

На правах рукописи



Бережная Елена Викторовна

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

Специальность – 03.01.02 Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Воронеж – 2017

Работа выполнена в Академии биологии и биотехнологии
ФГАОУ ВО «Южный Федеральный Университет»

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор
Узденский Анатолий Борисович

Официальные оппоненты:

Сури́н Александр Михайлович
доктор биологических наук,
ФГБНУ «НИИ общей патологии и
патофизиологии» (г. Москва), лаборатория
фундаментальных и прикладных проблем
боли, главный научный сотрудник

Балалаева Ирина Владимировна
кандидат биологических наук, ФГАОУ ВО
«Национальный исследовательский
Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского»,
кафедра биофизики биологического
факультета, доцент

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт
физиологически активных веществ
Российской академии наук, г. Черноголовка

Защита диссертации состоится 29 марта 2017 г. в 15:00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.038.03 на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет» по адресу: 394018, г. Воронеж, Университетская пл., 1, ауд. 59.

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

Автореферат разослан

. «28» февраля 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



Грабович Маргарита Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Фотодинамический (ФД) эффект представляет собой способ селективного повреждения клеток, окрашенных красителем-фотосенсибилизатором, под действием света в присутствии кислорода. ФД эффект лежит в основе фотодинамической терапии (ФДТ), которая используется в онкологии для разрушения опухолей мозга в качестве вспомогательной терапии при хирургическом вмешательстве [Sanchez-Barcelo, Mediavilla, 2014; Zavadskaya, 2015]. Ряд работ [Muller et al., 2006; Чиссов и др., 2009; Kostron et al., 2011; Олёшин и др., 2013] свидетельствует о повышении выживаемости и снижении риска неврологических заболеваний при применении ФДТ в нейроонкологии. Перспективными фотосенсибилизаторами (ФС), которые широко исследуются в странах СНГ, в том числе для лечения опухолей мозга, являются фотосенс и радахлорин [Zavadskaya, 2015].

Однако при ФД воздействии на нервную ткань повреждаются также и здоровые клетки, окружающие опухоль, поэтому важно исследовать реакцию нормальных нейронов и глиальных клеток на ФДТ [Узденский, 2016]. Гибель клеток при ФД воздействии происходит в результате окислительного стресса, инициатором которого является синглетный кислород и другие активные формы кислорода (АФК), которые образуются при воздействии света на ФС [Узденский, 2010]. Точные механизмы клеточной смерти различаются в зависимости от типа клеток, используемого фотосенсибилизатора, его локализации, накопления, способности генерировать АФК и т.д. [Castano et al., 2005; Robertson et al., 2009]. В ответ на окислительный стресс в клетке запускается ряд сигнальных процессов, направленных как на защиту клетки, так и ведущих к её гибели [Владимиров, Проскурина, 2009]. Важную роль при этом играют митохондрии, которые сами при этом являются источником АФК и при патологических состояниях, связанных с окислительным стрессом, могут запускать как апоптоз, так и некроз [Duchen, 2004]. Также при окислительном стрессе активируется ряд факторов транскрипции, в частности, NF- κ B, AP-1 и

HIF-1, регулирующих экспрессию генов, которые кодируют белки, участвующие в регуляции выживаемости клетки [Oleinick, Evans, 1998; Qutub, Popel, 2008; Morgan, Liu, 2011; Broekgaarden et al., 2015]. Однако в литературе мало сведений о клеточных механизмах повреждения здоровых нейронов и глии при фотоиндуцируемом окислительном стрессе. Вследствие этого, для повышения эффективности ФД воздействия актуально исследовать изменения митохондриального метаболизма и роль факторов транскрипции NF-κB, AP-1 и HIF-1 в нейронах и глиальных клетках при ФД воздействии радахлорина и фотосенса. Удобными объектами для изучения данных вопросов являются первичная сокультура нейронов и астроцитов коры мозга крысы и механорецептор речного рака, в котором нейроны и глиальные клетки точно идентифицированы.

Цель работы:

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

Задачи исследования:

– Изучить развитие окислительного стресса в нейронах и астроцитах первичной сокультуры коры мозга крысы при ФД воздействии по показателям динамики генерации АФК, уровню восстановленного глутатиона и скорости перекисного окисления липидов.

– Изучить изменения митохондриального метаболизма клеток по показателям изменения митохондриального потенциала и аутофлуоресценции НАД(Ф)Н при ФД воздействии.

– Изучить роль факторов транскрипции NF-κB, AP-1 и HIF-1 в гибели нейронов и глиальных клеток речного рака при ФД воздействии.

Научная новизна результатов исследования

- В настоящей работе впервые показано, что ФД воздействие радахлорина увеличивает скорость генерации супероксид-аниона и перекисного окисления липидов в нейронах и астроцитах первичной сокультуры коры мозга крысы и повышает уровень восстановленного глутатиона в астроцитах.
- Продемонстрировано, что ФД воздействие радахлорина активирует фермент PARP, который вызывает снижение депо НАДН и способствует деполяризации митохондрий.
- Впервые показано, что фактор транскрипции NF-κB участвует в некрозе нейронов и апоптозе глиальных клеток механорецептора речного рака при ФД воздействии фотосенса, но защищает глиальные клетки от фотоиндуцированного некроза.
- Продемонстрировано, что фактор транскрипции AP-1 участвует в апоптозе глиальных клеток механорецептора речного рака, вызванном ФД воздействием фотосенса.
- Показано, что активатор фактора транскрипции NIF-1 защищает глиальные клетки механорецептора речного рака от некроза и апоптоза, вызванных ФД воздействием фотосенса, а ингибиторы NIF-1 способствуют фотоиндуцированному апоптозу глии.

Научно-практическая значимость

Полученные данные о том, что ФД воздействие вызывает окислительный стресс в нейронах и астроцитах коры мозга крысы, который проявляется в увеличении скорости генерации супероксид-аниона и перекисного окисления липидов, повышает уровень восстановленного глутатиона в астроцитах и ведёт к изменениям митохондриального метаболизма и гибели клеток, которая регулируется в том числе факторами транскрипции NF-κB, AP-1 и NIF-1, дополняют известные клеточно-молекулярные механизмы, связанные с генерацией АФК и фотоповреждением клеток, и могут иметь

общебиологическое значение. Установленная в работе фотоиндуцированная активация PARP, влекущая за собой истощение НАДН депо и митохондриальную деполяризацию, свидетельствует о возможном участии PARP в повреждении нервных и глиальных клеток при ФД воздействии. Данные об активации PARP при ФД воздействии и об участии факторов транскрипции NF-κB, AP-1 и HIF-1 в фотоиндуцированной гибели клеток могут быть использованы для модуляции клеточной гибели и защиты нормальных клеток при ФДТ нервной ткани.

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

Основные положения, выносимые на защиту

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

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

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

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

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

Апробация диссертационной работы. Основные положения работы представлены на всероссийских и международных конференциях: XVI

Международная конференция по нейрокибернетике (Ростов-на-Дону, 2012), «Актуальные вопросы биомедицинской инженерии» (Ростов-на-Дону, 2012), «Современные проблемы биофизики сложных систем. Информационно-образовательные процессы» (Воронеж, 2013), «Миссия молодежи в науке» (Ростов-на-Дону, 2013), Международная научная школа «Горизонты современных нейронаук» (Нижний Новгород, 2014), Saratov Fall Meeting SFM'14 (Саратов, 2014), зимняя школа «Современная биология и Биотехнологии будущего – 2015» (Звенигород, 2015), «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2015), «Биология – наука 21 века» (Пушино, 2016), 10th FENS Forum of Neuroscience (FENS 2016) (Копенгаген, 2016), 13th International Conference on Neuroprotective Agents (ICNA 2016) (Бильбао, 2016), V Съезд физиологов СНГ, V Съезд биохимиков России, конференция ADFLIM (Дагомыс, Сочи, 2016), а также на семинаре в Институте Неврологии Университетского Колледжа Лондона.

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

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 129 страницах машинописного текста, состоит из введения, 4 глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследований, обсуждение результатов), выводов и библиографического указателя, включающего 232 отечественных и зарубежных источника. Работа иллюстрирована 27 рисунками и 1 таблицей.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В данной работе механизмы фотодинамического воздействия на нервные и глиальные клетки исследовались на двух модельных объектах – изолированном механорецепторе растяжения речного рака *Astacus leptodactylus*, состоящем из одиночного механорецепторного нейрона, окруженного оболочкой из сателлитных глиальных клеток, и первичной сокультуре нейронов и астроцитов

коры мозга крысы. В качестве фотосенсибилизатора использовались фотосенс (75 нМ; НИОПИК, Москва), состоящий из сульфированных алюмофталоцианинов, и радахлорин (200-400 нМ; ООО «Рада-фарма», Москва), состоящий из хлорина е6 (80-90%), хлорина р6 (5-20%) и пурпурина 5 (1-5%). Облучение производилось с помощью диодных лазеров, генерирующих излучение с длинами волн 654 и 670 нм; интенсивность облучения составляла 0,1 и 0,4 Вт/см², соответственно. Доза облучения варьировалась путём изменения времени облучения (от 10 с до 30 мин).

Для культивирования клеток использовались МЕМ, нейробазальная среда, супплекменты, антибиотики, поли-D-лизин, трипсин-ЭГТА, коллагеназа (Invitrogen) [Domijan, Abramov, 2011]. Для выделения механорецептора речного рака и поддержания его жизнедеятельности использовался физиологический раствор Ван-Харревельда (мМ: NaCl – 205; KCl – 5,4; NaHCO₃ – 0,24; MgCl₂ – 5,4; CaCl₂ – 13,5; pH 7.2–7.4) [Florey, Florey, 1955]. В исследовании использовались следующие химреактивы: разобщитель окислительного фосфорилирования, FCCP (Sigma-Aldrich, США); блокатор высокопроницаемых митохондриальных пор, циклоспорин А (Sigma-Aldrich, США); ингибитор дыхательной цепи, NaCN (Sigma-Aldrich, США); ингибитор фермента PARP, DPQ (Tocris, Великобритания); модуляторы фактора транскрипции NIF-1, KG-548, FM19G11 и DMOG (Sigma-Aldrich, США); модуляторы фактора транскрипции NF-κB, партенолид (Alomone Labs, Израиль), бетулиновая кислота (Sigma-Aldrich, США) и CAPE (Tocris, Великобритания); ингибитор фактора транскрипции AP-1, SR11302 (Tocris, Великобритания).

Для изучения гибели нейронов и глиальных клеток использовались флуоресцентные красители (Sigma-Aldrich, США), пропидий иодид (PI), который придает красную флуоресценцию некротическим клеткам с поврежденной плазматической мембраной, и Hoechst-33342, который окрашивает синим цветом ядра клеток с неповрежденной мембраной. После окрашивания клетки фиксировались 0,2% раствором глутаральдегида,

промывались физиологическим раствором и заключались в глицерин. Полученные препараты исследовались на флуоресцентном микроскопе Axio Lab.A1 (Zeiss, Германия).

Для исследования окислительного стресса в первичной сокультуре нейронов и астроцитов коры мозга крысы применялись флуоресцентные зонды Invitrogen Molecular Probes (Великобритания). По изменению флуоресценции дигидроэтидиума (DHE) оценивалась скорость образования супероксид-аниона [Robinson et al., 2006]. Скорость перекисного окисления липидов изучалась с помощью C11 BODIPY 581/591 [Drummen et al., 2002]. Для исследования уровня восстановленного глутатиона и изменений митохондриального потенциала использовались монохлорбиман (mcb) и родамин 123, соответственно [Keelan et al., 2001; Scaduto et al., 1999]. Все красители разводились в диметилсульфоксиде (DMSO, Sigma-Aldrich, США). Для лучшего проникновения данных зондов в клетки использовался специальный диспергирующий агент, плуроник F-127 (Invitrogen Molecular Probes, Великобритания), так, чтобы его конечная концентрация в среде составляла 0,005%. Функциональное состояние митохондрий исследовалось по аутофлуоресценции НАД(Ф)Н [Bartolomé, Abramov, 2015]. Для того, чтобы отличить аутофлуоресценцию митохондриального НАДН от флуоресценции цитозольного НАДН и НАДФН, в конце эксперимента последовательно добавлялись разобщитель окислительного фосфорилирования, FCCP, и ингибитор дыхательной цепи, NaCN. Перед началом каждого эксперимента клетки отмывались средой Хенкса (156 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 1,25 mM KH₂PO₄, 2 mM CaCl₂, 10 mM глюкозы и 10 mM HEPES, pH 7,35).

Культивируемые клетки исследовались с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Olympus (Япония), оборудованного флюоритовыми объективами 20x и 40x. Красители возбуждались светом ксеноновой лампы, проходящим через монохроматор (Cairn Research, Kent, Великобритания), контролируемый компьютерной программой Andor IQ

(Великобритания) с временными интервалами 5 или 10 с. Флуоресцентные изображения регистрировались с помощью CCD камеры (Retiga, QImaging, Surrey, BC, Канада) и оцифровывались с разрешением 12 бит при помощи программы Andor IQ. Во время облучения регистрация прерывалась во избежание засветки камеры; вдоль оси абсцисс откладывалось время регистрации интенсивности флуоресценции зонда в программе Andor IQ. Флуоресцентные изображения клеток, окрашенных красителем C11 BODIPY 581/591, были получены с интервалом 5 с на конфокальном микроскопе Zeiss 710 CLSM (Carl Zeiss, Германия).

Все изображения обрабатывались с помощью программ ImageJ (NIH, США). Математическая обработка полученных флуоресцентных сигналов проводилась с помощью программы MS Excel (США). Статистический анализ (однофакторный дисперсионный анализ, однофакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, *t*-критерий Стьюдента) и построение графиков осуществляли с помощью программы Origin 8.1 (Microcal Software Inc, США) и SigmaPlot (США). Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Результаты представляли в виде среднее значение \pm стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Фотоиндуцированный окислительный стресс в нейронах и астроцитах

Облучение культуры клеток в течение 30 с в присутствии радахлорина (200 нМ) достоверно ($p < 0,05$) увеличивало скорость продукции супероксид-аниона в нейронах ($n = 18$, $140 \pm 10\%$ относительно начального уровня, Рис. 1А), в астроцитах повышение наблюдалось только после двухминутного воздействия ($n = 28$, $160 \pm 10\%$ относительно начального уровня, Рис. 1Б). Ещё через 5 мин после облучения наблюдалась тенденция к снижению генерации супероксид-аниона по сравнению с его продукцией после двухминутного воздействия, что может быть связано либо с фотоповреждением митохондрий, либо с истощением зонда (Рис. 1).

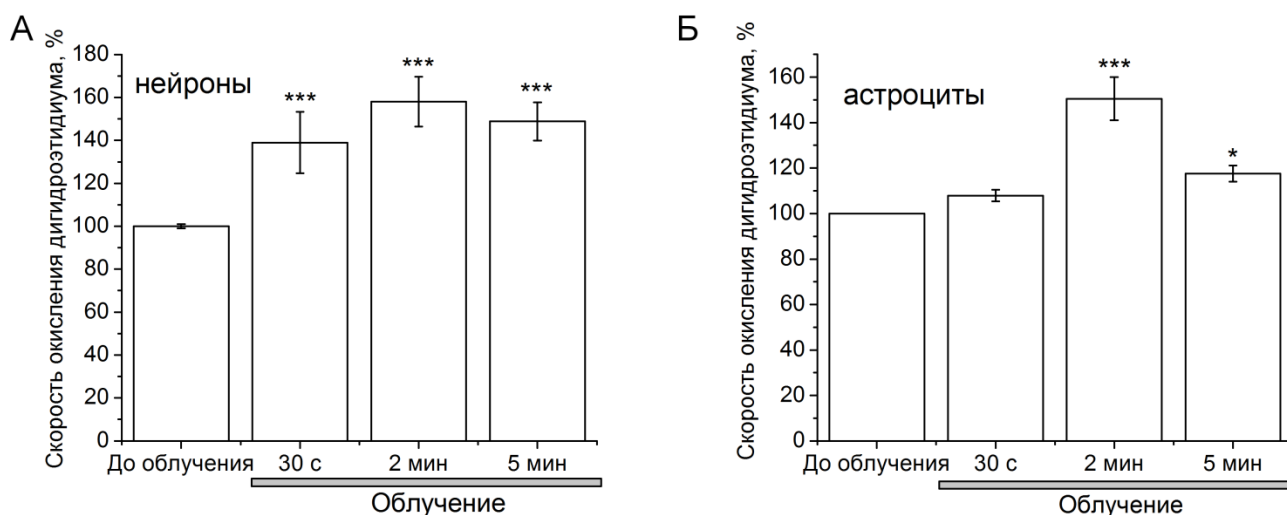


Рис. 2. Изменение скорости образования супероксид-аниона при ФД воздействии радахлорина 200 нМ (облучение в течение 30 с, 2 мин и 5 мин) на нейроны (А) и астроциты (Б) в первичной сокультуре коры мозга крысы, полученные по измерению отношения интенсивностей флуоресценции окисленной и восстановленной форм дигидроэтидиума.

На графиках за 100% взята скорость образования супероксид аниона до облучения, данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка (однофакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями). * - $p < 0,05$, *** - $p < 0,001$.

Увеличение продукции АФК в клетке при ФД воздействии ведёт к окислительному стрессу, нарушению баланса между прооксидантами и компонентами системы антиоксидантной защиты. Ключевым компонентом антиоксидантной защиты клетки является глутатион. Он может как непосредственно взаимодействовать с АФК, так и участвовать в реакциях ферментативной антиоксидантной системы в качестве донора электронов. При этом глутатион переходит из восстановленной формы в окисленную. Уровень восстановленного глутатиона (GSH) является одним из показателей развития окислительного стресса в клетке: его снижение свидетельствует о преобладании прооксидантных процессов. В нейронах GSH достоверно не отличался до ($n = 121$; 2050 ± 70) и после ФД воздействия РХ ($n = 195$; 2160 ± 60) (Рис. 2А). В астроцитах ФД воздействие РХ достоверно увеличивало GSH ($p < 0,001$; $n = 231$; 2000 ± 60) по сравнению с облучением культуры без добавления ФС ($n = 144$; 1480 ± 40) (Рис. 2Б). Полученные данные об уровне GSH свидетельствуют о том, что использованный режим ФД воздействия не приводит за 4 часа к подавлению антиоксидантной защиты в клетках и преобладанию прооксидантных процессов.

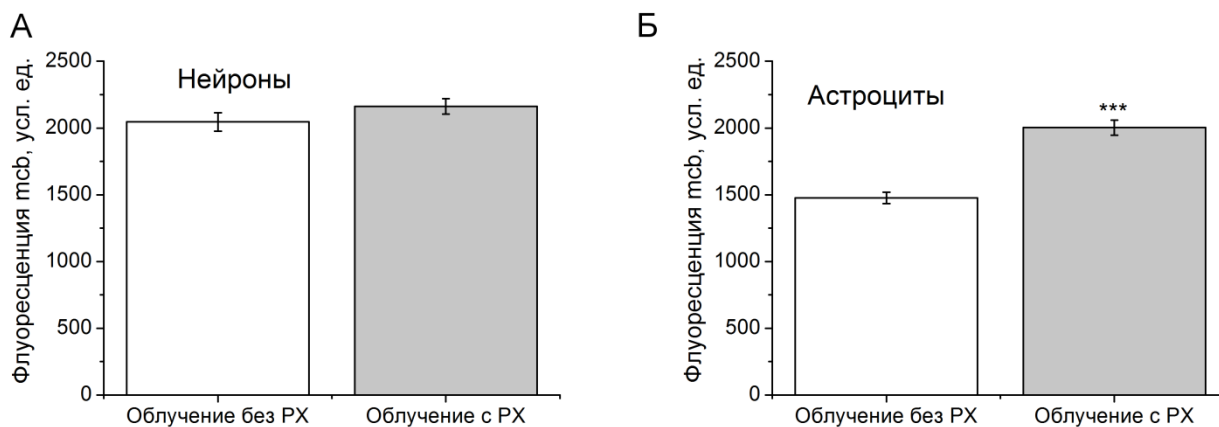


Рис. 2. Изменение уровня восстановленного глутатиона при фотодинамическом воздействии радахлорина 200 нМ (облучение в течение 4 мин) на нейроны (А) и астроциты (Б) в первичной сокультуре коры мозга крысы, полученные по измерению интенсивности флуоресценции монохлорбимана (mcb) через 4 часа после воздействия.

Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка (*t*-критерий Стьюдента). *** - $p < 0,001$.

Другой процесс, развивающийся при ФД воздействии – перекисное окисление липидов. Как в нейронах, так и астроцитах скорость перекисного окисления липидов достоверно увеличивалась только после 4 мин облучения (Рис. 3). Это повышение было больше выражено в глиальных клетках: в нейронах оно составляло $120 \pm 10\%$ ($n = 18$, $p < 0,05$, Рис. 3Б), тогда как в астроцитах – $280 \pm 70\%$ ($n = 28$, $p < 0,01$, Рис. 3А).

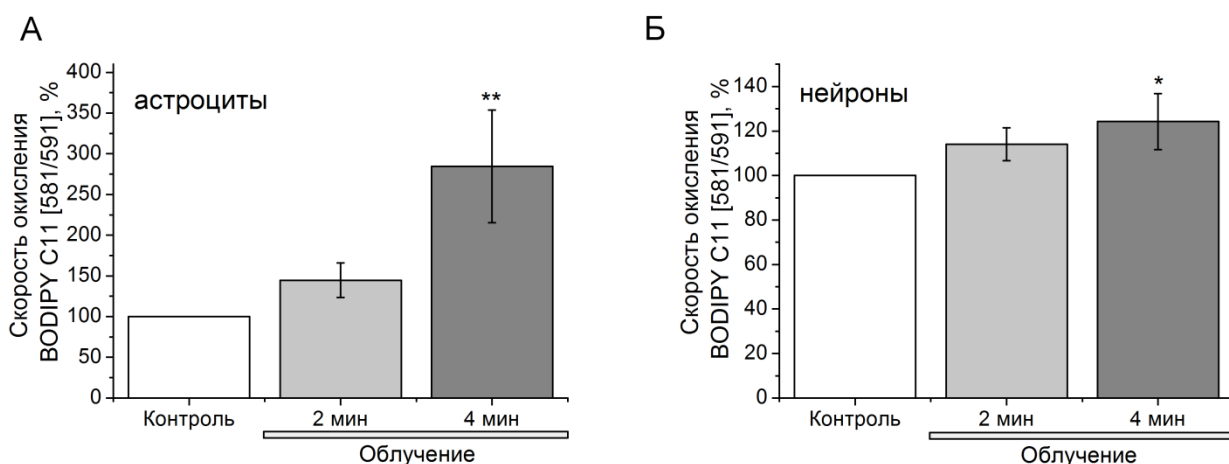


Рис. 3. Изменение скорости перекисного окисления липидов при ФД воздействии PXC 400 нМ (облучение в течение 2 и 4 мин) на астроциты (А) и нейроны (Б) в первичной сокультуре мозга крысы, полученные по измерению отношения интенсивностей флуоресценции окисленной и восстановленной форм BODIPY C11 [581/591].

На графиках за 100% взята скорость перекисного окисления липидов. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка (однофакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями). * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$.

Так как генерация супероксид-аниона при ФД воздействии выше в нейронах, то возможно наблюдаемые изменения уровня GSH и скорости перекисного окисления липидов в нейронах и астроцитах могут быть связаны с лучшим функционированием системы антиоксидантной защиты в нейронах.

2. Изменения в митохондриальном метаболизме при фотодинамическом воздействии радахлорина

Для того, чтобы предотвратить окислительное повреждение, в клетке запускаются защитные механизмы, которые потребляют энергию. Мы изучили изменение биоэнергетического статуса клеток при ФД воздействии РХ по изменению редокс состояния никотинамидадениндинуклеотида НАД⁺/НАДН. Образование АТФ в митохондриях функционально связано с переносом электронов по цепи электронного транспорта (ЦЭТ) и окислительным фосфорилированием. В цикле Кребса образуется НАДН, который передает электроны комплексу I, обеспечивая функционирование дыхательной цепи. Измерение аутофлуоресценции НАД(Ф)Н позволяет прижизненно оценить активность митохондрий по процессам восстановления НАДН в цикле трикарбоновых кислот и окисления НАДН в комплексе I [Bartolomé, Abramov, 2015]. Поэтому для оценки функционального состояния митохондрий при воздействии радахлорина (200 нМ) в темновых условиях и при облучении в данной работе исследовалась аутофлуоресценция НАД(Ф)Н.

Для того, чтобы отделить аутофлуоресценцию митохондриального НАДН от флуоресценции цитозольного НАДН и НАДФН, сначала перенос электронов по ЦЭТ максимизировался с помощью разобщителя окислительного фосфорилирования FCCP (1 мкМ), а затем блокировался при ингибировании ЦЭТ с помощью NaCN (1 мМ). Эти воздействия не влияют на редокс состояние цитозольного НАД⁺/НАДН и НАДФ⁺/НАДФН. Редокс состояние митохондриального НАД⁺/НАДН, которое определяется в процентах от разности между уровнями аутофлуоресценции НАД(Ф)Н при максимизации и ингибировании переноса электронов, отражает баланс между активностью ЦЭТ

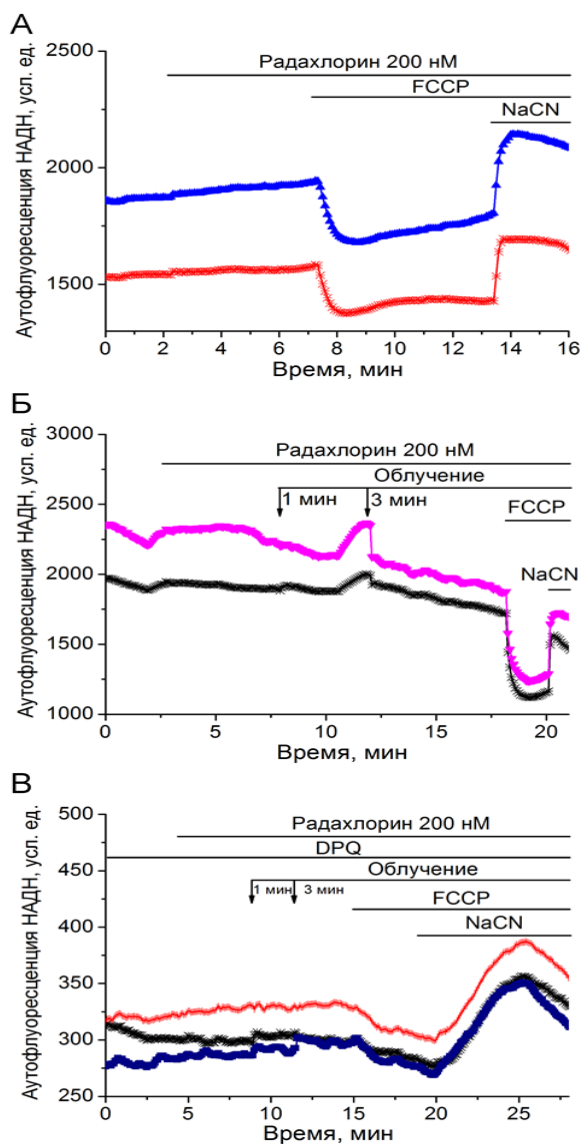


Рис. 4. Изменение аутофлуоресценции НАД(Ф)Н при воздействии РХ (200 нМ) на клетки первичной сокультуры нейронов и астроцитов коры мозга крысы.

А, РХ достоверно не влияет на аутофлуоресценцию НАД(Ф)Н в темновых условиях. Б, ФД воздействие РХ снижает аутофлуоресценцию НАД(Ф)Н и уменьшает митохондриальное депо НАДН по сравнению с влиянием РХ в темновых условиях. В, Ингибитор PARP, DPQ (20 мкМ), ингибирует уменьшение аутофлуоресценции НАД(Ф)Н при ФД воздействии РХ. На графиках представлены репрезентативные кривые, отражающие изменения в отдельных клетках. Вдоль осей абсцисс отложено время регистрации интенсивности флуоресценции зонда в программе Andor IQ, во время облучения регистрация прерывалась во избежание засветки камеры.

и скоростью восстановления НАД⁺ в цикле Кребса. В темноте в присутствии РХ (250 нМ) наблюдалась тенденция к увеличению аутофлуоресценции НАД(Ф)Н, что может указывать на ингибирование переноса электронов в ЦЭТ и клеточного дыхания (n = 51, Рис. 4). При ФД воздействии радахлорина аутофлуоресценцию НАД(Ф)Н было трудно измерять вследствие частого открепления клеток от предметного стекла при добавлении FCCP и NaCN. ФД воздействие РХ уменьшало аутофлуоресценцию НАД(Ф)Н и вело к истощению митохондриального НАДН депо (n = 42, Рис. 4Б). Данный эффект блокировался при добавлении ингибитора PARP, DPQ (20 мкМ), что свидетельствует об активации фермента PARP при ФД воздействии РХ (n = 9, Рис. 4В).

Таким образом, ФД воздействие изменяет митохондриальный метаболизм.

Одним из важных показателей митохондриального метаболизма является митохондриальный мембранный потенциал ($\Delta\Psi_m$). В связи с этим, в работе исследовалось влияние РХ в темновых условиях и при облучении на митохондриальный потенциал с помощью флуоресцентного зонда родамин 123. В темновых условиях РХ приводил к гиперполяризации митохондриальной мембраны ($n = 217$, Рис. 5А). Полученный результат и тенденция к увеличению уровня НАД(Ф)Н в клетках при воздействии РХ в темноте говорят о том, что ФС сам по себе замедляет дыхание и ингибирует окислительное фосфорилирование. Облучение клеток в течение 1 мин и 3 мин вело к деполяризации митохондрий ($n = 133$, Рис. 5А). Данный эффект не блокировался при добавлении CsA и, следовательно, не связан с открытием высокопроницаемой митохондриальной поры ($n = 8$, Рис. 5Б, Г), но снижался при добавлении ингибитора PARP, DPQ (20 мкМ) ($n = 16$, Рис. 5В, Г), что согласуется с данными об изменении аутофлуоресценции НАД(Ф)Н при фотоиндуцированном окислительном стрессе. Таким образом, по-видимому, ФД воздействие РХ активирует фермент PARP, потребляющий НАД⁺, что ведёт к снижению митохондриального НАДН депо и, как следствие, способствует ингибированию дыхания и митохондриальной деполяризации.

3. Участие факторов транскрипции NF-κB, AP-1 и HIF-1 в гибели нейронов и глиальных клеток при ФД воздействии

Развитие окислительного стресса в нейронах и глиальных клетках ведёт к гибели клеток путём апоптоза и некроза. Гибель клеток при этом модулируется различными сигнальными путями. Известно, что при окислительном стрессе активируются факторы транскрипции NF-κB, AP-1 и HIF-1, которые регулируют экспрессию генов белков, участвующих в регуляции выживаемости клетки при внешних воздействиях [Oleinick, Evans, 1998; Broekgaarden et al., 2015; Qutub, Popel, 2008; Morgan, Liu, 2011]. В литературе существует дискуссия о роли

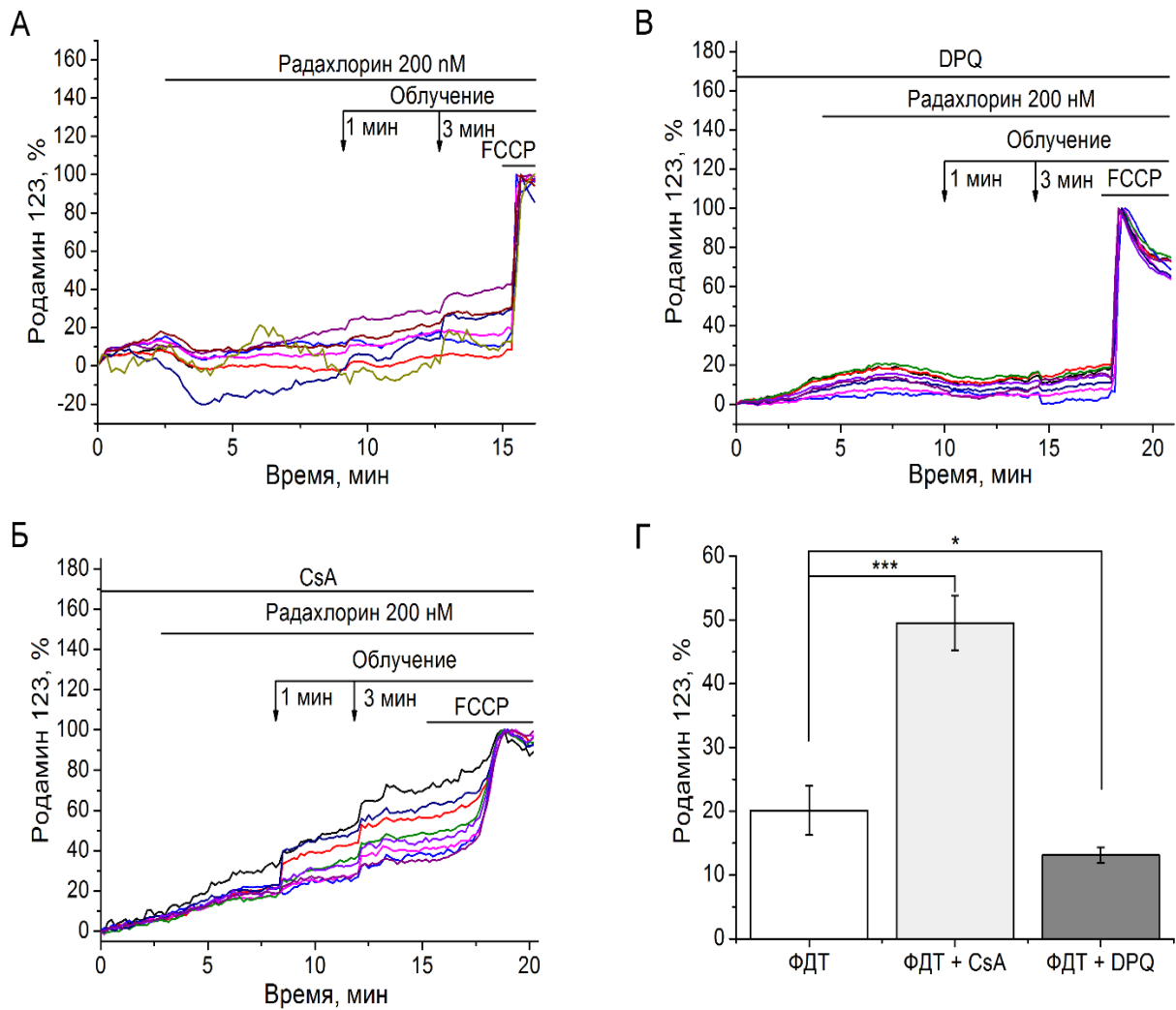


Рис. 5. ФД воздействие РХ 200 нМ (в темновых условиях и при облучении в течение 1 и 3 мин) на клетки в первичной сокультуре нейронов и астроцитов коры мозга крысы снижает митохондриальный мембранный потенциал ($\Delta\Psi_m$), измеренный по интенсивности флуоресценции родамина 123.

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

фактора транскрипции NF-κB в окислительном стрессе, существует мнение, что он может активироваться под действием АФК [Morgan, Liu, 2011]. В нашей работе показано, что NF-κB участвует в гибели нейронов и глиальных клеток при ФДТ (таблица).

Таблица. Участие факторов транскрипции в фотоиндуцированной гибели нейронов и глиальных клеток механорецептора речного рака. Стрелки соответствуют статистически значимому ($p < 0,05$) уменьшению или увеличению, тире – отсутствие изменений.

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

В присутствии бетулиновой кислоты, активатора NF-κB, ФД воздействие повышало фотодуцированный некроз механорецептора речного рака. Ингибиторы NF-κB, партенолид и CAPE, напротив, уменьшали некроз нейронов (таблица). В глиальных клетках активатор NF-κB, бетулиновая кислота, снижал фотодуцированный некроз, а ингибитор, партенолид, соответственно, повышал уровень некроза (таблица). О проапоптотическом действии NF-κB в глиальных клетках при ФД свидетельствует увеличение фотодуцированного апоптоза глии при активации NF-κB бетулиновой кислотой и уменьшение апоптоза при добавлении ингибитора NF-κB, CAPE (таблица). Таким образом, наши данные указывают на то, что фактор транскрипции NF-κB способствует некрозу нейронов и апоптозу глиальных клеток, но обладает при этом антинекротической активностью в глиальных клетках (таблица). Из этого можно сделать вывод, что сигнальные пути,

регулирующие выживаемость нейронов и глиальных клеток рака при ФД воздействии, различаются.

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

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

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

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

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

На основе литературных данных и полученных результатов построена концептуальная схема, представленная на Рис. 6.

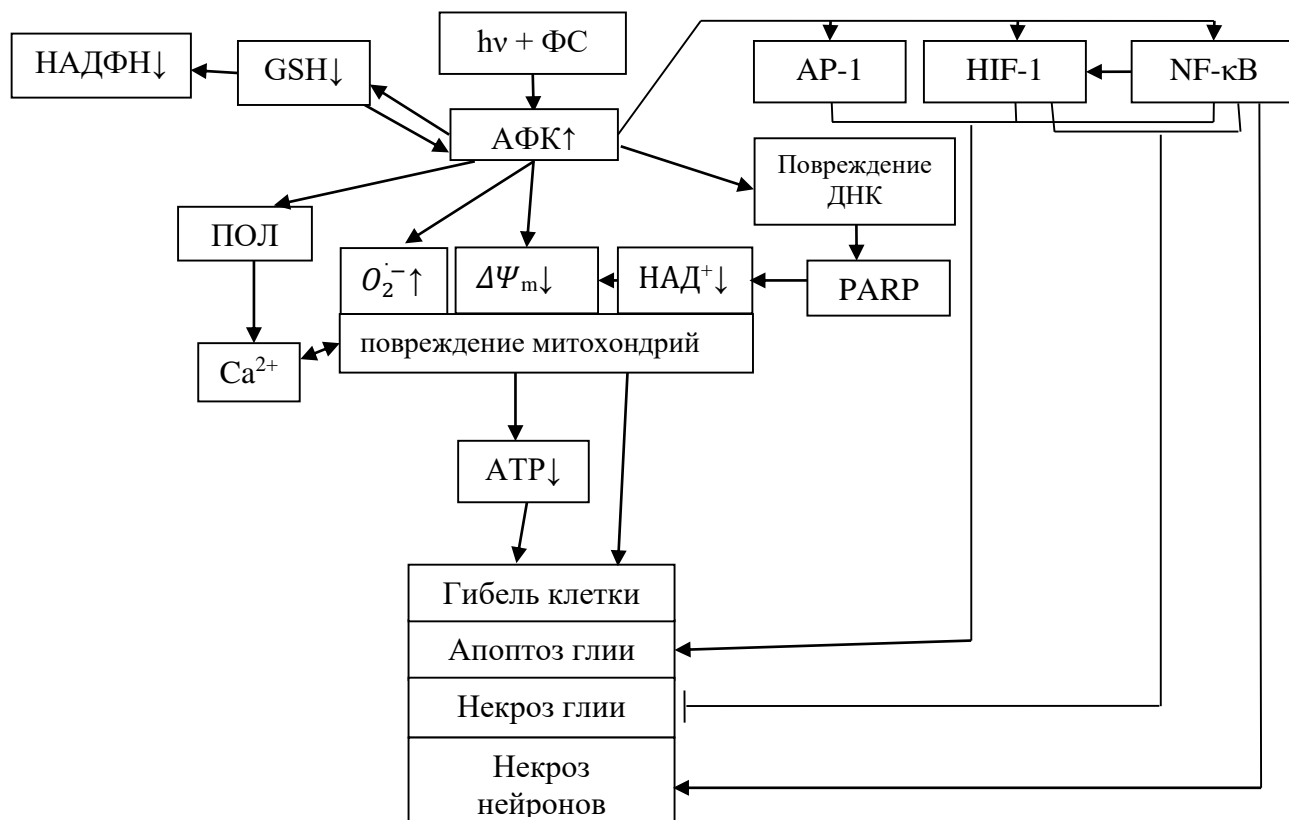


Рис. 6. Изменения митохондриального метаболизма при ФД воздействии и роль факторов транскрипции NF-κB, AP-1 и HIF-1 в фотоиндуцированной гибели нейронов и глиальных клеток.

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

ВЫВОДЫ

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

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

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

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

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

Список основных работ, опубликованных по теме диссертации

в журналах, рекомендованных ВАК РФ

1. **Бережная Е.В.** Исследование изменений митохондриального метаболизма в нейронах и астроцитах при фотоиндуцированном окислительном стрессе / **Е.В. Бережная**, М.А. Негинская // Acta Naturae. Спецвыпуск: Научные труды V Съезда физиологов СНГ, V Съезда биохимиков России, Конференции ADFLIM / под ред. А.И. Григорьева, Ю.В. Наточина, Р.И. Сепиашвили, А.Г. Габибова, В.Т. Иванова, А.П. Савицкого – 2016. – Т. 2. – С. 182-183.

2. Негинская М.А. Кальциевая сигнализация в нейронах и астроцитах при фотоиндуцируемом окислительном стрессе / М.А. Негинская, **Е.В. Бережная** // Acta Naturae. Спецвыпуск: Научные труды V Съезда физиологов СНГ, V Съезда биохимиков России, Конференции ADFLIM / под ред. А.И. Григорьева, Ю.В. Наточина, Р.И. Сепиашвили, А.Г. Габибова, В.Т. Иванова, А.П. Савицкого – 2016. – Т. 2. – С. 181.

3. Uzdensky A. Protection of the crayfish mechanoreceptor neuron and glial cells from photooxidative injury by modulators of diverse signal transduction pathways / A. Uzdensky, **E. Berezhnaya**, A. Khaitin, V. Kovaleva, M. Komandirov, M. Neginskaya, M. Rudkovskii, S. Sharifulina // Molecular Neurobiology. – 2015. – V. 52, N. 2. - P. 811–825.

4. **Berezhnaya E.** On involvement of transcription factors nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, activator protein-1 and signal transducer and activator of transcription-3 in photodynamic therapy-induced death of crayfish neurons and satellite glial cells / **E. Berezhnaya**, M. Neginskaya, V. Kovaleva, S. Sharifulina, I. Ischenko, M. Komandirov, M. Rudkovskii, A. Uzdensky // Journal of Biomedical Optics. – 2015. – V. 20, N. 7. – P. 075004-1–075004-9.

5. Uzdensky A.B. Photodynamic therapy: a review of applications in neurooncology and neuropathology / A.B. Uzdensky, **Е. Berezhnaya**, V. Kovaleva, M. Neginskaya, M. Rudkovskii, S. Sharifulina // Journal of Biomedical Optics. - 2015. – V. 20, N. 6. – P. 061108-1–061108-7.
6. Узденский А.Б. Реакции нейронов и глиальных клеток рака на фотодинамическое воздействие: факторы транскрипции и эпигенетическая регуляция / А.Б. Узденский, **Е.В. Бережная**, В. Д. Ковалева, М.А. Негинская, М.В. Рудковский, С.А. Шарифулина // Биологические мембраны. – 2015. – Т. 32, N. 5–6. – С. 437–445.
7. **Berezhnaya E.** Involvement of transcription factors NF- κ B, AP-1 and STAT-3 in death of crayfish glial and neuronal cells induced by photodynamic impact / **Е. Berezhnaya**, M. Neginskaya, S. Sharifulina, V. Kovaleva, A. Uzdensky // Glia: XII European Meeting on Glial Cells in Health and Disease. Bilbao, July 15–18, 2015. – 2015 – V. 63, N. S1. – P. E109–E110.
8. **Berezhnaya E.V.** The involvement of NF- κ B in PDT-induced death of crayfish glial and nerve cells / **Е.В. Berezhnaya**, M.A. Neginskaya, V.D. Kovaleva, M.V. Rudkovskii, A.B. Uzdensky // Proc. SPIE. – 2014. – V. 9448. – P. 94480N-1–94480M-6.
9. Ковалева В.Д. Участие межклеточных сигнальных процессов в реакциях нервных и глиальных клеток на фотоокислительный стресс / В.Д. Ковалева, **Е.В. Бережная**, М.А. Негинская, М.В. Рудковский, А.Б. Узденский // Валеология. – 2013. – N.1. – С. 21–26.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

10. Neginskaya M. Photodynamic effect of radachlorin triggers phospholipase C activity in primary neurons [Электронный ресурс] / М. Neginskaya, **Е. Berezhnaya**, A.B. Uzdensky // Тезисы докладов. Saratov Fall Meeting SFM'16 (Саратов). – 2016. – Режим доступа: <http://sfm.eventry.org/report/2125>.
11. **Berezhnaya E.** Photo-Induced Oxidative Stress Changes Mitochondrial Metabolism in Neurons and Astrocytes / **Е. Berezhnaya**, M. Neginskaya, A.B. Uzdensky, A.Y. Abramov // Proceedings of the 13th ICNA conference 2016, Bilbao, Spain. – 2016. – P. 43
12. Neginskaya M. Photo-Induced Oxidative Stress Activates Calcium Signal in Neurons / М. Neginskaya, **Е. Berezhnaya**, A.B. Uzdensky, A.Y. Abramov // Proceedings of the 13th ICNA conference 2016, Bilbao, Spain. – 2016. – P. 46.
13. **Berezhnaya E.** Photodynamic Treatment with Radachlorin Alters Mitochondrial Metabolism in Neurons and Astrocytes [Электронный ресурс] / **Е. Berezhnaya**, M. Neginskaya // Proceedings of the 10th FENS Forum of Neuroscience 2016, Copenhagen, Denmark. – 2016. – Режим доступа: <https://ep70.eventpilot.us/web/planner.php?id=FENS16>
14. Neginskaya M. Photodynamic Treatment Induces Calcium Signal in Neurons and Astrocytes [Электронный ресурс] / М. Neginskaya, **Е. Berezhnaya** // Proceedings

- of the 10th FENS Forum of Neuroscience 2016, Copenhagen, Denmark. – 2016. – Режим доступа: <https://ep70.eventpilot.us/web/planner.php?id=FENS16>
15. **Berezhnaya E.** Studying Photo-Induced Changes in Mitochondrial Metabolism in Neurons and Astrocytes by Live-Cell Imaging / **E. Berezhnaya**, M. Neginskaya // *Imaging the Brain. Abstract Book*, Warsaw, Poland. – 2016. – P. 39.
16. **Бережная Е.В.** Исследование изменений митохондриального метаболизма в нейронах и астроцитах при фотодинамическом воздействии радахлорина / **Е.В. Бережная**, М.А. Негинская // *Сборник тезисов. 20-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «БИОЛОГИЯ - НАУКА XXI ВЕКА»*, Пушкино. – 2016. – С. 255.
17. Негинская М.А. Исследование роли кальциевой сигнализации в ответах нейронов и астроцитов на фотодинамическое воздействие радахлорина / М.А. Негинская, **Е.В. Бережная** // *Сборник тезисов. 20-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «БИОЛОГИЯ - НАУКА XXI ВЕКА»*, Пушкино. – 2016. – С. 284.
18. **Бережная Е.В.** Исследование роли NIF-1 и АМРК в фотоиндуцированном повреждении нейронов и глиальных клеток / **Е.В. Бережная**, М.А. Негинская // *Сборник тезисов международной конференции молодых учёных «Экспериментальная и теоретическая биофизика»*, Пушкино. – 2015. – С. 71.
19. **Бережная Е.В.** Исследование роли NIF-1 в ФД-индуцированной гибели нейронов и глиальных клеток / **Е.В. Бережная**, М.А. Негинская, А.Б. Узденский // *Сборник конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация»* / под ред.: В.П. Зинченко, А.В. Бережнова; Пушкино. – 2015. – Т.2. – С. 556-560.
20. Uzdensky A.V. Protection of the crayfish mechanoreceptor neuron and surrounding glial cells from photooxidative injury by modulators of diverse signal transduction pathways / A.V. Uzdensky, **E.V. Berezhnaya**, V.D. Kovaleva, M.A. Komandirov, M.A. Neginskaya, A.M. Khaitin, A.V. Rudkovskii, S.A. Sharifulina // *Book of abstracts of the twelfth International Conference on Neuroprotective Agents*, Charlottesville, Virginia, USA. – 2014. – P. 40.
21. **Berezhnaya E.V.** The role of transcription factors NF-κB and AP-1 in photodynamic damage of neurons and glial cells [Электронный ресурс] / **E.V. Berezhnaya**, М.А. Neginskaya, V.D. Kovaleva, M.V. Rudkovskii, A.V. Uzdensky // *Тезисы докладов. Saratov Fall Meeting SFM'14 (Саратов)*. – 2014. – Режим доступа: <http://sfm.eventry.org/report/1009>
22. **Berezhnaya E.V.** The Role of Transcription Factors NF-κB and AP-1 in Photodynamic Damage of Neurons and Glial Cells / **E.V. Berezhnaya**, М.А. Neginskaya, V.D. Kovaleva, M.V. Rudkovskii, A.V. Uzdeskii // *Proceedings of the International Scientific School 'Frontiers in Modern Neuroscience' and International Symposium 'Glia as a target for the treatment of neurodegenerative diseases'*, June 15-18, Nizhny Novgorod. – 2014. – P. 6–7.
23. **Бережная Е.В.** Роль сигнальных процессов в фотодинамическом повреждении нейронов и глиии / **Е.В. Бережная**, М.А. Негинская, С.А. Шарифулина, В.Д. Ковалева, А.М. Хайтин, И.А. Ищенко, М.А. Командиров,

М.В. Рудковский, А.Б. Узденский // XXII Съезд Физиологического общества им. И. П. Павлова. Тезисы докладов. Волгоград. – 2013 – С. 59–60.

24. **Бережная Е.В.** Участие факторов транскрипции NF-κB, AP-1 и STAT-3 в реакциях нейронов и глиальных клеток рака на фотодинамическое воздействие / **Е.В. Бережная**, М.А. Негинская, М.В. Рудковский, А.Б. Узденский // Современные проблемы биофизики сложных систем. Информационно-образовательные процессы: Международная научно-методическая конференция, 24-27 июня 2013 г., Воронеж: материалы докладов. – 2013. – С. 103.

25. **Бережная Е.В.**, Негинская М.А., Ковалева В.Д., Командиров М.А., Рудковский М.В., Узденский А.Б. Участие факторов транскрипции NF-κB и AP-1 в реакциях нейронов и глиальных клеток на фотодинамическое воздействие / **Е.В. Бережная**, М.А. Негинская, В.Д. Ковалева, М.А. Командиров, М.В. Рудковский, А.Б. Узденский // В: Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. / под ред.: В.П. Зинченко, А.В. Бережнова; Пущино. – 2013. – Т.2. – С. 509–512.

26. Негинская М.А. Участие фактора транскрипции NF-κB в реакциях нейронов и глиальных клеток на фотодинамическое воздействие / М.А. Негинская, **Е.В. Бережная**, В.Д. Ковалева, М.А. Командиров, М.В. Рудковский, А.Б. Узденский // Материалы XVI Международной конференции по нейрокибернетике. Ростов-на-Дону. – 2012. – Т. 1. – С. 36–39.

27. Негинская М.А. Роль фактора транскрипции NF-κB в фотодинамическом повреждении нейронов и глиальных клеток / М.А. Негинская, **Е.В. Бережная**, В.Д. Ковалева // Материалы Всероссийской молодежной конференции "Актуальные вопросы биомедицинской инженерии". – 2012. – С. 77–78.

28. Негинская М.А. Исследование участия факторов транскрипции в фотодинамическом повреждении нейронов и глиальных клеток / М.А. Негинская, **Е.В. Бережная**, В.Д. Ковалева // Материалы научно-практической конференции "Миссия молодежи в науке", Естеств и техн. Науки. Ростов-на-Дону, изд. ЮФУ. – 2012. – С. 149–151.

Список сокращений

ФДТ – фотодинамическая терапия
ФД – фотодинамический
ФС – фотосенсибилизатор
АФК – активные формы кислорода
ПОЛ – перекисное окисление липидов
РХ – радахлорин
GSH – восстановленный глутатион
CsA – циклоспорин А