

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Воронеж – 2016

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

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор
Узденский Анатолий Борисович

Официальные оппоненты:

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

Земченкова Ольга Владимировна
кандидат биологических наук,
ГБОУ ВПО «Воронежский
государственный медицинский
университет имени Н.Н. Бурденко»,
кафедра биохимии, ассистент

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки «Институт химической
физики им. Н.Н. Семенова Российской
академии наук, г. Москва

Защита диссертации состоится 15 апреля 2016 г. в 13:30 часов на заседании диссертационного совета Д 212.038.03 на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет» по адресу: 394006, г. Воронеж, Университетская пл., 1, ауд. 59.

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

Автореферат разослан

«19» февраля 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



Грабович Маргарита Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность 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; 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 глии 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 глия точно идентифицированы. Вариантом такого объекта является изолированный рецептор растяжения речного 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 глиии 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-синтаз 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 гибель нейронов и глиальных клеток рецептора растяжения речного рака в темновых условиях.
- Изучить роль NO в инактивации и гибели нейронов и глиальных клеток, вызванных фотодинамическим воздействием.
- Установить роль нейрональной и индуцибельной NO-синтаз в повреждении 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 ФД индуцированного повреждения нейронов и глиальных клеток рецептора растяжения рака.
- Показано, что NO стимулирует ФД индуцированный апоптоз глиальных клеток рецептора растяжения рака и защищает нейроны и глиальные клетки 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 реализуется с участием сигнального пути NO/растворимая гуанилатциклаза/cGMP/протеинкиназа G, и растворимая гуанилатциклаза участвует в реализации ФД индуцированного некроза 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 при ФДТ.

Данные о проапоптотическом действии NO на глиальные клетки 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 при выполнении грантов РФФИ №12-04-32089, 15-04-05367 и АВЦП МОН №1.1/6185 и 4.6142.2011, а также использованы в спецкурсе по фотобиологии и фотомедицине 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 околядерной 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 диссертации представлены на всероссийских и международных 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 международных и всероссийских конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 130 страницах машинописного текста, состоит из введения, 4 глав (обзор литературы, методика, результаты исследования, обсуждение результатов), выводов и библиографического указателя, включающего 186 отечественных и зарубежных источников. Работа иллюстрирована 37 рисунками и 4 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Объектом исследования служил рецептор растяжения рака (PPP) *Astacus leptodactylus*, который выделяли по методике Florey and Florey (1955). Выделенный рецептор помещали в ванночку, снабженную устройством для растяжения рецепторных мышц, наполненную 2 мл физиологического раствора Ван-Харревельда для холоднокровных (рН 7.2-7.4).

Электрофизиологическая активность механорецепторных нейронов (МРН) отводилась внеклеточно с помощью присасывающегося к аксону электрода. Изменения частоты генерации потенциалов действия (ПД) регистрировалась непрерывно, вплоть до прекращения импульсной активности. Время от начала облучения до прекращения ПД обозначалось временем жизни нейрона. Начальная частота потенциала действия устанавливалась на уровне 6-10 Гц путем растяжения рецепторной мышцы. Эксперименты проводились при температуре $23 \pm 4^\circ\text{C}$.

Фотосенсибилизатором служил сульфированный алюмофталоцианин AlPcS_n Фотосенс (НИОПИК, Москва). После 30-минутной контрольной регистрации ПД в ванночку с рецептором растяжения добавляли Фотосенс в концентрации 10^{-8} М и инкубировали еще 30 минут. Затем в течение 30 минут рецепторы растяжения облучали диодным лазером (670 нм, $0,4 \text{ Вт/см}^2$). Диаметр лазерного луча был 3 мм, так, облучалось тело нейрона и значительная часть аксона. Химические модуляторы NO-зависимых сигнальных процессов применялись в концентрации в 2 раза меньшей, чем концентрация, вызывающая прекращение генерации потенциала действия в темноте в течение 3-4 ч.

Для изучения NO-зависимых сигнальных процессов использовались химические NO-генераторы: нитропруссид натрия (SNP, 10 мкМ) и гидрат натриевой соли диэтиламина NONOate (NONOate, 100 мкМ), ингибиторы nNOS N ω -нитро-L-аргинин метил эстер гидрохлорид (L-NAME, 1 мМ) и N ω -нитро-L-аргинин (L-NNA, 1 мМ), специфичные ингибиторы iNOS гемисульфат S-метилизотиомочевины (SMT) (50 мкМ) и L-N6-(1-иминоэтил) лизин дигидрохлорид (L-NIL, 1 мМ), активатор sGC 3-(5'-гидроксиметил-2'-фурил)-1-бензил индазол (YC-1, 5 мкМ) и ингибитор sGC 1H-[1,2,4] оксадиазол [4,3-a] хиноксалин-1 (ODQ, 10 мкМ). Ингибитор протеинкиназы G (PKG) KT-5823 (10мкМ) был поставлен фирмой Alomone Labs (Израиль). Остальные реактивы приобретены в фирме Sigma Aldrich Rus (Москва).

Уровень фотоиндуцированного некроза и апоптоза оценивали через 8 ч после облучения (время, достаточное для развития апоптоза). Препараты флуорохромировались иодидом пропидия (PI) ($2 \cdot 10^{-5}$ М) и Hoechst-33342 ($4 \cdot 10^{-5}$ М), промывались, фиксировались 0,2% глутаровым альдегидом, далее многократно промывались и заключались в глицерин.

Препараты исследовались с помощью флуоресцентного микроскопа Axiolab (Zeiss). PI придавал красную флуоресценцию ядрам некротических клеток с поврежденной плазматической мембраной, тогда как Hoechst 33342 придавал синюю флуоресценцию ядерному хроматину, визуализируя как интактные ядра живых клеток, так и фрагментированные ядра апоптотических клеток. Апоптоз глиальных клеток подсчитывался на проксимальном участке аксона длиной 2 мм, где он был более выражен, чем на теле нейрона.

Локализацию NO-синтазы оценивали по NADPH-диафоразной активности с использованием в качестве субстрата β -NADPH и нитротетразолиевого синего в качестве акцептора электронов (Schuppe et al., 2001, Scherer-Singler et al., 1983, Dawson et al. 1991). Окрашивание проводилось через 1 ч после выделения нейрона в контрольной группе препаратов, непосредственно после ФД-воздействия и через 4 ч после него в экспериментальных группах. Затем препараты фотографировали, и производили обработку изображений в программе Image-Pro Plus 6.0.

В иммунофлуоресцентном исследовании использовались растворы первичных антител anti-nNOS (1:100 в PBS), anti-iNOS (1:100 в PBS) (Sigma-Aldrich) и вторичных антител Alexa-Fluor 488 (1:500) (Jackson ImmunoResearch). Для отмывки от антител использовали смесь 1% BSA, 0,2% NaN_3 и 0,1% Triton x-100.

Для исследования генерации NO в рецепторе растяжения рака раствор Ван-Харревельда в ванночке замещался раствором 4,5-диаминфлуоресцеина диацетата (DAF-2DA), флуоресцентного зонда на NO. Препараты инкубировались 60 мин в растворе DAF-2DA (1:500) для загрузки красителя, затем 5 раз отмывались в физиологическом растворе, чтобы удалить избыток красителя. После инкубации с DAF-2DA в ванночку добавляли Фотосенс (10^{-8} М). После 30-мин инкубации с Фотосенсом препараты облучались диодным лазером (670 нм, 0,4 Вт/см²). Препараты фотографировали до ФДТ и через 1, 4, 7, 10 и 15 мин после начала ФДТ. Интенсивность флуоресценции оценивалась в программе Image-Pro Plus 6.0.

В качестве контроля продукции NO проводились эксперименты, в которых до инкубации с флуоресцентным зондом DAF-2DA проводилась инкубация рецепторов растяжения с NO-скавенджером РТИО (500мкМ) и ингибитором нейрональной NO-синтазы L-NAME (10мМ) в течение 1 ч.

Для статистической оценки отличий препаратов разных экспериментальных групп использовался одномерный однофакторный дисперсионный анализ (One Way ANOVA). Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние NO на нейроны в темновых условиях и при ФД воздействии

В темновых условиях iNOS способствует выживаемости МРН. В темновых условиях ингибирование iNOS с помощью SMT или L-NIL снижало среднюю продолжительность импульсации нейрона в 1,6 и 2,5 раза с 400 ± 30 мин до 140 ± 20 мин и с 341 ± 43 мин до 209 ± 39 мин, соответственно. SMT также достоверно повышал уровень некроза нейронов в 2,5 раза. Это свидетельствует об участии NO, синтезированного iNOS, в поддержании нейрональной активности и выживании нейронов. Ранее уже было показано, что NO может участвовать в процессах выживаемости не только отдельных нейронов и глиальных клеток (Calabrese et al., 2007), но и целых организмов, например, *C. elegans* (Gusarov et al., 2013). Другие модуляторы NO-зависимых процессов: NO-генераторы (SNP, NONOate), ингибиторы nNOS (L-NAME, L-NNA), активатор sGC (YC-1) и ее ингибитор (ODQ), а также ингибитор протеинкиназы G (KT5823) не влияли на время жизни и некроз нейрона.

При ФД-воздействии NO, синтезированный iNOS, участвует в изменении продолжительности импульсной активности нейронов. При ФД-воздействии ингибиторы iNOS, SMT и L-NIL, разнонаправленно влияли на нейронную активность: SMT ее продлевал, а L-NIL сокращал. Интересно, что SMT противоположно влиял на нейронную активность при ФД-воздействии и в темноте. Ингибитор гуанилатциклазы ODQ, как и L-NIL, снижал продолжительность импульсной активности МРН при ФД-воздействии (Рис. 1). Вероятно, NO-зависимая гуанилатциклаза участвует в поддержании нейронной активности при ФД-воздействии.

Экзогенный NO уменьшает ФД индуцированный некроз нейронов без участия NO-синтаз. Применение NO-генератора NONOate почти вдвое снижало уровень ФД-индуцированного некроза нейронов (Рис.2). Однако другой NO-генератор SNP не влиял на фотоиндуцированный некроз нейронов. Все использованные ингибиторы iNOS и nNOS (L-NAME, L-NNA, L-NIL, SMT) так же не влияли на некроз нейронов (Рис.2). Ингибирование или активация гуанилатциклазы также не влияли на ФД-индуцированный некроз нейронов. Вероятно, эти ферменты не участвовали в фотоиндуцированном некрозе нейронов. Но ингибитор PKG KT5823 так же, как NONOate снижал фотоиндуцированный некроз МРН. Следовательно, PKG может участвовать в ФД-индуцированном некрозе нейронов.

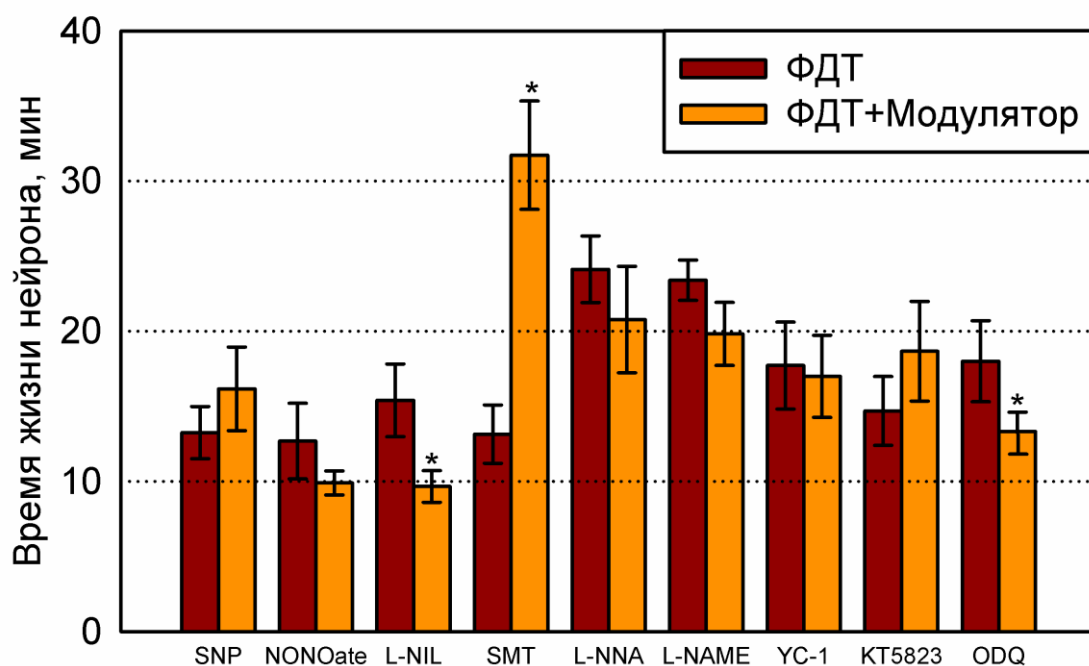


Рис.1. Влияние модуляторов NO-зависимых сигнальных процессов – генераторов NO (SNP, NONOate), активатора sGC (YC-1), ингибиторов NOS (L-NAME, L-NNA, L-NIL, SMT), sGC (ODQ) и PKG (KT5823) на продолжительность импульсной активности механорецепторных нейронов рака при ФД-воздействии,* $p < 0,05$.

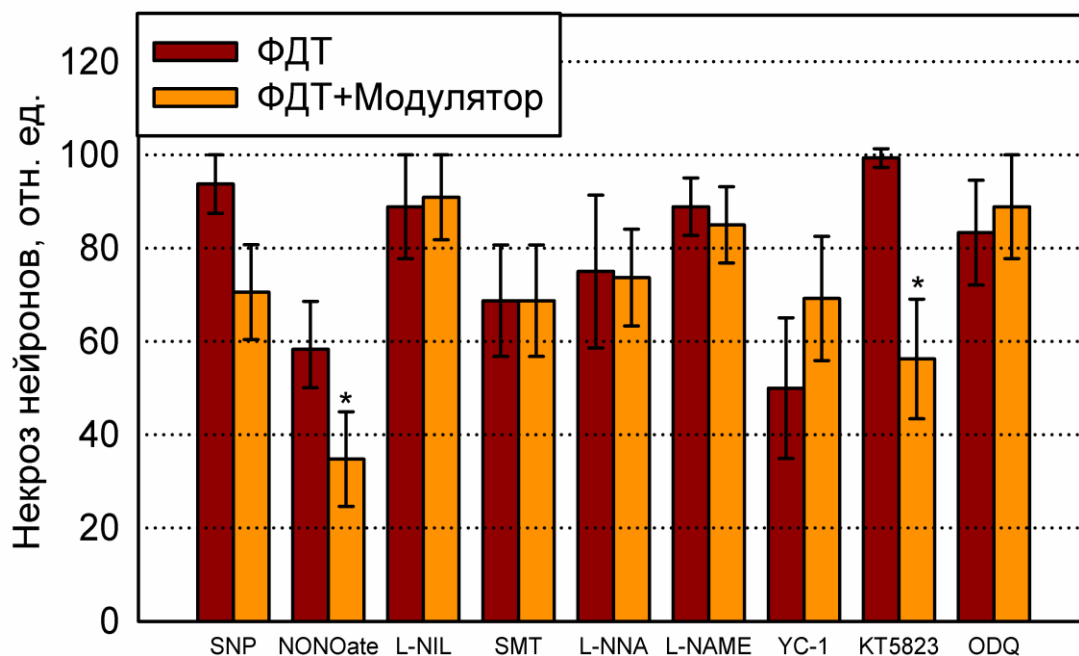


Рис.2. Влияние модуляторов NO-зависимых сигнальных процессов – генераторов NO (SNP, NONOate), активатора sGC (YC-1), ингибиторов NOS (L-NAME, L-NNA, L-NIL, SMT), sGC (ODQ) и PKG (KT5823) на ФД-индуцированный некроз нейронов,* $p < 0,05$.

Влияние NO на глиальные клетки в темноте и при ФД-воздействии

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

Активатор гуанилатциклазы YC-1 вдвое усиливал апоптоз глии. Таким образом, в темновых условиях cGMP, синтезируемый растворимой гуанилатциклазой, участвует в апоптозе глиальных клеток.

KT5823, ингибитор PKG, также увеличивал апоптоз глии в 2,9 раза, что указывает на противоапоптотическую роль PKG. По-видимому, в темновых условиях апоптоз реализуется через cGMP, но не посредством активации PKG. Вероятно, при этом cGMP запускает апоптоз не путем активации PKG, а посредством действия на другие сигнальные мишени. Ведь кроме PKG, клеточными мишенями cGMP являются cGMP-регулируемые фосфодиэстеразы и cGMP-активируемые ионные каналы (Koesling, Friebe, 2000).

Экзогенная генерация NO уменьшает ФД индуцированный некроз глиальных клеток. В присутствии NO-генераторов SNP и NONOate ФД-индуцированный некроз глиальных клеток достоверно снижался (Рис. 3). Неспецифический ингибитор nNOS L-NAME, наоборот, увеличивал уровень ФД-индуцированного некроза глиальных клеток. Ингибиторы iNOS SMT и L-NIL не влияли на ФД-индуцированный некроз глии. Следовательно, в антинекротических процессах в фотосенсибилизированных глиальных клетках участвует nNOS, но не iNOS.

Как и L-NAME, ингибитор гуанилатциклазы ODQ повышал уровень ФД-индуцированного некроза глиальных клеток. Следовательно, sGC играет антинекротическую роль в фотосенсибилизированных ГК. Таким образом, NO генераторы снижают некроз глиальных клеток посредством активации sGC, синтезирующей cGMP.

Протеинкиназа G не участвовала в процессах фотоиндуцированного некроза глиальных клеток.

Генераторы оксида азота NONOate и SNP снижают фотоиндуцированный некроз глии и нейронов, т.е. в небольших концентрациях NO является нейропротектором. Известно, что при ФД-воздействии NO может выступать в качестве антиоксиданта, участвовать в нейтрализации АФК и ингибировании перекисного окисления липидов (Niziolek et al., 2003).

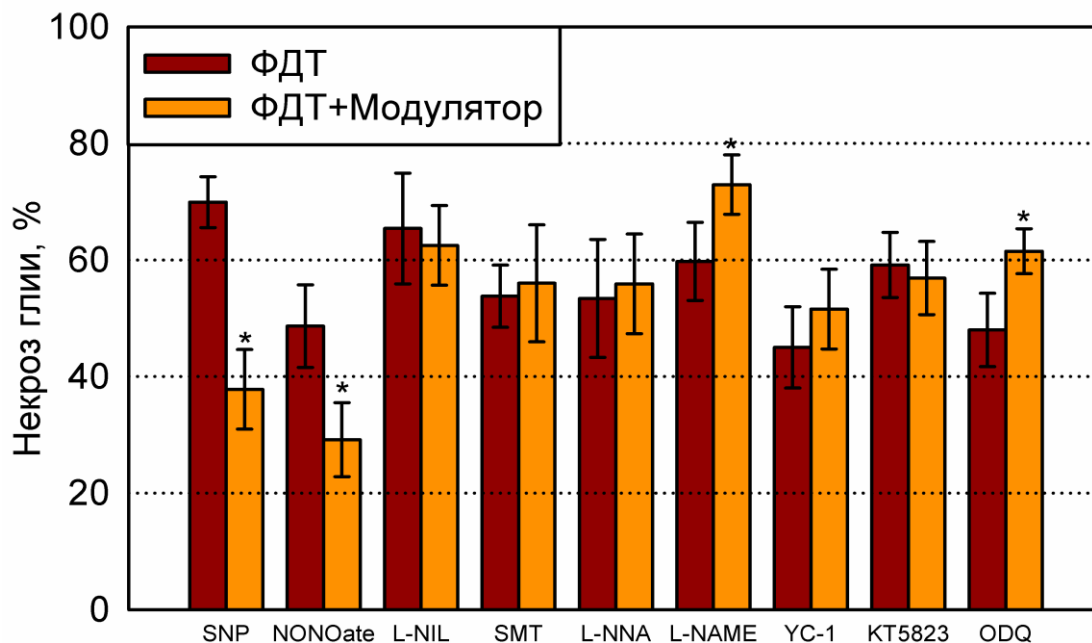


Рис.3. Влияние модуляторов NO-зависимых сигнальных процессов – генераторов NO (SNP, NONOate), активатора sGC (YC-1), ингибиторов NOS (L-NAME, L-NNA, L-NIL, SMT), sGC (ODQ) и PKG (KT5823) на ФД-индуцированный некроз глиальных клеток, * $p < 0,05$.

Кроме того, защита глии от некроза может происходить посредством активации протенкиназы В (Akt) и факторов транскрипции CREB и NK-kB (Brown, 2010). В наших опытах ингибирование nNOS с помощью L-NAME приводит к увеличению некроза глии. Можно предположить, что при ФД-воздействии антинекротическое действие NO на глиальные клетки связано с активацией nNOS.

Поскольку в ходе ингибиторного анализа было выявлено антинекротическое действие sGC, можно говорить о том, что NO, синтезированный nNOS активирует sGC, тем самым защищая ГК от фотоиндуцированного некроза. Мы предполагаем, что наиболее вероятным механизмом реализации фотоиндуцированного некроза клеток глии является сигнальный путь NO/cGC/cGMP/PKG/Akt, поскольку ранее в нашей лаборатории было показано, что Akt, так же, как и NO, снижает фотоиндуцированный апоптоз глиальных клеток (Komandirov et al., 2011).

NO увеличивает уровень ФД-индуцированного апоптоза глиальных клеток. Уровень ФД-индуцированного апоптоза глии достоверно повышался в 1.6 раза в присутствии NO генератора NONOate (Рис. 4). SNP проявлял сходную тенденцию. Ингибиторы nNOS L-NAME и L-NNA, а также ингибиторы iNOS, SMT и L-NIL, достоверно снижали уровень апоптоза глиальных клеток, индуцированного ФД-воздействием (Рис.4).

Следовательно, проапоптотический эффект NO реализуется посредством ФД-активации обеих изоформ NO-синтаз. 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.

Активация sGC с помощью YC-1 почти вдвое увеличивала ФД-индуцированный апоптоз глии. Очевидно, sGC также участвует в развитии апоптоза ГК при ФД-воздействии, и, как в случае фотоиндуцированного некроза ГК, ее влияние сонаправлено с действием NO генераторов. Ингибитор PKG, KT5823, снижал уровень апоптоза ГК при ФД-воздействии. То есть, PKG, как и NO и sGC оказывает проапоптотическое действие на ГК при ФДТ. Таким образом, можно говорить о том, что в глиальных клетках рецептора растяжения рака фотоиндуцированный апоптоз реализуется посредством активации сигнального пути NO/sGC /cGMP/PKG.

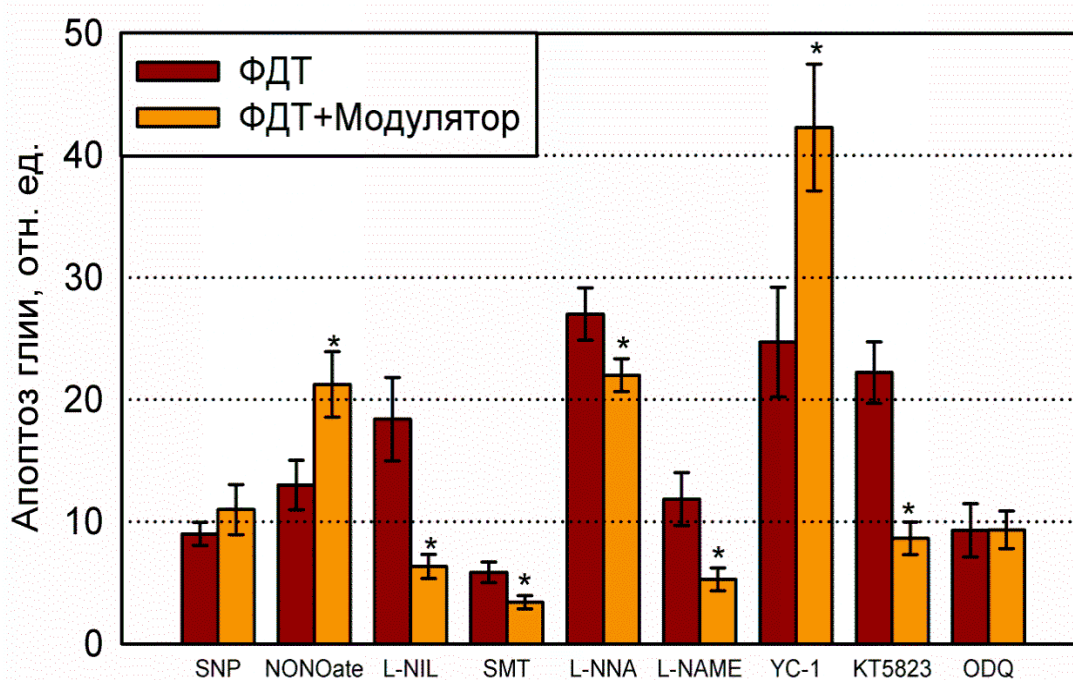


Рис.4. Влияние модуляторов NO-зависимых сигнальных процессов – генераторов NO (SNP, NONOate), активатора sGC (YC-1), ингибиторов NOS (L-NAME, L-NNA, L-NIL, SMT), sGC (ODQ) и PKG (KT5823) на уровень ФД-индуцированного апоптоза глии, * p<0,05.

В различных работах показано, что при ФДТ NO может оказывать как проапоптотическое, так и противоапоптотическое действие. Например, NO, воздействуя на различные клеточные мишени, может и стимулировать апоптоз, и подавлять его посредством активации различных сигнальных механизмов в зависимости от клеточного контекста (Calabrese et al., 2007, Rapozzi, 2013). Все исследованные в нашей работе ингибиторы iNOS и

pNOS уменьшали фотоиндуцированный апоптоз глии, а генератор NO NONOate увеличивал его. Ингибиторный анализ показал, что проапоптотическое действие NO на глию связано с фотоиндуцированной активацией iNOS. Поскольку при ФД-воздействии pNOS быстро инактивировалась (Рис.9), вероятно, она не участвовала в реализации проапоптотического действия NO на глиальные клетки.

Ранее было показано, что NO может оказывать проапоптотический эффект посредством индукции ЭР-стресса или действуя на p53 с последующим запуском митохондриального пути апоптоза или через сигнальный путь sGC/cGMP/PKG (Brown, 2010). Проведенный в нашей работе активаторно-ингибиторный анализ показал, что NO, sGC и PKG принимали участие в фотоиндуцированном апоптозе глиальных клеток рецептора растяжения рака. Поэтому, в нашем случае, можно предполагать участие сигнального пути NOS/NO/sGC/cGMP/PKG в проапоптотическом действии NO на глиальные клетки.

Локализация NO синтазы в рецепторе растяжения рака

Никотинамидадениндинуклеотидфосфат (NADPH) один из кофакторов NO-синтазы. NADPH-диафараза образует NADPH, вызывающий восстановление NO-синтазы в нитротетразоловый синий (НТС). Следовательно, экспрессия NADPH-диафаразы может рассматриваться как маркер присутствия NO-синтазы в нейронах.

Гистохимическое исследование распределения NADPH-диафаразы показало, что в рецепторе растяжения рака этот фермент локализуется преимущественно в телах обоих рецепторных нейронов (быстро- и медленно-адаптирующегося), но не ядрах (Рис. 5). Более слабая активность NADPH-диафаразы выявлялась в дендритах нейронов. Аксоны и глиальные оболочки практически не содержали NADPH-диафаразы. Такое распределение фермента совпадает с распределением митохондриальных ферментов, например, сукцинатдегидрогеназы.

Иммунофлуоресцентное исследование распределения pNOS в рецепторе растяжения рака показало, что в этот белок локализовался преимущественно в околядерной области сомы МРН аналогично локализации NADPH-диафаразы. Интересно, что также флуоресцировали ядрышки обоих нейронов (Рис.6А). Кроме того, pNOS также присутствовала в глиальной оболочке аксона и в мышцах (Рис.6Г).

Известно, что различная субклеточная локализация NOS может определять функции фермента. Считается, что pNOS в нейронах связана с плазматической мембраной или напрямую закорена в цитоплазме посредством адаптерных белков.

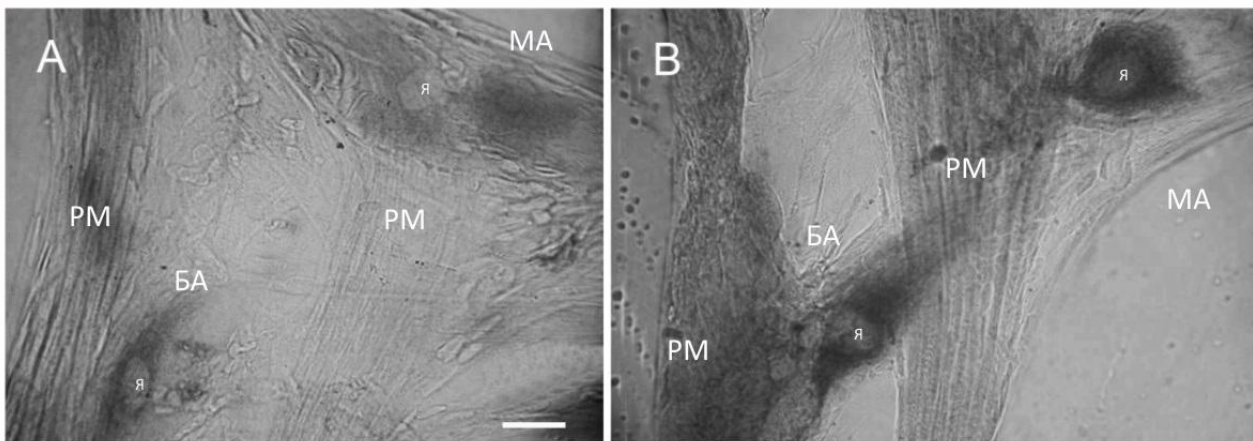


Рис.5. Распределение NADPH-диафоразной активности в цитоплазме быстро- (слева) и медленно-адаптирующегося (справа) нейронов рецептора растяжения рака. А – контрольный рецептор, В – рецептор, окрашенный после 30-минутного ФД воздействия. БА – быстро-адаптирующийся нейрон, МА – медленно-адаптирующийся нейрон, Я – ядро нейрона, РМ – рецепторная мышца. Масштабный отрезок 50 мкм.

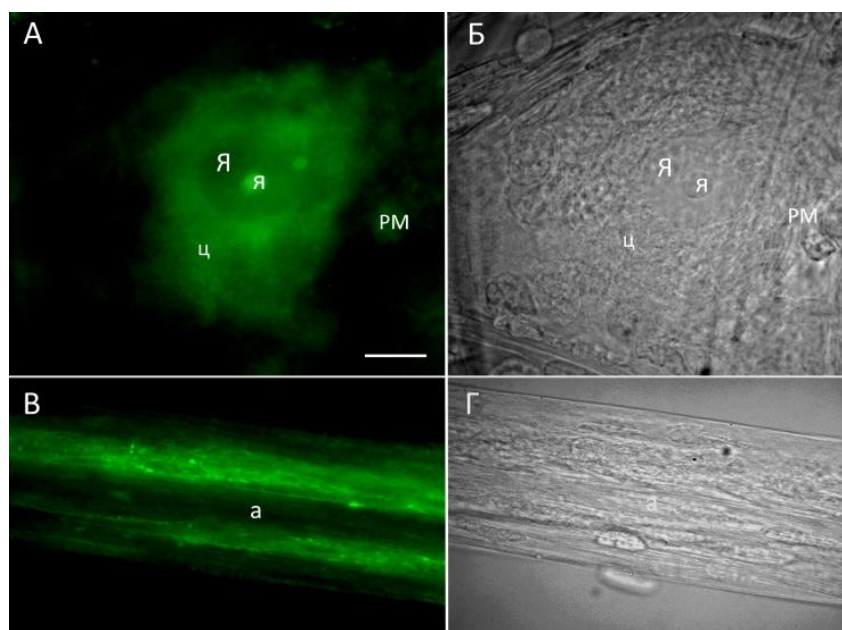


Рис.6. Локализация nNOS в рецепторе растяжения рака. А и В - микрофотографии тела нейрона и аксона в проходящем свете, соответственно. Б и Г – флуоресцентные изображения распределения nNOS в том же препарате. а – аксон, ц – цитоплазма, Я – ядро нейрона, я – ядрышко. Масштабный отрезок 20 мкм.

Проведенное гистохимического исследования показало, что NADPH-диафораза (а значит, и NO-синтаза) локализуются преимущественно в теле механорецепторного нейрона. Это согласуется с данными о цитоплазматической локализации NOS в нейронах крыс (Batista et al., 2001). В иммунофлуоресцентном исследовании выявлена аналогичная локализация

pNOS в околоядерной области, а также, в меньшем количестве, в дендритах и глиальной оболочке аксона. Интересно, что pNOS также обнаруживается в ядрышках нейронов. Ядерная локализация этого фермента была также отмечена в нейронах и глии мозга крысы (Korzhevski et al., 2007), культурах клеток Hela и миоцитов (Aquilano et al., 2014). Роль pNOS в ядре пока однозначно не определена. Однако есть данные о том, что ядерная локализация pNOS, и как следствие, продукция NO в ядре играет решающую роль в индукции митохондриального биогенеза (Aquilano et al., 2014).

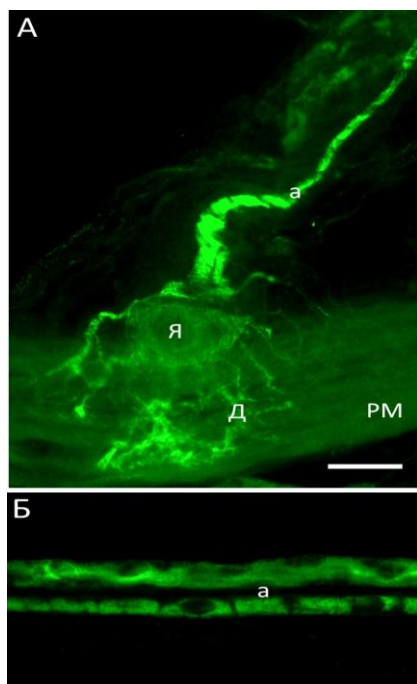


Рис. 7. Распределение индуцибельной NO-синтазы в рецепторе растяжения рака. А – флуоресцентное изображение распределения iNOS (anti-iNOS, 1:100) в механорецепторном нейроне речного рака. Б – флуоресцентное изображение распределения iNOS в аксоне нейрона. а – аксон, Я – ядро нейрона, Д – дендриты, РМ – рецепторная мышца. Масштабный отрезок 40 мкм.

Иммунофлуоресцентное исследование локализации iNOS показало, что эта изоформа фермента была диффузно распределена в сомах обоих механорецепторных нейронов и их аксонах (Рис. 7). iNOS локализовалась также в дендритах нейронов. В небольшом количестве iNOS присутствовала в мышцах рецептора растяжения рака. В глиальных клетках iNOS не присутствовала, в ядре нейрона и ядрышках эта изоформа фермента так же отсутствовала. 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, возможно, это связано с аксотомией нейронов при изолировании рецепторов растяжения.

Ранее уже было показано, что в некоторых типах клеток данная изоформа фермента может конститутивно экспрессироваться. Наиболее подробно описана конститутивная экспрессия iNOS 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, Thomas, 2014).

В этой связи, понимание свойств и экспрессии различных 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.

NO-синтаза активируется фотодинамическим воздействием

Сразу после ФД-воздействия в теле МРН средняя активность NADPH-диафоразы, отражающая активность NO-синтазы, достоверно возросла в 1,8 раз по сравнению с препаратами из контрольной группы ($p < 0.01$, Рис.8). Затем активность фермента медленно снижалась, и через 4 часа после ФД-воздействия активность фермента была в 2,7 раза меньше по сравнению с препаратами из контрольной группы ($p < 0.001$; Рис.8).

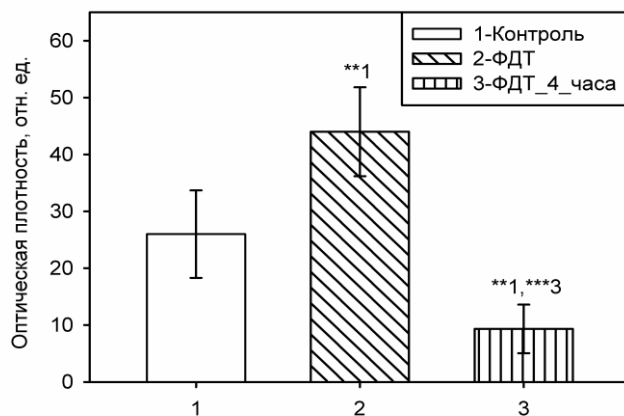


Рис.8. Изменения средней активности NADPH-диафоразы в теле МРН рака до, сразу после ФД-воздействия и через 4 ч после ФД-воздействия, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

В наших экспериментах активность NADPH-диафоразы в нейронах, но не ГК рецептора растяжения рака резко повышается сразу после ФД-воздействия, а затем постепенно снижается, и достигает минимального значения через 4 ч после ФД-воздействия. Поскольку и iNOS, и pNOS влияют на показатели выживаемости ГК при ФДТ, мы полагаем, что обе эти изоформы активируются ФД-воздействием. Продукция NO, синтезированного iNOS, может

достигать значительно больших значений по сравнению с продукцией nNOS, причем iNOS дольше генерирует NO.

Генерация NO в рецепторе растяжения рака при фотодинамическом воздействии

Продукция NO, определяемая с помощью флуоресцентного зонда DAF-2DA, и демонстрирующая активацию NO-синтазы при ФД-воздействии, сначала резко увеличивалась, затем уменьшалась (Рис. 9, 10). Максимальная продукция NO была отмечена на 4-7 минутах ФД-воздействия. До 4-7 минуты ФД-воздействия продукция NO быстро увеличивалась приблизительно на 40%, после 7-й минуты ФДТ продукция NO начинала уменьшаться, и к концу облучения она была на 40% ниже исходного уровня.

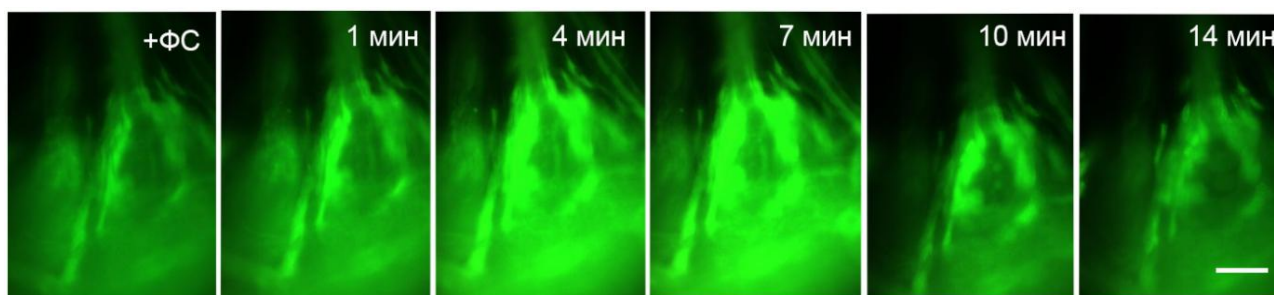


Рис.9. Динамика продукция NO в соме МРН рецептора растяжения рака, определяемая с помощью флуоресцентного зонда DAF-2DA, при ФД-воздействии после добавления ФС, через 1, 4, 7, 10, 14 мин после начала облучения. Масштабный отрезок соответствует 60 мкм.

Вероятно, быстрая генерация NO при ФД-воздействии стимулируется кратковременной активацией nNOS. Можно предположить, что активация nNOS стимулируется ионами Ca^{2+} , т.к. ФД воздействие быстро, за несколько секунд повышает уровень Ca^{2+} в разных типах клеток и нейрональная NO-синтаза является Ca^{2+} -зависимым белком (Almeida et al., 2004; Castano et al., 2005; Узденский, 2008, 2010). Затем, вероятно, nNOS разрушается активными формами кислорода, что обуславливает резкое уменьшение продукции NO.

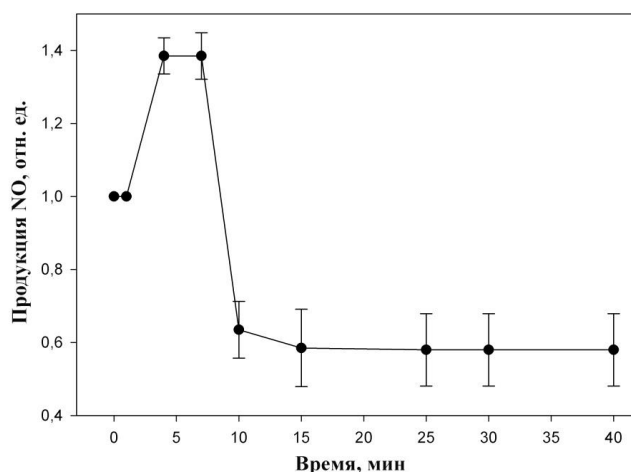


Рис. 10. Динамика изменения продукции NO в МРН.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы установлен характер NO-опосредованного повреждения нейронов и глиальных клеток при фотодинамическом воздействии, выявлено пространственное распределение изоформ фермента NO-синтазы (nNOS и iNOS) и активация фермента при ФД-воздействии в нашем модельном объекте, а также исследована продукция NO при фотодинамическом воздействии.

Установленное участие оксида азота в фотоиндуцированном 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. 11). 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, защищая окружающую нейрон глию. Таким образом, нейроглиальные взаимодействия, опосредованные этим вторичным мессенджером играют решающую роль в реализации процессов фотоиндуцированного повреждения.

Модулируя активность различных изоформ NO-синтазы (iNOS и nNOS) с помощью их селективных ингибиторов, можно направленно влиять на тот или иной тип клеточной смерти в нейронах и глиальных клетках, усиливать его или ослаблять.

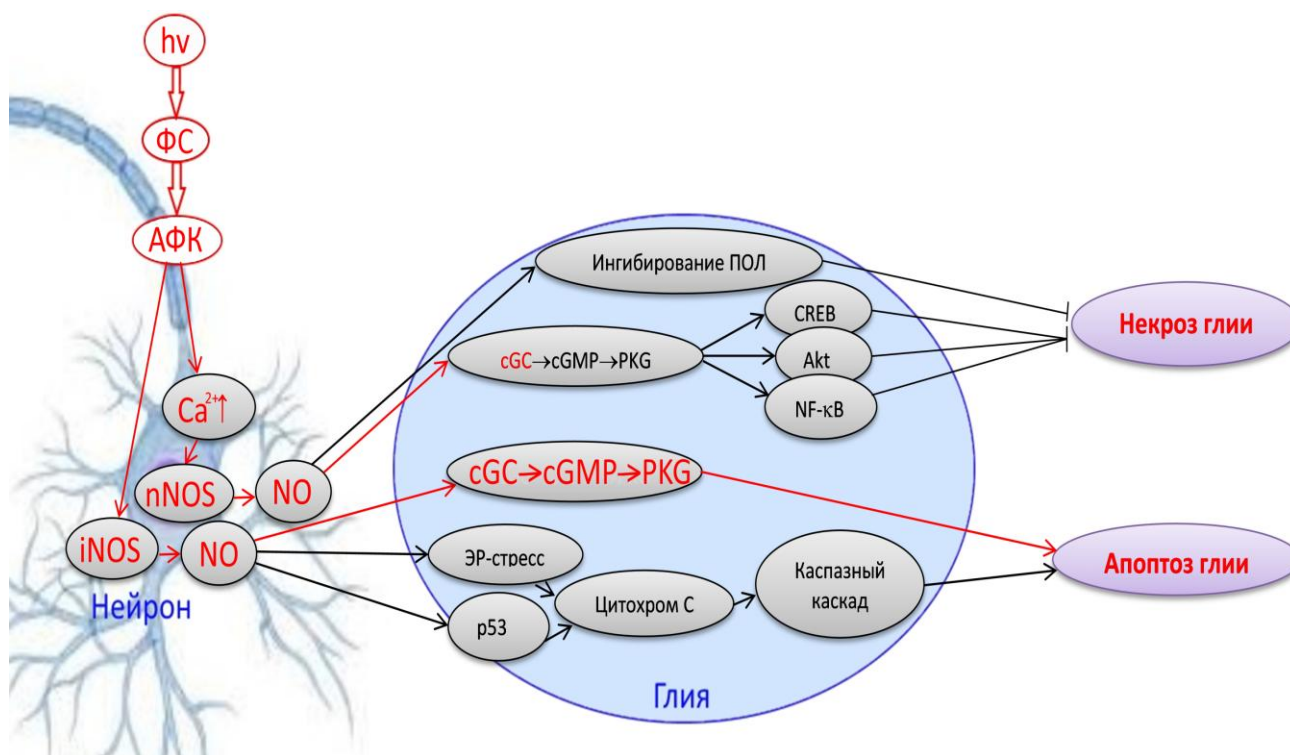


Рис. 11. Предполагаемая схема NO-зависимых сигнальных механизмов в нейронах и глиальных клетках речевого рака, активируемых фотодинамическим воздействием (красным обозначены результаты наших экспериментов, черным-литературные данные). ФС-фотосенсибилизатор, АФК-активные формы кислорода, ПОЛ-перекисное окисление липидов.

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. Нейрональная NO-синтаза локализуется, главным образом, в перикарионе нейронов. В меньшем количестве она также обнаруживается в дендритах, рецепторных мышцах и глиальной оболочке аксона. Индуцибельная NO-синтаза локализуется в цитозоле нейронов, дендритов и аксонов рецептора растяжения рака
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 фотоиндуцированного некроза.
5. В развитии фотоиндуцированного апоптоза глиальных клеток участвует индуцибельная NO-синтаза, а нейрональная NO-синтаза скорее задействована в развитии фотоиндуцированного некроза глиальных клеток.

6. В фотоиндуцированном 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 основных работ, опубликованных по теме диссертации
в журналах, рекомендованных ВАК РФ**

1. A. Uzdensky, E. Berezhnaya, A. Khaitin, **V. Kovaleva**, M. Komandirov, M. Neginskaya, M. Rudkovskii, S. Sharifulina. Protection of the crayfish mechanoreceptor neuron and glial cells from photooxidative injury by modulators of diverse signal transduction pathways // *Molecular Neurobiology*, 2015, V. 52, N. 2, P. 811-825.
2. **Kovaleva V.D.**, Berezhnaya E. V., Uzdensky A. B. The role of NO synthase isoforms in PDT-induced injury of neurons and glial cells // *Proc. SPIE*. 2014. V. 9448, P. 94480M1-94480M7
3. A.B. Uzdensky, E. Berezhnaya, **V. Kovaleva**, M. Neginskaya, M. Rudkovskii, S.Sharifulina. Photodynamic therapy: a review of applications in neurooncology and neuropathology // *Journal of Biomedical Optics*. 2015. V. 20, N. 6, P. 061108-1-061108-7.
4. **Kovaleva V.D.**, Uzdensky A. Activation of NO synthase and NO production in crayfish neurons modulates survival and death of satellite glial cells induced by photodynamic impact // *Glia*, 2015, V. 63, N. S1, P. E154-E155.
5. **Kovaleva V.D.**, Berezhnaya E.V., Komandirov M.A., Rudkovskii M.V., Uzdensky A.B. Involvement of nitric oxide in photodynamic injury of neurons and glial cells // *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*. 2013. V. 29, N. 28. P. 46-52.
6. **Ковалева В.Д.**, Бережная Е.В., Негинская М.А., Рудковский М.В., Узденский А.Б. Участие межклеточных сигнальных процессов в реакциях нервных и глиальных клеток на фотоокислительный стресс // *Валеология*. 2013. №1. С. 21-26.
7. **V. Kovaleva**, E.Berezhnaya, M. Rudkovskii, A.Uzdensky The involvement of NO-mediated signaling in PDT-induced injury of neurons and glial cells // *Glia*. 2013. V. 61. P. 61.
8. Узденский А.Б., Рудковский А.В., Федоренко Г.М., Бережная Е.В., Ищенко И.А., **Ковалева В.Д.**, Командиров М.А., Негинская М.А., Хайтин А.М., Шарифулина С.А. Реакции нейронов и глиальных клеток рака на фотодинамическое воздействие: сигнальная регуляция, ультраструктурные изменения и нейроглиальные взаимодействия // *Биологические мембраны*. 2013. Т. 30, № 5–6. С. 334–349.

9. М.А. Komandirov, Е.А. Knyazeva, Y.P. Fedorenko, M.V. Rudkovskii, E.V. Berezhnaya, **V.D. Kovaleva**, A.B. Uzdensky Chemical Modulation of Photodynamic Injury of Glial Cells // Journal of Innovative Optical Health Sciences. 2011. V. 4, N. 4. P. 429-435.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

10. **Ковалева В.Д.**, Узденский А.Б. Исследование ФД-индуцированной продукции NO в механорецепторном нейроне речного рака // Статья в сборнике конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино). 2015, Т.2. С. 556-560

11. **Kovaleva V.D.** Photodynamic impact induces production of nitric oxide in crayfish neurons and glial cells // Тезисы докладов международной школы для студентов и молодых ученых по оптике, лазерной физике и биофизике. Saratov Fall Meeting SFM'15 (Саратов). 2015.

12. **Ковалева В.Д.**, Узденский А.Б. Фотодинамическое воздействие индуцирует продукцию оксида азота в нейронах и глиальных клетках речного рака материалы докладов // V Съезд биофизиков России, Материалы докладов, Ростов-на-Дону, 2015. Т.2., С.152.

13. **Ковалева В.Д.**, Узденский А.Б. Продукция NO и активация NO-синтазы в нейронах и глие при ФДТ // VI Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины», Материалы докладов. Ростов-на-Дону, 2015. С.153-154

14. **Kovaleva V.D.**, Berezhnaya E.V., Rudkovskii M.V., Uzdensky A.B. The role of NO in photoinduced damage of neurons and glial cells // Тезисы докладов международной школы для студентов и молодых ученых по оптике, лазерной физике и биофизике. Saratov Fall Meeting SFM'14 (Саратов). 2014.

15. **V. D. Kovaleva**, E.V. Berezhnaya, M.V. Rudkovskii, A.B. Uzdensky Antinecrotic and proapoptotic effects of NO on photosensitized neurons and glial cells // Proceedings of the International Scientific School "Frontiers in Modern Neuroscience"(Nizhny Novgorod). 2014. P. 14.

16. A.B. Uzdensky, E.V. Berezhnaya, **V.D. Kovaleva**, M.A. Komandirov, M.A. Neginskaya, A.M. Khaitin, A.V. Rudkovskii, S.A. Sharifulina Protection of the crayfish mechanoreceptor neuron and surrounding glial cells from photooxidative injury by modulators of diverse signal transduction pathways // Book of abstracts of the twelfth International Conference on Neuroprotective Agents (Charlottesville, Virginia, USA). 2014, p. 40

17. **Ковалева В.Д.**, Бережная Е.В., Рудковский М.В., Узденский А.Б. Проапоптозное и антинекротическое действие NO на нейроны и глиальные клетки при повреждении, вызванном фотодинамическим воздействием // Статья в сборнике конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино). 2013. Т. 2. С. 543-548.

18. Узденский А.Б., Рудковский А.В., Бережная Е.В., **Ковалева В.Д.**, Ищенко И.А., Командиров М.А., Негинская М.А., Шарифулина С.А., Хайтин А.М. Сигнальная регуляция смерти нейронов и глиальных клеток при фотодинамическом воздействии // Статья в сборнике конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино). 2013. Т. 2. С. 611-616.
19. **Kovaleva V.D.**, Berezhnaya E.V., Rudkovskii M.V., Uzdensky A.B. The antinecrotic and proapoptotic effect of NO on photosensitized neurons and glial cells // 15th Congress of the European Society for Photobiology, Programme and book of abstracts (Liege, Belgium). 2013. P. 113-114.
20. **Kovaleva V.**, Berezhnaya E., Rudkovskii M., Uzdensky A. Pro-apoptotic and anti-necrotic effect of NO on neurons and glial cells under photo-oxidative stress // FENS Featured Regional Meeting, Book of abstracts (Prague, Czech Republic). 2013. P. 158.
21. A. Uzdensky, M. Rudkovskii, E. Berezhnaya, M. Komandirov, **V. Kovaleva**, M. Neginskaya, S. Sharifulina Intercellular and intracellular signaling modulate PDT-induced death of neurons and glial cells // FEBS Journal (St. Petersburg). 2013. V. 280. P. 425.
22. **Ковалева В.Д.**, Бережная Е.В., Рудковский М.В., Узденский А.Б. Роль NO в фотодинамическом повреждении нейронов и глиальных клеток // Тезисы докладов XXII Съезда Физиологического общества им. И. П. Павлова (Волгоград). 2013. С. 229-230.
23. **Ковалева В.Д.**, Бережная Е.В., Рудковский М.В., Узденский А.Б. Роль NO в фотоиндуцированном повреждении нейронов и глиальных клеток // Материалы докладов 9-й международной крымской конференции «Окислительный стресс и свободно-радикальные патологии» (Судак, Крым, Украина). 2013. С. 144.
24. **Ковалева В.Д.**, Бережная Е.В., Рудковский М.В., Узденский А.Б. Проапоптотное и антинекротное действие NO на нейроны и глиальные клетки при повреждении, вызванном фотодинамическим воздействием // Материалы докладов международной научно-практической конференции «Современные проблемы биофизики сложных систем. Информационно-образовательные процессы» (Воронеж). 2013. С. 130-133.
25. **Kovaleva V.D.**, Berezhnaya E.V., Rudkovskii M.V., Uzdensky A.B. The involvement of NO-mediated signaling in PDT-induced death of neurons and glial cells // International Summer School: Neurogenetics. Unraveling behavior and brain mechanisms using modern technologies (Zvenigorod). 2012. С.15.
26. **Ковалева В.Д.**, Бережная Е.В., Негинская М.А., Рудковский М.В., Узденский А.Б. Участие NO в фотодинамическом повреждении нейронов и глиальных клеток // Материалы докладов IV Съезда биофизиков России (Нижний Новгород). 2012. С.72.

27. **В.Д. Ковалева**, Е.В. Бережная, М.В. Рудковский, А.В. Лобанов, А.Б. Узденский Оксид азота регулирует жизнеспособность нейронов и глиальных клеток рака при фотодинамическом воздействии // Материалы XVI Международной конференции по нейрокибернетике (Ростов-на-Дону). 2012. Т. 1. С. 16-19.
28. **Ковалева В.Д.** Роль NO в смерти нейронов и глиальных клеток, вызванной фотодинамическим воздействием // Материалы Всероссийской молодежной конференции "Актуальные вопросы биомедицинской инженерии" (Ростов-на-Дону). 2012. С. 54-56.
29. **Ковалева В.Д.** Участие NO в процессах выживаемости нейронов и глиальных клеток // Материалы научно-практической конференции "Миссия молодежи в науке", Естеств и техн. Науки (Ростов-на-Дону). 2012. Т.1. С. 66-68.
30. Колосов М.С., Бибов М.Ю., Демьяненко С.В., **Ковалева В.Д.**, Узденский А.Б. Фотодинамическое воздействие на брюшную нервную цепочку речного рака: протеомное исследование // Материалы VI Съезда Российского фотобиологического общества (п. Шепси). 2011. С.112.
31. **Ковалева В.Д.**, Бережная Е.В., Рудковский М.В., Узденский А.Б. Роль NO в смерти нейронов и глиальных клеток, вызванной фотодинамическим воздействием // Материалы IV Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины» (Ростов-на-Дону). 2011. С. 175-176.
32. Колосов М.С., Бибов М.Ю., Демьяненко С.В., **Ковалева В.Д.**, Узденский А.Б. Протеомное исследование реакции нервной ткани речного рака на фотодинамическое воздействие // Цитология. 2011. № 53, С. 706.

Список сокращений

ФДТ – фотодинамическая терапия
 ФД – фотодинамический
 ГК – глиальные клетки
 NOS – NO-синтаза
 МРН – механорецепторный нейрон
 PPP – рецептор растяжения рака
 ПД – потенциал действия
 iNOS – индуцибельная NO-синтаза
 nNOS – нейрональная NO-синтаза
 sGC – растворимая гуанилатциклаза
 PKG – протеинкиназа G
 cGMP – циклический гуанозинмонофосфат
 ФС – фотосенсибилизатор
 АФК – активные формы кислорода
 ПОЛ – перекисное окисление липидов