскрипции AP-1 в выживаемости нейронов и глиальных клеток при ФД воздействии, мы ингибировали AP-1 с помощью SR11302 (10 мкМ) (рисунок 3.17).

Ингибирование AP-1 в темновых условиях вело к тенденции к увеличению некроза нейронов, достоверно снижало длительность импульсации ($p < 0.05$, one-way ANOVA) и увеличивало некроз ($p < 0.01$, one-way ANOVA) и апоптоз ($p < 0.05$, one-way ANOVA) глиальных клеток, что свидетельствует о токсичности SR11302 (10 мкМ) для клеток механорецептора речного рака (рисунок 3.17). Однако при этом при ФД воздействии фотосенса SR11302 (10 мкМ) достоверно снижал фотоиндуцируемый апоптоз глиальных клеток и не влиял на другие показатели выживаемости клеток механорецептора речного рака, что свидетельствует о проапоптотическом действии AP-1 при фотоиндуцируемом окислительном стрессе в глиальных клетках ($p < 0.05$, one-way ANOVA; рисунок 3.17). Таким образом, можно заключить, что AP-1 активируется в глиальных клетках при ФД воздействии и так же, как и NF-κB, способствует их фотоиндуцируемому апоптозу.

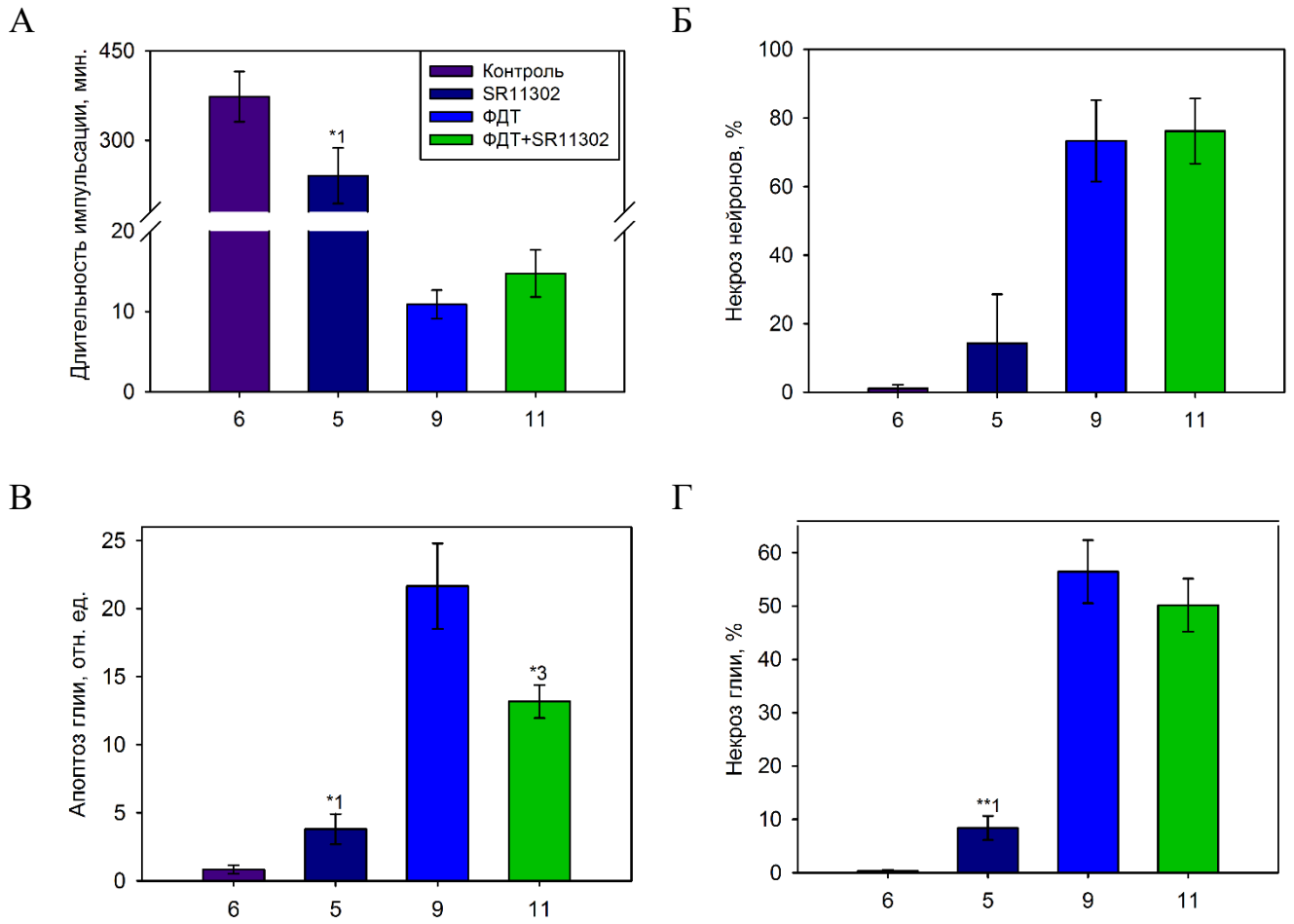


Рисунок 3.17 – Влияние ингибитора AP-1 SR11302 (10 мкМ) на длительность импульсации (А), некроз нейронов (Б), уровень апоптоза (В) и некроза (Г) глиальных клеток механорецептора речного рака в темновых условиях при ФД воздействии фотосенса (75 нМ)

*Под столбцами указано количество исследованных препаратов в соответствующих группах опытов. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, one-way ANOVA, отличия указывались между группами «SR11302» и «Контроль» (1) и между группами «ФДТ + SR11302» и «ФДТ» (3)*

Для изучения роли фактора транскрипции HIF-1 в выживаемости нейронов и глиальных клеток при ФД воздействии, мы активировали HIF-1 с помощью DMOG (1 мМ) и ингибировали его с помощью KG-548 (53 мкМ) и FM19G11 (3,7 мкМ) (рисунок 3.18).

Активация HIF-1 с помощью DMOG (1 мМ) не влияла на показатели выживаемости нейронов и глиальных клеток в темновых условиях и на длительность импульсации и фотоиндуцируемый некроз нейронов при ФД воздействии (рисунок 3.18). Однако добавление DMOG (1 мМ) достоверно снижало фотоиндуцируемый апоптоз ($p < 0.05$, one-way ANOVA) и некроз ($p < 0.001$, one-way ANOVA) глиальных клеток, что свидетельствует об участии HIF-1 в защите глии при ФД воздействии (рисунок 3.18В, 3.18Г).

Ингибирование HIF-1 в темновых условиях с помощью FM19G11 (3,7 мкМ) и KG-548 (53 мкМ) достоверно увеличивало некроз ($p < 0.05$, one-way ANOVA) глиальных клеток, но не влияло на другие показатели гибели клеток механорецептора речного рака, что свидетельствует о токсичности FM19G11 (3,7 мкМ) для глиальных клеток механорецептора речного рака (рисунок 3.18). При ФД воздействии фотосенса (75 нМ) ингибиторы HIF-1, FM19G11 (3,7 мкМ) и KG-548 (53 мкМ), не влияли на длительность импульсации и некроз нейронов и глиальных клеток, но достоверно снижали фотоиндуцируемый апоптоз глиальных клеток ($p < 0.01$, one-way ANOVA, рисунок 3.18).

Таким образом, нельзя сделать однозначного вывода об участии фактора транскрипции HIF-1 в гибели нейронов и глиальных клеток механорецептора речного рака при ФД воздействии фотосенса (75 нМ). Его активатор DMOG (1 мМ) защищал глиальные клетки от фотоиндуцируемой гибели, тогда как его ингибиторы, FM19G11 (3,7 мкМ) и KG-548 (53 мкМ), также оказывали противоапоптотическое, но не противонекротическое действие на глию.

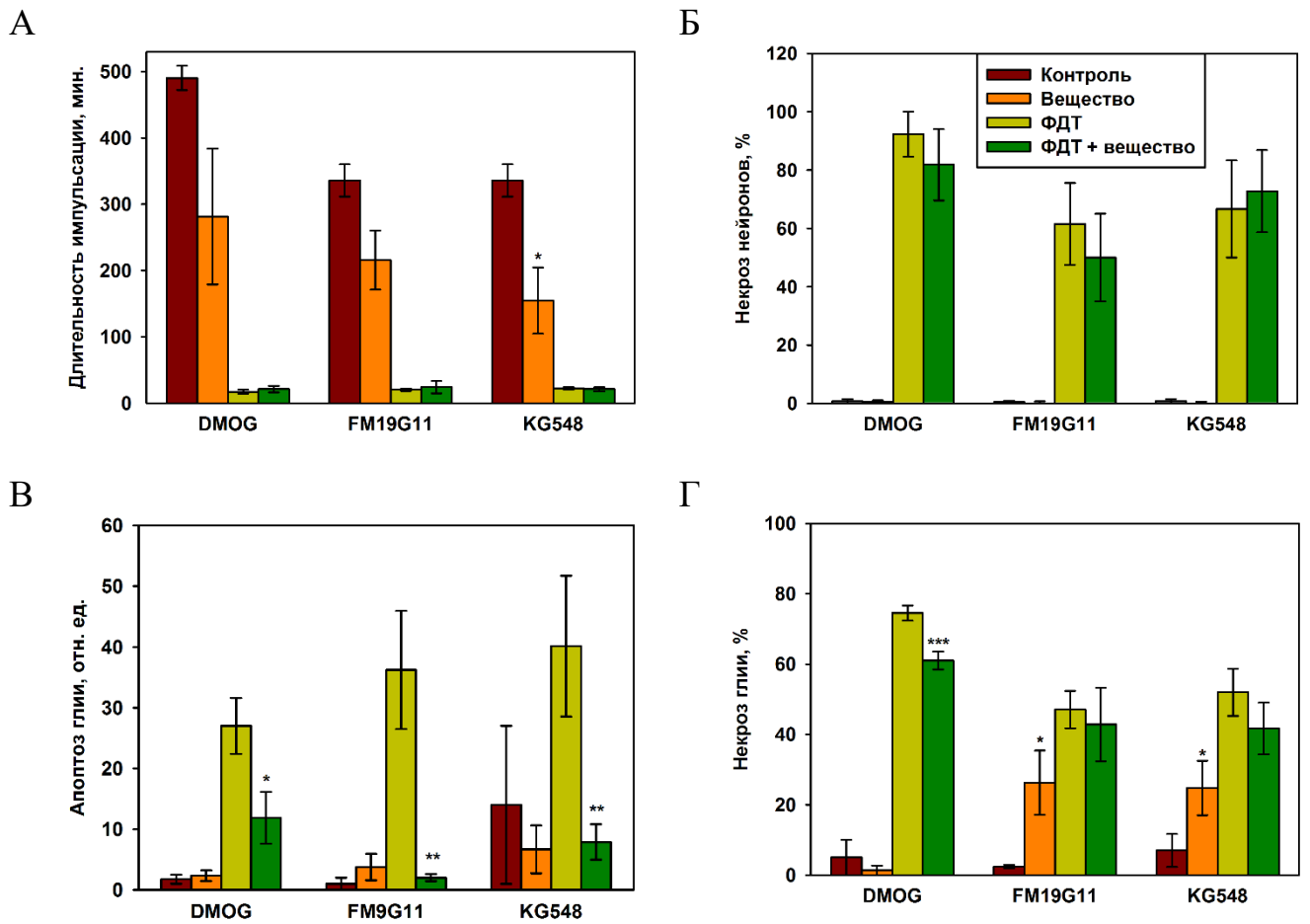


Рисунок 3.18 – Влияние активатора HIF-1 DMOG (1 мМ) и ингибиторов NF-κB, KG-548 (53 мкМ) и FM19G11 (3,7 мкМ), на длительность импульсации (А), некроз нейронов (Б), уровень апоптоза (В) и некроза (Г) глиальных клеток механорецептора речного рака в темновых условиях при ФД воздействии фотосенса (75 нМ)

* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$, one-way ANOVA, отличия указывались между группами «Модулятор» и «Контроль» и между группами «ФДТ + модулятор» и «ФДТ»

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

4.1 Фотоиндуцированный окислительный стресс в нейронах и глиальных клетках

Радахлорин представляет собой перспективный отечественный ФС хлоринового ряда, который частично одобрен в Южной Корее и проходит преклинические испытания в Европе [42, 43]. Было показано, что радахлорин хорошо накапливается в нервной ткани и эффективен для удаления опухолей мозга, однако механизмы, лежащие в основе гибели клеток при ФД воздействии радахлорина, изучены мало [45, 62, 210]. Мы исследовали окислительный стресс, развивающийся в нейронах и астроцитах первичной сокультуры коры мозга крысы при ФД воздействии радахлорина, по показателям скорости генерации супероксид-аниона и перекисного окисления липидов и по уровню восстановленного глутатиона.

Считается, что центральную роль в ФД повреждении клеток играет синглетный кислород, т.е. фотореакция развивается по второму типу [145, 157]. Мы показали, что ФД воздействие радахлорина (200 нМ) на первичную сокультуру нейронов и астроцитов коры мозга крысы ведёт к повышению продукции АФК, а именно супероксид-аниона, которое коррелирует с появлением других фотоиндуцированных эффектов, таких как кальциевые осцилляции, ПОЛ, митохондриальная деполяризация и изменение уровня НАД(Ф)Н (рисунки 3.3, 3.4). Это свидетельствует о том, что в фотоповреждении нервных и глиальных клеток важную роль играет реакция первого типа. Это не согласуется с работой [211], в которой показано, что фотоповреждение раковых клеток толстого кишечника SW620 при ФД воздействии хлорина еб, главного компонента радахлорина, зависит от генерации синглетного кислорода и, соответственно, протекает в соответствии с реакцией второго типа. Наблюдаемое различие может быть связано, как с отличиями в природе ФС, так и с особенностями метаболизма нейронов и глии и клеток SW620. Также возможно, что наблюдаемое повышение генерации супероксид-аниона связано не с фотовозбуждением ФС, а с

фотоповреждением ферментов дыхательной цепи и последующим повышением утечки электронов, ведущей к образованию $\bullet\text{O}_2^-$.

Увеличение продукции АФК в клетке при ФД воздействии ведёт к окислительному стрессу, нарушению баланса между прооксидантами и компонентами системы антиоксидантной защиты. Ключевым компонентом антиоксидантной защиты клетки является глутатион. Он может как непосредственно взаимодействовать с АФК, так и участвовать в реакциях ферментативной антиоксидантной системы в качестве донора электронов, при этом глутатион переходит из восстановленной формы в окисленную. Уровень восстановленного глутатиона (GSH) является одним из показателей развития окислительного стресса в клетке: его снижение свидетельствует о преобладании прооксидантных процессов в клетке. Так, при ФД воздействии хлорина еб на клетки холангиокарциномы уровень GSH снижался и коррелировал с выживаемостью клеток [212]. Однако ФД воздействие радахлорина (200 нМ) не изменяло уровень GSH в нейронах и повышало его в астроцитах в первичной сокультуре коры мозга крысы (рисунок 3.6). Это говорит о том, что использованный режим ФД воздействия (радахлорин 200 нМ, облучение 4 мин) не приводит за 4 часа к подавлению антиоксидантной защиты в клетке и преобладанию прооксидантных процессов. Однако при этом уровень НАДФН, который расходуется при восстановлении глутатиона глутатионредуктазой, снижался (рисунок 3.13), что может свидетельствовать о медленном развитии окислительного стресса в клетках и снижении уровня глутатиона на более отдаленных сроках.

Другой процесс, развивающийся при ФД воздействии, – перекисное окисление липидов. ФС хлоринового ряда эффективно вызывают ПОЛ в результате фотореакции второго типа [213]. ФД воздействие 400 нМ радахлорина достоверно увеличивало скорость ПОЛ только после 4 минут облучения как в нейронах, так и астроцитах (рисунки 3.7, 3.8). Интересно, что ПОЛ было более выражено в астроцитах и соответствовало увеличению уровня GSH, тогда как уровень GSH в нейронах не изменялся, а продукция супероксид-аниона

увеличивалась при более слабых воздействиях по сравнению с астроцитами (рисунки 3.5, 3.9). Возможно, наблюдаемые различия в реакциях нейронов и астроцитов связаны с лучшим функционированием антиоксидантной системы в первых.

4.2 Повреждение митохондрий при ФД воздействии радахлорина

Митохондрии являются важной мишенью окислительного стресса и ФД воздействия. Мы показали, что ФД воздействие радахлорина (200 нМ) ведёт к изменениям митохондриального метаболизма нейронов и астроцитов, которые проявляются в митохондриальной деполяризации и снижении аутофлуоресценции НАД(Ф)Н и способствуют фотоповреждению клеток.

Фотоповреждение митохондрий при ФД воздействии радахлорина может быть связано с локализацией ФС в митохондриях и его непосредственным взаимодействием с митохондриальными ферментами и ПОЛ митохондриальной мембраны. Действительно, известно, что ФС хлоринового ряда часто локализуются в митохондриях [157, 188]. Также Бисвас и соавторы показали, что в клетках анапластического рака щитовидной железы человека *in vitro* и *in vivo* радахлорин преимущественно локализуется в митохондриях и в меньшей степени в лизосомах и эндоплазматическом ретикулуме [47]. В темновых условиях радахлорин (200 нМ) вызывал в нейронах и астроцитах гиперполяризацию митохондриальной мембраны, которая ингибировалась при добавлении циклоспорина А, ингибитора высокопроницаемой митохондриальной поры (mPTP, рисунок 3.15). Это свидетельствует о накоплении радахлорина в митохондриях в нейронах и астроцитах и о его взаимодействии с белками mPTP. Участие mPTP в фотоповреждении клеток показано для ряда ФС [188]. ФД воздействие ветерпорфина, взаимодействующего с компонентом mPTP, ANT, в клетках Jurkat ведёт к открытию mPTP, снижению митохондриального потенциала ($\Delta\Psi_m$) и последующему апоптозу [214]. Салет и Морено в 1997 году показали на изолированных митохондриях печени крысы, что ФД воздействие

гематопорфирина может инактивировать открытие высокопроницаемой митохондриальной поры [175]. Таким образом, ФДТ может как ингибировать, так и активировать открытие mPTP. Однако, ФД воздействие радахлорина (200 нМ) на нейроны и астроциты вело к митохондриальной деполяризации, которая не ингибировалась циклоспорином А (рисунок 3.15). Таким образом, при данном режиме ФД воздействия (радахлорин 200 нМ, 1 и 3 минуты облучения) на нейроны и астроциты не происходит открытия высокопроницаемой митохондриальной поры, несмотря на то, что низкий митохондриальный потенциал и АФК являются триггерами mPTP. Возможно, для открытия mPTP в нейронах и астроцитах требуется более продолжительное или более интенсивное ФД воздействие.

Падение митохондриального потенциала при ФД воздействии радахлорина сопровождалось снижением уровня НАДН, что может свидетельствовать об изменении активности ферментов цепи переноса электронов (Рисунки 3.11, 3.12). Влияние ФД воздействия на дыхательную цепь, а именно ингибирование сукцинатдегидрогеназы и цитохром С оксидазы и нарушение митохондриального электрохимического градиента *in vitro* и *in vivo*, было показано для ФС порфиринового ряда [165–168]. При этом наблюдаемое падение градиента в митохондриях не было связано с потерей целостности митохондриальной мембраны, а обусловлено действием на митохондриальные ферменты, участвующие в окислительном фосфорилировании [168]. Известно, что снижение аутофлуоресценции НАД(Ф)Н может также происходить в результате выцветания в результате действия облучения. Подтверждением этого может быть снижение аутофлуоресценции НАД(Ф)Н после добавления NaCN (Рисунок 3.12). Однако эти эффекты блокировались при добавлении ингибитора фермента PARP, DPQ (20 мкМ) (Рисунки 3.11, 3.14). Также преинкубация клеток с этим ингибитором снижала уровень митохондриальной деполяризации (рисунок 3.15). Таким образом, в нашей работе падение митохондриального потенциала при ФД воздействии, по-видимому, было отчасти связано с истощением митохондриального депо НАДН и активацией фермента PARP.

Регистрация аутофлуоресценции НАД(Ф)Н после добавления разбавителя окислительного фосфорилирования FCCP (1 мкМ) и ингибитора дыхания NaCN (1 мМ) в части экспериментов затруднялась из-за открепления клеток от подложки, что может свидетельствовать о сильном повреждении и гибели клеток. Однако облучение клеток такой же продолжительности при аналогичной концентрации ФС (200 нМ) не приводило к снижению уровня восстановленного глутатиона через 4 часа после воздействия и достоверное увеличение ПОЛ наблюдалось при больших концентрациях радахлорина (400 нМ), при этом в обоих случаях не наблюдалось открепления клеток от подложки. Наблюдаемые отличия в реакциях первичных нейронов и астроцитов на ФД воздействие могут быть связаны с тем, что доза ФД воздействия в опытах с регистрацией аутофлуоресценции НАД(Ф)Н была выше в связи с дополнительным возбуждением радахлорина на волне возбуждения флуоресценции НАД(Ф)Н (360 нМ). Также открепление клеток от подложки в этих экспериментах может происходить в результате негативных эффектов FCCP и NaCN, которые вместе с ФД воздействием ведут к повреждению нейронов и астроцитов. Преинкубация клеток с ингибитором PARP, DPQ (20 мкМ), предотвращала открепление клеток от подложки, что свидетельствует о его защитном действии. Однако на раковых клетках ротовой полости при этом показано, что фермент PARP может играть защитную роль при ФД воздействии [216].

Поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP) представляют собой ферменты, которые катализируют перенос АДФ-рибозы на белки мишени (поли-АДФ-рибозилирование) с потреблением НАД⁺ и участвуют в репарации ДНК, в том числе при окислительном стрессе [104]. Известно, что эта группа ферментов активируется в клетке, как в ответ на повреждение ДНК, так и в ответ на стресс и кроме участия в репарации ДНК играет важную роль и в других клеточных процессах, осуществляя поли-АДФ-рибозилирование различных клеточных мишеней [107]. При окислительном стрессе может происходить гиперактивация PARP, ведущая к потреблению НАД⁺ и истощению НАДН, падению митохондриального потенциала и уровня АТФ и последующей некротической

гибели клетки в результате биоэнергетического кризиса, что, возможно, и происходит при ФД воздействии радахлорина [109]. Снижение уровней АТФ, вырабатываемых в митохондриях, которое коррелирует с выживаемостью клеток, наблюдалось при ФД воздействии порфиринов [170, 174]. Однако есть работы, которые свидетельствуют о том, что действие PARP при ишемии может быть не связано с потреблением НАД⁺, а с накоплением токсичных продуктов поли-АФД-рибозилирования в клетке или высвобождением апоптоз-индуцирующего фактора (AIF) из митохондрий и каспаз-независимой формой апоптоза [109, 215].

Таким образом, один из возможных механизмов повреждения клеток при ФД воздействии является активация фермента PARP, которая способствует изменению митохондриального метаболизма.

4.3 Участие факторов транскрипции NF-κB, AP-1 и NIF-1 в гибели нейронов и глиальных клеток при ФД воздействии

Развитие окислительного стресса в нейронах и глиальных клетках ведёт к гибели клеток путём апоптоза и некроза. Гибель клеток при этом модулируется различными сигнальными путями. В нашей работе показано участие факторов транскрипции NF-κB, AP-1 и NIF-1 в фотоиндуцированной гибели клеток механорецептора речного рака (таблица 1).

В литературе существует дискуссия о роли фактора транскрипции NF-κB в окислительном стрессе, существует мнение, что он может активироваться под действием АФК [14]. В нашей работе показано, что NF-κB участвует в гибели нейронов и глиальных клеток при ФДТ. Наши данные свидетельствуют, что он способствует некрозу нейронов и апоптозу глиальных клеток, но обладает при этом антинекротической активностью в глиальных клетках. Из этого можно сделать вывод, что сигнальные пути, регулирующие выживаемость нейронов и глиальных клеток рака при фотодинамическом воздействии, различаются.

Таблица 1. Участие факторов транскрипции NF-κB, AP-1 и HIF-1 в фотоиндуцированной гибели нейронов и глиальных клеток механорецептора речного рака

Модулятор	Активатор или ингибитор (концентрация)	Некроз		Апоптоз глии
		нейроны	глия	
<i>NF-κB</i>				
Активатор	Бетулиновая кислота (5 мкМ)	↑	↓	↑
Ингибиторы	Партенолид (20 мкМ)	↓	↑	–
	CAPE (30 мкМ)	↓	–	↓
<i>AP-1</i>				
Ингибитор	SR11302 (10 мкМ)	–	–	↓
<i>HIF-1</i>				
Ингибиторы	KG-548 (53 мкМ)	–	–	↓
	FM19G11 (3,7 мкМ)	–	–	↓
Активатор	DMOG (1 мМ)	–	↓	↓

Стрелки соответствуют статистически значимому ($p < 0,05$) уменьшению или увеличению, тире – отсутствию изменений

NF-κB выполняет различные функции в нервной системе, в частности, он участвует в защите клетки от стрессовых воздействий [125, 216]. В ответ на внешние воздействия он регулирует экспрессию множества генов, которые ведут либо к смерти клетки, либо к её выживанию [217–221]. Среди них способствуют выживанию такие белки, как Bcl-2, Mn-супероксид дисмутаза, ингибитор апоптоза (IAP), сурвивин, Ca²⁺/кальмодулин-зависимая протеинкиназа II (CamKII) и т.д. В то же время NF-κB регулирует такие проапоптотические белки, как p53, Bcl-Xs, Вах, c-Мус, индуцибельная NO-синтаза (iNOS) и т.д. [219, 221].

В ряде работ описывается участие NF-κB в апоптозе глиальных клеток при стрессовых условиях. Волльграф и соавторы [118] показали участие NF-κB в апоптозе культуры олигодендроцитов крысы при окислительном стрессе, вызванном H₂O₂. Также другими авторами было продемонстрировано, что ишемия и реперфузионное повреждение связаны со сверхэкспрессией p53 и проапоптотических белков Вах и каспазы 3 и даун-регуляцией антиапоптотических белков Bcl-2 вследствие активации NF-κB [222]. Такума и соавторы показали участие NF-κB и кальций-зависимых ферментов, кальпаина и кальцинейрина, в апоптозе астроцитов при реперфузии [223].

Было показано, что ФДТ активирует NF-κB в различных клеточных линиях [179, 224–226] и облегчает его связывание с ДНК [226]. Матруль показал, что активация NF-κB при ФДТ вызывает апоптоз культуры раковых клеток [225]. Наблюдаемое нами проапоптотическое действие NF-κB согласуется с этими данными. Этот эффект может быть опосредован NO, вырабатываемым iNOS, и протеинкиназой G, которые также вели к фотоиндуцируемому апоптозу глиальных клеток рака: PDT→NF-κB→iNOS→NO→protein kinaseG → apoptosis [227].

Роль NF-κB в некрозе нейронов и глиальных клеток изучена мало. Ранее было показано, что нейротрофические факторы NFG и GDNF защищают глиальные клетки рака от фотоиндуцированного некроза [228, 229]. Также было показано, что путь GDNF/ERK/NF-κB участвует в защите астроцитов мозга при ишемической смерти [230]. Наблюдаемая пронекротическая активность NF-κB

может быть опосредована различными сигнальными белками, включая аденилатциклазу [206], кальмодулин и CamKII [206] или протеинкиназу В/Akt [231], которые так же способствовали некрозу механорецепторного нейрона речного рака. Также недавно было показано, что NF-κB может участвовать в некрозе нейронов при дисфункции Hsp70.1 [232].

Фактор транскрипции AP-1, как и NF-κB, активируется в клетке на ранних стадиях ответа на стресс и запускает экспрессию генов раннего ответа. В наших опытах SR11302, ингибитор AP-1, не изменял некроз нейронов и глиальных клеток при ФД воздействии, но достоверно снижал уровень фотоиндуцированного апоптоза (таблица 1). Таким образом, по-видимому, AP-1 способствует апоптозу глиальных клеток при ФД воздействии. Это согласуется с данными о проапоптозной роли AP-1 при развитии окислительного стресса в олигодендроцитах [Vollgraf et al., 1999]. Также известно, что ФД воздействие вызывает сильную и продолжительную экспрессию c-Jun и c-Fos, компонентов AP-1 [Kick et al., 1996].

Фактор транскрипции HIF-1 активируется в клетках при гипоксии и низком содержании глюкозы и стимулирует транскрипцию генов, которые способствуют выживанию клетки в условиях низкого содержания кислорода. В результате клетки приобретают устойчивость не только к гипоксии, но и к другим внешним воздействиям. В нормальных условиях HIF-1 гидроксилируется и деградирует в протеасомах. Гипоксия и активные формы кислорода (АФК) ингибируют активность пролилгидроксилазы, стабилизируя и активируя HIF-1. ФД воздействие вызывает гиперэкспрессию HIF-1 [Mitra et al., 2006]. Сублетальное ФД воздействие втрое повышало экспрессию HIF-1α в тканях мозга мышей [Zheng et al., 2008]. В нашей работе активатор HIF-1, DMOG, снижал фотоиндуцированный апоптоз и некроз глиальных клеток. Это может указывать на защитную роль HIF-1. Однако ингибиторы HIF-1, KG-548 и FM19G11, также уменьшали апоптоз, но не некроз глиальных клеток при ФД воздействии (таблица). Эти результаты пока не позволяют сделать определенный вывод о роли

НIF-1 в ФД повреждении нейронов и глиальных клеток механорецептора речного рака.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе установлено, что фотодинамическое воздействие радахлорина вызывает окислительный стресс, который характеризуется увеличением скорости генерации супероксид-аниона и перекисного окисления липидов в нейронах и астроцитах первичной сокультуры мозга крысы, и повышает уровень восстановленного глутатиона в астроцитах, что свидетельствует об активации глутатион-зависимой антиоксидантной системы.

Фотоиндуцируемый окислительный стресс в нейронах и астроцитах первичной сокультуры мозга крысы ведёт к изменениям митохондриального метаболизма, по-видимому, связанных с активацией PARP. Активированный PARP потребляет НАД⁺, что ведёт к снижению митохондриального НАДН депо, последующему ингибированию дыхания и деполяризации митохондриальной мембраны.

Развитие окислительного стресса в нейронах и глиальных клетках ведёт к гибели клеток путём апоптоза и некроза. Гибель клеток при этом модулируется различными сигнальными путями, в том числе активирующимися при окислительном стрессе факторами транскрипции NF-κB, AP-1 и HIF-1, которые регулируют экспрессию генов белков, участвующих в регуляции выживаемости клетки при внешних воздействиях. Ингибиторный анализ, проведенный в работе, свидетельствует о том, что фактор транскрипции NF-κB способствует некрозу нейронов и апоптозу глиальных клеток механорецептора речного рака, но защищает глиальные клетки от некроза при ФД воздействии. Модуляция фактора транскрипции AP-1 указывает на его участие в апоптозе глиальных клеток при ФД воздействии. Ингибиторный анализ участия фактора транскрипции HIF-1 свидетельствует о его роли в защите глиальных клеток механорецептора речного рака от фотоиндуцируемого некроза и его участии в фотоиндуцированном апоптозе глиальных клеток.

На основе литературных данных и полученных результатов построена концептуальная схема, представленная на рисунке 4.1.

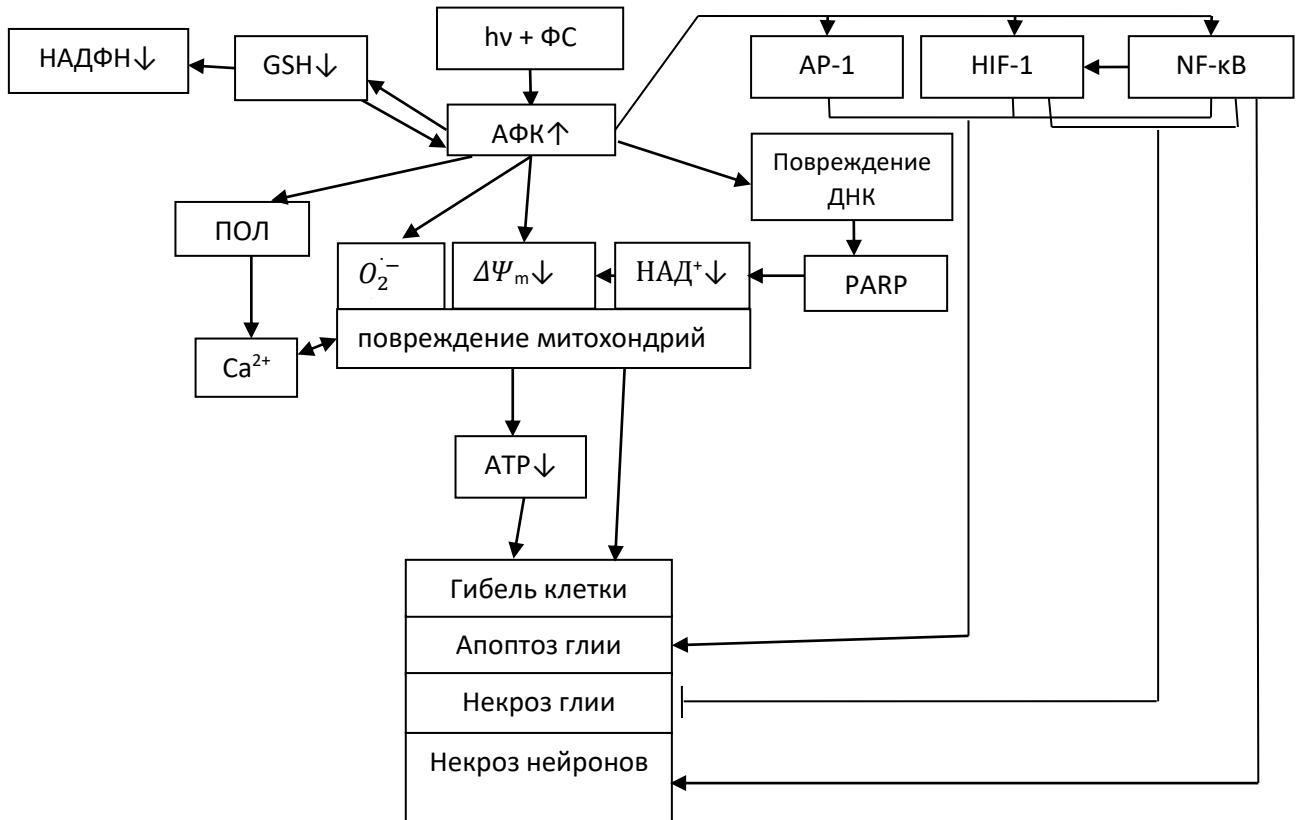


Рисунок 4.1 – Изменения митохондриального метаболизма при ФД воздействии и роль факторов транскрипции NF-κB, AP-1 и HIF-1 в фотоиндуцированной гибели нейронов и глиальных клеток

Эти результаты свидетельствуют том, что при использовании ФДТ для лечения опухолей мозга для минимизации повреждения нормальных клеток нужно учитывать возможное действие на митохондрии здоровых нейронов и астроцитов. Применение активаторов и ингибиторов факторов транскрипции NF- κ B, AP-1 и HIF-1 и фермента PARP может быть использовано для модуляции клеточной гибели и защиты нормальных клеток при ФДТ нервной ткани.

ВЫВОДЫ

1. Фотодинамическое воздействие вызывает окислительный стресс в первичной сокультуре нейронов и астроцитов мозга крысы, который характеризуется увеличением скорости генерации супероксид-аниона и перекисного окисления липидов и повышает уровень восстановленного глутатиона в астроцитах.

2. Фотодинамическое воздействие активирует PARP в клетках первичной сокультуры мозга крысы, что ведёт к снижению НАДН депо и деполяризации митохондриальной мембраны.

3. Фактор транскрипции NF-κB участвует в некрозе нейронов и апоптозе глиальных клеток механорецептора речного рака, но защищает глиальные клетки от некроза при фотодинамическом воздействии.

4. Фактор транскрипции AP-1 участвует в апоптозе глиальных клеток механорецептора речного рака при фотодинамическом воздействии.

5. Фактор транскрипции HIF-1 защищает глиальные клетки механорецептора рака от фотоиндуцированного некроза и участвует в фотоиндуцированном апоптозе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sanchez-Barcelo E.J. Recent patents on light based therapies: photodynamic therapy, photothermal therapy and photoimmunotherapy. / Sanchez-Barcelo E.J., Mediavilla M.D. // Recent patents on endocrine, metabolic & immune drug discovery – 2014. – Т. 8 – № 1 – С.1–8.
2. Zavadskaya T.S. Photodynamic Therapy in the Treatment of Glioma / Zavadskaya T.S. – 2015. – Т. 2015 – С.234–241.
3. Узденский А.Б. Биофизические аспекты фотодинамической терапии / Узденский А.Б. // Биофизика – 2016. – Т. 61 – № 3 – С.547–557.
4. Muller P.J. Photodynamic therapy of brain tumors - A work in progress / Muller P.J., Wilson B.C. // Lasers in Surgery and Medicine – 2006. – Т. 38 – № 5 – С.384–389.
5. Kostron H. Management of recurrent malignant glioma - neurosurgical strategies. / Kostron H., Bauer R. // Wiener medizinische Wochenschrift (1946) – 2011. – Т. 161 – № 1–2 – С.20–21.
6. Чиссов В.И. Фотодинамическая терапия метастатических опухолей головного мозга / Чиссов В.И., Соколов В.В., Решетов И.В., Зайцев А.М., Шелеско А.А. // Российский Онкологический Журнал – 2009. – № 2 – С.4–7.
7. Олюшин В.Е. Новые технологии в терапии больных злокачественными глиомами полушарий большого мозга / Олюшин В.Е., Филатов М.В., Улитин А.Ю., Ростовцев Д.М., Фадеева Т.Н., Маслова Л.Н., Папаян Г.В. // Практическая онкология – 2013. – Т. 14 – № 3 – С.175–179.
8. Узденский А.Б. Клеточно-молекулярные механизмы фотодинамической терапии / А. Б. Узденский – Санкт-Петербург: Наука, 2010. – 321с.
9. Castano A.P. Mechanisms in photodynamic therapy: Part three - Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction / Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R. // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy – 2005. – Т. 2 – № 2 – С.91–106.
10. Robertson C.A. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular

mechanisms and cancer research applications for PDT / Robertson C.A., Evans D.H., Abrahamse H. // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* – 2009. – Т. 96 – № 1 – С.1–8.

11. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция / Владимиров Ю.А., Проскурина Е.В. // *Успехи биологической химии* – 2009. – Т. 49 – С.341–388.

12. Duchen M.R. Mitochondria in health and disease: Perspectives on a new mitochondrial biology / Duchen M.R. // *Molecular Aspects of Medicine* – 2004. – Т. 25 – № 4 – С.365–451.

13. Oleinick N.L. The photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms. / Oleinick N.L., Evans H.H. // *Radiation research* – 1998. – Т. 150 – С.S146–S156.

14. Morgan M.J. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. / Morgan M.J., Liu Z. // *Cell research* – 2011. – Т. 21 – № 1 – С.103–15.

15. Broekgaarden M. Tumor cell survival pathways activated by photodynamic therapy: a molecular basis for pharmacological inhibition strategies / Broekgaarden M., Weijer R., Gulik T.M. van, Hamblin M.R., Heger M. // *Cancer and Metastasis Reviews* – 2015. – Т. 34 – № 4 – С.643–690.

16. Qutub A.A. Reactive oxygen species regulate hypoxia-inducible factor 1alpha differentially in cancer and ischemia / Qutub A.A., Popel A.S. // *Molecular and Cellular Biology* – 2008. – Т. 28 – № 16 – С.5106–5119.

17. Allison R.R. Photodynamic therapy (PDT): PDT mechanisms / Allison R.R., Moghissi K. // *Clinical Endoscopy* – 2013. – Т. 46 – № 1 – С.24–29.

18. Mroz P. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer / Mroz P., Yaroslavsky A., Kharkwal G.B., Hamblin M.R. // *Cancers* – 2011. – Т. 3 – № 2 – С.2516–2539.

19. Garg A.D. Photodynamic therapy: Illuminating the road from cell death towards anti-tumour immunity / Garg A.D., Nowis D., Golab J., Agostinis P. // *Apoptosis* – 2010. – Т. 15 – № 9 – С.1050–1071.

20. Benov L. Photodynamic therapy: Current status and future directions / Benov

L. // *Medical Principles and Practice* – 2015. – T. 24 – № suppl 1 – C.14–28.

21. Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours / Ochsner M. // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* – 1997. – T. 39 – № 1 – C.1–18.

22. Cló E. Control and selectivity of photosensitized singlet oxygen production: Challenges in complex biological systems / Cló E., Snyder J.W., Ogilby P.R., Gothelf K. V. // *ChemBioChem* – 2007. – T. 8 – № 5 – C.475–481.

23. Juzeniene A. The history of PDT in Norway. Part one: Identification of basic mechanisms of general PDT / Juzeniene A., Moan J. // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* – 2007. – T. 4 – № 1 – C.3–11.

24. Garland M.J. Designing photosensitizers for photodynamic therapy: strategies, challenges and promising developments. / Garland M.J., Cassidy C.M., Woolfson D., Donnelly R.F. // *Future medicinal chemistry* – 2009. – T. 1 – № 4 – C.667–691.

25. Juzeniene A. Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis. / Juzeniene A., Peng Q., Moan J. // *Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* – 2007. – T. 6 – № 12 – C.1234–1245.

26. Dougherty T.J. Of what value is a highly absorbing photosensitizer in PDT? / Dougherty T.J., Potter W.R. // *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology* – 1991. – T. 8 – № 2 – C.223.

27. Western A. Action Spectra for Photoinactivation of Cells in the Presence of Tetra-(3-Hydroxyphenyl)Porphyrin, Chlorin e6 and Aluminium Phthalocyanine Tetrasulphonate Boston, MA: Springer US, 1988. – 85–89c.

28. Moan J. The Biophysical Foundations of Photodynamic Therapy / Moan J., Peng Q., Sorensen R., Iani V., Nesland J.M. // *Endoscopy* – 1998. – T. 30 – № 4 – C.387–391.

29. Calzavara-Pinton P.G. Photodynamic therapy: Update 2006 Part 1: Photochemistry and photobiology / Calzavara-Pinton P.G., Venturini M., Sala R. // *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* – 2007. – T. 21 –

№ 3 – C.293–302.

30. Abels C. Targeting of the vascular system of solid tumours by photodynamic therapy (PDT). / Abels C. // *Photochemical & photobiological sciences* – 2004. – Т. 3 – № 8 – C.765–771.

31. Garg A.D. DAMPs and PDT-mediated photo-oxidative stress: exploring the unknown. / Garg A.D., Krysko D. V, Vandenabeele P., Agostinis P. // *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* – 2011. – Т. 10 – № 5 – C.670–680.

32. Garg A.D. ER stress, autophagy and immunogenic cell death in photodynamic therapy-induced anti-cancer immune responses. / Garg A.D., Agostinis P. // *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* – 2014. – Т. 13 – № 3 – C.474–87.

33. Pizova K. Photodynamic therapy for enhancing antitumour immunity / Pizova K., Tomankova K., Daskova A., Binder S., Bajgar R., Kolarova H. // *Biomedical Papers* – 2012. – Т. 156 – № 2 – C.93–102.

34. Agostinis P. Photodynamic Therapy of cancer: an update / Agostinis P., Berg K., Cengel K., Foster T., Girotti A., Gollnick S., Hahn S., Hamblin M., Juzeniene A., Kessel D., Koberlik M., Moan J., Mroz P., Nowis D., Piette J., Wilson B., Golab J. // *CA Cancer J Clin.* – 2011. – Т. 61 – № 4 – C.250–281.

35. Jori G. Tumour photosensitizers: Approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic therapy / Jori G. // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* – 1996. – Т. 36 – № 2 – C.87–93.

36. Dougherty T.J. Photosensitizers: Therapy and Detection of Malignant Tumors / Dougherty T.J. // *Photochemistry and Photobiology* – 1987. – Т. 45 – № 6 – C.879–889.

37. Ермакова К.В. Эффективность фотодинамической терапии фотосенсом глиобластомы 101/8 крыс / Ермакова К.В., Кубасова И.Ю., Борисова Л.М., Киселева М.П., Смирнова З.С., Меерович Г.А., Коган Е.А., Лукьянец Е.А., Ворожцов Г.Н. // *Российский биотерапевтический журнал* – 2009. – Т. 8 – № 4 –

C.73–78.

38. Sokolov V. V. Photodynamic therapy (PDT) of malignant tumors by photosensitizer photosens: results of 45 clinical cases / под ред. В. Ehrenberg, G. Jori, J. Moan. , 1996. – 281–287с.

39. Kuznetsova N.A. Sulfonated phthalocyanines: aggregation and singlet oxygen quantum yield in aqueous solutions / Kuznetsova N.A., Gretsova N.S., Derkacheva V.M., Kaliya O.L., Lukyanets E.A. // Journal of Porphyrins and Phthalocyanines – 2003. – Т. 7 – № 3 – С.147–154.

40. Rosenthal I. Phthalocyanines as photodynamic sensitizers / Rosenthal I., Hur B., Lier V. // Photochemistry and Photobiology – 1991. – Т. 53 – № 6 – С.859–870.

41. Ударцева О.О. Накопление и выведение фотосенса и протопорфирина IX разными типами клеток мезенхимального происхождения / Ударцева О.О., Андреева Е.Р., Буравкова Л.Б. // Клеточные технологии в биологии и медицине – 2013. – № 2 – С.102–106.

42. Leeuwen-van Zaane F. van Microscopic analysis of the localization of two chlorin-based photosensitizers in OSC19 tumors in the mouse oral cavity / Leeuwen-van Zaane F. van, Driel P.B.A.A.A.A. van, Gamm U.A., Snoeks T.J.A.A., Bruijn H.S. de, Ploeg-van den Heuvel A. van der, Löwik C.W.G.M.G.M., Sterenborg H.J.C.M.C.M., Amelink A., Robinson D.J. // Lasers in surgery and medicine – 2014. – Т. 46 – № 3 – С.224–234.

43. Kochneva E. V Photosensitizer Radachlorin®: Skin cancer PDT phase II clinical trials. / Kochneva E. V, Filonenko E. V, Vakulovskaya E.G., Scherbakova E.G., Seliverstov O. V, Markichev N.A., Reshetnikov A. V, Kochneva E.V., Vakulovskaya E.G., Markichev N.A., al. et, Privalov V.A., al. et, Privalov V.A., al. et, Vakulovskaya E.G., Reshetnikov A.V., Vakulovskaya E.G., al. et, Reshetnikov A.V., al. et, Reshetnikov A.V., al. et, Ivanov A.V., al. et, Uzdensky A.B., al. et, Reshetnikov A.V., al. et, Douillard S., al. et // Photodiagnosis and photodynamic therapy – 2010. – Т. 7 – № 4 – С.258–267.

44. Вакуловская Е.Г. Фотодинамическая терапия и флюоресцентная диагностика с фотосенсибилизатором Радахлорин у больных раком кожи /

Вакуловская Е.Г., Решетников А.В. // Российский биотерапевтический журнал – 2003. – Т. 2 – № 1 – С.53.

45. Neginskaya M.A. Photodynamic effect of Radachlorin on nerve and glial cells / Neginskaya M.A., Berezhnaya E.V., Rudkovskii M.V., Demyanenko S.V., Uzdensky A.B. // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy – 2014. – Т. 11 – № 3 – С.357–364.

46. Mirzaei H. The efficacy of Radachlorin-mediated photodynamic therapy in human hepatocellular carcinoma cells / Mirzaei H., Djavid G.E., Hadizadeh M., Jahanshiri-Moghadam M., Hajian P. // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology – 2015. – Т. 142 – С.86–91.

47. Biswas R. Chlorin e6 derivative radachlorin mainly accumulates in mitochondria, lysosome and endoplasmic reticulum and shows high affinity toward tumors in nude mice in photodynamic therapy / Biswas R., Moon J.H., Ahn J.C. // Photochemistry and Photobiology – 2014. – Т. 90 – № 5 – С.1108–1118.

48. Zenkevich E. Photophysical and photochemical properties of potential porphyrin and chlorin photosensitizers for PDT / Zenkevich E., Sagun E., Knyukshto V., Shulga A., Mironov A., Efremova O., Bonnett R., Songca S.P., Kassem M. // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology – 1996. – Т. 33 – № 2 – С.171–180.

49. Souza E. Antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of aggressive periodontitis: a systematic review and meta-analysis / Souza E., Medeiros A.C., Gurgel B.C., Sarmiento C. // Lasers in Medical Science – 2016. – Т. 31 – № 1 – С.187–196.

50. Sharma S.K. Photodynamic Therapy for Cancer and for Infections : What Is / Sharma S.K., Mroz P., Dai T., Huang Y., Tyler G. // Israel journal of chemistry – 2013. – Т. 52 – С.691–705.

51. Quirk B.J. Photodynamic therapy (PDT) for malignant brain tumors - Where do we stand? / Quirk B.J., Brandal G., Donlon S., Vera J.C., Mang T.S., Foy A.B., Lew S.M., Girotti A.W., Jogonal S., LaViolette P.S., Connelly J.M., Whelan H.T. // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy – 2015. – Т. 12 – № 3 – С.530–544.

52. Kostron H. Photodynamic therapy in neurosurgery: A review / Kostron H., Obwegeser A., Jakober R. // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology –

1996. – T. 36 – № 2 – C.157–168.

53. Stylli S.S. Photodynamic therapy of cerebral glioma - A review Part I - A biological basis / Stylli S.S., Kaye A.H. // *Journal of Clinical Neuroscience* – 2006. – T. 13 – № 6 – C.615–625.

54. Boyle R.W. Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers. / Boyle R.W., Dolphin D. // *Photochemistry and photobiology* – 1996. – T. 64 – № 3 – C.469–485.

55. Muller P.J. Photodynamic therapy for malignant newly diagnosed supratentorial gliomas. / Muller P.J., Wilson B.C. // *Journal of clinical laser medicine & surgery* – 1996. – T. 14 – № 5 – C.263–70.

56. Stummer W. Fluorescence-guided resection of glioblastoma multiforme utilizing 5-ALA-induced porphyrins: a prospective study in 52 consecutive patients / Stummer W., Novotny A., Stepp H., Goetz C., Bise K., Reulen H.J. // *Journal of Neurosurgery* – 2000. – T. 93 – № 6 – C.1003–1013.

57. Eljamel S. 5-ALA Fluorescence Image Guided Resection of Glioblastoma Multiforme: A Meta-Analysis of the Literature. / Eljamel S. // *International journal of molecular sciences* – 2015. – T. 16 – № 5 – C.10443–56.

58. Stummer W. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial / Stummer W., Pichlmeier U., Meinel T., Wiestler O.D., Zanella F., Reulen H.-J. // *The Lancet Oncology* – 2006. – T. 7 – № 5 – C.392–401.

59. Eljamel M.S. Brain photodiagnosis (PD), fluorescence guided resection (FGR) and photodynamic therapy (PDT): Past, present and future / Eljamel M.S. // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* – 2008. – T. 5 – № 1 – C.29–35.

60. Eljamel S. Photodynamic applications in brain tumors: A comprehensive review of the literature / Eljamel S. // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* – 2010. – T. 7 – № 2 – C.76–85.

61. Zimmermann A. mTHPC-mediated photodynamic diagnosis of malignant brain tumors / Zimmermann A., Ritsch-Marte M., Kostron H. // *Photochemistry and photobiology* – 2001. – T. 74 – № 4 – C.611–616.

62. Еремеев Д.В. Злокачественные опухоли головного мозга, полученные у крыс путем трансплантации от человека (экспериментальное исследование) / Еремеев Д.В. // Вестник Уральской медицинской академической науки – 2008. – Т. 4 – С.38–39.
63. Michelakis E.D. Mitochondrial medicine: A new era in medicine opens new windows and brings new challenges / Michelakis E.D. // *Circulation* – 2008. – Т. 117 – № 19 – С.2431–2434.
64. Friedman J.R. Mitochondrial form and function / Friedman J.R., Nunnari J. // *Nature* – 2014. – Т. 505 – № 7483 – С.335–343.
65. Vianello A. The mitochondrial permeability transition pore (PTP) — An example of multiple molecular exaptation? / Vianello A., Casolo V., Petrusa E., Peresson C., Patui S., Bertolini A., Passamonti S., Braidot E., Zancani M. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* – 2012. – Т. 1817 – № 11 – С.2072–2086.
66. Halestrap A.P. What is the mitochondrial permeability transition pore? / Halestrap A.P. // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* – 2009. – Т. 46 – № 6 – С.821–831.
67. Traaseth N. Role of calcium signaling in the activation of mitochondrial nitric oxide synthase and citric acid cycle / Traaseth N., Elfering S., Solien J., Haynes V., Giulivi C. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* – 2004. – Т. 1658 – № 1–2 – С.64–71.
68. Kowaltowski A.J. Alternative mitochondrial functions in cell physiopathology: beyond ATP production / Kowaltowski A.J. // *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* – 2000. – Т. 33 – № 2 – С.241–250.
69. Tait S.W.G. Mitochondrial regulation of cell death. / Tait S.W.G., Green D.R. // *Cold Spring Harbor perspectives in biology* – 2013. – Т. 5 – № 9.
70. Ichas F. From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state. / Ichas F., Mazat J.P. // *Biochimica et biophysica acta* – 1998. – Т. 1366 – № 1–2 – С.33–50.
71. Nicholls D.G. Mitochondria and Neuronal Survival / Nicholls D.G., Budd

S.L. // *Physiological Reviews* – 2000. – T. 80 – № 1 – C.315–360.

72. Nunnari J. Mitochondria: in sickness and in health / Nunnari J., Suomalainen A. // *Cell* – 2012. – T. 148.

73. Madeira V.M.C. Overview of mitochondrial bioenergetics. / Madeira V.M.C. // *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) – 2012. – T. 810 – C.1–6.

74. Logan D.C. The mitochondrial compartment. / Logan D.C. // *Journal of experimental botany* – 2007. – T. 58 – № 1 – C.1225–1243.

75. Crompton M. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death. / Crompton M. // *The Journal of physiology* – 2000. – T. 529 Pt 1 – № Pt 1 – C.11–21.

76. Kühlbrandt W. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. / Kühlbrandt W. // *BMC biology* – 2015. – T. 13 – № 1 – C.89.

77. Osellame L.D. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function / Osellame L.D., Blacker T.S., Duchen M.R. // *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* – 2012. – T. 26 – № 6 – C.711–723.

78. Benard G. Mitochondrial bioenergetics and structural network organization / Benard G., Bellance N., James D., Parrone P., Fernandez H., Letellier T., Rossignol R. // *Journal of Cell Science* – 2007. – T. 120 – № 5 – C.838–848.

79. Stock D. Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. / Stock D., Leslie A.G., Walker J.E. // *Science* (New York, N.Y.) – 1999. – T. 286 – № 5445 – C.1700–5.

80. Chevrollier A. Adenine nucleotide translocase 2 is a key mitochondrial protein in cancer metabolism / Chevrollier A., Loiseau D., Reynier P., Stepien G. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* – 2011. – T. 1807 – № 6 – C.562–567.

81. Ward M.W. Mitochondrial and plasma membrane potential of cultured cerebellar neurons during glutamate induced necrosis, apoptosis and tolerance / Ward M.W., Huber H.J., Weisova P., Duessmann H., Nicholls D.G., Prehn J.H.M. // *Journal of Neuroscience* – 2007. – T. 27 – № 31 – C.8238–8249.

82. Kadenbach B. Mitochondrial energy metabolism is regulated via nuclear-

coded subunits of cytochrome c oxidase. / Kadenbach B., Hüttemann M., Arnold S., Lee I., Bender E. // *Free radical biology & medicine* – 2000. – Т. 29 – № 3–4 – С.211–21.

83. McCormack J.G. Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. / McCormack J.G., Halestrap A.P., Denton R.M. // *Physiological reviews* – 1990. – Т. 70 – № 2 – С.391–425.

84. Pralong W.F. Pyridine nucleotide redox state parallels production of aldosterone in potassium-stimulated adrenal glomerulosa cells. / Pralong W.F., Hunyady L., Várnai P., Wollheim C.B., Spät A. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 1992. – Т. 89 – № 1 – С.132–6.

85. Duchen M.R. Ca(2+)-dependent changes in the mitochondrial energetics in single dissociated mouse sensory neurons. / Duchen M.R. // *The Biochemical journal* – 1992. – С.41–50.

86. Jouaville L.S. Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming. / Jouaville L.S., Pinton P., Bastianutto C., Rutter G.A., Rizzuto R. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 1999. – Т. 96 – № 24 – С.13807–12.

87. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в живых системах / Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Деев А.И., Козлов А.В. // *Итоги науки и техники. Биофизика* – 1992. – Т. 29 – С.3–250.

88. Gandhi S. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration / Gandhi S., Abramov A.Y. // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* – 2012. – Т. 2012.

89. Rahman T. Oxidative stress and human health / Rahman T., Hosen I., Islam M.M.T., Shekhar H.U. // *Advances in Bioscience and Biotechnology* – 2012. – Т. 3 – С.997–1019.

90. St-Pierre J. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. / St-Pierre J., Buckingham J.A., Roebuck S.J., Brand M.D. // *The Journal of biological chemistry* – 2002. – Т. 277 – № 47 – С.44784–90.

91. Votyakova T. $\Delta\Psi(m)$ -Dependent and $\Delta\Psi(m)$ -independent production of

reactive oxygen species by rat brain mitochondria. / Votyakova T. V, Reynolds I.J. // *Journal of neurochemistry* – 2001. – Т. 79 – № 2 – С.266–77.

92. Hamanaka R.B. Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. / Hamanaka R.B., Chandel N.S., Turrens J.F., et al. // *Trends in biochemical sciences* – 2010. – Т. 35 – № 9 – С.505–13.

93. Poli G. Oxidative stress and cell signalling. / Poli G., Leonarduzzi G., Biasi F., Chiarotto E. // *Current medicinal chemistry* – 2004. – Т. 11 – № 9 – С.1163–82.

94. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах // под ред. Ю.А. Владимиров, А.И. Арчаков, Г.М. Франк. – Москва: Наука, 1972.– 252с.

95. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты / Владимиров Ю.А. // *Вестник Российской академии медицинских наук* – 1998. – № 7 – С.43–51.

96. Davies M.J. *Oxidative Damage to Proteins* Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2012.

97. Stadtman E.R. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins / Stadtman E.R., Levine R.L. // *Amino Acids* – 2003. – Т. 25 – № 3 – С.207–218.

98. Bridge G. DNA mismatch repair and oxidative DNA damage: implications for cancer biology and treatment. / Bridge G., Rashid S., Martin S.A. // *Cancers* – 2014. – Т. 6 – № 3 – С.1597–614.

99. Cooke M.S. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease / Cooke M.S. // *The FASEB Journal* – 2003. – Т. 17 – № 10 – С.1195–1214.

100. Dizdaroglu M. Oxidatively induced DNA damage: mechanisms, repair and disease. / Dizdaroglu M., Halliwell B., Gutteridge J.M.C., Dizdaroglu M. // *Cancer letters* – 2012. – Т. 327 – № 1–2 – С.26–47.

101. Pogozelski W.K. Oxidative Strand Scission of Nucleic Acids: Routes Initiated by Hydrogen Abstraction from the Sugar Moiety. / Pogozelski W.K., Tullius T.D. // *Chemical reviews* – 1998. – Т. 98 – № 3 – С.1089–1108.

102. Maynard S. DNA Damage, DNA Repair, Aging, and Neurodegeneration / Maynard S., Fang E.F., Scheibye-Knudsen M., Croteau D.L., Bohr V.A. // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* – 2015. – Т. 5 – № 10 – С.a025130.

103. Narciso L. The Response to Oxidative DNA Damage in Neurons: Mechanisms and Disease / Narciso L., Parlanti E., Racaniello M., Simonelli V., Cardinale A., Merlo D., Dogliotti E., Narciso L., Parlanti E., Racaniello M., Simonelli V., Cardinale A., Merlo D., Dogliotti E. // *Neural Plasticity* – 2016. – T. 2016 – C.1–14.
104. Morales J. Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases. / Morales J., Li L., Fattah F.J., Dong Y., Bey E.A., Patel M., Gao J., Boothman D.A. // *Critical reviews in eukaryotic gene expression* – 2014. – T. 24 – № 1 – C.15–28.
105. Flohr C. Poly(ADP-ribosyl)ation accelerates DNA repair in a pathway dependent on Cockayne syndrome B protein. / Flohr C., Bürkle A., Radicella J.P., Epe B. // *Nucleic acids research* – 2003. – T. 31 – № 18 – C.5332–7.
106. Amé J.-C. The PARP superfamily / Amé J.-C., Spenlehauer C., Murcia G. de // *BioEssays* – 2004. – T. 26 – № 8 – C.882–893.
107. Luo X. On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1. / Luo X., Kraus W.L. // *Genes & development* – 2012. – T. 26 – № 5 – C.417–32.
108. Smith A.J.O. PARP-1 inhibition influences the oxidative stress response of the human lens. / Smith A.J.O., Ball S.S.R., Bowater R.P., Wormstone I.M. // *Redox biology* – 2016. – T. 8 – C.354–62.
109. Green D.R. Cell biology. Metabolic control of cell death. / Green D.R., Galluzzi L., Kroemer G. // *Science (New York, N.Y.)* – 2014. – T. 345 – № 6203 – C.1250256.
110. Alano C.C. NAD⁺ depletion is necessary and sufficient for poly(ADP-ribose) polymerase-1-mediated neuronal death. / Alano C.C., Garnier P., Ying W., Higashi Y., Kauppinen T.M., Swanson R.A. // *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* – 2010. – T. 30 – № 8 – C.2967–78.
111. Abramov A.Y. Mechanisms underlying the loss of mitochondrial membrane potential in glutamate excitotoxicity / Abramov A.Y., Duchon M.R. // *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* – 2008. – T. 1777 – № 7–8 – C.953–964.
112. Andrabi S.A. Iduna protects the brain from glutamate excitotoxicity and

stroke by interfering with poly(ADP-ribose) polymer-induced cell death. / Andrabi S.A., Kang H.C., Haince J.-F., Lee Y.-I., Zhang J., Chi Z., West A.B., Koehler R.C., Poirier G.G., Dawson T.M., Dawson V.L. // *Nature medicine* – 2011. – Т. 17 – № 6 – С.692–9.

113. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. / Halliwell B. // *Plant physiology* – 2006. – Т. 141 – № 2 – С.312–22.

114. Kalyanaraman B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms / Kalyanaraman B. // *Redox Biology* – 2013. – Т. 1 – № 1 – С.244–257.

115. Калинина Е.В. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов / Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Новичкова М.Д. // *Успехи биологической химии* – 2014. – Т. 54 – С.299–348.

116. Cooper A.J. Multiple roles of glutathione in the central nervous system. / Cooper A.J., Kristal B.S. // *Biological chemistry* – 1997. – Т. 378 – № 8 – С.793–802.

117. Berg R. van den Transcription factor NF- κ B as a potential biomarker for oxidative stress / Berg R. van den, Haenen G.R.M.M., Berg H. van den, Bast A. // *British Journal of Nutrition* – 2007. – Т. 86 – № S1 – С.S121.

118. Vollgraf U. Activation of AP-1 and Nuclear Factor- κ B Transcription Factors Is Involved in Hydrogen Peroxide-Induced Apoptotic Cell Death of Oligodendrocytes / Vollgraf U., Wegner M., Richter-Landsberg C. // *Journal of Neurochemistry* – 2002. – Т. 73 – № 6 – С.2501–2509.

119. Niecknig H. Role of reactive oxygen species in the regulation of HIF-1 by prolyl hydroxylase 2 under mild hypoxia / Niecknig H., Tug S., Reyes B.D., Kirsch M., Fandrey J., Berchner-Pfannschmidt U. // *Free Radical Research* – 2012. – Т. 46 – № 6 – С.705–717.

120. Sun Y. Redox regulation of transcriptional activators / Sun Y., Oberley L.W. // *Free Radical Biology and Medicine* – 1996. – Т. 21 – № 3 – С.335–348.

121. Reynaert N.L. In situ detection of S-glutathionylated proteins following glutaredoxin-1 catalyzed cysteine derivatization. / Reynaert N.L., Ckless K., Guala

A.S., Wouters E.F.M., Vliet A. van der, Janssen-Heininger Y.M.W. // *Biochimica et biophysica acta* – 2006. – T. 1760 – № 3 – C.380–7.

122. Klatt P. Redox regulation of c-Jun DNA binding by reversible S-glutathiolation. / Klatt P., Molina E.P., Lacoba M.G. De, Padilla C.A., Martinez-Galesteo E., Barcena J.A., Lamas S. // *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* – 1999. – T. 13 – № 12 – C.1481–90.

123. Filomeni G. Cell signalling and the glutathione redox system. / Filomeni G., Rotilio G., Ciriolo M.R. // *Biochemical pharmacology* – 2002. – T. 64 – № 5–6 – C.1057–64.

124. Napetschnig J. Molecular Basis of NF- κ B Signaling / Napetschnig J., Wu H. // *Annual Review of Biophysics* – 2013. – T. 42 – № 1 – C.443–468.

125. Gilmore T.D. NF- κ B: Where did it come from and why? / Gilmore T.D., Wolenski F.S. // *Immunological Reviews* – 2012. – T. 246 – № 1 – C.14–35.

126. Perkins N.D. Integrating cell-signalling pathways with NF- κ B and IKK function / Perkins N.D. // *Nature Reviews Molecular Cell Biology* – 2007. – T. 8 – № 1 – C.49–62.

127. Gilmore T.D. Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives / Gilmore T.D. // *Oncogene* – 2006. – T. 25 – № 51 – C.6680–6684.

128. Song Y.S. Oxidative stress increases phosphorylation of IkappaB kinase-alpha by enhancing NF-kappaB-inducing kinase after transient focal cerebral ischemia. / Song Y.S., Kim M.-S., Kim H.-A., Jung B.-I., Yang J., Narasimhan P., Kim G.S., Jung J.E., Park E.-H., Chan P.H. // *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* – 2010. – T. 30 – № 7 – C.1265–74.

129. Meyer M. H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. / Meyer M., Schreck R., Baeuerle P.A. // *The EMBO journal* – 1993. – T. 12 – № 5 – C.2005–15.

130. Hirota K. Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus.

A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF-kappaB. / Hirota K., Murata M., Sachi Y., Nakamura H., Takeuchi J., Mori K., Yodoi J. // The Journal of biological chemistry – 1999. – T. 274 – № 39 – C.27891–7.

131. Bandarra D. HIF-1 α , a novel piece in the NF- κ B puzzle / Bandarra D., Rocha S. // Inflammation and Cell Signaling – 2015. – T. 2 – № 2.

132. Uden P. van Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB. / Uden P. van, Kenneth N.S., Rocha S. // The Biochemical journal – 2008. – T. 412 – № 3 – C.477–84.

133. Shaulian E. AP-1 as a regulator of cell life and death / Shaulian E., Karin M. // Nature Cell Biology – 2002. – T. 4 – № 5 – C.E131–E136.

134. Vollgraf U. Activation of AP-1 and nuclear factor-kappaB transcription factors is involved in hydrogen peroxide-induced apoptotic cell death of oligodendrocytes. / Vollgraf U., Wegner M., Richter-Landsberg C. // Journal of neurochemistry – 1999. – T. 73 – № 6 – C.2501–9.

135. Weidemann A. Biology of HIF-1 α / Weidemann A., Johnson R.S. // Cell Death and Differentiation – 2008. – T. 15 – № 4 – C.621–627.

136. Liu W. Targeted genes and interacting proteins of hypoxia inducible factor-1. / Liu W., Shen S.-M., Zhao X.-Y., Chen G.-Q. // International journal of biochemistry and molecular biology – 2012. – T. 3 – № 2 – C.165–78.

137. Jung S.-N. Reactive oxygen species stabilize hypoxia-inducible factor-1 alpha protein and stimulate transcriptional activity via AMP-activated protein kinase in DU145 human prostate cancer cells / Jung S.-N., Yang W.K., Kim J., Kim H.S., Kim E.J., Yun H., Park H., Kim S.S., Choe W., Kang I., Ha J. // Carcinogenesis – 2008. – T. 29 – № 4 – C.713–721.

138. Ziello J.E. Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. / Ziello J.E., Jovin I.S., Huang Y. // The Yale journal of biology and medicine – 2007. – T. 80 – № 2 – C.51–60.

139. Green D.R. Mitochondria and Apoptosis / Green D.R., Reed J.C., Green D.R., Reed J.C. – 2009. – T. 1309 – № 1998.

140. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. / Elmore S. // *Toxicologic pathology* – 2007. – Т. 35 – № 4 – С.495–516.

141. Daugas E. Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis / Daugas E., Nochy D., Ravagnan L., Loeffler M., Susin S.A., Zamzami N., Kroemer G. // *FEBS Letters* – 2000. – Т. 476 – № 3 – С.118–123.

142. Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved? / Bernardi P. // *Frontiers in Physiology* – 2013. – Т. 4 – С.95.

143. Loupatatzis C. Single-channel currents of the permeability transition pore from the inner mitochondrial membrane of rat liver and of a human hepatoma cell line. / Loupatatzis C., Seitz G., Schönfeld P., Lang F., Siemen D. // *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* – 2002. – Т. 12 – № 5–6 – С.269–78.

144. Giorgi F. De The permeability transition pore signals apoptosis by directing Bax translocation and multimerization. / Giorgi F. De, Lartigue L., Bauer M.K.A., Schubert A., Grimm S., Hanson G.T., Remington S.J., Youle R.J., Ichas F. // *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* – 2002. – Т. 16 – № 6 – С.607–9.

145. Sharman W.M. Role of activated oxygen species in photodynamic therapy. / Sharman W.M., Allen C.M., Lier J.E. van // *Methods in enzymology* – 2000. – Т. 319 – С.376–400.

146. Красновский А.А. Фотодинамическое действие и синглетный кислород / Красновский А.А. // *Биофизика* – 2004. – Т. 49 – № 2 – С.305–322.

147. Шинкаренко Н.В. Химические свойства синглетного молекулярного кислорода и значение его в биологических системах / Шинкаренко Н.В., Алесковский В.Б. // *Успехи химии* – 1982. – № 5 – С.713–735.

148. DeRosa M.C. Photosensitized singlet oxygen and its applications / DeRosa M.C., Crutchley R.J. // *Coordination Chemistry Reviews* – 2002. – Т. 233–234 – С.351–371.

149. Scandalios J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of

signals triggering antioxidant gene defenses. / Scandalios J.G. // Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas – 2005. – Т. 38 – № 7 – С.995–1014.

150. Рощупкин Д.И. Основы фотобиофизики / Д. И. Рощупкин, В. Г. Артюхов – Воронеж: Изд. ВГУ, 1997. – 116с.

151. Boye E. The photodynamic effect of hematoporphyrin on DNA / Boye E., Moan J. // Photochemistry and Photobiology – 1980. – Т. 31 – № 3 – С.223–228.

152. Moan J. Photodynamic effect on DNA and cell survival of human cells sensitized by hematoporphyrin / Moan J., Boye E. // Photobiochemical Photobiophysics – 1981. – Т. 2 – С.301–307.

153. Moan J. On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissues / Moan J. // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology – 1990. – Т. 6 – № 3 – С.343–344.

154. Moan J. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen / Moan J., Berg K. // Photochemistry and Photobiology – 1991. – Т. 53 – № 4 – С.549–553.

155. Moan J. Sulfonated aluminium phthalocyanines as sensitizers for photochemotherapy. Effects of small light doses on localization, dye fluorescence and photosensitivity in V79 cells. / Moan J., Berg K., Anholt H., Madslie K. // International journal of cancer – 1994. – Т. 58 – № 6 – С.865–70.

156. Moan J. Intracellular localization of photosensitizers. / Moan J., Berg K., Kvam E., Western A., Malik Z., Rück A., Schneckenburger H. // Ciba Foundation symposium – 1989. – Т. 146 – С.95-107–11.

157. Peng Q. Correlation of subcellular and intratumoral photosensitizer localization with ultrastructural features after photodynamic therapy. / Peng Q., Moan J., Nesland J.M. // Ultrastructural pathology – 1996. – Т. 20 – № 2 – С.109–129.

158. Jiang Z. Pharmaceutical development, composition and quantitative analysis of phthalocyanine as the photosensitizer for cancer photodynamic therapy / Jiang Z., Shao J., Yang T., Wang J., Jia L. // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis – 2014. – Т. 87 – С.98–104.

159. Gomer C.J. Preclinical examination of first and second generation photosensitizers used in photodynamic therapy. / Gomer C.J. // *Photochemistry and photobiology* – 1991. – T. 54 – № 6 – C.1093–1107.

160. Kessel D. Photodynamic therapy: a mitochondrial inducer of apoptosis. / Kessel D., Luo Y. // *Cell death and differentiation* – 1999. – T. 6 – № 1 – C.28–35.

161. Noodt B.B. No correlation between DNA strand breaks and HPRT mutation induced by photochemical treatment in V79 cells / Noodt B.B., Moan J., Kvam E., Steen H.B. // *Mutation Research Letters* – 1994. – T. 323 – № 1–2 – C.75–79.

162. Noodt B.B. Primary DNA damage, HPRT mutation and cell inactivation photoinduced with various sensitizers in V79 cells. / Noodt B.B., Kvam E., Steen H.B., Moan J. // *Photochem Photobiol.* – 1993. – T. 58 – № 4 – C.541–547.

163. Kvam E. Sites of photodynamically induced DNA repair in human cells. / Kvam E., Stokke T. // *Photochemistry and Photobiology* – 1994. – T. 59 – № 4 – C.437–440.

164. Miller J.D. Photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4: The case experience with preclinical mechanistic and early clinical–translational studies / Miller J.D., Baron E.D., Scull H., Hsia A., Berlin J.C., McCormick T., Colussi V., Kenney M.E., Cooper K.D., Oleinick N.L. – 2007.

165. Berns M.W. In vitro cellular effects of hematoporphyrin derivative. / Berns M.W., Dahlman A., Johnson F.M., Burns R., Sperling D., Guiltinan M., Siemens A., Walter R., Wright W., Hammer-Wilson M., Wile A. // *Cancer research* – 1982. – T. 42 – № 6 – C.2325–9.

166. Gibson S.L. Photosensitization of mitochondrial cytochrome c oxidase by hematoporphyrin derivative and related porphyrins in vitro and in vivo. / Gibson S.L., Hilf R. // *Cancer research* – 1983. – T. 43 – № 9 – C.4191–4197.

167. Hilf R. Hematoporphyrin derivative-induced photosensitivity of mitochondrial succinate dehydrogenase and selected cytosolic enzymes of R3230AC mammary adenocarcinomas of rats. / Hilf R., Smail D.B., Murant R.S., Leakey P.B., Gibson S.L. // *Cancer research* – 1984. – T. 44 – № 4 – C.1483–1488.

168. Perlin D.S. Effects of Photosensitization by Hematoporphyrin Derivative on

Mitochondrial Adenosine Triphosphatase-mediated Proton Transport and Membrane Integrity of R3230AC Mammary Adenocarcinoma Effects of Photosensitization by Hematoporphyrin Derivative on Mitochondria / Perlin D.S., Murant R.S., Gibson S.L., Perlin D., Murant R., Gibson S. – 1985. – T. 45 – № February – C.653–658.

169. Murant R.S. Photosensitizing effects of Photofrin II on the site-selected mitochondrial enzymes adenylate kinase and monoamine oxidase. / Murant R.S., Gibson S.L., Hilf R. // *Cancer research* – 1987. – T. 47 – № 16 – C.4323–8.

170. Hilf R. Relationship of mitochondrial function and cellular adenosine triphosphate levels to hematoporphyrin derivative-induced photosensitization in R3230AC mammary tumors. / Hilf R., Murant R.S., Narayanan U., Gibson S.L. // *Cancer research* – 1986. – T. 46 – № 1 – C.211–7.

171. Ceckler T.L. ³¹P-NMR spectroscopy demonstrates decreased ATP levels in vivo as an early response to photodynamic therapy / Ceckler T.L., Bryant R.G., Penney D.P., Gibson S.L., Hilf R. // *Biochemical and Biophysical Research Communications* – 1986. – T. 140 – № 1 – C.273–279.

172. Ceckler T.L. Heterogeneous tumour response to photodynamic therapy assessed by in vivo localised ³¹P NMR spectroscopy. / Ceckler T.L., Gibson S.L., Kennedy S.D., Hill R., Bryant R.G. // *British journal of cancer* – 1991. – T. 63 – № 6 – C.916–22.

173. Hilf R. Early biochemical responses to photodynamic therapy monitored by NMR spectroscopy. / Hilf R., Gibson S.L., Penney D.P., Ceckler T.L., Bryant R.G. // *Photochemistry and photobiology* – 1987. – T. 46 – № 5 – C.809–17.

174. Chopp M. In vivo ³¹P-NMR spectroscopy of mammary carcinoma subjected to subcurative photodynamic therapy. / Chopp M., Farmer H., Hetzel F., Schaap A.P. // *Photochemistry and photobiology* – 1987. – T. 46 – № 5 – C.819–22.

175. Salet C. Singlet oxygen produced by photodynamic action causes inactivation of the mitochondrial permeability transition pore / Salet C., Moreno G., Ricchelli F., Bernardi P. // *Journal of Biological Chemistry* – 1997. – T. 272 – № 35 – C.21938–21943.

176. Wilson B.C. Subcellular localization of Photofrin and aminolevulinic acid

and photodynamic cross-resistance in vitro in radiation-induced fibrosarcoma cells sensitive or resistant to photofrin-mediated photodynamic therapy. / Wilson B.C., Olivo M., Singh G. // *Photochemistry and photobiology* – 1997. – T. 65 – № 1 – C.166–76.

177. Kessel D. Mitochondrial photodamage and PDT-induced apoptosis / Kessel D., Luo Y. // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* – 1998. – T. 42 – № 2 – C.89–95.

178. Agostinis P. Apoptotic and anti-apoptotic signaling pathways induced by photodynamic therapy with hypericin / Agostinis P., Assefa Z., Vantieghem A., Vandenneede J.R., Merlevede W., Witte P. De // *Advances in Enzyme Regulation* – 2000. – T. 40 – № 3 – C.157–182.

179. Matroule J.-Y. NF-KB in Photodynamic Therapy: Discrepancies of a Master Regulator / Matroule J.-Y., Volanti C., Piette J. // *Photochemistry and Photobiology* – 2006. – T. 82 – C.1241–1 246.

180. Kick G. Strong and prolonged induction of c-jun and c-fos proto-oncogenes by photodynamic therapy. / Kick G., Messer G., Plewig G., Kind P., Goetz A.E. // *British journal of cancer* – 1996. – T. 74 – № 1 – C.30–6.

181. Sanabria L.M. Direct and indirect photodynamic therapy effects on the cellular and molecular components of the tumor microenvironment / Sanabria L.M., Rodríguez M.E., Cogno I.S., Vittar N.B.R., Pansa M.F., Lamberti M.J., Rivarola V.A., Milla Sanabria L., Rodríguez M.E., Cogno I.S., Rumie Vittar N.B., Pansa M.F., Lamberti M.J., Rivarola V.A. // *Biochimica et biophysica acta* – 2013. – T. 1835 – № 1 – C.36–45.

182. Mitra S. Photodynamic therapy mediates the oxygen-independent activation of hypoxia-inducible factor 1 α / Mitra S., Cassar S.E., Niles D.J., Puskas J.A., Frelinger J.G., Foster T.H. // *Molecular Cancer Therapeutics* – 2006. – T. 5 – № 12.

183. Zheng X. Sensitization of cerebral tissue in nude mice with photodynamic therapy induces ADAM17/TACE and promotes glioma cell invasion / Zheng X., Jiang F., Katakowski M., Zhang X., Jiang H., Zhang Z.G., Chopp M. // *Cancer Letters* – 2008. – T. 265 – № 2 – C.177–187.

184. Piette J. Signalling pathway activation by photodynamic therapy: NF- κ B at

the crossroad between oncology and immunology. / Piette J. // Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology – 2015. – T. 14 – № 8 – C.1510–7.

185. Weijer R. Inhibition of hypoxia inducible factor 1 and topoisomerase with acriflavine sensitizes perihilar cholangiocarcinomas to photodynamic therapy / Weijer R., Broekgaarden M., Krekorian M., Alles L.K., Wijk A.C. van, Mackaaij C., Verheij J., Wal A.C. van der, Gulik T.M. van, Storm G., Heger M. // Oncotarget – 2016. – T. 7 – № 3 – C.3341–56.

186. Castano A. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity / Castano A., Mroz P., Hamblin M. // Nature Reviews Cancer – 2006. – T. 6 – № 7 – C.535–545.

187. Wu S. Cancer phototherapy via selective photoinactivation of respiratory chain oxidase to trigger a fatal superoxide anion burst. / Wu S., Zhou F., Wei Y., Chen W.R., Chen Q., Xing D. // Antioxidants & redox signaling – 2014. – T. 20 – № 5 – C.733–46.

188. Buytaert E. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. / Buytaert E., Dewaele M., Agostinis P. // Biochimica et biophysica acta – 2007. – T. 1776 – № 1 – C.86–107.

189. Agostinis P. Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis / Agostinis P., Buytaert E., Breyskens H., Hendrickx N. // Photochemical and Photobiological Sciences – 2004. – T. 3 – № 8 – C.721–729.

190. Al-Mutairi D.A. Induction of oxidative cell damage by photo-treatment with zinc *meta N* -methylpyridylporphyrin / Al-Mutairi D.A., Al-Mutairi D.A., Craik J.D., Batinic-Haberle I., Benov L.T. // Free Radical Research – 2007. – T. 41 – № 1 – C.89–96.

191. Almeida R.D. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. / Almeida R.D., Manadas B.J., Carvalho A.P., Duarte C.B. // Biochimica et biophysica acta – 2004. – T. 1704 – № 2 – C.59–86.

192. Florey E. Microanatomy of the abdominal stretch receptors of the crayfish (*Astacus fluviatilis* L.). / Florey E., Florey E. // The Journal of general physiology – 1955. – T. 39 – № 1 – C.69–85.

193. Uzdensky A.B. Responses of crayfish neurons and glial cells to photodynamic impact: Intracellular signaling, ultrastructural changes, and neuroglial interactions / Uzdensky A.B., Rudkovskii M. V., Fedorenko G.M., Berezhnaya E. V., Ischenko I.A., Kovaleva V.D., Komandirov M.A., Neginskaya M.A., Khaitin A.M., Sharifulina S.A. // *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology* – 2014. – T. 8 – № 1 – C.1–15.

194. Domijan A.-M. Lipid peroxidation is essential for phospholipase C activity and the inositol-trisphosphate-related Ca^{2+} signal. / Domijan A.-M., Kovac S., Abramov A.Y. // *Journal of cell science* – 2014. – T. 127 – № Pt 1 – C.21–6.

195. Uzdensky A. Protection of the Crayfish Mechanoreceptor Neuron and Glial Cells from Photooxidative Injury by Modulators of Diverse Signal Transduction Pathways / Uzdensky A., Berezhnaya E., Khaitin A., Kovaleva V., Komandirov M., Neginskaya M., Rudkovskii M., Sharifulina S. // *Molecular Neurobiology* – 2015. – T. 52 – № 2 – C.811–825.

196. Williams D.A. Confocal Ca^{2+} imaging of organelles, cells, tissues, and organs / Williams D.A., Bowser D.N., Petrou S. // *Methods in Enzymology* – 1999. – T. 307 – C.441–469.

197. Hamad M.I.K. Improving AM ester calcium dye loading efficiency / Hamad M.I.K., Krause M., Wahle P. // *Journal of Neuroscience Methods* – 2015. – T. 240 – C.48–60.

198. *Animals (Scientific Procedures) Act 1986.*

199. Paredes R.M. Chemical calcium indicators. / Paredes R.M., Etzler J.C., Watts L.T., Zheng W., Lechleiter J.D. // *Methods (San Diego, Calif.)* – 2008. – T. 46 – № 3 – C.143–51.

200. Zhao H. Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide / Zhao H., Kalivendi S., Zhang H., Joseph J., Nithipatikom K., Vásquez-Vivar J., Kalyanaraman B. // *Free Radical Biology and Medicine* – 2003. – T. 34 – № 11 – C.1359–1368.

201. Robinson K.M. Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using

ethidium-based probes. / Robinson K.M., Janes M.S., Pehar M., Monette J.S., Ross M.F., Hagen T.M., Murphy M.P., Beckman J.S. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America – 2006. – T. 103 – № 41 – C.15038–43.

202. Bartolomé F. Measurement of mitochondrial NADH and FAD autofluorescence in live cells. / Bartolomé F., Abramov A.Y. // Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) – 2015. – T. 1264 – C.263–70.

203. Scaduto R.C. Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. / Scaduto R.C., Grotyohann L.W., Grotyohann L.W. // Biophysical journal – 1999. – T. 76 – № 1 Pt 1 – C.469–77.

204. Keelan J. Quantitative imaging of glutathione in hippocampal neurons and glia in culture using monochlorobimane / Keelan J., Allen N.J., Antcliffe D., Pal S., Duchon M.R. // Journal of Neuroscience Research – 2001. – T. 66 – № 5 – C.873–884.

205. Drummen G.P.. C11-BODIPY581/591, an oxidation-sensitive fluorescent lipid peroxidation probe: (micro)spectroscopic characterization and validation of methodology / Drummen G.P., Liebergen L.C.. van, Op den Kamp J.A., Post J.A. // Free Radical Biology and Medicine – 2002. – T. 33 – № 4 – C.473–490.

206. Uzdensky A. Involvement of Ca²⁺- and cyclic adenosine monophosphate-mediated signaling pathways in photodynamic injury of isolated crayfish neuron and satellite glial cells. / Uzdensky A., Lobanov A., Bibov M., Petin Y. // Journal of neuroscience research – 2007. – T. 85 – № 4 – C.860–70.

207. Bernardi P. The Mitochondrial Permeability Transition Pore: Channel Formation by F-ATP Synthase, Integration in Signal Transduction, and Role in Pathophysiology. / Bernardi P., Rasola A., Forte M., Lippe G. // Physiological reviews – 2015. – T. 95 – № 4 – C.1111–1155.

208. Dumont E. Understanding DNA under oxidative stress and sensitization: the role of molecular modeling. / Dumont E., Monari A. // Frontiers in chemistry – 2015. – T. 3 – № July – C.43.

209. Uzdensky A. Photodynamic inactivation of isolated crayfish mechanoreceptor neuron: different death modes under different photosensitizer

concentrations. / Uzdensky A., Bragin D., Kolosov M., Dergacheva O., Fedorenko G., Zhavoronkova A. // *Photochemistry and photobiology* – 2002. – Т. 76 – № 4 – С.431–7.

210. Гиниатуллин Р.У. Морфологическая характеристика головного мозга крыс после трансплантации им злокачественных опухолей головного мозга человека (экспериментальное исследование) / Гиниатуллин Р.У., Исмагилова С.Т., Еремеев Д.В., Астахова Л.В. // *Вестник новых медицинских технологий* – 2008. – Т. 15 – № 1 – С.13–14.

211. Xue Q. Role of p38MAPK in apoptosis and autophagy responses to photodynamic therapy with Chlorin e6 / Xue Q., Wang X., Wang P., Zhang K., Liu Q. // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* – 2015. – Т. 12 – № 1 – С.84–91.

212. Lee H.M. Defensive mechanism in cholangiocarcinoma cells against oxidative stress induced by chlorin e6-based photodynamic therapy. / Lee H.M., Chung C.-W., Kim C.H., Kim D.H., Kwak T.W., Jeong Y.-I., Kang D.H. // *Drug design, development and therapy* – 2014. – Т. 8 – С.1451–62.

213. Mojzisoва H. Photosensitizing properties of chlorins in solution and in membrane-mimicking systems / Mojzisoва H., Bonneau S., Maillard P., Brault D. // *Photochemical & Photobiological Sciences* – 2009. – Т. 8 – № 6 – С.778.

214. Belzacq A.S. Apoptosis induction by the photosensitizer verteporfin: identification of mitochondrial adenine nucleotide translocator as a critical target. / Belzacq A.S., Jacotot E., Vieira H.L., Mistro D., Granville D.J., Xie Z., Reed J.C., Kroemer G., Brenner C. // *Cancer research* – 2001. – Т. 61 – № 4 – С.1260–4.

215. Surin A.M. Poly(ADP-ribose)polymerase-1 (PARP-1) impact on glutamate-induced disturbance of calcium concentration in cultured neurons Leipzig, 2016.

216. Kaltschmidt B. NF-kappaB in the nervous system. // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2009. – Т. 1. – № 3. – 649–652с.

217. Mattson M.P. NF-??B in the survival and plasticity of neurons / Mattson M.P. // *Neurochemical Research* – 2005. – Т. 30 – № 6–7 – С.883–893.

218. Camandola S. NF-kappa B as a therapeutic target in neurodegenerative diseases. / Camandola S., Mattson M.P. // *Expert opinion on therapeutic targets* – 2007. – Т. 11 – № 2 – С.123–132.

219. Pahl H.L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. / Pahl H.L. // *Oncogene* – 1999. – T. 18 – № 49 – C.6853–66.
220. Kaltschmidt B. Signaling via NF-kappaB in the nervous system. / Kaltschmidt B., Widera D., Kaltschmidt C. // *Biochimica et biophysica acta* – 2005. – T. 1745 – № 3 – C.287–99.
221. QIN Z. Dual roles of NF-κB in cell survival and implications of NF-κB inhibitors in neuroprotective therapy / QIN Z., TAO L., CHEN X. // *Acta Pharmacologica Sinica* – 2007. – T. 28 – № 12 – C.1859–1872.
222. Gu J.-H. Inhibition of NF-κB activation is associated with anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of Ginkgolide B in a mouse model of cerebral ischemia/reperfusion injury / Gu J.-H., Ge J.-B., Li M., Wu F., Zhang W., Qin Z.-H. // *European Journal of Pharmaceutical Sciences* – 2012. – T. 47 – № 4 – C.652–660.
223. Takuma K. Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection / Takuma K., Baba A., Matsuda T. // *Progress in Neurobiology* – 2004. – T. 72 – № 2 – C.111–127.
224. Volanti C. Involvement of oxidative stress in NF-kappaB activation in endothelial cells treated by photodynamic therapy. / Volanti C., Matroule J.-Y., Piette J. // *Photochemistry and photobiology* – 2002. – T. 75 – № 1 – C.36–45.
225. Matroule J.Y. Role of nuclear factor-kappa B in colon cancer cell apoptosis mediated by aminopyropheophorbide photosensitization. / Matroule J.Y., Hellin A.C., Morlière P., Fabiano A.S., Santus R., Merville M.P., Piette J. // *Photochemistry and photobiology* – 1999. – T. 70 – № 4 – C.540–8.
226. Ryter S.W. Nuclear factor kappa B binding activity in mouse L1210 cells following photofrin II-mediated photosensitization. / Ryter S.W., Gomer C.J. // *Photochemistry and photobiology* – 1993. – T. 58 – № 5 – C.753–6.
227. Kovaleva V. Involvement of nitric oxide in photodynamic injury of neurons and glial cells. / Kovaleva V., Berezhnaya E., Komandirov M., Rudkovskii M., Uzdensky A. // *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* – 2013. – T. 29 – C.46–52.
228. Lobanov A. V. Protection of crayfish glial cells but not neurons from

photodynamic injury by nerve growth factor / Lobanov A. V., Uzdensky A.B. // *Journal of Molecular Neuroscience* – 2009. – T. 39 – № 1–2 – C.308–319.

229. Uzdensky A. Protection Effect of GDNF and Neurturin on Photosensitized Crayfish Neurons and Glial Cells / Uzdensky A., Komandirov M., Fedorenko G., Lobanov A. // *Journal of Molecular Neuroscience* – 2013. – T. 49 – № 3 – C.480–490.

230. Chu L.-F. Ischemic brain cell-derived conditioned medium protects astrocytes against ischemia through GDNF/ERK/NF- κ B signaling pathway / Chu L.-F., Wang W.-T., Ghanta V.K., Lin C.-H., Chiang Y.-Y., Hsueh C.-M. // *Brain Research* – 2008. – T. 1239 – C.24–35.

231. Komandirov M.A. On the role of phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase b/Akt, and glycogen synthase kinase-3 β in photodynamic injury of crayfish neurons and glial cells / Komandirov M.A., Knyazeva E.A., Fedorenko Y.P., Rudkovskii M. V., Stetsurin D.A., Uzdensky A.B. // *Journal of Molecular Neuroscience* – 2011. – T. 45 – № 2 – C.229–235.

232. Yamashima T. Hsp70.1 and related lysosomal factors for necrotic neuronal death. / Yamashima T. // *Journal of neurochemistry* – 2012. – T. 120 – № 4 – C.477–94.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю – проф. Узденскому Анатолию Борисовичу, а также проф. Абрамову Андрею Юрьевичу и сотрудникам лаборатории «Молекулярная нейробиология», Негинской М.А., Ковалёвой В.Д., Рудковскому М.В., Командирову М.А., Ищенко И.А. за оказанную помощь в выполнении диссертационной работы.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа была поддержана грантами РФФИ № 11-04-01476, 14-04-32270, 14-04-00741 и 16-34-01145.