

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования

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

На правах рукописи



Негинская Мария Александровна

МЕХАНИЗМЫ КАЛЬЦИЕВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ НЕЙРОНОВ И
АСТРОЦИТОВ ПРИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ
РАДАХЛОРИНА

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.....	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1 Фотодинамическая терапия	12
1.1.1 Фотофизические и фотохимические механизмы при ФДТ	12
1.1.2 Фотосенсибилизаторы, используемые для ФДТ	14
1.1.3 Внутриклеточная локализация фотосенсибилизатора при ФДТ	15
1.1.4 Активные формы кислорода и окислительный стресс	17
1.1.5 Окислительный стресс клеток при ФДТ.....	20
1.1.6 Перекисное окисление липидов	21
1.1.7 Радахлорин как фотосенсибилизатор	22
1.1.8 Механизмы ФД-индуцированной клеточной гибели	23
1.2 Кальциевая сигнализация в клетках.....	28
1.2.1 Кальциевые насосы и обменники.....	30
1.2.2 Кальциевые каналы.....	31
1.2.2.1 Кальциевые каналы плазматической мембраны	31
1.2.2.2 Внутриклеточные кальциевые каналы	33
1.2.3 Митохондрии и кальциевая сигнализация	34
1.2.4 Роль Ca^{2+} при ФДТ	35
1.3 ФДТ опухолей мозга.....	37
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	41
2.1 Используемые реактивы.....	41
2.2 Объекты исследования	41
2.3 Фотодинамическое воздействие.....	44
2.3.1 Исследование динамики накопления и выведения радахлорина	45
2.3.2 Исследование импульсной активности нейронов при фотодинамическом воздействии.....	46

2.3.3	Определение типа клеточной гибели нейронов и глиальных клеток.....	47
2.3.4	Фотодинамическое воздействие на культуры нейронов и астроцитов.....	47
2.4	Исследование динамики параметров клеток флуоресцентными зондами....	49
2.4.1	Общая схема эксперимента.....	49
2.4.2	Флуоресцентные кальциевые зонды	50
2.4.2.1	Определение содержания Ca^{2+} в цитозоле	51
2.4.2.2	Определение содержания Ca^{2+} в митохондриях	52
2.4.3	Регистрация изменения скорости перекисного окисления липидов	53
2.4.4	Определение митохондриального потенциала	55
2.5	Ингибиторный анализ.....	56
2.6	Статистический анализ.....	57
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ		58
3.1	Исследование фотодинамического воздействия радахлорина на нейроны и глиальные клетки	58
3.1.1	Спектральные характеристики радахлорина	58
3.1.2	Внутриклеточное распределение радахлорина в нейронах и глиальных клетках.....	60
3.1.3	Динамика накопления и выведения радахлорина в нервной ткани.....	60
3.1.4	Биоэлектрические реакции нейронов на ФД воздействие радахлорина	63
3.1.5	Фотоиндуцируемая гибель нейронов и глиальных клеток.....	64
3.2	Изменение уровня ионов кальция в нейронах и астроцитах при ФД воздействии.....	68
3.2.1	Изменение уровня цитозольного кальция в нейронах и астроцитах при ФД воздействии радахлорина	68
3.2.2	Вклад внеклеточных ионов кальция в ответ нейронов и астроцитов на ФД воздействие	75
3.2.2.1	Роль NMDA рецепторов в фотоиндуцируемом повышении $[Ca^{2+}]_c$ нейронов и астроцитов	75
3.2.2.2	Фотоиндуцируемый вход ионов кальция в нейроны и астроциты из внеклеточного пространства.....	77

3.2.3 Вклад кальциевого депо ЭР в фотоиндуцируемый кальциевый ответ нейронов и астроцитов	84
3.2.4 Участие фосфолипазы С в кальциевом ответе на фотодинамическое воздействие	87
3.2.5 Роль АФК в ответе нейронов и астроцитов на ФД воздействие радахлорина	90
3.2.6 Изменение скорости перекисного окисления липидов при ФД воздействии радахлорина	93
3.2.7 Исследование участия митохондрий в ответе нейронов и астроцитов на ФД воздействие	95
3.2.7.1 Изменения $[Ca^{2+}]_m$ в ответ на ФД воздействие радахлорина	95
3.2.7.2 Изменения трансмембранного митохондриального потенциала при ФД воздействии.....	99
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	104
4.1 Эффективность ФД воздействия радахлорина на нервные клетки	104
4.2 Роль Ca^{2+} в ответе нейронов и астроцитов на ФД воздействие радахлорина	106
4.3 Роль митохондрий в ответе нейронов и астроцитов на ФД воздействие радахлорина	110
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	112
ВЫВОДЫ	115
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	116

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АМ – ацетоксиметильные эфиры зондов

АФК – активный формы кислорода

ГК – глиальные клетки

МП – миелопероксидазы

МРН – механорецепторный нейрон

НАДН – никотинамидадениндинуклеотид

ОС – окислительный стресс

ПД – потенциал действия

ПОЛ – перекисное окисление липидов

СОД – супероксиддисмутаза

СР – саркоплазматический ретикулум

ФД – фотодинамический

ФДД – фотодинамическая диагностика

ФДТ – фотодинамическая терапия

ФС – фотосенсибилизатор

ЦНС – центральная нервная система

ЦТК – цикл трикарбоновых кислот

ЭР – эндоплазматический ретикулум

$[Ca^{2+}]_m$ – концентрация ионов кальция в митохондриях

$[Ca^{2+}]_c$ – концентрация ионов кальция в цитозоле

ALA – аминолевулиновая кислота

Ca^{2+} –ион кальция

Glu – глутамат

GSH – глутатион

GSH-пероксидаза – глутатионпероксидаза

GSSG – глутатион окисленный

HrD – производные гематопорфирина

IP3 – инозитол-1,4,5-трифосфат

K_d – константа диссоциации

LDL – липопротеины низкой плотности

MCU – митохондриальный кальциевый унипортер

NCKX – $\text{Na}^+/\text{Ca}^+/\text{K}^+$ обменник

NCX – $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменник

PLC – фосфолипаза C

PMCA – Ca^{2+} -АТФаза плазматической мембраны

PTP – высокопроницаемая митохондриальная пора

Rh123 – родамин 123

ROC – рецептор-управляемые кальциевые каналы плазматической мембраны

Ry – рианодин

SERCA – Ca^{2+} -АТФаза сарко/эндоплазматического ретикулума

SOC – кальциевые каналы, управляемые опустошением депо ретикулума

VOC – потенциал-зависимые кальциевые каналы плазматической мембраны

$\Delta\Psi_M$ – трансмембранный митохондриальный потенциал

$\lambda_{\text{возб}}$ – длина волны возбуждения зонда

$\lambda_{\text{рег}}$ – длина волны регистрации сигнала зонда

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Фотодинамическая терапия (ФДТ) – широко применяемый в медицине способ селективного разрушения патологических клеток, окрашенных фотосенсибилизатором (ФС), под действием лазерного излучения. Фотовозбуждение молекулы ФС вызывает интенсивную генерацию синглетного кислорода и других активных форм кислорода (АФК), что ведет к гибели клеток вследствие окислительного стресса (ОС) [1–4]. Селективность накопления фотосенсибилизатора в опухоли и локальность облучения позволяют избирательно разрушать патологическую ткань, что делает этот метод подходящим для лечения опухолей мозга [5]. Однако в процессе фотодинамической терапии может повреждаться и здоровая нервная ткань, окружающая опухоль. Поэтому оптимизация ФДТ для лечения опухолей мозга является важной задачей современной медицины. Для оптимизации фотодинамического (ФД) воздействия необходимо изучение сигнальных механизмов реакций и здоровых нейронов и астроцитов, окружающих опухоль.

Ионы кальция являются важнейшим вторичным мессенджером, который регулирует множество процессов во всех эукариотических клетках [6]. В нервной ткани кальциевая система сигнализации играет особо важную роль, так как участвует в распространении деполяризации мембраны и синаптической активности. Многие биохимические и физиологические процессы в нервной ткани так или иначе контролируются кальциевой сигнальной системой [7].

В ответ на ФД воздействие во многих типах опухолевых клеток наблюдается повышение уровня Ca^{2+} в цитозоле, вызванное активацией каналов плазматической мембраны или опустошением внутриклеточных кальциевых депо [8–10]. Однако механизмы изменения уровня Ca^{2+} здоровых нейронов и глиальных клеток, вызванного ФДТ, до настоящего времени остается практически не изученным.

В данной работе изучено фотодинамическое воздействие радахлорина на нейроны и глиальные клетки, а также некоторые механизмы фотоиндуцированных изменений уровня внутриклеточного кальция в этих клетках.

Цель работы:

Исследовать влияние фотодинамического воздействия радахлорина на нейроны и глиальные клетки, распределение и накопление радахлорина в нервной ткани, а также механизмы кальциевой сигнализации нейронов и глиальных клеток в реакциях на фотодинамическое воздействие.

Задачи исследования:

1. Изучить локализацию и динамику накопления и выведения радахлорина в нервной ткани.
2. Изучить концентрационную зависимость фотодинамического воздействия радахлорина на нейрональную активность рецептора растяжения речного рака.
3. Изучить фотоиндуцированный некроз и апоптоз нейронов и глиальных клеток механорецептора речного рака.
4. Исследовать изменения внутриклеточного уровня ионов кальция в культивируемых нейронах и астроцитах коры головного мозга крысы при фотодинамическом воздействии.
5. Оценить вклад входа ионов кальция через плазматическую мембрану, а также вклад эндоплазматического ретикулула в фотоиндуцируемое изменение уровня внутриклеточного кальция в культивируемых нейронах и астроцитах.
6. Исследовать роль активных форм кислорода, перекисного окисления липидов, фосфолипазы C в повышении уровня внутриклеточного кальция в ответ на фотодинамическое воздействие.
7. Исследовать связь фотоиндуцированного повышения уровня кальция в цитозоле культивируемых нейронов и астроцитов с уровнем митохондриального кальция и трансмембранным митохондриальным потенциалом.

8. Построить концептуальную схему участия ионов кальция в реакциях нейронов и глиальных клеток на фотодинамическое воздействие.

Научная новизна результатов исследования

Впервые показано, что фотосенсибилизатор радахлорин быстро накапливается в нервной ткани (в течение первых 30 мин) и локализуется в основном в глиальной оболочке нейронов и в дендритах рецептора растяжения речного рака. ФД воздействие радахлорина прекращает импульсную активность нейронов и вызывает некроз нейронов, и некроз и апоптоз глиальных клеток даже в субнанолярных концентрациях. ФД воздействие радахлорина вызывает изменение уровня внутриклеточного кальция в культивируемых нейронах коры головного мозга крысы. Показано, что фотоиндуцируемое повышение уровня кальция в цитозоле нервных клеток происходит вследствие генерации активных форм кислорода и, вероятно, инициации перекисного окисления липидов мембран нейронов и астроцитов. Повышение уровня ионов кальция в цитозоле нейронов опосредовано фосфолипазой C, которая производит инозитол-1,4,5-трифосфат, активирующий кальциевые каналы эндоплазматического ретикулула. Показано, что повышение концентрации кальция в цитозоле нейронов и астроцитов приводит к изменению уровня ионов Ca^{2+} в митохондриях и падению митохондриального потенциала, что может приводить к открытию высокопроницаемой митохондриальной поры. Ca^{2+} -зависимый сигнальный механизм, опосредованный активацией фосфолипазы C, вовлечен в ответ нейронов и глии на ФД воздействие, а также в фотоиндуцированную клеточную гибель.

Научно-практическая значимость

Полученные результаты о высокой фотодинамической эффективности воздействия радахлорина на нормальную нервную ткань целесообразно учитывать при разработке методов фотодинамической терапии. Полученные данные о механизме фотоиндуцированного повышения уровня внутриклеточного кальция в нейронах могут быть использованы для оптимизации режимов фотодинамической терапии путем фармакологической модуляции.

Результаты работы получены при выполнении гранта РФФИ № 14-04-32270.

Данные о механизмах влияния фотодинамического воздействия на нервную ткань использованы в спецкурсе по фотобиологии и фотомедицине Южного федерального университета.

Основные положения, выносимые на защиту

Радахлорин быстро накапливается в нервной ткани речного рака, в основном, в глиальных клетках и нейрональной мембране.

Фотодинамическое воздействие субнанолярных концентраций радахлорина подавляет импульсную активность и вызывает некроз механорецепторных нейронов.

Фотодинамическое воздействие радахлорина вызывает некроз и апоптоз глиальных клеток механорецептора рака.

Фотодинамическое воздействие радахлорина индуцирует генерацию активных форм кислорода и перекисное окисление липидов в нейронах и астроцитах коры мозга крысы.

Фотодинамическое воздействие радахлорина вызывает осцилляции внутриклеточной концентрации ионов кальция в нейронах и астроцитах, обусловленные активацией фосфолипазы C и выходом ионов кальция из эндоплазматического ретикулума в цитозоль.

Фотодинамическое воздействие радахлорина вызывает увеличение концентрации ионов кальция в митохондриях и падение трансмембранного митохондриального потенциала нейронов и астроцитов коры мозга крысы.

Апробация диссертационной работы

Материалы диссертации представлены на всероссийских и международных конференциях: Международная научная школа «Горизонты современных нейронаук» (Нижний Новгород, Россия, 2014), Saratov Fall Meeting SFM'14 (Саратов, Россия, 2014), IBRO - 9th World Congress International Brain Research Organization (Рио-де-Жанейро, Бразилия, 2015), XII European Meeting on Glial Cells in Health and Disease (Бильбао, Испания, 2015), FENS 2016 (Копенгаген,

Дания, 2016), 20-я международная Пушкинская школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, Россия, 2016), 13th International Conference on Neuroprotective Agents (Бильбао, Испания, 2016), V Съезд физиологов СНГ, V Съезд биохимиков России, Конференция ADFLIM (Дагомыс, Россия, 2016) а также на семинаре в Институте Неврологии Университетского Колледжа Лондона (2015).

Публикации

По теме работы имеется 20 публикаций, 8 из них - в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Фотодинамическая терапия

1.1.1 Фотофизические и фотохимические механизмы при ФДТ

Фотодинамическая терапия – это вид терапии, широко применяемый в современной медицине для лечения доброкачественных и злокачественных новообразований. ФДТ основана на фотодинамическом эффекте [1, 4].

ФД эффект включает в себя три составляющих: фотосенсибилизатор, свет и кислород. Ни один из этих компонентов не токсичен сам по себе, но сочетание действия этих факторов приводит к фотохимической реакции, в результате которой образуется высоко активный синглетный кислород [11].

Молекула ФС является синглетной в основном состоянии и содержит два электрона с противоположными спинами. Поглощение кванта света с определенной энергией (длиной волны) приводит к переходу одного из электронов на следующую орбиталь и, таким образом, к переходу молекулы ФС в возбужденное синглетное состояние (рисунок 1.1). Это состояние молекулы ФС очень нестабильно, и молекула расходует избыток энергии на флуоресцентный переход или тепловое рассеяние. Молекула ФС из возбужденного синглетного состояния также может путем интеркомбинационной конверсии перейти в метастабильное возбужденное триплетное состояние с параллельными спинами электронов (рисунок 1.1). Триплетное состояние может релаксировать в основное с испусканием фотона, но этот переход является «запрещенным», поэтому возбужденное триплетное состояние является намного более долгоживущим (время жизни составляет мкс) по сравнению с возбужденным синглетным состоянием (время жизни составляет нс) [12]. При столкновении возбужденной молекулы фотосенсибилизатора с молекулой кислорода энергия с молекулы ФС переходит

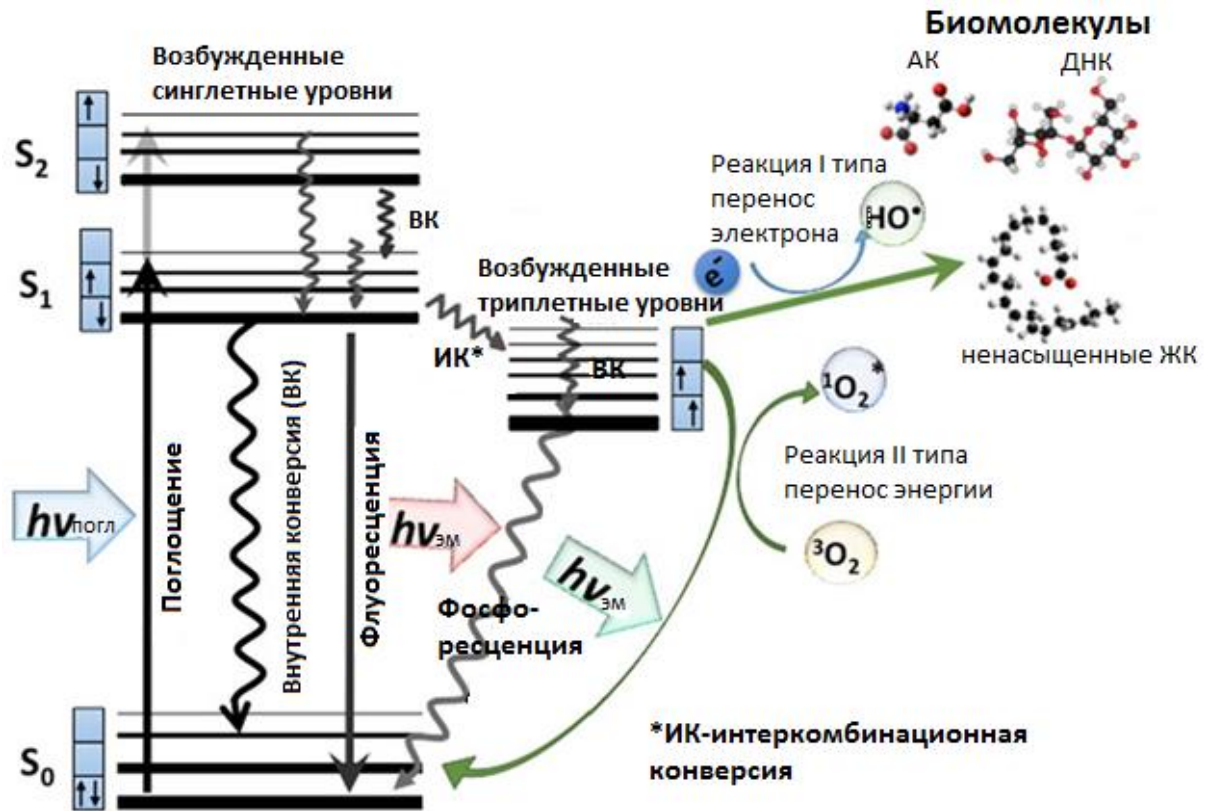


Рисунок 1.1 – Схема перехода молекулы фотосенсибилизатора в возбужденное состояние, генерации активных форм кислорода и повреждения биомолекул. Адаптировано по [2]

на молекулу кислорода, в результате чего образуется синглетный кислород, а ФС переходит в основное состояние. Это реакция по типу II [13, 14]. Реакция типа I происходит, когда возбужденное состояние ФС вступает в донорно-акцепторное взаимодействие, в результате образуются АФК. Механизм реакции типа I при ФД эффекте заключается в отдаче или захвате электрона и формировании катион-радикала или анион-радикала, которые в свою очередь вступая в реакцию с биомолекулами образуют активные формы кислорода такие как супероксид анион, перекись водорода, гидроксильные радикалы и т.д. Генерация АФК по II типу реакции является более химически простой, таким образом считается, что большинство ФС при ФДТ действуют по II типу реакции, формируя синглетный кислород [11].

1.1.2 Фотосенсибилизаторы, используемые для ФДТ

Текущая эра ФДТ началась с исследований Липсона и Шварца в клинике Майо в 1960 году. Они заметили, что инъекции гематопорфирина приводят к флуоресценции новообразований. Для достижения оптимальной локализации в опухоли Шварц подверг гематопорфирин обработке уксусной и серной кислотами и получил смесь, которую назвал «производное гематопорфирина» (HrD). Липсон использовал HrD для обнаружения опухолей [15–17].

Первый ФС – Фотофрин (Photofrin) – также является HrD, очищенным от менее активных мономеров порфиринов. Фотофрин и в наши дни является часто используемым ФС, несмотря на то, что он имеет множество недостатков. Среди них фоточувствительность кожи, которая может сохраняться на длительное время (от недель до месяцев), сравнительно малый пик поглощения на длине волны 630 нм и, как следствие, плохое проникновение в ткани [11, 18].

В разработке новых веществ для использования в качестве ФС для ФДТ стремятся достигнуть определенных свойств. Идеальный ФС должен быть легкого воспроизводимым чистым веществом, долго сохраняющим свои качества. Пик поглощения ФС должен находиться в пределах длин волн от 650 до 800 нм

для лучшего проникновения в ткани. Кроме того, фотоны с длиной волны более 800 нм не обладают энергией, достаточной для возбуждения молекулы кислорода. ФС должен иметь квазистабильное триплетное состояние для активной генерации АФК в процессе облучения, а также сравнительно большую скорость выведения из нормальной ткани. Также должна отсутствовать токсичность в темновых условиях. При соблюдении всех этих требований побочные эффекты при ФДТ сводятся к минимуму [4, 19].

В настоящее время для ФДТ используются различные тетрапиррольные соединения как порфирины, хлорины, бактериохлорины и фталоцианины. В зависимости от структуры полоса поглощения различных ФС лежит в пределах от 600 до 800 нм. Так как проникновение света в ткань пропорционально длине волны, то вещества с полосой поглощения дальней красной области спектра, такие как хлорины, бактериохлорины и фталоцианины, наиболее предпочтительны для использования в качестве ФС [2].

1.1.3 Внутриклеточная локализация фотосенсибилизатора при ФДТ

Большинство современных ФС при ФДТ вырабатывают активные формы кислорода в основном по реакции II типа. Считается, что в результате данной реакции образуется в основном синглетный кислород [20].

Время жизни синглетного кислорода $^1\text{O}_2$ достаточно мало ($\sim 10 - 320$ нс), что ограничивает его распространение по биологической ткани до расстояния на 10-55 нм [20, 21]. Таким образом ФД эффект при терапии достигается в непосредственной близости от места накопления ФС в клетках [22].

Самые эффективные ФС являются гидрофобными веществами, которые проникают в клетки опухоли и локализуются в мембранах внутриклеточных органелл, таких как митохондрии и эндоплазматический ретикулум (ЭР). Более полярные вещества имеют тенденцию захватываться эндоцитозом, этот процесс занимает больше времени, чем пассивная диффузия, соответственно для

полярных ФС нужен большой промежуток времени между введением ФС и началом облучения опухоли [23].

Для объяснения локализации ФС в опухолевых тканях было предложено несколько гипотез. Одно из объяснений заключается в том, что в процессе ангиогенеза опухоли образуется разветвленная сосудистая сеть, что в сочетании с отсутствием лимфатического дренажа в опухолях это приводит к большому накоплению ФС в патологических тканях [1, 24, 25]. Также обнаружено, что порфириновые ФС, встроенные в липопротеины низкой плотности (LDL) обладают лучшей селективностью накопления в клетках опухоли благодаря повышенной экспрессии рецепторов LDL в патологических клетках. Это позволяет подобным ФС локализоваться во внутриклеточных структурах, таких как липосомы и митохондрии [26, 27].

Один из наиболее применяемых в медицине ФС, фотофрин, как сложная смесь порфириновых эфиров, имеет множество областей локализации, но в основном связывается с липидной мембраной. Из других, наиболее применяемых в настоящее время ФС, хлорин NРe6 повреждает лизосомы, производные бензопорфирина – митохондрии, производное хлорина mTHPC также локализуется в митохондриях, эндоплазматическом ретикулуме или в обеих органеллах сразу, фталоцианины имеют широкий спектр аффинности, но считается, что в основном травмируют митохондрии. Специфичность локализации различных фотосенсибилизаторов может варьироваться также в зависимости от типа клеток [11].

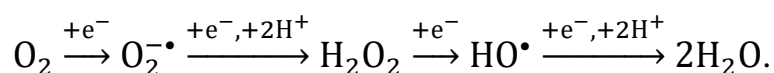
Считается, что внутриклеточная локализация ФС в различных органеллах (митохондриях, лизосомах, эндоплазматическом ретикулуме, плазматической мембране) играет главную роль в типе клеточной гибели при ФДТ. Однако, такие факторы как доза ФДТ (концентрация \times плотность потока мощности излучения), промежуток времени между введением препарата и облучением также очень важны [2, 28, 29]. В зависимости от локализации ФС фотодинамическая терапия может вызывать три различных типа клеточной смерти: апоптоз, некроз и аутофагическую гибель.

1.1.4 Активные формы кислорода и окислительный стресс

При ФДТ вырабатываются активные формы кислорода, что может приводить к окислительному повреждению клетки. Однако АФК и свободные радикалы вырабатываются клетками живых организмов и при нормальных условиях в процессе жизнедеятельности, поэтому для предотвращения окислительного стресса в клетках существует также мощная антиоксидантная защита [30].

В живых системах существует множество типов свободных радикалов, в том числе радикалов кислорода. Радикалы кислорода участвуют как в физиологических функциях организма, так и во многих патологических процессах [31, 32]. Свободные радикалы – это молекулярные частицы с неспаренным (одиночным) электроном на внешней электронной оболочке. Наличие неспаренного электрона делает эти частицы крайне реакционными [33]. В литературе встречается множество терминов, описывающих радикалы кислорода и другие активные производные кислорода (не радикалы), такие как $^1\text{O}_2$ и H_2O_2 . Термин «активные формы кислорода» включает в себя не только радикалы кислорода, но и другие нерадикальные производные O_2 . Таким образом, все радикалы кислорода являются АФК, но не все АФК – радикалы кислорода. Основными АФК считаются: супероксидный радикал $\text{O}_2^{\bullet-}$, синглетный кислород $^1\text{O}_2$, гидроксильный OH^{\bullet} и пероксидный HO_2^{\bullet} радикалы, перекись водорода H_2O_2 , пероксидный ион HO_2^- , гипохлорит HOCl [30, 31].

В клетке существует множество источников АФК. Наибольший вклад в генерацию вносит дыхательная цепь митохондрий, где наряду с четырехэлектронным восстановлением молекулы O_2 до воды, происходит и одно-трехэлектронное восстановление с последовательным образованием различных АФК [34]:

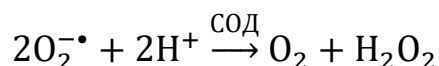


Генерация активных форм кислорода происходит во всех частях клетки. Вклад вносит системы цитохрома P-450 в эндоплазматическом ретикулуме, АФК активно производятся в мембранах фагоцитов при помощи НАДФН-оксидазного ферментативного комплекса:

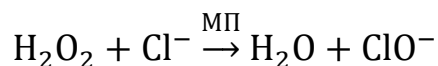


Образованный супероксид-радикал наносит вред как микроорганизмам, активировавшим фагоцит, так и самому фагоциту, и окружающим клеткам [32, 34].

Для защиты от негативного действия супероксида в клетках вырабатываются ферменты супероксиддисмутазы (СОД), которые катализируют реакцию с образованием перекиси водорода:

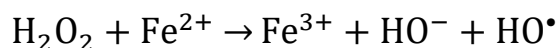


Перекись водорода не очень активна сама по себе, однако используется в реакции в фагоцитах для выработки гипохлорита при помощи фермента миелопероксидазы (МП):



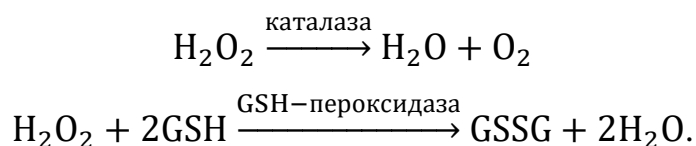
Гипохлорит используется в дальнейшем для уничтожения бактерий фагоцитами. Однако при реакции с ионами железа может образовывать гидроксил-радикал (HO^\bullet), который быстро вступает в реакции с окружающими его структурами, повреждая их. Гидроксил-радикал разрушает мембраны клеток, инициируя перекисное окисление липидов (ПОЛ), а также вызывает денатурацию белков, инактивацию ферментов и повреждение ДНК и РНК клеток [33, 35–37].

Перекись водорода также может образовывать HO^\bullet , вступая в реакции с ионами металла (реакция Фентона):



Донором электрона при образовании гидроксил-радикала из перекиси водорода может стать так же и $\text{O}_2^- \bullet$ [34].

Для быстрой утилизации H_2O_2 и предотвращения реакций с образованием гидроксил-радикала в клетке происходят реакции с участием ферментов каталазы и глутатионпероксидазы (GSH-пероксидазы) [30, 32–35]:



Одна из наиболее реакционных АФК, синглетный кислород $^1\text{O}_2$, может образовываться в клетке путем сообщения молекуле дополнительной энергии, под действием которой спины электронов на внешней орбитали молекулы кислорода перестраиваются, что повышает способность вступать в реакцию. $^1\text{O}_2$ может непосредственно повреждать белки, ДНК и липиды [30, 38].

Когда в клетке нарушается баланс между производством АФК и уровнем антиоксидантной активности, возникает состояние, которое называется «окислительный стресс». При окислительном стрессе избыточные АФК могут атаковать различные субстраты клетки, что приводит к окислению белков, ДНК и РНК, а также к ПОЛ [39]. Таким образом, ОС проявляется в накоплении поврежденных оснований ДНК, продуктов окисления белков и перекисного окисления. Кроме того, ОС приводит к снижению уровня антиоксидантов и, в связи с этим, повышению восприимчивости мембран клеток к воздействию АФК [32, 37].

АФК также могут действовать как сигнальные молекулы, запускающие механизмы, поддерживающие выживание клетки в неблагоприятных условиях [40]. АФК могут приводить к изменениям в активности ферментов, транскрипции генов, метаболизме и передаче сигналов. Генерация АФК в пределах физиологической нормы необходима для адаптации к стрессу, нормального развития организма и регуляции жизнедеятельности [41–44].

1.1.5 Окислительный стресс клеток при ФДТ

Способность АФК вступать в реакции с различными субстратами используется при ФДТ для разрушения клеток рака и лечения локальных инфекционных заболеваний. Преобладающий тип активных форм кислорода, вырабатываемый фотосенсибилизатором, зависит от типа реакции и концентрации кислорода в месте облучения при ФДТ. При реакциях I типа в основном образуется супероксид ($O_2^{\bullet-}$), а при реакциях II типа синглетный кислород (1O_2) [45, 46].

В клетках развиты механизмы защиты от окислительного стресса вследствие выработки супероксида, такие как превращение $O_2^{\bullet-}$ в перекись водорода H_2O_2 при помощи СОД. H_2O_2 в свою очередь убирается из клетки с помощью ферментативных реакций (например, при помощи каталаз) и при помощи GSH-пероксидазы во избежание реакции Фентона и формирования высоко реактивного гидроксил-радикала HO^{\bullet} [36].

Генерация $O_2^{\bullet-}$ при ФДТ может привести к каскаду образования различных АФК, каждый из которых обладает уникальными свойствами и основными биологическими мишенями [46]. Сам $O_2^{\bullet-}$ обладает зарядом, поэтому слабо проникает через мембраны, тогда как молекула H_2O_2 нейтральна и может свободно диффундировать сквозь биомембраны. В реакциях с ионами железа из перекиси водорода образуется HO^{\bullet} , который наибольшей цитотоксичностью. Гидроксил-радикал действует на SH-группы, гистидиновые и другие остатки аминокислот приводит к инактивации ферментов и денатурации белков. Кроме того, HO^{\bullet} приводит к разрывам ДНК и РНК, окислению оснований, что может привести к мутациям в клетке. В двойном липидном слое мембран гидроксил-радикал инициирует перекисное окисление липидов [37, 47].

При протонировании супероксида в кислой среде образуется гидроперекисный радикал HO_2^{\bullet} , который обладает более сильными окислительными свойствами по сравнению с $O_2^{\bullet-}$ и способен пересекать биологические мембраны и свободно диффундировать между органеллами

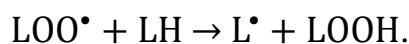
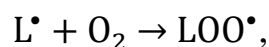
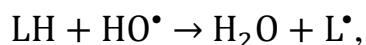
клетки. HO_2^\bullet вступает в реакцию с линолевой, линоленовой, арахидоновой кислотами, окисляя их до гидроперекисей [31, 48].

Наиболее реакционной формой АФК считается синглетный кислород, реакции с его участием не распространяются по объему ткани и лишены селективности. Принято считать, что большинство ФС используемых для ФДТ вступают в реакции II типа, в результате которых образуется $^1\text{O}_2$. Считается, что $^1\text{O}_2$ вступает в реакцию сразу после его образования [49, 50]. $^1\text{O}_2$ не может переходить в другие АФК в отличие от $\text{O}_2^{\bullet-}$, однако он может инициировать ПОЛ, как и HO^\bullet . Оба типа АФК легко вступают в реакции и могут образовывать гидроперекиси липидов, которые являются активными соединениями и обладают высокой биологической агрессивностью, таким образом могут инициировать цепное окисление липидов мембран клеток [5, 51].

1.1.6 Перекисное окисление липидов

Реакция перекисного окисления липидов играет важную роль во многих патологиях, а также в смерти клеток, вызванных ФДТ. Активные формы кислорода вызывают в липидах (L) цепные реакции с накоплением продуктов окисления, таких как: липидных радикалов (L^\bullet), пероксидов (LOO^\bullet), гидропероксидов (LOOH), алкоксидов (LO^\bullet) [51]. АФК в основном вступают в реакцию с остатками полиненасыщенных жирных кислот (LH) [32, 52].

Инициация цепной реакции происходит, когда в липидный слой мембран проникает свободный радикал, при этом образуется липидный радикал. Липидный радикал вступает в реакцию с молекулярным кислородом, образуя пероксид, который в свою очередь атакует соседнюю молекулу фосфолипида:



Две последние реакции чередуются и, таким образом, инициируется перекисное окисление липидов. Реакция ПОЛ может разветвляться при наличии в среде ионов металлов переменной валентности (Fe^{2+} и Cu^{2+}):



Образованные LO^{\bullet} инициируют новые цепи ПОЛ [34, 52, 53].

При увеличении АФК в клетке и усилении перекисного окисления липидов изменяются свойства биологических мембран, что приводит к нарушению работы клеток. Радикалы липидов вступают в реакцию с тиоловыми группами мембранных белков, это вызывает повреждение транспортных ферментов, в том числе Ca^{2+} -АТФаз, изменению ионной проницаемости мембран или к электрическому пробое мембраны под действием собственного мембранного потенциала [31, 51, 53].

1.1.7 Радахлорин как фотосенсибилизатор

Хлорины и их производные обладают свойствами, которые делают их подходящими для использования в качестве фотосенсибилизаторов. В сравнении с производными гематопорфиринов хлорины эффективнее накапливаются в опухолевых тканях и поглощают свет в более длинноволновой области спектра (650 – 670 нм) [54]. Многие соединения на основе хлоринов уже используются в клинике для лечения различных видов опухолей [55, 56].

Радахлорин – фотосенсибилизатор второго поколения российского производства, который представляет собой смесь трех соединений: хлорин еб, пурпурин 5 и хлорин рб (рисунок 1.2) [57]. Хлорин еб играет роль «растворителя» в смеси веществ составляющих радахлорин, что обеспечивает лучшую растворимость в воде и облегчает хранение ФС [58, 59].

Спектр поглощения радахлорина имеет пик около 662нм, что позволяет воздействовать на более глубокие слои ткани по сравнению с НрD. Квантовый выход интеркомбинационной конверсии хлоринов составляет около 0.78 [60], что

коррелирует с высоким квантовым выходом образования синглетного кислорода (приблизительно 0.7) [61]. Радахлорин может локализоваться в митохондриях и лизосомах, в меньшей степени – в ЭР [62–64]. Радахлорин обладает незначительной темновой цитотоксичностью и почти полностью выводится из тканей за 48 часов [62, 65, 66]. Эти свойства позволяют максимально снизить фоточувствительность кожи пациентов после сеансов ФДТ.

Исследования *in vitro* показали, что ФД воздействие радахлорина может эффективно разрушать культивируемые клетки гепатоцеллюлярной карциномы, запуская апоптоз и при этом незначительно воздействуя на нормальные клетки печени. Эти данные могут свидетельствовать о возможности использования радахлорина для ФДТ опухолей печени [67]. Эффективность радахлорина при фотодинамическом воздействии показана для клеток рака легкого, кожи, щитовидной железы, шейки матки. Он сравнительно быстро накапливается в опухолевых тканях и может эффективно разрушать патологические клетки [58, 68–71]. Показана эффективность ФДТ с применением радахлорина для ранних стадий рака пищевода. Этот метод может быть альтернативой хирургическим вмешательствам [66]. Кроме того, ФДТ с применением радахлорина используется для лечения рака кожи [65].

В последние годы радахлорин используется не только для ФДТ, но и для флуоресцентной диагностики опухолей. ФДТ с применением радахлорина эффективна в лечении опухолей кожи, легких, головы и шеи [62, 72, 73].

1.1.8 Механизмы ФД-индуцированной клеточной гибели

ФДТ может ко всем трем формам клеточной гибели, а именно к апоптозу, некрозу и аутофагическому типу гибели. Тип клеточной смерти может отличаться в зависимости от типа клеток, их генетического или метаболического потенциала, а также от экспериментальной модели, интенсивности лазерного облучения, типа фотосенсибилизатора и его внутриклеточной локализации [74].

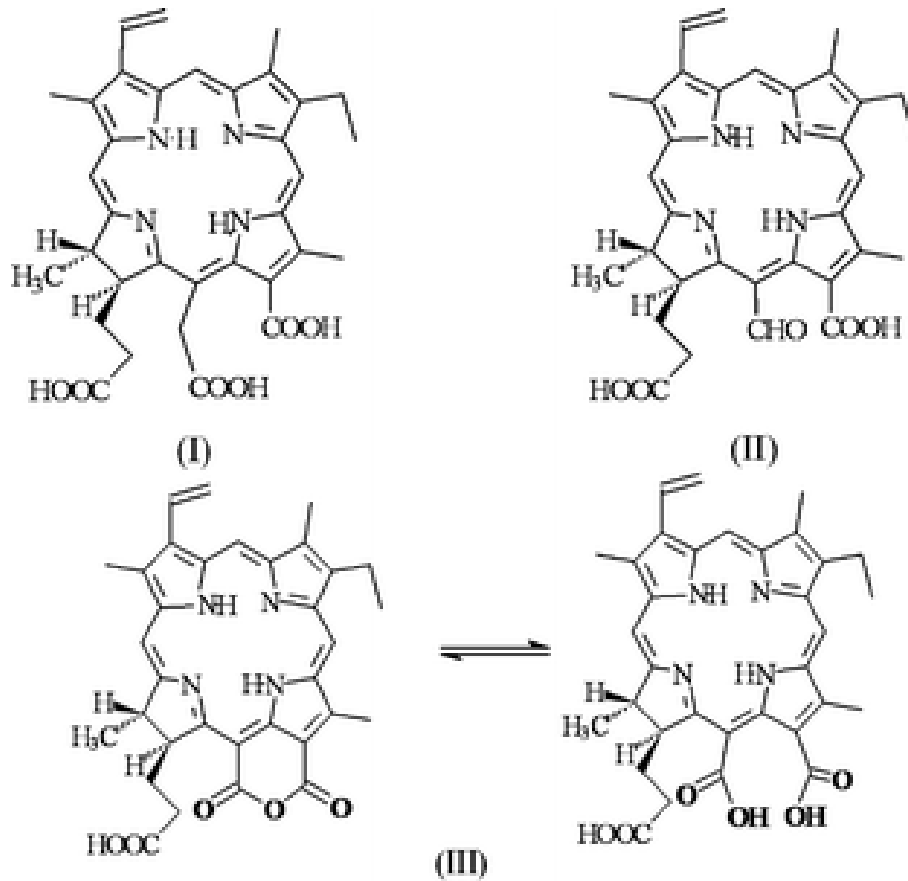


Рисунок 1.2 – Состав радахлорина. Субстанция радахлорина представляет собой водный раствор (жидкий экстракт хлоринов), содержащий натриевые соли: хлорина е6 – 80–90 % (I), пурпурина-5 – 5–20 % (II) и пурпурина-18, который в щелочной среде постепенно превращается в хлорин р6 (III) [57]

Апоптоз – запрограммированная программа клеточной смерти. Апоптоз является естественным процессом, необходимым для устранения поврежденных клеток или клеток, утративших свое значение в процессе развития [75]. Существенную роль в апоптозе играют каспазы – семейство эволюционно консервативных протеаз. При отсутствии стимулов апоптоза каспазы находятся в клетке в неактивном состоянии. Существует два вида каспаз: иницирующие (каспазы 8, 9, 10 и 12) и эффекторные (каспазы 3, 6, 7 и 14). Каспаза 2 обладает свойствами как иницирующих, так и эффекторных каспаз [76]. Апоптоз может запускаться как внешними, так и внутренними сигналами.

Внешним сигналом к запуску апоптоза является активация рецепторов плазматической мембраны, таких как Fas/CD95, TNF, DR-4, DR-5. Сигнал рецепторов плазматической мембраны приводит к активации каспазы 8, что в свою очередь прокаспазу 3. В некоторых типах клеток активации каспазы 8 не достаточно для запуска программируемой клеточной гибели [77].

Важнейшим внутренним стимулом запуска апоптоза является повреждение ДНК. При повреждении ДНК в ответ на различные факторы (в том числе АФК), повышается уровень белка p53. Это является сигналом, для митохондрий, которые играют роль посредника в передаче сигнала апоптоза при внутренней стимуляции [78]. На наружной мембране митохондрий локализовано множество белков семейства Bcl-2, среди которых есть как проапоптотические белки (Bax, Bid, Bik), так и противоапоптотические (Bcl2 и Bcl-X_L). От соотношения активности этих белков зависит состоится ли апоптоз. При митохондриальном пути запуска каспаз происходит изменение трансмембранного митохондриального потенциала и открытие митохондриальных пор. Это сопровождается выходом из митохондрий ряда белков, в частности цитохрома C, который в комбинации с белком Araf-1 переводит каспазу 9 в активное состояние. Далее каспаза 9 активирует каспазу 3. Каспаза 3 ДНКазу под названием CAD, которая вызывает межнуклеосомные разрывы ДНК [79].

Существует также каспазезависимый путь запуска апоптоза, при котором белок AIF перемещается от митохондрии непосредственно к ядру, где инициирует конденсацию хроматина и разрывы ДНК [78, 80].

Отличительным признаком апоптоза является протекания процессов деградации сначала в ядре. Наиболее характерными признаками апоптоза являются фрагментация ДНК, конденсация хроматина, сжатие и фрагментация ядра, и в результате разрезания белков цитоскелета и фрагментации клетки возникновение апоптозных телец, которые подвергаются фагоцитозу. При апоптозе не возникает воспалительного процесса, что существенно отличает его от некротического типа гибели [79].

ФДТ может приводить к апоптозу в результате повреждения белков семейства Bcl2, подавляющих апоптоз, и активации проапоптозных белков этого же семейства [81]. При ФДТ на опухолевых линиях клеток наблюдается выход цитохрома С, что также может приводить к активации каспазного каскада и запуску апоптоза [82]. На клетках человеческой карциномы было показано участие мембранных рецепторов Fas/CD95 в фотоиндуцируемом апоптозе [83]. Эти и многие другие исследования показывают, что при ФД воздействии на различные типы клеток могут активироваться как внешние сигнальные пути, связанные с активацией рецепторов плазматической мембраны, так и внутренние сигнальные каскады [4, 74, 84]

Некроз - это быстрая форма деградации, затрагивающая большое количество клеток. Некроз характеризуется набуханием цитоплазмы, разрушением органелл клетки и повреждением плазматической мембраны, ведущему к выходу внутриклеточного вещества в межклеточное пространство и последующему воспалительному процессу. Считается, что некроз – внезапная незапрограммированная клеточная смерть вследствие физического или химического повреждения [85].

Изучение факторов, приводящих к некрозу при ФДТ, не столь тривиальная задача. Ключевыми факторами, определяющими тип клеточной смерти при фотодинамическом воздействии (некроз или апоптоз) являются тип клетки,

целостность апоптотических клеточных механизмов, клеточная локализация ФС, доза светового излучения, а также парциальное давление кислорода [79]. Однако фактором, который в подавляющем большинстве случаев приводит к некротическому типу смерти, по мнению множества исследователей можно назвать высокую дозу ФДТ (достигается высокой концентрацией ФС или большой плотностью потока светового излучения). Умеренно малые дозы ФДТ в основном приводят к развитию апоптоза [4, 74].

Аутофагия – катаболический клеточный механизм, который позволяет клеткам поддерживать баланс между синтезом, деградацией и переработкой продуктов клеточной деятельности [86]. Существует целый ряд аутофагических процессов, среди них деградация клеточных органелл и белков в лизосомах. Наиболее хорошо изученный процесс аутофагии протекает следующим образом: структура с двойной мембраной, называемая аутофагосомой, окружает область – мишень, создавая таким образом везикулу и отделяя эту область от остальной цитоплазмы. Эта везикула сливается с лизосомой, формируя аутофаголизосому, содержимое которой последовательно расщепляется лизосомальными гидролазами [86, 87].

Помимо избавления от ненужных белков, органелл и чужеродных микроорганизмов, аутофагия также позволяет клетке перераспределять питательные вещества от второстепенных процессов к жизненно важным в периоды голодания и стресса.

Роль аутофагии при ФДТ не совсем изучена. Обычно клетки млекопитающих используют аутофагию для избавления от различных органелл, поврежденных в результате взаимодействия с АФК. В зависимости от типа АФК и степени развития окислительного стресса, ФДТ может стимулировать процессы аутофагии, которые могут играть защитную роль или приводить в результате к смерти клетки [88, 89]. Аутофагия может быть задействована в ФД индуцированном апоптозе, но также эти два процесса могут идти независимо друг от друга [90].

Из вышесказанного можно сделать вывод о том, что ФД воздействие ведет к различным изменениям в сигнальных процессах клеток, что впоследствии приводит к гибели клеток тем или иным образом. Одним из важнейших сигнальных механизмов, играющих роль в выживаемости клеток, является кальциевый сигнальный механизм [91].

Выход Ca^{2+} из внутриклеточного депо ЭР в митохондриях контролирует выживаемость клеток, влияя на биоэнергетические процессы в митохондриях. Кальциевые осцилляции способствуют повышению уровня ионов кальция в митохондриях, что приводит к стимуляции цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) путем усиления активности трех ключевых кальций-зависимых ферментов (пируватдегидрогеназы, изоцитратдегидрогеназы и α -кетоглутаратдегидрогеназы). Это приводит к увеличению выработки в ЦТК НАДН, который используется потом в цепи переноса электронов для создания протонного градиента. Увеличенный протонный градиент стимулирует работу F_1F_0 АТФ синтазы и, таким образом, выработку АТФ [92, 93]. Однако, избыточное накопление Ca^{2+} в митохондриях может приводить к открытию высокопроницаемой митохондриальной поры, падению трансмембранного митохондриального потенциала, выработке АФК и выходу из межмембранного пространства различных белков, в том числе цитохрома С. Цитохром С ведет к образованию и активации апоптосомы, запуская апоптоз и приводя к гибели клетки [78, 94]. Выживание клеток контролируется кальцием не только митохондриальным путем, но также может регулировать экспрессию генов [95].

1.2 Кальциевая сигнализация в клетках

Ионы Ca^{2+} - это гибкая и разносторонняя сигнальная система, которая способна регулировать множество различных клеточных функций. Гибкость кальциевой сигнальной системы достигается множеством различных путей для контроля над клеточными процессами с различной динамикой. Например, при синаптической передаче сигнала, Ca^{2+} переключает процессы экзоцитоза в

течение микросекунд, с другой стороны, кальциевая сигнализация участвует в регуляции процессов минутной и часовой длительности, таких как транскрипция генов или деление клеток [6, 96].

Клетка расходует большинство своей энергии для регуляции изменений концентрации кальция. Концентрация кальция во внутриклеточном пространстве поддерживается в наномолярных концентрациях, в то время как концентрация кальция во внеклеточном пространстве на четыре порядка больше (мМ) [95].

В каждом типе клеток существует свой уникальный набор компонентов кальциевой сигнализации для контроля различных клеточных процессов. Но почти все кальциевые сигнальные системы поддерживают внутриклеточную концентрацию кальция балансом между реакциями входа и выхода кальция. В процессе реакций входа внешний стимул (связывания лиганда с рецептором, изменение потенциала и т.д.) индуцирует вход внеклеточного кальция в цитозоль и активацию вторичных посредников, которые запускают выход кальция из внутриклеточных депо (в основном из эндоплазматического /саркоплазматического ретикулума). Большинство этих ионов кальция связываются с буфером, в то время как небольшая часть связывается с эффекторами и активирует различные клеточные процессы. В процессе реакций вывода кальция из цитозоля клетки, кальций оставляет эффекторы и буферы и удаляется из клетки различными обменниками и помпами. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменник (NCX) и Ca^{2+} -АТФаза плазматической мембраны (PMCA) выводит Ca^{2+} наружу, в то время как Ca^{2+} -АТФаза сарко/эндоплазматического ретикулума (SERCA) закачивает Ca^{2+} в люмен ЭР. Митохондрии также участвуют в восстановлении концентрации кальция, закачивая ионы через унипортер (MCU) [6, 97, 98].

Одну из главных ролей кальциевая сигнализация играет в различных нейрональных процессах, таких как контроль выхода нейромедиатора из пресинаптической терминали, регуляция нейрональной возбудимости и синаптической пластичности, ответственной за обучение и память [99]. Множество нейродегенеративных заболеваний связаны с изменениями Ca^{2+} - зависимых процессов в нейронах. Например, быстрое развитие симптомов

болезни Альцгеймера характеризуется изменениями в регуляции кальциевого сигналинга. Психиатрические заболевания, такие как биполярное расстройство и шизофрения, также характеризуются изменениями в специфических Ca^{2+} - зависимых сигнальных путях [99–103].

1.2.1 Кальциевые насосы и обменники

Для поддержания низкой концентрации кальция в клетке работают системы, которые перекачивают кальций против градиента концентраций через плазматическую мембрану и в ЭР. Система вывода кальция из цитозоля клетки представлена насосами (PMCA в плазматической мембране и SERCA в ЭР или саркоплазматическом ретикулуме) и обменниками (NCX и NCKX). Ca^{2+} -насосы выкачивают ионы кальция через плазматическую мембрану в обмен на один протон (PMCA) и в ЭР в обмен на два протона (SERCA) при гидролизе одной молекуле АТФ. NCX перекачивает один ион Ca^{2+} из клетки и три иона Na^+ в клетку, а NCKX осуществляет ко-транспорт одного иона Ca^{2+} и одного иона K^+ наружу в обмен на вход четырех ионов Na^+ . Помпы плазматической мембраны обладают высоким сродством к кальцию и сравнительно низкой пропускной способностью, обменники же обладают низким сродством, но высокой пропускной способностью. Таким образом эти две системы гармонично дополняют друг друга. PMCA эффективно поддерживают низкую $[\text{Ca}^{2+}]$ на протяжении длительного времени, тогда как NCX и NCKX могут быстро снизить $[\text{Ca}^{2+}]$ во время генерации потенциала действия в нейронах [6, 95, 97, 104].

Регуляция активности Ca^{2+} - АТФаз плазматической мембраны и ЭР/СР осуществляется разными белками. Активация PMCA происходит при помощи белка-регулятора кальмодулина, который связываясь с особым участком внутриклеточного домена АТФазы увеличивает ее сродство к ионам кальция. Работа АТФаз внутриклеточных депо регулируется белком фосфоламбаном, который при связывании ингибирует работу насоса [105].

1.2.2 Кальциевые каналы

Повышение $[Ca^{2+}]$ в цитозоле клетки может осуществляться как за счет входа ионов из внешней среды через плазматическую мембрану, так и за счет выхода Ca^{2+} из внутриклеточных депо.

Структуры в мембране клеток и внутриклеточных органелл, через которые проходит пассивный транспорт ионов кальция путем открытия поры, называются Ca^{2+} -каналы. В неактивном состоянии каналы непроницаемы для ионов, но при активации каналы образуют мгновенные ионоселективные поры, через которые ионы Ca^{2+} проникают внутрь клетки по направлению градиента концентрации. Кальциевые каналы являются рецепторами на некоторые внеклеточные и внутриклеточные стимулы. Такие рецепторы имеют специальные участки в своей структуре, необходимые для связывания лигандов или служащие сенсорами на некоторые стимулы.

Механизм перехода Ca^{2+} через канал можно представить следующим образом: сначала катион связывается с отрицательно заряженными остатками Glu в устье канала, а затем проходит по порообразующей структуре канала. Сенсорный участок канала вызывает конформационное изменение и открывание канала при поступлении стимула [106, 107].

1.2.2.1 Кальциевые каналы плазматической мембраны

Кальциевые каналы плазматической мембраны разделяют на три основные группы по механизму их активации: потенциал зависимые Ca^{2+} - каналы (VOC), рецептор управляемые Ca^{2+} - каналы и каналы (ROC), управляемые опустошением ЭР (SOC) [6, 95, 97, 107].

VOC характеризуются тем, что при потенциале покоя (-70-80 мВ) находятся в неактивном состоянии, а их активация происходит при сдвиге потенциала в положительную область, т.е. при деполяризации мембраны. Часто VOC находят там, где Ca^{2+} запускает секрецию, т.е. не только в электровозбудимых, но и

эндокринных клетках [106]. VOC являются самыми быстрыми кальциевыми сигнальными белками и запускают множество различных процессов в клетке. В нейронах VOC участвуют в передаче электрического импульса, запускают процессы синаптической передачи сигналов и, таким образом, регулируют такие процессы как секреция клетки и экспрессия генов [7, 95, 104].

ROC активируются связыванием специального лиганда, например, нейромедиатора, с их внеклеточным доменом, тем самым открывая ионный канал. В мозге млекопитающих главным возбуждающим нейромедиатором является L-глутамат, он активирует два класса рецепторов ионотропные и метаботропные рецепторы. NMDA и AMPA рецепторы являются двумя типами ионотропных глутаматных рецепторов. AMPA рецепторы опосредуют быструю возбуждающую синаптическую передачу в центральной нервной системе млекопитающих и являются проводящими каналами ионов Na^+ и K^+ , но также могут быть проницаемы и для Ca^{2+} . NMDA рецепторы проницаемы для Na^+ , который участвует в постсинаптической деполяризации, и для Ca^{2+} , ионы которого генерируют кальциевый ответ и определяют физиологические внутриклеточные процессы. NMDA рецепторы отвечают на глутамат медленнее, чем AMPA рецепторы. Активация этих каналов требует не только связывания лиганда (в данном случае, глутамата), но и деполяризацию мембраны. При деполяризации удаляются внеклеточные ионы Mg^{2+} , блокирующие каналы в нормальном (неактивном) состоянии [6, 97, 104, 107].

SOC активируются выходом Ca^{2+} из ЭР. Впервые каналы, активируемые выходом кальция из ЭР, были обнаружены в невозбудимых клетках, но позже они также были найдены и в нейронах и мышечных тканях. Считалось, что депо-зависимый вход кальция необходим для пополнения внутриклеточных депо после их опустошения. Позже обнаружилось, что вход Ca^{2+} через этот тип рецепторов может активировать кальциевый сигнал в зонах, расположенных непосредственно рядом с областями входа ионов. Например, нарушения работы SOC могут приводить к иммунодефициту вследствие изменения микродоменов Ca^{2+} и их

эффекта на кальциевые осцилляции и на фактор активирующий транскрипцию гена, ответственного за выработку Т-клеток [108, 109].

Молекулы, участвующие в сигналинге депо-зависимого кальциевого входа, представляют собой Ca^{2+} -связывающие трансмембранные белки из семейства с EF-доменами (EF-hand family). Трансмембранные молекулы STIM (представлены в двух изоформах STIM 1 и STIM 2) служат сенсором уровня Ca^{2+} в эндоплазматическом депо. STIM связаны с рецептором SOC на плазматической мембране клетки. В состав SOC входят белки из семейства ORAI, одна из субъединиц (ORAI 1) формирует пору канала [7]. В исследованиях на мушках *Drosophila melanogaster* показано, что механизмы ORAI/STIM существуют и в нейронах [110].

1.2.2.2 Внутриклеточные кальциевые каналы

Выход ионов Ca^{2+} из депо ЭР осуществляется через два типа кальциевых каналов-рецепторов: рианодиновые (Ry) рецепторы и инозитол-1,4,5-трифосфатные (IP3) рецепторы. IP3 рецепторы экспрессируется в клетках множества типов, тогда как Ry рецепторы в основном в нейронах и мышечных клетках.

Выход Ca^{2+} через IP3 рецепторы требует связывания вторичного посредника IP3. IP3 образуется путем расщепления фосфатидинозитол-4,5-бисфосфата фосфолипазой C (PLC). PLC становится активной в ответ на связывание лигандов с некоторыми G-белок связанными рецепторами на плазматической мембране.

Повышенные концентрации кальция в цитозоле клетки являются основным триггером для выхода Ca^{2+} через Ry рецепторы. Этот механизм выхода Ca^{2+} из внутриклеточного депо известен как CICR (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release). Ry рецепторы также могут регулироваться другими нейрональными мессенджерами, такими как циклическая аденозиндифосфатрибоза. Эти рецепторы относительно менее селективны для ионов Ca^{2+} по сравнению с SOC и VOC плазматической мембраны. Однако учитывая, что Ca^{2+} , возможно, единственный катион с

электрохимическим градиентом через мембрану ЭР/СР, отсутствие селективности не является определяющим для запуска сигнальных механизмов клетки [92, 104, 111].

1.2.3 Митохондрии и кальциевая сигнализация

Митохондрии, как и ЭР, являются внутриклеточным кальциевым депо. При повышении концентрации кальция в цитозоле клеток митохондрии начинают аккумулировать ионы кальция, закачивая их в матрикс через унипортер MCU [112]. Ca^{2+} входит в митохондрии по электрохимическому градиенту, создаваемому митохондриальным мембранным потенциалом. Считается, что выход Ca^{2+} осуществляется через $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (3 иона Na^+ в обмен на один ион Ca^{2+}) и $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ (2 или более протона – на один Ca^{2+}) обменники [94, 113]. Обменники работают медленнее, чем MCU, поэтому митохондрии склонны к перегрузке кальцием, что может приводить к открытию высокопроницаемой митохондриальной поры (РТР). Открытие РТР приводит к падению трансмембранного митохондриального потенциала, что может повлечь за собой снижение производства АТФ, а также выход цитохрома С, активацию каспаз и запуск апоптоза клеток. Однако существует ряд исследований, показывающих, что РТР может открываться и в условиях физиологической нормы [7, 112].

Главной функцией митохондрий в клетках является производство высокоэнергетических соединений АТФ и НАДН в цикле Кребса и благодаря окислительному фосфорилированию в цепи переноса электронов. Митохондрии также играют роль кальциевого буфера и главным источником АФК в клетке, и все эти функции связаны между собой [114].

Цикл Кребса поставляет субстраты для работы цепи переноса электронов, в которой при превращении кислорода O_2 в воду протоны перекачиваются из митохондриального матрикса в межмембранное пространство, создавая протонный градиент. Этот градиент используется F_0F_1 -АТФазой для производства АТФ, и этот же градиент является главной движущей силой для ионов кальция в

митохондриальный матрикс. Проницаемость МСУ повышается при высокой концентрации Ca^{2+} в цитоплазме и при малом значении отношения АТФ/АДФ, т.е. в ситуации больших энергозатрат. Повышение концентрации Ca^{2+} в митохондриях стимулирует активность трех ферментов цикла Кребса: пируватдегидрогеназы (через активацию фосфотазы), изоцитратдегидрогеназы и α -кетоглутаратдегидрогеназы (путем прямого связывания с ферментом), таким образом повышая продукцию АТФ и НАДН [93, 115].

Таким образом, важно помнить, что аккумуляция Ca^{2+} митохондриями играет не только роль посредника кальциевой сигнализации, но и участвует в поддержании биоэнергетического баланса клетки. Особо важное значение механизмы данной регуляции играют в нервных клетках, где периоды клеточной активности и больших энергетических затрат тесно связаны с потенциалами действия и синаптической передачей сигнала.

1.2.4 Роль Ca^{2+} при ФДТ

Система кальциевой сигнализации вовлечена в ответ клеток разного типа на ФД воздействие. Об этом свидетельствуют результаты множества исследований.

Было показано, что ФДТ вызывает повышение уровня ионов кальция в цитозоле $[\text{Ca}^{2+}]_c$ различных типов клеток, которое может приводить к смерти клеток. Хелатор кальция ВАРТА ингибировал выход цитохрома С, активацию каспазы 3 и апоптотическую смерть клеток линии легкого китайского хомячка V79, фотосенсибилизированных феофорбидом, что говорит о вовлеченности ионов кальция в ФД-индуцированный апоптоз. ВАРТА также уменьшал уровень апоптоза в клеточной линии HeLa, при ФДТ с фотосенсибилизатором ТВР, который локализуется в аппарате Гольджи [8, 116, 117].

В некоторых типах клеток наблюдалось повышение уровня $[\text{Ca}^{2+}]_c$ после фотосенсибилизации, которое способствовало выживаемости клетки, в других буферизация внутриклеточного кальция увеличивала клеточную гибель [9, 118].

Повышение $[Ca^{2+}]_c$ при ФД воздействии может достигаться путем входа ионов Ca^{2+} через ионные каналы [119, 120] или выходом Ca^{2+} из внутриклеточных кальциевых депо [121].

Например, вклад в кальциевый ответ на облучение в человеческих фибробластах, предварительно обработанных фталоцианином AlPcS4, состоял в основном из входящих из внеклеточного пространства ионов при малых дозах облучения и из выхода Ca^{2+} из внутриклеточных депо при больших дозах облучения [9].

Выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо через IP3 рецепторы давал осцилляторный ответ на ФД воздействие AlPcS4 и порфиринового производного в клетках изолированного ацинуса поджелудочной железы крысы. Фотоиндуцированные кальциевые осцилляции ингибировались U73122, ингибитором PLC [122]. Этот же механизм вовлечен в резкое увеличение $[Ca^{2+}]_c$ в клетках лимфомы мыши L5178Y при ФД воздействии фталоцианина AlPc [10].

В клетках человеческой аденокарциномы HeLa выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо в ответ на ФД воздействие вертепорфина был связан быстрым каспаз-независимым угнетением кальциевой АТФазы SERCA [121]. Ухудшение системы захвата кальция эндоплазматическим ретикулумом может давать вклад в повышение концентрации Ca^{2+} из-за изменения баланса между скоростями циркулирования кальция во внутриклеточных депо, а также утечки ионов Ca^{2+} благодаря угнетению работы SERCA.

АТФазы плазматической мембраны имеют высокое сродство к ионам Ca^{2+} и их активность замедляется в клетках, разрушающихся путем апоптоза вследствие каспазной активности [123]. Также известно, что АТФазы плазматической мембраны чувствительны к окислительному стрессу и их активность заметно снижается при ПОЛ мембран [105]. Оба этих фактора могут приводить к повышению уровня кальция в клетке вследствие угнетения работы АТФаз, так как ФДТ приводит к генерации АФК и инициации ПОЛ, а также может приводить к быстрой активации каспаз [8, 74].

Отличия в путях повышения кальция в клетках различных типов могут объясняться специфичностью ФС и его мишенями при облучении в различных клетках, а также уникальностью звеньев кальциевой сигнализации в различных типах клеток. Механизм кальциевого ответа на ФД воздействие нервных клеток остается не изученным, в связи с чем представляет собой особый интерес.

1.3 ФДТ опухолей мозга

ФДТ осуществляется в несколько этапов: ФС вводится в организм в необходимой дозе, и после времени, достаточного для селективного накопления в опухоли, производится облучение с целью выработки АФК. Таким образом, в месте облучения в результате ОС клетки опухоли погибают путем некроза или апоптоза. [4, 124].

Селективность накопления фотосенсибилизатора в опухоли и локальность облучения позволяют избирательно разрушать патологическую ткань, что делает ФДТ подходящим способом для лечения опухолей мозга, где высокая степень избирательности разрушения крайне важна [5, 125].

Фотодинамические техники, такие как фотодинамическая диагностика (ФДД), резекция с использованием флуоресцентной навигации и фотодинамическая терапия проходят клинические испытания как дополнительный метод лечения для злокачественных опухолей мозга. Несмотря на множество клинических испытаний ФДТ для лечения опухолей мозга первых двух фаз, существует всего несколько протоколов контрольных клинических испытаний ФДТ после резекции опухоли мозга [5].

Фотосенсибилизатор накапливается в патологической ткани мозга в большей концентрации, чем в нормальной ткани [63, 126]. Последующее облучение светом создает множество цитотоксических окислительных реакций, которые индуцируют разрушение опухоли через повреждение сосудов или через прямой молекулярных механизм. Таким образом, ФДТ представляет собой

подход наиболее селективного разрушения инфильтрирующих в нормальную ткань опухолей мозга. Клинические испытания показали эффективность ФДТ при лечении опухолей мозга как в отношении увеличения медианы выживаемости, так и в отношении улучшения качества жизни пациентов [126–128].

Резекция с использованием флуоресцентной навигации значительно увеличивает эффективность иссечения опухоли. Комбинация ФДД, флуоресцентной навигации и ФДТ становится новым и очень эффективным способом лечения опухолей головного мозга. ФДТ, как правило, переносится хорошо, и побочные эффекты заключаются в повышении внутричерепного давления и продолжительной чувствительности кожи к солнечному свету [27].

Флуоресцентные свойства ФС таких как НpD, 5-аминолевулиновой кислоты (5-ALA), производные хлоринов в настоящее время широко используются для ФДД и резекции с флуоресцентной навигацией в нейрохирургии [5, 27, 129]. Фотодинамическая диагностика позволяет оптически разделить нормальные и злокачественные ткани в реальном времени в процессе операции, что облегчает проведение резекции и приводит к более радикальному удалению патологической ткани. Это, в свою очередь отражается на продолжительности жизни пациентов.

В тех случаях, когда инфильтрирующая опухоль затрагивает функционально значимые участки мозга, патологические ткани не убирают, чтобы не затронуть неврологические функции и не ухудшить качество жизни. Применение ФДТ в ходе одной операции после ФДД увеличивает шанс наиболее селективно удалить участки патологии в мозге [27].

При ФДТ воздействию подвергаются не только опухолевые, но и здоровые клетки, окружающие опухоль. Поэтому для оптимизации режимов ФД

воздействия необходимо искать пути не только эффективного разрушения патологических тканей, но максимальной защиты окружающей здоровой ткани. Это особенно актуально для использования ФДТ в лечении опухолей мозга, где разрушение здоровых нейронов может привести к непредсказуемым последствиям. С этой точки зрения становятся интересными особенности ФД воздействия на нервную ткань, а также механизмы, которые запускаются при ФДТ в здоровых нервных клетках. Выживаемость клеток, в том числе и нервных, в нормальных условиях и при различных повреждающих воздействиях контролируется кальциевым сигнальным механизмом, опосредованным слаженной работой множества каналов, рецепторов, обменников и различных ферментов. Вклад данного механизма в ответ здоровых нервных клеток на ФД воздействие представляет собой важную, интересную и не изученную ранее задачу.

Фотосенсибилизаторы хлориновой группы уже использовались в клинических испытаниях ФДТ опухолей мозга и зарекомендовали себя как одни из наиболее эффективных в этой области [5]. Радахлорин, наряду с другими производными хлоринов, обладает высоким квантовым выходом производства $^1\text{O}_2$ и высокой избирательностью накопления в опухолях, но, кроме того, очень быстро выводится из организма [26, 130], что делает его крайне перспективным для использования в ФДТ мозга.

В связи с этим, необходимо изучить локализацию и динамику накопления и выведения радахлорина в нервной ткани; изучить концентрационную зависимость фотодинамического воздействия радахлорина на нейрональную активность рецептора растяжения речного рака; изучить фотоиндуцированный некроз и апоптоз нейронов и глиальных клеток; исследовать изменения внутриклеточного уровня ионов кальция в культивируемых нейронах и астроцитах коры головного мозга крысы при фотодинамическом воздействии; оценить вклад входа ионов кальция через плазматическую мембрану, а также вклад эндоплазматического ретикулума в фотоиндуцируемое изменение уровня внутриклеточного кальция в нейронах и астроцитах; исследовать роль активных форм кислорода, перекисного

окисления липидов, фосфолипазы С в повышении уровня внутриклеточного кальция в ответ на фотодинамическое воздействие; исследовать связь фотоиндуцированного повышения уровня кальция в цитозоле нейронов и астроцитов с уровнем митохондриального кальция и трансмембранным митохондриальным потенциалом.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Используемые реактивы

В работе использовали зонды Fluo-4 AM, Fura-2 AM, Rhodamine123, BODIPY C11[581/591], TMRM и X-Rhod-1 AM фирмы Molecular Probes. Все флуоресцентные зонды разводились в DMSO (Sigma). При загрузке кальциевых зондов использовался Pluronic 127 фирмы Invitrogen. В экспериментах использовались культуральные среды – MEM, нейробазальная среда, суплементы, антибиотики, поли-Д-лизин, трипсин-ЭГТА, коллагеназа - произведенные в компании Invitrogen. Для определения типа клеточной смерти использовались флуоресцентные красители пропидиум йодид и Hoechst-33342 фирмы Sigma. Также использовались следующие модуляторы: U73122 фирмы Tocris; MK801, тапсигаргин, FCCP, тролокс, циклоспорин А, лизирующий буфер Extraction/Labeling Buffer (E0655) фирмы Sigma.

Используемая среда Хенкса содержала (мМ): 156 NaCl, 3 KCl, 2 MgSO₄, 1.25 KN₂PO₄, 2 CaCl₂, 10 глюкозы и 10 HEPES, pH=7,35.

Используемый физиологический раствор ван Харревельда для холоднокровных животных содержал (мМ): NaCl - 205; KCl - 5.4; NaHCO₃ - 0.24; MgCl₂ - 5.4; CaCl₂ - 13.5; pH 7.2-7.4.

2.2 Объекты исследования

Механорецептор и брюшная нервная цепочка речного рака

Объектом исследований импульсных реакций и типа ФД индуцированной клеточной смерти, а также локализации радахлорина служил рецептор растяжения речного рака *Astacus leptodactylus* (рисунок 2.1), состоящий из пары рецепторных мышц с находящимися на них механорецепторными нейронами (МРН), окруженными сателлитными глиальными клетками (ГК). Быстро

адаптирующийся нейрон кратковременно генерирует потенциалы действия в ответ на резкое растяжение рецепторной мышцы, при постоянном растяжении – не производит потенциалов действия (рисунок 2.1). Медленно адаптирующийся нейрон генерирует потенциалы действия с частотой, пропорциональной натяжению рецепторной мышцы, длительное время (рисунок 2.1). Это позволяет регистрировать динамику физиологического ответа нейронов на внешние воздействия в режиме реального времени. Механорецептор речного рака имеет крупные тела (50 – 100 мкм), которые хорошо видны под микроскопом. Нейроны окружены многослойной глиальной оболочкой, состоящей из сателлитных глиальных клеток и не являющейся миелином [131]. Подобное морфологическое строение делает механорецептор подходящим для изучения локализации радахлорина в нейроглиальном препарате. Электрофизиология, морфология и биохимия этого объекта и его реакции на лазерное облучение и ФД воздействие хорошо изучены [4, 132].

Модельным объектом для исследования динамики накопления радахлорина в нервной ткани и последующего его выведения служила брюшная нервная цепочка речного рака *Astacus leptodactylus*, состоящая из сегментарных ганглиев, соединённых коннективами. [133].

Первичная культура нейронов и астроцитов

Для изучения изменения уровня ионов кальция и трансмембранного митохондриального потенциала в нейронах и астроцитах использовалась первичная смешанная культура нейронов и астроцитов коры мозга крысы. Первичная культура является хорошим объектом для изучения поведения клеток вне целого организма, но, тем не менее, отражающим процессы, происходящие в коре головного мозга. Также культуры удобны для наблюдения прижизненного изменения параметров клеток при помощи флуоресцентных зондов (рисунок 2.2).

Смешанная культура кортикальных нейронов и клеток глии были приготовлены как описано ранее [134]. Клетки были выделены из 2-4 дневных крысят линии Спрагу Даулей колонии

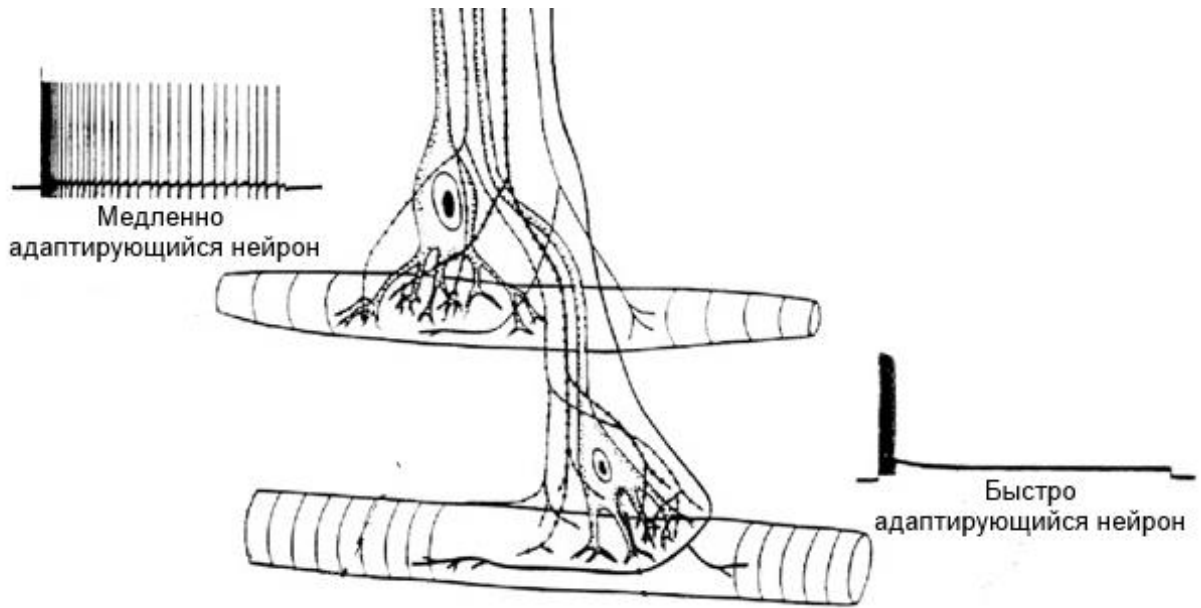


Рисунок 2.1 – Схема механорецептора речного рака *Astacus leptodactylus*.

Механорецептор речного рака состоит из 2 нейронов: медленно адаптирующегося и быстро адаптирующегося. Адаптировано по [135]

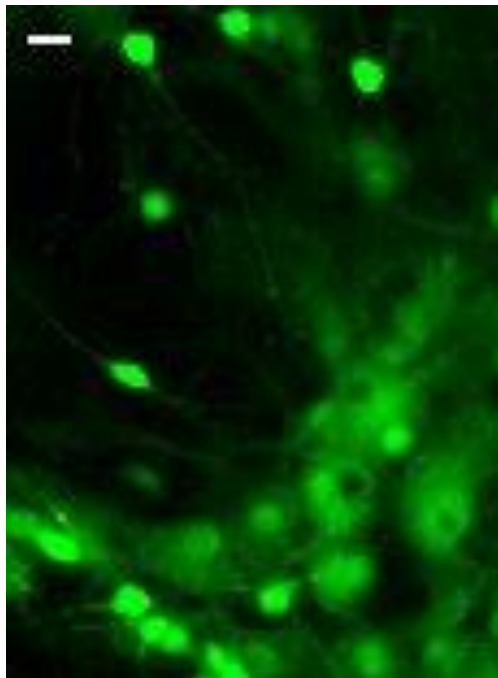


Рисунок 2.2 – Первичная культура нейронов и астроцитов коры головного мозга крысы, окрашенная флуоресцентным зондом Fluor-4. Масштабный отрезок – 10 мкм

Университетского Колледжа Лондона. Эксперименты с животными были проведены в соответствии с Актом Соединенного Королевства о животных (научные процедуры) 1986 года. После извлечения кора головного мозга крысы помещалась в бескальциевый раствор Хенкса с 20 мкг/мл гентамицина, расположенный на ледяной бане. Измельченная ножницами ткань подвергалась трипсинизации (0,1%; 10 минут при 37° С). После отмывки от трипсина с помощью центрифугирования (400 g, 3мин, 3 повтора), ткань была ресуспензирована в культуральной среде, состоящей из нейробазальной среды с суплементом В27 и 2мМ L-глутамина. На покровные стекла, обработанные поли-D-лизином, наносились капли суспензии клеток. Стекла помещались на 6 часов в инкубатор, после чего была добавлена культуральная среда. Культура клеток находилась в инкубаторе при 37°С в увлажненной атмосфере 5% CO₂ и 95% воздуха. Культуральная среда менялась дважды в неделю и культуры использовались в экспериментах от 10 до 20 дней *in vitro*.

2.3 Фотодинамическое воздействие

В данной работе изучено фотодинамическое воздействие фотосенсибилизатора российского производства радахлорин (ООО "Рада - Фарма", Москва, Россия). Радахлорин состоит из трех циклических соединений хлориновой природы - хлорина е6 (80-90%), пурпурина 5 (5-20%) и пурпурина 18 – хлорина р6 (остальное). Радахлорин обладает способностью разрушать биологические объекты после возбуждения светом с длиной волны 654-670 нм, его фотоактивации и последующей релаксации с переносом энергии на молекулярный кислород и органические субстраты [26, 57, 59].

2.3.1 Исследование динамики накопления и выведения радахлорина

Спектры поглощения и люминесценции измерялись в водном растворе радахлорина с концентрацией 20 мМ. Спектр поглощения регистрировался на спектрофотометре СФ-2000 (ЛОМО, Санкт-Петербург, Россия), а спектр люминесценции – на спектрофлуориметре Hitachi F-4010 (Япония).

Для изучения внутриклеточного распределения флуоресценции радахлорина в нейронах и глиальных клетках речного рака изолированный рецептор растяжения рака инкубировался 10 минут в растворе радахлорина с концентрацией 5 мкМ. Затем раствор заменялся на чистый раствор ван Харревельда и препарат фотографировался на флуоресцентном микроскопе Axio Lab.A1 (Carl Zeiss, Германия).

Модельным объектом для исследования динамики накопления радахлорина в нервной ткани и последующего его выведения служила брюшная нервная цепочка речного рака *Astacus leptodactylus*. После выделения брюшные цепочки взвешивались и затем инкубировались разное время: 1; 5; 15; 30 и 60 минут в растворе радахлорина с концентрацией 50 мкМ. После инкубации раствор в кювете с брюшной цепочкой заменялся несколько раз на чистый раствор ван Харревельда. Для изучения динамики выведения после одного часа инкубации в растворе с радахлорином, цепочка отмывалась и оставлялась в кювете с чистым раствором ван Харревельда на 1 или 2 часа. Затем после инкубации и отмывки нервную брюшную цепочку гомогенизировали в 1мл специального лизирующего буфера Extraction/Labeling Buffer (E0655) и центрифугировали 5 минут при 15000 об/мин. Уровень флуоресценции надосадочной жидкости с экстрагированным радахлорином регистрировался на спектрофлуориметре Hitachi F-4010 (Япония).

2.3.2 Исследование импульсной активности нейронов при фотодинамическом воздействии

Рецепторы растяжения рака (рисунок 2.1) вырезались с кусочками сегментов хитинового панциря, к которым они прикреплены по методике Florey и Florey, 1955 г. [136]. В ванночке с 1800 мкл физиологического раствора ван Харревельда для холоднокровных животных кусочки панциря с растянутым между ними рецепторами растяжения насаживались на иглы, одна из которых могла перемещаться и растягивать рецепторную мышцу, регулируя частоту потенциалов действия (ПД). Частота ПД устанавливалась на уровне 5-10 Гц. Импульсная активность нейронов регистрировалась внеклеточно от аксона с помощью стеклянного присасывающегося электрода и усиливались усилителем биопотенциалов. Частота ПД непрерывно регистрировалась с помощью аналогово-цифрового преобразователя L-761 (Л-Кард, Москва) и оригинальной программы Neuron, визуализирующей ПД на мониторе и записывающей частотограммы импульсов.

Для определения зависимости времени импульсной активности механорецептора при ФДТ от концентрации фотосенсибилизатора радахлорин препараты подвергались фотодинамическому воздействию при концентрациях радахлорина в диапазоне от 0,05 нМ до 5 мкМ. Контрольная регистрация импульсной активности продолжалась около 20-30 минут. Затем в кювету добавлялся радахлорин и после 30-минутной инкубации в темноте препарат 30 минут облучался красным светом гелий-неонового лазера ЛГН-111 (Полярон, Львов, Украина) с длиной волны 632,8 нм и плотностью мощности 0,4 Вт/см². Механорецептор облучался до полного прекращения импульсной активности нейронов. По полученным данным была построена зависимость продолжительности импульсной активности от концентрации радахлорина. Также оценивался характер изменения частоты потенциалов действия при ФД воздействии радахлорина.

2.3.3 Определение типа клеточной гибели нейронов и глиальных клеток

Для определения типа ФД-индуцированного некроза нейронов, а также некроза и апоптоза глиальных клеток была выбрана концентрация радахлорина 250 нМ, при которой продолжительность импульсной активности нейронов не превышала 30 минут. Через 8 часов (времени, достаточного для развития апоптоза) [4] после фотодинамического воздействия 250 нМ радахлорина проводилось двойное флуорохромирование препаратов пропидиум йодидом (20 мкМ) и Hoechst-33342 (40·мкМ) по 20 минут. Затем препараты 20 минут фиксировались 0,2% глутаровым альдегидом, физиологическим раствором и заключались в глицерин. Препараты исследовались на флуоресцентном микроскопе Axio Lab.A1 (Carl Zeiss, Германия) с цифровой фотокамерой. Пропидиум йодид придает красную флуоресценцию ядрам некротических клеток с поврежденной плазматической мембраной. Hoechst-33342 придает сине-зеленую флуоресценцию ядрам живых и апоптотических клеток. Это позволяет оценить процент некротических клеток и посчитать фрагментированные ядра апоптотических клеток (рисунок 2.3). Процент некротических клеток оценивался на цифровых микрофотографиях с помощью программы обработки изображений Image-Pro Plus 4.1. Для оценки уровня апоптоза глиальных клеток количество фрагментированных ядер подсчитывалось на 2 мм длины аксона. Уровень некроза клеток определялся по проценту красных ядер.

2.3.4 Фотодинамическое воздействие на культуры нейронов и астроцитов

Параметры фотодинамического воздействия на первичные культуры нейронов и астроцитов для изучения фотоиндуцируемого кальциевого сигнала были подобраны экспериментально. Концентрация была подобрана таким образом, чтобы в темновых условиях кальциевого ответа нейронов и астроцитов не наблюдалось, но наблюдался видимый кальциевый ответ нейронов на облучение полупроводниковым лазером с длиной волны 654 нм и мощностью 0,1

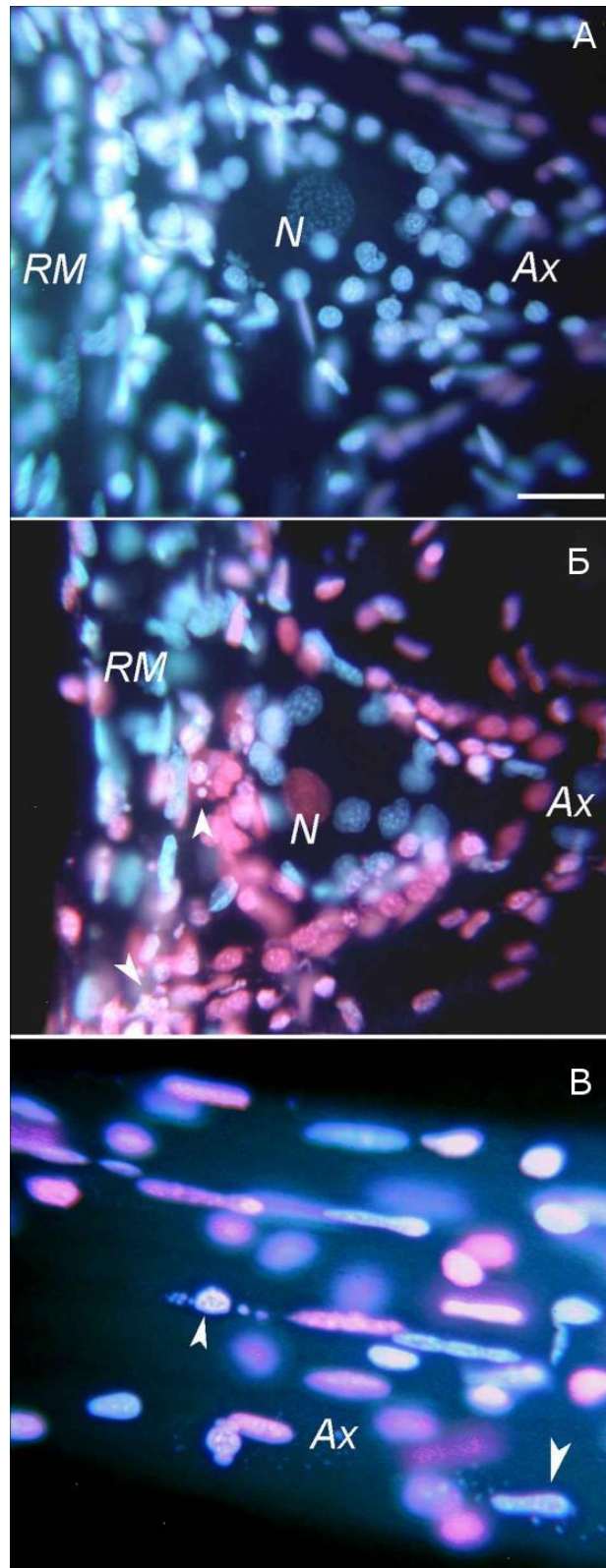


Рисунок 2.3 – Препараты рецептора растяжения речного рака, окрашенные пропидиум йодидом и Hoechst 33342. А - контроль; Б – тело нейрона после ФД воздействия; В – часть аксона после ФД воздействия. Стрелками указаны фрагментированные ядра апоптотических клеток. *RM* – рецепторная мышца, *N* – ядро нейрона, *Ax* – аксон. Масштабные отрезки: 20 мкм на А и Б, 10 мкм на В

мВт/см² в течении 30 секунд. Был проверен ряд концентраций от 100 до 700 нМ. На концентрацию радахлорина 100 нМ ответа нейронов и астроцитов в облучаемой сокультуре практически не наблюдалось. Добавление радахлорина в концентрации 700 нМ приводило к быстрой гибели клеток при ФД воздействии. При облучении клеток в присутствии 200 нМ радахлорина в течении 30 сек ответ наблюдался в среднем в 40±5 % (n=112) нейронов. Таким образом, рабочая концентрация варьировалась в пределах от 200 до 400 нМ в различных экспериментах в зависимости от используемого зонда. Фотосенсибилизатор добавлялся в кювету с клетками за пять минут до облучения. Клетки облучались в течении 10 с, 30 с, 1 мин, 2 мин, 3 мин, 5 мин в различных экспериментах.

2.4 Исследование динамики параметров клеток флуоресцентными зондами

2.4.1 Общая схема эксперимента

Исследование изменений концентрации уровня ионов кальция в цитозоле клеток первичной культуры производилось с помощью зонда Fluo-4 AM; изменений трансмембранного митохондриального потенциала - Rhodamine 123. Эксперименты проводились по следующей схеме: клетки инкубировали с флуоресцентными зондами и в течении необходимого времени, затем отмывали и, при необходимости, добавляли в кювету с культурами ингибиторы различных ферментов в зависимости от проводимого эксперимента. После помещали на инвертированный флуоресцентный микроскоп, оснащенный флюоритовым объективом с 20-кратным увеличением. Сигнал регистрировался с помощью CCD камеры (Retiga, QImaging, Surrey, BC, Canada). Получали серии изображений с интервалом 10 секунд. После 5 минут регистрации сигнала флуоресцентного зонда без воздействия на клетки запись останавливалась на короткое время для добавления фотосенсибилизатора в концентрации 200 нМ. Время инкубации радахлорина составляло 5 минут; в течении времени инкубации сигнал красителя регистрировался с интервалом 10 секунд. После инкубации регистрация сигнала

прерывалась для облучения клеток в течении 10 с, 30 с, 1 мин, 3 мин, 5 мин в различных экспериментах, затем регистрация возобновлялась для контроля ответа нейронов и астроцитов на фотодинамическое воздействие радахлорина.

Эксперименты с регистрацией изменения скорости перекисного окисления липидов с помощью флуоресцентного зонда C11-BODIPY^{581/591} проводились по аналогичной схеме, однако регистрация сигнала производилась с помощью конфокального микроскопа на двух длинах волн. Концентрация фотосенсибилизатора составляла 400 нМ, культуры облучались дважды в течении 2 минут.

Эксперименты с регистрацией изменения трансмембранного митохондриального потенциала и концентрации митохондриального кальция с помощью зондов TMRM и X-Rhod-1 AM проводились по следующей схеме: после инкубации клеток в присутствии зондов, клетки отмывались, после чего инкубировались в течении 5 минут в среде для регистрации с 200 нМ радахлорина. Затем кювета с культурой помещалась на конфокальный микроскоп. Регистрация сигнала производилась параллельно с облучением. Молекулы фотосенсибилизатора возбуждались импульсно с частотой 5 - 10 с на длине волны 633 нм.

Флуоресцентно-микроскопические измерения выполнены на установке, включающей инвертированный микроскоп Olympus, систему возбуждающего света ксеноновой лампы, монохроматор (Cairn Research, Кент, Великобритания) и CCD-камеру (Retiga, QImaging, Surrey, BC, Канада). Работа установки контролировалась компьютерной программой Andor IQ (Великобритания).

Флуоресцентный сигнал зондов X-Rhod-1, TMRM, BODIPY-C11 регистрировался с помощью конфокального микроскопа Zeiss 710 CLSM (Carl Zeiss, Германия).

2.4.2 Флуоресцентные кальциевые зонды

В работе были использованы ацетоксиметильные (AM) эфиры кальциевых зондов. В форме AM краситель является мембранно-проницаемым, так как может

пассивно проникать в клетки за счет гидрофобного АМ-хвоста. После проникновения в клетку АМ-форма зонда подвергается деэстерификации внутриклеточными эстеразами. Образованная таким образом полярная форма красителя не может диффундировать обратно через плазмалемму во внеклеточное пространство, оставаясь в цитоплазме клетки на достаточно длительное время [137].

Молекула красителя в АМ форме является неполярной и, соответственно имеет ограниченную растворимость в водных растворах. Для лучшей растворимости красителей в водной среде использовалось поверхностно активное вещество Pluronic F-127. Pluronic F-127 действует как диспергирующий агент и препятствует образованию мицелл из АМ эфиров зондов. Pluronic F-127, разведенный в DMSO до 2% раствора, добавлялся в кювету с клетками одновременно с зондом.

Основной характеристикой Ca^{2+} -индикаторов, отражающей сродство к Ca^{2+} , является константа диссоциации (K_d). K_d измеряется в молярных единицах и является концентрацией, при которой половина молекул индикатора связались с кальцием и находятся в равновесном состоянии. Флуоресценция зонда изменяется линейно при изменении концентрации Ca^{2+} в диапазоне от $0.1 \times K_d$ до $10 \times K_d$. С помощью K_d и калибровки сигнала зонда можно рассчитать концентрацию кальция в клетке по регистрируемому сигналу флуоресценции [137]. Однако, в данной работе исследовались качественные изменения концентрации ионов кальция в ответ на ФД-воздействие, поэтому оценивалась только интенсивность флуоресценции зондов.

2.4.2.1 Определение содержания Ca^{2+} в цитозоле

Флуоресцентный зонд Fluo-4 ($K_d=345$ нМ) – один из наиболее часто используемых зондов для измерения Ca^{2+} в цитозоле клеток. Зонд слабо флуоресцирует в бескальциевой среде, но при связывании с Ca^{2+} его флуоресценция возрастает приблизительно в 100 раз [137]. Спектральные

характеристики Fluo-4 (максимум возбуждения – 494 нм, максимум эмиссии – 516 нм) подходят для регистрации изменений $[Ca^{2+}]_c$ с минимальным возбуждением молекул радахлорина.

Для измерения $[Ca^{2+}]_c$ клетки инкубировали 40 минут при комнатной температуре с 5 мкМ Fluo-4 AM в среде Хенкса. Затем клетки отмывали средой регистрации и помещали на инвертированный флуоресцентный микроскоп, оснащенный 20х флюоритовым объективом. Флуоресценция Fluo-4 измерялась в одиночных клетках с использованием возбуждающего света ксеноновой лампы, проходящего через монохроматор на длине волны $\lambda_{\text{возб}}$ -490 нм, и охлаждаемой CCD камеры ($\lambda_{\text{рег}}$ - 515 нм). Получали серии изображений первичных культур нейронов и астроцитов с интервалом 10 секунд. Изображения обрабатывались с помощью программного пакета "Image J".

2.4.2.2 Определение содержания Ca^{2+} в митохондриях

Изменения концентрации Ca^{2+} в митохондриях нейронов и астроцитов первичной культуры регистрировались с помощью флуоресцентного зонда X-Rhod-1 AM. Зонд обладает следующими характеристиками: $K_d=700$ нМ, максимум возбуждения – 580 нм, эмиссии – 602 нм. Молекула X-Rhod-1 несет положительный заряд, что позволяет использовать этот зонд для регистрации уровня митохондриального кальция [137]. Однако, зонд слабо окрашивает также и Ca^{2+} в цитозоле, поэтому при обработке результатов анализировался сигнал, зарегистрированный в митохондриальных областях клеток.

Для измерения $[Ca^{2+}]_m$ клетки инкубировали 20 минут при комнатной температуре с 5 мкМ X-Rhod-1-AM в среде Хенкса, после чего клетки отмывали и помещали на конфокальный микроскоп. Флуоресценцию возбуждали твердотельным лазером $\lambda_{\text{возб}}$ - 561 нМ, регистрировали при $\lambda_{\text{рег}}$ - 592 нм. Одновременно с измерением Ca^{2+} в митохондриях использовался флуоресцентный зонд Fluo-4 для регистрации $[Ca^{2+}]_c$. Молекулы фотосенсибилизатора возбуждались импульсно с частотой 0,1 – 0,2 Гц на длине волны 633 нм. Серии

оптических изображений получали с интервалом 5- 10 сек. Для получения изображений использовался флюоритовый объектив 40х.

2.4.3 Регистрация изменения скорости перекисного окисления липидов

Регистрация изменения скорости перекисного окисления липидов осуществлялась с помощью ратиометрического флуоресцентного зонда BODIPY-C11[581/591]. BODIPY-C11[581/591] флуоресцирует в красной части спектра (максимум - 595 нм). При окислении липидной части зонда спектр флуоресценции сдвигается в зеленую область (с максимумом 520 нм). Молекулы зонда являются липофильными, что позволяет им быстро проникать в мембраны клеток. BODIPY-C11[581/591] используется в малых концентрациях, и не вносит существенных изменений в характеристики мембран клетки [138].

К клеткам добавляли флуоресцентный краситель BODIPY-C11 в концентрации 2 мкМ. Сигнал регистрировали с помощью конфокального микроскопа с использованием двойного возбуждения 488 нм и 561 нм (для окисленной и восстановленной форм BODIPY-C11, соответственно), регистрация сигнала производилась при длинах волн 525 нм и 626 нм (рисунок 2.4 А и Б). Скорости перекисного окисления липидов оценивали по углу наклона кривой отношения флуоресценции при различных длинах волн возбуждения BODIPY-C11[581/591] (рисунок 2.4 В). Для получения изображений использовался объектив с 40х увеличением.

Изменение скорости перекисного окисления липидов оценивалось по изменению наклона графика отношения окисленной формы зонда к восстановленной (рисунок 2.4 В). Увеличение угла наклона и значения тангенса угла наклона отражает увеличение скорости перекисного окисления липидов [138]. Сравнивались тангенсы углов наклона графиков после ФД воздействия с первоначальным тангенсом угла наклона графика.

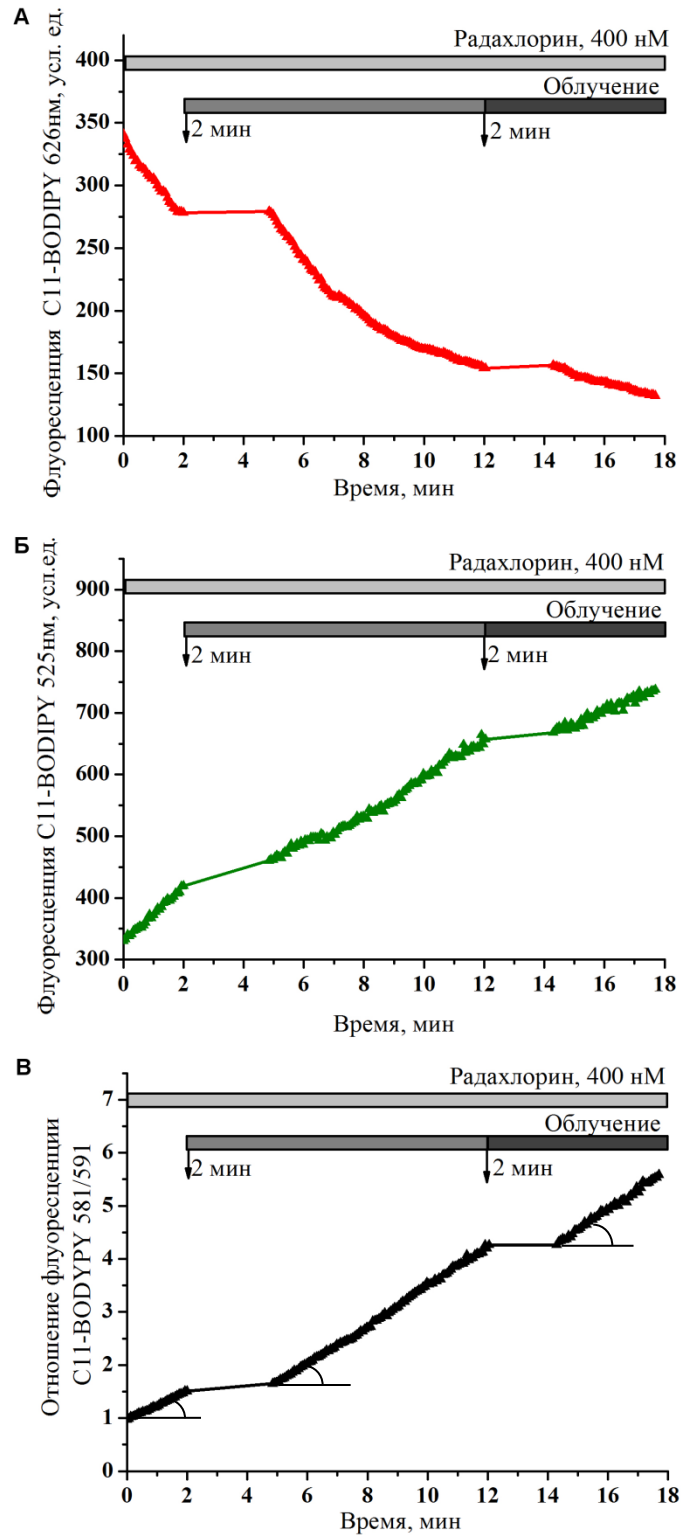


Рисунок 2.4 – Измерение скорости перекисного окисления липидов с помощью флуоресцентного зонда C11-BODIPY [581/591]: А - изменение флуоресценции не окисленной формы красителя ($\lambda_{\text{возб}}$ - 561 нм, $\lambda_{\text{рег}}$ - 626 нм); Б - изменение флуоресценции окисленной формы красителя ($\lambda_{\text{возб}}$ - 488 нм, $\lambda_{\text{рег}}$ - 525 нм); В - отношение флуоресценции окисленной формы красителя к не окисленной; сравниваются обозначенные углы наклона графика

2.4.4 Определение митохондриального потенциала

Для регистрации изменений трансмембранного митохондриального потенциала ($\Delta\Psi_M$) использовался флуоресцентный зонд Родамин 123 (Rh123). Rh123 – катионный флуоресцентный зонд с максимумом эмиссии 525 нм в водной среде. Положительный заряд позволяет зонду проникать через внутреннюю мембрану митохондрий за счет $\Delta\Psi_M$. Аккумуляция Rh123 в поляризованных митохондриях приводит к сдвигу спектра флуоресценции в красную область и гашению флуоресценции зонда за счет перераспределения. Митохондриальная деполяризация приводит к восстановлению флуоресцентного сигнала Rh 123 [139, 140]. Таким образом, увеличение флуоресцентного сигнала Rh123 в зеленой области спектра свидетельствует о деполяризации митохондрий. Учитывая это, в экспериментах сигнал калибровался добавлением 1 мкМ протонофора FCCP, который вызывает деполяризацию мембран митохондрий. Начальный уровень флуоресценции зонда был принят за 0, а максимальные значения, вызванные FCCP (при минимальном $\Delta\Psi_M$), за 100%.

Клетки инкубировались 15 минут при комнатной температуре с в среде Хенкса с добавлением Rh123 (1 мкг/ мл, 2.6 мкМ). Затем культуры отмывали средой регистрации и помещали на инвертированный флуоресцентный микроскоп, оснащенный 20x объективом.

Флуоресценция Rh123 измерялась в одиночных клетках с использованием возбуждающего света ксеноновой лампы, проходящего через монохроматор на длине волны $\lambda_{\text{возб}}$ - 490 нм, и охлаждаемой CCD камеры ($\lambda_{\text{рег}}$ - 515 нм).

Изменения митохондриального мембранного потенциала $\Delta\Psi_M$ также регистрировали с помощью зонда TMRM, который тоже имеет свойство накапливаться в поляризованных митохондриях. Флуоресценция TMRM в красно-оранжевой области спектра (максимум 575 нм) становится слабой или исчезает совсем при повреждении мембраны митохондрии и снижении мембранного потенциала [139]. Сигнал TMRM нормировался: начальный уровень

флуоресценции был принят за 100 %, минимальный сигнал (после добавления FCCP) – за 0%.

Клетки инкубировались в течении 40 мин в присутствии 20нМ TMRM при температуре 37°C, отмывались три раза, после чего помещались на микроскоп для регистрации сигнала. Флуоресценцию красителя возбуждали твердотельным лазером $\lambda_{\text{возб.}}$ - 561 нМ, регистрировали при $\lambda_{\text{рег.}}$ - 592 нм. Для получения серий изображений использовался флюоритовый объектив 40х. Серии оптических изображений получали с интервалом 5- 10 сек.

2.5 Ингибиторный анализ

Механизмы ответа нейронов и астроцитов первичной культуры были изучены при помощи ингибиторного анализа.

Для оценки вклада глутаматных рецепторов в ФД индуцируемый кальциевый сигнал использовался ингибитор NMDA рецепторов МК801. После стимуляции кальциевых осцилляций ФД воздействием радахлорина (30 секунд), в культуры добавлялся МК801 в концентрации 1 мкМ.

Для анализа вклада внеклеточного кальция в ответ нейронов и астроцитов на ФД воздействие радахлорина использовалась бескальциевая среда. Номинально бескальциевые растворы вместо CaCl_2 содержали 0,1мМ EGTA и 2мМ MgCl_2 . Культуральная среда заменялась на бескальциевый раствор за 10 минут до начала проведения эксперимента.

Для оценки вклада ЭР в кальциевый ответ клеток на облучение в присутствии фотосенсибилизатора в среду Хенкса добавлялся 1 мкМ тапсигаргина. Тапсигаргин, специфический ингибитор Ca^{2+} -АТФазы эндоплазматического ретикулума, вызывает опустошение ЭР, увеличение концентрации цитозольного кальция и последующую его откачку во внеклеточную среду АТФазами плазматической мембраны.

Для исследования вклада IP₃-рецепторов ЭР в ответ на ФД-воздействие использовали U73122 - ингибитор PLC, которая при активации производит IP₃. Для этого клетки предварительно инкубировали в культуральной среде с 5 мкМ U73122 при комнатной температуре.

Для оценки воздействия активных форм кислорода при облучении лазером в присутствии фотосенсибилизатора, в среду с клетками добавляли 500 мкМ антиоксиданта Тролокс (водорастворимый аналог витамина E) за 30 мин до начала проведения эксперимента.

Вклад митохондриальной поры в изменение мембранного потенциала при фотодинамическом воздействии радахлорина был оценен путем регистрации изменения митохондриального мембранного потенциала в клетках предварительно обработанных циклоспорином А. Для ингибирования митохондриальной поры в клетки инкубировали в среде Хенкса с 1 мкМ циклоспорино А 20 мин при комнатной температуре.

2.6 Статистический анализ

Статистический анализ и получение графиков был проведен с использованием компьютерной программы Microsoft Excel и Origin Pro 8.1 (Microcal Software Inc.). Статистическая оценка достоверности отличий проводилась с помощью однофакторного дисперсионного анализа для повторных измерений (One Way Anova RM), t – критерий Стьюдента для двух независимых выборок, также с помощью χ -квадрат критерия Пирсона для сравнения качественных признаков. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Серии фотографий обрабатывались с помощью программного пакета "Image J", Image Pro Plus 4.1.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Исследование фотодинамического воздействия радахлорина на нейроны и глиальные клетки

В первой части данной работы изучены особенности локализации и накопления радахлорина в нейронах и глиальных клетках. Также рассмотрены электрофизиологические реакции нейронов речного рака и эффективность ФД воздействия радахлорина на нейроны и глию. В качестве объекта исследования использован механорецептор речного рака и брюшная нервная цепочка.

3.1.1 Спектральные характеристики радахлорина

В спектре поглощения света водным раствором радахлорина (10 мМ) зарегистрированы 2 максимума: 420 и 654 нм (рисунок 3.1). Первый соответствует полосе Сорэ поглощения света порфириновым кольцом [141], а второй - специфичен для хлоринов и других производных хлорофилла. Этот максимум находится в диапазоне близком к «окну прозрачности» биологических тканей, что позволяет свету проникать глубже и воздействовать на более глубокие структуры [142].

Радахлорин ярко флуоресцирует в красной области спектра (рисунок 3.1). При возбуждении светом с длиной волны 410 нм его спектр флуоресценции представляет собой широкую полосу в диапазоне от 620 до 700 нм с максимумом при 654 нм (рисунок 3.1).

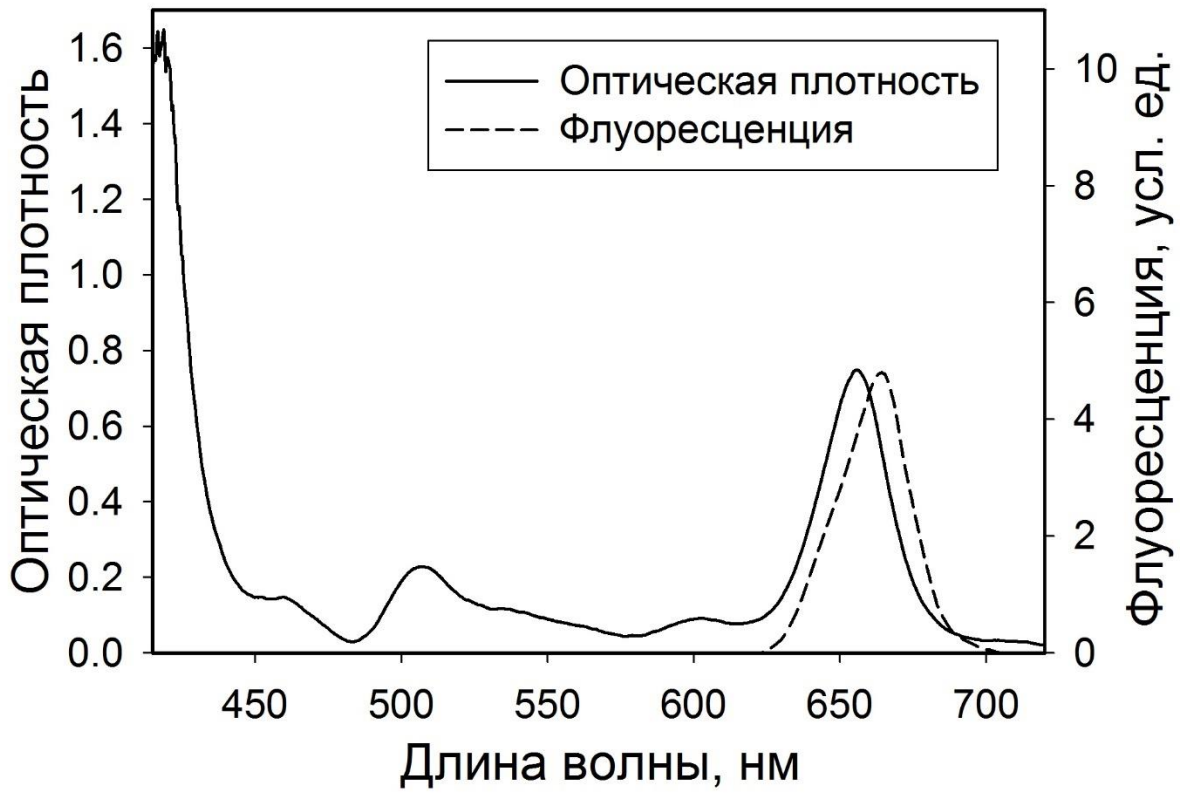


Рисунок 3.1 – Спектр поглощения и флуоресценции водного раствора
радахлорина (10 мМ)

3.1.2 Внутриклеточное распределение радахлорина в нейронах и глиальных клетках

Локализация радахлорина в нервной ткани изучалась на рецепторе растяжения речного рака. Флуоресцентная фотография препарата, инкубированного в растворе радахлорина (5 мкМ), представлена на рисунке 3.2. Радахлорин локализуется, в основном, на поверхности клеток рецептора речного рака. Он накапливается преимущественно в многослойной глиальной оболочке. Заметно ниже флуоресценция в теле и аксонах нейронов. В меньшей степени радахлорин также окрашивает дендриты, их глиальные оболочки, и рецепторные мышцы (рисунок 3.2).

3.1.3 Динамика накопления и выведения радахлорина в нервной ткани

Флуоресцентное исследование накопления и выведения радахлорина в нервной ткани проводилось на брюшной нервной цепочке речного рака при концентрации радахлорина 50 мкМ (рисунок 3.3). Основное накопление фотосенсибилизатора (до 10 усл. ед.) в ткани нервной брюшной цепочки рака происходит примерно за 30 минут, а за последующие 30 минут содержание радахлорина в нервной ткани увеличивается незначительно, примерно на 11%. Выведение радахлорина из нервной ткани в результате промывки в физиологическом растворе происходит медленней. По полученным данным через 2 часа промывки, содержание радахлорина в брюшной нервной цепочке снизилось всего на 11 % (таблица 1).

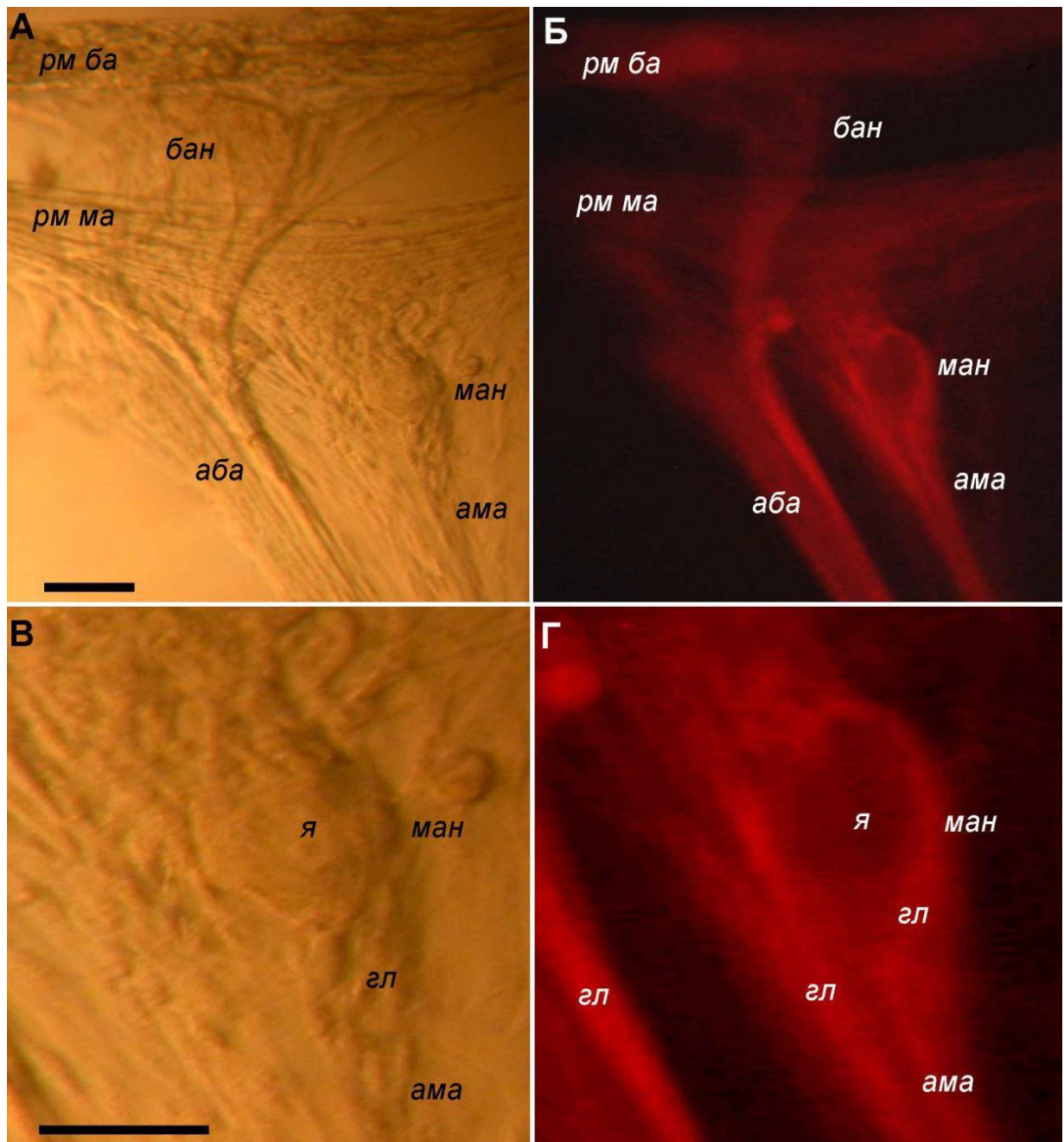


Рисунок 3.2 – Распределение флуоресценции радахлорина в рецепторе растяжения рака

Микрофотографии рецептора растяжения рака в проходящем свете, полученные при использовании объективов 20х (А) и 40х (В); Б и Г - флуоресцентные изображения того же препарата, флуорохромированного радахлорином (5·мкМ). Масштабные отрезки – 50 мкм

аба – аксон быстро адаптирующегося нейрона; *ама* – аксон медленно адаптирующегося нейрона; *бан* – быстро адаптирующийся нейрон; *гл* – глиальные клетки; *ман* – медленно адаптирующийся нейрон; *рм ба* – быстро адаптирующаяся рецепторная мышца; *рм ма* – медленно адаптирующаяся рецепторная мышца; *я* – ядро

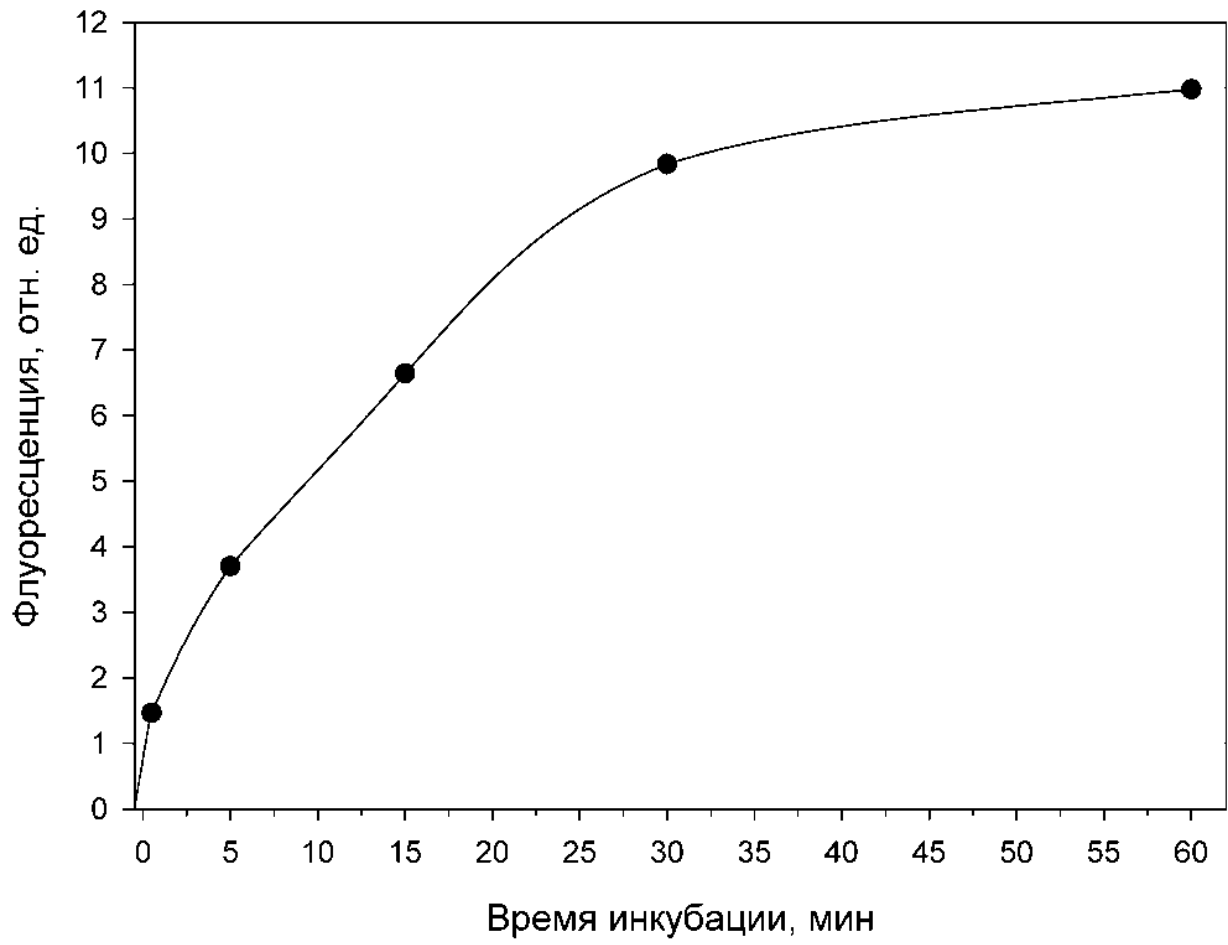


Рисунок 3.3 – Динамика накопления радахлорина нервной ткани рака

Таблица 1 - Накопление и выведение радахлорина в брюшной нервной цепочке речного рака

№ опыта	Время инкубации, мин	Время отмывки, мин	Флуоресценция радахлорина в нервной ткани рака, отн. ед
Накопление			
1	0,5	-	1,5
2	1	-	3,0
3	5	-	3,7
4	15	-	6,6
5	30	-	9,8
6	60	-	11,0
Выведение			
7	60	60	11,6
8	60	120	9,8

3.1.4. Биоэлектрические реакции нейронов на ФД воздействие радахлорина

В результате исследования физиологических реакции нейронов рецепторов растяжения в ответ на ФД воздействие радахлорина было выделено три основных типа изменения импульсной активности нейронов (рисунок 3.4).

При концентрациях радахлорина $0,05 \cdot \text{нМ}$ – $0,5 \cdot \text{нМ}$ в 76% случаев наблюдалась реакция типа А (рисунок 3.4 А), в 12% - реакция типа В (рисунок 3.4 Б), в остальных случаях изменений нейронной активности не наблюдалось. В диапазоне концентраций $0,5 \cdot \text{нМ}$ – $0,5 \cdot \text{мкМ}$ в 28% – реакций нейронов не наблюдалось, в 44% случаев преобладали реакции типа С (рисунок 3.4 В), в 14% – типа В, а в остальных случаях импульсная активность резко прекращалась. При концентрациях радахлорина $0,5 \cdot \text{мкМ}$ – $5 \cdot \text{мкМ}$ в 50% случаев преобладали реакции типа В, в 36% - реакции типа С, а в остальных 14% происходило резкое прекращение импульсной активности нейронов.

Была изучена зависимость продолжительности импульсных реакций фотосенсибилизированных нейронов от концентрации радахлорина; по полученным данным был построен график, отражающий зависимость (рисунок 3.5). Линия регрессии, отражающая зависимость продолжительности импульсации от концентрации радахлорина, характеризуется уравнением:

$$\log T = -0,26 \log C - 0,74.$$

Как показано ранее [59], эффективность фотосенсибилизаторов тем выше, чем меньше по модулю тангенс наклона графика. Данная функция не является крутой, что характеризует радахлорин, как фотосенсибилизатор, который может инактивировать нейроны даже в наномолярных концентрациях за время, приемлемое для ФДТ (до 30 минут). Коэффициент $b=0,26$; это указывает на то, что одна молекула ФС поглотившая квант света, вызывала около 4 вторичных повреждений клетки, возможно, иницилируя несколько цепочек свободнорадикального повреждения [4].

3.1.5 Фотоиндуцированная гибель нейронов и глиальных клеток

ФД воздействие в присутствии радахлорина (250 нМ, 30 мин) эффективно инактивировало нейроны рецептора растяжения и вызывало смерть нейронов и ГК путем некроза и апоптоза (рисунок 3.6). При этом длительность импульсации нейронов достоверно ($p < 0,001$) снижалась с 363 ± 45 мин до $14 \pm 1,5$ мин (рисунок 3.6 А). ФД воздействие в среднем увеличивало уровень некроза нейронов от 0 до 93 ± 7 % ($p < 0,001$; рисунок 3.5 Б), некроза ГК – от 3 ± 3 до 73 ± 5 % ($p < 0,001$; рисунок 3.6 Г). Также резко увеличивался уровень апоптоза глии от 2 ± 1 до 29 ± 6 отн. ед ($p < 0,001$; рисунок 3.6 В).

Полученные данные свидетельствуют о том, что радахлорин достаточно быстро накапливается в нервной ткани и вызывает гибель нервных клеток при облучении путем некроза или апоптоза и, следовательно, обладает высокой фотодинамической эффективностью в отношении нейронов и глиальных клеток.

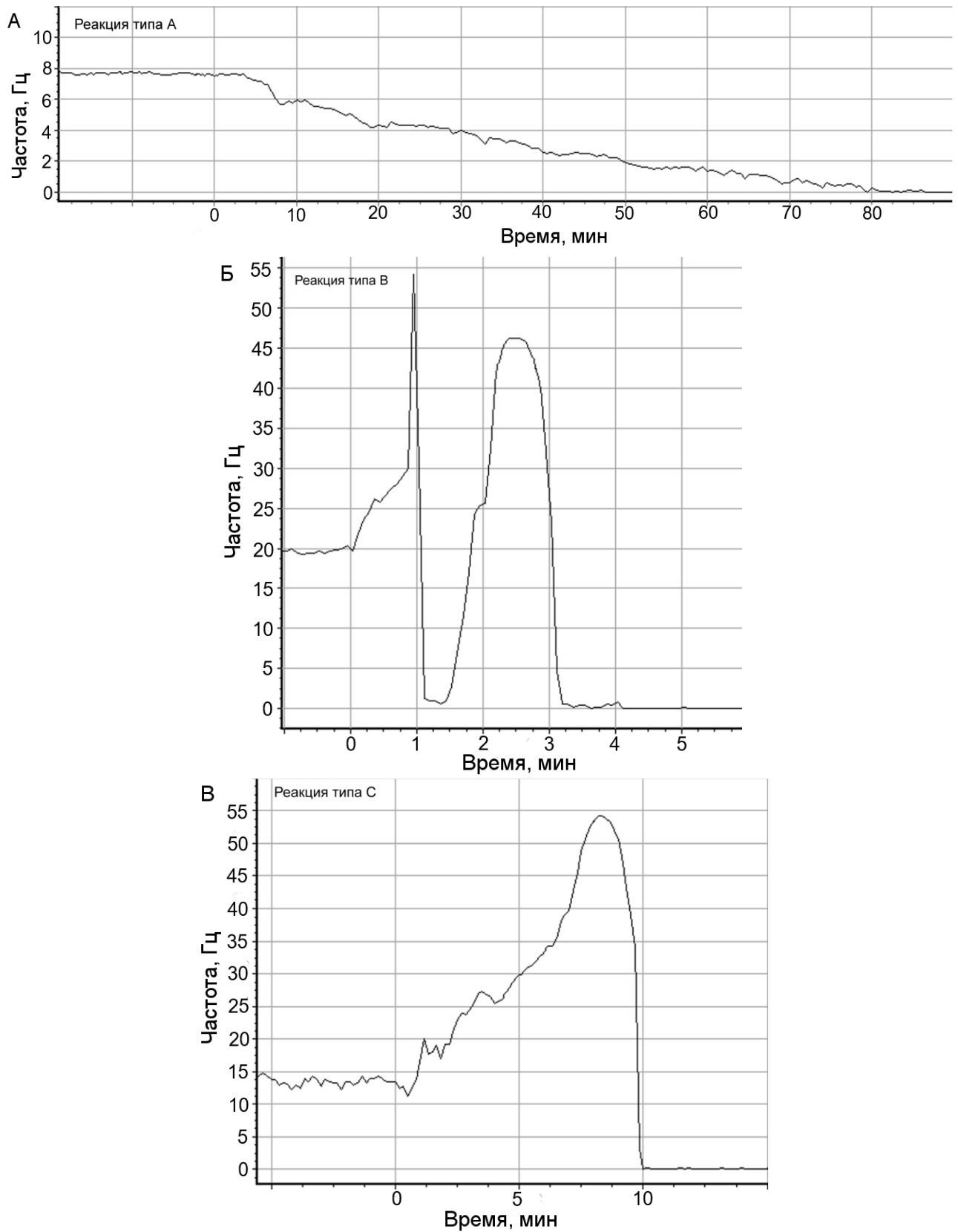


Рисунок 3.4 - Электрофизиологические реакции медленно адаптирующегося нейрона рецептора растяжения на ФД воздействие радехлорина
 Ноль на оси абсцисс соответствует началу облучения

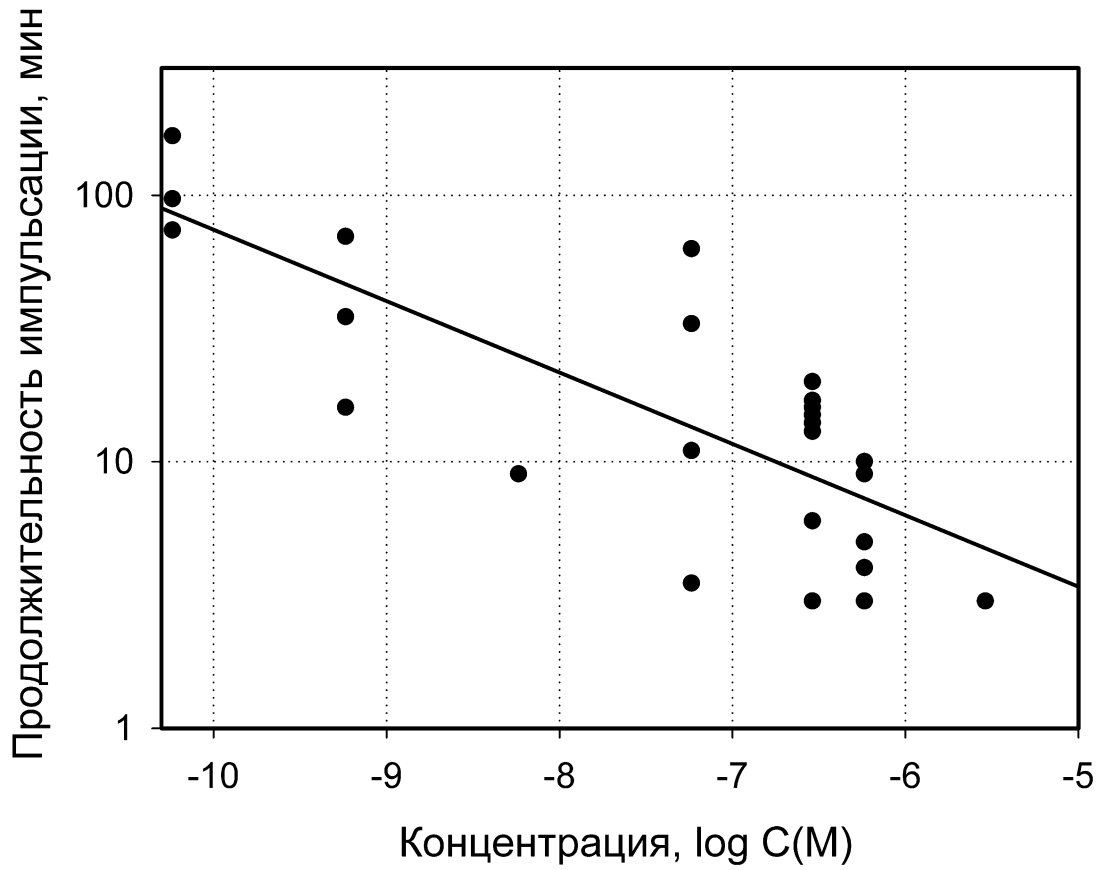


Рисунок 3.5 – Зависимость продолжительности импульсных реакций фотосенсибилизированных нейронов от концентрации радахлорина

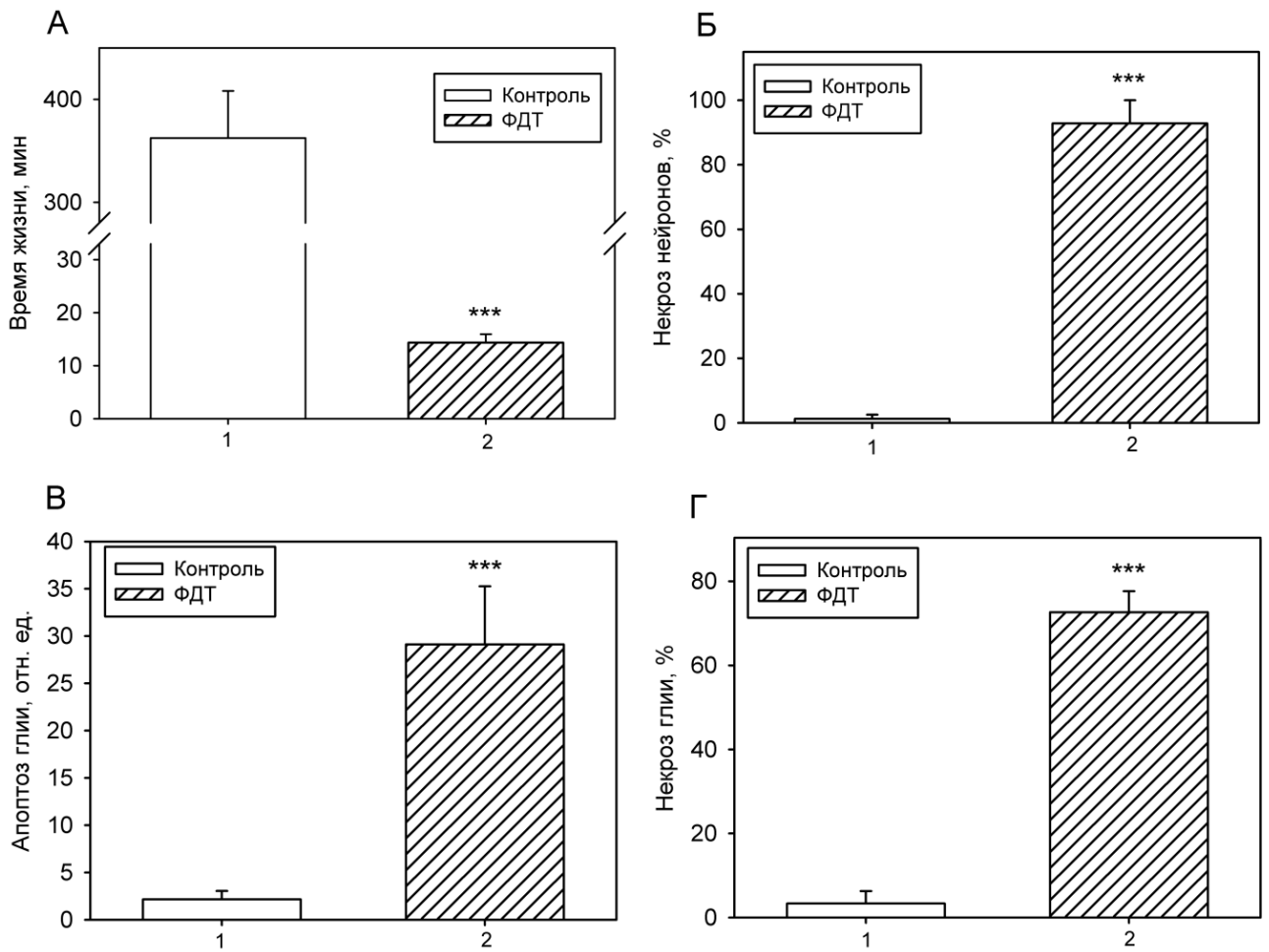


Рисунок 3.6 – Инактивация и смерть медленно адаптирующихся нейронов механорецептора под влиянием фотодинамического воздействия радахлорина (250 нМ). Достоверность отличий от контроля *** - $p < 0,001$ (t – критерий Стьюдента)

3.2 Изменения уровня ионов кальция в нейронах и астроцитах при ФД воздействии

ФД воздействие запускает множество сигнальных механизмов в клетках [74, 84]. Одним из таких механизмов, запускаемых в ответ на ФДТ, является повышение уровня цитозольного кальция. Известно, что в различных типах раковых клеток, в том числе в клетках глиомы, происходит увеличение $[Ca^{2+}]_c$ при ФД воздействии [8, 119]. Исследованию здоровых клеток, также подвергающимся воздействию при ФДТ, в литературе уделено малое внимание. Особенно важно изучить ответы здоровых нервных клеток, окружающих опухоль, так как изменение в их метаболизме и сигналинге может привести к непредсказуемым последствиям.

Во второй части экспериментов были изучены изменения внутриклеточного уровня ионов Ca^{2+} в первичных нейронах и астроцитах в ответ на ФД воздействие радахлорина.

3.2.1 Изменения уровня цитозольного кальция в нейронах и астроцитах при ФД воздействии

Для изучения изменений $[Ca^{2+}]_c$ в ответ на ФД воздействие радахлорина первичные смешанные культуры нейронов и астроцитов, предварительно загруженные кальциевым зондом Fluo-4, инкубировались в среде Хенкса с 200 нМ радахлорина. Далее клетки отмывались и последовательно подвергались облучению в течение 5 с, 30 с, 1 мин и 5 мин (рисунок 3.7, 3.8). Облучение в присутствии радахлорина вызывало изменения $[Ca^{2+}]_c$ в большинстве нейронов первичной культуры (рисунок 3.7) и в незначительном количестве астроцитов сокультуры (рисунок 3.8, 3.10). Типичные ответы нейронов и астроцитов представлены на рисунках 3.7 Б и 3.8 Б. В процессе эксперимента концентрация радахлорина в кювете была последовательно увеличена несколько раз на 100, 400

и 200 нМ. После каждого увеличения концентрации радахлорина клетки подвергались облучению (рисунок 3.7, 3.8). Облучение в течение 1 мин в присутствии максимальной концентрации ФС привело к резкому увеличению $[Ca^{2+}]_c$ с последующим выходом его во внеклеточное пространство как в нейронах (рисунок 3.7), так и в астроцитах (рисунок 3.8) первичной кортикальной культуры.

Интересно, что количество клеток, ответивших на ФД воздействие радахлорина (200 нМ) возрастало с увеличением времени облучения клеточной культуры (рисунок 3.9, 3.10), причем облучение в течение 1 и 3 мин достоверно ($p < 0,05$) увеличивало количество ответивших нейронов на $46 \pm 14\%$ и $55 \pm 20\%$ соответственно по сравнению с контрольной регистрацией $[Ca^{2+}]_c$ (данные из 4 экспериментов, $n=117$, рисунок 3.9 Б). Количество ответивших астроцитов также имело тенденцию к возрастанию при увеличении длительности ФД воздействия, однако достоверных отличий обнаружено не было (данные из 4 экспериментов, $n=126$, рисунок 3.10 Б).

Также оценивались изменения параметров кальциевых осцилляций первичных в зависимости от времени облучения. Амплитуда изменений $[Ca^{2+}]_c$ составляла $13 \pm 2\%$ увеличения базального уровня уже после 10 секунд облучения; а после облучения более 5 минут достоверно возрастала с $13 \pm 2\%$ (10 секунд) и с $15 \pm 2\%$ (30 секунд) до $30 \pm 6\%$ ($p < 0,01$; $n=142$; рисунок 3.11 А). Частота осцилляций $[Ca^{2+}]_c$ практически не изменялась в процессе ФД воздействия радахлорина ($n=142$; рисунок 3.11 Б).

ФД воздействие радахлорина не только увеличивало количество клеток с изменениями $[Ca^{2+}]_c$ при увеличении времени облучения, но и увеличивало амплитуду фотоиндуцированных кальциевых осцилляций с увеличением времени облучения более 5 минут. Полученные результаты свидетельствуют об участии кальциевой регуляции нейронов и астроцитов в ответах на фотодинамическое воздействие радахлорина. Для выяснения клеточных механизмов, участвующих в повышении $[Ca^{2+}]_c$ в ответ на облучение, был проведен ингибиторный анализ.

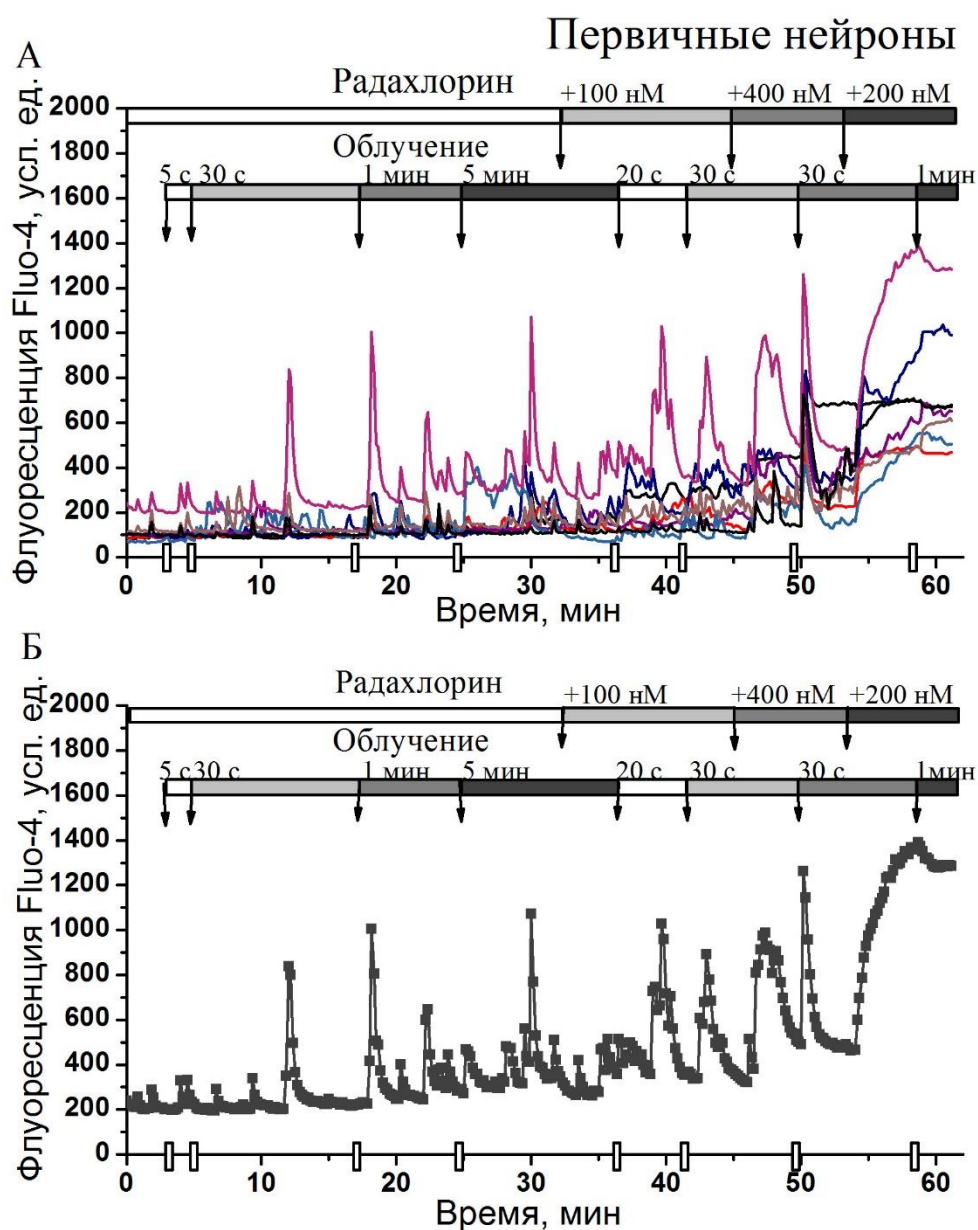


Рисунок 3.7 – ФД воздействие радахлорина стимулирует кальциевые осцилляции в первичных нейронах культуры. А – фотоиндуцированные изменения $[Ca^{2+}]_c$ нейронов в репрезентативном эксперименте. Б – типичное изменение $[Ca^{2+}]_c$ культивируемого нейрона в ответ на ФД воздействие.

Каждая кривая на графиках отражает изменения в одном репрезентативном нейроне. На оси абсцисс – время регистрации сигнала Fluo-4, прямоугольниками отмечены моменты остановки регистрации на время облучения

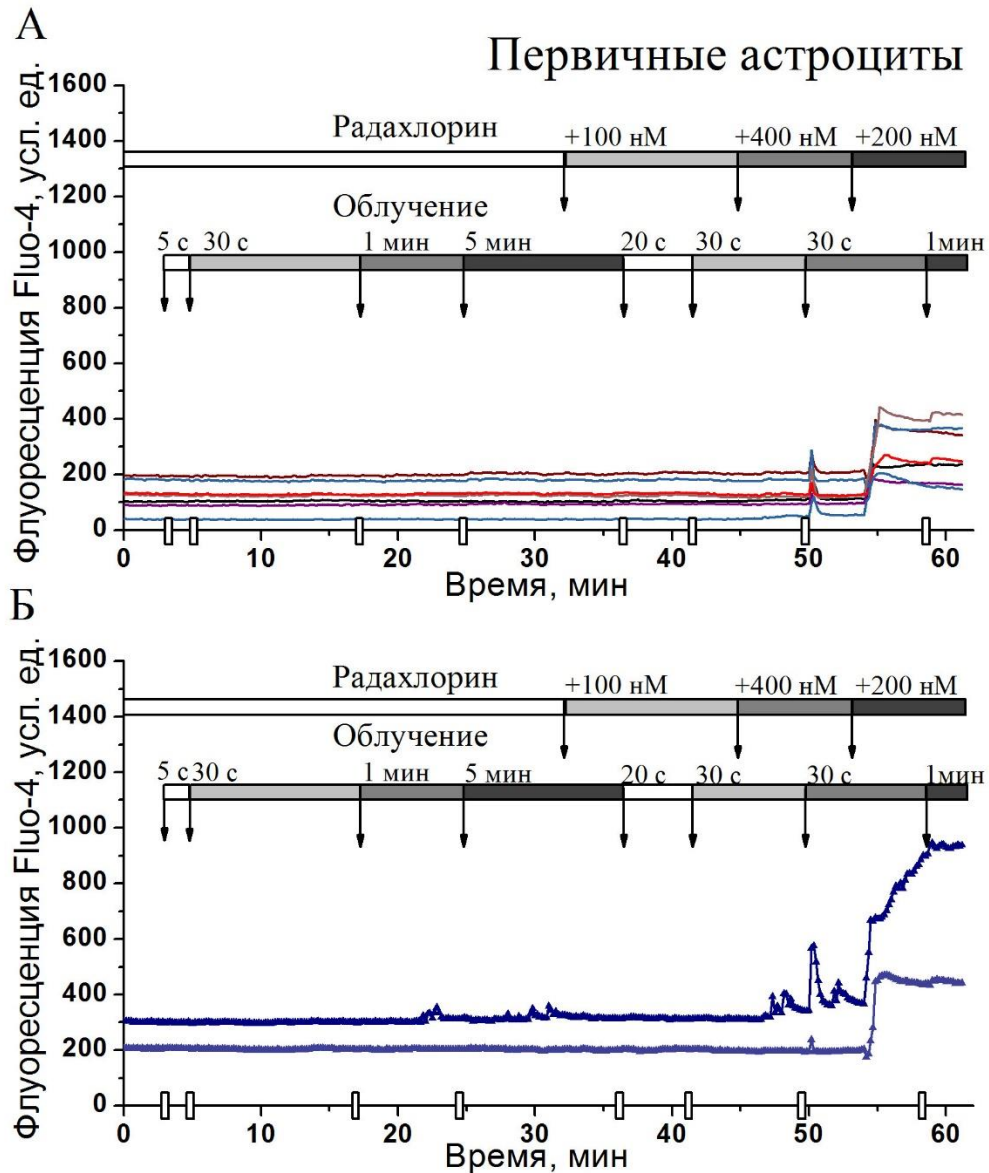


Рисунок 3.8 – ФД воздействие радахлорина вызывает изменения $[Ca^{2+}]_c$ лишь в некоторых астроцитах первичной культуры. А – фотоиндуцированные изменения $[Ca^{2+}]_c$ астроцитов в репрезентативном эксперименте. Б – типичные изменения $[Ca^{2+}]_c$ культивируемых астроцитов.

Каждая кривая на графиках отражает изменения в одном репрезентативном астроците. На оси абсцисс – время регистрации сигнала Fiuo-4, прямоугольниками отмечены моменты остановки регистрации на время облучения

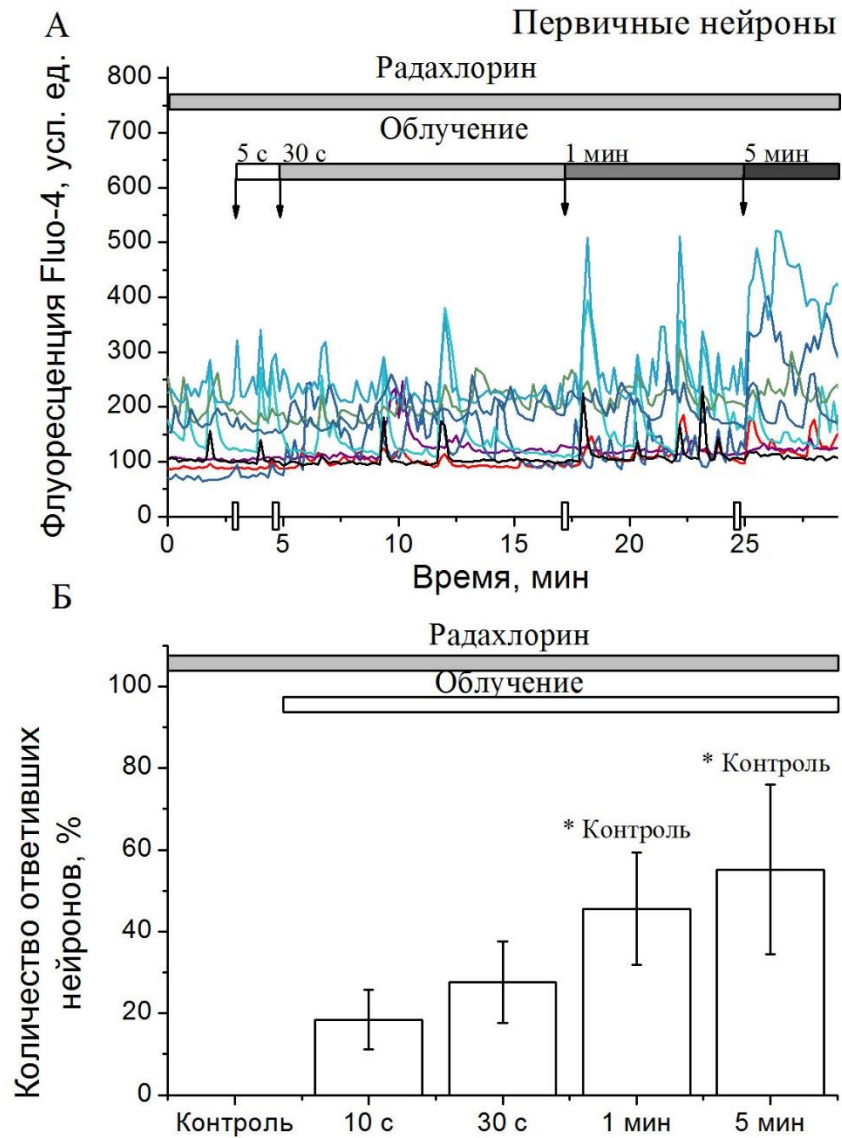


Рисунок 3.9 – Изменения количества ответивших нейронов культуры в зависимости от времени ФД воздействия радахлорина (200 нМ)

А – изменения $[Ca^{2+}]_c$ в культивируемых нейронах при различном времени облучения (представлены репрезентативные клетки). На оси абсцисс – время регистрации сигнала Fiuo-4, прямоугольниками отмечены моменты остановки регистрации на время облучения. Б – количество нейронов, ответивших на облучение. Данные представлены в процентах от общего числа нейронов в виде среднего значения \pm стандартная ошибка; * - $p < 0,05$ (One Way Anova RM)

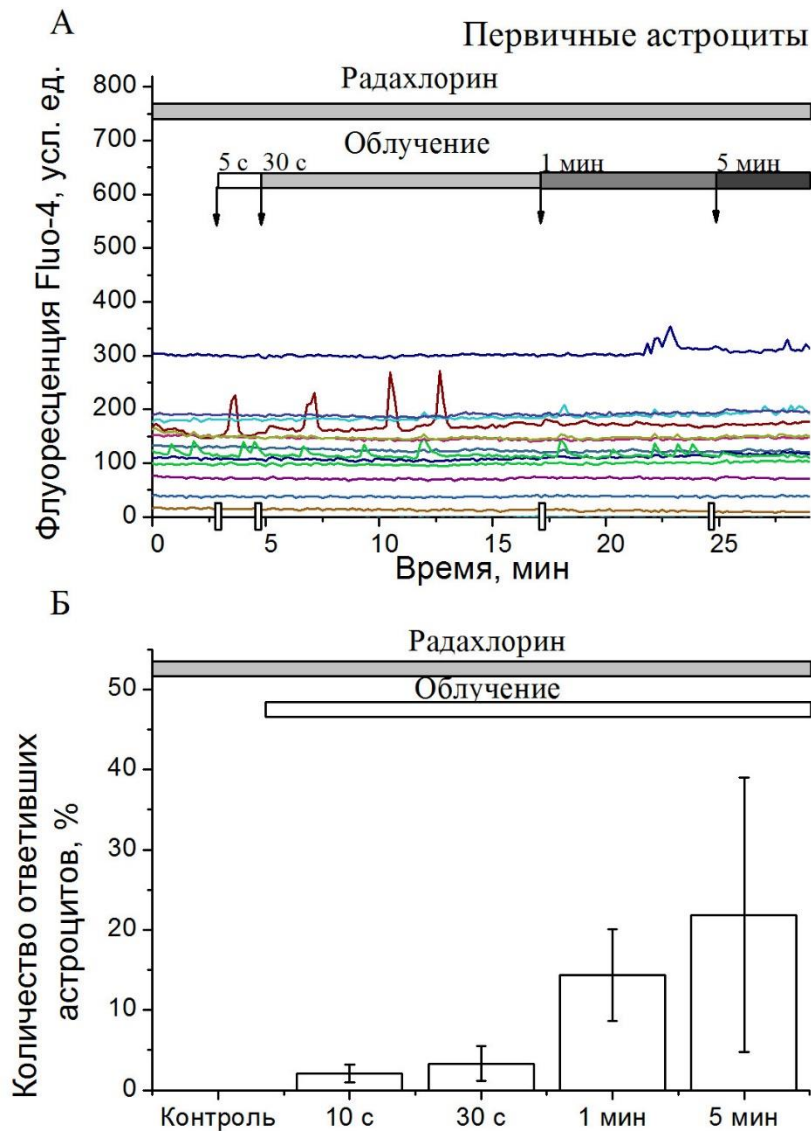


Рисунок 3.10 – Изменения количества ответивших астроцитов первичной культуры в зависимости от ФД воздействия радахлорина (200 нМ)

А – изменения $[Ca^{2+}]_c$ в культивируемых астроцитах при различном времени облучения (представлены репрезентативные клетки). На оси абсцисс – время регистрации сигнала Fiuo-4, прямоугольниками отмечены моменты остановки регистрации на время облучения. Б – количество астроцитов, ответивших на облучение. Данные представлены в процентах от общего числа астроцитов в культуре в виде среднего значения \pm стандартная ошибка

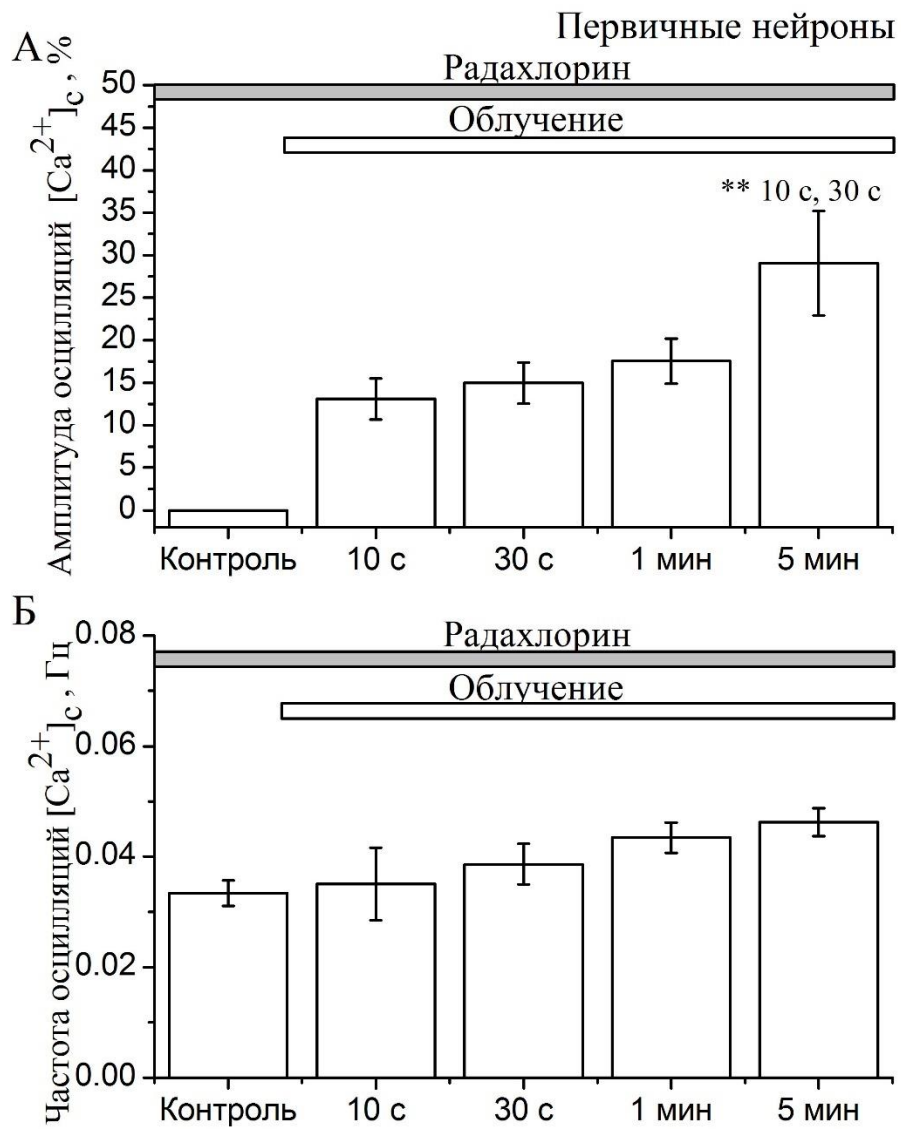


Рисунок 3.11 – Изменение параметров колебаний $[Ca^{2+}]_c$ в нейронах при ФД воздействии радахлорина. А – изменение амплитуды. Б – изменение частоты. Данные представлены в виде средних значений \pm стандартная ошибка.

** - $p < 0,01$ (One Way Anova RM)

3.2.2 Вклад внеклеточных ионов кальция в ответ нейронов и астроцитов на ФД воздействие радахлорина

3.2.2.1 Роль NMDA рецепторов в фотоиндуцируемом повышении $[Ca^{2+}]_c$ нейронов и астроцитов

Было показано, что ФД воздействие радахлорина вызывает колебания $[Ca^{2+}]_c$ в большинстве первичных нейронов и в некоторых астроцитах смешанной культуры. Одним из возможных путей увеличения концентрации ионов кальция в цитозоле клеток является рецептор-опосредованный вход Ca^{2+} из внеклеточного пространства. Главным возбуждающим нейромедиатором в центральной нервной системе (ЦНС) является глутамат. NMDA рецептор – ионотропный рецептор глутамата, играющий особую роль в нейрональной возбудимости.

Для выяснения вклада глутаматных NMDA рецепторов в фотоиндуцируемый ответ нейронов и астроцитов был использован ингибитор МК801.

В смешанную культуру нейронов и астроцитов после контрольной регистрации $[Ca^{2+}]_c$ добавлялся радахлорин в концентрации 200 нМ, затем клетки облучались в течение 30 с. После ФД воздействия и регистрации фотоиндуцированного повышения кальция к культуре добавлялся ингибитор NMDA рецепторов МК801 (1 мкМ). Добавление ингибитора не снижало сигнал Fluo-4 как в нейронах, так и в астроцитах (рисунок 3.12 А, 3.12 Б). Таким образом, количество ответивших на ФД воздействие клеток также не снижалось при ингибировании NMDA рецепторов (рисунок 3.12 В), что может говорить о незначительном вкладе NMDA рецепторов в повышение концентрации кальция в нейронах в ответ на ФД воздействие радахлорина.

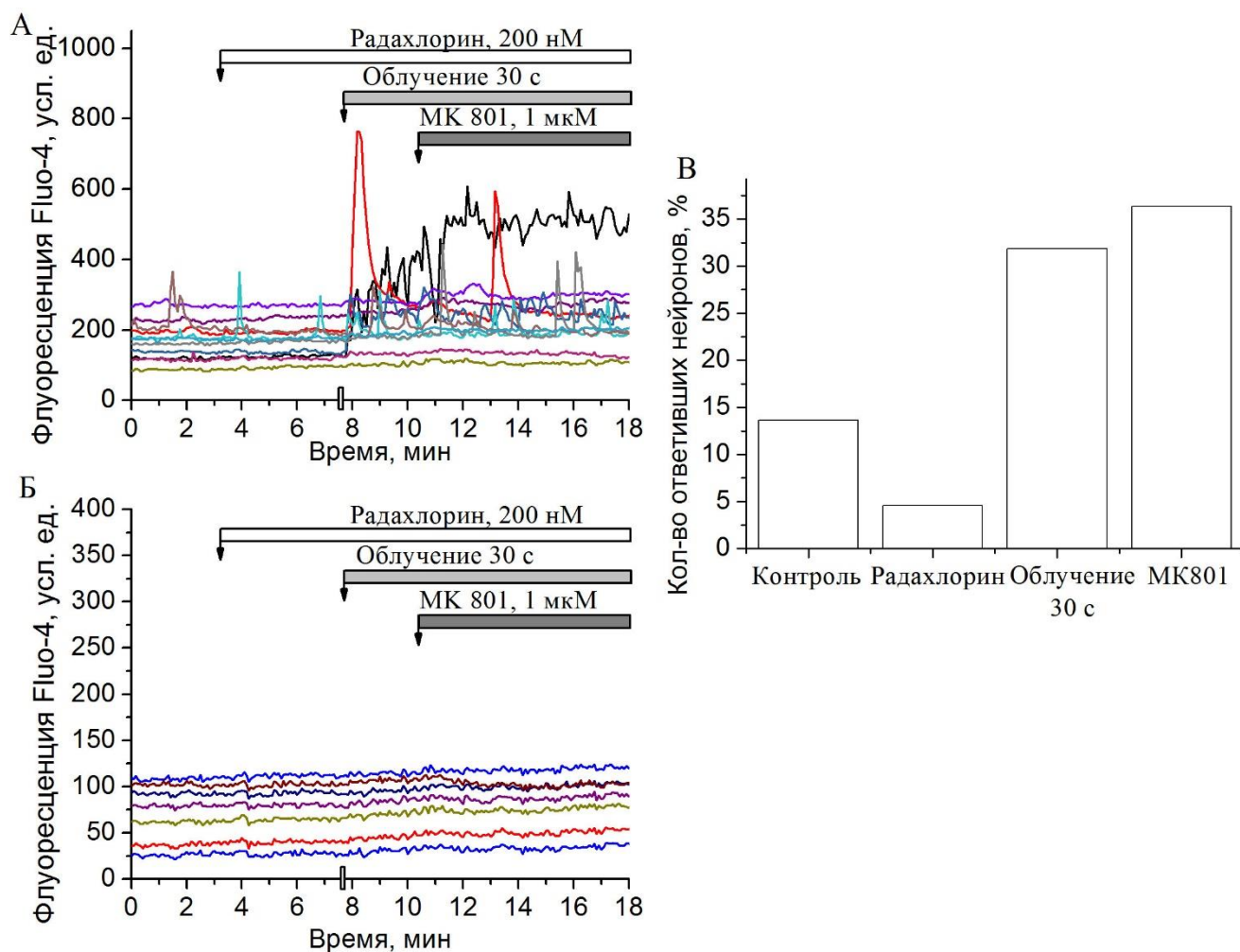


Рисунок 3.12 – Вклад глутаматных NMDA рецепторов в ФД-индуцируемое изменение $[Ca^{2+}]_c$ в первичных нейронах (А) и астроцитах (Б). Применение ингибитора NMDA рецепторов МК801 (1 мкМ) при ФД воздействии не привело к ингибированию изменения $[Ca^{2+}]_c$. На оси абсцисс – время регистрации сигнала Fluo-4, прямоугольником отмечен момент остановки регистрации на время облучения. Каждая кривая соответствует изменению уровня ионов кальция в одной репрезентативной клетке. В – процент первичных нейронов (n=22), ответивших на ФД воздействие радахлорина, не уменьшился при добавлении МК801 (1 мкМ).

3.2.2.2 Фотоиндуцируемый вход ионов кальция в нейроны и астроциты из внеклеточного пространства

Уровень кальция может повышаться благодаря входу кальция в цитозоль клетки из внеклеточного пространства или благодаря выходу кальция из внутриклеточных кальциевых депо [98].

Для определения вклада внеклеточного кальция в ответ первичных нейронов сокультура подвергалась облучению в среде без содержания кальция (рисунок 3.13). После контрольной регистрации флуоресценции Fluo-4, в среду для регистрации добавлялся радахлорин в концентрации 200 нМ, затем клетки облучались течение 1 и 3 мин. Облучение в среде без содержания кальция не привело к уменьшению ответа нейронов первичной сокультуры ($n=169$, рисунок 3.13 А), кроме того, были зарегистрированы кальциевые осцилляции в первичных астроцитах культуры ($n=162$, рисунок 3.13 Б). По сравнению с облучением в среде, содержащей кальций, количество первичных астроцитов, ответивших на облучение в бескальциевой среде в течение 1 мин возросло с 13 % ($n = 126$) до 48 % ($n=162$) от общего количества астроцитов ($p < 0,001$; рисунок 3.14 Б). Количество ответивших нейронов увеличилось с 42% ($n = 117$) при контрольном облучении до 60% в среде без кальция ($n = 169$; $p < 0,01$; рисунок 3.14 А).

Были оценены параметры фотоиндуцируемых кальциевых осцилляций в бескальциевой среде. Добавление радахлорина к кювету с клетками достоверно уменьшало частоту спонтанных кальциевых осцилляций по сравнению с контрольной регистрацией как в нейронах с $0,030 \pm 0,002$ Гц до $0,019 \pm 0,002$ Гц ($p < 0,001$; рисунок 3.15 А), так и в астроцитах с $0,030 \pm 0,001$ Гц до $0,020 \pm 0,002$ Гц ($p < 0,001$; рисунок 3.15 Б). Облучение в течение 1 мин вновь увеличивало частоту кальциевых осцилляций в первичных нейронах до $0,0250 \pm 0,0006$ Гц (рисунок 3.15 А) и в астроцитах до $0,02406 \pm 0,0007$ Гц (рисунок 3.15 Б). Однако увеличения частоты осцилляций во время облучения не наблюдалось (также, как и в случае ФД воздействия в среде, содержащей Ca^{2+}).

Амплитуда колебаний $[Ca^{2+}]_c$ в культивируемых нейронах после добавления радахлорина достоверно не отличалась от базальных изменений $[Ca^{2+}]_c$, но увеличивалась по отношению к $[Ca^{2+}]_c$ при контрольной регистрации после облучения в течение 1 мин в среднем на $37,1 \pm 4,7 \%$ ($p < 0,001$) и на $39,7 \pm 5,4 \%$ ($p < 0,001$; рисунок 3.16 А) после облучения в течение 3 мин. Амплитуда кальциевых осцилляций в астроцитах достоверно увеличивалась по сравнению с контрольной регистрацией после добавления радахлорина и после облучения в течение 1 и 3 мин на $20,0 \pm 6,0 \%$ ($p < 0,05$), на $22,7 \pm 2,7 \%$ ($p < 0,05$) и на $18,4 \pm 5,0 \%$ ($p < 0,05$) соответственно (рисунок 3.16 Б).

Следует отметить, что амплитуда фотоиндуцированных кальциевых осцилляций (облучение в течение 1 мин) в среде без содержания кальция была достоверно больше по сравнению со стандартной средой ($p < 0,001$) как в нейронах (рисунок 3.17 А), так и в астроцитах (рисунок 3.17 Б). Однако параметры (амплитуда и частота) колебаний $[Ca^{2+}]_c$ в клетках первичной культуры не изменялись при облучении (в бескальциевой среде) до 5 минут.

Отсутствие ионов кальция во внеклеточном пространстве не заингибировало и не уменьшило ответ нейронов и астроцитов на ФД воздействие радахлорина, что позволяет сделать вывод о незначительном вкладе внеклеточного кальция в увеличение $[Ca^{2+}]_c$ в первичных нейронах и астроцитах при ФД воздействии. Таким образом, можно предположить, ФД воздействие радахлорина стимулирует выход кальция из внутриклеточных депо нейронов и астроцитов.

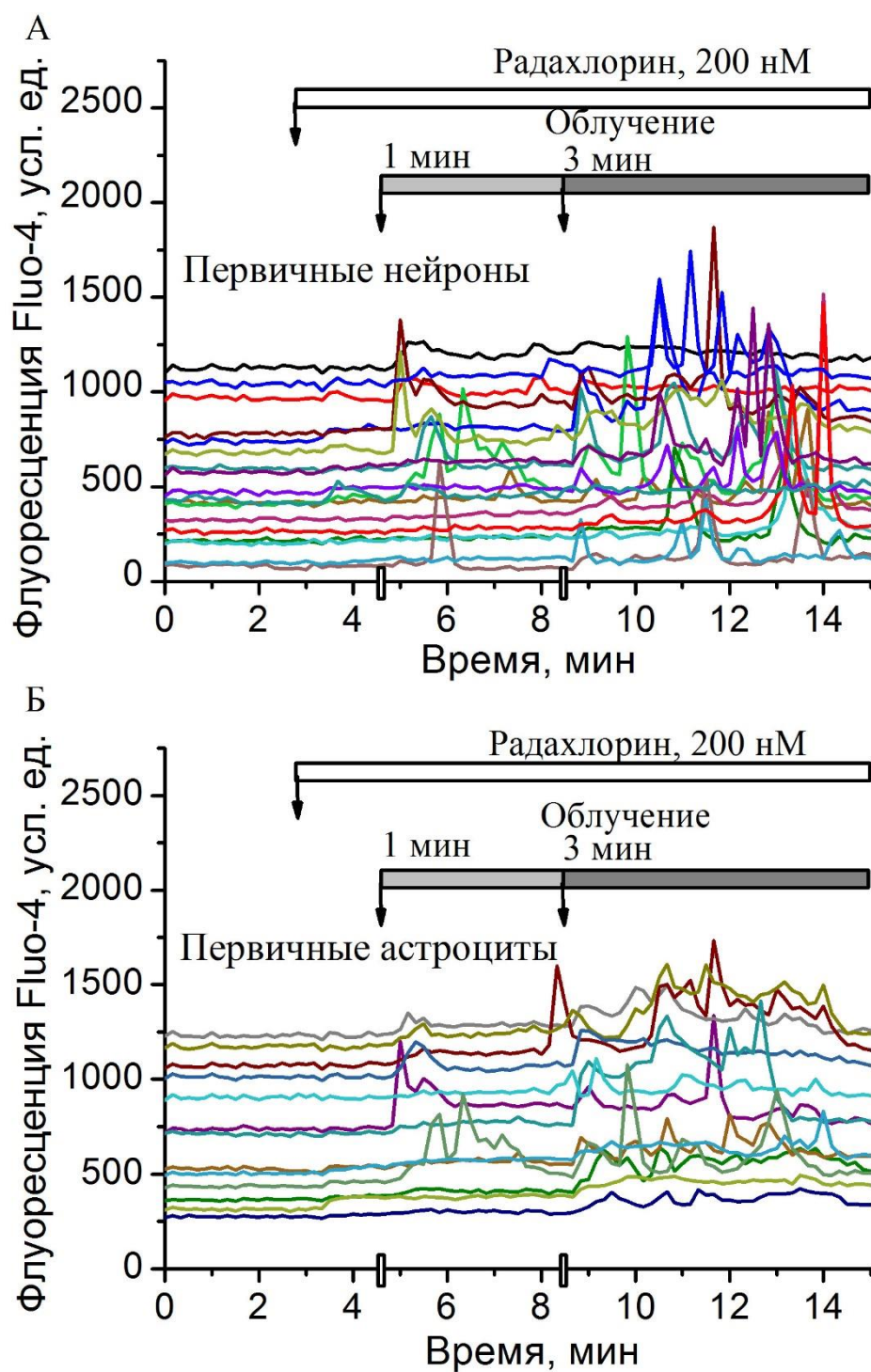


Рисунок 3.13 – ФД воздействие радахлорина стимулирует кальциевые осцилляции в нейронах (А) и астроцитах (Б) первичной смешанной культуры нейронов и астроцитов в бескальциевой среде. На оси абсцисс – время регистрации сигнала Fluo-4, прямоугольниками отмечены моменты остановки регистрации на время облучения. Каждая кривая на графиках отражает изменения в одной репрезентативной клетке

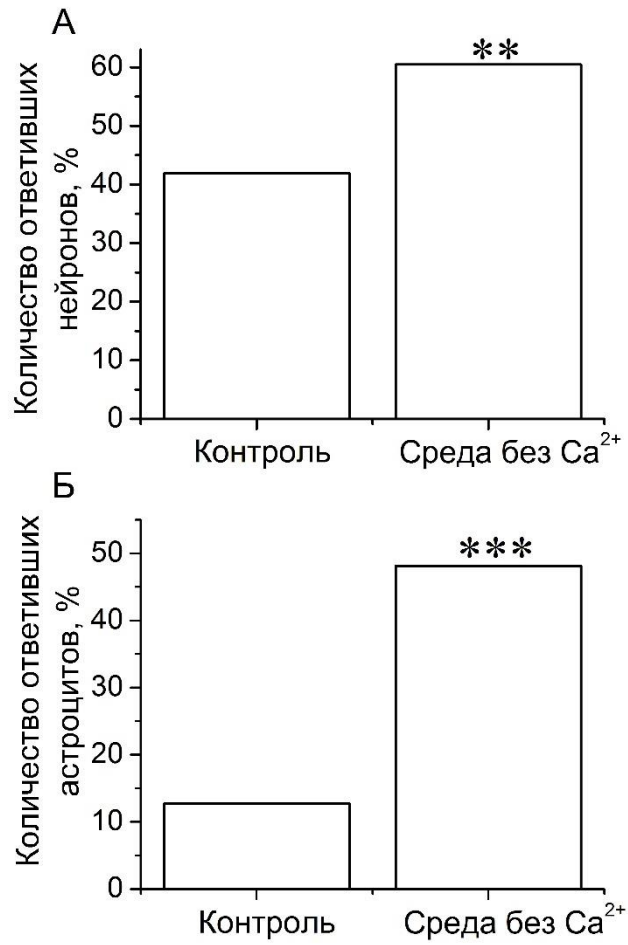


Рисунок 3.14 – Количество клеток, ответивших на ФД воздействие радахлорина (200 нМ) в среде, содержащей Ca²⁺, и в бескальциевой среде. А – нейроны; Б – астроциты. ** - $p < 0.01$; *** < 0.001 (критерий χ^2 Пирсона)

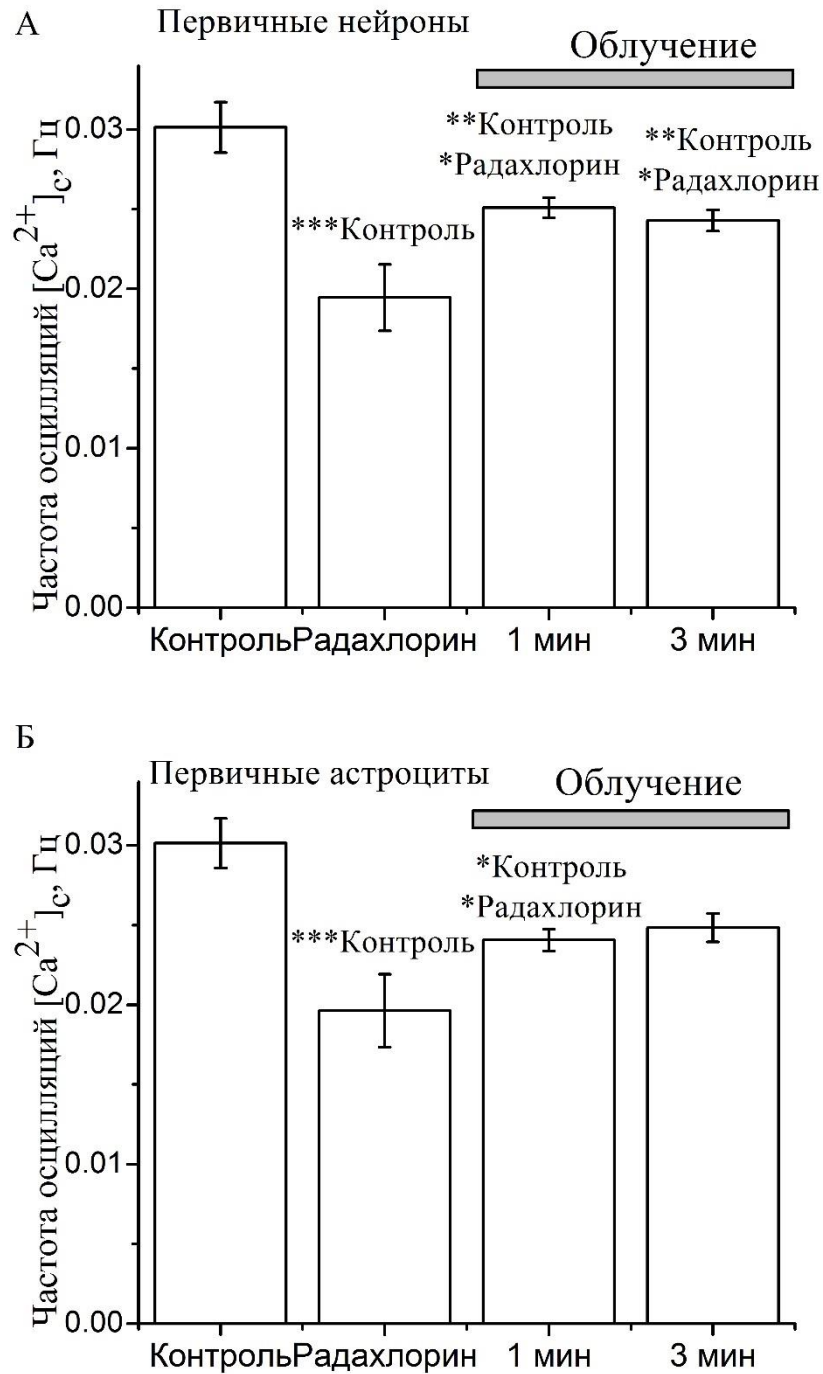


Рисунок 3.15 – Изменение частоты кальциевых осцилляций в нейронах (А) и астроцитах (Б) первичной сокультуры при добавлении 200 нМ радахлорина и ФД воздействии (1 мин и 3 мин) в бескальциевой среде.

Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка.

* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ (One Way Anova RM)

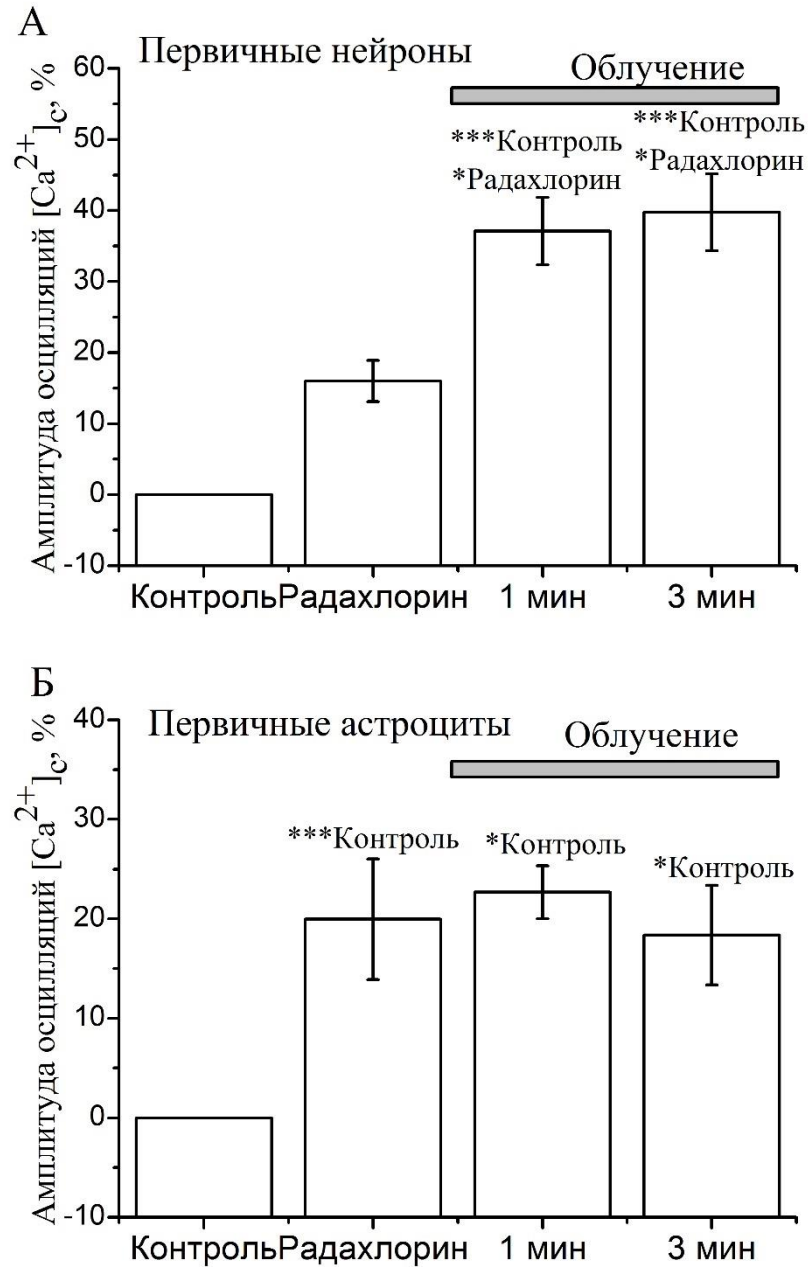


Рисунок 3.16 – Изменение амплитуды кальциевых осцилляций в нейронах (А) и астроцитах (Б) первичной сокультуры при добавлении 200 нМ радахлорина и ФД воздействии (1 мин и 3 мин) в бескальциевой среде. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка. * - $p < 0,05$; *** - $p < 0,001$ (One Way Anova RM)



Рисунок 3.17 – Амплитуды осцилляций $[Ca^{2+}]_c$ первичных нейронов (А) и первичных астроцитов (Б) при ФД воздействии радахлорина (200 нМ, 1 мин) в стандартной среде, содержащей Ca^{2+} , и бескальциевой среде. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка. *** - $p < 0,001$ (t – критерий Стьюдента)

3.2.3 Вклад кальциевого депо ЭР в фотоиндуцируемый кальциевый ответ нейронов и астроцитов

Эксперименты в среде без содержания кальция указывают на участие внутриклеточного кальциевого депо в формировании ответа клеток культуры на ФД воздействие радахлорина. ЭР является важнейшим участником кальциевой сигнализации в возбудимых клетках. Для проверки гипотезы о выходе ионов кальция из депо ЭР первичных нейронов и астроцитов был использован специфический ингибитор Ca^{2+} -АТФазы эндоплазматического ретикулула, тапсигаргин. Тапсигаргин вызывает опустошение кальциевого депо ЭР, увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_c$ и последующую откачку ионов Ca^{2+} во внеклеточную среду.

После добавления тапсигаргина (1 мкМ) в среду с клеточной культурой наблюдалось повышение концентрации ионов кальция в цитозоле вследствие пассивного выхода кальция из внутриклеточных депо как в нейронах (рисунок 3.18 А), так и в астроцитах (рисунок 3.18 Б). После прекращения изменений $[\text{Ca}^{2+}]_c$ к первичной культуре добавлялось 200 нМ радахлорина, после чего клетки последовательно облучались в течение 1 мин и 3 мин (рисунок 3.18). Было показано, что при добавлении тапсигаргина количество клеток, ответивших на ФД воздействие радахлорина, значительно снижалось.

Процент ответивших на одноминутное ФД воздействие нейронов сокультуры снижался с 42 % ($n = 117$) в контроле до 1 % ($n = 108$) в присутствии тапсигаргина ($p < 0,001$; рисунок 3.19 А). Процент ответивших астроцитов также снижался с 13 % ($n = 126$) при контрольном облучении до 0 % ($n = 143$) при облучении с 1 мкМ тапсигаргина ($p < 0,001$; рисунок 3.19 Б).

Опустошение кальциевого депо ЭР путем ингибирования Ca^{2+} -АТФазы практически полностью блокировало фотоиндуцированные изменения $[\text{Ca}^{2+}]_c$ как в нейронах, так и в астроцитах, что указывает на значительный вклад внутриклеточного депо ЭР в кальциевый сигнал при ФД воздействии радахлорина.

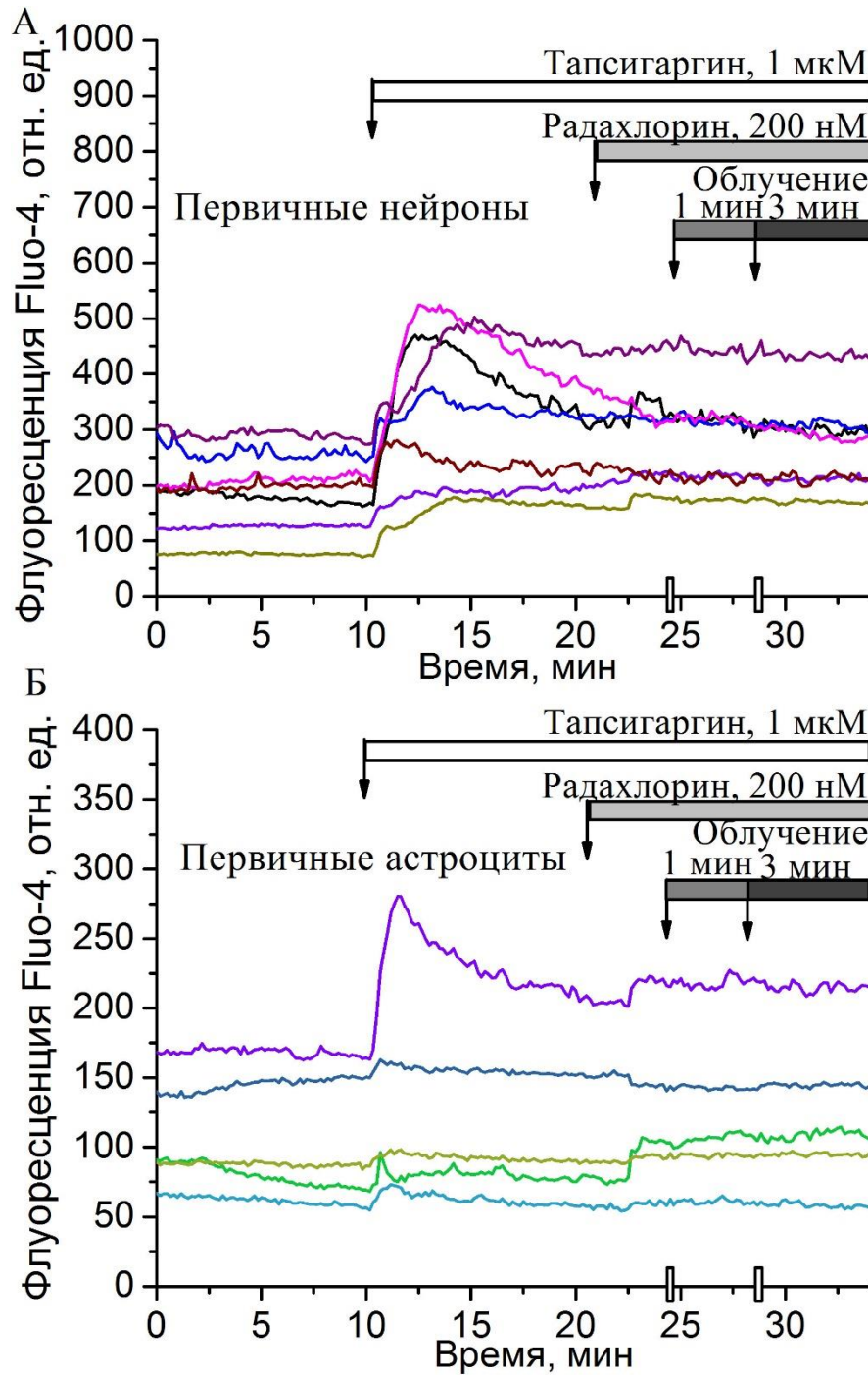


Рисунок 3.18 – Применение ингибитора SERCA, тапсигаргина (1 мкМ) блокировало колебания $[Ca^{2+}]_c$ при ФД воздействии радахлорина (200 нМ) как в нейронах (А), так и в астроцитах (Б) культуры. На оси абсцисс – время регистрации сигнала Fluo-4, прямоугольниками отмечены моменты остановки регистрации на время облучения. Каждая кривая на графиках отражает изменения $[Ca^{2+}]_c$ в отдельных репрезентативных клетках

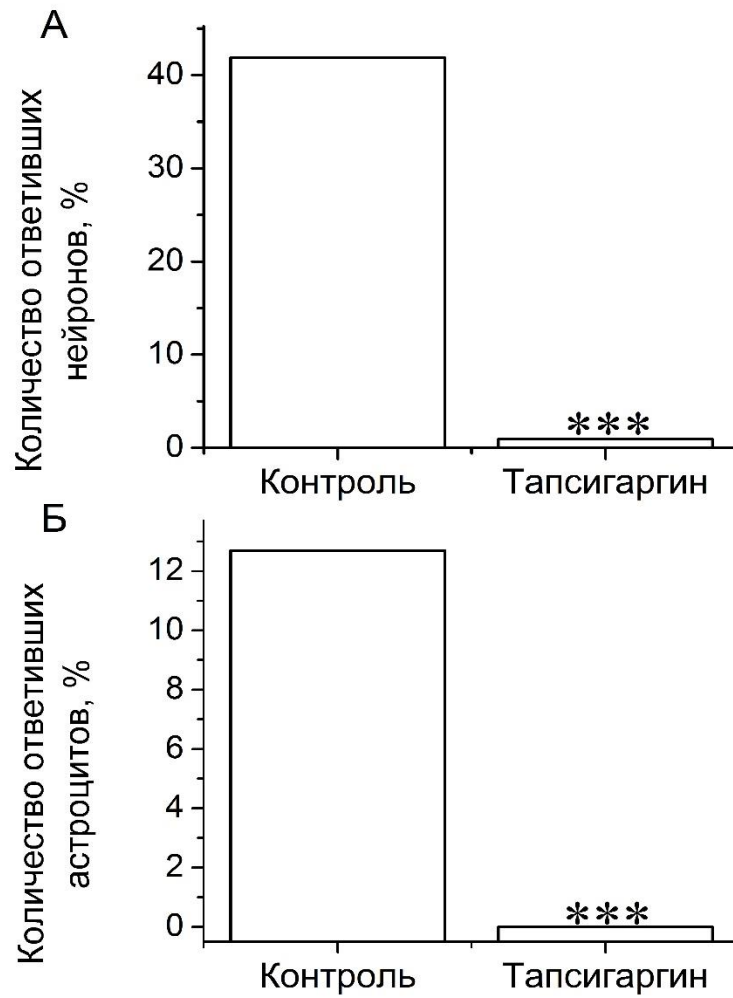


Рисунок 3.19 – Количество клеток, ответивших на ФД воздействие радахлорина в контрольных опытах и в присутствии тапсигаргина (1 мкМ). А – нейроны. Б – астроциты. *** <0,001 (критерий χ^2 Пирсона)

3.2.4 Участие фосфолипазы C в кальциевом ответе на фотодинамическое воздействие

Выход кальция из ЭР в цитозоль клетки может осуществляться за счет активации IP₃ рецепторов. IP₃ вырабатывается за счет работы фермента PLC, которая расщепляет мембранный фосфолипид фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат до вторичных мессенджеров IP₃ и диацилглицерола. IP₃ выступает лигандом для соответствующих рецепторов ЭР. Для изучения участия PLC в кальциевом ответе культивируемых нейронов и астроцитов на ФД воздействие радахлорина был проведен эксперимент с ингибированием данного фермента.

Первичные сокультуры предварительно инкубировали в присутствии 5 мкМ ингибитора PLC, U73122, после чего в кювету добавлялся радахлорин (200 нМ) и культура дважды облучалась (1 мин и 3 мин). Ингибирование фосфолипазы C приводило к подавлению фотоиндуцированных кальциевых осцилляций в первичных нейронах смешанной культуры (рисунок 3.20 А). В астроцитах сокультуры изменения $[Ca^{2+}]_c$, вызванные облучением в присутствии радахлорина, также не наблюдались после добавления ингибитора PLC, U73122 (рисунок 3.20 Б).

Процент ответивших клеток после предварительной инкубации с U73122 снижался при минутном ФД воздействии до 5% (n = 20) в случае первичных нейронов (рисунок 3.21 А) и до 0% (n = 18) в случае астроцитов (рисунок 3.21 Б) по сравнению с контрольным облучением.

Ингибитор PLC практически полностью блокировал кальциевый ответ нейронов и астроцитов на ФД воздействие. Таким образом, можно предположить, что в нейронах и астроцитах первичной сокультуры изменения $[Ca^{2+}]_c$ при ФД воздействии радахлорина вызваны выходом кальция из ЭР через IP₃ рецепторов вследствие активации PLC.

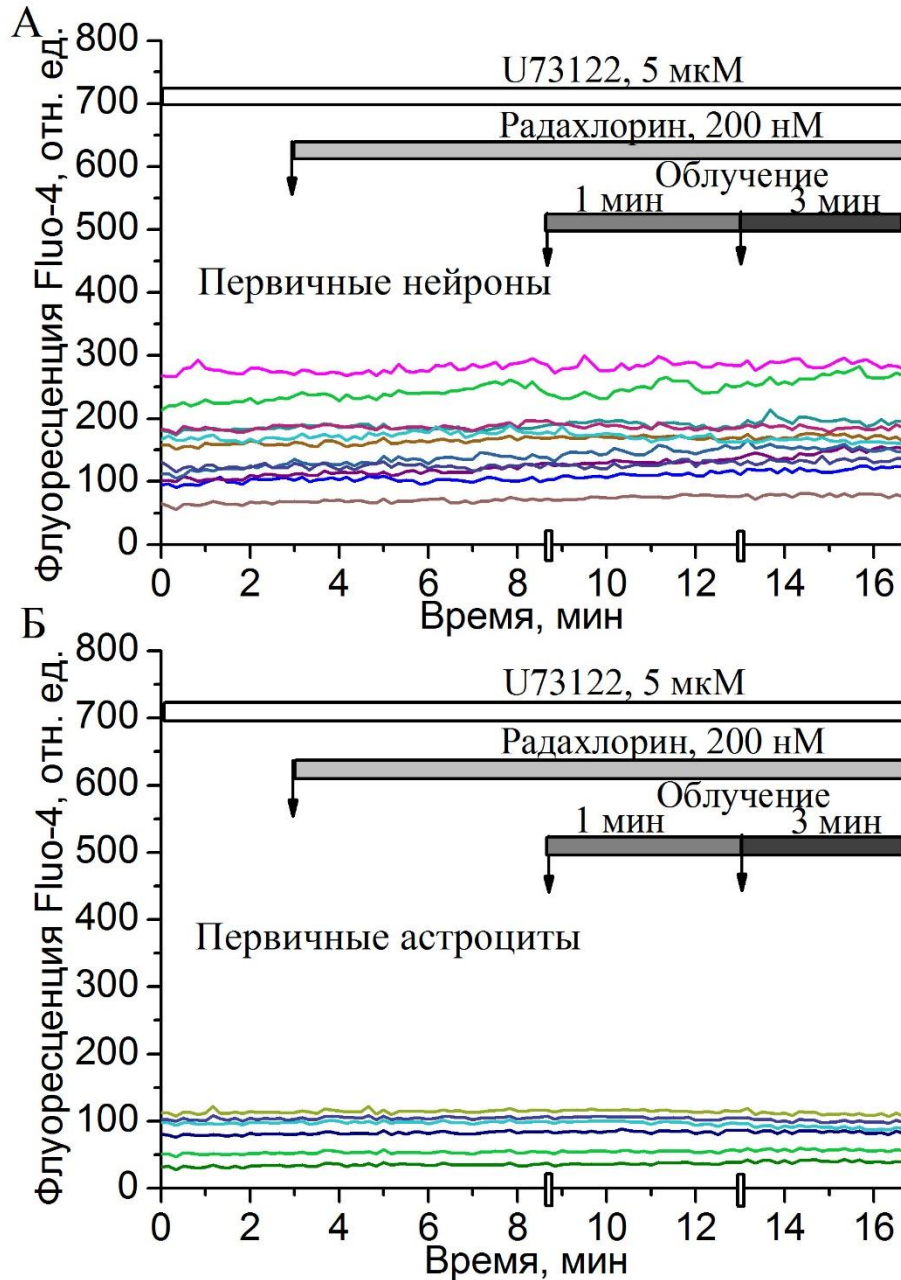


Рисунок 3.20 – Ингибитор фосфолипазы С U73122 (5 мкМ) блокировал колебания $[Ca^{2+}]_c$ при ФД воздействии радахлорина (200 нМ) как в первичных нейронах (А), так и в первичных астроцитах (Б). На оси абсцисс – время регистрации сигнала Fluo-4, прямоугольниками отмечены моменты остановки регистрации на время облучения. Каждая кривая на графиках отражает изменения $[Ca^{2+}]_c$ в репрезентативных отдельных клетках

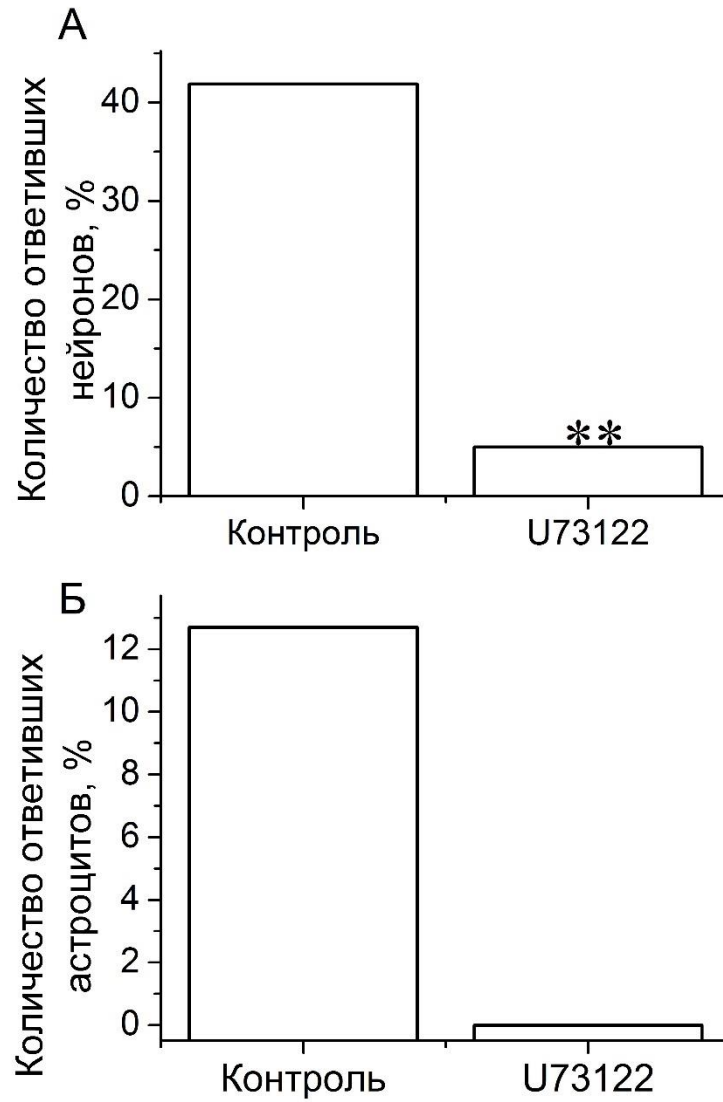


Рисунок 3.21 – Количество клеток, ответивших на ФД воздействие радахлорина в контрольных опытах и в присутствии ингибитора фосфолипазы С, U73122 (5 мкМ). А – нейроны. Б – астроциты. ** - $p < 0,01$ (критерий χ^2 Пирсона)

3.2.5 Роль АФК в кальциевом ответе нейронов и астроцитов на ФД воздействие радахлорина

ФД воздействие приводит к генерации синглетного кислорода и других АФК. АФК могут окислять мембранные липиды, приводить к инициации ПОЛ, что, в свою очередь, может являться триггером для запуска клеткой каскадов кальциевого сигнального механизма.

Для изучения роли АФК в активации осцилляций $[Ca^{2+}]_c$ в нейронах и астроцитах в ответ на ФД воздействие радахлорина клеточные культуры предварительно инкубировались в среде с 500 мкМ антиоксиданта тролокс (водорастворимый аналог витамина Е), после чего облучались 1 и 3 минуты в присутствии 200 нМ радахлорина. Обработка клеток сокультуры тролоксом снижала осцилляции $[Ca^{2+}]_c$ как в первичных нейронах (рисунок 3.22 А), так и в астроцитах первичной культуры (рисунок 3.22 Б).

Количество клеток, ответивших на облучение в течение 1 минуты в присутствии 200 нМ радахлорина, после предварительной инкубации с тролоксом также снизилось. Процент ответивших нейронов снизился до 11% ($n = 19$) с 42 % ($n = 117$) в случае контрольного облучения (рисунок 3.23 А). Процент ответивших на одноминутное облучение астроцитов первичной смешанной культуры после предварительной обработки тролоксом снизился до 0% (рисунок 3.23 Б).

Предварительная обработка тролоксом привела к ингибированию кальциевых осцилляций в большинстве клеток, что может говорить о том, что АФК, образовавшиеся в результате ФД воздействия радахлорина, являются триггером для запуска кальциевого сигнала в культивируемых нейронах и астроцитах.

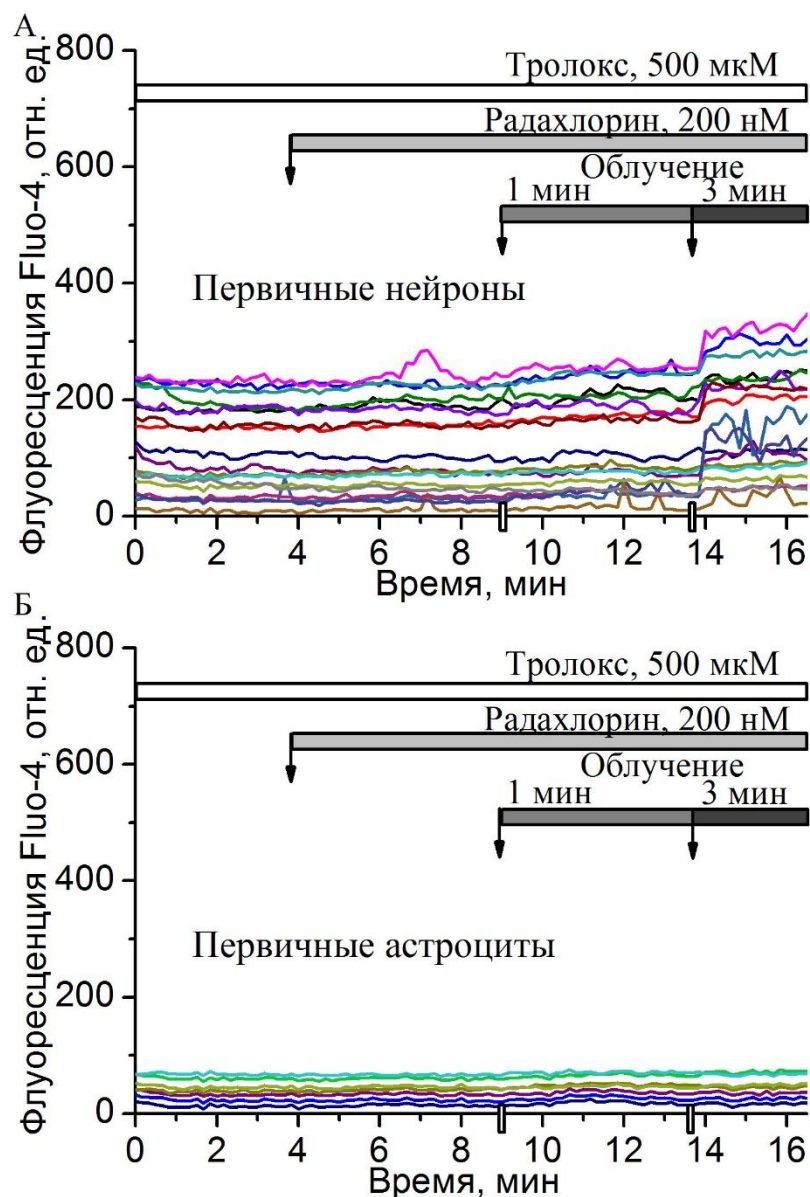


Рисунок 3.22 – Антиоксидант Тролокс (500 мкМ) снижал колебания $[Ca^{2+}]_c$ при ФД воздействии радахлорина как в первичных нейронах (А), так и в первичных астроцитах (Б). На оси абсцисс – время регистрации сигнала Fluo-4, прямоугольниками отмечены моменты остановки регистрации на время облучения. Каждая кривая на графиках отражает изменения $[Ca^{2+}]_c$ в отдельных репрезентативных клетках

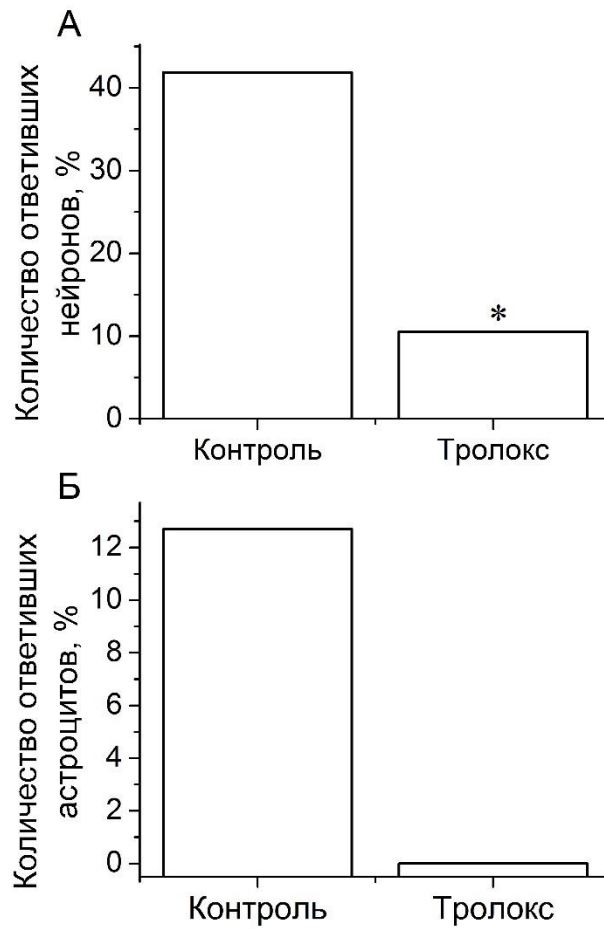


Рисунок 3.23 – Количество клеток, ответивших на ФД воздействие радахлорина, в контрольных экспериментах и в присутствии тролокса (500 мкМ). А – нейроны. Б – астроциты. * - $p < 0,05$ (критерий χ^2 Пирсона)

3.2.6 Изменение скорости перекисного окисления липидов при ФД воздействии радахлорина

Активная генерация АФК приводит к ПОЛ клеточных мембран, что является причиной нестабильности липидного слоя мембран и может приводит к токсическим эффектам в результате продуктов ПОЛ. Также продукты ПОЛ могут приводить к активации PLC [134].

Для оценки изменения скорости ПОЛ, вызванного ФД воздействием радахлорина был использован флуоресцентный зонд BODIPY C11 [581/591]. Клетки смешанной культуры облучались 2 раза в течение 2 минут в присутствии 400 нМ радахлорина.

Скорость ПОЛ увеличивалась уже после облучения в течение 2 минут (увеличение угла наклона кривой на графике и увеличение значения тангенса угла наклона кривой) как в первичных нейронах ($n = 18$; рисунок 3.24 А), так и в первичных астроцитах ($n = 28$; рисунок 3.24 Б). Достоверное увеличение скорости ПОЛ в клетках первичной смешанной культуры наблюдалось только после 4 минут облучения ($n = 46$; $p < 0,05$; рисунок 3.24 В).

Повышение скорости окисления зонда подтверждает литературные данные о выработке АФК при ФД воздействии, запускающих каскады ПОЛ [51], что в свою очередь может активировать PLC и стимулировать выход Ca^{2+} в цитозоль клетки из ЭР.

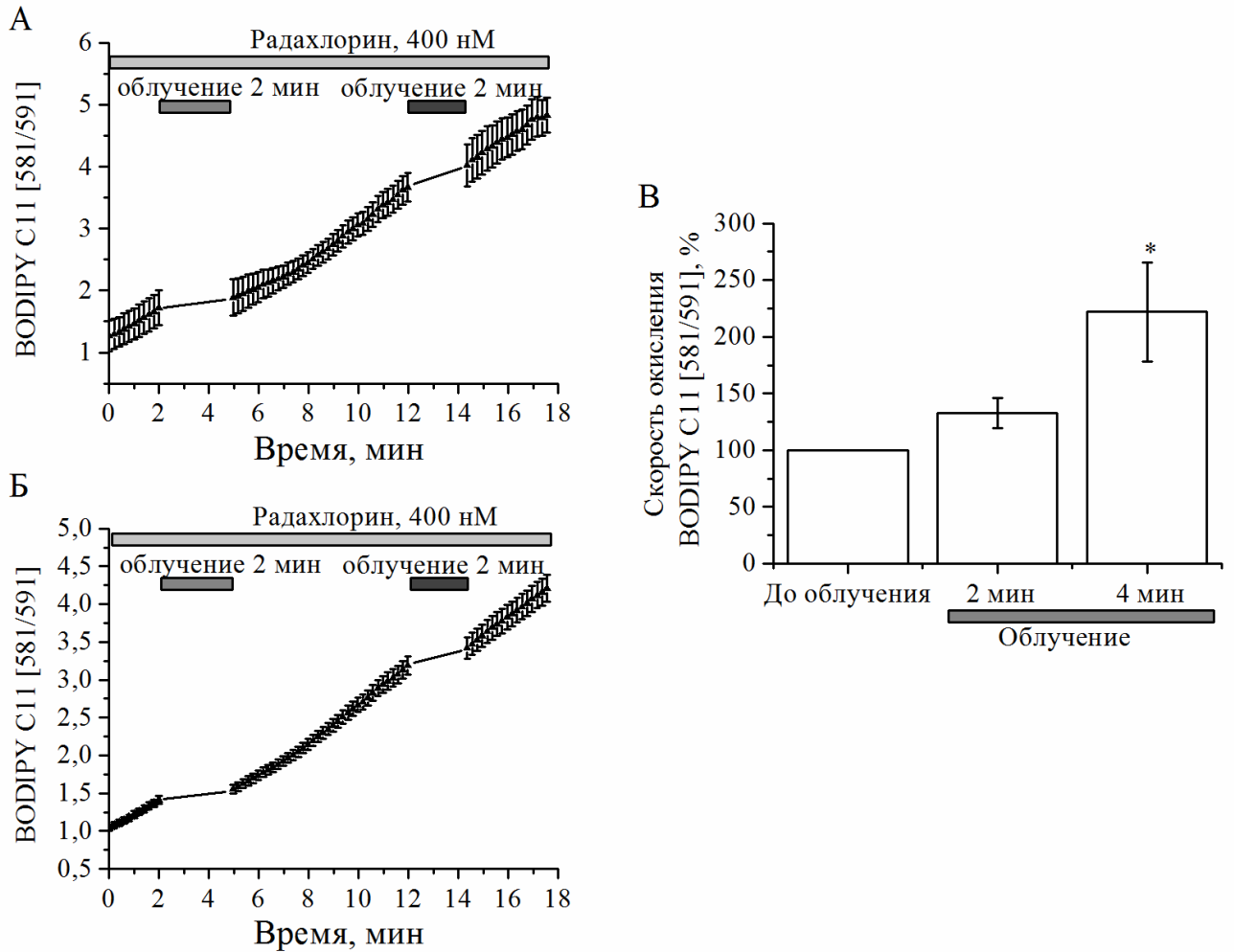


Рисунок 3.24 – Изменение скорости ПОЛ, измеренное с помощью зонда ВODIPY C11 [581/591] в ответ на ФД воздействие радахлорина (400 нМ) в нейронах (А) и астроцитах (Б). Кривые представляют собой набор средних значений отношения флуоресценций окисленной и восстановленной формы ВODIPY C11 [581/591] \pm стандартные ошибки. В – изменения скорости окисления ВODIPY C11 [581/591] в клетках первичной культуры коры мозга крысы ($n = 46$) после ФД воздействия радахлорина * - $p < 0,05$ (One Way Anova RM). Данные приставлены в виде средних значений \pm стандартная ошибка

3.2.7 Исследование участия митохондрий в ответе нейронов и астроцитов на ФД воздействие

Концентрация цитозольного кальция в клетке регулируется множеством механизмов. Митохондрии являются одним из внутриклеточных кальциевых депо, их биоэнергетическая активность регулируется в том числе и кальциевой сигнальной системой. При повышении $[Ca^{2+}]_c$ митохондрии могут накапливать Ca^{2+} [143]. Причем повышение $[Ca^{2+}]_m$ может приводить как к стимуляции выработки АТФ, так и к запуску клеточной смерти при перегрузке митохондрий Ca^{2+} [78].

Повышение $[Ca^{2+}]_c$ в первичных нейронах и астроцитах культуры, наблюдаемое при ФД воздействии радахлорина, может приводить к увеличению $[Ca^{2+}]_m$, что может приводить к снижению $\Delta\Psi_m$, изменению биоэнергетических функций митохондрий, а также к клеточной гибели.

3.2.7.1 Изменения $[Ca^{2+}]_m$ в ответ на ФД воздействие радахлорина

Для изучения изменений $[Ca^{2+}]_m$ первичных нейронов и астроцитов при ФД воздействии радахлорина использовался флуоресцентный зонд X-Rhod-1. Измерения $[Ca^{2+}]_m$ проводились одновременно с регистрацией флуоресценции зонда Fluo-4, отражающего изменения $[Ca^{2+}]_c$. Смешанные клеточные культуры нейронов и астроцитов облучались в присутствии 200 нМ радахлорина импульсно (с частотой $\nu = 0,1 - 0,2$ Гц, $\lambda = 633$ нм) в течение всего эксперимента.

В ответ на ФД воздействие радахлорина в первичных нейронах ($n = 12$) повышалась непрерывно повышались как флуоресценция Fluo-4 с 1390 ± 170 усл. ед до 1620 ± 150 усл. ед. после 15 мин облучения, так и флуоресценция X-Rhod-1 с 2820 ± 310 усл. ед. до 3050 ± 270 усл. ед. после 15 минут воздействия (рисунок 3.25), что указывает на увеличение $[Ca^{2+}]_m$.

В случае астроцитов ($n = 15$) $[Ca^{2+}]_c$ также непрерывно повышался в течение эксперимента в большинстве клеток, в то время как содержание кальция в митохондриях после роста до определенной концентрации начинало резко снижаться (рисунок 3.26 А). Сигнал Fluo-4 увеличивался с 280 ± 10 усл. ед. в начале воздействия до 420 ± 20 усл. ед., 550 ± 30 усл. ед. и 530 ± 20 усл. ед. через 5, 10 и 15 минут облучения соответственно. Флуоресценция X-Rhod-1 в астроцитах увеличивалась с 1480 ± 60 усл. ед. до 1680 ± 60 усл. ед. после 5 мин облучения и до 2000 ± 100 усл. ед. после 10 минут облучения ($p < 0,001$), после чего начинала уменьшаться (рисунок 3.26 А, 3.26 Б).

Полученные данные указывают на повышение $[Ca^{2+}]_m$ при ФД воздействии радахлорина в культивируемых нейронах и астроцитах. Однако в большинстве астроцитов после увеличения до определенного значения $[Ca^{2+}]_m$ начинала уменьшаться (рисунок 3.26). Флуоресценция X-Rhod-1 заметно снижалась в некоторых областях клеток при облучении более 10 минут (рисунок 3.27).

Подобный характер изменения $[Ca^{2+}]_m$ позволяет предположить, что ФД воздействие радахлорина приводит к переизбытку Ca^{2+} в матриксе митохондрий и стимулирует открытие РТР в первичных астроцитах. Считается, что открытие РТР может приводить к падению $\Delta\Psi_m$. Поэтому был проведен опыт с регистрацией $\Delta\Psi_m$ при ФД воздействии радахлорина.

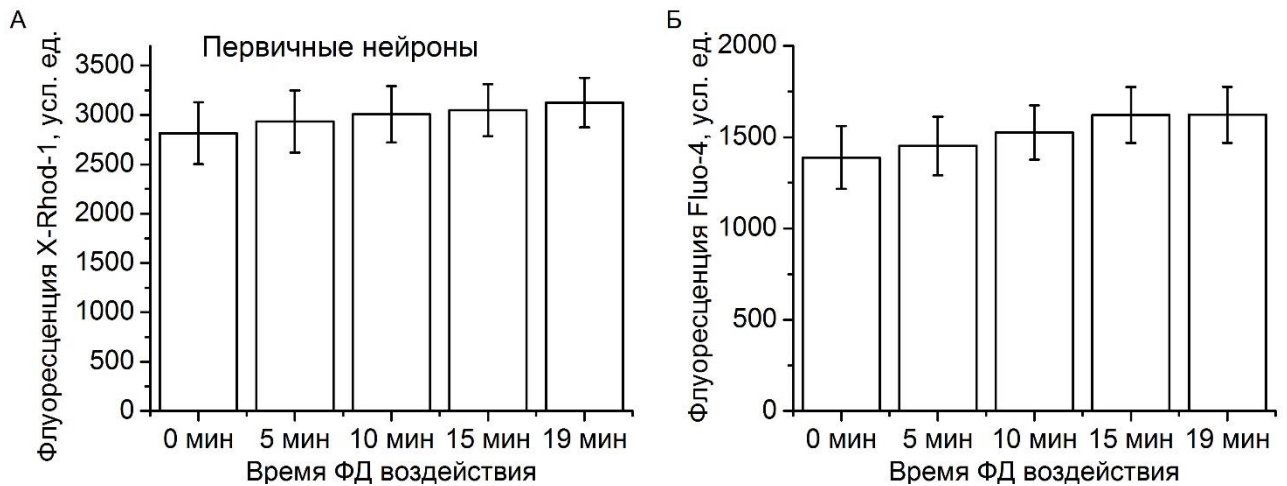


Рисунок 3.25 – Изменения $[Ca^{2+}]_m$ и $[Ca^{2+}]_c$ в первичных нейронах при ФД воздействии радахлорина (200 нМ). А – флуоресценция X-Rhod-1 отражает изменение $[Ca^{2+}]_m$. Б – флуоресценция Fluo-4 отражает изменение $[Ca^{2+}]_c$. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка

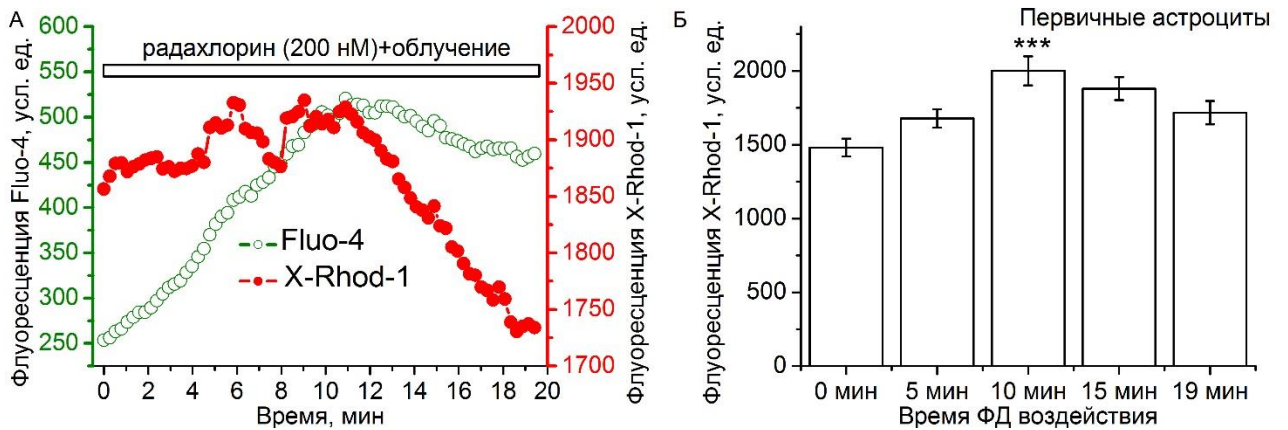


Рисунок 3.26 – Изменения $[Ca^{2+}]_m$ в первичных астроцитах при ФД воздействии радахлорина (200 нМ). А – типичный ответ астроцита на ФД воздействие; Fluo-4 отражает изменения $[Ca^{2+}]_c$; X-Rhod-1 - $[Ca^{2+}]_m$. Б – Изменение $[Ca^{2+}]_m$ при ФД воздействии. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка. *** - $p < 0.001$ (One Way Anova RM)

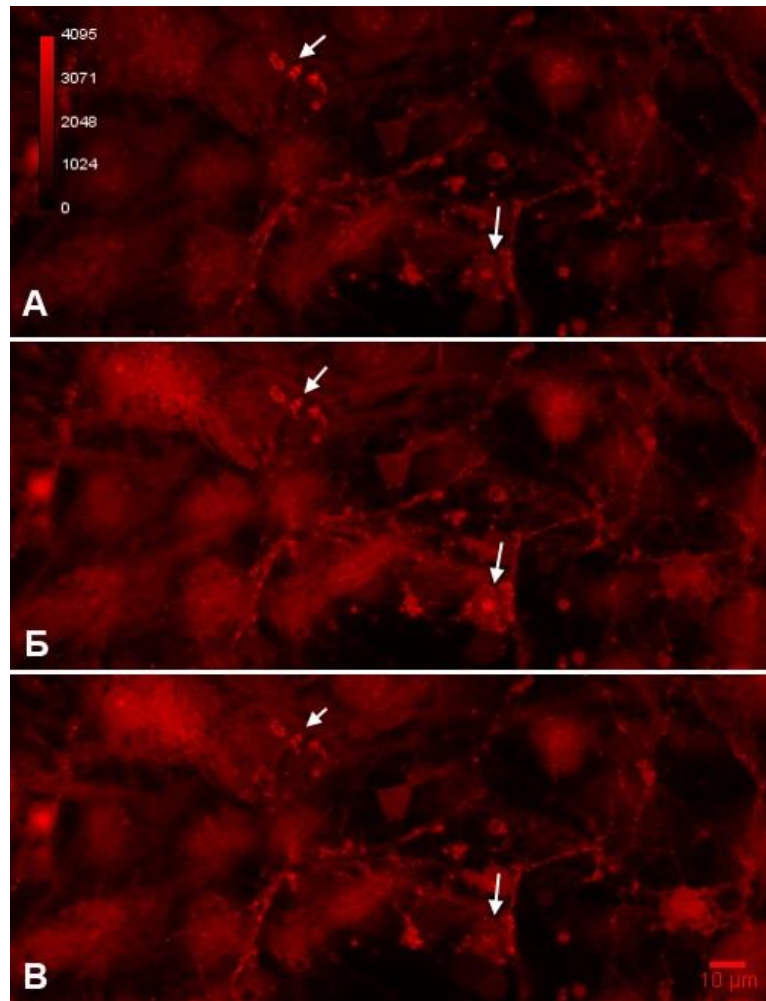


Рисунок 3.27 – Изменения интенсивности флуоресценции зонда X-Rhod-1 в митохондриальных областях при ФД воздействии радахлорина (200 нМ). А – начало ФД воздействия; Б – 10 минута ФД воздействия; В – 17 минута ФД воздействия. Стрелками отмечены митохондриальные области, наиболее явно отражающие процесс накопления ионов кальция митохондриями по мере облучения (флуоресценция X-Rhod-1 увеличивается) с последующим затуханием флуоресценции зонда. Масштабный отрезок – 10 мкм

3.2.7.2 Изменения трансмембранного митохондриального потенциала при ФД воздействии

Для регистрации изменения $\Delta\Psi_m$ использовался флуоресцентный зонд TMRM, параллельно проводилась регистрация изменений флуоресценции Fluo-4 (рисунок 3.28). Для нормировки сигнала TMRM в конце эксперимента добавлялся протонофор FCCP (1 мкМ). За 100 % принимался изначальный уровень сигнала TMRM, за 0 – сигнал после добавления FCCP. В среду к клеткам добавлялся радахлорин, после чего клетки импульсно облучались (с частотой $\nu = 0,1 - 0,2$ Гц на длине волны 633 нм). Флуоресценция Fluo-4 повышалась как в первичных нейронах ($n = 4$) с 280 ± 40 усл. ед. в начале регистрации до 420 ± 80 усл. ед. после 15 минут воздействия, так и в первичных астроцитах ($n = 9$) с 200 ± 20 усл. ед. до 220 ± 20 усл. ед., что указывает на увеличение $[Ca^{2+}]_c$ в клетках (в основном в нейронах) сокультуры в процессе ФД воздействия. Флуоресценция TMRM значительно уменьшалась в нейронах от 100% до воздействия до 79 ± 8 % ($p < 0,05$) и до 70 ± 8 % ($p < 0,05$) после 10 и 15 минут облучения соответственно (рисунок 3.29 А) и в астроцитах от 100% до $43 \pm 6,5$ % и 42 ± 7 % ($p < 0,001$) после 10 и 15 минут ФД воздействия соответственно (рисунок 3.29 Б). Уменьшение флуоресценции TMRM указывает на падение $\Delta\Psi_m$ как в первичных нейронах, так и в астроцитах. Уменьшение флуоресценции TMRM вплоть до полного исчезновения в некоторых областях клетки (рисунок 3.30) также может указывать на падение $\Delta\Psi_m$, что может свидетельствовать об открытии РТР в митохондриальной мембране или о разрушении мембраны митохондрии в процессе ФД воздействия.

Для оценки вклада РТР в падение $\Delta\Psi_m$ культуры клеток подверглись ФД воздействию радахлорина после предварительной инкубации в среде с циклоспорином А (1 мкМ). По изменению флуоресценции зонда Rh123 производилась оценка изменений $\Delta\Psi_m$. Сигнал калибровался добавлением 1 мкМ

FCCP, при этом базовая флуоресценция была принята за 0, а максимальные значения, вызванные FCCP (при минимальном $\Delta\Psi_m$), за 100%.

В опытах с контрольным облучением клеток флуоресценция Rh 123 уменьшалась в ответ на добавление радахлорина (рисунок 3.31 А), что говорит о гиперполяризации митохондрий в клетках смешанной культуры нейронов и астроцитов. В ответ на облучение (1 мин и 3 мин) происходила деполяризация митохондрий (флуоресценция зонда увеличивалась; рисунок 3.31 А). В присутствии циклоспорина А эффект гиперполяризации при добавлении радахлорина не наблюдался (рисунок 3.31 Б), процесс деполяризации наблюдался как после облучения в течение 1 мин, так и после облучения в течение 3 мин (рисунок 3.31 Б).

Циклоспорин А не блокировал фотоиндуцированного снижения $\Delta\Psi_m$ при данном режиме облучения, что говорит о незначительном вкладе РТР в процесс деполяризации митохондриальной мембраны при ФД воздействии радахлорина в течение 1 и 3 минут. Повышение $[Ca^{2+}]_c$ в ответ на облучение может стимулировать захват кальция митохондриями, что приводит к снижению $\Delta\Psi_m$. Однако характер изменения флуоресценции X-Rhod-1 в астроцитах первичной сокультуры (рисунок 3.26), а также исчезновение флуоресценции TMRM в некоторых областях клеток (рисунок 3.30) говорит о том, что двойная мембрана митохондрий становится проницаемой для ионов при ФД воздействии. Это может происходить как и в следствие открытия поры при дальнейшем облучении, так и в следствие разрушения целостности мембран митохондрий при ФД повреждении.

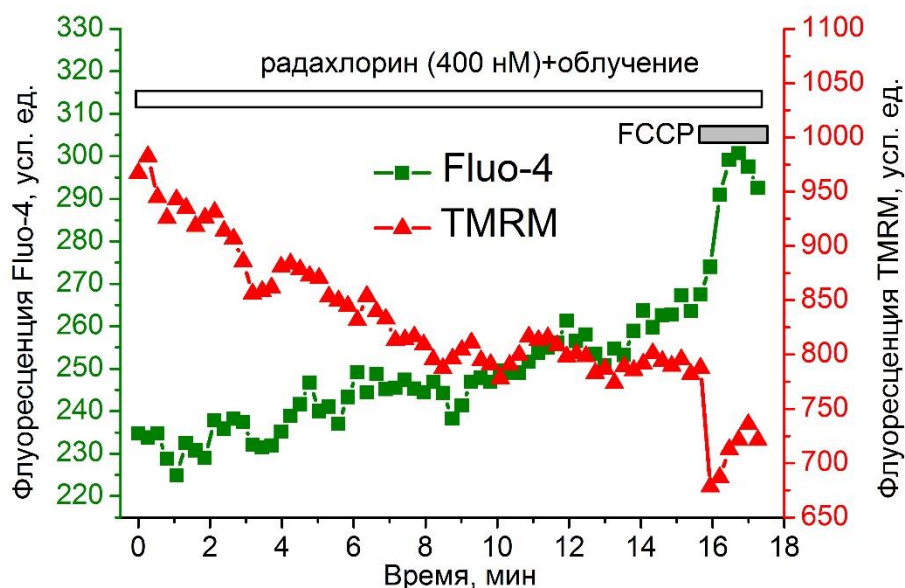


Рисунок 3.28 – Падение $\Delta\Psi_M$ при ФД воздействии радахлорина на примере первичного астроцита культуры. Fluo-4 отражает изменения $[Ca^{2+}]_c$; TMRM - $\Delta\Psi_M$. Для нормировки сигнала TMRM в конце эксперимента добавлялся протонифор FCCP

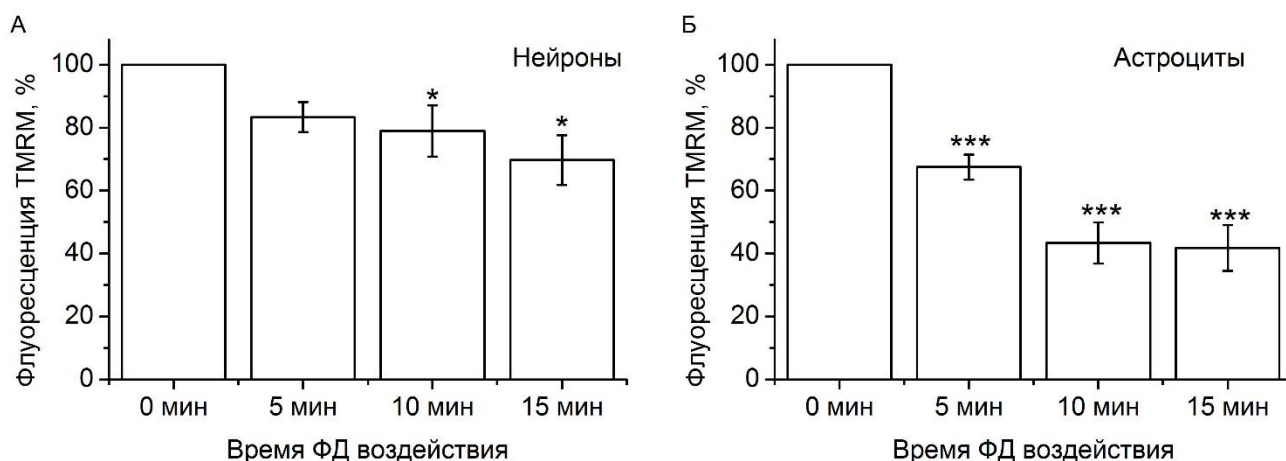


Рисунок 3.29 – Изменения $\Delta\Psi_M$ нейронов (А) и астроцитов (Б) смешанной культуры в ответ на ФД воздействие радахлорина, зарегистрированные с помощью зонда TMRM. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка. * - $p < 0,05$; *** - $p < 0,001$ (One Way Anova RM)

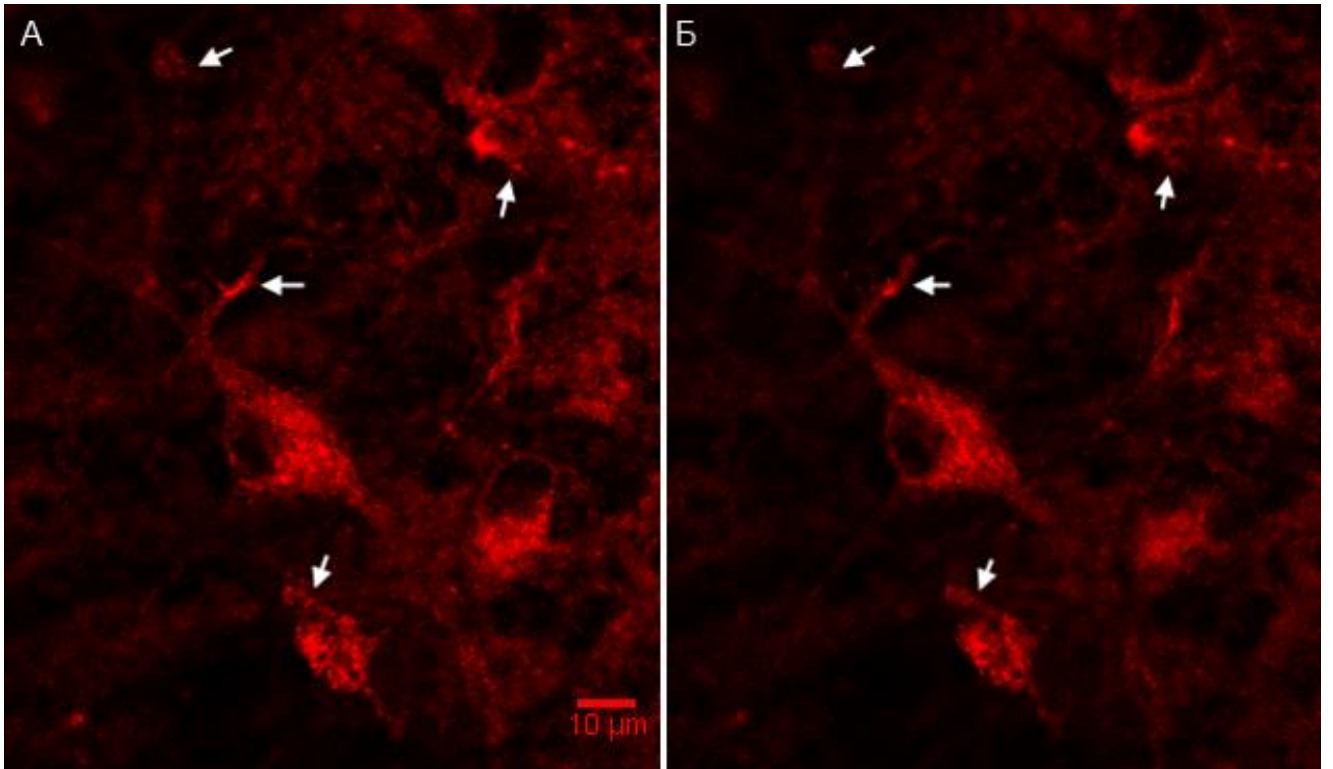


Рисунок 3.30 – Изменение флуоресценции зонда TMRM в ответ на ФД воздействие радахлорина. А – начало воздействия; Б – 15 минута воздействия. Стрелки указывают на области, в которых наиболее явно видно падение или полное исчезновение флуоресценции TMRM в ответ на ФД воздействие, указывающее на падение $\Delta\Psi_m$. Масштабный отрезок – 10 мкм

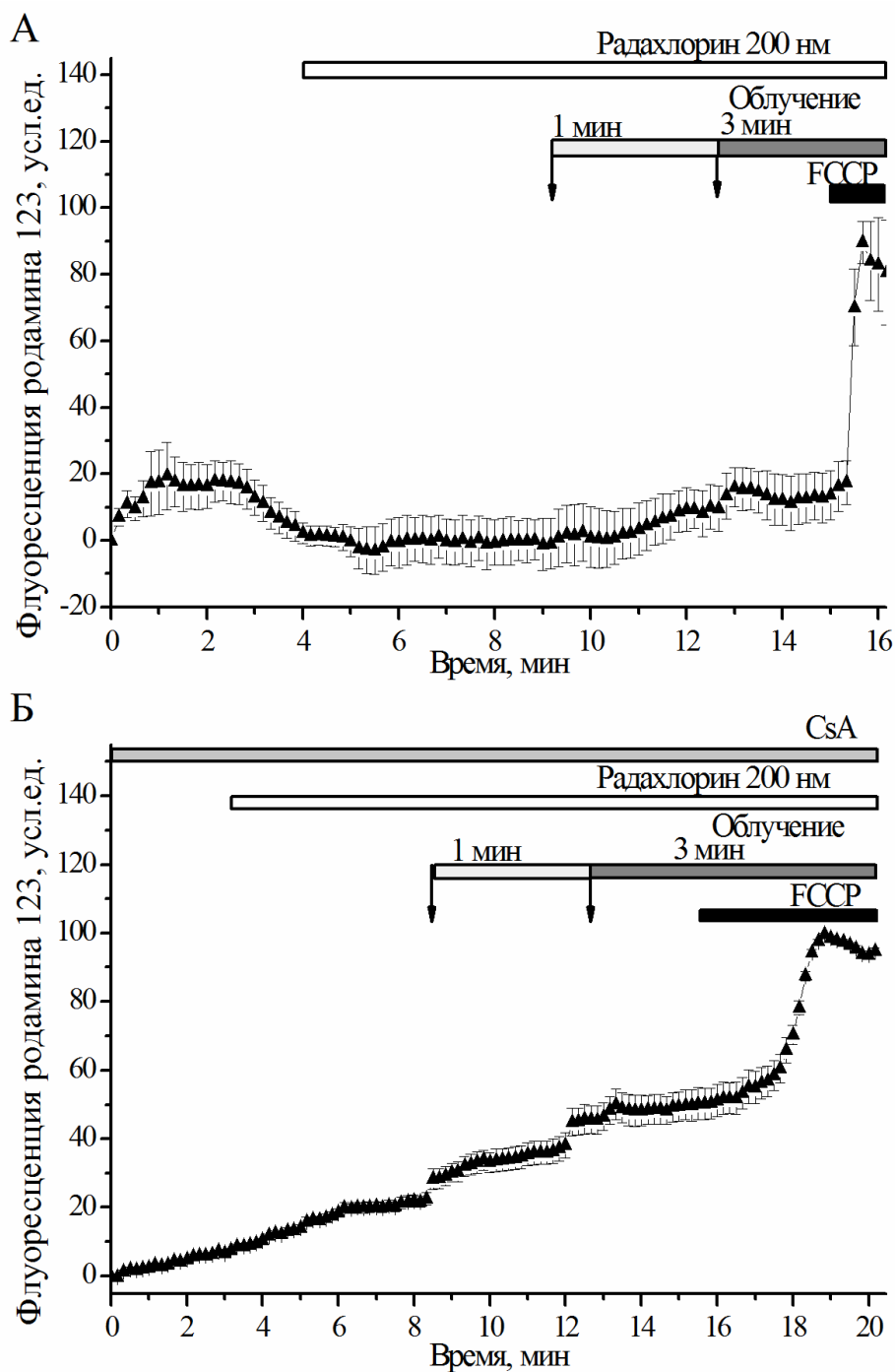


Рисунок 3.31 – Изменение $\Delta\Psi_m$ в ответ на ФД воздействие радахлорина, зарегистрированное с помощью родамина 123. А – изменения флуоресценции родамина 123 в ответ на добавление радахлорина и облучение (1 мин и 3 мин, $n = 123$). Б – изменение флуоресценции родамина в ответ на добавление радахлорина и облучение (1 мин и 3 мин) в присутствии циклоспорина А ($n = 8$). Кривые представляют собой набор средних значений флуоресценции клеток сокультуры \pm стандартная ошибка

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

4.1 Эффективность ФД воздействия радахлорина на нервные клетки

Радахлорин уже в настоящее время успешно применяется в качестве ФС для ФДТ различных видов опухолей. В работах российских авторов сообщается об успешном применении радахлорина для ФДТ базальноклеточного рака кожи, рака пищевода, желудка, прямой кишки и некоторых других видов злокачественных новообразований [130, 144, 145]. Несмотря на успех в применении радахлорина для ФДТ, продолжаются активные исследования фотосенсибилизирующей и фармакокинетической активности хлориновых производных и радахлорина в частности. Особое место отводится локализации ФС в клетках, так как от этого зависит достигаемый ФД эффект.

По данным Douillard et al. (2010), радахлорин отличается высоким уровнем фотосенсибилизирующей и фармакокинетической активности. После введения он проникает в клетки аденокарциномы HT29 и клеток рака легкого A549 всего за 4 часа, а максимальный фототоксический эффект отмечается уже через 3 часа. При удалении радахлорина из среды культуры клеток его уровень сравнительно быстро снижается. В клетках HT29 и A549 радахлорин накапливался в основном в ЭР и других органеллах цитоплазмы и не проникает в клеточное ядро [58]. Это обеспечивает его низкую мутагенность. В работах Biswas et al. (2014) показано, что основное накопление радахлорина в клетках рака щитовидной железы происходит за 3 – 6 часов, максимум приходится на 6 часов. Практически полное выведение из клеток происходит за 48 часов. В клетках рака щитовидной железы радахлорин накапливался в митохондриях и в меньшей степени в лизосомах и ЭР [62]. В работах Вае et al. (2004) на клетках рака шейки матки также показана локализация радахлорина в цитоплазме, однако отмечено некоторое его содержание и в плазматической мембране клеток [68]. В исследованиях *in vivo* также отмечено большее накопление радахлорина в опухолевых клетках по сравнению со здоровыми [62, 68, 146].

Исследование в рамках диссертационной работы показало, что накопление радахлорина в ткани нервной брюшной цепочки рака происходит в течение 30 минут, в дальнейшем этот процесс замедляется. Выведение радахлорина из нервной ткани происходит медленнее – за 2 часа она теряет порядка 11% накопленного красителя. В нейроглиальном препарате рецептора растяжения рака радахлорин локализуется преимущественно в глиальной оболочке и слабо проникает в цитоплазму и ядро нейрона.

Мы можем судить о локализации фотосенсибилизатора и о зоне его воздействия на клетку не только по распределению флуоресценции, но и по ФД - индуцированным изменениям в активности нейронов. Биоэлектрические данные показали, что ФД воздействие с очень малой концентрацией фотосенсибилизатора (ниже 0.1 – 1 нМ) может существенно изменить активность нейронов. Фотоповреждение быстро нарушает целостность плазматической мембраны, что ухудшает ионный гомеостаз и вызывает деполяризацию с последующим ускорением импульсной активности, а после блок деполяризации и, в случае длительного облучения, некроз [4, 147, 148]. Ответ рецептора растяжения на ФД воздействие по типу С (быстрое увеличение частоты импульсной активности с последующим резкой остановкой; рисунок 3.4 В), как правило, обусловлено интенсивным фотоповреждением с относительно высокой концентрацией ФС. Реакция нейронов по типу А (медленное угнетение импульсной активности; рисунок 3.4 А), которые были вызваны довольно слабым ФД воздействием с относительно низким уровнем ФС, возможно связаны с повреждениями митохондрий и ЭР и последующим выходом Ca^{2+} из депо ЭР. Высвобожденный Ca^{2+} угнетает импульсную активность нейронов путем активации Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов, что приводит к гиперполяризации клеток. Интенсивное фотодинамическое повреждение вызывает в основном некроз, в то время как апоптоз, как правило, обусловлен относительно слабым, но длительным воздействием [147, 149, 150]. Слабая зависимость эффекта от концентрации ФС указывает на то, что один акт поглощения фотона молекулой

фотосенсибилизатора может вызвать около 4 вторичных повреждений биомолекул, что приводит к изменениям импульсной активности [4, 150].

В рамках данной работы впервые была показана высокая ФД эффективность радахлорина и в отношении нервных и глиальных клеток. Быстрое накопление и выведение радахлорина – ценное качество для практического применения, так как это позволяет избежать долговременной фотосенсибилизации кожи пациента и сократить время стационарного лечения. Он способен инактивировать нервные клетки механорецептора речевого рака при концентрациях в диапазоне от 1 нМ и выше, вызывать некроз нейронов и ГК, а также апоптоз глии. Основываясь на биоэлектрических реакциях нейронов можно предположить, что радахлорин может повреждать как внутриклеточные органеллы, так и плазматические мембраны нервных клеток, что частично коррелирует с исследованиями на опухолевых клеточных линиях. Таким образом на модели МРН показано, что ФД воздействие хлориновых ФС способно менять клеточные механизмы здоровой нервной ткани и приводить к гибели нейронов и глии, окружающих опухоль при ФДТ мозга. В случае нервной ткани изучение фотоиндуцированных механизмов ответа нейронов и глии представляет собой особо важную задачу, так как изменение внутриклеточной сигнализации нейронов и глиальных клеток может приводить к непредсказуемым последствиям.

4.2 Роль Ca^{2+} в ответе нейронов и астроцитов на ФД воздействие радахлорина

ФД воздействие запускает множество клеточных сигнальных каскадов в различных типах клеток [8, 74, 124]. Исследования участия различных сигнальных белков и молекул, в том числе ионов кальция, участвующих в ответе клеток при ФД воздействии ведутся уже давно.

По результатам множества исследований ФДТ повышает уровень кальция в цитозоле клеток [8]. Изменения уровня кальция в результате ФД воздействия могут быть вызваны как высвобождением кальция из внутриклеточных депо ЭР [121], с последующим трансфером Ca^{2+} в митохондрии [124], так и с

поступлением ионов из внеклеточного пространства. Так, например, по результатам группы исследователей из Китая в клетках глиомы С6 ФД воздействие вызывало повышение уровня кальция в цитозоле частично через активацию АМРА рецепторов, что в последующем приводило к фотоиндуцированной смерти клеток глиомы [119, 120]. ФД воздействие фталоцианина вызывало изменение концентрации Ca^{2+} в цитозоле эмбриональных фибробластов мыши за счет выхода ионов Ca^{2+} из ЭР и последующего захвата митохондриями [151]. Кальциевый ответ может зависеть также и от параметров облучения, так в исследованиях Hubmer et al. (1996) на человеческих фибробластах при малых дозах облучения основной вклад в увеличение концентрации Ca^{2+} в цитозоле давал поток ионов из межклеточного пространства, а при больших – выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо [9]. ФД воздействие вызывало IP3 – опосредованный выход Ca^{2+} , вызывающий осцилляторные колебания $[\text{Ca}^{2+}]_c$ в панкреатических клетках. Этот ответ блокировался при помощи ингибитора фосфотидилинозитол-4,5-бисфосфат специфичной PLC, U 73122 [122]. Этот же механизм фотоиндуцированных колебаний $[\text{Ca}^{2+}]_c$ наблюдался и в клетках лимфомы мыши L5178Y [10]. В клетках HeLa при ФД воздействии вертепорфина также наблюдался выход Ca^{2+} из ЭР, но происходящий не за счет активации IP3 рецепторов, а за счет фотоиндуцированного угнетения работы SERCA [121]. Можно сделать вывод, что кальциевый ответ зависит как от типа клеток, так и от типа ФС, его локализации, и параметров ФД воздействия.

В данном исследовании было показано, что ФД воздействие радахлорина в первичной культуре нейронов и астроцитов вызывает осцилляторный характер изменения уровня Ca^{2+} в цитозоле клеток. Причем фотоиндуцируемые изменения $[\text{Ca}^{2+}]_c$ были вызваны выходом Ca^{2+} из внутриклеточного депо ретикулума, что подтверждалось ингибированием осцилляций предварительным опустошением депо ЭР при помощи ингибирования SERCA тапсигаргином (рисунок 4.1). Вход ионов кальция из внеклеточного пространства давал незначительный вклад в ответ нейронов и астроцитов на ФД воздействие, так как замена внеклеточной среды на бескальциевую не блокировала осцилляций $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (рисунок 4.1).

Одним из наиболее частых механизмов выхода Ca^{2+} из ЭР в нейронах и астроцитах является активация IP3 рецепторов. IP3 вырабатывается при активации работы фермента PLC. В работе Domijan et al. (2014) было показано, что активация PLC в нейронах и астроцитах первичной культуры мозга крысы может происходить вследствие ПОЛ в результате переизбытка АФК различной природы [134]. В нашем исследовании было показано, что ФД воздействие радахлорина приводит к ПОЛ и активации PLC, которая влечет за собой IP3 опосредованный выход Ca^{2+} из ЭР. Это подтверждается блокированием фотоиндуцированного кальциевого сигнала ингибитором PLC, U73122 (рисунок 4.1). Таким образом можно предположить, что активация PLC при ФД воздействии радахлорина на нейроны и глию играет две важные функции: удаление окисленных фосфолипидов и инициация кальциевого сигнала. Как было описано выше подобный характер и механизм кальциевых осцилляций наблюдался в исследованиях *in vitro* [10, 122]. Однако на клетках глиомы при ФД-воздействии активировались рецепторы плазматической мембраны [120], что приводило к дисбалансу Ca^{2+} в цитозоле.

В рамках данного исследования было показано, что амплитуда осцилляций изменялась только при длительном облучении первичной культуры нейронов и астроцитов. Это может говорить, что при данных параметрах облучения (200 нМ радахлорина, время облучения до 5 минут) ФД воздействие не активирует кальциевый сигнал иной природы, тогда как более длительное облучение (более 5 минут воздействия) может приводить как к вторичной активации мембранных рецепторов-каналов, так и к разрушению или нестабильности плазматической, или других мембран нейронов и астроцитов, что может увеличивать $[\text{Ca}^{2+}]_c$.

Следует отметить, что в нейронах ФД воздействие радахлорина вызывало осцилляции и изменения $[\text{Ca}^{2+}]_c$ в большей степени, чем в астроцитах. Это может быть связано с большим уровнем эндогенных антиоксидантов (глутатиона) в глии по сравнению с нейронами [152].

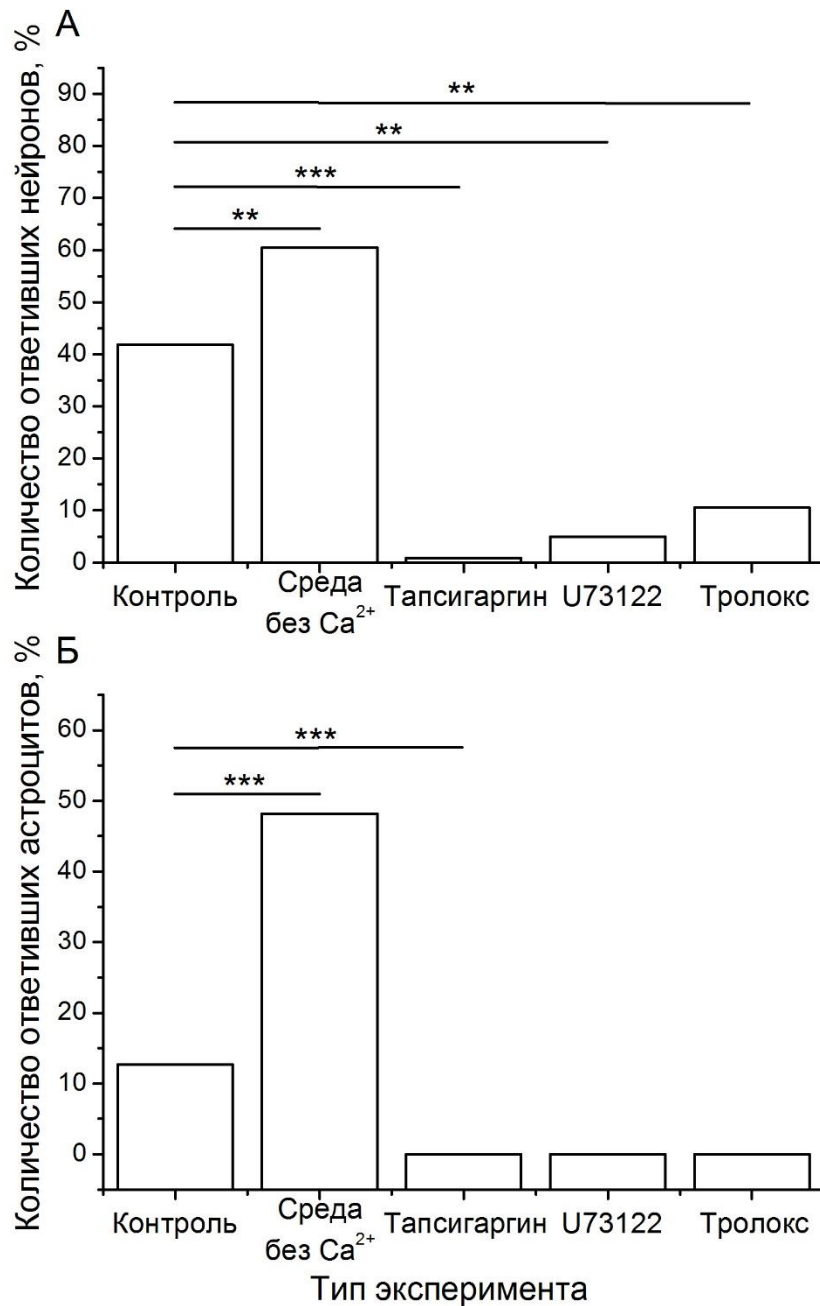


Рисунок 4.1 – Количество клеток, ответивших на ФД воздействие радахлорина при различных ингибиторах. А – нейроны. Б – астроциты
 Тапсигаргин – ингибитор Ca²⁺-АТФазы ЭР, U73122 – ингибитор фосфотидилинозитол-4,5-бифосфат специфичной фосфолипазы С, Тролокс – антиоксидант, водорастворимый аналог витамина Е. Линии обозначают группы экспериментов, между которыми есть достоверные отличия. ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ (χ^2 критерий Пирсона)

4.3 Роль митохондрий в ответе нейронов и астроцитов на ФД воздействие радахлорина

Известно, что митохондрии могут участвовать в регуляции кальциевых сигналов клеток. При увеличении уровня Ca^{2+} в цитозоле митохондрии могут захватывать ионы и, таким образом, служить буфером для цитозольного кальция при повышении его концентрации до высоких значений [153]. При накоплении Ca^{2+} в митохондриях выше критического уровня, может произойти разрыв митохондриальной мембраны или открытие РТР, что в последствии может привести к нарушению работы всей клетки [154].

При ФД воздействии в некоторых случаях наблюдается падение $\Delta\Psi_m$, что может быть связано с открытием высоко проницаемой поры. Открытие РТР может повлечь за собой выход Ca^{2+} , а также выход цитохрома С [155]. Смерть клеток при ФДТ путем апоптоза часто ассоциируют с повреждением митохондрий и выходом цитохрома С. Считается, что открытие митохондриальной поры при ФД воздействии, которое также ведет к падению трансмембранного митохондриального потенциала, является главной причиной апоптотической гибели клетки [74]. Например, в исследованиях Kessel et al. (1999) было установлено, что падение митохондриального потенциала при ФД повреждении клеток лейкоза мыши P388 коррелирует с выходом цитохрома С в цитоплазму [49]. Однако в исследованиях Chiu et al. (2001) на клеточной линии лимфомы LY-R было показано, что падение $\Delta\Psi_m$ и выход цитохрома С могут происходить независимо друг от друга. Кроме того, снижение $\Delta\Psi_m$ наблюдалось только в клетках, которые получили высокую дозу облучения при ФДТ [82]. В исследованиях Giorgi et al. (2015) ФДТ в первичных фибробластах мыши и раковых клетках линии НСТ-116 вызывало выход Ca^{2+} из ЭР, что приводило к переизбытку Ca^{2+} в митохондриях, их набуханию и последующему запуску клеточной гибели [156].

В данном исследовании было показано, что при ФД воздействии радахлорина наблюдалось повышение $[Ca^{2+}]_m$ не только в цитозоле клеток, но и в митохондриях. После достижения некоторого порогового значения $[Ca^{2+}]_m$ начинала резко снижаться в первичных астроцитах сокультуры после 10 минут ФД воздействия. Подобная зависимость изменения $[Ca^{2+}]_m$ может объясняться перегрузкой митохондрий ионами кальция и последующим открытием РТР. Подобный эффект ФД воздействия на опухолевые линии клеток наблюдался в исследованиях группы Giorgi et. al. (2015) [151, 156]. В первичных нейронах $[Ca^{2+}]_m$ продолжала повышаться. Отличие в характере изменения $[Ca^{2+}]_m$ в первичных нейронах и астроцитах при ФД воздействии может объясняться различием в количестве митохондрий в различных типах нервных клеток. В нейронах происходит множество энергозатратных процессов (например, синаптическая передача), для поддержания которых необходимо большее количество митохондрий в сравнении с астроцитами. В связи с этим в нейронах митохондрии могут послужить буфером большему количеству Ca^{2+} . Этим может объясняться более быстрая перегрузка Ca^{2+} митохондрий астроцитов.

При ФД воздействии радахлорина наблюдалось снижение $\Delta\Psi_m$, причем ингибирование РТР циклоспорином А при ФД воздействии до 5 минут не блокировало фотоиндуцированного снижения $\Delta\Psi_m$ как в нейронах, так и в астроцитах первичной культуры. Снижение $\Delta\Psi_m$ при таких дозах облучения фотосенсибилизированных клеток может объясняться как захватом Ca^{2+} митохондриями, так и повышением проницаемости митохондриальной мембраны вследствие ее ФД повреждения. Дальнейшее ФД воздействие может приводить как к стимуляции открытия РТР, так и к критическому повреждению мембраны с последующей деградацией $\Delta\Psi_m$. Таким образом ФД воздействие может приводить к гибели нейронов и астроцитов, в том числе и кальций-опосредованными сигнальными путями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Участие кальциевой сигнальной системы в ответе различных типов клеток на ФД воздействие было подтверждено множеством исследований [8, 120, 157]. Ответ клеток и запускаемые ФД воздействием сигнальные механизмы напрямую зависят от интенсивности воздействия и физико-химических свойств фотосенсибилизатора, а также его локализации в клетке [55, 63]. В данной работе исследовано ФД воздействие фотосенсибилизатора радахлорин на нейроны и глиальные клетки беспозвоночных и позвоночных животных, а также изучен кальциевый сигнальный механизм, запускаемый клеткой в ответ на ФД воздействие радахлорина. Установлено, что радахлорин быстро накапливается сначала в глиальной оболочке нейронов, но также проникает в дендриты и сому, и связывается с нейрональной мембраной. Радахлорин обладает высокой ФД эффективностью в наномолярных и субнаномолярных концентрациях, вызывая инактивацию и смерть нейронов и глиальных клеток.

Показано, что фотодинамическое воздействие радахлорина запускает процесс перекисного окисления липидов клеточных мембран вследствие активной выработки АФК. Фотоиндуцированное перекисное окисление липидов плазматической мембраны, вероятно, активирует фосфолипазу С – фермент, находящийся на клеточной мембране. Активация фосфолипазы С, в свою очередь, приводит к производству IP₃ в результате расщепления фосфотидилинозитол-4,5-дифосфата. Выработка IP₃ приводит к высвобождению ионов кальция из эндоплазматического ретикулума вследствие активации IP₃-рецепторов на поверхности мембраны ретикулума. ФД-индуцированный кальциевый сигнал может запускать множество клеточных функций. Известно, что выход ионов кальция из эндоплазматического ретикулума часто сопровождается захватом кальция митохондриями. Это, по-видимому, играет физиологическую роль, так как было установлено, что повышение концентрации кальция в митохондриях может стимулировать выработку АТФ [114]. Однако перегрузка митохондрий

кальцием часто приводит к запуску сигнальных каскадов, приводящих к клеточной гибели. В рамках данного исследования, было установлено, что ФД-индуцированный кальциевый сигнал приводит к повышению уровня митохондриального кальция и снижению трансмембранного митохондриального потенциала.

Эти результаты могут указывать на повреждение мембраны митохондрий, открытие высокопроницаемой митохондриальной поры вследствие перегрузки митохондрий ионами кальция, или же на угнетение биоэнергетических функций клетки, вызванное фотодинамическим воздействием радахлорина. На основе анализа литературных данных и полученных результатов была построена концептуальная схема реакций нервных клеток на фотодинамическое воздействие радахлорина (рисунок 4.2).

Таким образом, в рамках данной работы был изучен один из сигнальных механизмов нейронов и астроцитов первичной смешанной культуры, запускаемых при ФДТ. Результаты данного исследования однозначно свидетельствуют о запуске кальциевого сигнального механизма в здоровых нейронах и астроцитах в ответ на ФД воздействие. Этот факт целесообразно учитывать при применении ФДТ для лечения рака головного мозга, так как данный сигнал может запустить различные и непредсказуемые процессы или же впоследствии привести к гибели здоровых нейронов и утере физиологических функций организма.

Полученные данные кальциевом сигнальном механизме ответа, опосредованном активацией фосфолипазы C, могут быть использованы при дальнейших исследованиях для оптимизации режимов ФДТ опухолей мозга.

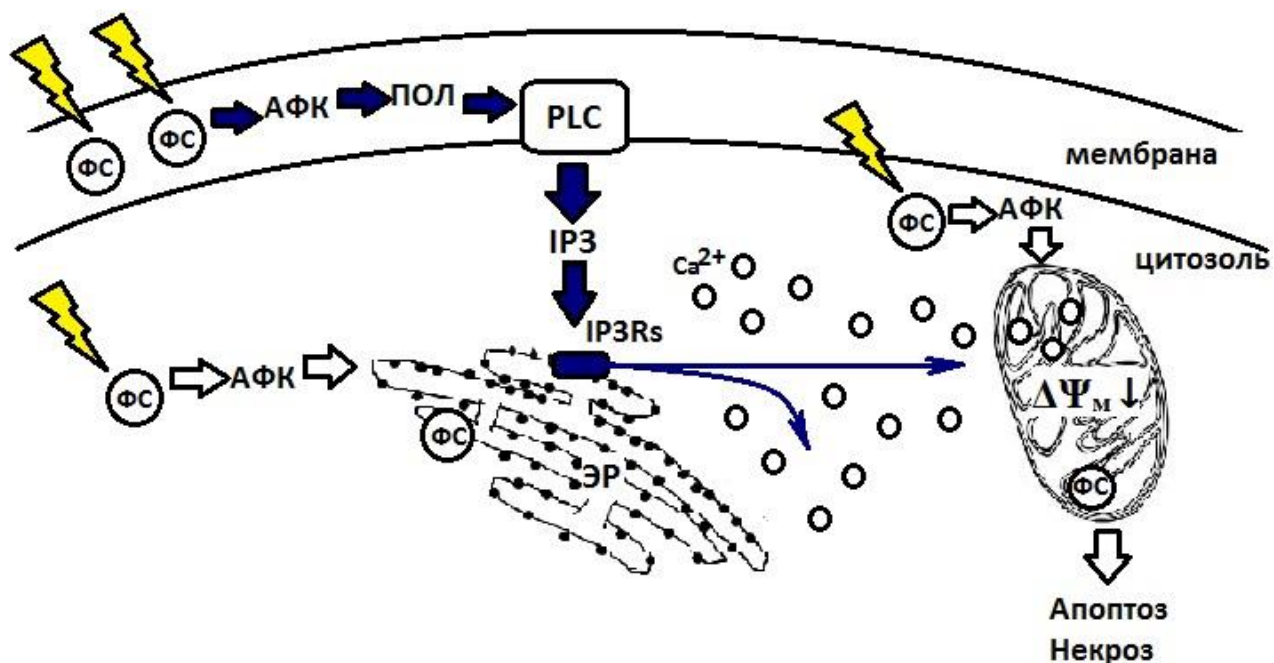


Рисунок 4.2 – Сигнальный механизм, приводящий к повышению уровня кальция в ответ на ФД воздействие. Синими стрелками показана взаимосвязь, предполагаемая на основе результатов экспериментов. Белыми стрелками показаны возможные механизмы, предполагаемые на основе литературных данных. ФС – молекулы фотосенсибилизатора, АФК – активные формы кислорода, ПОЛ – перекисное окисление липидов, PLC – фосфолипаза С, IP3 – инозитолтрифосфат, IP3Rs – IP3 рецепторы, ЭР – эндоплазматический ретикулум, $\Delta\Psi_M$ – трансмембранный митохондриальный потенциал.

ВЫВОДЫ

1. Радахлорин быстро, за 30 минут, накапливается в нервной ткани речного рака. Он локализуется, в основном, в глиальных оболочках нейронов, а также связывается с нейрональной мембраной.
2. Фотодинамическое воздействие субнанолярных концентраций радахлорина необратимо тормозит и подавляет импульсную активность и вызывает некроз механорецепторных нейронов речного рака.
3. Фотодинамическое воздействие радахлорина вызывает некроз и апоптоз глиальных клеток речного рака
4. Фотодинамическое воздействие радахлорина вызывает осцилляции внутриклеточной концентрации ионов кальция в культивируемых нейронах и, в меньшей степени, в астроцитах коры головного мозга крысы.
5. Фотоиндуцированные кальциевые осцилляции в нейронах и астроцитах крысы обусловлены выходом ионов кальция из эндоплазматического ретикулума в цитозоль, опосредованным фосфолипазой C.
6. Фотодинамическое воздействие радахлорина вызывает повышение уровня ионов кальция в митохондриях нейронов и астроцитов коры мозга крысы.
7. Фотодинамическое воздействие радахлорина вызывает падение трансмембранного митохондриального потенциала нейронов и астроцитов коры мозга крысы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Узденский А.Б. Биофизические аспекты фотодинамической терапии / Узденский А.Б. // Биофизика сложных систем – 2016. – Т. 61 – № 3 – С.547–557.
2. Abrahamse H. New photosensitizers for photodynamic therapy / Abrahamse H., Hamblin M.R. // Biochemical Journal – 2016. – Т. 473 – № 4 – С.347–364.
3. Debele T.A. Drug Carrier for Photodynamic Cancer Therapy. / Debele T.A., Peng S., Tsai H.-C. // International journal of molecular sciences – 2015. – Т. 16 – № 9 – С.22094–136.
4. Узденский А.Б. Клеточно-молекулярные механизмы фотодинамической терапии / А. Б. Узденский – Санкт-Петербург: Наука, 2010. – 327с.
5. Quirk B.J. Photodynamic therapy (PDT) for malignant brain tumors — Where do we stand ? / Quirk B.J., Brandal G., Donlon S., Carlos J., Mang T.S., Foy A.B., Lew S.M., Girotti A.W., Jogal S., Laviolette P.S., Connelly J.M., Whelan H.T. // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy – 2015. – Т. 12 – № 3 – С.530–544.
6. Berridge M.J. Calcium: Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling / Berridge M.J., Bootman M.D., Roderick H.L. // Nature Reviews Molecular Cell Biology – 2003. – Т. 4 – № 7 – С.517–529.
7. Brini M. Neuronal calcium signaling: function and dysfunction / Brini M., Cali T., Ottolini D., Carafoli E. // Cellular and Molecular Life Sciences – 2014. – Т. 71 – № 15 – С.2787–2814.
8. 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. – Т. 1704 – № 2 – С.59–86.
9. Hubmer A. Role of calcium in photodynamically induced cell damage of human fibroblasts. / Hubmer A., Hermann A., Uberriegler K., Krammer B. // Photochemistry and Photobiology – 1996. – Т. 64 – № 1 – С.211–5.
10. Agarwal M.L. Phospholipase activation triggers apoptosis in photosensitized mouse lymphoma cells. / Agarwal M.L., Larkin H.E., Zaidi S.I., Mukhtar H., Oleinick

N.L. // *Cancer Research* – 1993. – Т. 53 – № 24 – С.5897–902.

11. 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 – С.250–281.

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

13. Foote C.S. Mechanisms of photosensitized oxidation. There are several different types of photosensitized oxidation which may be important in biological systems. / Foote C.S. // *Science (New York, N.Y.)* – 1968. – Т. 162 – № 3857 – С.963–70.

14. Foote C.S. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. / Foote C.S. // *Photochemistry and Photobiology* – 1991. – Т. 54 – № 5 – С.659.

15. Dougherty T.J. Photodynamic therapy (PDT) of malignant tumors / Dougherty T.J. // *Critical Reviews in Oncology/Hematology* – 1984. – Т. 2 – № 2 – С.83–116.

16. Lipson R.L. The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative. / Lipson R.L., Baldes E.J. // *Archives of dermatology* – 1960. – Т. 82 – С.508–16.

17. Lipson R.L. Hematoporphyrin derivative: a new aid for endoscopic detection of malignant disease. / Lipson R.L., Baldes E.J., Olsen A.M. // *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* – 1961. – Т. 42 – С.623–9.

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

19. Allison R.R. Future of oncologic photodynamic therapy. / Allison R.R., Bagnato V.S., Sibata C.H. // *Future oncology (London, England)* – 2010. – Т. 6 – № 6 – С.929–940.

20. Krasnovsky A.A. Singlet molecular oxygen in photobiochemical systems: IR phosphorescence studies. / Krasnovsky A.A. // *Membrane & cell biology* – 1998. – Т.

12 – № 5 – C.665–90.

21. Dysart J.S. Characterization of Photofrin photobleaching for singlet oxygen dose estimation during photodynamic therapy of MLL cells in vitro. / Dysart J.S., Patterson M.S. // *Physics in medicine and biology* – 2005. – Т. 50 – № 11 – C.2597–616.

22. Moan J. Properties for optimal PDT sensitizers / Moan J. // *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology* – 1990. – Т. 5 – № 3–4 – C.521–524.

23. 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. – Т. 1 – № 4 – C.667–691.

24. St Denis T.G. Synthesis, bioanalysis and biodistribution of photosensitizer conjugates for photodynamic therapy / St Denis T.G., Hamblin M.R. // *Bioanalysis* – 2013. – Т. 5 – № 9 – C.1099–1114.

25. Hamblin M.R. Photosensitizer targeting in photodynamic therapy. II. Conjugates of haematoporphyrin with serum lipoproteins. / Hamblin M.R., Newman E.L. // *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* – 1994. – Т. 26 – № 2 – C.147–57.

26. Решетников А.В. Фотосенсибилизаторы в современной клинической практике (обзор) / под ред. В.Г. Зенгера, А.Н. Наседкина. Тула, 2007.

27. Kostron H. Photodynamic diagnosis and therapy and the brain. / Kostron H. // *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* – 2010. – Т. 635 – C.261–80.

28. Buytaert E. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy / Buytaert E., Dewaele M., Agostinis P. // *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* – 2007. – Т. 1776 – № 1 – C.86–107.

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

30. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. / Halliwell B. // *Plant physiology* – 2006. – Т. 141 –

№ 2 – С.312–322.

31. Донцов В.И. Активные формы кислорода как система: значение в физиологии, патологии и естественном старении / Донцов В.И., Крутько В.Н., Мрикаев Б.М., Уханов С.В. // Труды ИСА РАН – 2006. – Т. 19 – С.50–67.

32. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах / Владимиров Ю.А. // Соросовский образовательный журнал – 2000. – Т. 6 – № 12 – С.13–19.

33. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. / Halliwell B. // Journal of neurochemistry – 1992. – Т. 59 – С.1609–23.

34. Кулинский В.И. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред и защита / Кулинский В.И. // Соросовский образовательный журнал – 1999. – № 1 – С.2–7.

35. Gutteridge J.M. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. / Gutteridge J.M., Halliwell B. // Annals of the New York Academy of Sciences – 2000. – Т. 899 – С.136–47.

36. Gutteridge J.M.C. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths / Gutteridge J.M.C., Halliwell B. // Biochemical and Biophysical Research Communications – 2010. – Т. 393 – № 4 – С.561–564.

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

38. Evans M.D. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. / Evans M.D., Dizdaroglu M., Cooke M.S. // Mutation research – 2004. – Т. 567 – № 1 – С.1–61.

39. Gandhi S. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. / Gandhi S., Abramov A.Y. // Oxidative medicine and cellular longevity – 2012. – Т. 2012 – С.428010 1-11.

40. Чеснокова Н.П. Источники образования свободных радикалов и их значение в биологических системах в условиях нормы / Чеснокова Н.П., Понукалина Е.В., Бизенкова М.Н. // Современные наукоемкие технологии:

Медицинские науки – 2006. – № 6 – С.28–34.

41. Janssen-Heininger Y.M.W. Redox-based regulation of signal transduction: Principles, pitfalls, and promises / Janssen-Heininger Y.M.W., Mossman B.T., Heintz N.H., Forman H.J., Kalyanaraman B., Finkel T., Stamler J.S., Rhee S.G., Vliet A. van der // *Free Radical Biology and Medicine* – 2008. – Т. 45 – № 1 – С.1–17.

42. Ray P. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling / Ray P., Huang B., Tsuji Y. // *Cell Signal* – 2012. – Т. 24 – № 5 – С.981–990.

43. Vranová E. Signal transduction during oxidative stress. / Vranová E., Inzé D., Breusegem F. Van // *Journal of experimental botany* – 2002. – Т. 53 – № 372 – С.1227–36.

44. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance / Mittler R. // *Trends in Plant Science* – 2002. – Т. 7 – № 9 – С.405–410.

45. Wojtovich A.P. Optogenetic control of ROS production / Wojtovich A.P., Foster T.H. // *Redox Biology* – 2014. – Т. 2 – № 1 – С.368–376.

46. Garcia-Diaz M. Use of fluorescent probes for ROS to tease apart Type I and Type II photochemical pathways in photodynamic therapy / Garcia-Diaz M., Huang Y.-Y., Hamblin M.R. // *Methods* – 2016. – Т. 109 – С.158–166.

47. D'Autréaux B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis / D'Autréaux B., Toledano M.B. // *Nature Reviews Molecular Cell Biology* – 2007. – Т. 8 – № 10 – С.813–824.

48. Grey A.D.N.J.N.J. de HO₂•: The Forgotten Radical / Grey A.D.N.J.N.J. de // *DNA and Cell Biology* – 2002. – Т. 21 – № 4 – С.251–257.

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

50. Kessel D. Photodynamic therapy: from the beginning / Kessel D. // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* – 2004. – Т. 1 – № 1 – С.3–7.

51. Girotti A.W. Photosensitized oxidation of membrane lipids: Reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms / Girotti A.W. // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* – 2001. – Т. 63 – № 1–3 – С.103–113.

52. Hauck A.K. Oxidative stress and lipotoxicity / Hauck A.K., Bernlohr D.A. // *Journal of Lipid Research* – 2016. – Т. 57 – № 11 – С.1976–1986.
53. Catalá A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxyalkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions / Catalá A. // *Chemistry and Physics of Lipids* – 2009. – Т. 157 – № 1 – С.1–11.
54. Spikes J.D. Chlorins as photosensitizers in biology and medicine. / Spikes J.D. // *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* – 1990. – Т. 6 – № 3 – С.259–74.
55. Juzeniene A. Chlorin e6-based photosensitizers for photodynamic therapy and photodiagnosis / Juzeniene A. // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* – 2009. – Т. 6 – № 2 – С.94–96.
56. Чан Тхи Хай Иен Фотосенсибилизаторы хлоринового ряда в ФДТ опухолей / Чан Тхи Хай Иен, Раменская Г. В., Оборотова Н. А. // *Российский биотерапевтический журнал* – 2009. – Т. 8 – № 4 – С.99–104.
57. Reshetnikov A.V. Photosensitizer and method for production thereof / Reshetnikov A.V., Zalevsky I.D., Kemov J.V., Ivanov A.V., Karmenyan A.V., Gradyushko A.T., Laptev V.P., Neugodova N.P., Abakumova O.Y., Privalov A.V., Lappa V.A., Romanov V.A. – 2001.
58. Douillard S. In vitro evaluation of Radachlorin sensitizer for photodynamic therapy / Douillard S., Lhommeau I., Olivier D., Patrice T. // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* – 2010. – Т. 98 – № 2 – С.128–137.
59. Uzdensky A.B. Photodynamic effect of novel chlorin e6 derivatives on a single nerve cell / Uzdensky A.B., Dergacheva O.Y., Zhavoronkova A.A., Reshetnikov A. V., Ponomarev G. V. // *Life Sciences* – 2004. – Т. 74 – № 17 – С.2185–2197.
60. Gradyushko A.T. Energetics of photophysical processes in chlorophyll-like molecules / Gradyushko A.T., Sevchenko A.N., Solovyov K.N., Tsvirko M.P. // *Photochemistry and Photobiology* – 1970. – Т. 11 – № 6 – С.387–400.
61. 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. – T. 33 – № 2 – C.171–180.

62. 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. – T. 90 – № 5 – C.1108–1118.

63. 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. – T. 2 – № 2 – C.91–106.

64. O'Connor A.E. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: Preclinical and clinical advances in photodynamic therapy / O'Connor A.E., Gallagher W.M., Byrne A.T. // *Photochemistry and Photobiology* – 2009. – T. 85 – № 5 – C.1053–1074.

65. 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., Reshetnickov A. V. // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* – 2010. – T. 7 – № 4 – C.258–267.

66. Filonenko E. V. Photodynamic therapy of early esophageal cancer / Filonenko E. V., Sokolov V. V., Chissov V.I., Lukyanets E.A., Vorozhtsov G.N. // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* – 2008. – T. 5 – № 3 – C.187–190.

67. 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. – T. 142 – C.86–91.

68. Bae S.-M. Photodynamic Effects of Radachlorin® on Cervical Cancer Cells / Bae S.-M., Kim Y.-W., Lee J.-M., Namkoong S.-E., Han S.-J., Kim J.-K., Lee C.-H., Chun H.-J., Jin H.-S., Ahn W.-S. // *Cancer Research and Treatment* – 2004. – T. 36 – № 6 – C.389.

69. Ji W. The effect of Radachlorin PDT in advanced NSCLC: A pilot study / Ji W., Yoo J. wan, Bae E.K., Lee J.H., Choi C.M. // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* – 2013. – T. 10 – № 2 – C.120–126.

70. Sukhova T.E. Comparative Assessment of the Efficacy of Photodynamic Therapy of Basal Cell Skin Cancer With the Intralesional Administration of Radachlorin and Fotoditazin / Sukhova T.E. // *Almanac of Clinical Medicine* – 2016. – T. 44 – № 44–1 – C.78–87.

71. Biswas R. Carboplatin synergistically triggers the efficacy of photodynamic therapy via caspase 3-, 8-, and 12-dependent pathways in human anaplastic thyroid cancer cells. / Biswas R., Chung P.-S., Moon J.H., Lee S.-H., Ahn J.-C. // *Lasers in medical science* – 2014. – T. 29 – № 3 – C.995–1007.

72. Vakulovskaya E.G. Photodynamic therapy and fluorescent diagnostics of skin cancer with radochlorine and photosense: comparing efficacy and toxicity / Vakulovskaya E.G., Kemov Y.V., Zalevsky I.D., Reshetnikov A.V., Umnova L.V., Vorozhcsov G.N. // *Proceedings of SPIE - the International Society for Optical Engineering* – 2004. – T. 5315 – C.4.

73. Hwang H. Modulation of EGFR and ROS induced cytochrome c release by combination of photodynamic therapy and carboplatin in human cultured head and neck cancer cells and tumor xenograft in nude mice / Hwang H., Biswas R., Chung P.-S., Ahn J.-C. // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* – 2013. – T. 128 – C.70–77.

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

75. Pettigrew C.A. Deregulation of cell death (apoptosis): implications for tumor development. / Pettigrew C.A., Cotter T.G. // *Discovery Medicine* – 2009. – T. 8 – № 41 – C.61–3.

76. Kaufmann S.H. Induction of Apoptosis by Cancer Chemotherapy / Kaufmann S.H., Earnshaw W.C. // *Experimental Cell Research* – 2000. – T. 256 – № 1 – C.42–49.

77. Kaufmann S.H. Programmed cell death: alive and well in the new

millennium. / Kaufmann S.H., Hengartner M.O. // Trends in cell biology – 2001. – Т. 11 – № 12 – С.526–34.

78. Orrenius S. Calcium and mitochondria in the regulation of cell death / Orrenius S., Gogvadze V., Zhivotovsky B. // Biochemical and Biophysical Research Communications – 2015. – Т. 460 – № 1 – С.72–81.

79. Zhivotovsky B. Current Concepts in Cell Death Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2001.

80. Широкова А.В. Апоптоз. Сигнальные пути и изменение ионного и водного баланса клетки / Широкова А.В. // Цитология – 2007. – Т. 49 – № 5 – С.385–394.

81. Oleinick N.L. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. / Oleinick N.L., Morris R.L., Belichenko I. // Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology – 2002. – Т. 1 – № 1 – С.1–21.

82. Chiu S.M. Dissociation of mitochondrial depolarization from cytochrome c release during apoptosis induced by photodynamic therapy. / Chiu S.M., Oleinick N.L. // British journal of cancer – 2001. – Т. 84 – № 8 – С.1099–106.

83. Ahmad N. Involvement of Fas (APO-1/CD-95) during Photodynamic-Therapy-Mediated Apoptosis in Human Epidermoid Carcinoma A431 Cells / Ahmad N., Gupta S., Feyes D.K., Mukhtar H. // Journal of Investigative Dermatology – 2000. – Т. 115 – № 6 – С.1041–1046.

84. Yoo J.-O. New insights into the mechanisms for photodynamic therapy-induced cancer cell death. / Yoo J.-O., Ha K.-S. // International review of cell and molecular biology – 2012. – Т. 295 – С.139–74.

85. Danial N.N. Cell death: critical control points. / Danial N.N., Korsmeyer S.J. // Cell – 2004. – Т. 116 – № 2 – С.205–19.

86. Mathew R. Why sick cells produce tumors: the protective role of autophagy. / Mathew R., White E. // Autophagy – 2007. – Т. 3 – № 5 – С.502–5.

87. Kroemer G. Lysosomes and autophagy in cell death control / Kroemer G.,

Jäättelä M. // *Nature Reviews Cancer* – 2005. – Т. 5 – № 11 – С.886–897.

88. Scherz-Shouval R. Oxidation as a post-translational modification that regulates autophagy. / Scherz-Shouval R., Shvets E., Elazar Z. // *Autophagy* – 2007. – Т. 3 – № 4 – С.371–3.

89. Scherz-Shouval R. ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. / Scherz-Shouval R., Elazar Z. // *Trends in cell biology* – 2007. – Т. 17 – № 9 – С.422–7.

90. Kessel D. Initiation of autophagy by photodynamic therapy. / Kessel D., Oleinick N.L. // *Methods in enzymology* – 2009. – Т. 453 – С.1–16.

91. Rovere R.M.L. La Intracellular Ca²⁺ signaling and Ca²⁺ microdomains in the control of cell survival, apoptosis and autophagy / Rovere R.M.L. La, Roest G., Bultynck G., Parys J.B. // *Cell Calcium* – 2016. – Т. 60 – № 2 – С.74–87.

92. Verkhatsky A. Endoplasmic reticulum calcium signaling in nerve cells. / Verkhatsky A. // *Biological Research* – 2004. – Т. 37 – № 4 – С.693–9.

93. Denton R.M. Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions / Denton R.M. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* – 2009. – Т. 1787 – № 11 – С.1309–1316.

94. Nicholls D.G. Mitochondria and calcium signaling / Nicholls D.G. // *Cell Calcium* – 2005. – Т. 38 – № 3–4 – С.311–317.

95. Clapham D.E. Calcium Signaling / Clapham D.E. // *Cell* – 2007. – Т. 131 – № 6 – С.1047–1058.

96. Артюхов В.Г. Молекулярная биофизика: механизмы протекания и регуляции внутриклеточных процессов / В. Г. Артюхов, О. В. Башарина – Воронеж: Изд.-полигр. центр Воронеж. гос. ун-та, 2012.– 220с.

97. Bootman M.D. Calcium signalling—an overview / Bootman M.D., Collins T.J., Peppiatt C.M., Prothero L.S., MacKenzie L., Smet P. De, Travers M., Tovey S.C., Seo J.T., Berridge M.J., Ciccolini F., Lipp P. // *Seminars in Cell & Developmental Biology* – 2001. – Т. 12 – № 1 – С.3–10.

98. Bootman M.D. Calcium signalling: more messengers, more channels, more complexity. / Bootman M.D., Berridge M.J., Roderick H.L. // *Current biology : CB* – 2002. – Т. 12 – № 16 – С.R563-5.

99. Berridge M.J. Calcium signalling and psychiatric disease: bipolar disorder and schizophrenia / Berridge M.J. // *Cell and Tissue Research* – 2014. – Т. 357 – № 2 – С.477–492.
100. Berridge M.J. Calcium Signalling and Alzheimer's Disease / Berridge M.J. // *Neurochemical Research* – 2011. – Т. 36 – № 7 – С.1149–1156.
101. Berridge M.J. Dysregulation of neural calcium signaling in Alzheimer disease, bipolar disorder and schizophrenia / Berridge M.J. // *Prion* – 2013. – Т. 7 – № 1 – С.2–13.
102. Berridge M.J. The Inositol Trisphosphate/Calcium Signaling Pathway in Health and Disease / Berridge M.J. // *Physiological Reviews* – 2016. – Т. 96 – № 4 – С.1261–1296.
103. Безпрозванный И.Б. Система кальциевой сигнализации при нейродегенерации / Безпрозванный И.Б. // *Acta Naturae* (русскаяязычная версия) – 2010. – Т. 2 – № 1.
104. Berridge M.J. Neuronal calcium signaling / Berridge M.J. // *Neuron* – 1998. – Т. 21 – № 1 – С.13–26.
105. Владимиров Ю.А. Кальциевые насосы живой клетки / Владимиров Ю.А. // *Соросовский образовательный журнал* – 1998. – Т. 3 – С.20–27.
106. Зинченко В.П. Внутриклеточная сигнализация / В. П. Зинченко, Долгачева Л.П. – Пушкино, 2003. – 84с.
107. Мельников К.Н. Разнообразие и свойства кальциевых каналов возбудимых мембран / Мельников К.Н. // *Психофармакология и биологическая наркология* – 2006. – Т. 6 – № 1–2 – С.1139–1155.
108. Feske S. Immunodeficiency due to defects in store-operated calcium entry / Feske S. // *Annals of the New York Academy of Sciences* – 2011. – Т. 1238 – № 1 – С.74–90.
109. Luik R.M. New insights into the molecular mechanisms of store-operated Ca²⁺ signaling in T cells / Luik R.M., Lewis R.S. // *Trends in Molecular Medicine* – 2007. – Т. 13 – № 3 – С.103–107.
110. Venkiteswaran G. Intracellular Ca²⁺ signaling and store-operated Ca²⁺

entry are required in *Drosophila* neurons for flight. / Venkiteswaran G., Hasan G. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2009. – T. 106 – № 25 – C.10326–31.

111. Berridge M.J. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. / Berridge M.J. // *Cell Calcium* – 2002. – T. 32 – № 5–6 – C.235–49.

112. Abeti R. Mitochondrial Ca²⁺ in neurodegenerative disorders / Abeti R., Abramov A.Y. // *Pharmacological Research* – 2015. – T. 99 – C.377–381.

113. 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.

114. Gleichmann M. Neuronal Calcium Homeostasis and Dysregulation / Gleichmann M., Mattson M.P. // *Antioxidants & Redox Signaling* – 2011. – T. 14 – № 7 – C.1261–1273.

115. Kannurpatti S.S. Mitochondrial calcium homeostasis: Implications for neurovascular and neurometabolic coupling / Kannurpatti S.S. // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* – 2016. – C.0271678X16680637.

116. Ogata M. Ca(2+)-dependent and caspase-3-independent apoptosis caused by damage in Golgi apparatus due to 2,4,5,7-tetrabromorhodamine 123 bromide-induced photodynamic effects. / Ogata M., Inanami O., Nakajima M., Nakajima T., Hiraoka W., Kuwabara M. // *Photochemistry and Photobiology* – 2003. – T. 78 – № 3 – C.241–7.

117. Inanami O. Effects of BAPTA-AM and forskolin on apoptosis and cytochrome c release in photosensitized Chinese hamster V79 cells. / Inanami O., Yoshito A., Takahashi K., Hiraoka W., Kuwabara M. // *Photochemistry and photobiology* – 1999. – T. 70 – № 4 – C.650–5.

118. Penning L.C. A role for the transient increase of cytoplasmic free calcium in cell rescue after photodynamic treatment. / Penning L.C., Rasch M.H., Ben-Hur E., Dubbelman T.M., Havelaar A.C., Zee J. Van der, Steveninck J. Van // *Biochimica et biophysica acta* – 1992. – T. 1107 – № 2 – C.255–60.

119. Du P. Photodynamic therapy leads to death of C6 glioma cells partly through

AMPAR / Du P., Hu S., Cheng Y., Li F., Li M., Li J., Yi L., Feng H. // *Brain Research* – 2012. – Т. 1433 – С.153–159.

120. Hu S.L. Imbalance of Ca²⁺ and K⁺ fluxes in C6 glioma cells after PDT measured with scanning ion-selective electrode technique / Hu S.L., Du P., Hu R., Li F., Feng H. // *Lasers in Medical Science* – 2014. – Т. 29 – № 3 – С.1261–1267.

121. Granville D.J. Bcl-2 increases emptying of endoplasmic reticulum Ca²⁺ stores during photodynamic therapy-induced apoptosis / Granville D.J., Ruehlmann D.O., Choy J.C., Cassidy B.A., Hunt D.W.C., Breemen C. va., McManus B.M. // *Cell Calcium* – 2001. – Т. 30 – № 5 – С.343–350.

122. Cui Z.J. Photodynamic triggering of calcium oscillation in the isolated rat pancreatic acini. / Cui Z.J., Kanno T. // *The Journal of physiology* – 1997. – С.47–55.

123. Schwab B.L. Cleavage of plasma membrane calcium pumps by caspases: a link between apoptosis and necrosis / Schwab B.L., Guerini D., Didszun C., Bano D., Ferrando-May E., Fava E., Tam J., Xu D., Xanthoudakis S., Nicholson D.W., Carafoli E., Nicotera P. // *Cell Death and Differentiation* – 2002. – Т. 9 – № 8 – С.818–831.

124. Mfouo-Tynga I. Cell death pathways and phthalocyanine as an efficient agent for photodynamic cancer therapy / Mfouo-Tynga I., Abrahamse H. // *International Journal of Molecular Sciences* – 2015. – Т. 16 – № 5 – С.10228–10241.

125. Чисов В.И. Фотодинамическая терапия метастатических опухолей головного мозга / Чисов В.И., Соколов В.В., Решетов И.В., Зайцев А.М., Шелеско А.А. // *Российский онкологический журнал* – 2009. – № 2 – С.4–7.

126. Kostron H. Photodynamic therapy in neurosurgery: A review / Kostron H., Obwegeser A., Jakober R. // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* – 1996. – Т. 36 – № 2 – С.157–168.

127. 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. – Т. 13 – № 6 – С.615–625.

128. Stylli S.S. Photodynamic therapy of cerebral glioma - a review. Part II - clinical studies. / Stylli S.S., Kaye A.H. // *Journal of clinical neuroscience: official journal of the Neurosurgical Society of Australasia* – 2006. – Т. 13 – № 7 – С.709–17.

129. 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. – Т. 5 – № 1 – С.29–35.
130. 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.
131. Машанский В.Ф. Гистохимическое и электронно-микроскопическое изучение нейронно-глиальных отношений в рецепторе растяжения речного рака / Машанский В.Ф., Загускин С.Л., Федоренко Г.М. // *Цитология* – 1974. – Т. 16 – С.770–773.
132. Ильинский О.Б. Физиология сенсорных систем: Ч. 3. Физиология механорецепторов / О. Б. Ильинский – Ленинград: Наука, 1975.– 560с.
133. Cattaert D. Adaptive motor control in crayfish / Cattaert D., Ray D. Le // *Progress in Neurobiology* – 2001. – Т. 63 – № 2 – С.199–240.
134. 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. – Т. 127 – № Pt 1 – С.21–6.
135. Rydqvist B. Mechanotransduction and the crayfish stretch receptor / Rydqvist B., Lin J.H., Sand P., Swerup C. // *Physiology and Behavior* – 2007. – Т. 92 – № 1–2 – С.21–28.
136. Florey E. Microanatomy of the Abdominal Stretch Receptors of the Cayfish (*Astacus Fluviatilis* L.) / Florey E., Florey E. // *The Journal of general physiology* – 1955. – Т. 39 – С.69–85.
137. Paredes R.M. Chemical calcium indicators / Paredes R.M., Etzler J.C., Watts L.T., Zheng W., Lechleiter J.D. // *Methods* – 2008. – Т. 46 – № 3 – С.143–151.
138. Drummen G.P.C. C11-BODIPY(581/591), an oxidation-sensitive fluorescent lipid peroxidation probe: (micro)spectroscopic characterization and validation of methodology. / Drummen G.P.C., Liebergen L.C.M. van, Op den Kamp J.A.F., Post J.A. // *Free radical biology & medicine* – 2002. – Т. 33 – № 4 – С.473–90.

139. Scaduto R.C. Measurement of Mitochondrial Membrane Potential Using Fluorescent Rhodamine Derivatives / Scaduto R.C., Grotyohann L.W. // *Biophysical Journal* – 1999. – Т. 76 – № 1 – С.469–477.
140. Baracca A. Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F₀ during ATP synthesis / Baracca A., Sgarbi G., Solaini G., Lenaz G. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* – 2003. – Т. 1606 – № 1 – С.137–146.
141. Рощупкин Д.И. Основы фотобиофизики / Д. И. Рощупкин, В. Г. Артюхов – Воронеж: ВГУ, 1997. – 116с.
142. Оптическая биомедицинская диагностика // под ред. В.В. Тучин. – Москва: Физматлит, 2007. – 368с.
143. Abramov A.Y. Mechanism of neurodegeneration of neurons with mitochondrial DNA mutations / Abramov A.Y., Smulders-Srinivasan T.K., Kirby D.M., Acin-Perez R., Enriquez J.A., Lightowers R.N., Duchen M.R., Turnbull D.M. // *Brain* – 2010. – Т. 133 – № 3 – С.797–807.
144. Кочнева Е.В. Фотодинамическая терапия в онкологической практике / Кочнева Е.В., Привалов В.А. // *Лазерная медицина* – 2005. – Т. 9 – № 3 – С.7–13.
145. Петровский В.Ю. Фотодинамическая терапия с фотосенсибилизаторами хлоринового ряда при раке головы, 2012. – 47–48с.
146. Douillard S. In vitro and in vivo evaluation of Radachlorin® sensitizer for photodynamic therapy / Douillard S., Olivier D., Patrice T. // *Photochemical & Photobiological Sciences* – 2009. – Т. 8 – № 3 – С.405.
147. Bragin D.E. Photodynamic inactivation of isolated crayfish neuron requires protein kinase C, PI 3-kinase and Ca²⁺ / Bragin D.E., Kolosov M.S., Uzdensky A.B. // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* – 2003. – Т. 70 – № 2 – С.99–105.
148. 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.

149. Uzdensky A.B. A single neuron response to photodynamic effect of various aluminum and zinc phthalocyanines / Uzdensky A.B., Derkacheva V.M., Dergacheva O.Y., Zhavoronkova A.A. // *Life Sciences* – 2000. – T. 68 – № 5 – C.547–555.

150. 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. – T. 11 – № 3 – C.357–364.

151. Giorgi C. Intravital imaging reveals p53-dependent cancer cell death induced by phototherapy via calcium signaling. / Giorgi C., Bonora M., Missiroli S., Poletti F., Ramirez F.G., Morciano G., Morganti C., Pandolfi P.P., Mammano F., Pinton P. // *Oncotarget* – 2015. – T. 6 – № 3 – C.1435–45.

152. Dringen R. Glutathione metabolism in brain / Dringen R., Gutterer J.M., Hirrlinger J. // *European Journal of Biochemistry* – 2000. – T. 267 – № 16 – C.4912–4916.

153. Nicholls D.G. Mitochondria and Neuronal Survival / Nicholls D.G., Budd S.L. // *Physiological Reviews* – 2000. – T. 80 – № 1 – C.315–360.

154. Abramov A.Y. β -Amyloid Peptides Induce Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Astrocytes and Death of Neurons through Activation of NADPH Oxidase / Abramov A.Y., Canevari L., Duchen M.R. // *Journal of Neuroscience* – 2004. – T. 24 – № 2 – C.565–575.

155. Moor A.C.. Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy / Moor A.C.. // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* – 2000. – T. 57 – № 1 – C.1–13.

156. Giorgi C. p53 at the endoplasmic reticulum regulates apoptosis in a Ca^{2+} - dependent manner / Giorgi C., Bonora M., Sorrentino G., Missiroli S., Poletti F., Suski J.M., Galindo Ramirez F., Rizzuto R., Virgilio F. Di, Zito E., Pandolfi P.P., Wieckowski M.R., Mammano F., Sal G. Del, Pinton P. // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 2015. – T. 112 – № 6 – C.1779–1784.

157. Hong X. Intracellular free calcium mediates glioma cell detachment and cytotoxicity after photodynamic therapy / Hong X., Jiang F., Kalkanis S.N., Zhang

Z.G., Zhang X., Zheng X., Jiang H., Chopp M. // Lasers in Medical Science – 2009. – Т. 24 – № 5 – С.777–786.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю – проф. Узденскому Анатолию Борисовичу; а также проф. Абрамову Андрею Юрьевичу и сотрудникам лаборатории «Молекулярная нейробиология» Бережной Е. В., Рудковскому М. В., Демьяненко С. В. за оказанную помощь в выполнении диссертационной работы.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа была поддержана грантами РФФИ (№ 14-04-32270) и РНФ (14-15-00068).