

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«ЮЖНЫЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
АКАДЕМИЯ БИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ
ИМ. Д. И. ИВАНОВСКОГО

На правах рукописи



Ковалева Вера Дмитриевна

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ NO-ЗАВИСИМЫХ СИГНАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ
В УСТОЙЧИВОСТИ НЕЙРОНОВ И ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК К
ФОТОДИНАМИЧЕСКОМУ ПОВРЕЖДЕНИЮ

Специальность: 03.01.02 – Биофизика

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

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

Ростов-на-Дону – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 NO-зависимые сигнальные процессы в нейронах и глиальных клетках	11
1.2 NO-синтазы, их локализация в нейронах и глиальных клетках.....	17
1.3 Виды клеточной смерти	23
1.4 ФД индуцированная гибель клеток.....	24
1.5 Роль NO в ФД индуцированном повреждении клеток.....	30
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	34
2.1 Объект исследования	34
2.2 Исследование показателей выживаемости нейронов и глиальных клеток при ФД-воздействии	36
2.2.1 Регистрация биоэлектрической активности механорецепторного нейрона	36
2.2.2 Фотодинамическое воздействие	37
2.2.3 Ингибиторно-активаторный анализ	41
2.2.4 Флуоресцентно-микроскопическое определение некроза и апоптоза ...	43
2.3 Гистохимическое исследование локализации NADPH диафоразы и ее активности при ФД-воздействии.....	45
2.4 Иммунофлуоресцентное исследование локализации нейрональной и индуцибельной NO-синтазы	46
2.5 Исследование флуоресценции NO-специфического зонда DAF-2DA в рецепторе растяжения рака	47
2.6 Статистическая обработка результатов	49
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	50
3.1 Влияние NO на нейроны в темновых условиях и при ФД-воздействии	50

3.1.1 В темновых условиях NO не влияет на выживаемость нейронов	50
3.1.2 При ФД-воздействии NO, синтезированный iNOS, участвует в изменении продолжительности импульсной активности нейронов.....	53
3.1.3 NO, синтезированный nNOS, не влияет на ФД индуцированные изменения продолжительности импульсной активности нейронов	53
3.1.4 При ФД-воздействии растворимая гуанилатциклаза не влияет на продолжительность импульсной активности нейронов посредством сигнального пути NO/sGC/cGMP/PKG.....	55
3.1.5 Экзогенная генерация NO не влияет на ФД индуцированные изменения продолжительности импульсной активности нейронов	55
3.1.6 Экзогенный NO уменьшает ФД индуцированный некроз нейронов без участия NO-синтаз	57
3.1.7 Сигнальный путь NO/sGC/cGMP/PKG участвует в ФД индуцированном некрозе нейронов	60
3.2 Влияние NO-зависимых сигнальных механизмов на процессы повреждения глиальных клеток в темновых условиях и при ФД-воздействии.....	60
3.2.1 В темновых условиях NO не участвует в выживаемости глиальных клеток	60
3.2.2 Экзогенная генерация NO уменьшает ФД индуцированный некроз глиальных клеток	63
3.2.3 При ФД-воздействии растворимая гуанилатциклаза участвует в некрозе глиальных клеток.....	63
3.2.4 nNOS участвует в ФД индуцированном некрозе глиальных клеток	65
3.2.5 iNOS не участвует в ФД индуцированном некрозе глиальных клеток ..	65
3.2.6 Экзогенный NO увеличивает уровень ФД индуцированного апоптоза глиальных клеток	67
3.2.7 iNOS и nNOS участвуют в ФД индуцированном апоптозе глиальных клеток.....	67
3.2.8 При ФД-воздействии NO увеличивает уровень апоптоза глиальных посредством сигнального пути NO/sGC/cGMP/PKG	70

3.3 Исследование локализации NO-синтазы и динамики её активности при ФД-воздействии	72
3.3.1 Гистохимическое исследование локализации NADPH-диафоразы и динамики активности этого фермента при ФД-воздействии	72
3.3.2 Иммунофлуоресцентное исследование локализации нейрональной NO-синтазы в рецепторе растяжения рака	76
3.3.3 Иммунофлуоресцентное исследование локализации индуцибельной NO-синтазы в рецепторе растяжения рака	79
3.4 Продукция NO в рецепторе растяжения рака	81
3.4.1 Распределение NO в рецепторе растяжения рака в темновых условиях	81
3.4.2 Изменение продукции NO в рецепторе растяжения рака в процессе ФД-воздействия.....	83
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	87
4.1 Локализация NOS и динамика ее активности при ФД-воздействии	87
4.2 Продукция NO в рецепторе растяжения рака при ФД-воздействии.....	88
4.3 Локализация nNOS в рецепторе растяжения рака	91
4.4 Локализация iNOS в рецепторе растяжения рака.....	92
4.5 Роль NO в смерти клеток в темноте	93
4.6 Роль NO в ФД индуцированном повреждении нейронов и ГК.....	95
4.7 NO-синтазы в ФД индуцированном повреждении нейронов и ГК.....	99
4.8 Участие сигнального пути NO/sGC/cGMP/PKG в процессах ФД индуцированного повреждения	100
4.9 Роль NO в нейроглиальных взаимодействиях	101
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	103
ПЕРСПЕКТИВЫ	106
ВЫВОДЫ	107
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	108

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода

ГК – глиальные клетки

ДНКЖ – динитрозильные комплексы железа

МРН – механорецепторный нейрон

ПД – потенциал действия

ПОЛ – перекисное окисление липидов

РРР – рецептор растяжения рака

ФД – фотодинамический

ФДТ – фотодинамическая терапия

ФС – фотосенсибилизатор

ALA – аминолевулиновая кислота

cGMP – циклический гуанозинмонофосфат

iNOS – индуцибельная NO-синтаза

nNOS – нейрональная NO-синтаза

NOS – NO-синтаза

PI – иодид пропидия

PBS – фосфатный буфер

PFA – параформальдегид

PKG – протеинкиназа G

RSNO – S-нитрозотиолы

sGC – растворимая гуанилатциклаза

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Фотодинамическая терапия (ФДТ) – метод селективного разрушения клеток опухолей, широко используемый в онкологии, в том числе при лечении рака мозга. Фотодинамический (ФД) эффект заключается в фотовозбуждении молекул фотосенсибилизатора под действием света в присутствии кислорода и образовании высокотоксичного синглетного кислорода, вызывающего клеточную гибель. Однако при ФДТ в мозге погибают не только злокачественные клетки, но и нормальные нейроны и глиальные клетки (ГК). Действие ФДТ на опухолевые клетки детально исследовано [Almeida et al., 2004, Brown et al., 2004; Castano et al., 2005; Quirk et al., 2015], а механизмы его действия на здоровую нервную ткань изучены недостаточно.

Процессы выживаемости нервной ткани под действием физико-химических факторов контролируется сигнальными путями. Важнейшим сигнальным мессенджером является оксид азота (NO), вовлеченный в реализацию нейротрансмиссии, нейродегенерации и клеточных реакций на окислительный стресс [Robb et al., 1999; Garthwaite, 2008; Russwurm et al., 2013]. Одна из основных функций NO – вазодилатация (расслабление гладкой мускулатуры сосудов). Исследовать генерацию NO и его распределение в клетках весьма сложно, поскольку NO – короткоживущая молекула (время жизни 5-10 с). Поэтому исследователи зачастую фокусируют свое внимание на NO-синтазе (NOS), ферменте, синтезирующем NO из L-аргинина. В настоящее время многие исследователи изучают пути сигнальной трансдукции, контролируемые NO. Однако имеющиеся данные по действию NO на нервную ткань и данные о его роли в ФД индуцированном повреждении нейронов и глиии противоречивы. Генерация NO при ФДТ была выявлена в различных культурах клеток [Gupta et al., 1998; Coutier et al., 1999; Ali and Olivo, 2003]. Несмотря на то, что участие NO в процессах повреждения клеток при ФДТ активно исследуется в мировом

научном сообществе [Rapozzi et al., 2015; Girotti, 2015], роль NO в устойчивости нейронов и клеток глии к ФД индуцированному повреждению однозначно не установлена. Также не определена динамика генерации NO при ФД-воздействии и не определены изоформы NO-синтаз, играющие решающую роль в гибели клеток. Углубленное изучение NO-зависимых сигнальных механизмов при фотодинамическом воздействии – важная биофизическая проблема.

Проблемы подобного характера удобно изучать на простых модельных объектах, в которых нервные клетки и окружающая их глиа точно идентифицированы. Вариантом такого объекта является изолированный рецептор растяжения рака, состоящий из двух механорецепторных нейронов (МРН), окруженных оболочкой глиальных клеток.

Цель работы: Исследовать роль NO и различных изоформ NO-синтаз в устойчивости нейронов и глии рецептора растяжения рака к фотодинамическому повреждению, а также оценить локализацию изоформ NO-синтазы в рецепторе растяжения рака и исследовать динамику активации NO-синтазы и генерации NO при фотодинамическом воздействии.

Задачи исследования:

- Изучить динамику активации NO-синтазы и генерации NO при фотодинамическом воздействии на рецептор растяжения речного рака.
- Исследовать внутриклеточное распределение изоформ NO-синтазы в нейронах и глиальных клетках рецептора растяжения речного рака.
- Изучить влияние NO на нейронную активность и смерть нейронов и глиальных клеток рецептора растяжения речного рака в темновых условиях.
- Изучить роль NO в инактивации и гибели нейронов и глии, вызванных фотодинамическим воздействием.
- Установить роль нейрональной и индуцибельной NO-синтаз в процессах повреждения нейронов и глиальных клеток при фотодинамическом воздействии.

– Определить, участвует ли сигнальный путь NO/sGC/cGMP/PKG в процессах ФД индуцированного повреждения нейронов и глиальных клеток

Научная новизна результатов исследования:

- Впервые показано, что динамика ФД индуцированной генерации NO и активации NO-синтазы в рецепторе растяжения рака состоит из двух фаз: резкой активации и торможения.
- Установлена локализация нейрональной NO-синтазы и NADPH-диафоразы в околядерной области механорецепторного нейрона, а также в меньшем количестве в глиальной оболочке аксона и рецепторных мышцах. Нейрональная NO-синтаза впервые обнаружена в ядрышках нейронов.
- Установлена локализация индуцибельной NO-синтазы в цитозоле нейронов, дендритов и аксонов рецептора растяжения рака.
- Впервые продемонстрировано участие NO в процессах фотодинамического повреждения нейронов и глиальных клеток рецептора растяжения рака.
- Показано, что NO стимулирует ФД индуцированный апоптоз глиальных клеток рецептора растяжения рака и защищает их от некроза, вызванного ФД-воздействием.
- Установлено участие индуцибельной NO-синтазы в ФД индуцированном апоптозе глиальных клеток, а нейрональной NO-синтазы – в некрозе глиальных клеток рецептора растяжения рака.
- Впервые выявлено, что ФД индуцированный апоптоз глиальных клеток у ракообразных осуществляется посредством сигнального пути NO/sGC/cGMP/PKG, и sGC участвует в реализации ФД индуцированного некроза глии рецептора растяжения рака.

Научно-практическая значимость. В работе показана различная роль изоформ NO-синтаз в ФД индуцированном некрозе и апоптозе глиальных клеток. Эти результаты свидетельствуют о том, что воздействие на разные изоформы NO-синтаз при фотодинамической терапии представляет собой потенциальный способ модулирования типа клеточной смерти.

Данные о проапоптотическом действии NO на клетки глии и NO-опосредованной защите глии могут быть использованы для разработки методов селективного воздействия на глиальные клетки и защиты нормальных клеток при оптимизации методов фотодинамической терапии опухолей мозга.

Результаты работы получены в ходе работы над грантами РФФИ №12-04-32089, 15-04-05367, АВЦП МОН №1.1/6185 и 4.6142.2011, а также использованы в спецкурсе по фотомедицине и фотобиологии Южного Федерального университета.

Основные положения, выносимые на защиту:

При фотодинамическом воздействии динамика продукции NO состоит из двух фаз: резкой активации и последующей медленной инактивации. Динамика экспрессии NO-синтазы также носит двухфазный характер.

В рецепторе растяжения речного рака нейрональная NO-синтаза и NADPH-диафораза локализуются преимущественно в околоядерной области тел нейронов, обнаруживаются также в рецепторных мышцах и глиальной оболочке аксона. iNOS присутствует в цитозоле нейронов, дендритов и аксонов рецептора растяжения рака.

Экзогенный NO оказывает проапоптотическое действие на фотосенсибилизированные глиальные клетки рецептора растяжения рака.

Экзогенный NO защищает клетки глии рецептора растяжения рака от некроза индуцированного ФД-воздействием.

В апоптозе клеток глии, индуцированном ФД-воздействием, участвует индуцибельная NO-синтаза, тогда как в процесс некроза глиальных клеток при ФД-воздействии вовлечены нейрональная NO-синтаза и sGC.

При ФД-воздействии апоптоз клеток глии в рецепторе растяжения рака опосредуется сигнальным путем NO/sGC/cGMP/протеинкиназа G.

Апробация диссертационной работы. Материалы диссертационного исследования были представлены на конференциях: XVI Международная конференция по нейрокибернетике (Ростов-на-Дону, 2012), IV Съезд биофизиков России (Нижний Новгород, 2012), «Актуальные вопросы биомедицинской

инженерии» (Ростов-на-Дону, 2012), Международная научная школа «Neurogenetics. Unraveling behavior and brain mechanisms using modern technologies» (Звенигород, 2012), FENS Featured Regional Meeting (Prague, the Czech Republic, 2013), «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2013), «Современные проблемы биофизики сложных систем. Информационно-образовательные процессы» (Воронеж, 2013), Congress of Federation of European Biochemical Societies (St. Petersburg, 2013), 15th Congress of the European Society for Photobiology (Liege, Belgium, 2013), «Окислительный стресс и свободно-радикальные патологии» (Судак, Крым, Украина, 2013), XXII Съезд Физиологического общества им. И. П. Павлова (Волгоград, 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), «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2015), Saratov Fall Meeting SFM'15 (Саратов, 2015), V Съезд биофизиков России (Ростов-на-Дону, 2015), VI Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины» (Ростов-на-Дону, 2015), XII European Meeting on Glial Cells in Health and Disease (Bilbao, Spain, 2015).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 работ в журналах, рекомендованных ВАК, 4 статьи в сборниках и 19 тезисов докладов всероссийских и международных конференций.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 NO-зависимые сигнальные процессы в нейронах и глиальных клетках

Оксид азота (NO) – небольшая короткоживущая молекула с непарным электроном, превращающим ее в высоко реактивный радикал, способный проникать через биомембраны и легко взаимодействовать с другими молекулами. С химической точки зрения NO бесцветный газ, плохо растворимый в воде. В организме молекула оксида азота может существовать в разных электронных состояниях: нейтрально заряженного радикала (NO^{*}); восстановленного до нитроксил-аниона (NO⁻). У NO есть лишний электрон, обуславливающий его высокую (в три раза выше, чем у кислорода) химическую активность. При потере одного электрона он трансформируется в ион нитрозония (NO⁺) [Степанов и др., 2004]. Разные формы NO имеет свои мишени в клетках и, соответственно, играют различные роли в сигнальных процессах.

NO – важный вторичный мессенджер, участвующий в регуляции систем как внутриклеточной, так и межклеточной сигнализации. Он присутствует как в центральной, так и в периферической нервной системе. NO синтезируется в нейронах некоторых отделов головного мозга [Черток и др., 2009], парасимпатических и симпатических волокнах [Keilhoff et al., 2002]. Несколько лет назад NO обнаружили в афферентных волокнах и рецепторных аппаратах сердца [Черток и Коцюба, 2010].

NO способен как связываться в относительно стабильные соединения и депонироваться в клетках, так и транспортироваться на большие расстояния, намного превышающие размеры клетки. В качестве депо NO в живых организмах могут выступать как S-нитрозотиолы (RSNO), так и динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ), открытые и идентифицированные в микроорганизмах и тканях

животных в начале 60-х годов А.Ф. Ваниным, и подробно описанные им в своей книге [Ванин, 2015]. ДНКЖ и RSNO как естественные доноры NO могут влиять на многие физиологические процессы, например, вызвать гипотензию, вазодилатацию, подавлять тромбоз, и в этой связи, могут быть рекомендованы как основа для создания лекарственных препаратов [Тимошин и др., 2007].

Известно, что в ЦНС оксид азота действует не как классические нейротрансмиттеры, а выступает в качестве ретроградного мессенджера. Он может проникать в соседние нейроны, пресинаптические нейроны и глиальные клетки. Таким образом, по эфферентным нитергическим нервам NO распространяется в органы дыхательной системы, мочеполовой системы, ЖКТ.

При высвобождении нейромедиатора из синапса и последующем входе ионов Ca^{2+} и Na^+ в постсинаптическую клетку NO-синтаза вырабатывает NO из L-аргинина. Затем NO диффундирует в синаптическую терминаль и окружающие астроциты (рис. 1). Главной мишенью оксида азота там является растворимая гуанилатциклаза (sGC), содержащая 4 гема (рецепторы для NO). Связывание с ними активирует растворимую гуанилатциклазу и усиливает образование циклического ГМФ [Moncada and Higgs, 1993; Реутов, 1995]. В клетках гладкой мускулатуры это циклическое соединение снижает концентрацию внутриклеточного Ca^{2+} , что приводит к расслаблению клетки и вазодилатации. Кроме того, cGMP в крови взаимодействует со специфическими рецепторами внутренних органов, вызывая разнообразные биологические эффекты.

Недавние исследования показали, что NO присутствует в афферентных структурах головного мозга, а особенности функциональных свойств этой молекулы доказывают возможность ее активного участия в локальных механизмах чувствительной иннервации церебральных сосудов [Черток и Коцюба, 2010]. Находясь в структуре клубочковых рецепторов сосудов, NO участвует в барорецепции, реагировании на изменения кровяного давления.

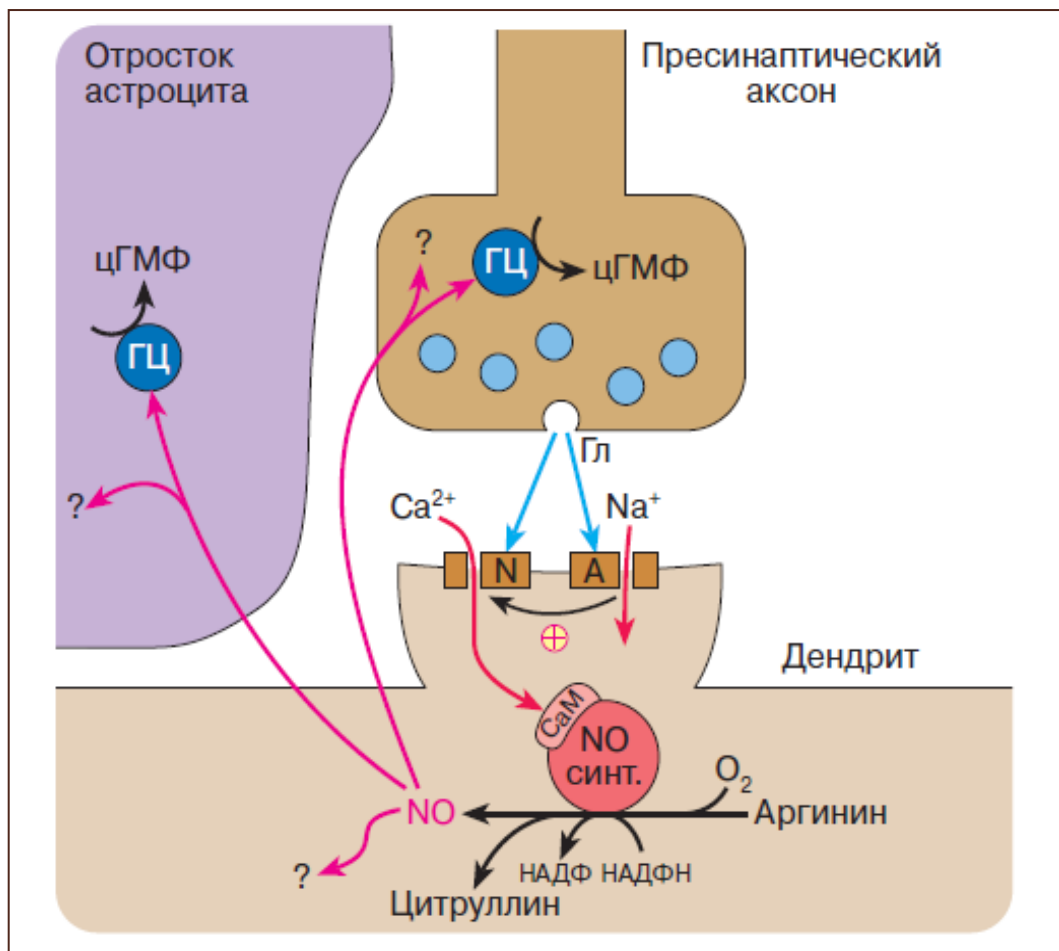


Рис. 1. Механизм индуцированной NO активации cGMP в нервных клетках [По А.А. Сосунову, 2000]

Этот газ сигнализирует о тоне и сократительной деятельности сосудов, обеспечивая нормальное функционирование нейронов головного мозга [Motavkin et al., 1990]. Предполагается, что механизмы участия NO в рецепции одинаковы в центральной и в периферической нервной системе [Toda and Okamura, 2003].

NO – один из ключевых медиаторов внутри- и межклеточного взаимодействия в нейроэндокринной системе. Продемонстрирована важная роль NO при стрессе. Некоторые исследователи даже выделяют оксид азота как самостоятельную «стресс-лимитирующую NO-систему». Как избыток, так и нехватка оксида азота способствуют развитию многих заболеваний.

В высоких концентрациях оксид азота оказывают прямое цитотоксическое действие. По мнению большинства исследователей, такое действие NO обусловлено, главным образом, его способностью вступать в реакции с супероксид-анионом, с последующим образованием пероксинитрита. При физиологическом pH пероксинитрит стабилен, однако при патологических состояниях очень быстро распадается, окисляя внутриклеточные мишени, оказывая тем самым цитотоксическое действие, индуцируя повреждения ДНК и мутации, ингибируя функцию ферментов и вызывая апоптоз или некроз [Степанов и др., 2004].

NO может индуцировать апоптоз посредством ряда сигнальных каскадов: через глутаматные NMDA рецепторы, посредством активации PARP, через MAPK каскад и сигнальный путь NO-cGMP-протеинкиназа G. Последний, в свою очередь, может реализовываться несколькими способами, включая Akt, фактор транскрипции CREB или гемоксигеназу-1(HO-1) [Calabrese et al., 2007]. Проапоптозное действие NO может быть связано с активацией транскрипционных факторов p53 и NF-κB [Lu et al., 2006; Bhomwick and Girotti, 2013].

В вопросе изучения механизмов апоптогенного эффекта оксида азота, рядом исследований показано, что NO может служить фактором, инициирующим запуск киназного каскада [Huwiler and Pfeilschifter, 1999] – основной

регуляторной системы, контролирующей экспрессию ряда генов, отвечающих за запуск апоптоза.

Механизм активации стресс-активируемых киназ (МАРКs) посредством NO может быть представлен следующим образом. Как известно, весь каскад представляет собой цепь последовательных реакций фосфорилирования нижестоящих киназ (МАРК, к которым относятся p38 МАРК и JNK) вышестоящими (например, Ask-1). В покое Ask-1 (киназа первого порядка) связана с белком тиоредоксином (Trx1). Нитрирование тиоредоксина по остатку тирозина (Tyr49) приводит к изменению конформации белка. Вследствие чего происходит диссоциация комплекса и, соответственно, активация Ask-1 [Tao et al., 2006; Zhang et al., 2007]. Интересно, что S-нитрозилирование Trx1 по остаткам цистеина (Cys-69, Cys-73), напротив, приводит к повышению его активности и, соответственно, блоку апоптоза [Tao et al., 2006]. Ферменты третьего порядка МАР-киназного каскада, способны к модификации ряда белков, препятствующих апоптозу. Так, например, p38 МАРК обуславливает транслокацию Вах к митохондриальной мембране, и последующее высвобождение цитохрома С [Ghatan et al., 2000; Van Laethem et al., 2004]. То же справедливо и по отношению к протеинкиназе JNK [Putchu et al., 2003; Kim et al., 2006].

Существенное значение в развитии запрограммированной клеточной гибели имеет S-нитрозилирование белков семейства IAP. Это семейство белков высокой консервативности, которые отвечают за блок активных сайтов каспаз, посредством их связывания через специфические BIR-домены.

Многие исследователи полагают, что NO может не только индуцировать апоптоз, но и защищать от него [Brune, 2003; Rapozzi et al., 2013]. Противоапоптозный эффект оксида азота сводится к подавлению активности каспаз, главным образом каспазы-3. Подавление происходит либо вследствие S-нитрозилирования активного центра непосредственно каспазы-3 [Zhou et al., 2005], либо в результате блока иницирующих каспаз [Rössig et al., 1999; Zhou et

al., 2005]. Так, например, нарушение функционирования Araf-1 вызывает блокирование апоптоза на уровне иницирующих каспаз [Zech et al., 2003].

Поскольку NO может участвовать в целом ряде патологических состояний нервной системы, в том числе ишемии, изучаются некоторые ингибиторы NO-синтазы, которые могут быть рекомендованы к использованию в качестве возможных нейропротекторов.

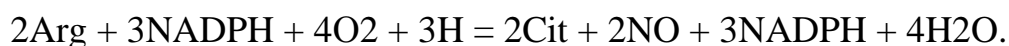
Таким образом, NO важен в защите нейронов, глиальных клеток и всего организма от внешних повреждающих воздействий, в том числе и от ФД-воздействия. Известно, что этот мессенджер регулирует процессы выживаемости нервных клеток. Следовательно, он может влиять на степень повреждения нейронов и клеток глии при ФДТ. В этой связи интересным является недавнее исследование, в котором показано, что NO может влиять не только на выживаемость отдельных клеток, но и целых организмов, в частности увеличивать продолжительность жизни *C. Elegans* [Gusarov et al, 2013].

Растворимая гуанилатциклаза считается наиболее чувствительным физиологическим рецептором NO. Связывание оксида азота с гемом в активном центре гуанилатциклазы запускает синтез вторичного мессенджера cGMP. Хотя изменение состояния гема под действием NO и его корреляция со стимулирующей гуанилатциклазной активностью хорошо изучены, точный механизм этого процесса не установлен, и требует дальнейших структурно-функциональных исследований.

Таким образом, оксид азота и связанные с ним сигнальные механизмы исследуются уже на протяжении длительного периода, и эти исследования достигли значительных успехов. Как известно еще в 1992 году NO назвали молекулой года, а в 1998 году Р. Фуршготт, Л. Игнарро и Ф. Мурад за исследование по выяснению механизмов, связанных с ролью NO в сердечно-сосудистой системе, получили Нобелевскую премию. Тем не менее, роль этого вторичного мессенджера в некоторых физиологических и патологических процессах, в том числе в повреждении клеток при ФД-воздействии, все еще однозначно не установлена.

1.2 NO-синтазы, их локализация в нейронах и глиальных клетках

В живых организмах за синтез NO из L-аргинина отвечают цитохром P-450-подобные гемпротеины – NO-синтазы (NOS). Эти ферменты присоединяют кислород к конечному атому азота в гуанидиновой группе L-аргинина:



NO-синтазам необходим восстановленный никотинамид-аденин-динуклеотид фосфат (НАДФ) и кислород в качестве со-субстратов для L-аргинина, а также флавин-аденин-динуклеотид (ФАД), флавин-моноклеотид (ФМН) и (6R-)5,6,7,8-тетрагидробиоптерин (BH₄) в качестве кофакторов. Все изоформы NO-синтаз содержат тиолатный комплекс цинка, однако цинк выполняет скорее структурную, чем каталитическую функцию [Hemmens et al., 2000]. Мономеры NO-синтазы способны передавать электроны НАДФа ФАДу и далее ФМН, и имеют возможность в ограниченном количестве превращать молекулярный кислород в супероксид анион (O^{2•-}) [Klatt et al. 1996; Kotsonis et al., 2000; Stuehr et al., 2001) (рис. 2). Мономеры NO-синтазы не способны связывать кофактор BH₄, субстрат L-аргинин, и, таким образом, не способны синтезировать NO.

В присутствии гема, субъединицы NO-синтазы могут образовывать функциональный гомодимер [Klatt et al. 1996]. Гем необходим для междоменной передачи электронов от флавинов гему противоположного мономера (рис. 3). Из-за различий в кальмодулин-связывающем домене, конститутивным формам NO-синтаз необходима повышенная концентрация Ca²⁺, тогда как индуцибельная изоформа фермента в виду высокой афинности к кальмодулину способна его связывать в отсутствии кальция.

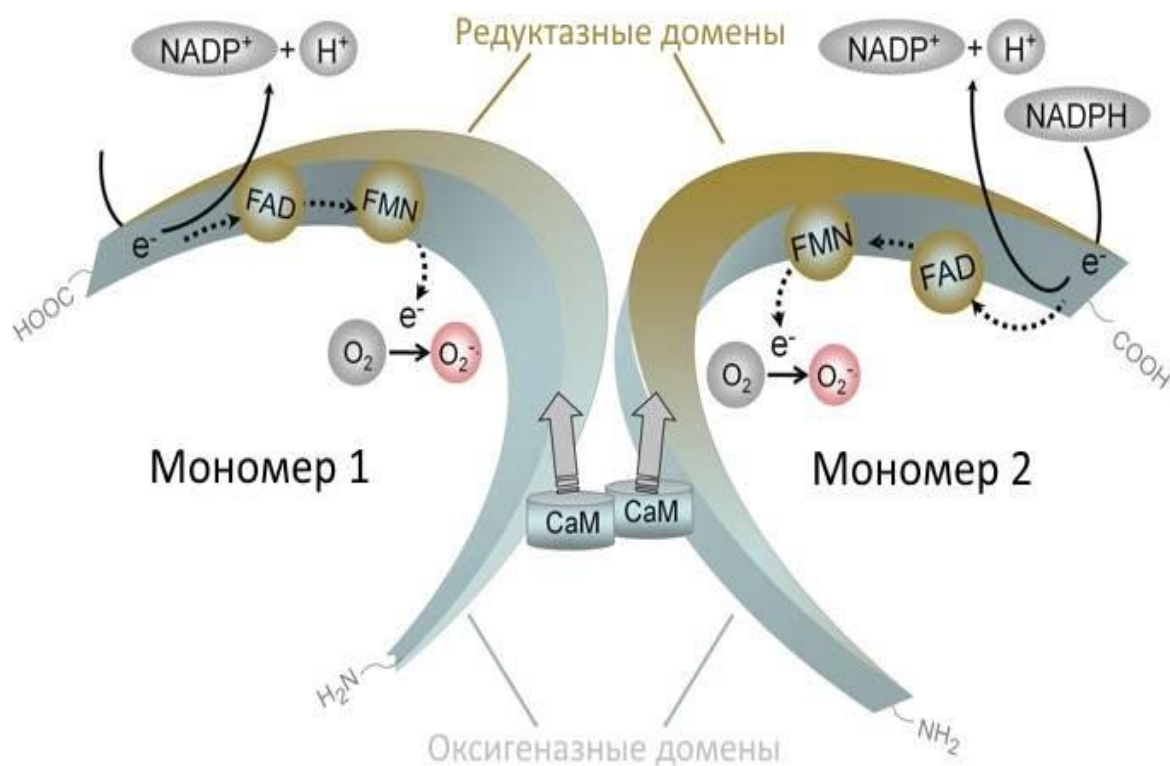


Рис. 2. Структура мономеров NO-синтазы [По Förstermann, Sessa, 2012]

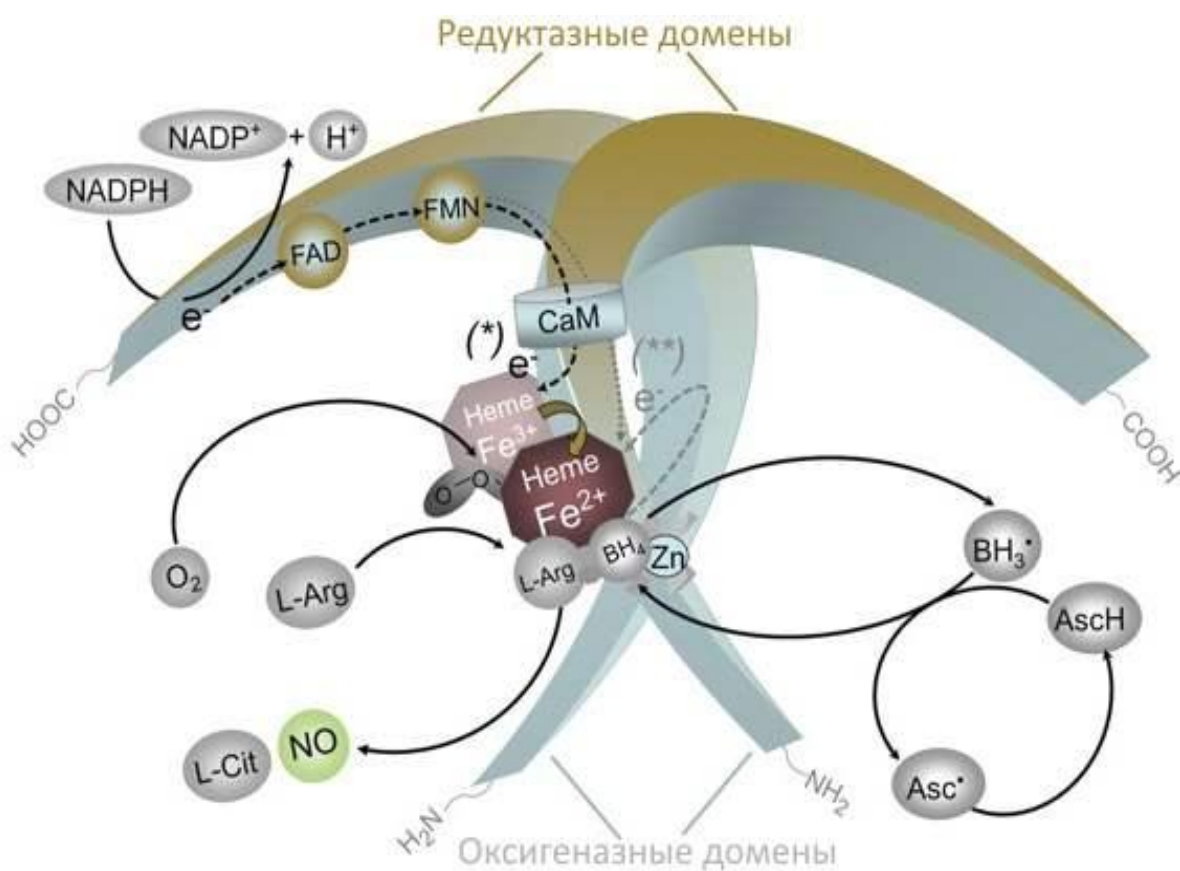


Рис. 3. Структура активного гомодимера NO-синтазы [По Förstermann, Sessa, 2012]

Когда субстрат NO L-аргинин и кофактор BH_4 присутствуют в достаточных количествах, димеры NOS соединяют геммы и восстанавливают кислород для синтеза NO, NO-синтаза становится полностью активной. Фермент осуществляет 2 шага окисления, сначала L-аргинин до N-гидрокси-L-аргинина, а потом N-гидрокси-L-аргинин до L-цитруллина с образованием NO.

Существует три разные изоформы NO-синтаз: индуцибельная iNOS, нейрональная nNOS и эндотелиальная eNOS. Эти изоформы отличающиеся локализацией, особенностями механизмов действия, и, как следствие, функциями в организме. По механизму активации NO-синтазы делят на Ca^{2+} - и кальмодулин-зависимые и Ca^{2+} -независимую. Менее мощные Ca^{2+} -зависимые конститутивные изоформы, nNOS и eNOS экспрессируются постоянно, как в норме, так и при патологии.

Из этих трех изоформ в нейроне главным источником NO является нейрональная NO-синтаза (nNOS). Кроме того, nNOS также присутствует в скелетной, сердечной и гладкой мускулатуре млекопитающих, где NO контролирует кровоток и сократимость мышц [Nakane et al., 1993; Förstermann et al., 1994].

Нейрональная NO-синтаза конститутивно экспрессируется специфичными нейронами мозга млекопитающих. Активность этой изоформы прямо пропорциональна внутриклеточной концентрации Ca^{2+} и кальмодулина. В зависимости от субклеточной локализации фермента nNOS в нейронах может выполнять различные функции. Эта изоформа NO-синтазы содержит PDZ домен, и может напрямую взаимодействовать с PDZ доменами других белков. Такие взаимодействия определяют субклеточное распределение и активность фермента [Zhou and Zhu, 2009]. По мнению большинства исследователей, nNOS локализуется в цитозоле. В последнее время появляется все больше подтверждений участия нейрональной NO-синтазы в синаптической сигнализации. Показано, что эта изоформа фермента участвует в процессах обучения, памяти и нейрогенеза [Zhou and Zhu, 2009]. В ЦНС nNOS вовлечена в

формирование долговременной потенциации и долговременного торможения [Shuman and Madison, 1991; Izumi and Zorumski, 1993].

Общепринятое мнение о том, что за тонус сосудов отвечает исключительно eNOS, изменилось, было показано, что нейрональная NO-синтаза также участвует в вазодилатации [Melikian et al., 2009]. Повреждение nNOS может приводить к нарушению NO-зависимых сигнальных механизмов в нейронах и приводить к развитию ряда нейродегенеративных патологий, таких как инсульт, рассеянный склероз, болезни Альцгеймера и Паркинсона [Steinert et al., 2010]. При повреждении клеток увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} может вызывать гиперактивацию нейрональной NO-синтазы, и NMDA-опосредованную гибель нейронов. Гиперактивация этой изоформы фермента может также вести к эксайтотоксичности посредством активации PARP и/или увеличения проницаемости митохондрий.

Индуцибельная изоформа NO-синтазы (iNOS) является Ca^{2+} -независимой изоформой фермента и может экспрессироваться только при патологических процессах. Впервые iNOS была выделена из макрофагов, активированных лейкоцитов, поэтому ее иногда называют макрофагальной NO-синтазой. Эта изоформа фермента также обнаружена в кардиомиоцитах, эндотелиоцитах, гладкомышечных клетках, гепатоцитах, однако основным ее источником являются макрофаги [Kazuhiro and Michel, 1997]. Стоит отметить, что эта изоформа также связывает кальмодулин, как и конститутивные изоформы фермента, однако в чрезвычайно малых концентрациях (ниже 40 нМ). Индуцибельная NO-синтаза активируется внешними воздействиями, антигенами микроорганизмов или некоторыми цитокинами. Причем iNOS синтезирует NO в значительно больших концентрациях, чем конститутивные изоформы фермента.

Однако помимо положительного эффекта индуцибельной изоформы NO-синтазы, выражающегося в токсичности синтезированных ею высоких уровней NO по отношению к микробам, паразитам и опухолевым клеткам, активация iNOS может приводить также и к гибели здоровых клеток. In vivo повреждение клеток может быть обусловлено как непосредственно токсичностью NO радикала самого

по себе, так и взаимодействием NO и O_2^- , приводящим к образованию высокотоксичного пероксинитрита ($ONOO^-$). iNOS играет важную роль в процессах воспалительной нейродегенерации, приводящих ко многим патологиям. Индуцибельная NO-синтаза может вызывать смерть нейронов посредством активации цитохром-оксидазы. Активация цитохром-оксидазы может приводить к высвобождению глутамата, и к эксайтотоксичности, более выраженной, чем в случае гиперактивации нейрональной NO-синтазы [Kanwar et al., 2009, Brown and Neher, 2010]. Избыточная продукция NO, вызванная активацией iNOS играет решающую роль в развитии септического шока [Lange et al., 2009].

Эндотелиальная NO-синтаза (eNOS) экспрессируется, главным образом, эндотелиальными клетками. Однако эта изоформа была также обнаружена в кардиомиоцитах, тромбоцитах, некоторых нейронах мозга, клетках плаценты и тубулярных клетках почек [Förstermann et al., 1994]. Также, как и в случае нейрональной NO-синтазы, Ca^{2+} -активируемый кальмодулин необходим для активации этой изоформы фермента. Однако помимо внутриклеточного кальция в активации eNOS могут участвовать и другие белки, в частности Hsp90 [Garcia-Cardena et al., 1998] и кавеолин-1 [Drab et al., 2001]. eNOS участвует в регуляции многих функций сердечно-сосудистой системы.

Сейчас, выделяют еще один тип конститутивной изоформы NO-синтазы митохондриальную NO-синтазу (mtNOS). Еще в 1995 году было иммуногистохимически обнаружено наличие изоформы NO-синтазы в митохондриях мозга и печени крыс [Bates et al., 1995]. После этого открытия несколькими группами ученых были показаны функции этой изоформы, её Ca^{2+} -зависимость, локализация на внутренней мембране митохондрий и участие в контроле митохондриального дыхания [Ghafourifar and Richter, 1997; Giulivi et al., 1998; Tatoyan and Giulivi, 1998; Carreras et al., 2001]. Подобно другим конститутивным изоформам для активации mtNOS необходим кальций, более того активность этой изоформы напрямую зависит от внутриклеточной концентрации кальция. Известно, что активация mtNOS играет важную роль в

процессах повреждения и гибели клеток. Поскольку активация mtNOS приводит к выходу цитохрома C из митохондрий, и активации каспазы-9, т.е. реализации митохондриального пути апоптоза.

В качестве мишеней mtNOS выделяют гуанилатциклазу и цитохром C-оксидазу [Cleeter et al., 1994]. Непосредственное связывание NO с цитохром C-оксидазой было показано [Brown and Cooper 1994]. Ингибирующее действие NO на потребление кислорода митохондриями вызвано конкуренцией между NO и кислородом за сайт связывания в бинуклеарном центре цитохром C-оксидазы [Torres et. al., 2000]. Было также показано прямое взаимодействие PDZ домена mtNOS с субъединицей цитохром C-оксидазы [Persichini et. al., 2005]. Данные других исследователей указывают на то, что цитохром C-оксидаза наиболее важная молекулярная мишень NO, синтезированного mtNOS [Elfering et al., 2002].

Однако, существование митохондриальной изоформы фермента (mtNOS) – спорный факт. По мнению некоторых исследователей, mtNOS не существует, а под mtNOS понимают связанную с митохондриями нейрональную изоформу фермента [Bustamante et al., 2007].

Принято считать, что нейрональная и индуцибельная изоформы NO-синтазы локализуются в цитозоле нейронов, а eNOS мембраносвязанная изоформа фермента. Оксид азота, образуемый различными изоформами NO-синтаз, может влиять на множество ферментов и белков, участвовать в запуске многих сигнальных каскадов. Наиболее важный сигнальный путь, запускаемый NO – это активация растворимой гуанилатциклазы (sGC), и как следствие, синтез циклического гуанозинмонофосфата (сGMP).

Наиболее часто в качестве ингибиторов NO-синтаз используют нитро- и алкилпроизводные L-аргинина, т.е. структурные аналоги субстрата NO-синтазы L-аргинина (L-NAME, L-NNA и др.). Поскольку NO, по-видимому, играет решающую роль в развитии патологий нервной системы, в частности ишемии, ингибиторы NO-синтаз стали изучают в качестве потенциальных нейропротекторов.

Выделяют несколько основных механизмов регуляции NO-синтаз, обусловленных конформационными изменениями ферментов: посредством ионов Ca^{2+} , путем фосфорилирования белковой части молекулы, и через ассоциацию-диссоциацию молекулы фермента, в частности с участием белка PIN [Артюхов и Башарина, 2012].

1.3 Виды клеточной смерти

Клетки могут гибнуть двумя основными путями, в процессе апоптоза или некроза. Эти типы клеточной смерти различаются по морфологическим признакам.

Апоптоз, или программируемая клеточная смерть, режим гибели клетки, происходящий в нормальных физиологических условиях и контролируемый самой клеткой. Клетка при этом является активным участником собственной гибели, реализуя программу «клеточного суицида», посредством запуска определенных проапоптотических сигнальных механизмов. Нарушения механизмов апоптоза лежат в основе многих нейродегенеративных заболеваний [Nicotera et al, 1999].

Для апоптоза характерны:

- сохранение целостности плазматической мембраны;
- отсутствие воспалительного ответа;
- уплотнение цитоплазмы;
- сжатие клетки;
- конденсация ядерного хроматина;
- формирование апоптотических телец;
- зависимость от энергетического статуса клетки;
- увеличение проницаемости митохондрий;
- индуцирование физиологическими стимулами;

– реализация фагоцитоза погибшей клетки окружающими здоровыми клетками и макрофагами.

Некротическая гибель клетки, в отличие от апоптоза, является патологическим неконтролируемым процессом. Гибель клетки путем некроза обычно происходит под действием повреждающих внешних факторов, приводящих к деградации плазматической мембраны клетки [Новиков, 1996].

Для некроза характерны следующие морфологические признаки:

- нарушение целостности плазматической мембраны;
- вакуолизация эндоплазматического ретикулума;
- набухание митохондрий и цитоплазмы клетки;
- разрушение клеточных органелл;
- лизис клетки;
- кариопикноз (уменьшение, уплотнение и сморщивание ядра клетки) ;
- отсутствие необходимости в энергии;
- затрагивание близлежащих клеток;
- индуцирование нефизиологическими внешними факторами;
- наличие воспалительной реакции;
- формирование соединительно-тканного рубца.

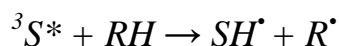
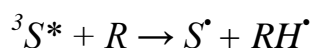
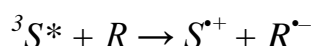
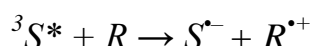
1.4 ФД индуцированная гибель клеток

Фотодинамический (ФД) эффект, иногда называемый фотосенсибилизацией, заключается в фотовозбуждении молекул красителя - фотосенсибилизатора в присутствии кислорода. Этот эффект лежит в основе фотодинамической терапии (ФДТ), метода лечения онкологических заболеваний. При ФД эффекте происходит генерация фотосенсибилизатором активных форм кислорода (АФК), в частности высокоактивного синглетного кислорода, вызывающего повреждение биологических структур клеток.

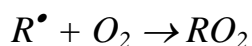
Все фотохимические превращения происходят с молекулами,

находящимися в электронно-возбужденном состоянии. Когда молекула фотосенсибилизатора поглощает фотон, она переходит из основного состояния в возбужденное (рис. 4). Поглотив квант света, молекулы переходят на более высокие энергетические уровни. Сначала молекула переходит на высокий синглетный уровень (короткоживущее состояние, несколько наносекунд), сохраняя свой спин. Затем, молекула переходит в долгоживущее триплетное состояние (микросекунды), при котором электрон на высоком энергетическом уровне, меняет спин [Владимиров и Потапенко, 1989]. Фотодинамический эффект при этом может реализовываться двумя путями.

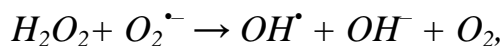
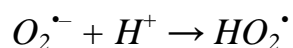
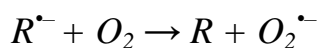
При фотодинамическом эффекте I типа молекулы фотосенсибилизатора напрямую реагируют с молекулами биологического субстрата (R), и/или молекулами среды, например, с водой [Узденский, 2010]:



Образовавшиеся радикалы биологических молекул, присоединяя кислород, могут инициировать цепное перекисное окисление, которому подвержены ненасыщенные липиды в биомембранах:



Кроме того, возможно образование супероксид-аниона ($O_2^{\bullet-}$) и других активных форм кислорода:



где (OH^{\bullet} – гидроксил радикал, H_2O_2) – перекись водорода.

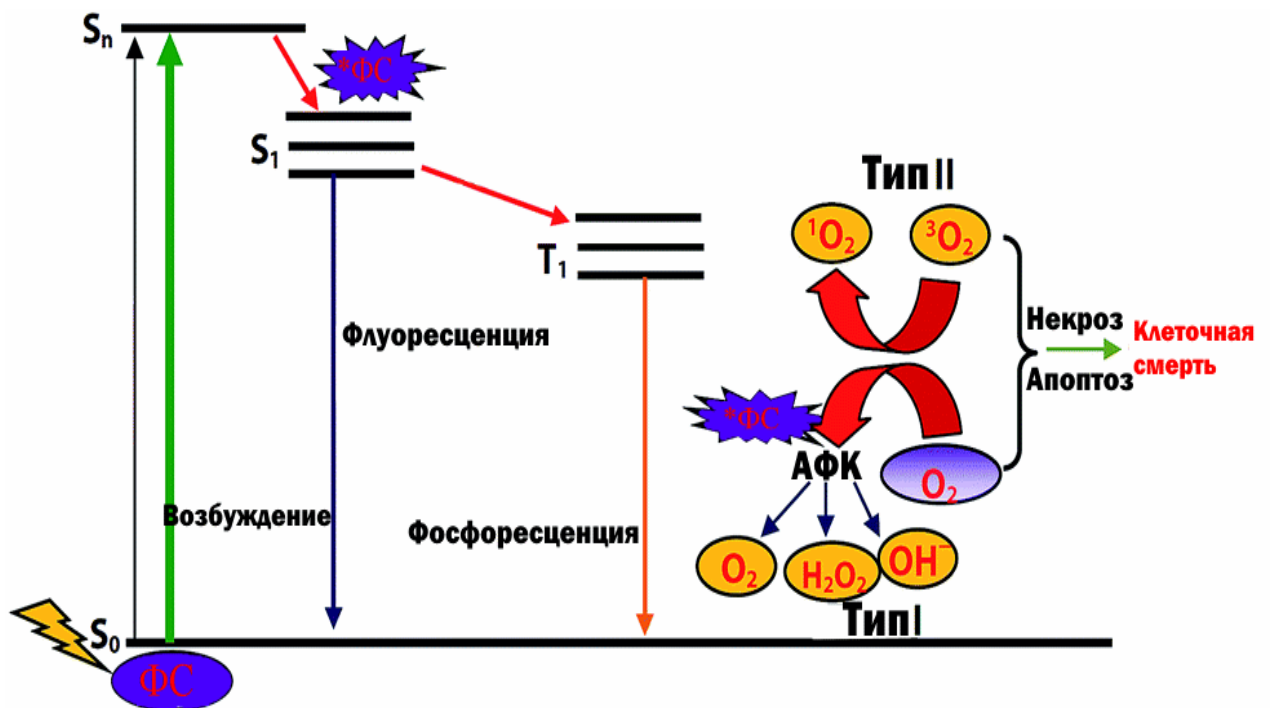
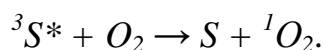


Рис. 4. Диаграмма энергетических уровней (диаграмма Яблонского) для ФДТ

[По Majumdar et al., 2014]

Взаимодействуя с ненасыщенными жирными кислотами биологических мембран, эти активные формы кислорода инициируют образование радикалов липидов, приводя к инициации цепного перекисного окисления липидов (ПОЛ) и повреждению биомембран [Владимиров и Потапенко, 1989].

При фотодинамическом эффекте II типа осуществляется перенос энергии электронного возбуждения от фотосенсибилизатора на соседнюю молекулу, обычно на молекулу кислорода, переводя ее в высокоактивное синглетное состояние (1O_2):



Поскольку окислительная способность образовавшегося синглетного кислорода велика, на 2 порядка выше, чем у обычного кислорода, он эффективно окисляет основные компоненты клеток [Владимиров и Потапенко, 1989; Castano et al., 2004; Узденский, 2010].

ФД-воздействие вызывает окисление аминокислот белков, вследствие чего белки могут терять активность. Нарушается структура активных центров белков, появляются внутренние сшивки и межмолекулярные сшивки с другими белками и липидами [Davies M.J., 2003, Girotti, 2001].

Следует отметить, что при ФД-воздействии, чаще всего реализуются смешанные реакции, с участием механизмов обоих типов фотодинамического эффекта и образованием различных активных форм кислорода. Так как при ФД-воздействии уровень кислорода в тканях резко снижается, со временем вклад реакции I типа должен увеличиваться, а вклад реакции II типа падать [Узденский, 2010].

Фотодинамическое воздействие, генерируя различные цитотоксические активные формы кислорода, может вызывать гибель клеток, как в результате развития некроза, так и посредством апоптоза [He and Oleinick, 1995].

Внутриклеточная локализация фотосенсибилизатора (ФС) оказывает существенное влияние на тип ФД индуцированной гибели клеток. Так, в большинстве случаев, фотосенсибилизация плазматической мембраны вызывает некроз, тогда как локализация ФС в митохондриях чаще вызывает апоптоз

[Dellinger, 1996; Luo and Kessel, 1997; Kessel and Luo, 1998]. Отмечают и другую общую закономерность, в соответствии с которой увеличение дозы ФД-воздействия, которая пропорциональна концентрации фотосенсибилизатора, интенсивности и продолжительности облучения, переключает преобладающий тип гибели клеток с апоптоза на некроз [Oleinick et al., 2002]. Индукция апоптоза предпочтительна при ФД терапии опухолей, поскольку при апоптозе, в отличие от некроза, в тканях не развивается воспалительная реакция и не формируется рубец [Новиков, 1996].

Активация протеолитического каспазного каскада, запускающего и выполняющего основные процессы апоптоза, может инициироваться при ФД-воздействии на лизосомы, эндоплазматический ретикулум или митохондрии. Фотосенсибилизаторы, локализуясь в этих органеллах, сенсибилизируют повреждение их мембран и высвобождение факторов, активирующих каспазу-3 – центральное звено каспазного каскада. Каспаза-3 активирует "нижележащие" эффекторные каспазы 6, 7, которые расщепляют множество клеточных белков, включая ламины ядерной оболочки, нуклеазы, белки цитоскелета, клеточной адгезии и т.д. [Oleinick et al., 2002].

Фотосенсибилизаторы, локализуясь в лизосомах, при облучении могут вызывать как некроз, так и апоптоз [Luo and Kessel, 1997; Woodburn et al., 1997]. При фотодинамическом повреждении лизосом могут высвобождаться катепсины, расщепляющие прокаспазу-3 и превращающие ее в активную каспазу-3, запускающую апоптоз. Катепсины могут запускать апоптоз, расщепляя и другие белки, например, проапоптотный белок Bid [Oleinick et al., 2002].

Фотосенсибилизаторы, локализуясь в митохондриях, особенно эффективно индуцируют апоптоз [Kessel and Luo, 1997, 1998, Oleinick et al., 2002]. Фотоповреждение митохондрий приводит к высвобождению в цитозоль цитохрома С [Kessel and Luo, 1999; Varnes et al., 1999]. Цитохром С образует комплекс с цитоплазматическим белком Araf-1, называемый "апоптосомой", и активирует протеолитический каскад, включающий расщепление прокаспазы-9. Образующаяся каспаза-9 активирует каспазу-3, которая активирует каспазы 2, 6, 7

и 8 [He et al., 1998; Chan et al., 2000]. Это приводит к быстрому развитию апоптоза [Kessel and Luo, 1998, 1999].

Ранее было показано, что ФД-воздействие на нейроны приводит к необратимому прекращению их биоэлектрической активности [Uzdensky et al., 2001]. Однако интересно, что при этом в нейронах речного рака апоптоз не наблюдался. Вероятно, это было обусловлено внутренней блокировкой возможности клеточного суицида в них [Uzdensky et al., 2001]. ФД индуцированный некроз механорецепторных нейронов рецептора растяжения речного рака может быть связан как с повреждением цитоплазматической мембраны, так и с активацией различных внутриклеточных сигнальных механизмов [Uzdensky et al., 2002]. Кроме того, повреждение нейрона может быть связано с нарушением его метаболизма из-за повреждения клеточных органелл: комплекса Гольджи, эндоплазматического ретикулума, митохондрий [Федоренко и др., 2002].

При ФД-воздействии на клетки глии рецептора растяжения речного рака может происходить как некротическая, так и апоптотическая гибель. Поскольку большинство фотосенсибилизаторов лучше накапливаются в глиальной оболочке, а не в нейронах, клетки глии более чувствительны к ФД-воздействию. При этом ФД индуцированная гибель глиальных клеток может быть обусловлена снижением энергетического статуса клетки и повреждением кальциевых депо [Uzdensky et al., 2004].

В настоящее время очень большой интерес вызывает исследование нейроглиальных взаимодействий при различных патологических процессах: ишемии, аксотомии, окислительном стрессе и др. [Misonou et al., 2008; Hamilton and Attwell, 2010]. Нейроны могут защищать глиальные клетки. В частности, механорецепторный нейрон рака оказывает антиапоптотическое влияние на фотосенсибилизированные глиальные клетки [Узденский, 2010]. Механизмы, защитных нейроглиальных взаимодействий пока не установлены. В качестве потенциальных сигнальных молекул, высвобождаемых нейроном и влияющих на устойчивость глиальных клеток к ФД-повреждению, могут выступать как оксид

азота, так и нейротрофины, ионы кальция, нейромедиаторы. Исследование нейроглиальных взаимодействий при ФДТ в литературе освещено слабо, а роль NO в этих взаимодействиях при ФДТ практически не исследована. Планируемые исследования могут ответить на вопрос о роли NO в качестве посредника между нейроном и глиальными клетками.

1.5 Роль NO в ФД индуцированном повреждении клеток

NO участвует в реализации как физиологических, так и многих патологических процессов, таких как нейротрансмиссия, клеточный ответ на стресс и нейродегенерация [Bredt 1999; Moncada and Balanos 2006, Brown 2010]. В нескольких публикациях показано участие NO в нейроглиальных взаимодействиях в нервной системе [Larionova et al., 2003].

Сейчас некоторыми учеными показано, что NO участвует в повреждении клеток при терапиях, опосредованных генерацией активных форм кислорода (АФК), в частности при фотодинамической терапии (ФДТ) [Korbelik et al., 2000, Di Venosa et al., 2005]. ФДТ быстро, в первые минуты воздействия, вызывает продукцию NO в различных клеточных культурах [Gupta et al., 1998; Coutier et al., 1999; Ali and Olivo, 2003]. Однако однозначно не установлено, как именно NO влияет на выживаемость клеток при ФД-воздействии. Большинство исследователей полагают, что NO защищает клетки от ФД индуцированной смерти.

Тем не менее, есть данные подтверждающие участие NO в ФД индуцированном апоптозе [Gupta 1998; Gomes et al., 2002; Lu et al., 2006]. В то же время, есть исследования, в которых не было выявлено корреляции между продукцией NO и ФД индуцированным повреждением клеток [Di Venosa et al., 2005]. Роль NO в повреждении нейронов и глиальных клеток, вызванном ФД-воздействием, еще не изучена.

NO может влиять на клетки как напрямую, так и посредством формирования активных форм, таких как пероксинитрит и диоксид азота. При различных обстоятельствах прямые реакции могут быть как протекторными, так и цитотоксическими, тогда как непрямые реакции, главным образом, цитотоксические [Moncada and Balanos, 2006]. Цитопротекторный эффект NO может быть связан с его антиоксидантной активностью. Было показано, что экзогенный NO, генерируемый NONOate может выступать в качестве ловушки цитотоксичных свободных радикалов и снижать перекисное окисление липидов (ПОЛ) в клеточных мембранах, тем самым защищая клетки различных культур от фотоиндуцированного ПОЛ и последующего некроза [Niziolek et al., 2003; Niziolek et al., 2006]. Сигнальный каскад, посредством которого NO увеличивает устойчивость клеток к фотоокислительному стрессу, вероятно, может быть обусловлен NO-опосредованным высвобождением гема с последующей мобилизацией свободных ионов железа, которое может участвовать в запуске экспрессии цитопротекторных белков, ферритина и гемоксигеназы-1 [Niziolek et al., 2006].

Большинство исследований роли NO в ФД индуцированном повреждении проведено на опухолевых клетках. Так, в клетках карциномы человека была показана NO-продукция, как результат фотосенсибилизации фталоцианином [Gupta et al., 1998] и фотофрином [Korbelik et al., 2000]. На лимфатических клетках лейкомы, фотосенсибилизированных другим фотосенсибилизатором, мероцианином-540, было также показано участие NO в процессах выживаемости клеток при ФД-воздействии [Zareba et al., 2005]. Авторы полагают, что NO может участвовать в ФД индуцированном апоптозе и смерти клеток. Однако промежуточные даунстрим мишени NO в реализации апоптотических каскадов однозначно не определены. Показано, что NO вызывает активацию Fas и апоптоз [Fukuо et al., 1996; Boyle et al., 2002]. Кроме того, было выявлено, что NO участвовал в защите от апоптоза посредством сигнального пути NO/sGC/cGMP/PKG, а другие сигнальные белки гемоксигеназа-1, Hsp-70 и Bcl-2 не участвовали в NO-индуцированной защите клеток от апоптоза [Gomes et al.,

2002]. Что конкретно фосфорилирует протеинкиназа G пока неизвестно, вероятно, эта протеинкиназа запускает некий механизм, влияющий на эффекторные каспазы.

Растворимая гуанилатциклаза (sGC) один из ключевых белков играющих решающую роль во всех этих процессах. sGC гетеродимерный протеин, состоящий из двух субъединиц [Kamisaki et al., 1986]. В физиологических условиях только гетеродемер обладает каталитической активностью. Каталитический домен фермента превращает гуанозин трифосфат (GTP) во вторичный мессенджер циклический гуанозин монофосфат (сGMP). Известны три основных мишени сGMP, опосредованных сигнальным путем NO/sGC/cGMP/PKG: сGMP-зависимая протеинкиназа (PKG), сGMP-фосфодиэстераза, сGMP-зависимые ионные каналы. Протеинкиназа G фосфорилирует белки-мишени в ответ на повышение концентрации сGMP.

Есть подтверждения факта того, что NO может модулировать клеточную смерть посредством сGMP-зависимых сигнальных механизмов. Однако большинство исследователей фокусируются на исследованиях на культурах опухолевых клеток, а для здоровых клеток аналогичные данные отсутствуют. Так, ранее уже было показано участие сигнального пути NO/sGC/cGMP/PKG в ФД индуцированном повреждении клеток опухолей мыши [Gomes et al., 2002]. Исследователи показали, что NO участвует в ингибировании апоптоза не посредством S-нитрозилирования каспаза-3-подобных протеаз или апрегуляции гемоксигеназы-1, Bcl-2 и Hsp70, а посредством непосредственной активации сGMP и протеинкиназы G. Каковы дальнейшие клеточные мишени PKG неизвестно, вероятно, эта протеинкиназа фосфорилирует некие субстраты, ведущие к реализации апоптотических сигнальных каскадов в клетке. Участие протеинкиназы G в реализации апоптотических каскадов было неоднократно показано и не только на опухолевых клетках. Протеинкиназа G, запускаемая посредством NO, участвовала в ингибировании или активации сигнальных механизмов, связанных с апоптозом в гепатоцитах [Kim et al., 1997] и нейронах коры мозга [Fernandez-Tome et al., 1999].

Таким образом, очевидно, что NO, изоформы NO-синтаз, его синтезирующие, и сигнальный путь NO/sGC/cGMP/PKG могут по-разному участвовать в процессах выживаемости и смерти клеток, в частности индуцированной ФД-воздействием. Однако роль NO в ФД индуцированном повреждении нейронов и глиальных клеток не изучена. Между тем, NO может также играть важную роль в нейроглиальных взаимодействиях при действии внешних повреждающих факторов.

Поэтому исследование роли NO и различных изоформ NO-синтаз в устойчивости нейронов и глиальных клеток такого простого нейроглиального препарата, как рецептор растяжения речного рака, к фотодинамическому повреждению представляет интерес.

В связи с этим, в настоящей работе ставились задачи: изучить динамику активации NO-синтаз и генерации NO при ФД-воздействии на рецептор растяжения речного рака; исследовать внутриклеточное распределение изоформ NO-синтазы в нейронах и глии рецептора растяжения речного рака; изучить влияние NO на нейронную активность и смерть нейронов и глиальных клеток рецептора растяжения речного рака в темновых условиях и при ФД-воздействии; установить роль нейрональной и индуцибельной NO-синтаз в повреждении нейронов и глиальных клеток при ФДТ; определить, участвует ли сигнальный путь NO/sGC/cGMP/PKG в процессах ФД индуцированного повреждения нейронов и глии.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объект исследования

Объектом исследования служил рецептор растяжения рака (PPP) *Astacus leptodactylus*, состоящий из пары рецепторных мышц и находящихся между ними двух механорецепторных нейронов (МРН). Последние имеют аксоны и оболочку из сателлитных глиальных клеток. Рецепторы растяжения рака расположены на внутренней поверхности спинной стороны брюшка, по два в каждом сегменте. Медленно-адаптирующийся или тонический нейрон поставляет информацию о положении хвоста рака (рис. 5), он способен длительно генерировать потенциалы действия (ПД) в ответ на растяжение рецепторной мышцы с частотой пропорциональной её растяжению [Узденский, 2010]. Быстро-адаптирующийся или фазический нейрон является «датчиком» скорости движения брюшка. При резком растяжении рецепторной мышцы происходит кратковременная генерация ПД, а при постоянном уровне растяжения рецепторной мышцы он молчит [Ильинский, 1975; Uzdensky, 1993]. Данные механизмы обусловлены деформацией мембран дендритных окончаний, тесно контактирующих с мышечными волокнами [Tao-Cheng et al., 1981], а также с деполяризацией и генерацией рецепторного потенциала [Ringham, 1971]. Тонический нейрон способен поддерживать постоянный уровень импульсной активности в течение 7-10 ч, что позволяет точно регистрировать клеточный ответ на внешние воздействия [Uzdensky, 1993]. Поэтому динамика электрофизиологических изменений изучалась именно на основе его активности.

Глиальные клетки (ГК), образующие рулетообразную оболочку вокруг рецептора растяжения рака из 10-30 слоев толщиной 0.2-1 мкм, сохраняют цитоплазму и не являются классическим миелином.

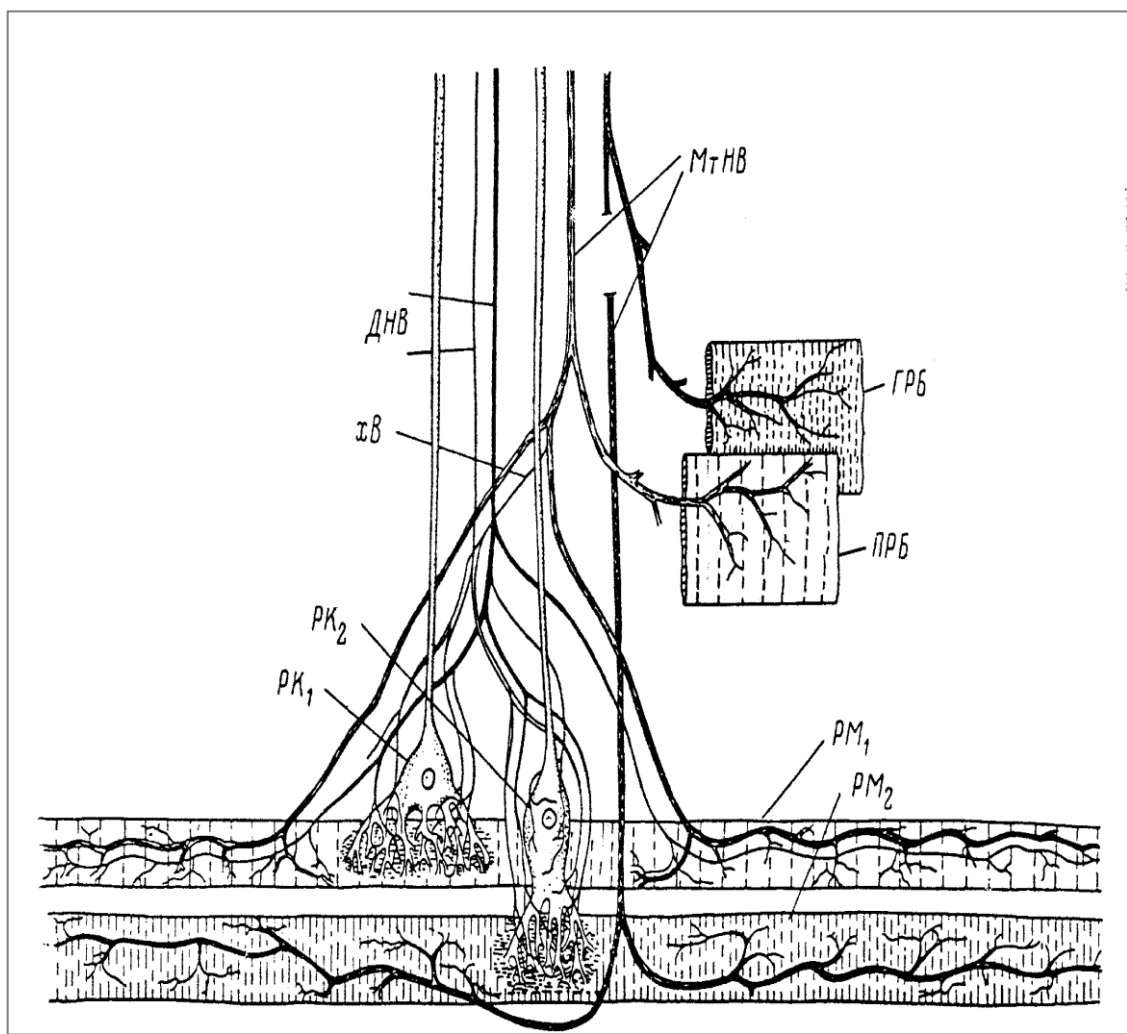


Рис. 5. Строение механорецептора растяжения речного рака

Обозначения: PK_1 – быстро адаптирующийся нейрон; PK_2 – медленно адаптирующийся нейрон; PM_1 и PM_2 – рецепторные мышцы; xB – дополнительное x-волокно; $ДНВ$ – дополнительные толстые и тонкие нервные волокна ($ТВ_1$ и $ТВ_2$); $МтНВ$ – моторные нервные волокна; $ГРБ$ – глубокие (быстрые) разгибатели брюшка; $ПРБ$ – поверхностные (медленные) разгибатели брюшка [По Ильинскому, 1975]

2.2 Исследование показателей выживаемости нейронов и глиальных клеток при ФД-воздействии

2.2.1 Регистрация биоэлектрической активности механорецепторного нейрона

Рецепторы растяжения рака выделяли по методике Florey and Florey, 1955. Рецепторы выделяли с кусочками хитинового панциря, к которым они крепятся. В ванночке с 2 мл физиологического раствора ван Харревельда для холоднокровных животных [mM: NaCl - 205; KCl - 5.4; NaHCO₃ - 0.24; MgCl₂ - 5.4; CaCl₂ - 13.5; pH 7.2-7.4) кусочки панциря с растянутым между ними PPP насаживались на иглы, одна из которых могла перемещаться, удаляясь и приближаясь к первой. Таким образом, осуществлялась регуляция растяжения рецепторной мышцы тонического нейрона, а, следовательно, и его частоты генерации потенциала действия. При этом также происходила активация фазического механорецепторного нейрона, но она была очень кратковременной и не отражалась на общей картине импульсной активности.

Частота генерации ПД устанавливалась путем растягивания рецепторных мышц на уровне 5-10 Гц, затем около 20-30 минут проводилась ее контрольная регистрация.

Отведение потенциалов действия от аксона проводили внеклеточно с помощью стеклянного присасывающегося электрода, заполненного физиологическим раствором ван Харревельда. ПД усиливались усилителем биопотенциалов. Изменения частоты генерации потенциала действия оценивались непрерывно, вплоть до прекращения импульсной активности. Время от начала облучения до прекращения генерации потенциала действия называлось временем жизни нейрона.

Частота потенциала действия контролировалась, измерялась и регистрировалась с помощью программно-аппаратного комплекса на базе персонального компьютера, аналогово-цифрового преобразователя L-761 (Л-Кард, Москва) и оригинальной программы Neuron, визуализирующей ПД на мониторе и записывающей частотограммы импульсов в компьютерный файл.

Во всех сериях потенциалы действия регистрировались все время, до необратимого прекращения генерации ПД. По частотограмме определяли фазы импульсной реакции нейрона (возбуждение и торможение), а также время его жизни при фотодинамическом воздействии или при инкубации в темновых условиях. Необратимое прекращение генерации потенциала действия рассматривали как показатель функциональной гибели нейрона. Эксперименты проводились при температуре $25 \pm 4^\circ\text{C}$.

2.2.2 Фотодинамическое воздействие

Для исследования влияния ФД-воздействия на механорецепторные и глиальные клетки рецептора растяжения рака в качестве фотосенсибилизатора использовался Фотосенс (НИОПИК, Москва). Это отечественный фотосенсибилизатор, разрешенный к клиническому применению при ФДТ различных опухолей [Странадко и др., 2004]. Фотосенс относится к классу фталоцианиновых фотосенсибилизаторов, обладающих рядом достоинств при ФДТ: высокое поглощение света в красной области спектра, большое время жизни триплетных состояний, стабильность, высокий квантовый выход. Для придания этому классу веществ водорастворимости используют их сульфопроизводные, а образование комплексов фталоцианинов с металлами (в данном случае с алюминием) повышает выход АФК при воздействии света.

Фотосенс представляет собой смесь ди-, три- и тетра-алюмофталоцианинов (AlPcS_n , где $n=2, 3$ или 4 ; среднее $n=3,1$) в соотношении 15:50:35 [Rosenthal et al., 1991] (рис. 6).

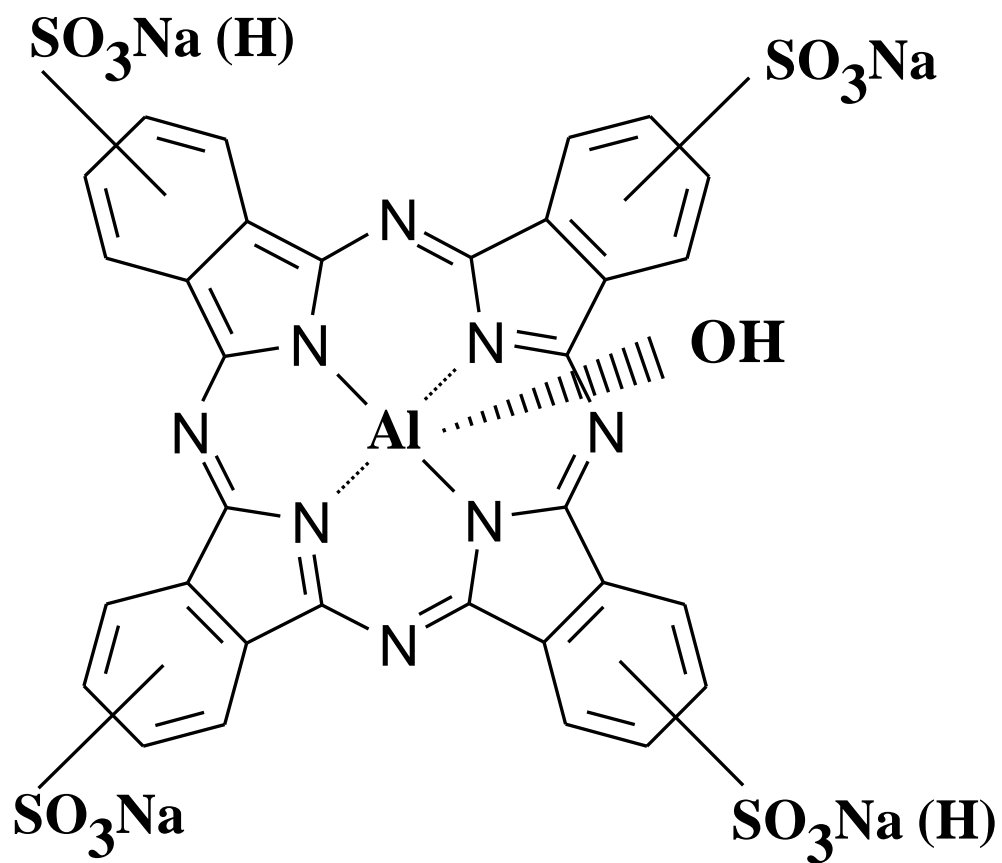


Рис. 6. Структурная формула молекулы тетрасульфоната
алюмофталоцианина AlPcS₄, одного из основных компонентов
Фотосенса

Фотосенс обладает узкой и интенсивной полосой поглощения света при 673 нм с молярной экстинкцией $\varepsilon = 1,9 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$, 348 нм и 605 нм. Последние два пика являются менее интенсивными. Спектр его флуоресценции имеет максимум 685 нм [Kolosov et al., 2003].

Для облучения использовался полупроводниковый, излучающий красный свет с длиной волны 670 нм и плотностью мощности 0,4 Вт/см². Экстинкция Фотосенса на этой длине волны составляла 20%.

В настоящей работе Фотосенс применялся в концентрации 10^{-7} М. При этой концентрации электрофизиологическая активность механорецепторных нейронов инактивируется приблизительно за 15 мин, в основном путем торможения, а ГК могут как выживать, так и гибнуть обоими способами клеточной смерти [Узденский и др., 2002]. Схема эксперимента по изучению влияния ФД-воздействия на нейроны и глию приведена на рис. 7.

Фотосенсибилизатор сульфированный алюмофталоцианин AlPcSn Фотосенс (НИОПИК, Москва) в концентрации 10^{-8} М добавляли в кювету после записи электрофизиологической активности в течение 30 мин.

После 30-минутной инкубации с Фотосенсом нейроны облучали в течение 30 мин диодным лазером (670 нм, 0,4 Вт/см²). Диаметр лазерного луча был 3 мм, таким образом, облучалось тело нейрона и значительная часть аксона. Фотосенс и ингибитор оставались в кювете вовремя и после облучения. Модуляторы, как правило, применялись в концентрации в 2 раза меньшей концентрации, вызывающей прекращение генерации потенциала действия в течение 3-4 ч в темноте.

Уровень ФД индуцированного некроза и апоптоза МРН и глиальных клеток оценивали через 8 ч, в течение этого времени успевавший развиваться ФД индуцированный апоптоз глиальных клеток [Узденский, 2005]. После облучения препараты окрашивались двумя флуорохромами, пропидием иодида (PI) ($2 \cdot 10^{-5}$ М) и Hoechst-33342 ($4 \cdot 10^{-5}$ М) (Sigma-Aldrich), промывались, фиксировались 0,2% глутаровым альдегидом, далее многократно промывались и заключались в глицерин.

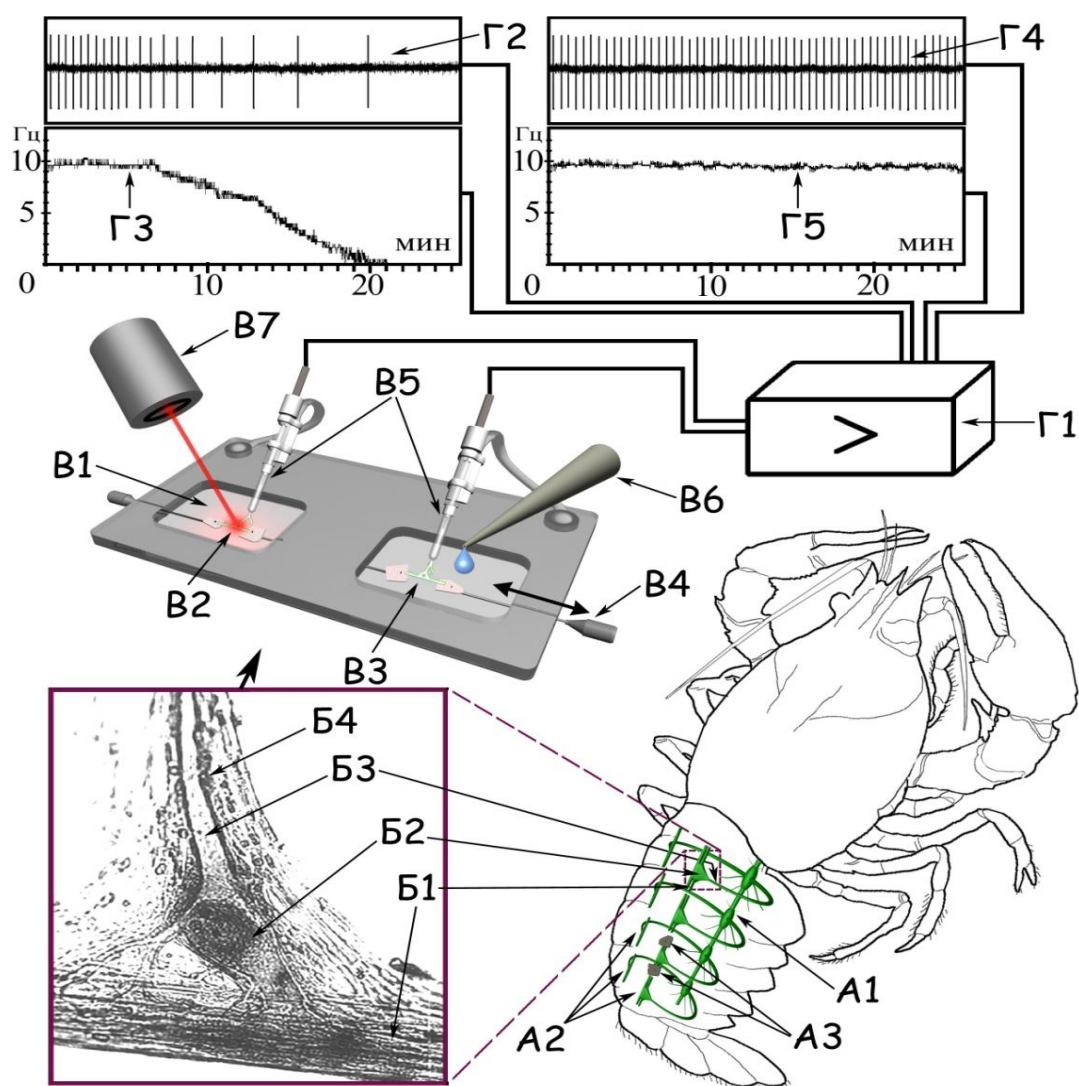


Рис. 7. Схема эксперимента по изучению влияния фотодинамического воздействия на механорецепторные нейроны и глиальные клетки

Обозначения: Рак: А1 – брюшная нервная цепочка, А2 – рецептор растяжения рака, А3 – вырезаемые кусочки панциря, на которых крепится рецептор. Препарат: Б1 – механорецепторная мышца, Б2 – механорецепторный нейрон, Б3 – аксон, Б4 – оболочка из сателлитных глиальных клеток. Установка: В1 – кювета, В2 – опытный рецептор растяжения, В3 – контрольный рецептор растяжения, В4 – регулятор растяжения рецепторной мышцы, В5 – присасывающиеся электроды, В6 – добавление фотосенсибилизатора или нейротрофина, В7 – лазер. Биопотенциалы: Г1 – усилитель, Г2 – импульсная активность опытного нейрона, Г3 – частотограмма опытного нейрона, Г4 – импульсная активность контрольного нейрона, Г5 – частотограмма контрольного нейрона [по Лобанову, 2007]

Показатели выживаемости нейронов и клеток глии исследовались с помощью флуоресцентного микроскопа Axiolab (К. Zeiss, Германия), оснащенного камерой AxioCam ERc 5s, с последующей обработкой результатов в программе Image-Pro Plus.

2.2.3 Ингибиторно-активаторный анализ

Для изучения NO-зависимых сигнальных процессов использовались следующие модуляторы: NO-генераторы, SNP (10 мкМ) и NONOate (100 мкМ), неспецифичные ингибиторы нейрональной NO-синтазы, L-NAME (1 мМ) и L-NNA (1 мМ), специфичные ингибиторы индуцибельной NO-синтазы, SMT (50 мкМ) и L-NIL (1 мМ), ингибитор протеинкиназы G (PKG), KT-5823 (10 мкМ), активатор растворимой гуанилатциклазы (sGC) YC-1 (5 мкМ) и ингибитор sGC ODQ (10 мкМ), все реактивы были приобретены в фирме Sigma Aldrich.

После контрольной регистрации биоэлектрической активности нейронов в кювету добавлялись фотосенсибилизатор (Фотосенс, 10^{-7} М) и/или модуляторы NO-зависимых сигнальных процессов.

Каждая серия экспериментов состояла из 4 групп опытов, схема которых приведена на рис. 8:

- 1) контрольная группа состояла из PPP, не подвергавшихся никаким воздействиям и инкубированных в растворе ван Харревелинда в течение 8 часов;
- 2) группа из PPP, инкубированных в темноте в присутствии генераторов NO или ингибиторов NO-синтазы в течение 8 часов;
- 3) группа из PPP, подвергавшихся ФД-воздействию. В этой серии опытов после контрольной записи ПД, в кювету добавлялся фотосенсибилизатор Фотосенс, и после 30-минутной инкубации в темноте препарат облучался лазером (633 нм, 0.4 Вт/см²) в течение 30 мин;



Рис. 8. Схемы протоколов различных серий экспериментов

4) группа из PPP, подвергавшихся комбинированному воздействию фотоокислительного стресса и одного из генераторов NO/ингибиторов NO-синтазы. В этой серии опытов после контрольной записи ПД, в кювету добавлялись фотосенсибилизатор Фотосенс (10^{-7} М) генераторы NO или ингибиторы NO-синтазы, после 30-минутной инкубации в темноте препарат облучался лазером (633 нм, 0.4 Вт/см^2) в течение 30 мин.

2.2.4 Флуоресцентно-микроскопическое определение некроза и апоптоза

Для полного развития всех морфологических проявлений некроза и апоптоза после прекращения облучения (или добавления генераторов NO/ингибиторов NO-синтазы в темновых сериях) препараты инкубировались в течение 8 часов [Uzdensky et al., 2005].

Методом двойного флуорохромирования (окраска препаратов PPP флуорохромами: пропидиум йодидом ($2 \cdot 10^{-5}$ М) и Hoechst-33342 ($4 \cdot 10^{-5}$ М)) производилось определение типов клеточной смерти по регистрации характерных морфологических признаков – повреждения мембраны в случае некроза и наличие апоптотных телец в случае апоптоза. После инкубации с NO-модуляторами и/или ФД-воздействия препараты флуорохромировали красителями по 20 мин каждым, затем промывались физиологическим раствором 3-4 раза, также в течение 20 минут фиксировались 0,2% глутаровым альдегидом и снова промывались физиологическим раствором. Помещенные после этого под покровное стекло в глицерин препараты исследовались при разном увеличении (20x и 40x) на флуоресцентном микроскопе Zeiss, оснащенный цифровой камерой и ртутной лампой высокого давления для возбуждения люминесценции красителей.

Пропидиум йодид визуализирует некротические клетки, так как может проникнуть в ядро только сквозь поврежденную мембрану. Там он интеркалирует между парами оснований ДНК и окрашивает ядра в красный цвет (рис. 9), что позволяет определять уровень некроза [Brana et al., 2002].

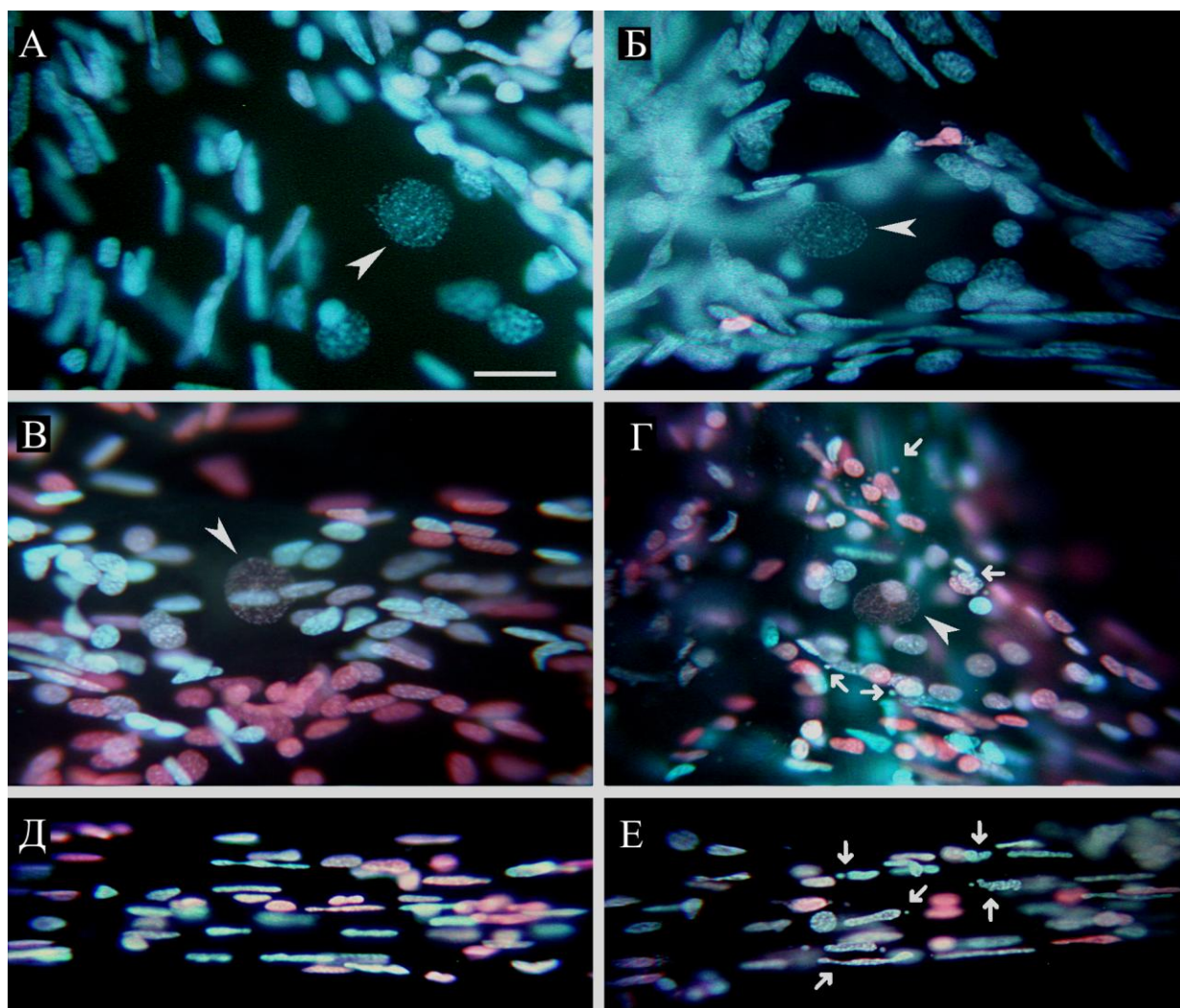


Рис. 9. Морфология ядер фотосенсибилизированных нейронов и глиальных клеток в изолированном рецепторе растяжения речного рака (PPP), окрашенном пропидиум йодидом ($2 \cdot 10^{-5}$ M) и Hoechst-33342 ($4 \cdot 10^{-5}$ M) *Обозначения: А – участок контрольного (не подвергавшегося воздействию) препарата PPP; Б – участок препарата PPP, подвергшийся воздействию 100мкМ NONOate; В – участок фотосенсибилизированного препарата PPP; Г – участок фотосенсибилизированного в присутствии 100мкМ NONOate препарата PPP; Д – морфология проксимального участка аксона в фотосенсибилизированном препарате PPP; Е – морфология проксимального участка аксона в фотосенсибилизированном в присутствии 100мкМ NONOate препарате PPP. Фрагментированные ядра апоптотических клеток показаны маленькими стрелками, большие стрелки показывают ядра нейронов в центрах препаратов. Масштабный отрезок 30мкм*

Hoechst-33342 в свою очередь позволяет увидеть общее число ГК и определить число апоптозных клеток с фрагментированными ядрами (рис. 9, маленькие стрелки) за счет селективного флуорохромирования ДНК любых клеток в сине-зеленый цвет [Latt et al., 1976].

На цифровых фотографиях разрешением 1600x1200 пикселей с помощью программы обработки изображений Image-Pro Plus 4.1 оценивался процент некротических клеток на выделенном участке.

Количество апоптозных ГК подсчитывалось на 2 мм длины аксона в относительных единицах (число ГК на 2мм длины аксона), что позволяет более точно определить уровень апоптозной гибели клеток. Это связано с тем, что их процент невысокий и составляет около 5% от всего числа глиальных клеток. Изменения уровня апоптоза не обязательно должны сопровождаться заметными изменениями общего количества погибших клеток, на 95% определяемых некрозом.

Некроз нейронов определялся по красной окраске ядер (рис. 9, большие стрелки).

2.3 Гистохимическое исследование локализации NADPH-диафоразы и ее активности при ФД-воздействии

Цитохимическую активность и локализацию NO-синтазы оценивали по NADPH-диафоразной активности с использованием в качестве субстрата β -NADPH и нитротетразолиевого синего (НТС) – в качестве акцептора электронов [Scherer-Singler et al., 1983, Dawson et al. 1991; Schuppe et al., 2001]. Никотинамидадениндинуклеотидфосфат (NADPH) один из кофакторов NO-синтазы. NADPH-диафораза образует NADPH, вызывающий восстановление NO-синтазы в нитротетразолевым синим (НТС). Следовательно, экспрессия NADPH-диафоразы может рассматриваться как маркер присутствия NO-синтазы в нейронах.

Смесь для окрашивания содержала смесь 1 мл раствора НТС (10мг НТС в 1мл Triton X-100-Tris), 100 мкл β -NADPH (50мг в 1мл Tris), 4мл Triton X-100-Tris (100мкл Triton X-100 в 100мл Tris). Окрашивание проводилось через 1 ч после выделения нейрона в контрольной группе препаратов, непосредственно после ФД-воздействия и через 4 часа после него в экспериментальных группах. Нейроны инкубировались в смеси для окрашивания в течение 1ч. Далее препараты тщательно промывались физиологическим раствором. Для фиксации препаратов использовали 0,2% глutarовый альдегид. Через 10 мин после фиксации препараты промывались AqD. Затем препараты фотографировали, и производили обработку изображений в программе Image-Pro Plus 6.0.

2.4 Иммунофлуоресцентное исследование локализации нейрональной и индуцибельной NO-синтазы

Исследование проводилось посредством метода непрямой иммунофлуоресценции, основанного на выявлении комплекса антиген — антитело с помощью люминесцирующей иммунной сыворотки против IgG-антител.

Антитела anti-nNOS (Sigma-Aldrich), разведенные в соотношении 1:100 в PBS, и антитела anti-iNOS (Sigma-Aldrich) (1:100 в PBS), использовались как первичные антитела. В качестве вторичных антител использовали Alexa-Fluor 488 (1:500). Иммунофлуоресцентное исследование проводилась по стандартной методике. Препараты рецептора растяжения рака фиксировались 4% раствором PFA в PBS. Затем отмывались от PFA смесью 1% BSA, 0,2% NaN_3 и 2% Triton X-100. Далее инкубировались в растворе первичных антител в PBS. Впоследствии, препараты отмывали, инкубировали в растворе вторичных антител, снова отмывали, заключали в глицерин под покровное стекло, и фотографировали с использованием флуоресцентного микроскопа Zeiss.

2.5 Исследование флуоресценции NO-специфического зонда DAF-2DA в рецепторе растяжения рака

Исследование флуоресценции NO-специфического флуоресцентного зонда 4,5-диаминофлуоресцеина диацетата (DAF-2DA) проводилось в соответствии со стандартной методикой.

В клетке DAF-2DA гидролизуется неспецифическими внутриклеточными эстеразами, и превращается в нефлуоресцирующий 4,5-диаминофлуоресцеин (DAF-2) (рис. 10). DAF-2, взаимодействуя с эндогенным NO, образует флуоресцирующее соединение диаминофлуоресцеин триазол (DAF-2T).

В экспериментах по исследованию продукции NO в рецепторе растяжения рака физиологический раствор в ванночке замещался DAF-2DA, разведенном в отношении 1:500 в физиологическом растворе. Препараты инкубировались в растворе DAF-2DA 60 мин для загрузки красителя. Затем препараты 5 раз отмывались в физиологическом растворе, чтобы удалить избыток красителя. Все манипуляции проводились в темновых условиях.

В качестве контроля продукции NO проводились эксперименты, в которых до инкубации с флуоресцентным зондом DAF-2DA проводилась инкубация рецепторов растяжения с NO-скавенджером PTIO (500мкМ) и ингибитором нейрональной NO-синтазы L-NAME (10мМ) в течение 1 ч. Затем рецепторы также 5 раз отмывались физиологическим раствором, и затем уже инкубировались в течение 60 мин в растворе DAF-2DA (1:500). В серии экспериментов по исследованию динамики продукции NO при ФД-воздействии, после инкубации с DAF-2DA (1:500) в ванночку добавляли фотосенсибилизатор Фотосенс ($1 \cdot 10^{-8}$ М). После 30-минутной инкубации с фотосенсибилизатором препараты облучались диодным лазером (670 нм, 0,4 Вт/см²).

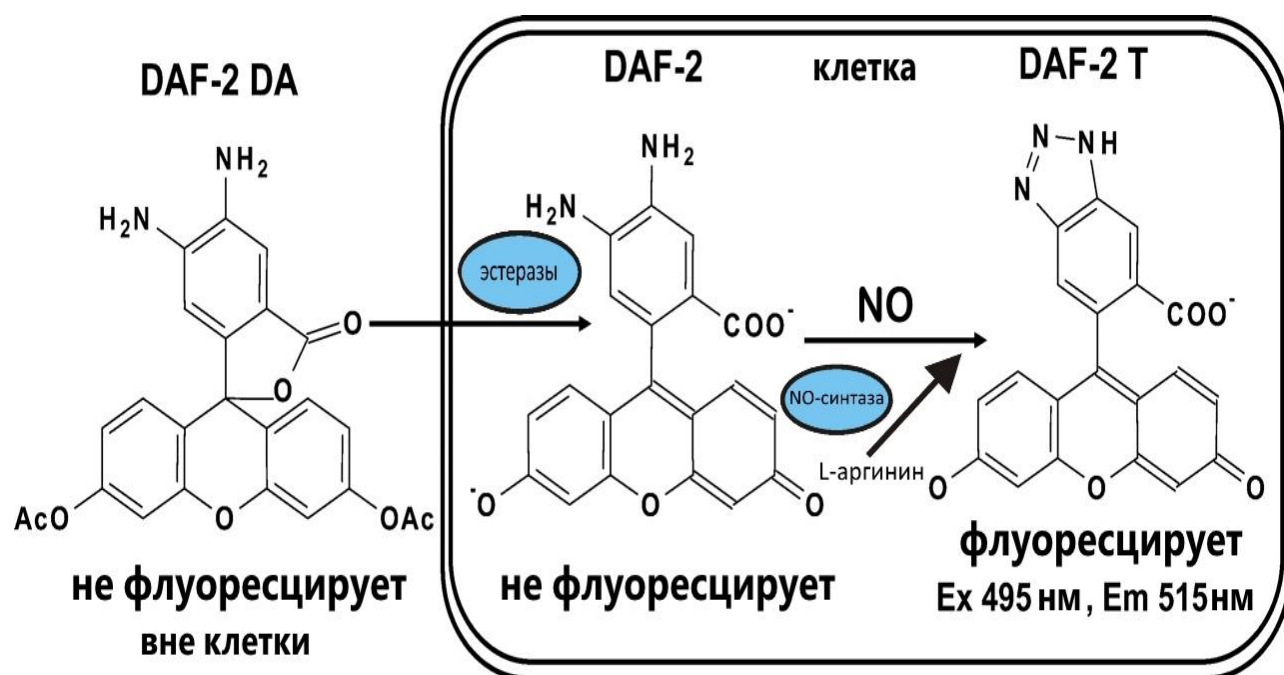


Рис 10. Механизм флуоресценции DAF-2DA в живой клетке нейрона [по Tarpey et al., 2004]

Более высокая по сравнению с гистохимическим исследованием мощность лазера была обусловлена конструкцией установки для исследования флуоресценции DAF-2DA и задачей изучить *in vivo* изменение концентрации NO при ФД-воздействии. Таким образом, мощность лазера в этом случае была вдвое больше мощности лазера в случае гистохимического исследования. Препараты фотографировали до ФД-воздействия, а также спустя 1, 4, 7, 10, 15, 20, 25, 30 и 40 мин ФД-воздействия. Затем интенсивность флуоресценции оценивалась в программе ImagePRO.

2.6 Статистическая обработка результатов

Для статистической оценки отличий препаратов в различных экспериментальных группах использовался одномерный однофакторный дисперсионный анализ (One Way ANOVA). Отличия рядов считались достоверными при уровне значимости $p < 0.05$. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Влияние NO на нейроны в темновых условиях и при ФД-воздействии

3.1.1 В темновых условиях NO не влияет на выживаемость нейронов

В экспериментах контрольной серии опытов с препаратами, не подвергавшимися никаким воздействиям, изолированные нейроны работали в темноте в среднем 6–8 часов. Затем частота импульсов постепенно уменьшалась до полной инактивации нейрона.

Ядра нейронов отличаются четкой границей, сравнительно однородным распределением флуоресценции Hoechst-33342, что свидетельствует о выраженной деконденсации хроматина и высоком уровне биосинтетических процессов (рис. 11). Ядра глиальных клеток вокруг нейрона имеют округлую форму, а вокруг аксонов – вытянутую. Они меньше ядер нейронов и отличаются более яркой флуоресценцией, что свидетельствует о большей конденсации хроматина и меньшем уровне биосинтетических процессов.

NO-генераторы SNP (10 мкМ) и NONOate (100 мкМ), ингибиторы nNOS L-NAME (1 мМ) и L-NNA (1 мМ), активатор растворимой гуанилатциклазы YC-1 (5 мкМ) и ее ингибитор ODQ (10 мкМ), а также ингибитор протеинкиназы G KT5823 (10 мкМ) не влияли на продолжительность импульсной активности (время жизни) и некроз МРН в темновых условиях (таблица 1). Это свидетельствует о том, что NO не участвует в процессах повреждения нейронов в темновых условиях.

Спонтанный некроз нейронов и глиальных клеток, а также апоптоз глиальных клеток практически не наблюдался.

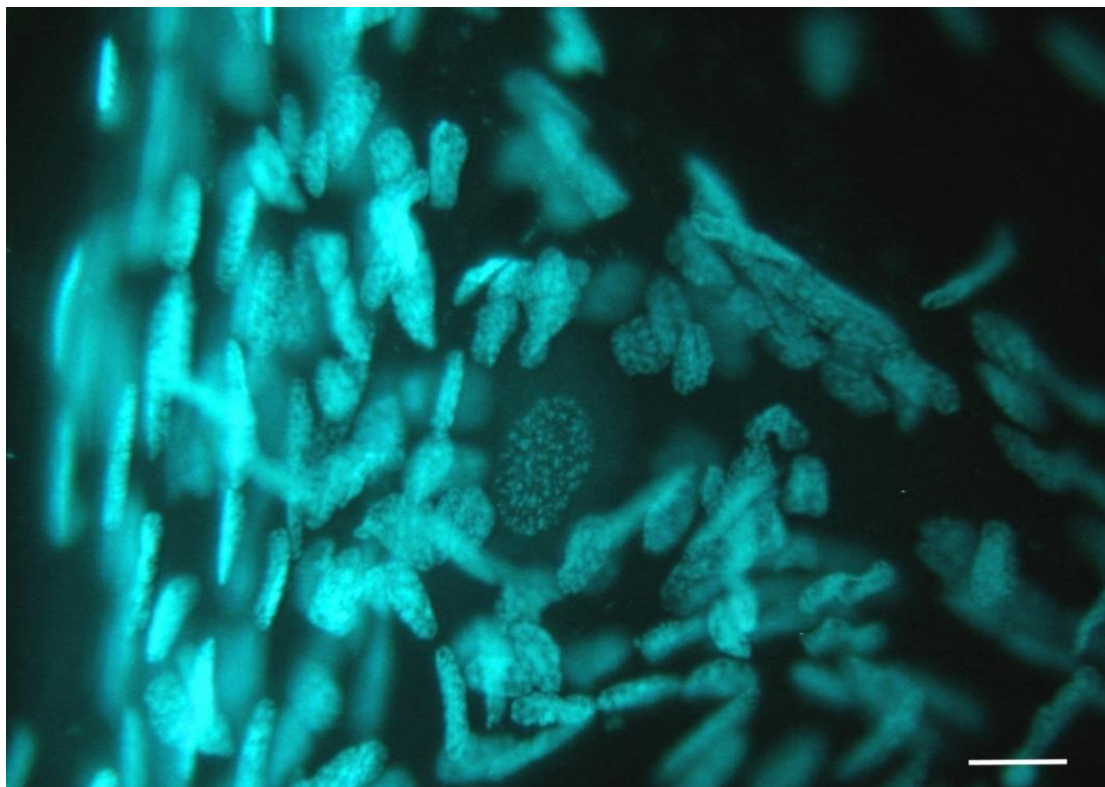


Рис. 11. Микрофотография одного из препаратов серии опытов контрольной группы, в которой нейроны и глиальные клетки не подвергались некрозу и апоптозу

Обозначения: Масштабный отрезок 20 мкм

Таблица 1. Влияние модуляторов NO-зависимых сигнальных процессов – генераторов NO (SNP, NONOate), активатора sGC (YC-1), ингибиторов nNOS и iNOS (L-NAME, L-NNA, L-NIL, SMT), гуанилатциклазы (ODQ) и протеинкиназы G (KT5823) на продолжительность импульсной активности и некроз нейронов в темновых условиях

		1-Контроль	2-Модулятор
NONOate, 100 мкМ	Время жизни нейрона, мин	370 ± 40 (6)	270 ± 50 (4)
	Некроз нейронов,%	0 ± 0 (9)	0 ± 0 (8)
SNP, 10 мкМ	Время жизни нейрона, мин	390 ± 20 (4)	220 ± 80 (4)
	Некроз нейронов,%	2 ± 2 (10)	3 ± 3 (10)
L-NAME, 1 мМ	Время жизни нейрона, мин	370 ± 30 (8)	340 ± (6)
	Некроз нейронов,%	0 ± 0 (12)	33 ± 17 (9)
L-NNA, 1 мМ	Время жизни нейрона, мин	610 ± 70 (15)	450 ± 50 (9)
	Некроз нейронов,%	0 ± 0 (17)	0 ± 0 (12)
SMT, 50 мкМ	Время жизни нейрона, мин	400 ± 30 (6)	140 ± 20 (6)***1
	Некроз нейронов,%	0 ± 0 (10)	57 ± 9 (7)***1
L-NIL, 100 мкМ	Время жизни нейрона, мин	341 ± 43 (6)	209 ± 39 (6)*1
	Некроз нейронов,%	0 ± 0 (12)	0 ± 0 (12)
YC-1, 5 мкМ	Время жизни нейрона, мин	342.6 ± 60.5 (5)	402.6 ± 53 (5)
	Некроз нейронов,%	0 ± 0 (10)	0 ± 0 (10)
ODQ, 10 мкМ	Время жизни нейрона, мин	294.5 ± 42.5 (5)	221 ± 41 (5)
	Некроз нейронов,%	0 ± 0 (10)	0 ± 0 (10)
KT5823, 10 мкМ	Время жизни нейрона, мин	370 ± 30.2(5)	430 ± 21.4
	Некроз нейронов,%	11 ± 7 (9)	7 ± 4 (8)

Примечание: В скобках указано число экспериментов в каждой серии. * – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$

Однако, ингибиторы индуцибельной NO-синтазы, SMT (50мкМ) и L-NIL (100мкМ), изменяли время жизни МРН в темновых условиях. Ингибитор iNOS, L-NIL, снижал время жизни нейрона в темновых условиях с 341 ± 43 мин до 209 ± 39 мин ($p < 0,05$). Другой ингибитор iNOS, SMT, не только снижал время жизни нейронов с 400 ± 30 мин до 140 ± 20 мин ($p < 0,001$), но и увеличивал их некроз до 57 ± 9 % ($p < 0,001$). Это говорит о возможном участии NO, синтезированного индуцибельной изоформой фермента в поддержании импульсной активности механорецепторных нейронов.

3.1.2 При ФД-воздействии NO, синтезированный iNOS, участвует в изменении продолжительности импульсной активности нейронов

Ингибиторы iNOS, SMT (50мкМ) и L-NIL (100мкМ), разнонаправленно изменяли продолжительность импульсной активности механорецепторных нейронов рецептора растяжения речного рака при ФД-воздействии (Рис 12).

SMT продлевал продолжительность импульсной активности нейрона при ФДТс 13.1 ± 1.9 мин до 31.7 ± 3.6 мин ($p < 0,05$). Другой ингибитор iNOS, L-NIL, снижал её с 25.2 ± 2.8 мин до 9.7 ± 0.7 мин ($p < 0,05$).

Это говорит о том, что продукция NO в результате активации iNOS, изменяет характер электрофизиологической реакции механорецепторных нейронов не только в темновых условиях, но и при ФД-воздействии, причем, в случае SMT, разнонаправленно.

3.1.3 NO, синтезированный nNOS, не влияет на ФД индуцированные изменения импульсной активности нейронов

Ингибиторы нейрональной изоформы фермента (nNOS) L-NAME (1 мМ) и L-NNA (1 мМ) не влияли на продолжительность импульсной активности нейронов при ФД-воздействии (рис.13). Продолжительность импульсной активности нейронов при ФД-воздействии без L-NAME была 23.4 ± 1.34 мин, стала 19.8 ± 2.1 мин. При исследовании L-NNA продолжительность импульсной активности нейронов при ФД-воздействии была 20.3 ± 1.9 мин, с модулятором стала 20.2 ± 3.0 мин.

Таким образом, NO, синтезированный nNOS, достоверно не изменяет продолжительность импульсной активности нейронов при фотодинамическом воздействии.

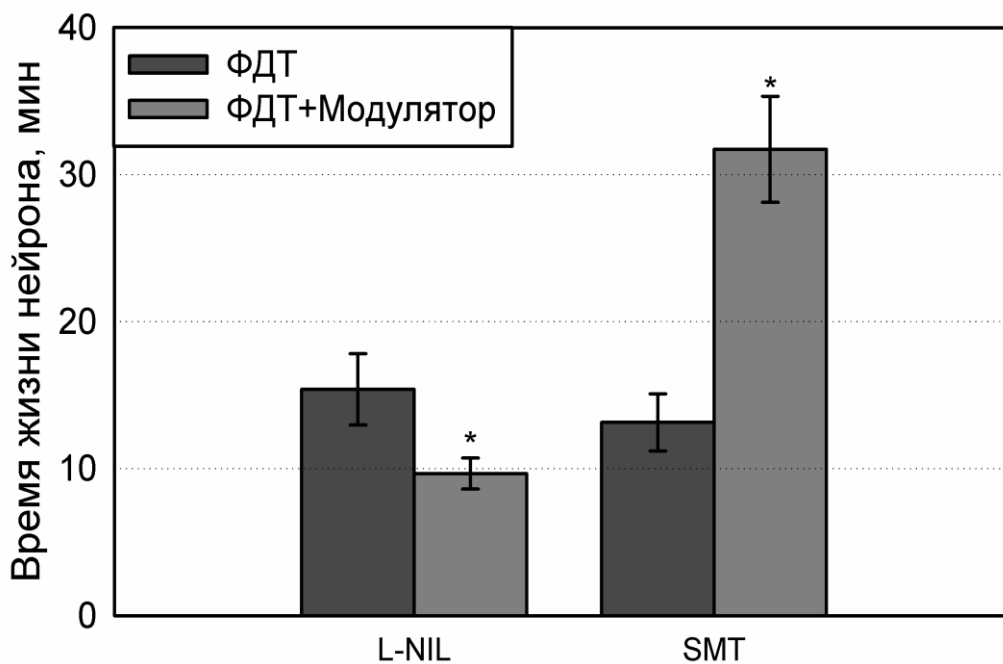


Рис. 12. Влияние ингибиторов индуцибельной изоформы NO-синтазы L-NIL (100мкМ) и SMT (50 мкМ) на продолжительность импульсной активности нейронов речного рака при ФД-воздействии, * – $p < 0,05$

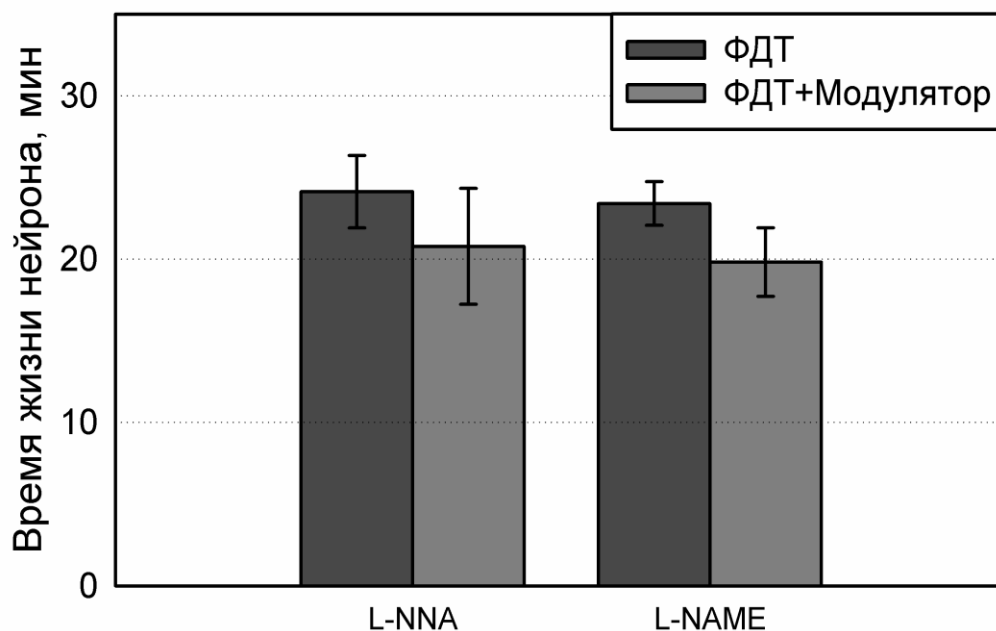


Рис. 13. Влияние ингибиторов нейрональной изоформы NO-синтазы L-NAME (1 мМ) и L-NNA (1 мМ) на продолжительность импульсной активности нейронов речного рака при ФД-воздействии

3.1.4 При ФД-воздействии растворимая гуанилатциклаза не влияет на продолжительность импульсной активности нейронов посредством сигнального пути NO/sGC/cGMP/PKG

Ингибитор растворимой гуанилатциклазы ODQ (10 мкМ), так же, как и ингибитор индуцибельной NO-синтазы L-NIL (100 мкМ), снижал продолжительность импульсной активности нейронов при ФД-воздействии (рис.14). ODQ достоверно снижал этот параметр с 18.3 ± 1.3 мин до 12.2 ± 3.1 мин ($p < 0,05$).

По-видимому, cGMP, синтезируемый растворимой гуанилатциклазой поддерживал импульсную активность механорецепторного нейрона рецептора растяжения речного рака, хотя это подтверждается только в случае использования ODQ.

Активатор растворимой гуанилатциклазы YC-1 (5мкМ) и ингибитор протеинкиназы G KT5823(10мкМ) достоверно не изменяли продолжительность импульсной активности нейронов при ФД-воздействии.

Следовательно, протеинкиназа G, по-видимому, не участвует в регуляции нейронной активности рецептора растяжения речного рака при ФД-воздействии.

3.1.5 Экзогенная генерация NO не влияет на ФД индуцированные изменения импульсной активности нейронов

Экзогенная генерация NO с помощью NO-генераторов SNP (10 мкМ), NONOate (100 мкМ) не оказывала влияния на продолжительность импульсной активности нейронов при ФД-воздействии (рис.15).

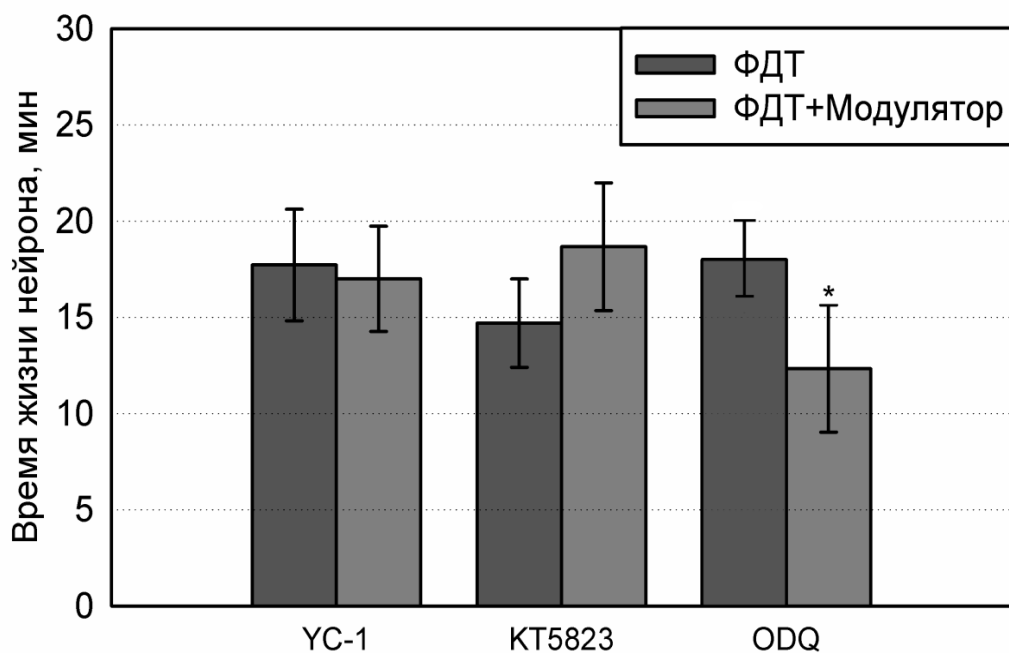


Рис. 14. Влияние модуляторов сигнального пути NO/sGC/cGMP/PKG, ингибитора sGC ODQ (10 мкМ), активатора sGC YC-1 (5мкМ) и ингибитора PKG KT5823 (10мкМ), на продолжительность импульсной активности нейронов речного рака при ФД-воздействии, * – $p < 0,05$

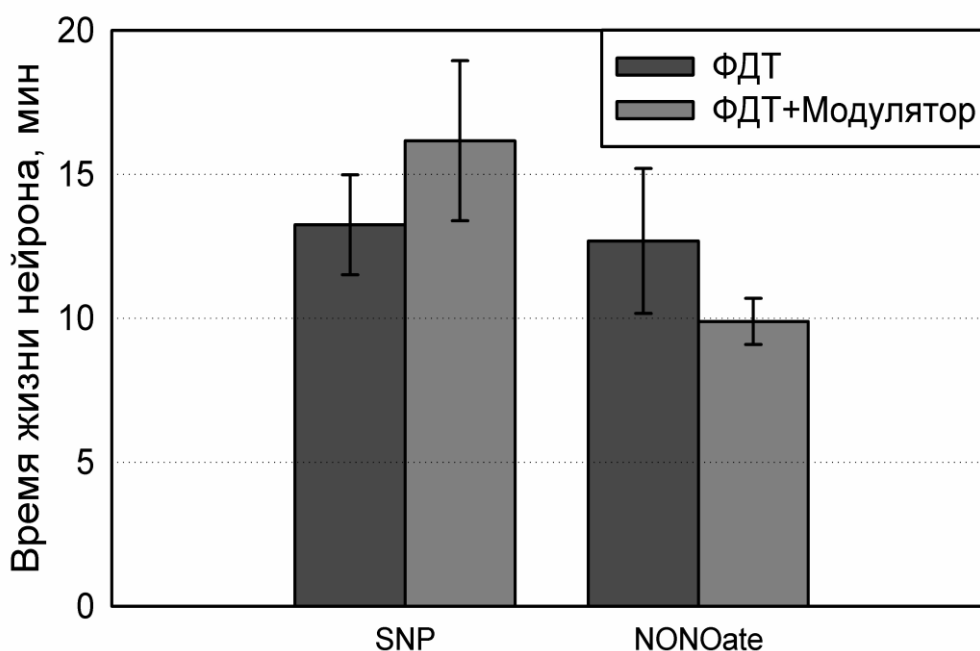


Рис. 15. Влияние экзогенных NO-генераторов SNP (10 мкМ) и NONOate (100 мкМ) на продолжительность импульсной активности нейронов речного рака при ФД-воздействии

При исследовании SNP продолжительность импульсной активности нейронов при ФД-воздействии без генератора была 13.8 ± 1.7 мин, с генератором стала 16.2 ± 2.8 мин. При исследовании NONOate продолжительность импульсной активности нейронов при ФД-воздействии без генератора была 13.1 ± 3.0 мин, с генератором стала 9.9 ± 2.6 мин. В этом случае, можно говорить лишь о наличии неких тенденций SNP увеличивать, а NONOate уменьшать продолжительность импульсной активности нейронов при ФД-воздействии.

3.1.6 Экзогенный NO уменьшает ФД индуцированный некроз нейронов без участия NO-синтаз

Применение NO-генератора NONOate (100 мкМ) достоверно снижало некроз нейронов при ФД-воздействии с 59 ± 11 отн.ед. до 37 ± 5 отн.ед. ($p < 0,05$) (рис. 16).

Другой NO-генератор SNP (10 мкМ) имел сходную тенденцию к снижению некроза нейронов, при ФД-воздействии некроз нейронов был 92 ± 4 отн.ед., а при комбинированном воздействии ФДТ + SNP некроз нейронов стал 71 ± 7 отн.ед. Менее выраженные изменения в случае SNP, по сравнению с NONOate могут быть обусловлены тем, что SNP применялся в меньшей концентрации.

Ингибиторы индуцибельной NO-синтазы SMT (50мкМ) и L-NIL (100мкМ) достоверно не изменяли ФД индуцированный некроз нейронов рецептора растяжения рака (рис. 17). При исследовании влияния ингибиторов нейрональной NO-синтазы L-NAME (1 мМ) и L-NNA (1 мМ) на некроз нейронов так же не было выявлено достоверных отличий (рис. 18).

Это говорит о том, что при ФД-воздействии NO-синтазы не участвуют в сигнальных механизмах, обеспечивающих устойчивость нейронов к ФД индуцированному некрозу.

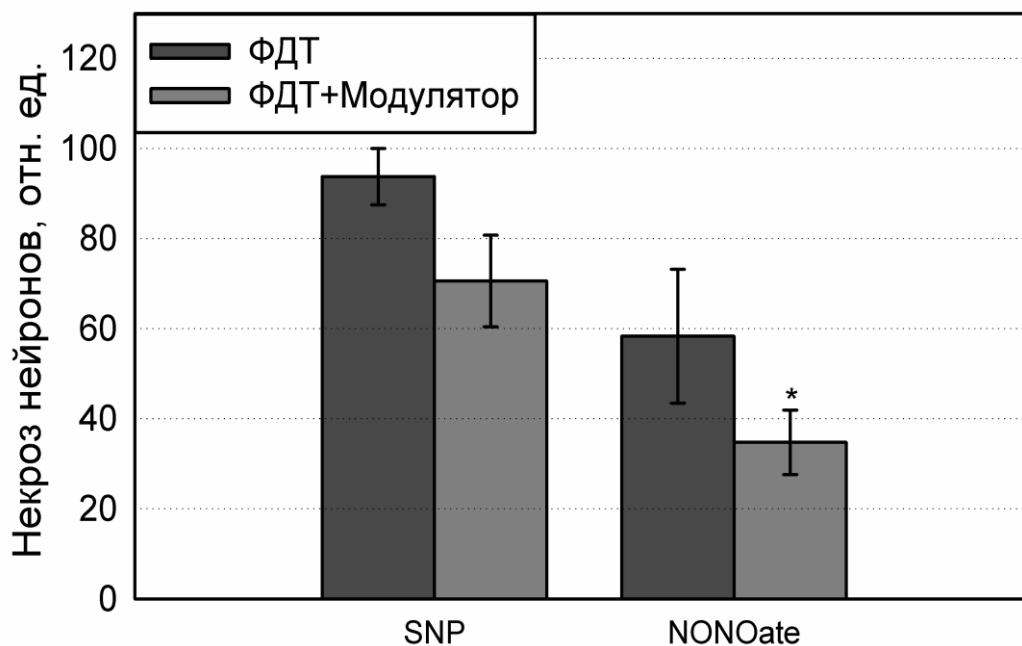


Рис. 16. Влияние экзогенных NO-генераторов SNP (10 мкМ) и NONOate (100 мкМ) на некроз нейронов речного рака при ФД-воздействии, * – $p < 0,05$

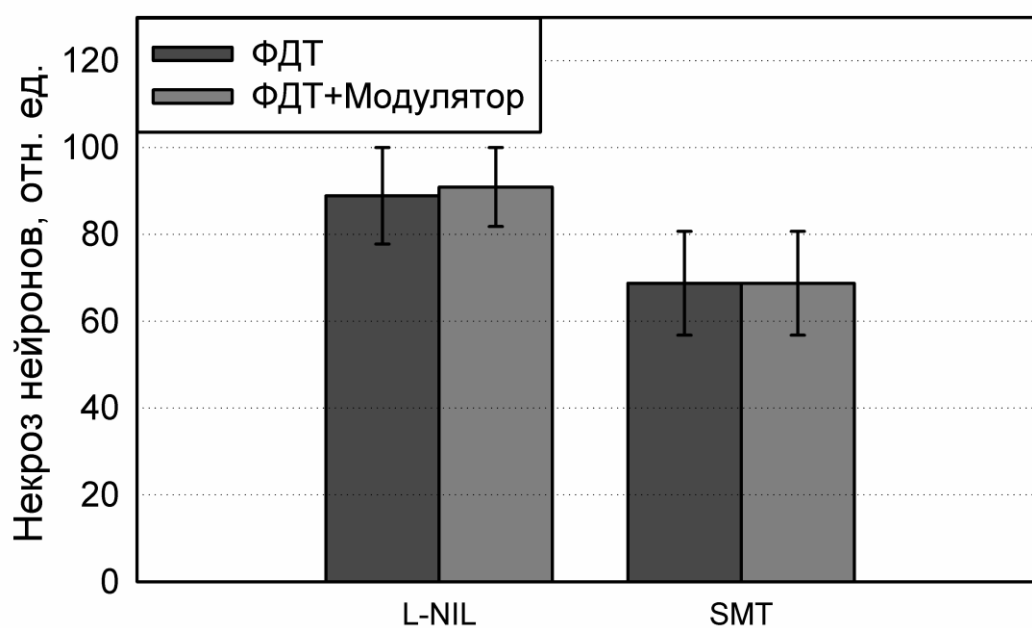


Рис. 17. Влияние ингибиторов индуцибельной изоформы NO-синтазы L-NIL (100мкМ) и SMT (50 мкМ) на некроз нейронов речного рака при ФД-воздействии

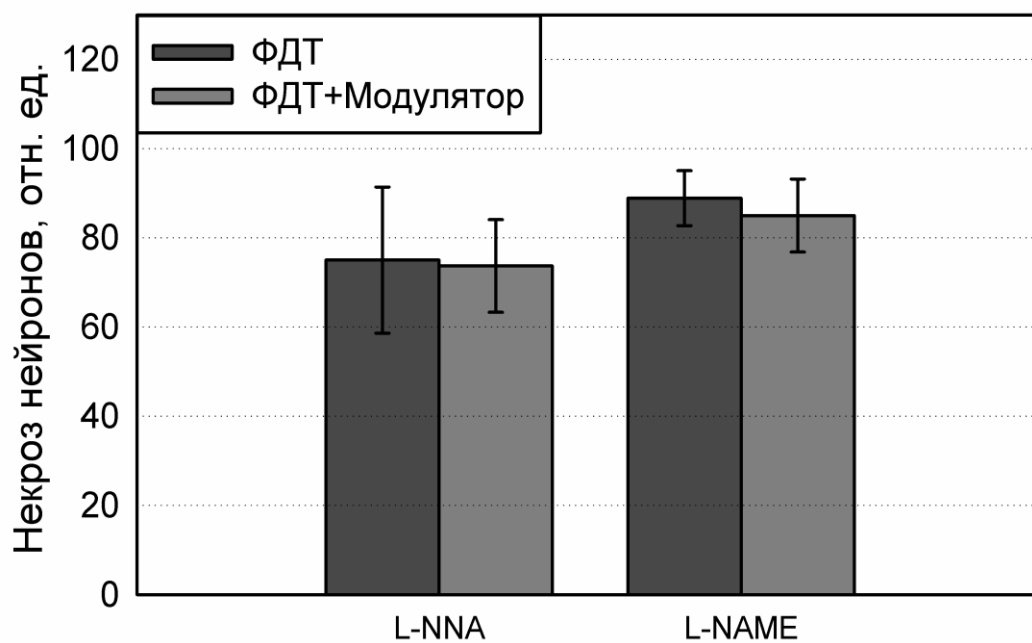


Рис. 18. Влияние ингибиторов нейрональной изоформы NO-синтазы синтазы L-NAME (1 мМ) и L-NNA (1 мМ) на некроз нейронов речного рака при ФД-воздействии

3.1.7 Сигнальный путь NO/sGC/cGMP/PKG участвует в ФД индуцированном некрозе нейронов

Ингибитор протеинкиназы G KT5823 (10мкМ) так же, как и NO генераторы значительно снижал уровень ФД индуцированного некроза механорецепторных нейронов рака с 97.2 ± 2.1 до 55.4 ± 11.2 % ($p < 0.05$). Следовательно, протеинкиназа G оказывает пронекрозное действие на нейроны рецептора растяжения рака при ФД-воздействии (рис.19).

Ингибитор растворимой гуанилатциклазы ODQ (10 мкМ) не влиял на уровень ФД индуцированного некроза рецептора растяжения рака. Активатор растворимой гуанилатциклазы YC-1 (5мкМ) также достоверно не изменял ФД индуцированный некроз механорецепторных нейронов. То есть, растворимая гуанилатциклаза, по-видимому, не задействована в реализации процессов ФД индуцированного некроза механорецепторных нейронов рецептора растяжения рака.

3.2 Влияние NO-зависимых сигнальных механизмов на процессы повреждения глиальных клеток в темновых условиях и при ФД-воздействии

3.2.1 В темновых условиях NO не участвует в выживаемости глиальных клеток

NO-генераторы SNP (10 мкМ) и NONOate (100мкМ), ингибиторы нейрональной NO-синтазы L-NAME (1 мМ) и L-NNA (1 мМ), ингибитор индуцибельной NO-синтазы L-NIL (100мкМ) не влияли уровни некроза и апоптоза глиальных клеток в темновых условиях (таблица 2).

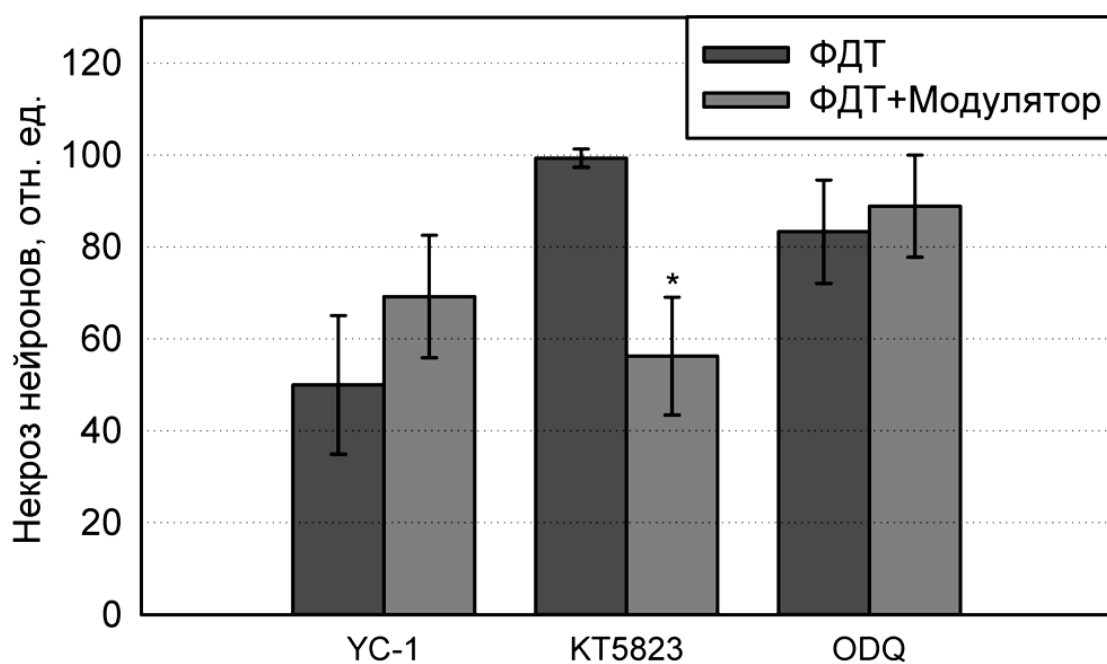


Рис. 19. Влияние модуляторов сигнального пути NO/sGC/cGMP/PKG, ингибитора sGC ODQ (10 мкМ), активатора sGC YC-1 (5мкМ) и ингибитора PKG KT5823 (10мкМ), на некроз нейронов речного рака при ФД-воздействии,* – $p < 0,05$

Таблица 2. Влияние модуляторов NO-зависимых сигнальных процессов – генераторов NO (SNP, NONOate), активатора sGC (YC-1), ингибиторов NOS (L-NAME, L-NNA, L-NIL, SMT), гуанилатциклазы (ODQ) и протеинкиназы G (KT5823) на показатели выживаемости ГК в темновых условиях.

		1-Контроль	2-Модулятор
NONOate, 100 мкМ	Некроз глии, %	0.3 ± 0.2 (6)	2 ± 1(4)
	Апоптоз глии, отн. ед.	0.8 ± 0.3 (6)	3.2 ± 1.3 (4)
SNP, 10 мМ	Некроз глии, %	0.4 ± 0.4 (5)	2 ± 2 (4)
	Апоптоз глии, отн. ед.	2.5 ± 1.2 (4)	5.2 ± 2.0 (4)
L-NAME, 1 мМ	Некроз глии, %	6 ± 2.5 (8)	13 ± 5 (7)
	Апоптоз глии, отн. ед.	4.1 ± 1.1 (7)	2.4 ± 0.8 (7)
L-NNA, 1 мМ	Некроз глии, %	2 ± 1 (11)	6 ± 3 (7)
	Апоптоз глии, отн. ед.	2.5 ± 1.0 (11)	2.3 ± 1.6 (6)
SMT, 50 мкМ	Некроз глии, %	1 ± 0.4 (6)	29 ± 6 (5)***
	Апоптоз глии, отн. ед.	1.5 ± 0.6 (6)	2.8 ± 1.2 (6)
L-NIL, 100 мкМ	Некроз глии, %	5 ± 2.7 (6)	7.7 ± 1.2 (6)
	Апоптоз глии, отн. ед.	5 ± 1 (6)	4 ± 1 (6)
YC-1, 5 мкМ	Некроз глии, %	2.8 ± 1.4 (5)	2.6 ± 1.9 (5)
	Апоптоз глии, отн. ед.	5.8 ± 0.7 (5)	11.8 ± 2.4 (5)**
ODQ, 10 мкМ	Некроз глии, %	3 ± 1.2 (5)	6 ± 2.5 (5)
	Апоптоз глии, отн. ед.	2.3 ± 0.8 (5)	4.5 ± 0.5 (5) *
KT5823, 10 мкМ	Некроз глии, %	7 ± 2 (5)	5.2 ± 3 (5)
	Апоптоз глии, отн. ед.	8.5 ± 2.5 (5)	25 ± 7 (5)**

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$

Следовательно, экзогенный NO, и нейрональная NO-синтаза не участвуют в повреждении глиальных клеток рецептора растяжения рака в темновых условиях.

Активатор растворимой гуанилатциклазы YC-1 (5 мкМ) в темновых условиях усиливал уровень апоптоза глиальных клеток с 5.8 ± 0.7 отн.ед. до 11.8 ± 2.4 отн.ед. ($p < 0,01$).

Таким образом, в темновых условиях cGMP, синтезируемый растворимой гуанилатциклазой, участвует в апоптозе глиальных клеток.

Однако другой модулятор сигнального пути NO/sGC/cGMP/PKG ингибитор растворимой гуанилатциклазы ODQ (10мкМ) не влиял на показатели выживаемости глиальных клеток. Ингибитор протеинкиназы G KT5823 (10 мкМ) увеличивал уровень апоптоза глиальных клеток с 8.5 ± 2.5 отн. ед. до 25 ± 7 отн. ед. ($p < 0.05$) Вероятно, в темновых условиях апоптоз в рецепторе растяжения рака реализуется через cGMP, но не посредством активации PKG. На некроз

глиальных клеток модуляторы сигнального пути NO/sGC/cGMP/PKG в темновых условиях влияния не оказывали.

Ингибитор индуцибельной NO-синтазы SMT (50мкМ) в темновых условиях увеличивал некроз глиальных клеток рецептора растяжения рака с $1 \pm 0.4 \%$ до $29 \pm 6 \%$ ($p < 0,001$). Это говорит о возможном участии NO, синтезированного индуцибельной NO-синтазой в процессах некроза глиальных клеток в темновых условиях.

3.2.2 Экзогенная генерация NO уменьшает ФД индуцированный некроз глиальных клеток

NO-генератор SNP (10 мкМ) достоверно снижал уровень ФД индуцированного некроза глиальных клеток рецептора растяжения рака с $69.2 \pm 4.3 \%$ до $37.8 \pm 6.8 \%$ ($p < 0.05$). Другой NO-генератор NONOate (100мкМ) также снижал уровень некроза глиии при ФД-воздействии с $48.5 \pm 6.2 \%$ до $27.9 \pm 5.9 \%$ ($p < 0.05$) (рис. 20). Таким образом, экзогенная генерация NO защищает глиальные клетки рецептора растяжения рака от ФД индуцированного некроза.

3.2.3 При ФД-воздействии растворимая гуанилатциклаза участвует в некрозе глиальных клеток

Ингибитор растворимой гуанилатциклазы ODQ (10 мкМ) увеличивал ФД индуцированный некроз глиальных клеток рецептора растяжения рака с $48 \pm 6.3 \%$ до $61.5 \pm 3.8 \%$ ($p < 0.05$) (рис. 21).

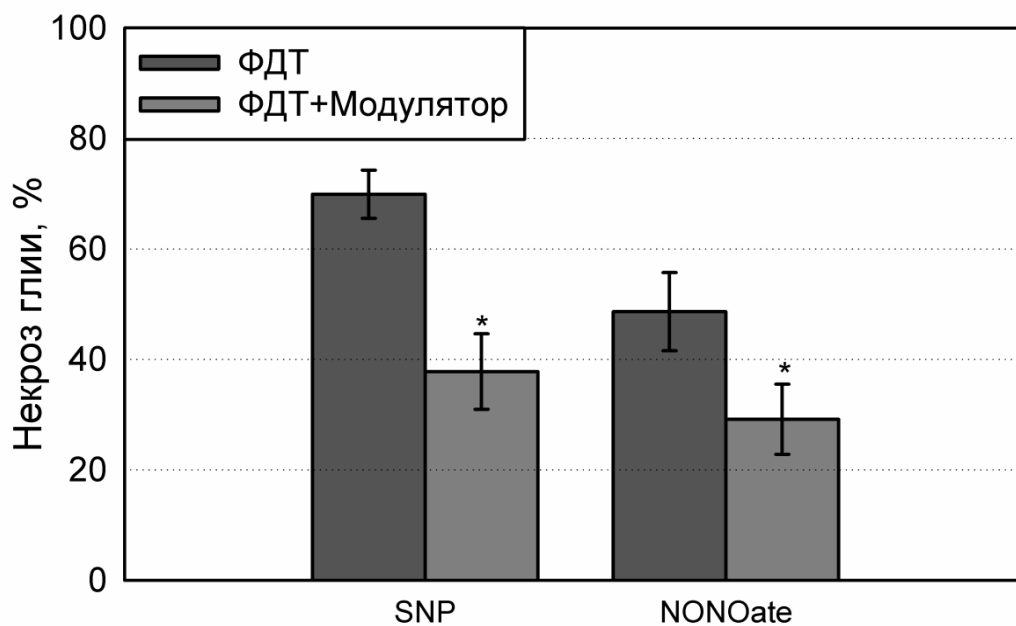


Рис. 20. Влияние экзогенных NO-генераторов SNP (10 мкМ) и NONOate (100 мкМ) на некроз глиальных клеток речного рака при ФД-воздействии,

* – $p < 0,05$

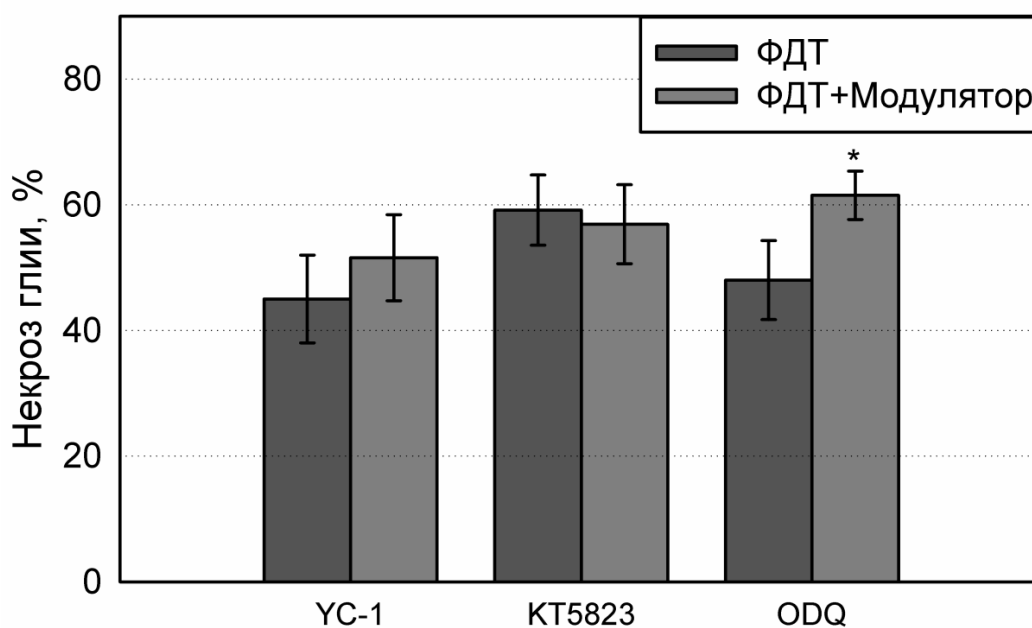


Рис. 21. Влияние модуляторов сигнального пути NO/sGC/cGMP/PKG ингибитора sGC ODQ (10 мкМ), активатора sGC YC-1 (5мкМ) и ингибитора PKG KT5823 (10мкМ) на некроз глиальных клеток речного рака при ФД-

воздействии, * – $p < 0,05$

Следовательно, можно говорить о том, что растворимая гуанилатциклаза может участвовать в процессах некроза глиальных клеток при ФД-воздействии, а именно, снижает некроз глии. Активатор растворимой гуанилатциклазы YC-1 (5 мкМ) при этом достоверно не изменял ФД индуцированный некроз глиальных клеток.

Ингибитор протеинкиназы G KT5823 (10 мкМ) не влиял на уровень ФД индуцированного некроза глиальных клеток (рис. 21). Вероятно, протеинкиназа G не участвует в некрозе глиальных клеток при ФД-воздействии.

3.2.4 nNOS участвует в ФД индуцированном некрозе глиальных клеток

Ингибитор нейрональной NO-синтазы L-NAME (1мМ) оказывал противоположное NO-генераторам действие, а именно, увеличивал ФД индуцированный некроз глиальных клеток с $68 \pm 3 \%$ до $81 \pm 2 \%$ ($p < 0.05$) (рис. 22). При этом другой ингибитор NO-синтазы L-NNA (1 мМ) достоверно не изменял ФД индуцированный некроз глиальных клеток.

Таким образом, вероятно, при ФД-воздействии некротические процессы в глиальных клетках рецептора растяжения рака реализуются с участием нейрональной NO-синтазы.

3.2.5 iNOS не участвует в ФД индуцированном некрозе глиальных клеток

Ингибитор индуцибельной NO-синтазы SMT (50мкМ) не влиял на некроз глиальных клеток рецептора растяжения рака при ФД-воздействии. Другой ингибитор этой изоформы фермента L-NIL (100мкМ) также не влияли на ФД индуцированный некроз глии (рис. 23).

Следовательно, индуцибельная NO-синтаза не участвует в развитии ФД индуцированного некроза глиальных клеток рецептора растяжения рака.

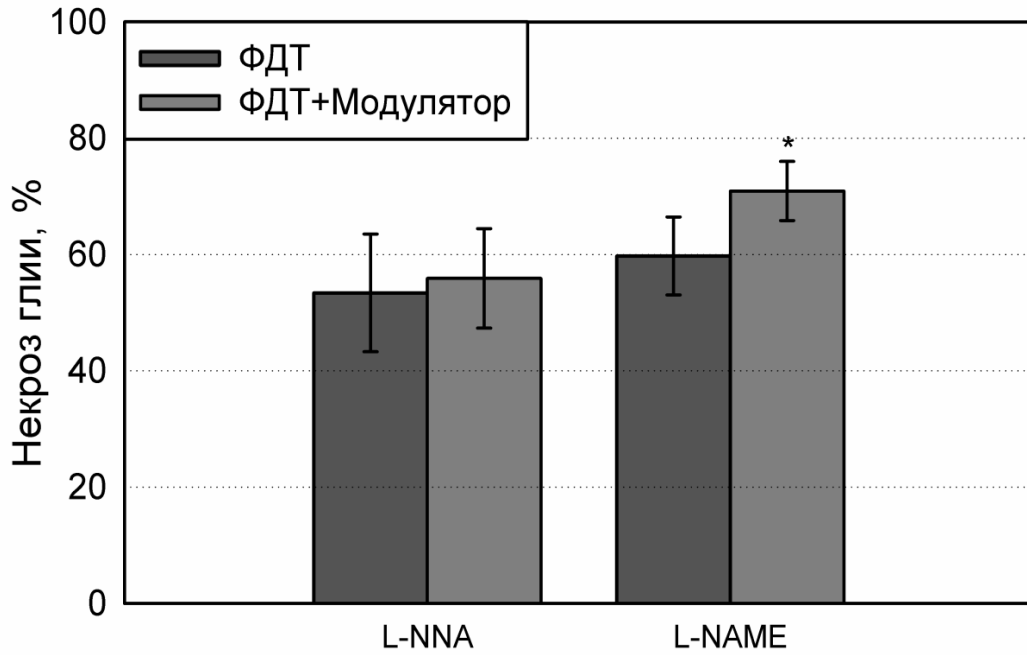


Рис. 22. Влияние ингибиторов нейрональной изоформы NO-синтазы синтазы L-NAME (1 мМ) и L-NNA (1 мМ) на некроз глиальных клеток речного рака при ФД-воздействии, * – $p < 0,05$

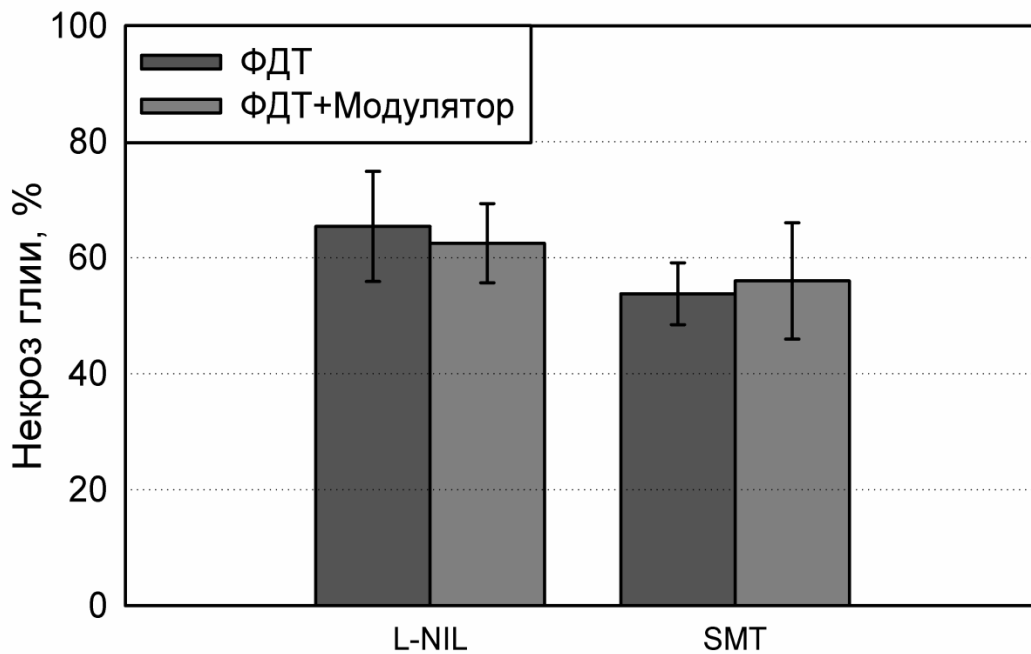


Рис. 23. Влияние ингибиторов индуцибельной изоформы NO-синтазы L-NIL (100мкМ) и SMT (50 мкМ) на некроз глиальных клеток речного рака при ФД-воздействии

3.2.6 Экзогенный NO увеличивает уровень ФД индуцированного апоптоза глиальных клеток

NO-генератор NONOate (100 мкМ) увеличивал ФД индуцированный апоптоз глиальных клеток с 13.5 ± 1.5 отн. ед. до 21.7 ± 1.9 отн. ед. ($p < 0,05$) (рис. 24).

Другой NO-генератор SNP (10 мкМ) проявлял сходную тенденцию к увеличению апоптоза глиальных клеток при ФД-воздействии, но изменения были недостоверны.

Таким образом, экзогенная генерация NO стимулирует апоптоз глиальных клеток при ФД-воздействии.

Ингибиторы индуцибельной NO-синтазы, SMT (50 мкМ) и L-NIL (100 мкМ), достоверно снижали уровень ФД индуцированного апоптоза глиальных клеток (рис. 25). При использовании L-NIL ФД индуцированный апоптоз уменьшался с 18.4 ± 3.4 отн. ед. до 6.3 ± 1 отн. ед. ($p < 0,01$). При применении SMT апоптоз глиии при ФД воздействии изменялся менее существенно, с 5.8 ± 0.8 отн. ед. до 3.4 ± 0.5 отн. ед. ($p < 0,05$).

Следовательно, индуцибельная изоформа NO-синтазы участвует в развитии апоптоза глиальных клеток при ФД-воздействии.

3.2.7 iNOS и nNOS участвуют в ФД индуцированном апоптозе глиальных клеток

Неспецифичные ингибиторы нейрональной NO-синтазы, L-NAME (1мМ) и L-NNA (1мМ), также снижали апоптоз глиальных клеток с при ФД-воздействии с 15.8 ± 4.1 отн. ед. до 5.4 ± 2.2 отн. ед. ($p < 0,01$) и с 27.2 ± 3.9 до 22.5 ± 3.0 ($p < 0,05$), соответственно (рис. 26).

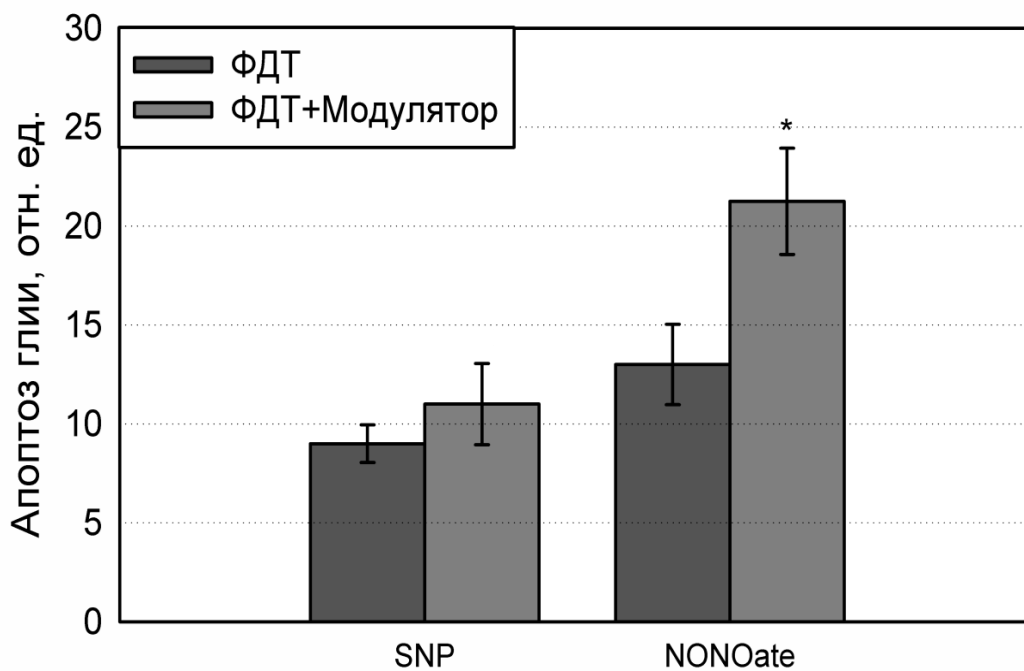


Рис. 24. Влияние экзогенных NO-генераторов SNP (10 мкМ) и NONOate (100 мкМ) на уровень апоптоза глиальных клеток речного рака при ФД-воздействии, * – $p < 0,05$

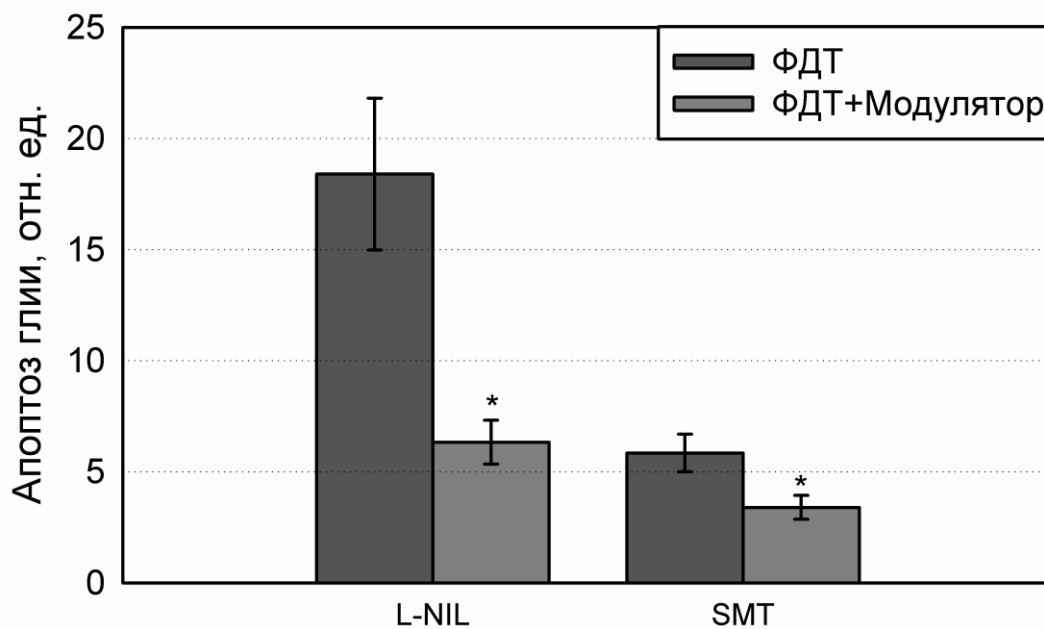


Рис. 25. Влияние ингибиторов индуцибельной изоформы NO-синтазы L-NIL (100мкМ) и SMT (50 мкМ) на апоптоз глиальных клеток речного рака при ФД-воздействии, * – $p < 0,05$

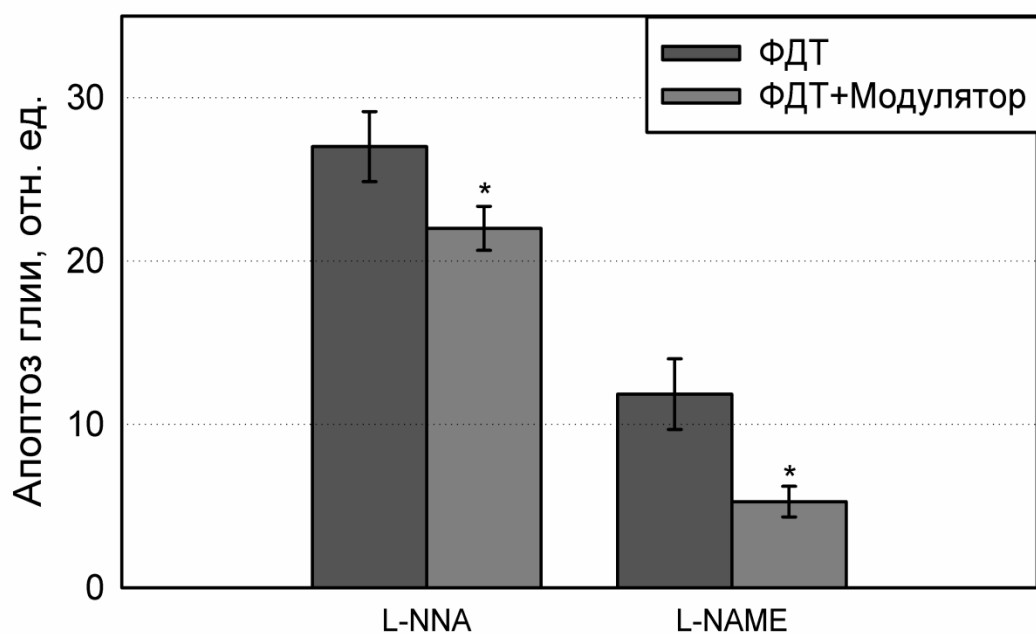


Рис. 26. Влияние ингибиторов нейрональной изоформы NO-синтазы синтазы L-NAME (1 мМ) и L-NNA (1 мМ) на уровень апоптоза глиальных клеток речного рака при ФД-воздействии, * – $p < 0,05$

Следовательно, в реализации проапоптозного эффекта NO на глиальные клетки при ФД-воздействии может участвовать и нейрональная изоформа фермента.

Однако в виду низкой специфичности ингибиторов нейрональной изоформы фермента, и более существенных изменений в уровне апоптоза под действием индуцибельной изоформы фермента, по-видимому, именно iNOS играет решающую роль в реализации ФД индуцированного апоптоза глиальных клеток рецептора растяжения рака.

3.2.8 При ФД-воздействии NO увеличивает уровень апоптоза глиальных клеток посредством сигнального пути NO/sGC/cGMP/PKG

Активатор растворимой гуанилатциклазы, YC-1 (5 мкМ), оказывал проапоптозное действие на глиальные клетки при ФД-воздействии, почти вдвое увеличивая ФД индуцированный апоптоз глии, а именно с 24.7 ± 4.5 отн.ед. до 42.3 ± 5.2 отн.ед. ($p < 0,05$) (рис. 27).

Таким образом, растворимая гуанилатциклаза, по-видимому, участвует в развитии апоптоза глиальных клеток при ФД-воздействии, и, как и при исследовании ФД индуцированного некроза глии, ее влияние сонаправлено с действием NO генераторов, а значит, и с действием NO.

Ингибитор растворимой гуанилатциклазы ODQ (10 мкМ) в исследуемой концентрации достоверно не изменял уровень ФД индуцированного апоптоза глиальных клеток рецептора растяжения рака (рис. 27).

Ингибитор протеинкиназы G, KT5823 (10 мкМ), при ФД-воздействии снижал уровень апоптоза глиальных клеток рецептора растяжения рака с 24.8 ± 2.2 отн.ед. до 8.7 ± 1.4 отн.ед. ($p < 0,05$) (рис. 27). То есть, протеинкиназа G, так же как и NO, и растворимая гуанилатциклаза оказывает проапоптозное действие на глиальные клетки рецептора растяжения рака при ФД-воздействии.

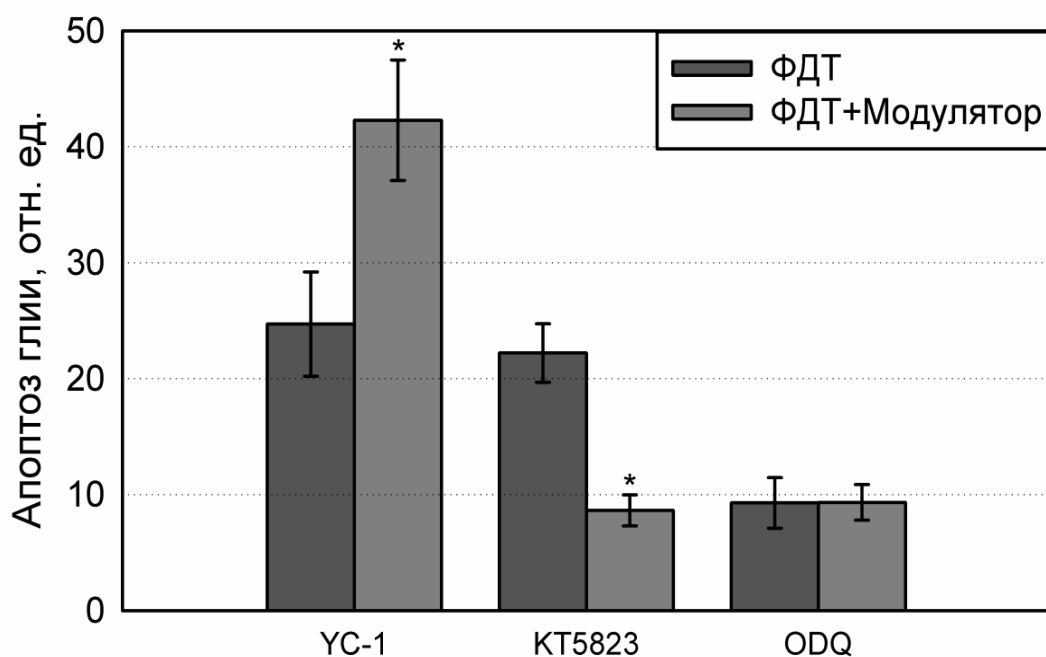


Рис. 27. Влияние модуляторов сигнального пути NO/sGC/cGMP/PKG, ингибитора sGC ODQ (10 мкМ), активатора sGC YC-1 (5мкМ) и ингибитора PKG KT5823 (10мкМ), на уровень апоптоза глиальных клеток речевого рака при ФД-воздействии, * – $p < 0,05$

Таким образом, можно говорить о том, что в изолированном рецепторе растяжения речного рака ФД индуцированный апоптоз глиальных клеток реализуется с участием сигнального пути NO/sGC/cGMP/PKG.

3.3 Исследование локализации NO-синтазы и динамики её активности при ФД-воздействии

3.3.1 Гистохимическое исследование локализации NADPH-диафоразы и динамики активности этого фермента при ФД-воздействии

Поскольку никотинамидадениндинуклеотидфосфат (NADPH) является кофактором NO-синтазы, а NADPH-диафараза образует NADPH, вызывающий восстановление NO-синтазы в нитротетразолевый синий (НТС), экспрессия NADPH-диафоразы может рассматриваться как маркер присутствия NO-синтазы в нейронах. Таким образом, локализация NADPH-диафоразной активности, отражает локализацию NO-синтазы в клетке (Dawson et al., 1991, Hope et al., 1991).

Гистохимическое исследование распределения NADPH-диафоразы в изолированном рецепторе растяжения рака показало, что этот фермент локализуется преимущественно в телах обоих рецепторных нейронов (быстро- и медленно-адаптирующегося), в области перекариона (рис. 28 А). Дендриты и рецепторные мышцы были также окрашены, но в значительно меньшей степени. Ядра нейронов и глиальные клетки окрашены не были. Такое распределение фермента совпадает с распределением сукцинатдегидрогеназы и цитохромоксидазы, которые локализуются в митохондриях (Узденский, 1986; Загускин, 2010).

При окраске рецептора растяжения непосредственно после ФД-воздействия, NADPH-диафоразной активности резко увеличивался. Наиболее интенсивная

окраска фермента наблюдалась как в области перекарионов нейронов, так и в дендритах (рис. 28 Б).

Непосредственно после 30-мин ФД-воздействия средняя активность NADPH-диафоразы в сомах нейронов изолированного рецептора растяжения рака достоверно возрастала в 1,8 раз по сравнению с препаратами из контрольной группы ($p < 0.01$, рис. 29). Затем активность фермента постепенно медленно снижалась, и через 4 часа после ФД-воздействия активность фермента достигала своего минимального значения, была снижена в 2,7 раз по сравнению с препаратами из контрольной группы ($p < 0.001$; рис. 29).

Следовательно, активность NADPH-диафоразы, отражающая активность конститутивной NO-синтазы при ФД-воздействии носит двухфазный характер, с резкой активацией фермента и с его последующей медленной инактивацией.

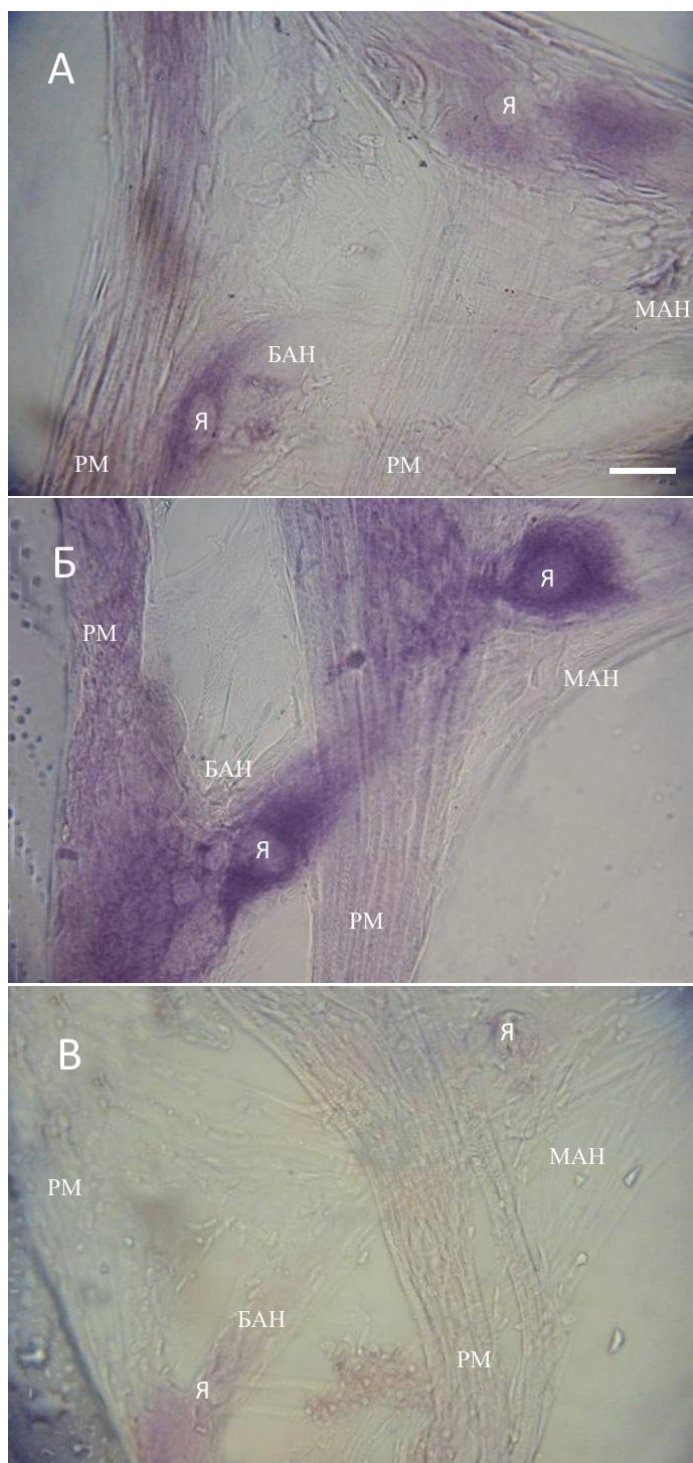


Рис. 28. Распределение NADPH-диафоразной активности в цитоплазме быстро- (слева) и медленно-адаптирующегося (справа) нейронов рецептора растяжения рака

Обозначения: А – контрольный PPP; Б – рецептор, окрашенный после ФД-воздействия; В – рецептор, окрашенный через 4 ч после ФД-воздействия. МАН – медленно-адаптирующийся нейрон, БАН – быстро-адаптирующийся нейрон, Я – ядро нейрона, РМ – рецепторная мышца. Масштабный отрезок 50 мкм

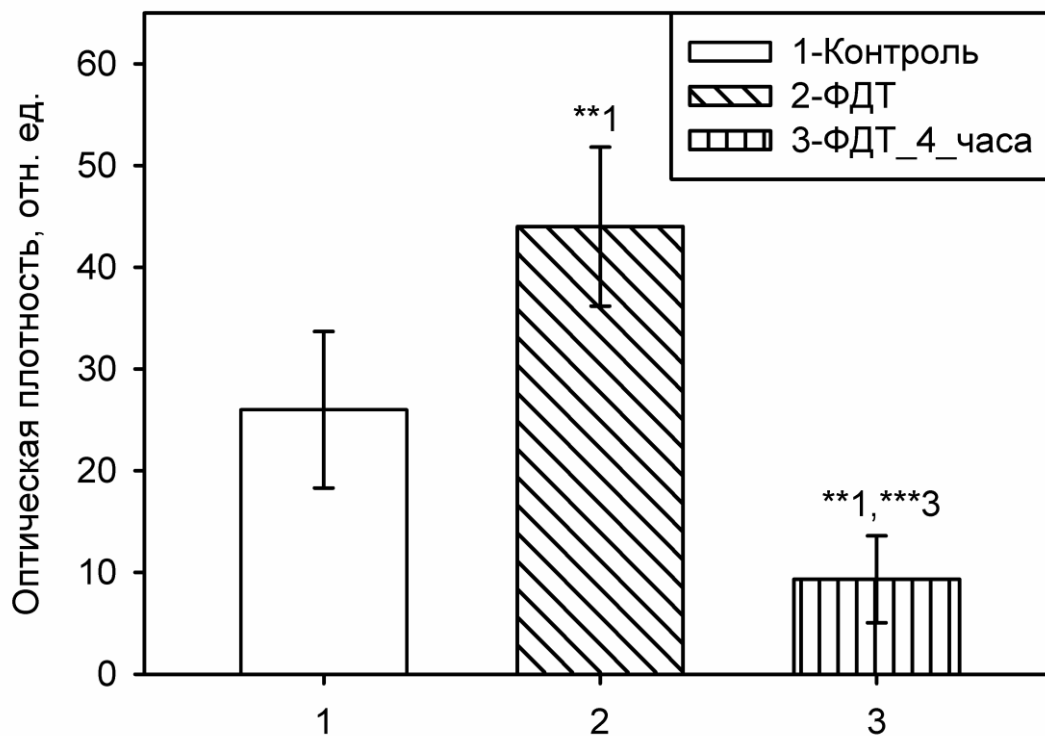


Рис. 29. Изменения в средней активности NADPH-диафоразы в сомах механорецепторных нейронов рецептора растяжения рака до (столбец 1), сразу после (столбец 2) и через 4 ч после ФД-воздействия (столбец 3)
Обозначения: ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$

3.3.2 Иммунофлуоресцентное исследование локализации нейрональной NO-синтазы в рецепторе растяжения рака

Иммунофлуоресцентное исследование распределения нейрональной NO-синтазы в изолированном рецепторе растяжения речного рака было проведено с использованием антител anti-nNOS (Sigma-Aldrich) (1:100) методом непрямой иммунофлуоресценции.

В сомах механорецепторных нейронов нейрональная NO-синтаза локализовалась в околядерной области, то есть локализация этой изоформы фермента была аналогична локализации NADPH-диафоразы (рис. 30 А). Интересно, что также интенсивно флуоресцировали ядрышки обоих механорецепторных нейронов. Кроме того, нейрональная NO-синтаза также присутствовала в глиальной оболочке аксонов рецептора растяжения рака (рис. 30 В).

Помимо этого, мы наблюдали наличие нейрональной изоформы фермента в мышцах обоих рецепторных нейронов (рис. 31 Б). При этом в толстой мышце (PM2) быстроадаптирующегося нейрона количество фермента было больше, чем в тонкой мышце медленноадаптирующегося нейрона (PM1).

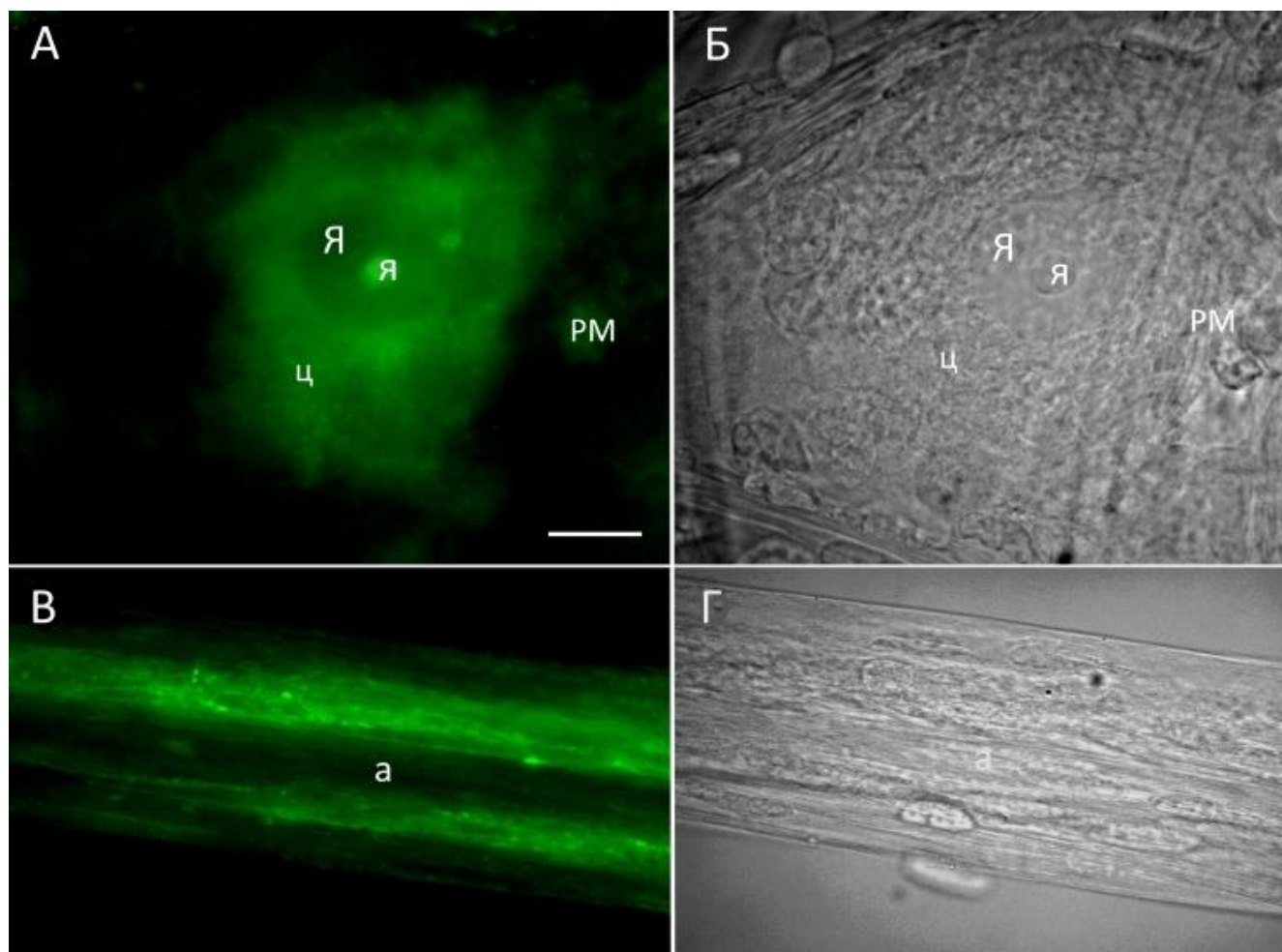


Рис. 30. Распределение нейрональной NO-синтазы в рецепторе рецептора растяжения рака

Обозначения: А – локализация фермента в сомах механорецепторных нейронов рецептора растяжения рака, окраска anti-nNOS (1:100), Б – сомы нейронов того же рецептора растяжения в проходящем свете; В – локализация фермента в аксоне рецептора растяжения рака, окраска anti-nNOS (1:100); Г – участок аксона того же рецептора растяжения рака в проходящем свете. Масштабный отрезок 15 мкм

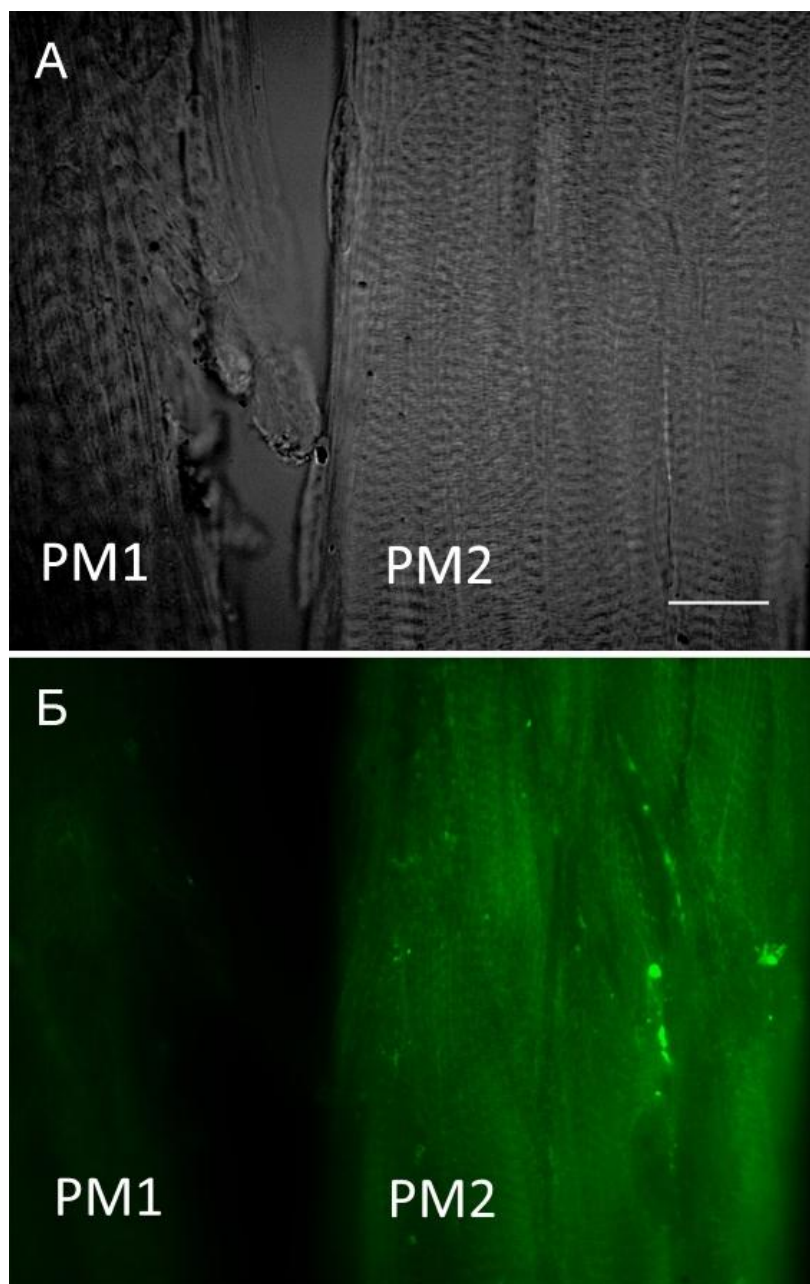


Рис. 31. Распределение нейрональной NO-синтазы в рецепторных мышцах нейронов рецептора растяжения речного рака (PPP)

Обозначения: А – мышцы PPP в проходящем свете; Б – мышцы PPP, окраска anti-nNOS (1:100). PM1 – тонкая рецепторная мышца медленно-адаптирующегося нейрона, PM2 – толстая мышца быстро-адаптирующегося нейрона. Масштабный отрезок 15 мкм

3.3.3 Иммунофлуоресцентное исследование локализации индуцибельной NO-синтазы в рецепторе растяжения рака

Иммунофлуоресцентное исследование распределения индуцибельной NO-синтазы в механорецепторных нейронах рецептора растяжения рака проводилось с использованием антител anti-iNOS (Sigma-Aldrich) (1:100) методом непрямой иммунофлуоресценции.

Иммунофлуоресцентное исследование фермента проводилась непосредственно после изолирования рецепторов растяжения, дополнительные химические модуляторы активности индуцибельной NO-синтазы не использовались.

Исследование показало, что в рецепторе растяжения речного рака индуцибельная изоформа фермента экспрессировалась конститутивно, в отсутствие внешних повреждающих воздействий.

Эта изоформа фермента была диффузно распределена в сомах обоих механорецепторных нейронов и их аксонах (рис. 32). Индуцибельная NO-синтаза локализовалась также в дендритах нейронов. В небольшом количестве эта изоформа фермента присутствовала в мышцах рецептора растяжения рака, причем, как и в случае исследования локализации нейрональной изоформы фермента, толстая мышца быстро-адаптирующегося нейрона окрашивалась интенсивнее тонкой мышцы медленно-адаптирующегося.

В глиальных клетках индуцибельная NO-синтаза, в отличие от нейрональной изоформы фермента, не присутствовала. В ядрах и ядрышках обоих механорецепторных нейронов рецептора растяжения рака индуцибельная изоформа фермента также отсутствовала.

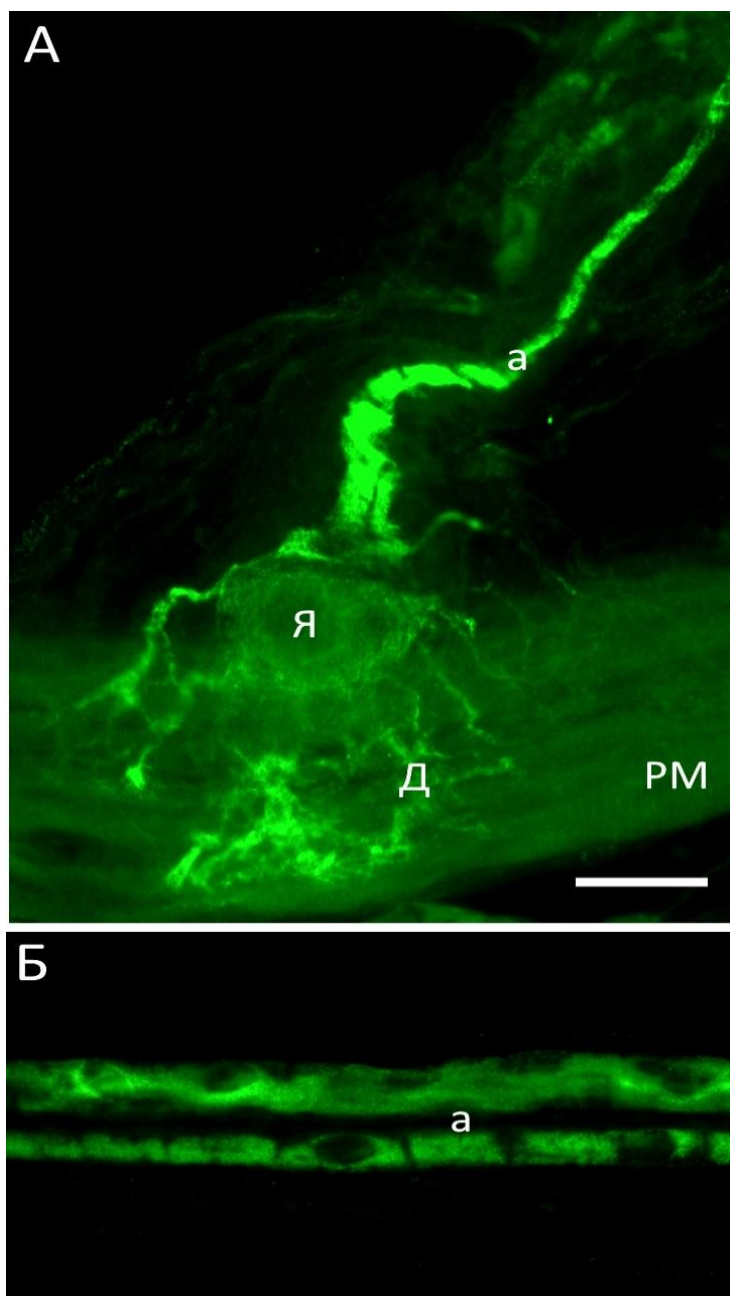


Рис. 32. Распределение индуцибельной NO-синтазы в рецепторе растяжения рака

Обозначения: А – флуоресцентное изображение распределения *iNOS* (*anti-iNOS*, 1:100) в механорецепторном нейроне речного рака. Б – флуоресцентное изображение распределения *iNOS* в аксонах механорецепторных нейронов. а – аксон, Я – ядро нейрона, Д-дендриты, РМ – рецепторная мышца. Масштабный отрезок 40 мкм

3.4 Продукция NO в рецепторе растяжения рака

3.4.1 Распределение NO в рецепторе растяжения рака в темновых условиях

Распределение NO в рецепторе растяжения рака исследовалось с помощью флуоресцентной пробы на оксид азота 4,5-диаминофлуоресцеина диацетата (DAF-2DA).

Было показано, что в темновых условиях NO образуется, главным образом в глиальной оболочке механорецепторных нейронов и их аксонов (рис. 33). Наиболее яркая флуоресценция DAF-2DA наблюдалась в области, вокруг сомы нейрона, ближе к аксону (область аксонного холмика), клетки глиальной оболочки аксона также флуоресцировали. Кроме того, в темновых условиях, наблюдалась также слабая флуоресценция дендритов и рецепторных мышц.

В области сом нейронов, ядер и ядрышек флуоресценция зонда отсутствовала.

В качестве контроля до инкубации с флуоресцентным зондом DAF-2DA проводилась инкубация рецепторов растяжения с NO-скавенджером РТЮ (500мкМ) и ингибитором нейрональной NO-синтазы L-NAME (10мМ). Такая инкубация приводила к полному отсутствию флуоресценции глиальной оболочки, что свидетельствует о том, что в нашем случае флуоресценция глиальной оболочки нейронов и аксонов вызвана именно продукцией NO, а не различных его производных, нитритов, нитратов или пероксинитрита.

Вероятно, в темновых условиях, оксид азота мог вырабатываться в виду повреждения рецепторов растяжения, вызванного их аксотомией при изолировании.

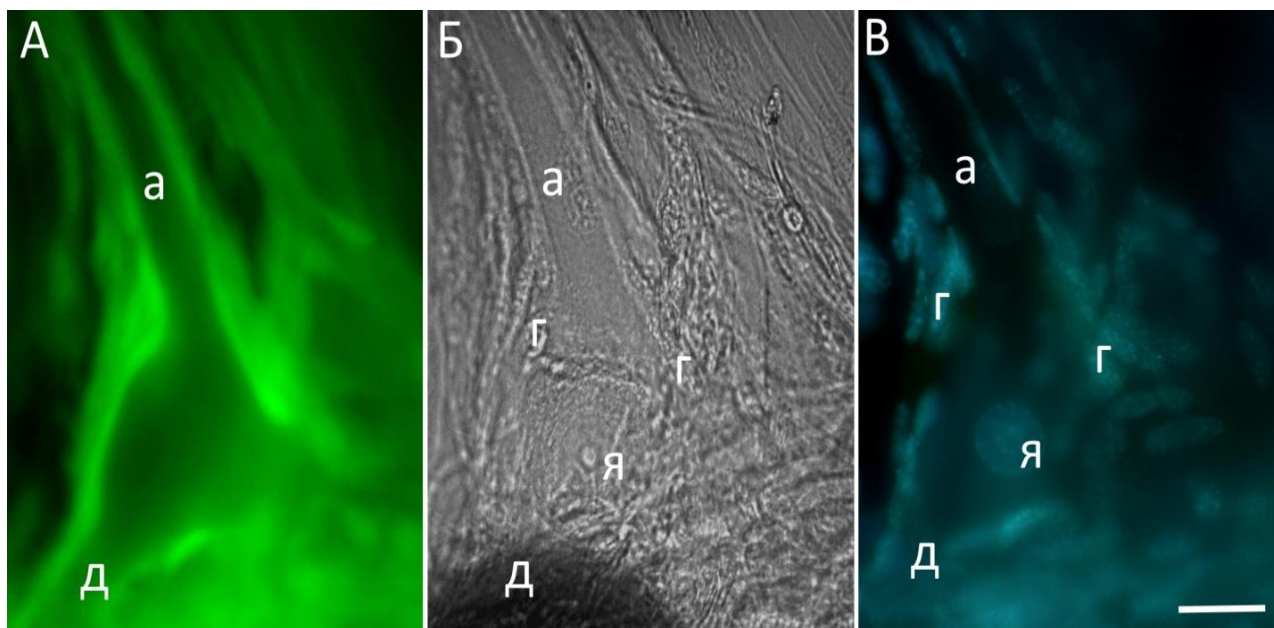


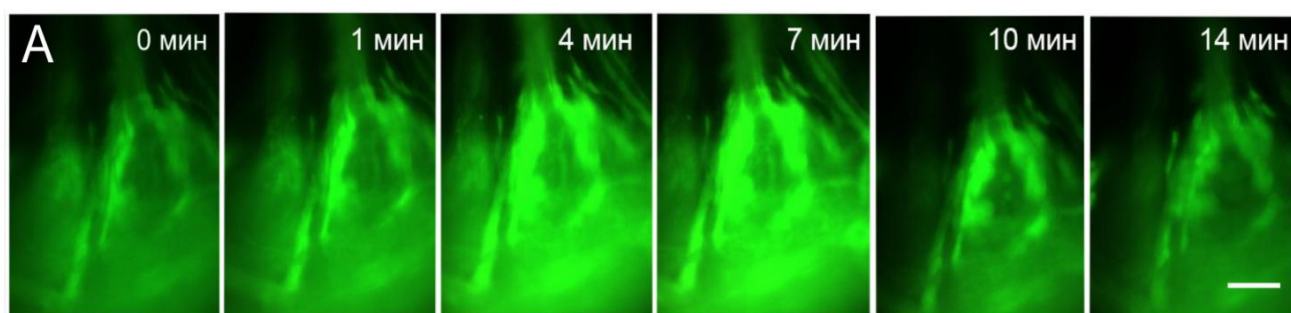
Рис. 33. Продукция NO в контрольном (интактном) рецепторе растяжения рака, окрашенного флуоресцентным зондом на NO DAF-2DA (1:500)

Обозначения: А – участок рецептора растяжения рака, окрашенный DAF-2DA; Б – тот же участок рецептора растяжения рака в проходящем свете; В – тот же участок рецептора растяжения рака, окрашенный Hoechst-33342. Я – ядро; а – аксон; д – дендриты; г – ядра глиальных клеток. Масштабный отрезок 40 мкм.

3.4.2 Изменение продукции NO в рецепторе растяжения рака в процессе ФД-воздействия

Продукция NO, косвенно демонстрирующая активацию NO-синтаз при ФД-воздействии, также как и в случае исследования активности NADPH-диафоразы при ФД-воздействии, носила двухфазный характер (рис. 34 Б). Однако в случае исследования флуоресценции DAF-2DA, активация NO-синтазы была более резкой, по-видимому, в виду большей мощности лазера. Сначала, до 4-7-й минуты ФДТ продукция NO резко увеличивалась, в 1,4 раза ($p < 0.05$), а затем к 10 мин ФД-воздействия уменьшалась в 1,6 раз ($p < 0.05$) и практически не изменялась в течение следующих 30 минут облучения (рис. 34 А). Необходимо отметить, что к концу ФДТ интенсивность флуоресценции препарата уменьшалась приблизительно в 2 раза, по сравнению с исходным уровнем, до ФДТ.

Интересно, что кроме увеличения продукции NO при ФД-воздействии, мы наблюдали также ФД индуцированное появление неких пузырьков, содержащих NO в соме нейрона, и, вероятно, в области ядра (рис. 35). Обычно это происходило тогда, когда начиналось уменьшение продукции NO в механорецепторном нейроне, обычно на 10-й мин ФД-воздействия. По-видимому, это связано с повреждением плазматической мембраны нейронов, индуцированным ФД-воздействием. Такое повреждение приводит к тому, что NO проникает в сому нейрона. Спустя еще несколько минут воздействия, к 14-й минуте ФД-воздействия эти пузырьки исчезают, и продукция NO в рецепторе растяжения рака продолжает уменьшаться с увеличением времени ФД-воздействия. Далее (на 14-20 мин ФДТ) появляется некий NO-содержащий тяж, берущий начало в рецепторных мышцах, как быстро-адаптирующегося нейрона, так и медленно-адаптирующегося (рис. 36) Он тянется вверх, вдоль аксона. Через некоторое время интенсивность его флуоресценции ослабевает, а к концу облучения исчезает полностью.



Б

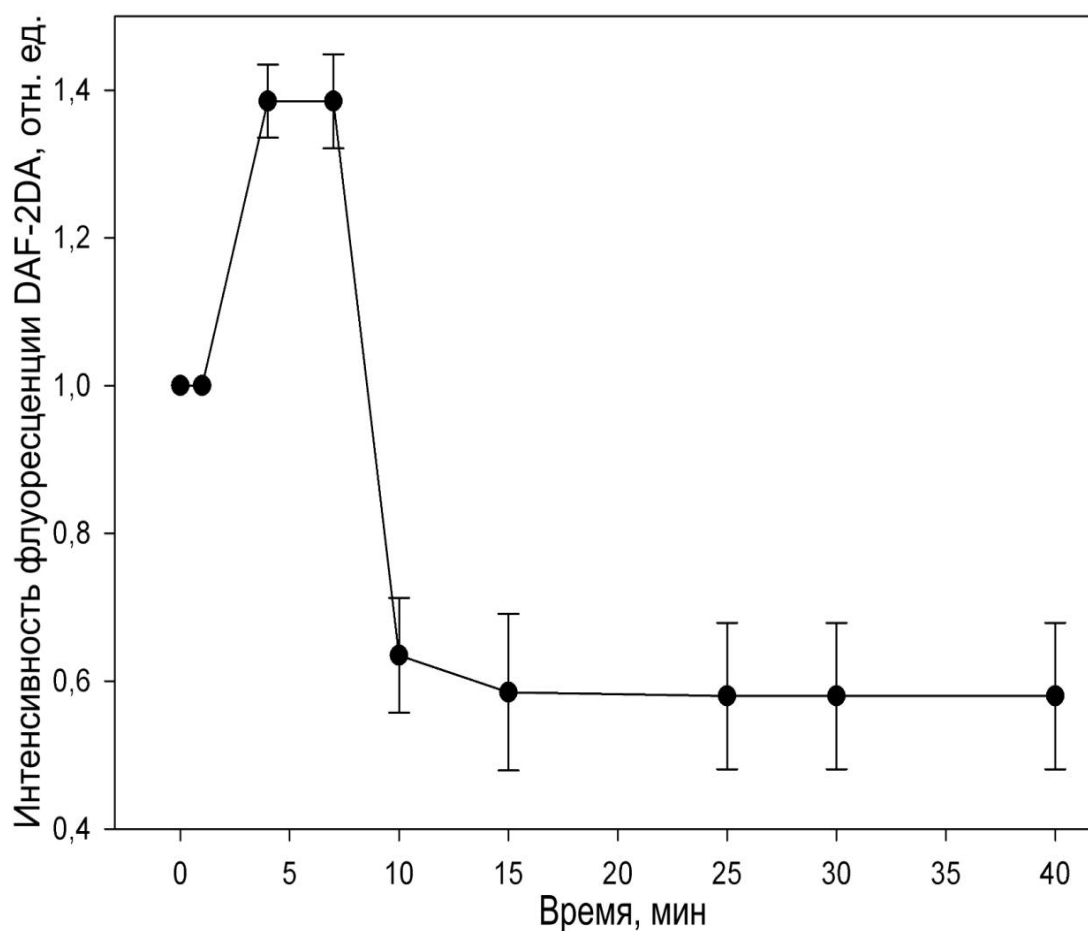


Рис. 34. Динамика продукции NO в рецепторе растяжения рака при ФД-воздействии

Обозначения: А – флуоресценция DAF-2DA (1:500) в рецепторе растяжения рака до ФД-воздействия и в течение ФД-воздействия, через 1, 4, 7, 10 и 14 мин; Б – изменения интенсивности флуоресценции DAF-2DA в течение ФД-воздействия. Масштабный отрезок 60 мкм

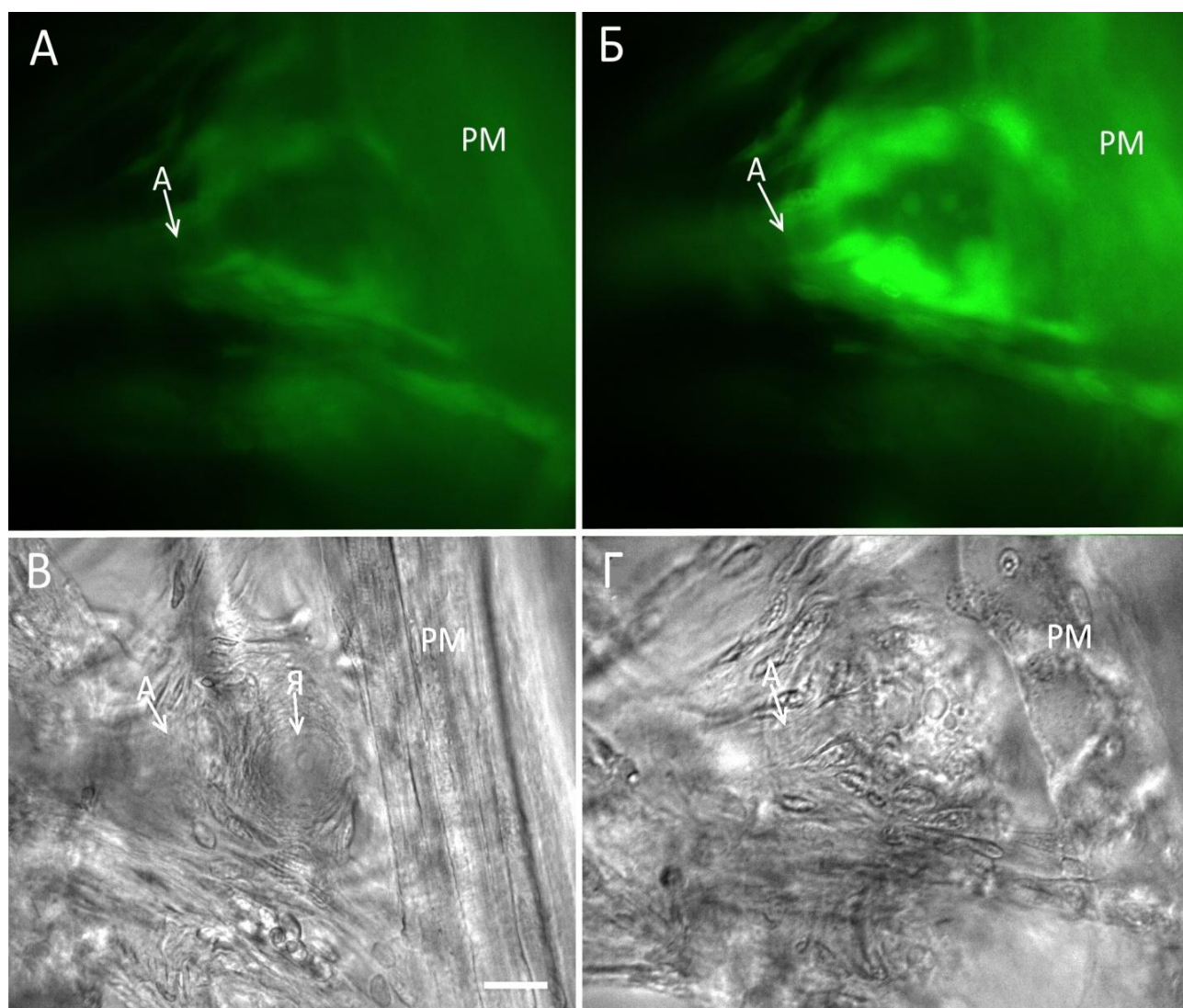


Рис. 35. Изменение продукции NO в рецепторе растяжения рака при ФД-воздействии

Обозначения: А – участок рецептора, окрашенного DAF-2DA (1:500), до ФД-воздействия; Б – тот же участок рецептора, окрашенного DAF-2DA, после 10-минутного ФД-воздействия; В – тот же участок рецептора до ФД-воздействия, в проходящем свете; Г – тот же участок рецептора после 10-минутного ФД-воздействия. Масштабный отрезок соответствует 30 мкм

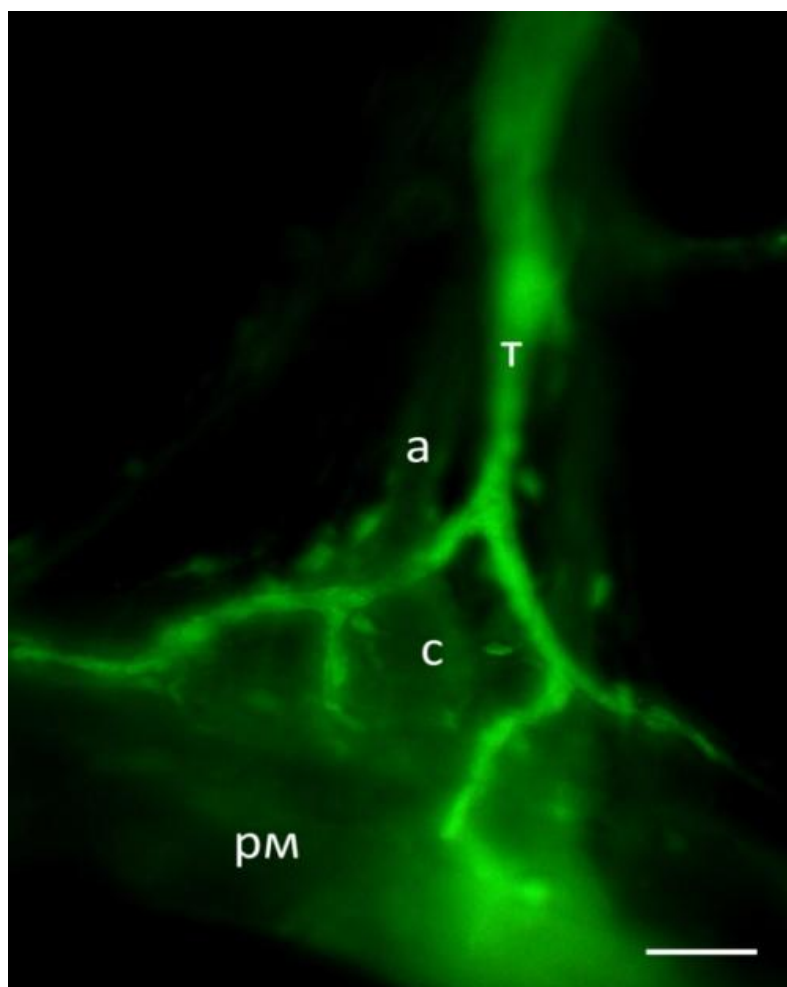


Рис. 36. Появление тяжа с NO при ФД-воздействии на рецептор растяжения
рака

Обозначения: *С* – сома нейрона; *рм* – рецепторная мышца; *а* – аксон; *Т* –
тяж. Масштабный отрезок 60 мкм

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

4.1 Локализация NO-синтазы и динамика ее активности при ФД-воздействии

Известно, что NO имеет короткий период полужизни (5-10 с), и в этой связи возникают сложности при его изучении. Исследования поэтому обычно фокусируются на NO-синтазе, ферменте, образующем NO из аргинина. NO-синтаза нуждается в калмодулине, ионах кальция и никотинамидадениндинуклеотидфосфате (NADPH) как кофакторах. NADPH-диафораза продуцирует NADPH, который вызывает восстановление NO-синтазы в нитротетразолевым синим (НТС). Следовательно, экспрессия диафразы может рассматриваться как маркер присутствия NO-синтазы в нейронах, в частности в механорецепторном нейроне речного рака. Гистохимические исследования активности NADPH-диафразы, в том числе и в нервных клетках, проводятся довольно часто, главным образом, на мышах и крысах [Gonzalez Deniselle et. al., 2004, Torres et. al., 2006]. Есть также и несколько аналогичных работ на беспозвоночных [Schuppe et. al., 2001, Zaitseva et. al., 2012, Gallus et. al., 2013]. Однако гистохимический подход не использовался ранее для оценки изменений локализации конститутивной NO-синтазы в нейронах при ФД-воздействии.

В опытах по гистохимическому выявлению активности NADPH-диафразы нами было установлено, что фермент локализуется преимущественно в телах обоих рецепторных нейронов (быстро- и медленно-адаптирующегося), однако дендриты и рецепторные мышцы были также окрашены. Полученные данные согласуются с мнением большинства исследователей о цитоплазматической локализации конститутивной NO-синтазы в нейронах [Batista et al., 2001; Cao and Eldred, 2001]. Однако стоит отметить, что в последнее время стали появляться данные о ядерной локализации NOS [Aquilano et al., 2014; McLeod, 2012].

Гистохимически установлено, что ФДТ быстро, во время облучения активировало NADPH-диафорузу в нейронах рецептора растяжения рака, но не в глиальных клетках. Процесс активации был кратковременный, затем через 4 часа фермент ингибировался. Изменения NADPH-диафоразной активности отражают динамику генерации NO в механорецепторном нейроне. Поскольку и iNOS, и nNOS влияли на показатели выживаемости ГК при ФД-воздействии, мы полагаем, что обе эти изоформы активируются при ФДТ. Мы считаем, что быстрая активация NADPH-диафоразы (и NO-синтазы) при ФДТ обусловлена, главным образом, активацией нейрональной NO-синтазы. В качестве механизмов, обуславливающих активацию nNOS, могут выступать кальций-зависимые сигнальные процессы, играющие важную роль в ФД индуцированном повреждении нейронов и глиальных клеток [Almeida et al., 2004; Castano et al., 2005; Узденский, 2008, 2010]. После ФД-воздействия активность нейрональной NO-синтазы резко падает, а активация индуцибельной изоформы фермента может происходить позднее и поддерживается в течение длительного времени.

Активация NADPH-диафоразы при ФД-воздействии ранее не была изучена, хотя служит достаточно информативным показателем активации NO-синтазы. Нами было показано, что фермент активируется очень быстро, однако инактивация фермента/ферментов более длительный процесс. Это говорит о том, что NO-синтаза участвует в повреждении нейронов и ГК при ФД-воздействии. Как было показано ранее, воздействуя на разные изоформы NO-синтаз, можно модулировать тип клеточной смерти при ФД-воздействии. Таким образом, возможно в течение длительного времени после ФДТ воздействовать на NO-синтазу с целью оптимизации ФД-воздействия.

4.2 Продукция NO в рецепторе растяжения рака при ФД-воздействии

Динамика процессов генерации NO в нейронах и глиальных клетках при фотодинамическом воздействии ранее не была изучена. Мы полагаем, что

динамика ФД индуцированной продукции NO может определять сигнальные механизмы, посредством которых NO регулирует повреждения при ФД-воздействии. DAF-2DA показал себя как достаточно мощный инструмент для оценки продукции NO в нашем модельном объекте, дающий возможность объективно оценивать изменение продукции NO под действием модуляторов различных сигнальных механизмов.

Динамика продукции NO при ФД-воздействии представляет особый интерес. Известно, что NO синтезируется клетками из L-аргинина под действием фермента NO-синтазы (NOS), которая присоединяет молекулярный кислород к конечному атому азота в гуанидиновой группе L-аргинина. Количество NO и время его синтеза в клетке может определяться изоформой синтезирующего фермента. Конститутивная нейрональная изоформа nNOS, активируемая ионами Ca^{2+} способствует выделению сравнительно небольшого количества NO на короткий период в ответ на рецепторную или экзогенную стимуляцию, в частности ФД-воздействие. Количество NO, образующегося под действием индуцибельной, Ca^{2+} -независимой, изоформы фермента (iNOS), может варьировать и достигать больших значений (наномолей). При этом продукция NO сохраняется в течение более длительного периода. Количество продуцируемого NO на 2-3 порядка выше по сравнению с конститутивными NO-синтазами.

За счет какой из изоформ NOS может увеличиваться содержание NO при ФД-воздействии мы попытались выяснить. Есть данные в пользу определяющей роли каждой из изоформ NO-синтаз в процессах генерации NO при фотодинамической терапии и ФД индуцированном повреждении нервных клеток [Korbelik et al., 2000; Niziolek et al., 2006; Bhowmick and Girotti, 2010].

Вероятно, динамика генерации NO при ФД-воздействии определяется внутриклеточными сигнальными процессами. К ним относятся изменениями внутриклеточной концентрации Ca^{2+} и фосфорилирование NOS. Фосфорилирование конститутивных NO-синтаз цАМФ-зависимой протеинкиназой, протеинкиназой C, сGMP-зависимой протеинкиназой, Ca^{2+} -кальмодулин-зависимой протеинкиназой ведет к снижению активности этих

ферментов. С другой стороны, протеинфосфатаза кальцинейрин может дефосфорилировать NOS, вызывая тем самым повышение ее каталитической активности.

Динамика продукции NO в нейронах и глии при ФД-воздействии представляет особый интерес, поскольку ранее она не была изучена. Есть данные об изменении продукции NO спустя разные промежутки времени после фотодинамического воздействия [Ali and Olivo, 2003], но не во время этого воздействия, как исследовалось в наших экспериментах. Мы полагаем, что динамика ФД индуцированной продукции NO может определять сигнальные механизмы, посредством которых NO регулирует повреждения при ФД-воздействии.

Генерация NO в рецепторе растяжения рака при ФД-воздействии так же, как и динамика активации NO-синтазы носила двухфазный характер. Однако ввиду большей мощности лазера этот процесс был более быстрым. Мы полагаем, что увеличение уровня NO при ФД-воздействии, по-видимому, было вызвано быстрой активацией nNOS.

Можно предположить, что быстрая ФД индуцированная генерация NO в наших экспериментах была вызвана Ca^{2+} -зависимой активацией nNOS (или mtNOS), поскольку известно, что ФД-воздействие резко повышает цитозольный уровень Ca^{2+} [Almeida et al., 2004; Castano et al., 2005; Узденский, 2008, 2010]. Более того, некоторые авторы обнаружили корреляцию между уровнем кальция в цитозоле и продукцией NO при ФД-воздействии [Dedkova and Blatter, 2009; Chan 2011].

Поскольку продукция NO снижалась, можно предположить, что во время ФД-воздействия nNOS инактивируется, вероятно, вследствие нарушения структуры фермента под действием АФК. iNOS может активироваться через несколько часов после ФД-воздействия, однако, на данной стадии экспериментов наличие второго пика роста продукции NO, вызванного активацией iNOS, выявлено не было.

4.3 Локализация nNOS в рецепторе растяжения рака

Иммунофлуоресцентное исследование локализации nNOS показало, что фермент локализуется в околядерной области, в ядрышках обоих нейронов, а также в мышцах и глиальной оболочке аксона рецептора растяжения рака.

Известно, что различная субклеточная локализация NO-синтазы может определять функции фермента. Поэтому исследование и было нацелено на определение локализации nNOS в нашем модельном объекте, рецепторе растяжения рака. Большинство исследователей полагает, что nNOS связана с плазматической мембраной напрямую или заякорена в цитоплазме посредством адаптерных белков [Batista et al., 2001; Cao and Eldred, 2001]. Однако есть также и доказательства ядерной локализации фермента в нейронах и глиальных клетках [Korzhevski et al., 2007, Aquilano et al., 2014]. Роль nNOS в ядре все еще однозначно не определена. Было продемонстрировано, что PDZ домен nNOS обеспечивает сборку nNOS в ядре, тем самым способствуя локальной продукции NO, S-нитрозилированию ядерных белков и индукции митохондриального биогенеза.

Выявление nNOS в ядрышках – необычный факт. Тем не менее, ранее в ядрышках клеток глиомы крыс уже было показано присутствие фосфорилированной формы другой изоформы NO-синтазы eNOS [Klinz et al., 2007]. Все чаще появляются различные доказательства неканонической локализации этой изоформы фермента. Например, ранее было показано, что nNOS присутствует в эпителии крыс [Kobzik et al., 1993]

Результаты по локализации nNOS могут быть полезными для понимания фундаментальных основ NO-сигнальных процессов и оценки пространственного распределения NO в нейронах. В частности, становится понятно, что фермент локализуется в околядерной области в сомах нейронов и ядрышках. Однако существенно фермент влиял на показатели выживаемости глиальных клеток.

Таким образом, NO-синтаза, образуясь в сомах нейронов решающее влияние оказывает не на нейроны, а на глиальные клетки. Ранее было показано, что конститутивный мембранный и индуцибельный цитозольный ферменты у моллюсков отличаются от соответствующих ферментов млекопитающих [Franchini, et al., 1995]. Эти и многие другие данные могут свидетельствовать о том, что ферментативный синтез NO представляет собой достаточно древний регуляторный процесс, трансформация которого в ходе эволюции привела к появлению в клетках млекопитающих целого семейства разных по свойствам NO-синтаз. Установленная локализация nNOS в рецепторе растяжения *Astacus leptodactylus* во многом совпадает с локализацией фермента у млекопитающих, однако имеет и свои особенности, в частности nNOS локализуется помимо околядерной области также и в ядрышках обоих нейронов рецептора растяжения рака, в связи с этим работа представляет интерес в эволюционном аспекте.

4.4 Локализация iNOS в рецепторе растяжения рака

Выявленная нами локализация этой изоформы фермента в сомах, дендритах и аксонах обоих механорецепторных нейронов совпадает с общепринятыми представлениями о том, что iNOS не связана с мембранными белками и имеет цитозольную локализацию.

Как известно, iNOS конститутивно не экспрессируется, и может синтезировать NO под действием внешних повреждающих факторов, цитокинов и бактериальных полисахаридов [Ванин, 2001].

Однако в нашем случае, эта изоформа экспрессируется в механорецепторных нейронах конститутивно, при отсутствии внешних повреждающих воздействий.

Ранее уже было показано, что в некоторых типах клеток эта изоформа фермента может конститутивно экспрессироваться. Наиболее подробно описана конститутивная экспрессия индуцибельной NO-синтазы в эпителии кишечника

человека [Pertner et al., 2002, Roberts et al., 2001] и легких обезьян [Lane et al., 2004]. Кроме того, есть доказательства конститутивной экспрессии iNOS в нервной ткани грызунов, в частности в головном и спинном мозге [Tang et al., 2007; Ruscheweyh et al., 2006]. В последнее время появляется все больше доказательств неканонической экспрессии изоформ NO-синтаз [Mattila and Thomas, 2014].

В этой связи, понимание свойств и экспрессии изоформ NO-синтаз может внести ясность в механизмы разнообразных физиологических функции iNOS. Выяснение же возможности неканонической локализации изоформ NO-синтаз улучшит понимание процессов ответа тканей на патологические процессы, открывая возможности для развития новых терапевтических стратегий.

4.5 Роль NO в смерти клеток в темноте

Экзогенная генерация NO, а также ингибирование нейрональной изоформы NO-синтазы в темновых условиях не влияло на исследуемые показатели выживаемости нейронов и глии рецептора растяжения речного рака (таблица 3).

В связи с этим, можно говорить о том, что в отсутствие внешних повреждающих факторов NO, по-видимому, не участвует в процессах выживаемости нервных и глиальных клеток. Кроме того, конститутивная нейрональная изоформа фермента также не вовлечена в процессы повреждения нейронов и глии в темноте.

Однако, поскольку ингибиторы индуцибельной NO-синтазы участвовали в повреждении нейронов и глии в темноте, по всей видимости, активация индуцибельной изоформы фермента в темновых условиях может каким-то образом происходить, это подтверждается результатами проведенного нами иммунофлуоресцентного исследования.

Таблица 3. Роль модуляторов NO-зависимых сигнальных процессов – генераторов NO (SNP, NONOate), активатора растворимой гуанилатциклазы (YC-1), ингибиторов nNOS и iNOS (L-NAME, L-NNA, L-NIL, SMT), растворимой гуанилатциклазы (ODQ) и протеинкиназы G (KT5823) в процессах повреждения нейронов и глиальных клеток рецептора растяжения рака в темновых условиях

Модулятор	Время жизни, мин	Некроз нейронов, отн. ед.	Некроз глиальных клеток, %	Апоптоз глиальных клеток, отн. ед.
NONOate, 100 мкМ	—	—	—	—
SNP, 10 мкМ	—	—	—	—
L-NAME, 1 мМ	—	—	—	—
L-NNA, 1 мМ	—	—	—	—
SMT, 50 мкМ	↓	↑	↑	—
L-NIL, 100 мкМ	↓	—	—	—
YC-1, 5 мкМ	—	—	—	↑
ODQ, 10 мкМ	—	—	—	—
KT5823, 10 мкМ	—	—	—	↑

Вероятно, это может быть обусловлено последствием аксотомии нейронов при изолировании рецептора растяжения рака. Стоит отметить, что ингибиторы iNOS снижали время жизни механорецепторных нейронов в темноте.

Это говорит о том, что NO, синтезированный iNOS, в темновых условиях может поддерживать импульсную активность механорецепторных нейронов, то есть способствовать выживаемости нейронов. Кроме того, стоит отметить, что один из ингибиторов iNOS увеличивал некроз нейронов и глии в темновых

условиях. Это интересный факт, в виду того, что общепринятыми являются представления о цитотоксическом эффекте индуцибельной изоформы фермента [Golde et al., 2002; Moncada et al., 1991; Sparrow, 1995]. Однако, в нашем случае, NO, синтезированный этой изоформой фермента, по всей видимости, может оказывать цитопротекторное действие, как на нейроны, так и на глиальные клетки рецептора растяжения рака в темновых условиях.

Было также выявлено, что модуляторы сигнального пути NO/sGC/cGMP/PKG участвуют в процессах апоптоза глиальных клеток в темновых условиях. При этом активация растворимой гуанилатциклазы, вероятно, приводит к активации проапоптотических сигнальных механизмов, а протеинкиназа G, напротив, участвует в защите от апоптоза глии. То есть в темновых условиях в рецепторе растяжения рака апоптоз по сигнальному пути NO/sGC/cGMP/PKG не реализуется, однако растворимая гуанилатциклаза и протеинкиназа G могут в нем участвовать независимо друг от друга и от NO.

4.6 Роль NO в ФД индуцированном повреждении нейронов и ГК

При ФД-воздействии модуляторы NO-зависимых сигнальных процессов влияли на показатели выживаемости нейронов и глиальных клеток более существенно, чем в темновых условиях (таблица 4).

При этом под действием модуляторов NO-зависимых сигнальных процессов показатели выживаемости глиальных клеток изменялись более значительно, чем показатели выживаемости нейронов.

На продолжительность импульсной активности влияли ингибиторы индуцибельной изоформы NO-синтазы, причем влияли разнонаправлено. Мы полагаем, что NO, синтезированный iNOS, может продлевать время жизни нейронов не только в темновых условиях, но и при ФД-воздействии.

Таблица 4. Роль модуляторов NO-зависимых сигнальных процессов – генераторов NO (SNP, NONOate), активатора растворимой гуанилатциклазы (YC-1), ингибиторов nNOS и iNOS (L-NAME, L-NNA, L-NIL, SMT), растворимой гуанилатциклазы (ODQ) и протеинкиназы G (KT5823) в процессах повреждения нейронов и глиальных клеток рецептора растяжения рака при ФД-воздействии

Модулятор	Время жизни, мин	Некроз нейронов, отн. ед.	Некроз глиальных клеток, %	Апоптоз глиальных клеток, отн. ед.
NONOate, 100 мкМ	—	↓	↓	↑
SNP, 10 мкМ	—	—	↓	—
L-NAME, 1 мМ	—	—	↑	↓
L-NNA, 1 мМ	—	—	—	↓
SMT, 50 мкМ	↑	—	—	↓
L-NIL, 100 мкМ	↓	—	—	↓
YC-1, 5 мкМ	—	—	—	↑
ODQ, 10 мкМ	↓	—	↑	—
KT5823, 10 мкМ	—	↓	—	↓

Интересно, что действие SMT на время жизни нейрона в темновых условиях и при ФД-воздействии было противоположным. То есть, в темноте ингибирование iNOS вызывало цитотоксический эффект, а при ФД-воздействии, увеличивало длительность импульсной активности механорецепторных нейронов.

Вероятно, это связано с тем, что SMT, помимо ингибирования iNOS, может снижать продукцию нитритов, в частности в нашем случае образуемых при ФД-воздействии [Iuvone et al., 1997].

Некроз нейронов уменьшался под действием одного из экзогенных NO генераторов, NONOate (100 мкМ). Это косвенно говорит о возможном защитном действии оксида азота на нейроны при ФД-воздействии. Протеинкиназа G, по-видимому, напротив, способствует некрозу нейронов при ФД-воздействии.

Данные действия ингибиторов NO-синтаз и экзогенных генераторов NO согласуются между собой. Полученные результаты свидетельствуют о том, что NO снижает ФД индуцированный некроз глиальных клеток, но в то же время увеличивает апоптоз глиальных клеток рецептора растяжения рака при облучении. Вероятно, NO может также защищать от некроза нейроны при ФД-воздействии.

Данные, указывающие на противонекрозное и проапоптозное действие NO, согласуются с некоторыми литературными источниками. Ранее было показано, что NO участвует в повреждении клеток при ФДТ. Сублетальное ФД-воздействие mTHPC усиливало генерацию NO, экспрессию TNF- α и фагоцитарную активность моноцитов U937 [Coutier et al., 1999]. Продукция NO также отмечена в фотосенсибилизированных Pc4 клетках карциномы, [Gupta et al., 1998] эпителиальных клетках носоглотки, фотосенсибилизированных гиперциномом [Ali and Olivo, 2003].

В клетках карциномы при ФДТ NO участвовал в ФД индуцированном апоптозе, однако, этот эффект не наблюдался в клетках фибросаркомы, в которых апоптоз предварительно заблокировали [Gupta et al., 1998].

Однако NO может оказывать и защитное действие против апоптоза, вызванного ФД-воздействием [Niziolek et al., 2003, 2006]. Противоапоптозный эффект оксида азота сводится к подавлению активности каспаз, главным образом каспазы-3, либо в результате блока иницирующих каспаз.

Был выявлен и другой механизм участия NO в защите клеток против фотодинамического повреждения и апоптоза [Gomes et al., 2002]. Сигнальный

путь: гунилатциклаза-сGMP-протеинкиназа G опосредовал протекторное действие NO в фотосенсибилизированных клетках.

Некоторые исследователи полагают, что NO может оказывать как проапоптозное, так и противоапоптозное действие при ФДТ [Rapozzi et al., 2015]. При этом, при низких уровнях NO в клетке, он обычно препятствует апоптозу и способствует выживаемости клеток, однако большие уровни эндогенного NO могут оказывать проапоптозное и цитотоксическое действие. Например, NO, воздействуя на NF- κ B, может и стимулировать апоптоз, и подавлять его [Rapozzi, 2013].

Оксид азота может выступать в качестве антиоксиданта, прерывая цепь перекисного окисления липидов (ПОЛ) и ослабляя процесс ФД индуцированного разрушения биомембран. Так, экзогенный NO-генератор, спермин NONOate, существенно снижал уровень ПОЛ и последующий некроз эпителиальных фотосенсибилизированных опухолевых клеток [Niziolek et al., 2003].

Выявленное нами снижение фотоиндуцированного некроза нейронов и ГК оксидом азота, вероятно, обусловлено тем, что в небольших концентрациях этот вторичный мессенджер является нейропротектором. Он выступает в качестве антиоксиданта, участвует в нейтрализации АФК, тем самым снижает вызванный облучением некроз глиальных клеток и нейронов.

В ходе исследования установлено, что NO запускает проапоптотические каскады в рецепторе растяжения рака. Мы полагаем, что наиболее вероятным вариантом развития апоптоза глиальных клеток в рецепторе растяжения рака может быть запуск сигнального пути NO/sGC/cGMP/PKG. При этом cGMP, образованный растворимой гунилатциклазой, активирует проапоптотическую серин/треонин киназу Akt посредством PKG-зависимой активации фосфатидилиназитол-3-киназы.

Другим вероятным механизмом развития NO-зависимого апоптоза может быть активация MAP-киназного каскада. Киназы осуществляют транслокацию белка Вах к митохондриальной мембране, где он высвобождает из митохондрий цитохром С. Последний, в свою очередь, запускает каспазный каскад,

приводящий к фрагментации ГК МРН. Блокирования каспазного каскада, по-видимому, при этом не происходит. Либо же, процессы активации каспаз преобладают над процессами их инактивации.

Важно, что в глиальных клетках ФД индуцированный апоптоз реализуется не только посредством митохондриального пути, но и с участием NO, cGMP и PKG. Это значит, что для модулирования типа клеточной смерти, в частности, для модулирования апоптоза, необходимо воздействовать именно на эти клеточные мишени.

4.7 NO-синтазы в ФД индуцированном повреждении нейронов и ГК

Оксид азота в живых организмах образуется из L-аргинина под действием фермента NO-синтазы (NOS), которая присоединяет молекулярный кислород к конечному атому азота в гуанидиновой группе L-аргинина. Количество NO и время его синтеза в клетке может определяться изоформой синтезирующего фермента. Конститутивная нейрональная изоформа nNOS, активируемая ионами Ca^{2+} , способствует выделению сравнительно небольшого количества NO на короткий период в ответ на рецепторную или экзогенную стимуляцию, в частности ФД-воздействие. Количество NO, образующегося под действием индуцибельной, Ca^{2+} -независимой, изоформы фермента (iNOS), может варьировать и достигать больших значений (наномолей). При этом продукция NO сохраняется в течение более длительного периода. Количество продуцируемого NO на 2-3 порядка выше по сравнению с конститутивными NOS. Мы попытались ответить на вопрос, какая изоформа NOS наиболее значительно влияет на ФД индуцированное повреждение нейронов и ГК рецептора растяжения рака.

Итак, применение различных ингибиторов NO-синтаз показало, что проапоптозный эффект NO связан с активацией индуцибельной изоформы NO-синтазы. Однако антинекротное действие NO на ГК могло быть связано с активацией скорее нейрональной, чем индуцибельной изоформы фермента.

Есть данные в пользу определяющей роли каждой из изоформ NO-синтаз в процессах генерации NO при ФДТ.

В клетках карциномы ФД-воздействие быстро, за 5 мин увеличивало активность nNOS, но не iNOS, и производство NO возрастало в течение 15 мин после фотосенсибилизации и приводило к развитию апоптоза [Gupta et al., 1998]. Цитопротекторный и противоапоптотический эффект nNOS при ФДТ был показан как на клетках опухоли мыши, так и на нормальных клетках [Reeves et al., 2009]. Участие iNOS в противоапоптотическом эффекте при 5-ALA ФДТ также было продемонстрировано [Bhowmick and Girotti, 2009].

Другое мнение было предложено Lu et al., авторы полагают, что митохондриальная NO-синтаза и последующее высвобождение цитохрома C играют решающую роль в ФД индуцированном повреждении клеток опухоли мыши [Lu et al., 2006].

На клетках различных видов рака человека было показано участие как iNOS, экспрессируемой макрофагами, так и eNOS, экспрессируемой клетками эндотелия сосудов в процессах ФД индуцированного повреждения [Reeves, 2010].

4.8 Участие сигнального пути NO/sGC/cGMP/PKG в процессах ФД индуцированного повреждения

Согласно полученным результатам, проапоптотический эффект NO в рецепторе растяжения рака при ФД-воздействии реализуется посредством сигнального пути NO/sGC/cGMP/PKG, поскольку NO, растворимая гуанилатциклаза и протеинкиназа G увеличивали апоптоз глиальных клеток рецептора растяжения рака при ФД-воздействии. Надо отметить, что в темновых условиях sGC также стимулировала развитие апоптоза, хотя этот факт подтверждается действием только одного модулятора. Протеинкиназа G же в процессах апоптоза в темноте не участвовала. Вероятно, в темноте cGMP ее не активировал, а запускал апоптоз посредством действия на другие сигнальные мишени. Как известно, помимо PKG,

клеточными мишенями cGMP являются cGMP-регулируемые фосфодиэстеразы и cGMP-активируемые ионные каналы [Koesling and Friebe, 2000].

Ранее уже было показано участие сигнального пути NO/sGC/cGMP/PKG в ФД индуцированном повреждении клеток опухолей мыши [Gomes et al., 2002]. Однако в данной работе активация сигнального пути NO/sGC/cGMP/PKG приводила к противоположному эффекту, защите клеток от ФД индуцированного апоптоза. Вероятно, это связано с тем, что в нормальных и опухолевых клетках при ФДТ активируются различные сигнальные механизмы.

Апоптоз в нормальных условиях (без повреждающих внешних воздействий) посредством сигнального пути NO/sGC/cGMP/PKG может реализовываться несколькими способами: через Akt, фактор транскрипции Creb или гемоксигеназу-1(НО-1) [Calabrese et al., 2007]. Вероятно, при ФД-воздействии протеинкиназа G также может активировать одну из этих клеточных мишеней.

Согласно данным, полученным в нашей лаборатории в развитии апоптоза глиии могут участвовать также нейротрофин NGF, фосфолипаза C, а протеинкиназы A и C, MAP киназа JNK и аденилатциклаза, напротив, защищают глиальные клетки от апоптоза [Узденский, 2010].

4.9 Роль NO в нейроглиальных взаимодействиях

Сейчас нейроглиальные взаимодействия в норме и патологии очень широко изучаются и представляют большой интерес, поскольку появляется все больше доказательств новых функций глиальных клеток [Temburni and Jacob, 2001], в том числе их участия в процессах нейротрансмиссии [Auld and Robitaille, 2003]. Ранее было показано, что глиальные клетки могут поддерживать выживаемость нейронов и процессы регенерации в них [Barres and Barde, 2000, Узденский, 2010]. Кроме того, в нашей лаборатории было продемонстрировано, что нейрон может предотвращать развитие апоптоза клеток глиии [Kolosov and Uzdeny, 2006].

В этой связи, можно полагать, что существуют некоторые сигнальные молекулы, секретируемые нейронами и влияющие на процессы выживаемости глиальных клеток рецептора растяжения рака. NO способен легко диффундировать, как внутри клетки, так и в окружающие близлежащие клетки, и, вероятно, может быть кандидатом на роль такого посредника между нейроном и глией.

Встречаются данные о возможном участии NO в нейроглиальных взаимодействиях. Например, в Бергмановской глии мозжечка, нейроглиальный сигналинг опосредовался оксидом азота и глутаматом [Metea and Newman, 2006]. Также есть данные о том, что глиальные клетки являются мишенями NO, синтезированного нейронами паренхимы в ЦНС [Murphy et al., 1993]. При этом нейроны способны высвобождать небольшое количество NO в качестве нейротрансмиттера, а продукция NO глиальными клетками может быть медленной реакцией на стресс [Buskila et al., 2005]. В нашем случае такой стресс мог индуцироваться ФД-воздействием или аксотомией рецепторов растяжения рака при их изолировании.

Согласно полученным нами результатам NO синтезируется NO-синтазами обеих изоформ, локализующимся главным образом в нейронах, но при этом более существенное влияние при ФД-воздействии оказывает не на нейроны, а на глиальные клетки рецептора растяжения рака.

Таким образом, вероятно NO в нашем объекте выступает как межклеточный посредник, модулирующий нейроглиальные взаимодействия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе работы установлен характер NO-опосредованного повреждения нейронов и глиальных клеток при фотодинамическом воздействии, выявлено пространственное распределение фермента NO-синтазы и его активация при ФД-воздействии в нашем модельном объекте, а также исследована продукция NO при фотодинамическом воздействии.

Установленное участие оксида азота в ФД индуцированном повреждении нейронов и глиальных клеток говорит о важной роли этого вторичного мессенджера в повреждении нервных клеток, вызванном внешними воздействиями. Эти результаты также свидетельствуют о возможности применения NO-модуляторов при разработке новых терапевтических стратегий для лечения неврологических и соматических патологий. Данные об активации NO-зависимых сигнальных механизмов могут быть использованы при оптимизации ФДТ в клинической практике, в частности для разработки методов более селективного разрушения злокачественных клеток при ФДТ опухолей мозга.

Исходя из литературных данных и результатов наших исследований, мы предлагаем схему NO-зависимых сигнальных процессов в нейронах и глиальных клетках при ФД-воздействии (рис. 37). Выявленная нами локализация фермента и данные ингибиторного анализа свидетельствуют о том, что NO-зависимые сигнальные процессы различаются в нейронах и ГК рецептора растяжения рака. При ФД-воздействии NO генерируется в нейроне, и затем влияет на глиальные клетки, вызывая их апоптоз, и снижая некроз. В ответ на фотодинамическое воздействие в механорецепторном нейроне рака активируются индуцибельная и нейрональная изоформы фермента, которые синтезируют NO, защищающий окружающую нейрон глию. Таким образом, NO в рецепторе растяжения рака выступает как межклеточный посредник, и нейроглиальные взаимодействия,

опосредованные этим вторичным мессенджером играют решающую роль в реализации процессов ФД индуцированного повреждения.

Другой важный результат исследования – наличие возможности, модулируя активность различных изоформ NO-синтазы (iNOS и nNOS) с помощью их селективных ингибиторов, направленно влиять на тот или иной тип клеточной смерти в нейронах и глиальных клетках, усиливать его или ослаблять.

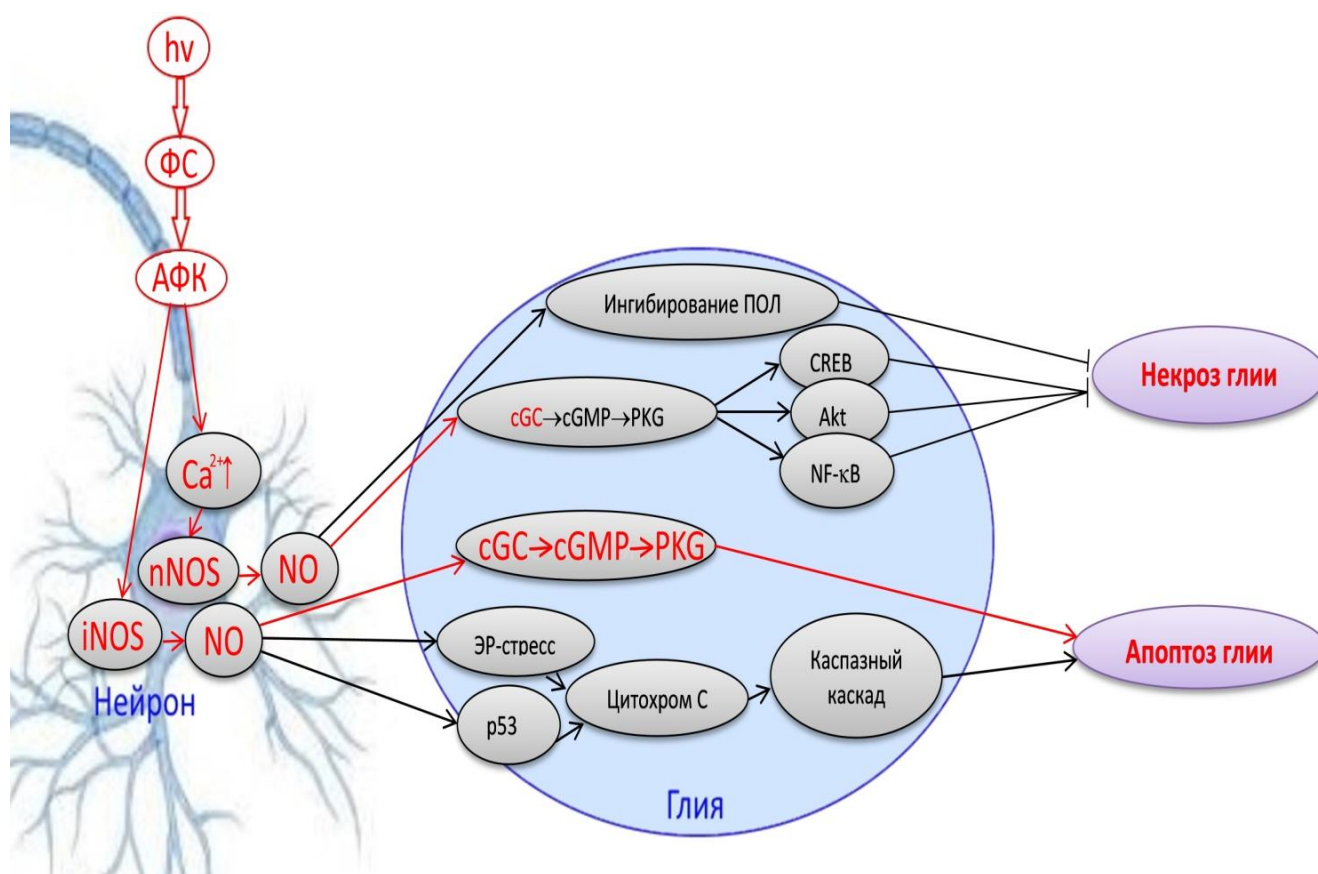


Рис. 37. Предполагаемая схема NO-зависимых сигнальных механизмов в нейронах и глиальных клетках речевого рака, активируемых фотодинамическим воздействием

Обозначения: красным обозначены результаты наших экспериментов, черным – литературные данные. ФС – фотосенсибилизатор, АФК – активные формы кислорода, ПОЛ – перекисное окисление липидов

ПЕРСПЕКТИВЫ

Поскольку ФДТ широко используется в онкологии очень важно оптимизировать этот метод, разрушая опухолевые клетки более селективно. Особенно это актуально именно при лечении опухолей мозга, поскольку гибель каждого нейрона оказывает неизгладимое влияние на весь организм в целом.

Как показали наши исследования, активируя/ингибируя разные изоформы NO-синтаз при ФДТ, мы можем модулировать тип клеточной смерти, индуцировать апоптоз или некроз. В этой связи, идеи использования препаратов, модулирующих NO-зависимые сигнальные механизмы, для оптимизации ФДТ, очень разумны. После четкого выяснения механизмов участия NO в ФД индуцированном повреждении нейронов и глиальных клеток, нейроглиальных взаимодействиях при ФДТ и выявлении наиболее вероятных ключевых участников этих процессов на нашем модельном объекте необходимо будет провести исследование выявленных модуляторов на млекопитающих (крысах, мышах). В дальнейшем выявленные модуляторы или их аналоги можно будет рекомендовать фармацевтическим компаниям для клинических испытаний.

Кроме того, селективный запуск апоптоза, может быть интересен также и при лечении других видов раков, в виду того, что при апоптотической гибели клеток не происходит образования шрамов и рубцов. В этой связи, важно будет изучить участие выявленных наиболее значимых в ФД индуцированном повреждении NO-модуляторов в ФД индуцированном повреждении клеток другого типа, например, культурах клеток карциномы и меланомы, с целью дальнейшего достижения максимального косметологического эффекта при лечении раков кожи.

ВЫВОДЫ

1. Фотодинамическое воздействие за 4-7 минут вызывает резкое увеличение генерации NO, а затем продукция NO уменьшается ниже исходного уровня. Динамика активации NO-синтазы имеет аналогичный двухфазный характер.

2. NO-синтаза локализуется, главным образом, в перикарионе нейронов. В меньшем количестве она также обнаруживается в дендритах, рецепторных мышцах и глиальной оболочке аксона.

3. При фотодинамическом воздействии в глиальных клетках рецептора растяжения рака NO проявляет проапоптотическую активность.

4. NO защищает нейроны и глиальные клетки рецептора растяжения рака от ФД индуцированного некроза.

5. В развитии апоптоза глиальных клеток при фотодинамическом воздействии участвует индуцибельная NO-синтаза, а нейрональная NO-синтаза скорее задействована в развитии ФД индуцированного некроза глиальных клеток.

6. В ФД индуцированном апоптозе глиальных клеток участвует сигнальный путь NO/sGC/cGMP/протеинкиназа G.

7. При фотодинамическом воздействии NO генерируется в нейронах рецептора растяжения рака и влияет на глиальные клетки: стимулирует их фотоиндуцированный апоптоз, и снижает некроз.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 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. – 220 с.
- Ванин, А.Ф. Оксид азота регулятор клеточного метаболизма / А.Ф.Ванин // Соросовский образовательный журнал. – 2001. – Т. 7, – № 11. – С. 712.
- Ванин, А.Ф. Динитрозильные комплексы железа с тиолсодержащими лигандами: физикохимия, биология, медицина / А.Ф.Ванин. – Москва: ИКИ, 2015. – 220 с.
- Владимиров, Ю.А. Физико-химические основы фотобиологических процессов/ Ю.А. Владимирова, А.Я. Потапенко. – Москва: Высшая школа, 1989. – 199 с.
- Загускин, С. Л. Ритмы клетки и здоровье человека / С. Л. Загускин – Ростов-на-Дону: Издательство Южного Федерального Университета, 2010. – 292 с.
- Ильинский, О.Б. Физиология сенсорных систем / О.Б. Ильинский – Ленинград: Наука, 1975. – 560 с.
- Лобанов, А.В. Роль неироглиальных взаимодействий и кальциевой сигнальной системы в реакциях нейронов и глиальных клеток речного рака на фотодинамическое воздействие: автореф. дисс. на соискание ученой степени канд. биол. наук. – Ростов-на-Дону. – 2007. – 27 с.
- Новиков, В.С. Программированная клеточная гибель / В.С. Новиков. – Санкт-Петербург: Наука, 1996. –175 с.
- Реутов, В.П. Цикл окиси азота в организме млекопитающих / В.П. Реутов // Успехи биол. химии. – 1995. – Т. 35. – С. 189–228.
- Сосунов, А.А. Оксид азота как межклеточный посредник / А.А. Сосунов // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – Т. 6. – №8. – С. 27–34.

- Странадко, Е.Ф. Фотодинамическая терапия в комплексном лечении злокачественных опухолей / Е.Ф. Странадко, В.М. Мешков, М.В. Рябов // Экспер. онкология. – 2000. – Т.22. – С. 362–364.
- Степанов, Ю.М. Аргинин в медицинской практике / Ю. М. Степанов, И. Н. Кононов, А. И. Журбина, А. Ю. Филиппова // Журн. АМН України. – 2004. – Т. 10. – № 1. – С. 340–375.
- Тимошин, А.А. Динитрозильные комплексы железа - новый тип гипотензивных препаратов / А.А. Тимошин, Ц.Р. Орлова, А.Ф. Ванин, Н.А. Санина, Э.К. Рууге, С.М. Алдошин, Е.И. Чазов // Российский химический журнал. –2007 . – Т. 51. – № 1. – С. 88–92.
- Узденский А.Б. Инактивация сукцинатдегидрогеназы в изолированном механорецепторном нейроне рака сфокусированным синим лазерным излучением / А.Б. Узденский // Цитология. – 1987. – Т.2 9. – С. 1392–1397.
- Узденский А.Б. Клеточно-молекулярные механизмы фотодинамической терапии / А.Б. Узденский. – Санкт-Петербург: Наука, 2010. – 327 с.
- Черток, В. М. Рецепторный аппарат сосудов головного мозга при артериальной гипертензии / В. М. Черток, А. Е. Коцюба // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. – 2010. – Т. 110. – № 10. – С. 40–47.
- Черток, В. М. Нитроксидергические нейроны в некоторых ядрах продолговатого мозга человека и крысы / В. М. Черток, А. Е. Коцюба, Е. В. Бабич // Цитология. – 2009. – Т. 51, – № 7. – С. 612–616
- Ahern, G.P. cGMP and S-nitrosylation: two routes for modulation of neuronal excitability by NO / G.P. Ahern, V.A.Klyachko, M.B.Jackson // Trends Neurosci. – 2002. – V. 25. – No. 10. – P. 510–517.
- Ahern, G.P. Induction of persistent sodium current by exogenous and endogenous nitric oxide / G.P. Ahern, S.F. Hsu, V.A. Klyachko, M.B. Jackson // J Biol Chem. – 2000. – V. 275. – No. 37. – P. 28810–28815.

- Ali, S.M. Mechanisms of action of phenanthroperylenequinones in photodynamic therapy / S.M. Ali, M. Olivo // *Int J Oncol.* – 2003. – V. 22. – No. 6. – P. 1181–1191.
- Almeida, R.D. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy / R.D. Almeida, B.J. Manadas, A.P. Carvalho, C.B. Duarte // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2004. – V. 1704. – No. 2. – P. 59–86.
- Aquilano, K. Nuclear recruitment of neuronal nitric-oxide synthase by α -synuclein is crucial for the induction of mitochondrial biogenesis / K. Aquilano, S. Baldelli, M.R. Ciriolo // *J Biol. Chem.* – 2014. – V. 289. – P. 365–378.
- Auld, D.S. Glial cells and neurotransmission: an inclusive view of synaptic function / D.S. Auld, R. Robitaille // *Neuron.* – 2003. – V. 40. – P. 389–400.
- Barres, B.A. Neuronal and glial cell biology / B.A. Barres, Y. Barde // *Curr Opin. Neurobiol.* – 2000. – V.10. – No.5. – P. 642–648.
- Bates, T.E. Immunocytochemical evidence for a mitochondrially located nitric oxide synthase in brain and liver / T.E. Bates, A. Loesch, G. Burnstock, J.B. Clark // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1995. – V. 213. – No. 3. – P. 896–900.
- Batista, C.M. Subcellular localization of neuronal nitric oxide synthase in the superficial gray layer of the rat superior colliculus / C.M. Batista, K.C. De Paula, L.A. Cavalcante, R. Mendez-Otero // *Neurosci Res.* – 2001. – V. 41. – No. 1. – P. 67–70.
- Bhowmick, R. Cytoprotective signaling associated with nitric oxide upregulation in tumor cells subjected to photodynamic therapy-like oxidative stress / R. Bhowmick, A.W. Girotti // *Free Radic Biol Med.* – 2013. – V. 57. – P. 39–48.
- Bhowmick, R. Signaling events in apoptotic photokilling of 5-aminolevulinic acid-treated tumor cells: inhibitory effects of nitric oxide / R. Bhowmick, A. W. Girotti // *Free Radic Biol Med.* – 2009. – V. 47. – No. 6. – P. 731–740.

- Bicker, G. Sources and targets of nitric oxide signalling in insect nervous systems / G. Bicker // *Cell Tissue Res.* – 2001. – V. 303. – No. 2. – P. 137–146.
- Boyle, J.J. Human macrophage–induced vascular smooth muscle cell apoptosis requires NO enhancement of Fas/Fas–L interactions / J.J. Boyle, P.L. Weissberg, M.R. Bennett // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2002. – V. 22. – No. 10. – P. 1624–1630.
- Brana, C. A method for characterising cell death in vitro by combining propidium iodide staining with immunohistochemistry / C. Brana, C. Benham, L. Sundstrom // *Brain Res Brain Res Protoc.* – 2002. – V. 10. – No. 2. – P. 109–114.
- Bredt, D.S. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology / D.S. Bredt // *Free Radic. Res.* – 1999. – V. 31. – P. 577–596.
- Brown, G.C. Inflammatory neurodegeneration and mechanisms of microglial killing of neurons / G.C. Brown, J.J. Neher // *Mol Neurobiol.* – 2010. – V. 41. – No. 2–3. – P. 242–247.
- Brown, G.C. Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase / G.C. Brown, C.E. Cooper // *FEBS Lett.* – 1994. – V. 356. – No. 2–3. – P. 295–298.
- Brown, G.C. Nitric oxide and neuronal death / G.C. Brown // *Nitric Oxide.* – 2010. – V. 23. – No. 3. – P. 153–165.
- Brown, S.B. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment / S.B. Brown, E.A. Brown, I. Walker // *Lancet Oncol.* – 2004. – V. 5. – No. 8. – P. 497–508.
- Brune, B. Nitric oxide: NO apoptosis or turning it ON? / B. Brune // *Cell Death Differ.* – 2003. – V. 10. – No. 8. – P. 864–869.
- Buskila, Y. Rapid and reactive nitric oxide production by astrocytes in mouse neocortical slices / Y. Buskila, S. Farkash, M. Hershfinkel, Y. Amitai // *Glia.* – 2005. – V. 52. – No. 3. – P. 169–176.

- Bustamante, J. Brain nitric oxide synthases and mitochondrial function / J. Bustamante, A. Czerniczyniec, S. Lores–Arnaiz // *Front Biosci.* – 2007. – V. 12. – No. 3. – P. 1034–1040.
- Calabrese, V. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity / V. Calabrese, C. Mancuso, M. Calvani, E. Rizzarelli, D.A. Butterfield, A.M. Stella // *Nat Rev Neurosci.* – 2007. – V. 8. – No. 10. – P. 766–775.
- Cao, L. Subcellular localization of neuronal nitric oxide synthase in turtle retina: electron immunocytochemistry / L. Cao, W.D. Eldred // *Vis Neurosci.* – 2001. – V. 18. – P. 949–960.
- Carreras, M.C. Modulation of liver mitochondrial NOS is implicated in thyroid–dependent regulation of O(2) uptake/ M.C. Carreras, J.G.Peralta, D.P. Converso, P.V. Finocchietto, I. Rebagliati, A.A. Zaninovich, J.J. Poderoso // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2001. – V. 281. – No. 6. – P. H2282–8.
- Castano, A.P. Mechanisms in photodynamic therapy: part two–cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death / A.P. Castano, T.N. Demidova, M.R. Hamblin // *Photodiagnosis Photodyn Ther.* – 2005. – V. 2. – No. 1. – P. 1–23.
- Chan, W.H. Apoptotic signalling cascade in photosensitized human epidermal carcinoma A431 cells: involvement of singlet oxygen, c–Jun N–terminal kinase, caspase–3 and p21–activated kinase 2 / W.H. Chan, J.S. Yu, S.D. Yang // *Biochem J.* – 2000. – V. 351. – No. 1. – P. 221–232.
- Chan, W.H. Photodynamic treatment induces an apoptotic pathway involving calcium, nitric oxide, p53, p21-activated kinase 2, and c-jun n-terminal kinase and inactivates survival signal in human umbilical vein endothelial cells / W.H. Chan // *Int J Mol Sci.* – 2011. – V. 12. – No. 2. – P. 1041–1059.
- Cleeter, M.W. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for

- neurodegenerative diseases / M.W. Cleeter, J.M. Cooper, V.M. Darley–Usmar, S. Moncada, A.H. Schapira // *FEBS Lett.* – 1994. – V. 345. – No. 1. – P. 50–54.
- Coutier, S. Foscan (mTHPC) photosensitized macrophage activation: enhancement of phagocytosis, nitric oxide release and tumour necrosis factor–alpha–mediated cytolytic activity / S. Coutier, L. Bezdetsnaya, S. Marchal, V. Melnikova, I. Belitchenko, J.L. Merlin, F. Guillemin // *Br J Cancer.* – 1999. – V. 81. – No. 1. – P. 37–42.
- Davies, M.J. Singlet oxygen–mediated damage to proteins and its consequences / M.J. Davies // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2003. – V. 305. – No. 3. – P. 761–770.
- Dawson, T.M. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues / T.M. Dawson, D.S. Bredt, M. Fotuhi, P.M. Hwang, S.H. Snyder // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1991. – V. 88. – P. 7797–7801.
- Dedkova, E.N. Characteristics and function of cardiac mitochondrial nitric oxide synthase / E.N. Dedkova, E.A. Blatter // *J Physiol.* – 2009. – V. 15. – No. 587(Pt 4). – P. 851–872.
- Dellinger, M. Apoptosis or necrosis following Photofrin photosensitization: influence of the incubation protocol / M. Dellinger // *Photochem Photobiol.* – 1996. – V. 64. – No. 1. – P. 182–187.
- Di Venosa, G. No cross–resistance between ALA–mediated photodynamic therapy and nitric oxide / G. Di Venosa, A. Casas, H. Fukuda, C. Perotti, A. Batlle // *Nitric Oxide.* – 2005. – V. 13. – No. 3. – P. 155–162.
- Ding, J.M. Resetting the biological clock: mediation of nocturnal circadian shifts by glutamate and NO / J.M. Ding, D. Chen, E.T. Weber, L.E. Faiman, M.A. Rea, M.U. Gillette // *Science.* – 1994. – V. 266. – No. 5191. – P. 1713–1717.
- Dougherty, T.J. Photodynamic therapy / T.J. Dougherty, C.J. Gomer, B.W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, Q. Peng // *J Natl Cancer Inst.* – 1998. – V. 90. – No. 12. – P. 889–905.

- Drab, M. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice / M. Drab, P. Verkade, M. Elger, M. Kasper, M. Lohn, B. Lauterbach, J. Menne, C. Lindschau, F. Mende, F.C. Luft, A. Schedl, H. Haller, T.V. Kurzchalia // *Science*. – 2001. – V. 293. – No. 5539. – P. 2449–2452.
- Edwards, T.M. New perspectives on the mechanisms through which nitric oxide may affect learning and memory processes / T.M. Edwards, N.S. Rickard // *Neurosci Biobehav Rev*. – 2007. – V. 31. – No. 3. – P. 413–425.
- Elfering, S.L. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. / S.L. Elfering, T.M. Sarkela, C. Giulivi // *J Biol Chem*. – 2002. – V. 277. – No. 41. – P. 38079–38086.
- Fedorenko, G.M. Photodynamic Inactivation of Isolate Crayfish Mechanoreceptor Neuron Different Photosensitizer Concentrations / G.M. Fedorenko, A.B. Uzdensky, D.F. Bragin, M.B. Kolosov // *J. Photochemistry and Photobiology*. – 2002. – V. 76. – No. 4. – P. 52–58.
- Fernández-Tomé, P. Neuroprotective effects of DETA-NONOate, a nitric oxide donor, on hydrogen peroxide-induced neurotoxicity in cortical neurons / P. Fernández-Tomé, I. Lizasoain, J.C. Leza, P. Lorenzo, M.A. Moro // *Neuropharmacology*. – 1999. – V. 38. – No. 9. – P. 1307–1315.
- Florey, E. Microanatomy of the abdominal stretch receptors of the crayfish (*Astacus fluviatilis* L.) / E. Florey, E. Florey // *J Gen Physiol*. – 1955. – V. 39. – No. 1. – P. 69–85.
- Förstermann, U. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions / U. Förstermann, E.I. Closs, J.S. Pollock, M. Nakane, P. Schwarz, I. Gath, H. Kleinert // *Hypertension*. – 1994. – V. 23. – No. 6. – P. 1121–1131.
- Förstermann, U. Nitric oxide synthases: regulation and function / U. Förstermann, W.C. Sessa // *Eur Heart J*. – 2012. – V. 33. – No. 7. – P. 829–837.

- Franchini, A. Nitric oxide: an ancestral immunocyte effector molecule / A. Franchini, A. Conte, E. Ottaviani // *Adv Neuroimmunol.* – 1995. – V. 5. – No. 4. – P. 463–478.
- Fukuo, K. Nitric oxide induces upregulation of Fas and apoptosis in vascular smooth muscle / K. Fukuo, S. Hata, T. Suhara, T. Nakahashi, Y. Shinto, Y. Tsujimoto, S. Morimoto, T. Ogihara // *Hypertension.* – 1996. – V. 27. – No. 3. – P. 823–826.
- Gallus, L. Nitric oxide synthase (NOS) in the cyprid of *Amphibalanus amphitrite* (Cirripedia, Crustacea) / L. Gallus, S. Ferrando, C. Gambardella, M. Faimali, V. Piazza, M.A. Masini // *Neurosci Lett.* – 2013. – V. 555. – P. 209–214.
- García–Cardeña, G. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90 / G. García–Cardeña, R. Fan, V. Shah, R. Sorrentino, G. Cirino, A. Papapetropoulos, W.C. Sessa // *Nature.* – 1998. – V. 392. – No. 6678. – P. 821–824.
- Garthwaite, J. Concepts of neural nitric oxide–mediated transmission / J. Garthwaite // *Eur J Neurosci.* – 2008. – V. 27. – No. 11. – P. 2783–2802.
- Ghafourifar, P. Nitric oxide synthase activity in mitochondria / P. Ghafourifar, C. Richter // *FEBS Lett.* – 1997. – V. 418. – No. 3. – P. 291–296.
- Ghatan, S. p38 MAP kinase mediates bax translocation in nitric oxide–induced apoptosis in neurons / S. Ghatan, S. Larner, Y. Kinoshita, M. Hetman, L. Patel, Z. Xia, R.J. Youle, R.S. Morrison // *J Cell Biol.* – 2000. – V. 24. – No. 150. – P. 335–347.
- Girotti, A.W. Photodynamic lipid peroxidation in biological systems / A.W. Girotti // *Photochem Photobiol.* – 1990. – V. 51. – No. 4. – P. 497–509.
- Girotti, A.W. Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms / A.W. Girotti // *J Photochem Photobiol B.* – 2001. – V. 63. – No. 1–3. – P. 103–113.

- Girotti, A.W. Tumor-generated nitric oxide as an antagonist of photodynamic therapy / A.W. Girotti // *J Photochem Photobiol B.* – 2015. – V. 14. – No. 8. — P. 1425-1432.
- Giulivi, C. Production of nitric oxide by mitochondria / C. Giulivi, J.J. Poderoso, A. Boveris // *J Biol Chem.* – 1998. – V. 273. – No. 18. – P. 11038–11043.
- Golde, S. Different pathways for iNOS-mediated toxicity in vitro dependent on neuronal maturation and NMDA receptor expression / S. Golde, S. Chandran, G.C. Brown, A. Compston // *J Neurochem.* – 2002. – V. 82. – No. 2. – P. 269–282.
- Gomes, E.R. Nitric oxide modulates tumor cell death induced by photodynamic therapy through a cGMP-dependent mechanism / E.R. Gomes, R.D. Almeida, A.P. Carvalho, C.B. Duarte // *Photochem Photobiol.* – 2002. – V. 76. – P. 423–430.
- González Deniselle, M.C. Progesterone treatment reduces NADPH-diaphorase/nitric oxide synthase in Wobbler mouse motoneuron disease / M.C. González Deniselle, L. Garay, J.J. López-Costa, S. González, A. Mougel, R. Guennoun, M. Schumacher, A.F. De Nicola // *Brain Res.* – 2004. – V. 1014. – P. 71–79.
- González-Forero, D. Inhibition of resting potassium conductances by long-term activation of the NO/cGMP/protein kinase G pathway: a new mechanism regulating neuronal excitability / D. González-Forero, F. Portillo, L. Gómez, F. Montero, S. Kasparov, B. Moreno-López // *J Neurosci.* – 2007. – V. 27. – No. 23. – P. 6302–6312.
- Grassi, C. Modulation of Ca(v)1 and Ca(v)2.2 channels induced by nitric oxide via cGMP-dependent protein kinase / C. Grassi, M. D'Ascenzo, G.B. Azzena // *Neurochem Int.* – 2004. – V. 45. – No. 6. – P. 885–893.
- Gupta, S. Involvement of nitric oxide during phthalocyanine (Pc4) photodynamic therapy-mediated apoptosis / S. Gupta, N. Ahmad, H. Mukhtar // *Cancer Res.* – 1998. – V. 58. – No. 9. – P. 1785–1788.

- Gusarov, I. Bacterial nitric oxide extends the lifespan of *C. elegans*. / I.Gusarov, L. Gautier, O. Smolentseva, I. Shamovsky, S. Eremina, A. Mironov, E. Nudler // *Cell*. – 2013. – V. 152. – No. 4. – P. 818–830.
- Haase, A. Nitric oxide and cyclic nucleotides are regulators of neuronal migration in an insect embryo / A. Haase, G. Bicker // *Development*. – 2003. – V. 130. – No. 17. – P. 3977–3987.
- Hamilton, N.B Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? / N.B. Hamilton, D. Attwell // *Nat Rev Neurosci*. – 2010. – V. 11. – No. 4. – P. 227–238.
- Hardingham, N. The role of nitric oxide in pre-synaptic plasticity and homeostasis *Front* / N. Hardingham, J. Dachtler, K. Fox // *Cell Neurosci*. – 2013. – V. 7. – P. 190.
- Haunstetter, A. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease / A. Haunstetter, S. Izumo // *Circ Res*. – 1998. – V. 82. – No. 11. – P. 1111–1129.
- He, J. Cell death mechanisms vary with photodynamic therapy dose and photosensitizer *Proc* / J. He, N.L. Oleinick // *SPIE Int. Soc. Opt. Eng*. – 1995. – V. 2371. – P. 92–96.
- He, J. Protease activation and cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: an integral part of apoptosis in response to photodynamic treatment / J. He, C.M. Whitacre, L.Y. Xue, N.A. Berger, N.L. Oleinick // *Cancer Res*. – 1998. – V. 58. – No. 5. – P. 940–946.
- Hemmens, B. Role of bound zinc in dimer stabilization but not enzyme activity of neuronal nitric-oxide synthase / B. Hemmens, W. Goessler, K. Schmidt, B. Mayer // *J Biol Chem*. – 2000. – V. 275. – No. 46. – P. 35786–35791.
- Hope, B.T. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase *Proc Natl* / B.T. Hope, G.J. Michael, K.M. Knigge, S.R. Vincent // *Acad Sci USA*. – 1991. – V. 88. – No. 7. – P. 2811–2814.

- Huwiler, A. Nitric oxide stimulates the stress-activated protein kinase p38 in rat renal mesangial cells / A. Huwiler, J. Pfeilschifter // *J Exp Biol.* – 1999. – V. 202. – P. 655–660.
- Iuvone, T. Differential effect of L-NAME and S-methyl-isothiourea on leukocyte emigration in carrageenin-soaked spongeimplants in rat / T. Iuvone, N. Van Osselaer, F. D'Acquisto, R. Carnuccio, A.G. Herman // *Br J Pharmacol.* – 1997. – V. 121. – No. 8. – P. 1637–1644.
- Izumi, Y. Nitric oxide and long-term synaptic depression in the rat hippocampus / Y. Izumi, C.F. Zorumski // *Neuroreport.* – 1993. – V. 4. – No. 9. – P. 1131–1134.
- Kamisaki, Y. The involvement of catalytic site thiol groups in the activation of soluble guanylate cyclase by sodium nitroprusside / Y. Kamisaki, S.A. Waldman, F. Murad // *Arch Biochem Biophys.* – 1986. – V. 251. – No. 2. – P. 709–714.
- Kanwar, J.R. Recent advances on the roles of NO in cancer and chronic inflammatory disorders / J.R. Kanwar, R.K. Kanwar, H. Burrow, S. Baratchi // *Curr Med Chem.* – 2009. – V. 16. – No. 19. – P. 2373–2394.
- Keilhoff, G. Neuronal nitric oxide synthase is the dominant nitric oxide supplier for the survival of dorsal root ganglia after peripheral nerve axotomy / G. Keilhoff, H. Fansa, G. Wolf // *J Chem Neuroanat.* – 2002. – V. 24. – No. 3. – P. 181–187.
- Kessel, D. Mitochondrial photodamage and PDT-induced apoptosis / D. Kessel, Y. Luo // *J Photochem Photobiol B.* – 1998. – V. 42. – No. 2. – P. 89–95.
- Kessel, D. Photodynamic therapy: a mitochondrial inducer of apoptosis / D. Kessel, Y. Luo // *Cell Death Differ.* – 1999. – V. 6. – No. 1. – P. 28–35.
- Kim, R. Role of the unfolded protein response in cell death / R. Kim, M. Emi, K. Tanabe, S. Murakami // *Apoptosis.* – 2006. – V. 11. – No. 1. – P. 5–13.
- Kim, Y.M. Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms J / Y.M. Kim, R.V. Talanian, T.R. Billiar // *Biol. Chem.* . – 1997. – V. 272. – P. 31138–31148.

- Klatt, P. Determination of nitric oxide synthase cofactors: heme, FAD, FMN, and tetrahydrobiopterin / P. Klatt, K. Schmidt, E.R. Werner, B. Mayer // *Methods Enzymol.* – 1996. – V. 268. – P. 358–365.
- Klinz, F.J. Phospho-eNOS Ser-1176 is associated with the nucleoli and the Golgi complex in C6 rat glioma cells / F.J. Klinz, N. Herberg, S. Arnhold, K. Addicks, W. Bloch // *Neurosci Lett.* – 2007. – V. 421. – No. 3. – P. 224–228.
- Kobzik, L. Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization / L. Kobzik, D.S. Bredt, C.J. Lowenstein, J. Drazen, B. Gaston, D. Sugarbaker // *Am J Respir Cell Mol Biol.* – 1993. – V. 9. – No. 4. – P. 371–377.
- Koesling, D. Structure–function relationships in NO–sensitive Guanylyl cyclase. Nitric oxide. biology and pathobiology / D. Koesling, A. Friebe // *Academic Press.* – 2000. – P. 369–379.
- Kolosov, M.S. Photodynamic injury of isolated neuron and satellite glial cells: morphological study / M.S. Kolosov, D.E. Bragin, A.S. Kohany, A.B. Uzdensky // *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics.* – 2003. – V. 9. – No. 2. – P. 337–342.
- Kolosov, M. Crayfish mechanoreceptor neuron prevents photoinduced apoptosis of satellite glial cells / M. Kolosov, A. Uzdensky // *Brain Research Bulletin.* – 2006. – V. 69. – P. 495–500.
- Korbelik, M. Nitric oxide production by tumour tissue: impact on the response to photodynamic therapy / M. Korbelik, C.S. Parkins, H. Shibuya, I. Cecic, M.R. Stratford, D.J. Chaplin // *Br J Cancer.* – 2000. – V. 82. – No. 11. – P. 1835–1843.
- Korzhevskii, D.E. Immunocytochemical demonstration of neuronal NO–synthase in rat brain cells / D.E. Korzhevskii, V.A. Otellin, I.P. Grigor'ev, E.S. Petrova, E.G. Gilerovich, N.N. Zin'kova // *Morfologia.* – 2007. – V. 132. – P. 77–80.
- Kotsonis, P. Allosteric regulation of neuronal nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin and suppression of auto–damaging superoxide / P. Kotsonis,

- L.G. Fröhlich, Z.V. Shutenko, R. Horejsi, W. Pfeleiderer, H.H. Schmidt // *Biochem J.* – 2000. – V. 346. – No. 3. – P. 767–776.
- Lane, C. Epithelial inducible nitric oxide synthase activity is the major determinant of nitric oxide concentration in exhaled breath / C. Lane, D. Knight, S. Burgess, P. Franklin, F. Horak, J. Legg // *Thorax.* – 2004. – V. 59. – No. 9. – P. 757–760.
- Lange, M. Role of nitric oxide in shock: the large animal perspective / M. Lange, P. Enkhbaatar, Y. Nakano, D.L. Traber // *Front Biosci (Landmark Ed).* – 2009. – V. 14. – P. 1979–1989.
- Larionova, N.P. Comparative analysis of plasticity of neuro–neuronal and neuroglial encapsulating interactions of molecular layer of isolated frog cerebellum exposed to excess L–glutamate and NO–generating compound / N.P. Larionova, V.P. Reutov, N.V. Samosudova, L.M. Chailakhyan // *Dokl Biol Sci.* – 2003. – V. 393. – P. 515–519.
- Latt, S.A. Brdu–333258 Hoechst analysis of DNA replication in human lymphocytes with supernumerary or structurally abnormal X chromosomes / S.A. Latt, H.F. Willard, R.S. Gerald // *Chromosoma.* – 1976. – V. 57. – No. 2. – P. 135–153.
- Lemasters, J.J. Confocal microscopy of the mitochondrial permeability transition in necrotic cell killing, apoptosis and autophagy / J.J. Lemasters, T. Qian, S.P. Elmore, L.C. Trost, Y. Nishimura, B. Herman, C.A. Bradham, D.A. Brenner, A.L. Nieminen // *Biofactors.* – 1998. – V. 8. – No. 3–4. – P. 283–285.
- Lu, Z. Mitochondrial reactive oxygen species and nitric oxide–mediated cancer cell apoptosis in 2–butylamino–2–demethoxyhypocrellin B photodynamic treatment / Z. Lu, Y. Tao, Z. Zhou, J. Zhang, C. Li, L. Ou, B. Zhao // *Free Radic Biol Med.* – 2006. – V. 41. – No. 10. – P. 1590–1605.
- Lucas, K.A. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP / K.A. Lucas, G.M. Pitari, S. Kazerounian, I. Ruiz–Stewart, J. Park, S. Schulz, K.P. Chepenik, S.A. Waldman // *Pharmacol Rev.* – 2000. – V. 52. – No. 3. – P. 375–414.

- Luo, Y. Initiation of apoptosis versus necrosis by photodynamic therapy with chloroaluminum phthalocyanine / Y. Luo, D. Kessel. // *Photochem Photobiol.* – 1997. – V. 66. – No. 4. – P. 479–483.
- Madison, D.V. LTP, post or pre? A look at the evidence for the locus of long-term potentiation / D.V. Madison, E.M. Schuman // *New Biol.* – 1991. – V. 3. – No. 6. – P. 549–557.
- Majumdar, P. Activatable triplet photosensitizers: magic bullets for targeted photodynamic therapy / P. Majumdar, R. Nomula, J. Zhao // *Chem. C.* – 2014. – V. 2. – P. 5982–5997.
- Mattila, J.T. Nitric oxide synthase: non-canonical expression patterns / J.T. Mattila, A.C. Thomas // *Front Immunol.* – 2014. – V. 5. – P. 478.
- McLeod, D.S. Co-expression of endothelial and neuronal nitric oxide synthases in the developing vasculatures of the human fetal eye / D.S. McLeod, T. Baba, I.A. Bhutto, G.A. Luttly // *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* – 2012. – V. 250. – No. 6. – P. 839–848.
- Melikian, N. Neuronal nitric oxide synthase and human vascular regulation / N. Melikian, M.D. Seddon, B. Casadei, P.J. Chowienczyk, A.M. Shah // *Trends Cardiovasc Med.* – 2009. – V. 19. – No. 8. – P. 256–262.
- Metea, M. R. Calcium signaling in specialized glial cells / M.R. Metea, E.A. Newman // *Glia.* – 2006. – V. 54. – No. 7. – P. 650–655.
- Misonou, H. Dynamic regulation of the Kv2.1 voltage-gated potassium channel during brain ischemia through neuroglial interaction / H. Misonou, S.M. Thompson, X. Cai // *J Neurosci.* – 2008. – V. 28. – No. 34. – P. 8529–8538.
- Moncada, S. The L-arginine-nitric oxide pathway / S. Moncada, A. Higgs // *Engl J Med.* – 1993. – V. 329. – No. 27. – P. 2002–2012.

- Moncada, S. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology / S. Moncada, R.M. Palmer, E.A. Higgs // *Pharmacol Rev.* – 1991. – V. 43. – P. 109–142.
- Moncada, S. Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration / S. Moncada, J.P. Bolaños // *J Neurochem.* – 2006. – V. 97. – No. 6. – P. 1676–1689.
- Moor, A.C. Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy / A.C. Moor // *J Photochem Photobiol B.* – 2000. – V. 57. – No. 1. – P. 1–13.
- Moroz, L.L. From Polyplacophora to Cephalopoda: comparative analysis of nitric oxide signalling in Mollusca / L.L. Moroz, R. Gillette // *Acta Biol Hung.* – 1995. – V. 46. – No. 2–4. – P. 169–182.
- Motavkin, P.A. Immunochemical identification of vasopressin in neurons and granule-containing cells of blood vessels of the human brain / P.A. Motavkin, A.V. Lomakin, Yu.I. Pigolkin // *Neurosci Behav Physiol.* – 1990. – V. 20. – No. 4. – P. 348–352.
- Murphy, S. Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells / S. Murphy, M.L. Simmons, L. Agullo, A. Garcia, D.L. Feinstein, E. Galea, D.J. Reis, D. Minc-Golomb, J.P. Schwartz // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1993. – V. 90. – No. 7. – P. 3024–3027.
- Nakane, M. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle / M. Nakane, H.H. Schmidt, J.S. Pollock, U. Förstermann, F. Murad // *FEBS Lett.* – 1993. – V. 316. – No. 2. – P. 175–180.
- Nicotera, P. Apoptosis and necrosis: different execution of the same death / P. Nicotera, M. Leist, E. Ferrando-May // *Biochem Soc Symp.* – 1999. – V. 66. – P. 69–73.
- Niziolek, M. Nitric oxide inhibition of free radical-mediated lipid peroxidation in photodynamically treated membranes and cells / M. Niziolek, W. Korytowski, A.W. Girotti // *Free Radic Biol Med.* – 2003. – V. 34. – P. 997–1005.

- Niziolek, M. Nitric oxide–induced resistance to lethal photooxidative damage in a breast tumor cell line / M. Niziolek, W. Korytowski, A.W. Girotti // *Free Radic Biol Med.* – 2006. – V. 40. – No. 8. – P. 1323–1331.
- Oleinick, N.L. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how / N.L. Oleinick, R.L. Morris, I. Belichenko // *Photochem Photobiol Sci.* – 2002. – V. 1. – No. 1. – P. 1–21.
- Perner, A. Constitutive expression of inducible nitric oxide synthase in the normal human colonic epithelium / A. Perner, L. Andresen, M. Normark, J. Rask–Madsen // *Scand J Gastroenterol.* – 2002. – V. 37. – No. 8. – P. 944–948.
- Persichini, T. Mitochondrial type I nitric oxide synthase physically interacts with cytochrome c oxidase / T. Persichini, V. Mazzone, F. Polticelli, S. Moreno, G. Venturini, E. Clementi, M. Colasanti // *Neurosci Lett.* – 2005. – V. 384. – No. 3. – P. 254–259.
- Putcha, G.V. JNK–mediated BIM phosphorylation potentiates BAX–dependent apoptosis / G.V. Putcha, S. Le, S. Frank, C.G. Besirli, K. Clark, B. Chu, S. Alix, R.J. Youle, A. LaMarche, A.C. Maroney, E.M. Johnson Jr. // *Neuron.* – 2003. – V. 38. – No. 6. – P. 899–914.
- Quirk, B.J. Photodynamic therapy (PDT) for malignant brain tumors--where do we stand? / B.J. Quirk, G. Brandal, S. Donlon, J.C. Vera, T.S. Mang, A.B. Foy, S.M. Lew, A.W. Girotti, S. Jogonal, P.S. LaViolette, J.M. Connelly, H.T. Whelan // *Photodiagnosis Photodyn Ther.* . – 2015. – V. 12. – No. 3. – P. 530–544.
- Rapozzi, V. Nitric oxide–mediated activity in anti–cancer photodynamic therapy / V. Rapozzi, E. Della Pietra, S. Zorzet, M. Zacchigna, B. Bonavida, L.E. Xodo // *Nitric Oxide.* – 2013. – V. 30. – P. 26–35.
- Rapozzi, V. Dual roles of nitric oxide in the regulation of tumor cell response and resistance to photodynamic therapy / V. Rapozzi, E. Della Pietra, B. Bonavida // *Redox Biol.* – 2015. – V. 31. – No. 6. – P. 311–317.

- Reeves, K.J. Is nitric oxide important in photodynamic therapy? / K.J. Reeves, M.W. Reed, N.J. Brown // *J Photochem Photobiol. B.* – 2009. – V. 95. – P. 141–147.
- Reeves, K.J. The role of nitric oxide in the treatment of tumours with aminolaevulinic acid–induced photodynamic therapy / K.J. Reeves, M.W. Reed, N.J. Brown // *J Photochem Photobiol B.* – 2010. – V. 101. – No. 3. – P. 224–232.
- Ringham, G.L. Origin of nerve impulse in slowly adapting stretch receptor of crayfish. / G.L. Ringham // *J Neurophysiol.* – 1971. – V. 34. – No. 5. – P. 773–784.
- Robb, S.J. Influence of nitric oxide on cellular and mitochondrial integrity in oxidatively stressed astrocytes / S.J. Robb, L.D. Gaspers, K.J. Wright, A.P. Thomas, J.R. Connor // *J Neurosci Res.* – 1999. – V. 56. – P. 166–176.
- Roberts, P.J. The physiological expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the human colon / P.J. Roberts, G.P. Riley, K. Morgan, R. Miller, J.O. Hunter, S.J. Middleton // *J Clin Pathol.* – 2001. – V. 54. – No. 4. – P. 293–297.
- Rössig, L. Nitric oxide inhibits caspase–3 by S–nitrosation in vivo / L. Rössig, B. Fichtlscherer, K. Breitschopf, J. Haendeler, A.M. Zeiher, A. Mülsch, S. Dimmeler // *J Biol Chem.* – 1999. – V. 274. – No. 11. – P. 6823–6826.
- Ruscheweyh, R. Possible sources and sites of action of the nitric oxide involved in synaptic plasticity at spinal lamina I projection neurons / R. Ruscheweyh, A. Goralczyk, G. Wunderbaldinger, A. Schober, J. Sandkuhler // *Neuroscience* – 2006. – V. 141. – No. 2. – P. 977–988.
- Russwurm, M. NO/cGMP: the past, the present, and the future / M. Russwurm, C. Russwurm, D. Koesling, E. Mergia // *Methods Mol Biol.* – 2013. – V. 1020. – P. 1–16.
- Sase, K. Expression and regulation of endothelial nitric oxide synthase / K. Sase, T. Michel // *Trends Cardiovasc Med.* – 1997. – V. 7. – P. 28–37.

- Scherer–Singler, U. Demonstration of a unique population of neurons with NADPH–diaphorase histochemistry / U. Scherer–Singler, S.R. Vincent, H. Kimura, E.G. McGeer // *J. Neurosci. Methods.* – 1983. – V. 9. – P. 229–234.
- Schuppe, H. NADPH–diaphorase histochemistry in the terminal abdominal ganglion of the crayfish / P.L. Newland, H. Schuppe, H. Aonuma // *Cell Tissue Res.* – 2001. – V. 303. – No. 2. – P. 289–299.
- Schuppe, H. Distribution of NADPH–diaphorase–positive ascending interneurons in the crayfish terminal abdominal ganglion / H. Schuppe, H. Aonuma, P.L. Newland // *Cell Tissue Res.* – 2001. – V. 305. – P. 135–146.
- Sharman, W.M. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications / W.M. Sharman, C.M. Allen, J.E. Van Lier // *Drug Discov Today.* – V. 4. – No. 11. – P. 507–517.
- Sparrow, J.R. Inducible nitric oxide synthase in the central nervous system / J.R. Sparrow // *J Molec Neurosci.* – 1995. – V. 5. – P. 219–229.
- Steinert, J.R. Nitric oxide is a volume transmitter regulating postsynaptic excitability at a glutamatergic synapse / J.R. Steinert, C. Kopp–Scheinflug, C. Baker, R.A. Challiss, R. Mistry, M.D. Haustein, S.J. Griffin, H. Tong, B.P. Graham, I.D. Forsythe // *Neuron.* – 2008. – V. 60. – No. 4. – P. 642–656.
- Steinert, J.R. Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia / J.R. Steinert, T. Chernova, I.D. Forsythe // *Neuroscientist.* – 2010. – V. 16. – No. 4. – P. 435–452.
- Stuehr, D. Oxygen reduction by nitric–oxide synthases / D. Stuehr, S. Pou, G.M. Rosen // *J Biol Chem.* – 2001. – V. 276. – No. 18. – P. 14533–14536.
- Tang, Q. Inhibition of spinal constitutive NOS–2 by 1400W attenuates tissue injury and inflammation–induced hyperalgesia and spinal p38 activation / Q. Tang, C.I. Svensson, B. Fitzsimmons, M. Webb, T.L. Yaksh, X.Y. Hua // *Eur J Neurosci.* – 2007. – V. 25. – No. 10. – P. 2964–2972.

- Tao, L. Thioredoxin reduces post-ischemic myocardial apoptosis by reducing oxidative/nitrative stress / L. Tao, E. Gao, A. Hu, C. Coletti, Y. Wang, T.A. Christopher, B.L. Lopez, W. Koch, X.L. Ma // *Br J Pharmacol.* – 2006. – V. 149. – No. 3. – P. 311–318.
- Tao–Cheng, J.H. Ultrastructure of the crayfish stretch receptor in relation to its function / J.H. Tao–Cheng, K. Hirosawa, Y. Nakajima // *J Comp Neurol.* – 1981. – V. 200. – No. 1. – P. 1–21.
- Tarpey, M.M. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations / M.M. Tarpey, D.A. Wink, M.B. Grisham // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* – 2004. – V. 286. – No. 3. – P. 431–444.
- Tatoyan, A. Purification and characterization of a nitric–oxide synthase from rat liver mitochondria / A. Tatoyan, C. Giulivi // *J Biol Chem.* – 1998. – V. 273. – No. 18. – P. 11044–11048.
- Temburni, M.K. New Functions for Glia in the Brain / M.K. Temburni, M.H. Jacob // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2001. – V. 98. – No. 7. – P. 3631–3632.
- Toda, N. The pharmacology of nitric oxide in the peripheral nervous system of blood vessels / N. Toda, T. Okamura // *Pharmacol Rev.* – 2003. – V. 55. – No. 2. – P. 271–324.
- Torres, J. Cytochrome C oxidase rapidly metabolises nitric oxide to nitrite / J. Torres, M.A. Sharpe, A. Rosquist, C.E. Cooper, M.T. Wilson // *FEBS Lett.* – 2000. – V. 475. – No. 3. – P. 263–266.
- Torres, J.B. NADPH–diaphorase histochemical changes in the hippocampus, cerebellum and striatum are correlated with different modalities of exercise and watermaze performances / J.B. Torres, J. Assuncao, J.A. Farias, R. Kahwage, N. Lins, A. Passos, A. Quinteiros, N. Trevia, C.W. Diniz // *Exp Brain Res.* – 2006. – V. 175. – P. 292–304.

- Uzdensky, A. B. Laser microirradiation of single nerve cell – Laser–Tissue Interaction / A.B. Uzdensky // Proc. SPIE. – 1993. – V. 1882. – P. 254–267.
- Uzdensky, A. Photodynamic inactivation of isolated crayfish mechanoreceptor neuron: different death modes under different photosensitizer concentrations / A. Uzdensky, D. Bragin, M. Kolosov, O. Dergacheva, G. Fedorenko, A. Zhavoronkova. // Photochem Photobiol. – 2002. – V. 76. – No. 4. – P. 431–437.
- Uzdensky, A.B. Elevated activity of the crayfish stretch receptor neuron increases resistance of surrounding glial cells to apoptosis induced by photodynamic treatment / A.B Uzdensky, A.V. Lobanov // Neurosci Lett. – 2010. – V. 468. – No. 1. – P. 89–92.
- Uzdensky, A.B. Elevated activity of the crayfish stretch receptor neuron increases resistance of surrounding glial cells to apoptosis induced by photodynamic treatment / A.B. Uzdensky, A.V. Lobanov // Neurosci Lett. – 2010. – V. 468. – No.1. – P.89–92.
- Uzdensky, A.B. Photodynamic effect of novel chlorin e6 derivatives on a single nerve cell / A.B. Uzdensky, O.Y. Dergacheva, A.A. Zhavoronkova, A.V. Reshetnikov, G.V. Ponomarev // Life Sci. – 2004. – V. 74. – No.17. – P.2185–2197.
- Uzdensky, A.B. Signal Transduction and Photodynamic Therapy / A.B. Uzdensky // Curr. Sign. Transd. Ther. – 2008. – V. 3. – No.1. – P.55–74.
- Uzdensky, A. Photodynamic inactivation of isolated crayfish mechanoreceptor neuron / A. Uzdensky, D. Bragin, M. Kolosov, O. Yu. Dergacheva, G. M. Fedorenko, A. A. Zhavoronkova // Photochem. Photobiol. – 2002. – V. 76. – P.431–437.
- Uzdensky, A.B. PDT effect of different photosensitizers on a single nerve cell: Electrophysiological and Pharmacological Study / A.B. Uzdensky, D.E. Bragin, M.S. Kolosov, A.A. Zhavoronkova // IEEE J. of Selected Topics in Quantum Electronics. – 2001. – V.7. – No. 6. – P.989–995.

- Uzdensky, A.B. Photobleaching of hypericin bound to human serum albumin, cultured adenocarcinoma cells and nude mice skin / A.B. Uzdensky, V. Iani, L.W. Ma, J. Moan // *Photochem. Photobiol.* – 2002. – V.76. – No. 3. – P.320–328.
- Uzdensky, A. Involvement of adenylate cyclase and tyrosine kinase signaling pathways in response of crayfish stretch receptor neuron and satellite glia cells to photodynamic treatment / A. Uzdensky, M. Kolosov, D. Bragin, O. Dergacheva, O. Vanzha, L. Oparina // *Glia.* – 2005. – V.49. – No. 3. – P.339–348.
- Valenzeno, D.P. Membrane photomodification of cardiac myocytes: potassium and leakage currents / D.P. Valenzeno, M. Tarr // *Photochem Photobiol.* – 1991. – V. 53. – No.2. – P.195–201.
- Van Laethem, A. Activation of p38 MAPK is required for Bax translocation to mitochondria, cytochrome c release and apoptosis induced by UVB irradiation in human keratinocytes / A. Van Laethem, S. Van Kelst, S. Lippens, W. Declercq, P. Vandenabeele, S. Janssens, J.R. Vandenheede, M. Garmyn, P. Agostinis // *FASEB J.* – 2004. – V.18. – No.15. – P.1946–1948.
- Varnes, M.E. Photodynamic therapy-induced apoptosis in lymphoma cells: translocation of cytochrome C causes inhibition of respiration as well as caspase activation / M.E. Varnes, S.M. Chiu, L.Y. Xue, N.L. Oleinick // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1999. – V. 255. – No.3. – P. 673–679.
- Woodburn, K.W. Localization and efficacy analysis of the phototherapeutic lutetium texaphyrin (PCI-0123) in the murine EMT6 sarcoma model / K.W. Woodburn, Q. Fan, D.R. Miles, D. Kessel, Y. Luo, S.W. Young // *Photochem Photobiol.* – 1997. – V. 65. – No.3. – P. 410–415.
- Zaitseva, O.V. Distribution of NADPH-diaphorase activity in organs and tissues of adult ascidians / O.V. Zaitseva, V.N. Romanov, T.G. Markosova // *Dokl Biol Sci.* – 2012. – V. 444. – P. 180–183.
- Zareba, M. Merocyanine 540-sensitized photokilling of leukemia cells: role of post-irradiation chain peroxidation of plasma membrane lipids as revealed by nitric

- oxide protection / M. Zareba, M. Niziolek, W. Korytowski, A.W. Girotti // *Biochim Biophys Acta.* – V. 2005. – V. 1722. – No.1. – P. 51–59.
- Zech, B. Nitric oxide donors inhibit formation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome and activation of caspases / B. Zech, R. Köhl, A. von Knethen, B. Brüne // *Biochem J.* – 2003. – V. 371. – P. 1055–1064.
- Zhang, J. Protective effect of endothelial nitric oxide synthase against induction of chemically-induced diabetes in mice / J. Zhang, S. Kawashima, M. Yokoyama, P. Huang, C.E. Hill // *Nitric Oxide.* – 2007. – V.17. – No.2. – P. 69–74.
- Zhou, L. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications / L. Zhou, D.Y. Zhu // *Nitric Oxide.* – 2009. – V. 20. – No.4. – P. 223–230.
- Zhou, P. Nitric oxide inhibits caspase activation and apoptotic morphology but does not rescue neuronal death / P. Zhou, L. Qian, C. Iadecola // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2005. – V.25. – No.3. – P. 348–357.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю - Узденскому Анатолию Борисовичу, а также сотрудникам лаборатории Бережной Е. В. и Рудковскому М. В. за оказанную помощь в выполнении диссертационной работы.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа была поддержана грантами РФФИ (№ 12-04-32089, 14-04-00741 и 15-04-05367), а также Минобразования РФ «Организация проведения научных исследований» № 790, Минобрнауки № 4.6142.2011 и РНФ (14-15-00068).