

*На правах рукописи*



**Негинская Мария Александровна**

**МЕХАНИЗМЫ КАЛЬЦИЕВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ НЕЙРОНОВ И  
АСТРОЦИТОВ ПРИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ  
РАДАХЛОРИНА**

Специальность – 03.01.02 Биофизика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Воронеж – 2017

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

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук,  
профессор  
**Узденский Анатолий Борисович**

**Официальные оппоненты:**

**Пинелис Всеволод Григорьевич**  
доктор медицинских наук, профессор,  
ФГАУ «Национальный научно-практический  
центр здоровья детей» Министерства  
здравоохранения РФ (г. Москва),  
лаборатория нейробиологии и  
фундаментальных основ развития мозга,  
главный научный сотрудник

**Иванов Андрей Валентинович**  
доктор физико-математических наук,  
ФГБУ «Российский онкологический  
научный центр им. Н.Н. Блохина»  
Министерства здравоохранения РФ (г.  
Москва), лаборатория экспериментальной  
диагностики и биотерапии опухолей,  
ведущий научный сотрудник

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Институт биофизики  
клетки Российской академии наук,  
г. Пущино

Защита диссертации состоится 29 марта 2017 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: 394018, г. Воронеж, Университетская пл., 1, ауд. 59.

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

Автореферат разослан

«28» февраля 2017 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук



Грабович Маргарита Юрьевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Фотодинамическая терапия (ФДТ) – широко применяемый в медицине способ селективного разрушения паталогических клеток, окрашенных фотосенсибилизатором (ФС), под действием лазерного излучения. Фотовозбуждение молекулы ФС вызывает интенсивную генерацию синглетного кислорода и других активных форм кислорода (АФК), что ведет к гибели клеток вследствие окислительного стресса (ОС) [Узденский, 2016, Abrahamse et al., 2016, Debele et al., 2015]. Селективность накопления фотосенсибилизатора в опухоли и локальность облучения позволяют избирательно разрушать патологическую ткань, что делает этот метод подходящим для лечения опухолей мозга [Quirk et al., 2015]. Однако в процессе фотодинамической терапии может повреждаться и здоровая нервная ткань, окружающая опухоль. Поэтому оптимизация ФДТ для лечения опухолей мозга является важной задачей современной медицины. Для оптимизации фотодинамического (ФД) воздействия необходимо изучение сигнальных механизмов реакций и здоровых нейронов и астроцитов, окружающих опухоль.

Ионы кальция являются важнейшим вторичным мессенджером, который регулирует множество процессов во всех эукариотических клетках [Berridge et al., 2003]. В нервной ткани кальциевая система сигнализации играет особо важную роль, так как участвует в распространении деполяризации мембраны и синаптической активности. Многие биохимические и физиологические процессы в нервной ткани так или иначе контролируются кальциевой сигнальной системой [Brini et al., 2014].

В ответ на ФД воздействие во многих типах опухолевых клеток наблюдается повышение уровня  $Ca^{2+}$  в цитозоле, вызванное активацией каналов плазматической мембраны или опустошением внутриклеточных кальциевых депо [Agarwal et al., 1993, Almeida et al., 2004, Humbler et al., 1996]. Однако механизмы изменения уровня  $Ca^{2+}$  здоровых нейронов и глиальных клеток, вызванного ФДТ, до настоящего времени остается практически не изученным.

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

### Цель работы:

Исследовать влияние фотодинамического воздействия радахлорина на нейроны и глиальные клетки, распределение и накопление радахлорина в

нервной ткани, а также механизмы кальциевой сигнализации нейронов и глиальных клеток в реакциях на фотодинамическое воздействие.

#### **Задачи исследования:**

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

#### **Научная новизна результатов исследования**

Впервые показано, что фотосенсибилизатор радахлорин быстро накапливается в нервной ткани (в течение первых 30 мин) и локализуется в основном в глиальной оболочке нейронов и в дендритах рецептора растяжения речного рака. ФД воздействие радахлорина прекращает импульсную активность нейронов и вызывает некроз нейронов и некроз и апоптоз глиальных клеток даже в субнанолярных концентрациях. ФД воздействие радахлорина вызывает изменение уровня внутриклеточного кальция в культивируемых нейронах коры головного мозга крысы. Показано, что фотоиндуцируемое повышение уровня кальция в цитозоле нервных клеток происходит вследствие генерации активных форм кислорода и, вероятно, инициации перекисного окисления липидов мембран нейронов и астроцитов. Повышение уровня ионов кальция в цитозоле нейронов опосредовано фосфолипазой C, которая производит инозитол-1,4,5-

трифосфат, активирующий кальциевые каналы эндоплазматического ретикулума. Показано, что повышение концентрации кальция в цитозоле нейронов и астроцитов приводит к изменению уровня ионов  $Ca^{2+}$  в митохондриях и падению митохондриального потенциала, что может приводить к открытию высокопроницаемой митохондриальной поры.  $Ca^{2+}$ -зависимый сигнальный механизм, опосредованный активацией фосфолипазы C, вовлечен в ответ нейронов и глии на ФД воздействие, а также в фотоиндуцированную клеточную гибель.

### **Научно-практическая значимость**

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

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

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

### **Основные положения, выносимые на защиту**

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

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

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

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

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

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

## **Апробация диссертационной работы**

Материалы диссертации представлены на всероссийских и международных конференциях: Международная научная школа «Горизонты современных нейронаук» (Нижний Новгород, Россия, 2014), Saratov Fall Meeting SFM'14 (Саратов, Россия, 2014), IBRO - 9th World Congress International Brain Research Organization (Рио-де-Жанейро, Бразилия, 2015), XII European Meeting on Glial Cells in Health and Disease (Бильбао, Испания, 2015), FENS 2016 (Копенгаген, Дания, 2016), 20-я международная Пуштинская школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, Россия, 2016), 13th International Conference on Neuroprotective Agents (Бильбао, Испания, 2016), V Съезд физиологов СНГ, V Съезд биохимиков России, Конференция ADFLIM (Дагомыс, Россия, 2016) а также на семинаре в Институте Неврологии Университетского Колледжа Лондона (2015).

## **Публикации**

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

## **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 132 страницах машинописного текста, состоит из введения, 4 глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследований, обсуждение полученных результатов), выводов и библиографического указателя, включающего 157 отечественных и зарубежных источников. Работа иллюстрирована 39 рисунками и 1 таблицей.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследований**

*Объекты исследования.* Работа выполнена на следующих модельных объектах:

1. Рецептор растяжения речного рака *Astacus leptodactylus*, состоящий из пары изолированных механорецепторных нейронов (МРН), окруженных сателлитными глиальными клетками (ГК).
2. Брюшная нервная цепочка речного рака *Astacus leptodactylus*, состоящая из сегментарных ганглиев, соединённых коннективами.
3. Культивируемые нейроны и астроциты коры головного мозга крысы [Domijan, Abramov, 2011].

*Исследование динамики накопления и выведения радахлорина в нервной ткани.*

Для изучения внутриклеточного распределения радахлорина в нейронах и глиальных клетках речного рака изолированный рецептор растяжения рака инкубировался 10 минут в растворе радахлорина (5·мкМ). После отмывки

фотосенсибилизатора раствором ван Харревельда препарат фотографировался на флуоресцентном микроскопе Axio Lab.A1 (Carl Zeiss, Германия). Для изучения динамики накопления и выведения радахлорина в нервной ткани брюшные цепочки взвешивались и затем инкубировались в течение 1, 5, 15, 30 или 60 минут в растворе радахлорина (50 мкМ), после чего отмывались 3 раза раствором ван Харревельда. Для изучения динамики выведения радахлорина после одного часа инкубации, цепочка отмывалась и оставлялась в кювете с раствором ван Харревельда на 1 или 2 часа. Затем нервную брюшную цепочку гомогенизировали в 1мл лизирующего буфера Extraction/Labeling Buffer (E0655, Sigma Aldrich) и центрифугировали 5 минут при 15000 об/мин. Уровень флуоресценции надосадочной жидкости с экстрагированным радахлорином регистрировался на спектрофлуориметре Hitachi F-4010 (Япония).

*Фотодинамическое воздействие.* В качестве фотосенсибилизатора использовался радахлорин (ООО "Рада-Фарма", Москва), состоящий из хлорина е6 (80-90%), пурпурина 5 (5-20%) и хлорина р6 (1-5%).

Для исследования ФД индуцированной клеточной смерти после 30-минутной инкубации в растворе с 250 нМ радахлорина клетки облучались гелий-неоновым лазером ЛГН-111 (Полярон, Львов, Украина) с длиной волны 632,8 нм и интенсивностью 0,4 Вт/см<sup>2</sup>. При изучении кальциевого ответа первичных нейронов и астроцитов смешанной культуры облучение проводилось полупроводниковым лазером с длиной волны 654 нм и интенсивностью 0,1 Вт/см<sup>2</sup> в течение 1 и 3 минут в присутствии 200-400 нМ ФС.

*Флуоресцентное исследование.* Для выявления типа ФД-индуцированного некроза и апоптоза нейронов и глиальных клеток через 8 часов после ФД воздействия проводилось двойное флуорохромирование препаратов йодидом пропидия (20·мкМ), который проникает в ядра некротических клеток и придает им красную окраску, и Hoechst-33342 (40 мкМ), придающий ядрам клеток зеленую окраску, по 20 минут. Затем препараты 20 минут фиксировались 0,2% глutarовым альдегидом и заключались в глицерин. Изображения препаратов получали при помощи флуоресцентного микроскопа Axio Lab.A1 (Carl Zeiss, Германия).

Регистрацию изменения концентрации кальция в цитозоле  $[Ca^{2+}]_c$  в клетках первичной культуры нейронов и астроцитов при ФД воздействии проводили с помощью флуоресцентного зонда Fluo-4. Изменения концентрации  $Ca^{2+}$  в митохондриях  $[Ca^{2+}]_m$  регистрировались с помощью флуоресцентного X-Rhod-1. Фотоиндуцированные изменения митохондриального мембранного потенциала  $\Delta\Psi_m$  регистрировали с помощью зондов Rhodamine 123 и TMRM [Scaduto et al., 1999]. Скорости перекисного окисления липидов регистрировались с помощью флуоресцентного зонда BODIPY-C11 [581/591] [Drummen et al., 2002].

Флуоресцентно-микроскопические измерения выполнены на установке, включающей инвертированный микроскоп Olympus (Япония), систему возбуждающего света ксеноновой лампы, проходящего через монохроматор (Cairn Research, Kent, Великобритания) и CCD-камеру (Retiga, QImaging, Surrey, BC, Канада). Работа установки контролируется компьютерной программой Andor IQ (Великобритания). Флуоресцентные сигналы зондов X-Rhod-1, TMRM, BODIPY-C11 [581/591] регистрировались с помощью конфокального микроскопа Zeiss 710 CLSM (Carl Zeiss, Германия).

*Ингибиторный анализ.* Для изучения механизмов ФД-индуцированных изменений  $[Ca^{2+}]_c$  и  $[Ca^{2+}]_m$  использовались бескальциевые растворы, которые вместо  $CaCl_2$  содержали 0,1мМ EGTA и 2мМ  $MgCl_2$ , ингибитор фосфолипазы C U73122 (5 мкМ, ) фирмы Tocris, а также тапсигаргин (1 мкМ) – ингибитор  $Ca^{2+}$ -АТФазы эндоплазматического ретикулума, водорастворимый аналог витамина E тролокс (500 мкМ) и циклоспорин А (1 мкМ), ингибитор высокопроницаемой митохондриальной поры, фирмы Sigma Aldrich.

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

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### **Локализация и накопление радахлорина в нервной ткани**

В клетках механорецептора речного рака радахлорин накапливается преимущественно в многослойной глиальной оболочке, окружающей нейрон. Флуоресценция в теле и аксонах нейронов заметно ниже. Радахлорин также окрашивает дендриты, их глиальные оболочки, и рецепторные мышцы (Рис. 1).

Накопление фотосенсибилизатора в нервной ткани изучали на примере брюшной нервной цепочки речного рака. Основное накопление (до 10 усл. ед.) происходит примерно за 30 минут, а за последующие 30 минут содержание радахлорина в нервной ткани увеличивалось незначительно (до 11,5 усл. ед). Выведение радахлорина из нервной ткани в при инкубации в физиологическом растворе происходило медленней: через 2 часа промывки, содержание радахлорина в брюшной цепочке снижалось всего на 11 % от максимального значения.



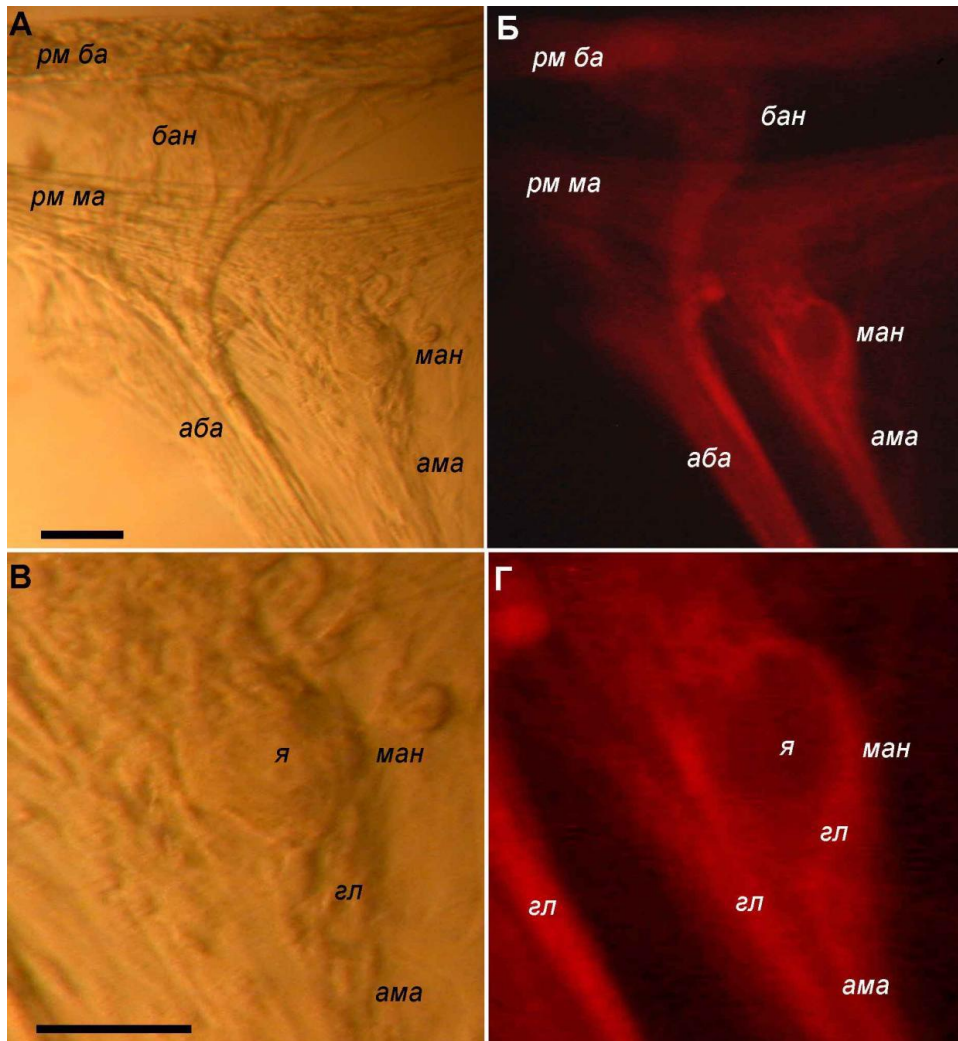


Рис. 1 Распределение флуоресценции радахлорина в рецепторе растяжения рака

Микрофотографии рецептора растяжения рака в проходящем свете, объектив 20х (А) и 40х (В); Б и Г - флуоресцентные изображения того же препарата, флуорохромированного радахлорином (5·мкМ). Масштабные отрезки – 50 мкм. *аба* – аксон быстро адаптирующегося нейрона; *ама* - аксон медленно адаптирующегося нейрона; *бан* - быстро адаптирующийся нейрон; *гл* – глиальные клетки; *ман* - медленно адаптирующийся нейрон; *рм ба* – быстро адаптирующаяся рецепторная мышца; *рм ма* – медленно адаптирующаяся рецепторная мышца; *я* – ядро

### **Фотодинамическое воздействие радахлорина на нейроны и глиальные клетки**

ФД воздействие радахлорина вызывало необратимое прекращение импульсной активности МРН даже при концентрациях ниже 1 нМ (Рис. 2).

Линия регрессии, отражающая зависимость продолжительности импульсации от концентрации радахлорина, характеризуется уравнением:

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

Данная функция не является крутой, что характеризует радахлорин, как фотосенсибилизатор, который может инактивировать нейроны даже в наномолярных концентрациях за время, приемлемое для ФДТ (порядка 30 минут). Коэффициент  $b=0,26$ ; это указывает на то, что одна молекула ФС,

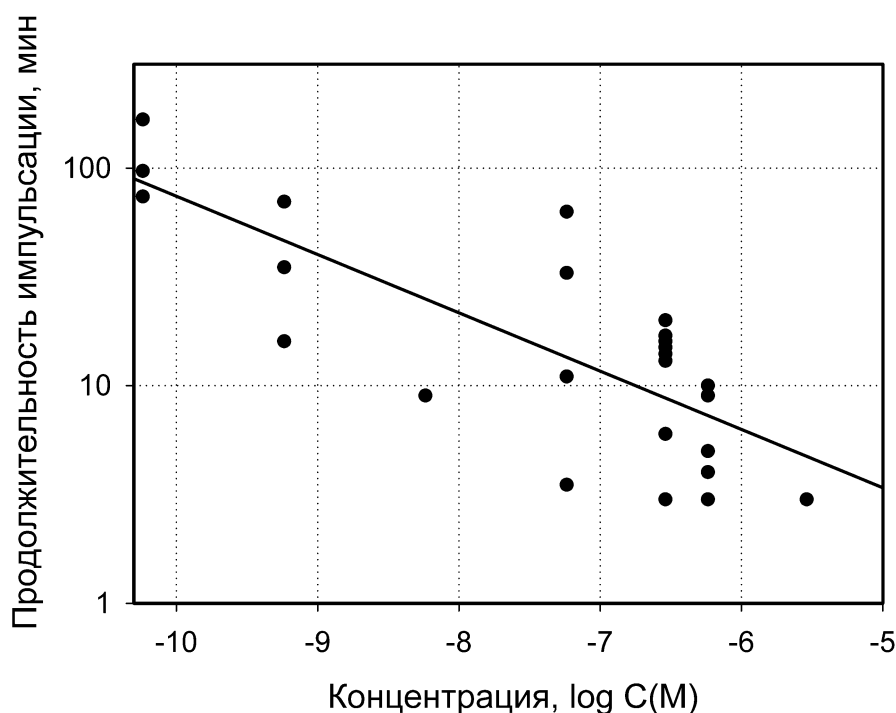


Рис. 2 Зависимость продолжительности импульсных реакций фотосенсибилизированных нейронов от концентрации радахлорина

поглотившая квант света, вызывала около 4 вторичных повреждений клетки, возможно, иницируя несколько цепочек свободнорадикального повреждения [Узденский, 2010].

В присутствии 250 нМ радахлорина ФД воздействие вызывало некроз нейронов и некроз и апоптоз глиальных клеток. При этом продолжительность импульсации нейронов в среднем снижалась с 363 мин до 14 мин ( $p < 0,001$ ; Табл. 1). Такое воздействие в среднем увеличивало уровень некроза нейронов от 0 до 93% ( $p < 0,001$ ; Табл. 1), некроза глиальных клеток – от 3 до 73% ( $p < 0,001$ ; Табл. 1). Также резко увеличивался уровень апоптоза глии от 2 до 29% ( $p < 0,001$ ; Табл. 1).

Полученные данные целесообразно учитывать при использовании радахлорина в фотодинамической терапии опухолей мозга. Радахлорин быстро накапливается в нервной ткани и вызывает некроз и апоптоз нейронов и

глиальных клеток при облучении. Таким образом, ФД воздействие радахлорина может повреждать и здоровую нервную ткань.

Табл. 1 Инактивация и смерть медленно адаптирующихся нейронов рака под влиянием фотодинамического воздействия радахлорина (250 нМ). Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка (n= 9)

Параметр	Контроль	ФДТ
Нейроны		
Продолжительность импульсации, мин	363 $\pm$ 45	14 $\pm$ 1,5
Некроз, %	0	93 $\pm$ 7
Глиальные клетки		
Апоптоз, усл. ед.	2 $\pm$ 1	29 $\pm$ 6
Некроз, %	3 $\pm$ 3	73 $\pm$ 5

### **Фотодинамическое воздействие радахлорина стимулирует кальциевые осцилляции нейронах и астроцитах культуры коры мозга крысы**

Ионы  $Ca^{2+}$  регулируют множество процессов в клетке, а также играют важную роль в ответе клеток на внешние воздействия [Berridge et al., 2003]. По литературным данным ФД воздействие на различные типы клеток может вызывать изменения  $[Ca^{2+}]_c$ , обусловленное как активацией каналов плазматической мембраны, так и выходом  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо [Almeida et al., 2004].

По полученным данным, культивируемые нейроны коры головного мозга крысы были более чувствительны к ФД воздействию радахлорина, чем астроциты сокультуры. Облучение в присутствии радахлорина вызывало изменения концентрации ионов кальция в цитозоле большинства нейронов культуры (Рис. 3 А) и только в некоторых астроцитах (Рис. 3 Б). При этом количество ответивших нейронов возрастало с увеличением времени облучения культуры. Облучение в течение 1 и 3 минут достоверно увеличивало количество ответивших нейронов на 46 $\pm$ 14% и 55 $\pm$ 20% ( $p < 0,05$ ) соответственно по сравнению с контрольной регистрацией  $[Ca^{2+}]_c$ . ФД-индуцированные кальциевые осцилляции наблюдались только в некоторых астроцитах (рис.3Б).

Полученные результаты свидетельствуют об участии ионов кальция в реакциях нейронов и астроцитов на фотодинамическое воздействие.

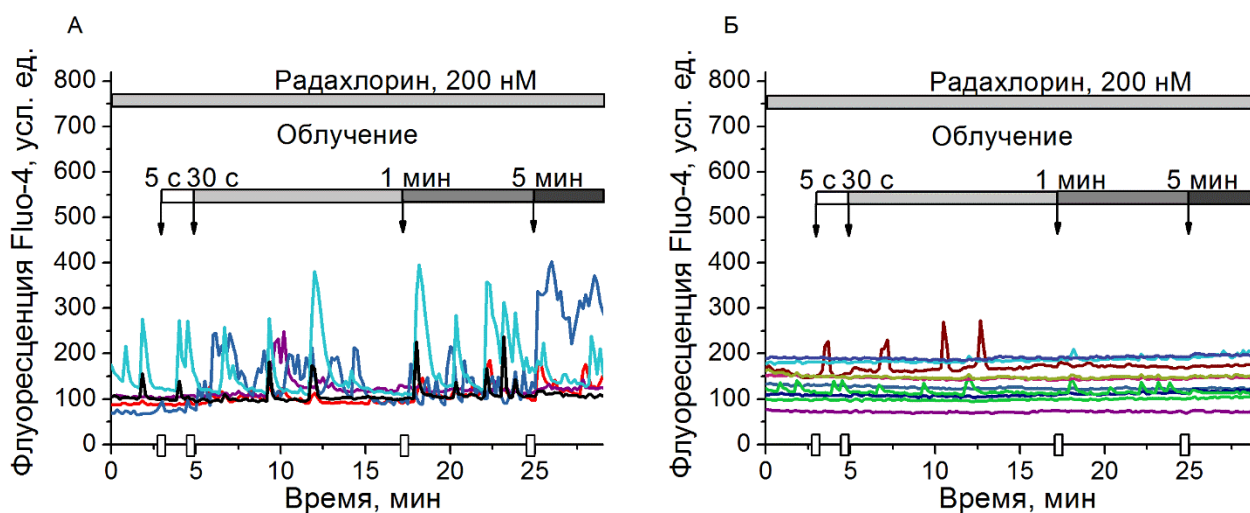


Рис. 3 ФД воздействие радахлорина стимулирует кальциевые осцилляции в нейронах первичной смешанной культуры. А – фотоиндуцированные изменения  $[Ca^{2+}]_c$  первичных нейронов (n=117). Б – фотоиндуцированные изменения  $[Ca^{2+}]_c$  первичных астроцитов (n=126). На графиках отражены изменения репрезентативных клеток. Каждая кривая отражает изменения в одной клетке. На оси абсцисс – время регистрации сигнала Fluo-4, прямоугольниками отмечена остановка регистрации на время облучения

Для выяснения клеточных механизмов, участвующих в повышении уровня цитозольного кальция в ответ на облучение, был проведен ингибиторный анализ фотоиндуцированного кальциевого сигнала.

#### **Исследование участия внеклеточных ионов кальция в реакциях клеток первичной культуры на фотодинамическое воздействие радахлорина**

Для изучения фотоиндуцированного входа ионов кальция в цитозоль нейронов и астроцитов через плазматическую мембрану ФД воздействие производилось в бескальциевой среде (Рис. 4). Отсутствие ионов кальция во внеклеточной среде не ингибировало ФД-индуцированные кальциевые осцилляции нейронов (Рис. 4 А). В астроцитах в бескальциевой среде увеличение  $[Ca^{2+}]_c$  также происходило лишь в некоторых клетках (Рис. 4 Б).

Можно предположить, что ФД воздействие радахлорина стимулирует выход кальция из внутриклеточных депо нейронов и астроцитов, а вход внеклеточного кальция через плазматическую мембрану не играет существенной роли в ФД-индуцированном кальциевом ответе.

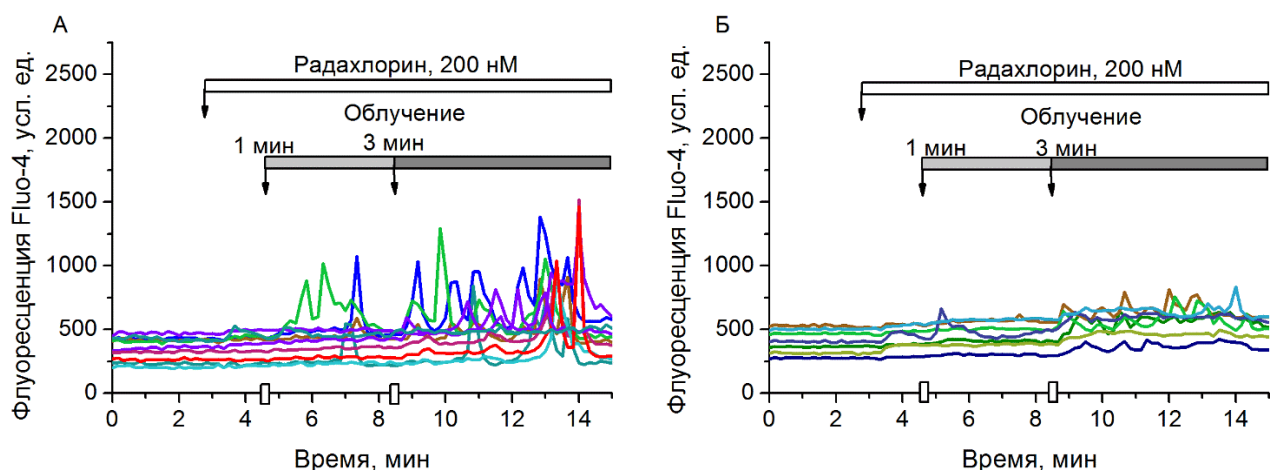


Рис. 4 ФД воздействие радахлорина стимулирует кальциевые осцилляции в нейронах (А, n=169) и астроцитах (Б, n=162) первичной смешанной культуры в бескальциевой среде. На графиках отражены изменения репрезентативных клеток. Каждая кривая отражает изменения в одной клетке. На оси абсцисс – время регистрации сигнала Fluo-4, прямоугольниками отмечена остановка регистрации на время облучения

### **Внутриклеточное кальциевое депо участвует в формировании кальциевого сигнала нейронов и астроцитов при фотодинамическом воздействии**

Для изучения участия ионов  $\text{Ca}^{2+}$  эндоплазматического ретикулума (ЭР) в фотоиндуцированных изменениях  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  нейронов и астроцитов был использован специфический ингибитор  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы ЭР, тапсигаргин. Тапсигаргин вызывает опустошение  $\text{Ca}^{2+}$  депо ЭР, увеличение концентрации цитозольного кальция и последующую откачку ионов  $\text{Ca}^{2+}$  во внеклеточную среду (Рис. 5). При добавлении 1 мкМ тапсигаргина количество ответивших на одноминутное ФД воздействие радахлорина значительно снижалось с 42% в случае контрольного облучения до 1 % ( $p < 0,001$ ; Рис. 5). Реакции астроцитов смешанной культуры на ФД воздействие радахлорина в присутствии тапсигаргина совсем не наблюдалось ( $n = 143$ ).

Таким образом, опустошение кальциевого депо в ЭР путем ингибирования  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы практически полностью блокировало фотоиндуцированные кальциевые осцилляции в нейронах, что указывает на значительный вклад ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , депонированных в ЭР, в ФД-индуцированное изменение  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ .

### **Изучение роли фосфолипазы С в фотоиндуцированном увеличении $[\text{Ca}^{2+}]_c$**

Для изучения роли фосфолипазы С клетки инкубировали в присутствии 5 мкМ U73122, ингибитора фосфолипазы С, после чего в кювету добавлялся радахлорин и культура дважды последовательно облучалась (1 и 3 минуты).

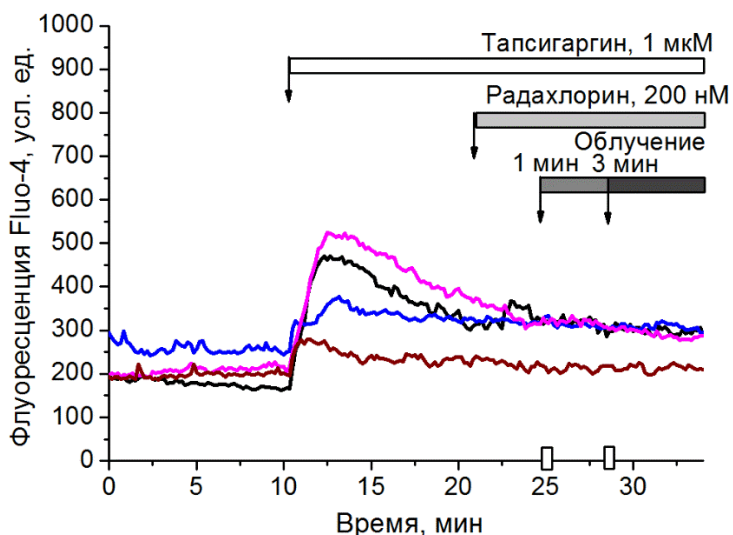


Рис. 5 Тапсигаргин (1 мкМ) ингибирует ФД-индуцированные изменения  $[Ca^{2+}]_c$  в первичных нейронах. Каждая кривая соответствует изменениям  $[Ca^{2+}]_c$  в отдельной клетке. На графике представлены ответы 4 репрезентативных клеток (n = 108). На оси абсцисс – время регистрации сигнала Fluo-4, прямоугольниками отмечена остановка регистрации на время облучения

Ингибирование фосфолипазы С подавляло фотоиндуцированные кальциевые осцилляции в первичных нейронах смешанной культуры (Рис. 6). Процент ответивших нейронов после предварительной инкубации с U73122 снижался с 42 % в контроле до 5 % ( $p < 0,01$ ) при одностороннем ФД воздействии. В астроцитах ФД-индуцированные изменения  $[Ca^{2+}]_c$  при добавлении U73122 не наблюдались (n = 18).

Можно предположить, что в нейронах и астроцитах первичной сокультуры изменения уровня кальция в цитозоле вызваны выходом кальция из ЭР путем активации фосфолипазы С и IP3 рецепторов.

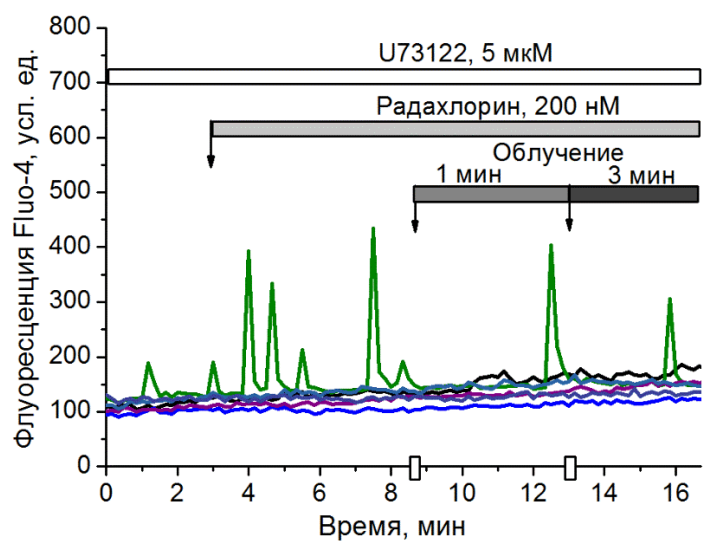


Рис. 6 Ингибитор фосфолипазы С U73122 (5 мкМ) блокирует ФД - индуцированные изменения  $[Ca^{2+}]_c$  в первичных нейронах. На графике представлены ответы 6 репрезентативных клеток (n = 20). Каждая кривая соответствует изменениям в отдельной клетке. На оси абсцисс – время регистрации сигнала Fluo-4, прямоугольниками отмечена остановка регистрации на время облучения

## Роль активных форм кислорода в активации фотоиндуцируемых кальциевых осцилляций клеток смешанной культуры

Для изучения роли АФК в активации кальциевых осцилляций в ответ на ФД воздействие радахлорина клеточные культуры предварительно инкубировались в среде с 500 мкМ антиоксиданта тролокс (водорастворимый аналог витамина Е). Предварительная инкубация с тролоксом снижала количество клеток, в которых  $[Ca^{2+}]_c$  увеличивалась в ответ на ФД воздействие радахлорина (Рис. 7). Процент ответивших нейронов снизился с 42 % ( $n = 117$ ) в случае контрольного облучения до 11% ( $p < 0,05$ ). В астроцитах после применения тролокса ФД-индуцированных изменений  $[Ca^{2+}]_c$  не наблюдалось ( $n = 19$ ). Предварительная обработка тролоксом привела к ингибированию кальциевых осцилляций в большинстве клеток. Таким образом, можно предположить, что генерация АФК в результате ФД воздействия приводит к активации фосфолипазы С и стимуляции IP3 рецепторов ЭР.

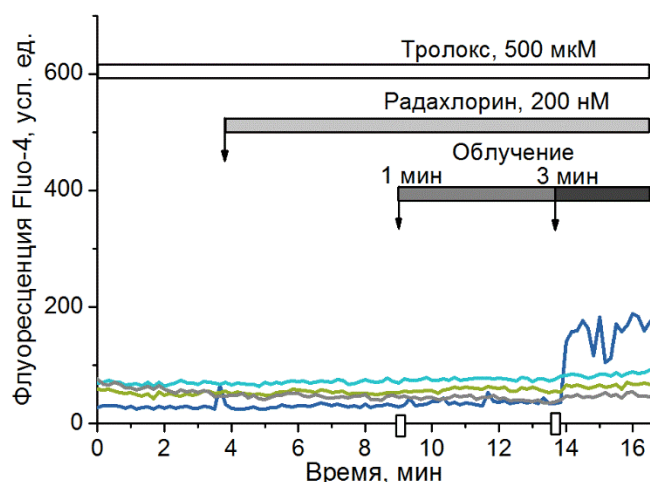


Рис. 7 Антиоксидант Тролокс (500 мкМ) ингибирует ФД - индуцированные изменения  $[Ca^{2+}]_c$  в первичных нейронах. На графике представлены ответы 4 репрезентативных клеток ( $n = 19$ ). Каждая кривая соответствует изменениям в отдельной клетке. На оси абсцисс – время регистрации сигнала Fluo-4, прямоугольниками отмечена остановка регистрации на время облучения

## Фотоиндуцированное перекисное окисление липидов смешанных культур нейронов и астроцитов

Выработка АФК в процессе ФД воздействия и, как следствие, окислительный стресс сопровождаются перекисным окислением липидов (ПОЛ) и повреждением мембран клетки и внутриклеточных органелл. Для оценки изменения скорости перекисного окисления липидов, вызванного ФД воздействием радахлорина, был использован флуоресцентный зонд BODIPY-C11 [581/591]. Клетки смешанной культуры облучались 2 раза в течение 2 минут в присутствии 400 нМ радахлорина. Скорость ПОЛ начинала увеличиваться уже после облучения в течение 2 минут (Рис. 8), но достоверное увеличение скорости

перекисного окисления липидов в клетках первичной сокультуры наблюдалось только после 4 минут облучения ( $p < 0,05$ ; Рис. 8).

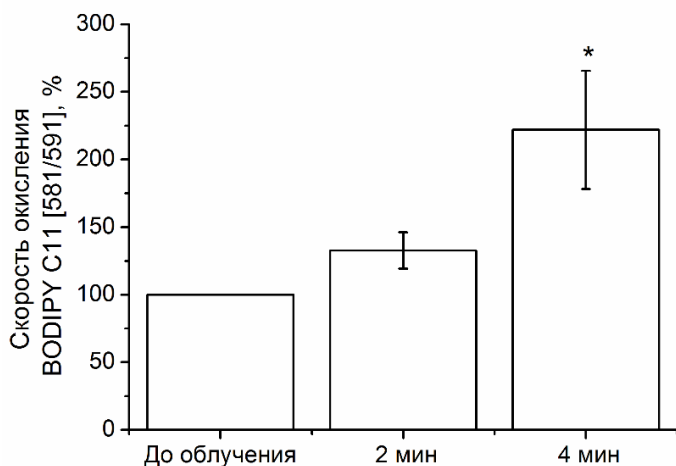


Рис. 8 Изменение скорости окисления BODIPY C11 [581/591] в клетках первичной сокультуры коры мозга крысы ( $n = 46$ ) после облучения в течение 2 мин и 4 мин. \* -  $p < 0,05$ . Сигнал калибровался относительно первоначальной скорости окисления зонда (100%). Данные приставлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка

### **Изменения концентрации ионов $Ca^{2+}$ в митохондриях нейронов и астроцитов при фотодинамическом воздействии**

При повышении уровня  $[Ca^{2+}]_c$  митохондрии также могут накапливать кальций, что может приводить к стимуляции биоэнергетических функций или же, при перегрузке кальцием, к гибели клеток [Gleichmann et al., 2011]. Измерения митохондриального кальция  $[Ca^{2+}]_m$  проводились с помощью флуоресцентного зонда X-Rhod-1 одновременно с регистрацией флуоресценции зонда Fluo-4, отражающего изменения  $[Ca^{2+}]_c$ . Смешанные культуры нейронов и астроцитов облучались в присутствии 200 нМ радахлорина импульсно (с частотой 0,1-0,2 Гц на длине волны 633 нм) в течение всего эксперимента. При этом в первичных нейронах сокультуры ( $n = 12$ ) непрерывно повышались как флуоресценция Fluo-4 с  $1390 \pm 170$  усл. ед. до  $1620 \pm 150$  усл. ед. после 15 мин облучения, так и флуоресценция X-Rhod-1 с  $2820 \pm 310$  усл. ед. до  $3050 \pm 270$  усл. ед. после 15 минут воздействия.

В астроцитах  $[Ca^{2+}]_c$  также непрерывно повышался при ФД воздействии (Рис. 9А). Сигнал Fluo-4 увеличивался с  $280 \pm 10$  усл. ед. в начале воздействия до  $420 \pm 20$  усл. ед.,  $550 \pm 30$  усл. ед. и  $530 \pm 20$  усл. ед. через 5, 10 и 15 минут облучения соответственно. Флуоресценция X-Rhod-1 в астроцитах увеличивалась с  $1480 \pm 60$  усл. ед. до  $1680 \pm 60$  усл. ед. после 5 мин облучения и до  $2000 \pm 100$  усл. ед. после 10 минут облучения ( $p < 0,001$ ), после чего начинала уменьшаться (Рис. 9Б).

Увеличение флуоресценции зонда X-Rhod-1 указывает на захват ионов  $Ca^{2+}$  митохондриями клеток первичной сокультуры, в результате ФД-индуцированного повышения концентрации  $Ca^{2+}$  в цитозоле. Резкое снижение  $[Ca^{2+}]_m$  в астроцитах после 10 минут ФД воздействия может свидетельствовать о



фотоиндуцированном повреждении митохондриальной мембраны или же об открытии высокопроницаемой митохондриальной поры (РТР), опосредованное повышением концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях.

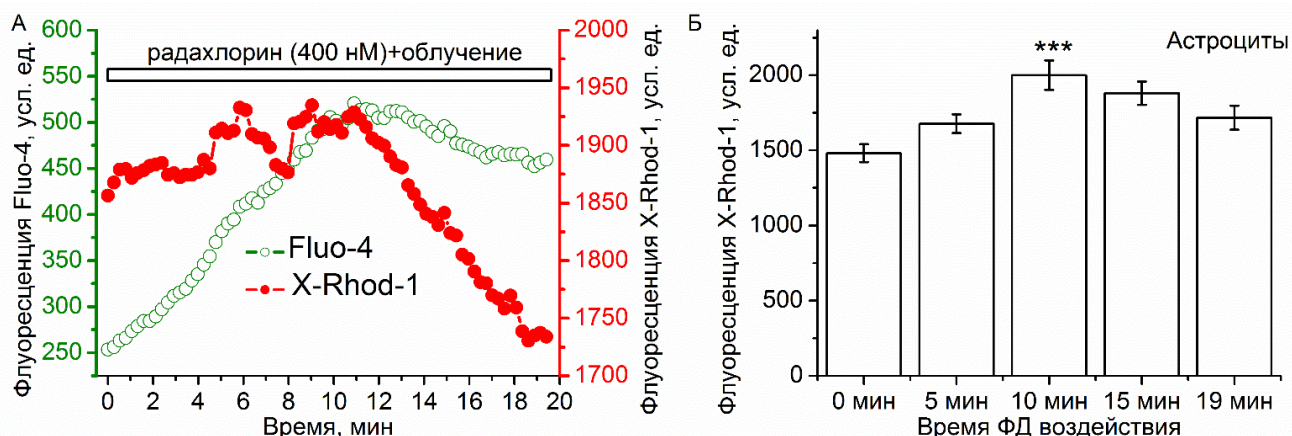


Рис. 9 А – ФД-индуцированные изменения  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  и  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  в репрезентативном астроците первичной сокультуры из  $n = 15$ , измеренные с помощью зондов Fluo-4 и X-Rhod-1. Б - ФД-индуцированные изменения  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  в астроцитах. Значения в столбцах представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка. \*\*\* -  $p < 0,001$

### Изменения митохондриального потенциала нейронов и астроцитов при фотодинамическом воздействии

Для регистрации изменения митохондриального потенциала  $\Delta\Psi_m$  использовался флуоресцентный зонд TMRM, параллельно проводилась регистрация изменений  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  с помощью зонда Fluo-4 (Рис. 10). Для нормировки сигнала TMRM в конце эксперимента добавлялся протонофор FCCP (1 мкМ), который приводит к деполяризации внутренней митохондриальной мембраны и выходу  $\text{Ca}^{2+}$  из органеллы в цитозоль (Рис. 10). За 100 % принимался изначальный уровень сигнала TMRM, за 0 – сигнал после добавления FCCP. Клетки облучались непрерывно (с частотой 0,1-0,2 Гц на длине волны 633 нм). Флуоресценция Fluo-4 повышалась как в первичных нейронах ( $n = 4$ ) с  $280 \pm 40$  усл. ед. в начале регистрации до  $420 \pm 80$  усл. ед. после 15 минут воздействия, так и в первичных астроцитах с  $200 \pm 20$  усл. ед до  $220 \pm 20$  усл. ед., что указывает на увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  в клетках сокультуры в процессе ФД воздействия. Флуоресценция TMRM значительно уменьшалась в нейронах от 100% до воздействия до  $79 \pm 8 \%$  ( $p < 0,05$ ) и до  $70 \pm 8 \%$  ( $p < 0,05$ ) после 10 и 15 минут облучения соответственно (Рис. 11 А) и в астроцитах от 100% до  $43 \pm 6,5 \%$  и  $42 \pm 7 \%$  ( $p < 0,001$ ) после 10 и 15 минут ФД воздействия соответственно (Рис. 11 Б).

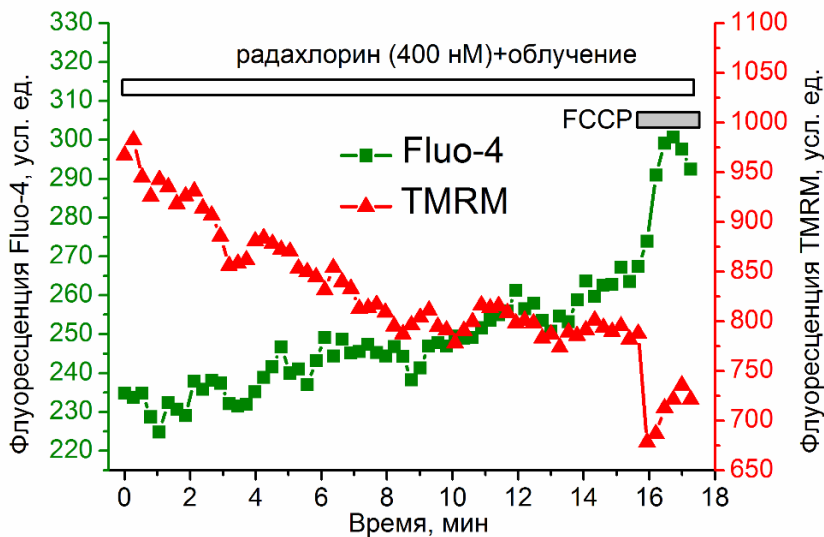


Рис. 10 ФД-индуцированные изменения  $[Ca^{2+}]_c$  и  $\Delta\Psi_m$  в репрезентативном астроците первичной сокультуры ( $n = 9$ ), измеренные с помощью зондов Fluo-4 и TMRM соответственно.

Уменьшение флуоресценции TMRM (вплоть до полного исчезновения в некоторых областях клетки) свидетельствует о падении митохондриального потенциала, которое может быть следствием ФД-индуцированного повреждения мембраны митохондрий, входа ионов  $Ca^{2+}$  митохондрии (Рис. 9), или же открытием РТР.

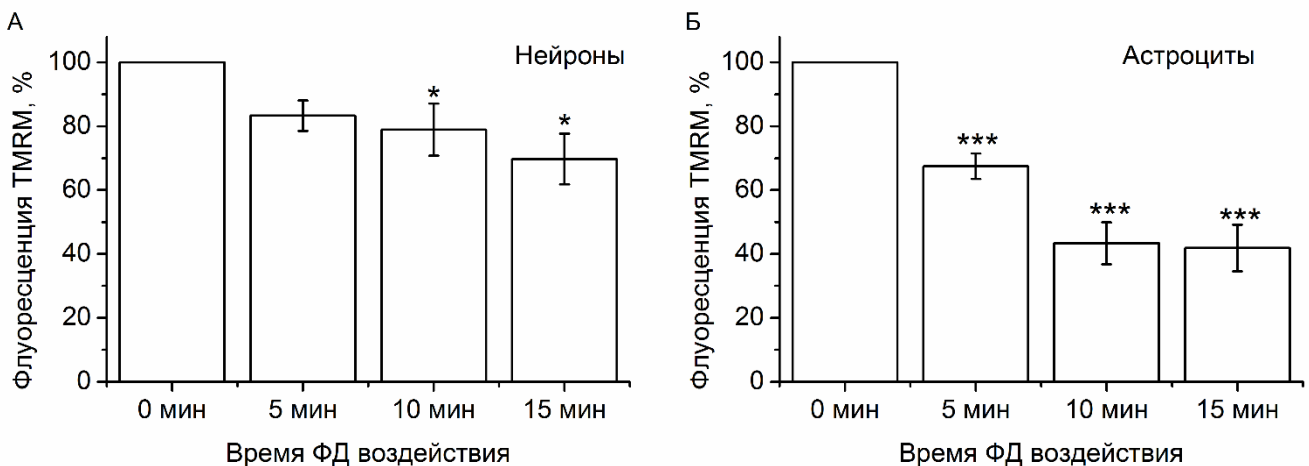


Рис. 11 Падение сигнала TMRM в процессе ФД-воздействия в нейронах (А) и астроцитах (Б), отражающее уменьшение  $\Delta\Psi_m$ . Сигнал калибровался относительно первоначального уровня (100%) и уровня после добавления 1 мкМ FCCP (0%). Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка. \* -  $p < 0,05$ , \*\*\* -  $p < 0,001$

Для оценки вклада РТР в падение  $\Delta\Psi_m$  культуры клеток подверглись ФД воздействию с предварительной инкубацией в среде с циклоспорином А (1 мкМ), ингибитором РТР. Изменения  $\Delta\Psi_m$  при ФД воздействии регистрировались с помощью зонда родамин 123. Сигнал калибровался добавлением 1 мкМ FCCP, при этом базовая флуоресценция была принята за 0, а максимальные значения, вызванные FCCP (при минимальном  $\Delta\Psi_m$ ), за 100%. В отсутствии циклоспорино

А флуоресценция родамина 123 уменьшалась в ответ на добавление радахлорина (рис. 12 А), что говорит о гиперполяризации митохондрий в клетках сокультуры. В ответ на последовательное облучение в течение 1 и 3 минут происходила деполяризация митохондрий (флуоресценция зонда увеличивалась; рис. 12 А). В присутствии циклоспорина А эффект гиперполяризации при добавлении радахлорина не наблюдался (рис. 12 Б). Ингибирование РТР циклоспорином А не повлияло на деполяризацию митохондриальной мембраны при облучении в течение 1 и 3 минут (Рис. 12 Б), что может говорить о незначительном вкладе высокопроницаемой поры в падение трансмембранного потенциала при ФД воздействии. Однако, характер изменения уровня кальция в митохондриях (см. выше) и значительное падение сигнала TMRM позволяют предположить вклад депонирования цитозольного кальция митохондриями и открытия РТР в падение  $\Delta\Psi_m$  при ФД воздействии.

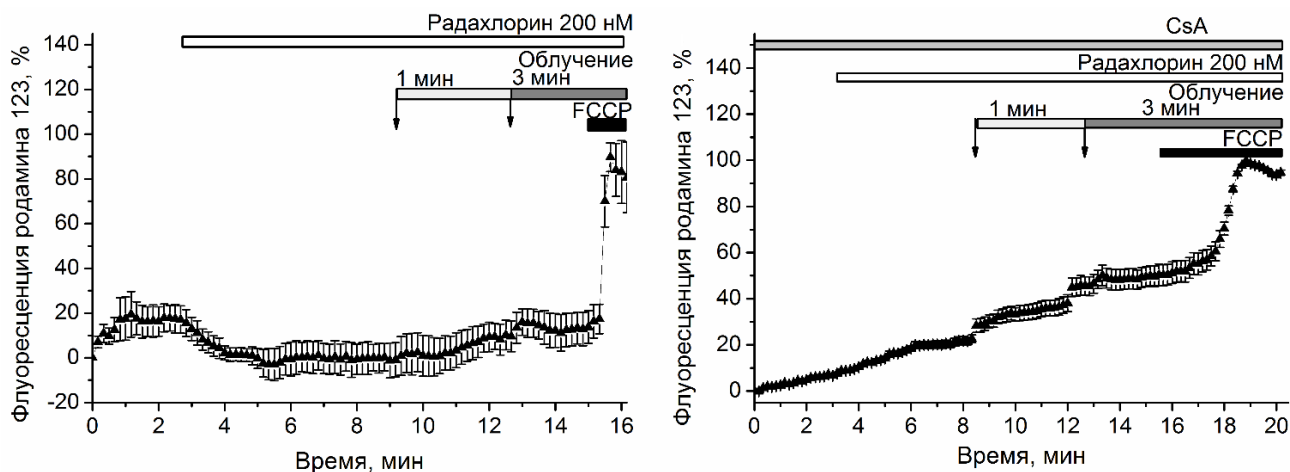


Рис. 12 Изменение  $\Delta\Psi_m$  в ответ на ФД воздействие радахлорина, зарегистрированное с помощью родамина 123 без (А,  $n = 125$ ) и в присутствии циклоспорина А (Б,  $n = 8$ ). Сигнал калибровался добавлением 1 мкМ FCCP, при этом базовая флуоресценция была принята за 0, а максимальные значения, вызванные FCCP (при минимальном  $\Delta\Psi_m$ ), за 100%. Кривые представляют собой набор средних значений флуоресценции клеток сокультуры  $\pm$  стандартная ошибка

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Участие кальциевой сигнальной системы в ответе различных типов клеток на ФД воздействие было подтверждено множеством исследований [Almeida et al., 2004; Hong et al., 2009; Hu et al., 2014]. Ответ клеток и запускаемые ФД воздействием сигнальные механизмы напрямую зависят от интенсивности воздействия и физико-химических свойств фотосенсибилизатора, а также его локализации в клетке [Castano et al., 2005; Juzeniene, 2009]. В данной работе

исследовано ФД воздействие фотосенсибилизатора радахлорин на нейроны и глиальные клетки беспозвоночных и позвоночных животных, а также изучен кальциевый сигнальный механизм, запускаемый клеткой в ответ на ФД воздействие радахлорина. Установлено, что радахлорин быстро накапливается сначала в глиальной оболочке нейронов, но также проникает в дендриты и сому, и связывается с нейрональной мембраной. Радахлорин обладает высокой ФД эффективностью в наномолярных и субнаномолярных концентрациях, вызывая инактивацию и смерть нейронов и глиальных клеток.

Показано, что фотодинамическое воздействие радахлорина запускает процесс перекисного окисления липидов клеточных мембран вследствие активной выработки АФК. Фотоиндуцированное перекисное окисление липидов плазматической мембраны, вероятно, активирует фосфолипазу С – фермент, находящийся на клеточной мембране. Активация фосфолипазы С, в свою очередь, приводит к производству IP<sub>3</sub> в результате расщепления фосфотидилинозитол-4,5-дифосфата. Выработка IP<sub>3</sub> приводит к высвобождению ионов кальция из эндоплазматического ретикулума вследствие активации IP<sub>3</sub>-рецепторов на поверхности мембраны ретикулума. ФД-индуцированный кальциевый сигнал может запускать множество клеточных функций. Известно, что выход ионов кальция из эндоплазматического ретикулума часто сопровождается захватом кальция митохондриями. Это, по-видимому, играет физиологическую роль, так как было установлено, что повышение концентрации кальция в митохондриях может стимулировать выработку АТФ [Gleichmann et al., 2011]. Однако перегрузка митохондрий кальцием часто приводит к запуску сигнальных каскадов, приводящих к клеточной гибели. В рамках данного исследования, было установлено, что ФД-индуцированный кальциевый сигнал приводит к повышению уровня митохондриального кальция и снижению трансмембранного митохондриального потенциала.

Эти результаты могут указывать на повреждение мембраны митохондрий, открытие высокопроницаемой митохондриальной поры вследствие перегрузки митохондрий ионами кальция, или же на угнетение биоэнергетических функций клетки, вызванное фотодинамическим воздействием радахлорина. На основе анализа литературных данных и полученных результатов была построена концептуальная схема реакций нервных клеток на фотодинамическое воздействие радахлорина (Рис. 13).

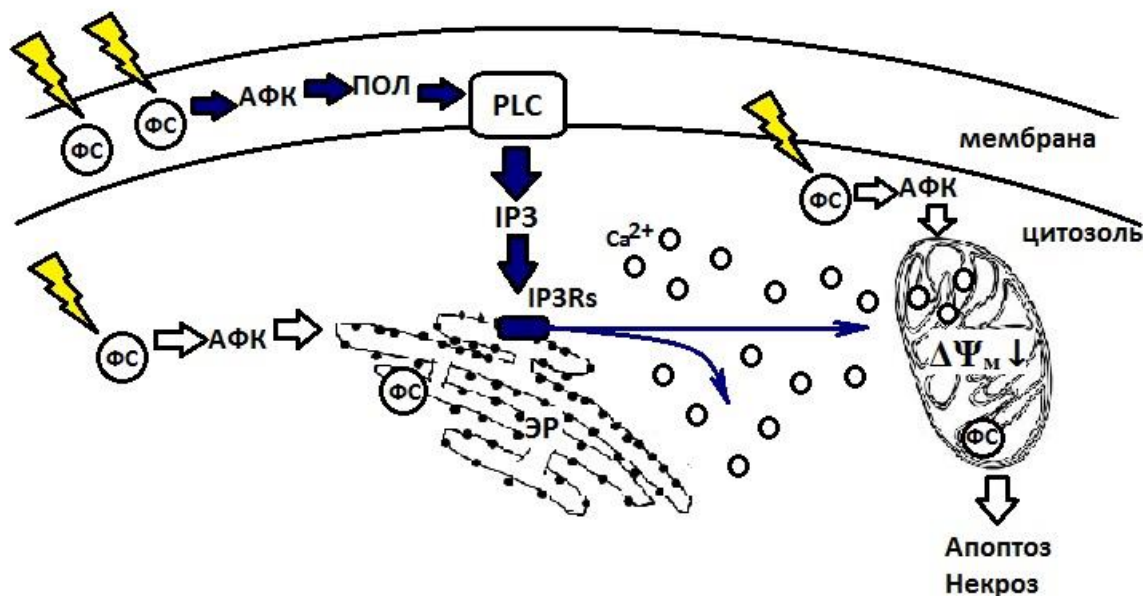


Рис.13 Сигнальный механизм, приводящий к повышению уровня кальция в ответ на ФДТ воздействие. Синими стрелками показана взаимосвязь, предполагаемая на основе результатов экспериментов. Белыми стрелками показаны возможные механизмы, предполагаемые на основе литературных данных. ФС – молекулы фотосенсибилизатора, АФК – активные формы кислорода, ПОЛ – перекисное окисление липидов, PLC – фосфолипаза С, IP3 – инозитолтрифосфат, IP3Rs – IP3 рецепторы, ЭР – эндоплазматический ретикулум,  $\Delta\Psi_m$  – трансмембранный митохондриальный потенциал.

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

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

## **Выводы:**

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

## **Список основных работ, опубликованных по теме диссертации в журналах, рекомендованных ВАК РФ**

1. Neginskaya M. Photodynamic Effect of Radachlorin on Nerve and Glial Cells / **M. Neginskaya**, E. Berezhnaya, M. Rudkovskii, S. Demyanenko, A. Uzdensky // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. - 2014. - V. 11, N. 3. - P. 357 – 364.
2. Neginskaya M. Radachlorin as a Photosensitizer / **M. Neginskaya**, E. Berezhnaya, M. Rudkovskii, S. Demyanenko, A. Uzdensky // Proceedings of SPIE. 2014. V. 9448. P. 94480O-1 - 94480O-6.
3. Fedorenko G. The Paired Neuroglial and Interglial Membranes in the Crayfish Stretch Receptor and their Local Disorganization / G Fedorenko, **M. Neginskaya**, A. Fedorenko, A. Uzdensky // Journal of Neuroscience Research. - 2015. - V. 93, N. 5. - P. 707 – 713.
4. Neginskaya M. Radachlorin as a Glia Specific Photosensitizer / **M. Neginskaya**, E. Berezhnaya, A. Uzdensky // Glia. - 2015. - V. 63, N. S1. - P. E217.
5. Uzdensky A. Protection of the crayfish mechanoreceptor neuron and glial cells from photooxidative injury by modulators of diverse signal transduction pathways / A. Uzdensky, E. Berezhnaya, A. Khaitin, V. Kovaleva, M. Komandirov, **M. Neginskaya**, M. Rudkovskii, S. Sharifulina // Molecular Neurobiology. – 2015. - V. 52, N. 2. - P.

811 – 825.

6. Uzdensky A.B. Photodynamic therapy: a review of applications in neurooncology and neuropathology / A.B. Uzdensky, E. Berezhnaya, V. Kovaleva, **M. Neginskaya**, M. Rudkovskii, S. Sharifulina // Journal of Biomedical Optics. - 2015. - V. 20, N. 6. - P. 061108-1–061108-7.

7. Негинская М.А. Кальциевая сигнализация в нейронах и астроцитах при фотоиндуцируемом окислительном стрессе / **М.А. Негинская**, Е.В. Бережная // Acta Naturae. Спецвыпуск: Научные труды V Съезда физиологов СНГ, V Съезда биохимиков России, Конференции ADFLIM. – 2016. – Т. 2. – С. 181.

8. Бережная Е.В. Исследование изменений митохондриального метаболизма в нейронах и астроцитах при фотоиндуцированном окислительном стрессе / Е.В. Бережная, **М.А. Негинская** // Acta Naturae. Спецвыпуск: Научные труды V Съезда физиологов СНГ, V Съезда биохимиков России, Конференции ADFLIM. – 2016. – Т. 2. – С. 182 - 183.

#### Список работ, опубликованных по теме диссертации

9. Neginskaya M. Photodynamic effect of radachlorin triggers phospholipase C activity in primary neurons [Электронный ресурс] / **M. Neginskaya**, E. Berezhnaya, A.B. Uzdensky // Тезисы докладов. Saratov Fall Meeting SFM'16 (Саратов). - 2016.- Режим доступа: <http://sfm.eventry.org/report/2125>.

10. Berezhnaya E. Photo-Induced Oxidative Stress Changes Mitochondrial Metabolism in Neurons and Astrocytes / E. Berezhnaya, **M. Neginskaya**, A.B. Uzdensky, A.Y. Abramov // Proceedings of the 13th ICNA conference 2016, Bilbao, Spain. - 2016. – P. 43

11. Neginskaya M. Photo-Induced Oxidative Stress Activates Calcium Signal in Neurons / **M. Neginskaya**, E. Berezhnaya, A.B. Uzdensky, A.Y. Abramov // Proceedings of the 13th ICNA conference 2016, Bilbao, Spain. - 2016. – P. 46.

12. Berezhnaya E. Photodynamic Treatment with Radachlorin Alters Mitochondrial Metabolism in Neurons and Astrocytes [Электронный ресурс] / E. Berezhnaya, **M. Neginskaya** // Proceedings of the 10th FENS Forum of Neuroscience 2016, Copenhagen, Denmark. - 2016. – Режим доступа: <https://ep70.eventpilot.us/web/planner.php?id=FENS16>.

13. Neginskaya M. Photodynamic Treatment Induces Calcium Signal in Neurons and Astrocytes [Электронный ресурс] / **M. Neginskaya**, E. Berezhnaya // Proceedings of the 10th FENS Forum of Neuroscience 2016, Copenhagen, Denmark. - 2016. – Режим доступа: <https://ep70.eventpilot.us/web/planner.php?id=FENS16>.

14. Berezhnaya E. Studying Photo-Induced Changes in Mitochondrial Metabolism in Neurons and Astrocytes by Live-Cell Imaging / E. Berezhnaya, **M. Neginskaya** //Imaging the Brain. Abstract Book, Warsaw, Poland. – 2016. - P. 39.

15. . Бережная Е.В. Исследование изменений митохондриального метаболизма

в нейронах и астроцитах при фотодинамическом воздействии радахлорина / Е.В. Бережная, **М.А. Негинская** // Сборник тезисов. 20-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «БИОЛОГИЯ - НАУКА XXI ВЕКА», Пущино. - 2016. – С. 255.

16. Негинская М.А. Исследование роли кальциевой сигнализации в ответах нейронов и астроцитов на фотодинамическое воздействие радахлорина / **М.А. Негинская**, Е.В. Бережная // Сборник тезисов. 20-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «БИОЛОГИЯ - НАУКА XXI ВЕКА», Пущино. - 2016. – С. 284.

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

18. Neginskaya M. Photodynamic Effect of Radachlorin on Nerve and Glial Cells [Электронный ресурс] / **М. Neginskaya**, E. Berezhnaya, A. Rudkovskii, A.B. Uzdensky // Тезисы докладов. Saratov Fall Meeting SFM'14 (Саратов). - 2014.- Режим доступа: <http://sfm.eventry.org/report/1024>.

19. Neginskaya M. The Study of Photodynamic Effect of Radachlorin on Neurons and Glial Cells / **М. Neginskaya**, E. Berezhnaya, M. Rudkovskii, A. Uzdensky. // Proceedings of the International Scientific School 'Frontiers in Modern Neuroscience' and International Symposium 'Glial as a target for the treatment of neurodegenerative diseases', June 15-18, Nizhny Novgorod. – 2014. – P. 28 - 29.

20. Негинская М. Фотодинамическое влияние радахлорина на нервные клетки / **М. Негинская**, Е. Бережная, М. Рудковский, С. Демьяненко, А. Узденский // VII съезд Российского фотобиологического общества. Пос. Шепси, Материалы съезда. - 2014. - С.71.