

Оригинальные статьи

© Коллектив авторов, 2023

УДК 577.25, 57.085

Кислухина Е.Н.¹, Лизунова Н.В.^{1,2}, Лисина О.Ю.³, Шарипов Р.Р.³, Красильникова И.А.¹, Бакаева З.В.^{1,4}, Пинелис В.Г.¹, Сурин А.М.³

Индукцированные глутаматом и ишемией изменения ионного гомеостаза в нейрональной культуре и коре головного мозга мышей, экспрессирующих Ca^{2+} -сенсор GCaMP6f

¹ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России,

119991, Москва, Россия, Ломоносовский просп., д. 2, стр. 1;

²ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»,

119234, Москва, Россия, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

³ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»,

125315, Москва, Россия, Балтийская ул., д. 8;

⁴ФГБОУ ВО «Калмыцкий государственный университет им. Б.Б. Городовикова»,

358000, Элиста, Республика Калмыкия, Россия, ул. Пушкина, д. 11

Актуальность. При исследованиях внутриклеточного сигналинга и межнейрональной передачи сигнала в мозге в норме и при патологии все большее применение находят трансгенные животные, экспрессирующие в нейронах флуоресцентный Ca^{2+} -сенсор. Вместе с тем, пока недостаточно исследовано, насколько изменения кальциевого гомеостаза в интактном мозге соотносятся с гораздо более подробно изученными изменениями этого важнейшего параметра в нейроглиальных культурах, служащих модельными системами живого мозга.

Целью работы было на модели ишемического инсульта выяснить в какой степени изменения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) в мозге трансгенной мыши, измеренные с помощью флуоресцентного белкового сенсора GCaMP6f, соотносятся с изменениями $[Ca^{2+}]_c$ в первичных нейроглиальных культурах из кортекса этих животных.

Методы. Методом широкопольной оптической нейровизуализации (ШОН) измерены изменения концентрации свободного Ca^{2+} в цитозоле нейронов ($[Ca^{2+}]_i$) головного мозга мышей. Измерения проводили перед и после фотоиндуцированного инсульта в сенсомоторной зоне коры. Изменения $[Ca^{2+}]_c$ отслеживали по флуоресценции GCaMP6f, экспрессируемого в нейронах кортекса. На первичных нейроглиальных культурах из коры головного мозга мышей той же линии проверено влияние эксайтотоксических доз глутамата (Glu) на $[Ca^{2+}]_c$ и на изменения средней концентрации свободного Ca^{2+} в цитоплазме ($[Ca^{2+}]_i$). Измерения $[Ca^{2+}]_i$ выполнены методом флуоресцентной микроскопии с использованием синтетических Ca^{2+} -индикаторов Fura-2 и Fura-FF. В культивируемых нейронах дополнительно к измерениям кальциевого гомеостаза выполнены измерения внутриклеточного pH (pH_i), митохондриального потенциала ($\Delta\Psi_m$) и эндогенной флуоресценции NADH.

Результаты. Фотоиндуцированная ишемия вызывает сильный рост $[Ca^{2+}]_c$ в зоне облучения $\sim 1,1$ мм² ($n=9$). В течение суток область высокой $[Ca^{2+}]_c$ расширяется до ~ 6 мм², но к 7-м сут практически возвращается к размерам необратимого повреждения. В нейроглиальных культурах из коры головного мозга мышей этой же линии кинетика изменений $[Ca^{2+}]_c$ индуцированных Glu, напоминает кинетику $[Ca^{2+}]_i$, однако $[Ca^{2+}]_c$ имеет значительно меньшую амплитуду при развитии отсроченной кальциевой дисрегуляции (ОКД). Сопоставление изменений $[Ca^{2+}]_c$ и pH_i показывает, что различия могут быть обусловлены тушением флуоресценции GCaMP6f при закислении цитозоля в результате эксайтотоксического действия Glu.

Заключение. Сопоставление сигналов экспрессируемого нейронами Ca^{2+} -сенсора GCaMP6f в мозге и синтетических Ca^{2+} -индикаторов в первичных нейроглиальных культурах, полученных из животных той же линии, показывает, что феномен ОКД, впервые обнаруженный в культурах, вероятно, реализуется и в нейронах целого мозга при инсульте. Вместе с тем, необходимо учитывать, что относительные изменения $[Ca^{2+}]_c$ на разных стадиях развития ишемического повреждения и последующего восстановления мозга после фотоиндуцированного инсульта, могут быть искажены за счет влияния pH_i на флуоресценцию белкового сенсора.

Ключевые слова: широкопольная оптическая нейровизуализация; ишемия мозга; глутамат; нейротоксичность; кальций; GCaMP6f; фототромбоз

Для цитирования: Кислухина Е.Н., Лизунова Н.В., Лисина О.Ю., Шарипов Р.Р., Красильникова И.А., Бакаева З.В., Пинелис В.Г., Сурин А.М. Индуцированные глутаматом и ишемией изменения ионного гомеостаза в нейрональной культуре и коре головного мозга мышей, экспрессирующих Ca^{2+} -сенсор GCaMP6f. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2023; 67(1): 5–20.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.01.5-20

Участие авторов: концепция дизайна исследования – Сурин А.М., Кислухина Е.Н., Лизунова Н.В., Бакаева З.В.; сбор материала – Лисина О.Ю., Шарипов Р.Р., Кислухина Е.Н., Лизунова Н.В., Красильникова И.А.; анализ и интерпретация данных – Сурин А.М., Лисина О.Ю., Шарипов Р.Р., Кислухина Е.Н., Лизунова Н.В., Бакаева З.В.; подготовка иллюстративного материала – Сурин А.М., Кислухина Е.Н., Лизунова Н.В., Лисина О.Ю., Шарипов Р.Р.; написание текста – Сурин А.М., Кислухина Е.Н., Лизунова Н.В., Шарипов Р.Р.; редактирование текста – Сурин А.М., Бакаева З.В., Пинелис В.Г. Кислухина Е.Н., Лизунова Н.В., Лисина О.Ю. и Шарипов Р.Р. внесли равный вклад в сбор материала и анализ результатов. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Сурин Александр Михайлович, e-mail: surin_am@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена за счет средств Государственного задания № FGfU-2022-0012, а также при финансовой поддержке Минздрава России, проект № ААААА19-119012590191-3. Оборудование для исследования приобретено в рамках гранта в форме субсидии Министерства науки и высшего образования Российской Федерации по программе обновления приборной базы НИОКР (внутренний номер 08-07-56/2021/82930).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 14.01.2023

Принята к печати 26.01.2023

Опубликована 17.03.2023

Kislukhina E.N.¹, Lizunova N.V.^{1,2}, Lisina O.Yu.³, Sharipov R.R.³, Krasilnikova I.A.¹, Bakaeva Z.V.^{1,4}, Pinelis V.G.¹, Surin A.M.³

Glutamate and ischemia-induced changes in ion homeostasis in the neuronal culture and cerebral cortex of mice expressing Ca^{2+} -sensor GCaMP6f

¹National Medical Research Center for Children's Health of the Russian Ministry of Health, Lomonosovsky prospect, 2, bldg. 1, Moscow, 119991, Russian Federation;

²Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Leninskie Gory, 1, bldg.12, Moscow, 119234, Russian Federation;

³Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltyskaya st., 8, Moscow, 125315, Russian Federation;

⁴Department of General Biology and Physiology, Kalmyk State University named after B.B. Gorodovikov, Pushkin st., 11, Elista, 358000, Russian Federation

Relevance. In studies of brain intracellular and intercellular signaling in normal and pathological conditions, transgenic animals expressing a fluorescent Ca^{2+} sensor in neurons are increasingly used. Calcium homeostasis was studied in detail in primary neuroglial cultures, which serve as model systems of the living brain. But how change in calcium homeostasis during ischemic conditions in the intact brain correlate with experiments on cell cultures has been poorly studied so far.

The aim of this work was to compare ischemia-driven changes in the intracellular concentration of Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) *in vivo* and *in vitro*: in the brain of transgenic mice, using the GCaMP6f fluorescent protein sensor, and in the neuroglial cell culture, obtained from the cortex of these animals.

Methods. Changes in the cytosolic concentration of free Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) in the neurons was measured by wide-field optical imaging (WFOI). Measurements were taken before and after photothrombotic stroke performed in the sensorimotor cortex. Changes in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ were monitored by the fluorescence of GCaMP6f expressed in cortical neurons. In primary neuroglial cultures from the cerebral cortex glutamate (Glu) in excitotoxic doses was used to model ischemic injury. Measurements of averaged Ca^{2+} concentration in the cyto- and nucleoplasm ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) were carried out by fluorescence microscopy using synthetic Ca^{2+} indicators Fura-2 and Fura-FF. In addition, measurements of intracellular pH (pH_i) and mitochondrial potential ($\Delta\Psi_m$) were carried out *in vitro*.

Results. Photothrombotic stroke caused a strong increase in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ in the illuminated zone $\sim 1.1 \text{ mm}^2$ ($n=9$). During the 24 hours, the area with high $[\text{Ca}^{2+}]_c$ expands to $\sim 6 \text{ mm}^2$, but by the 7th day it almost returns to the size of the primary damage. In neuroglial cultures from the cerebral cortex of the same mice strain, the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kinetics measured by GCaMP6f resembles the $[\text{Ca}^{2+}]_c$ kinetics, but $[\text{Ca}^{2+}]_c$ has a significantly lower amplitude during the development of delayed calcium deregulation (DCD). Comparison of changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and pH_i shows that the differences may be due to the quenching of GCaMP6f fluorescence due to cytosol acidification as a result of the excitotoxic Glu action.

Conclusion. Comparison of measurements by the genetically-encoded GCaMP6f Ca^{2+} sensor *in vivo* and by the synthetic Ca^{2+} indicators in primary neuroglial cultures shows that the DCD phenomenon, first discovered in cultures, is probably realized in intact brain neurons in stroke. It should be taken into account that the relative changes in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ can be distorted due to the effect of pH_i on the fluorescence of the protein sensor at different stages of ischemia development and subsequent brain recovery after a photothrombotic stroke.

Keywords: wide-field optical imaging; brain ischemia; glutamate; neurotoxicity; calcium; GCaMP6f; photothrombosis

For citation: Kislukhina E.N., Lizunova N.V., Lisina O.Yu., Sharipov R.R., Krasilnikova I.A., Bakaeva Z.V., Pinelis V.G., Surin A.M. Glutamate and ischemia-induced changes in ion homeostasis in the neuronal culture and cerebral cortex of mice expressing Ca^{2+} -sensor GCaMP6f. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(1): 5–20. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.01.5-20

Author's contribution: the study design – Surin A.M., Kislukhina E.N., Lizunova N.V., Bakaeva Z.V.; data acquisition – Lisina O.Yu., Sharipov R.R., Kislukhina E.N., Lizunova N.V., Krasilnikova I.A.; data analysis and interpretation – Surin A.M., Lisina O.Yu., Sharipov R.R., Kislukhina E.N., Lizunova N.V., Bakaeva Z.V.; preparation of illustrative material – Surin A.M., Kislukhina E.N., Lizunova N.V., Lisina O.Yu., Sharipov R.R.; writing the text – Surin A.M., Kislukhina E.N., Lizunova N.V., Sharipov R.R.; editing the text – Surin A.M., Bakaeva Z.V., Pinelis V.G. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: Alexander M. Surin, e-mail: surin_am@mail.ru

Information about the authors:

Lizunova N.V., <https://orcid.org/0000-0002-6644-7716>

Kislukhina E.N., <https://orcid.org/0000-0001-9217-1330>

Lisina O.Yu., <https://orcid.org/0000-0003-0273-9928>

Sharipov R.R., <https://orcid.org/0000-0001-9280-5954>

Krasilnikova I.A., <https://orcid.org/0000-0001-9453-3040>

Bakaeva Z.V., <https://orcid.org/0000-0002-2797-3270>

Surin A.M., <https://orcid.org/0000-0003-1104-5442>

Financing. This research was funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, State order No. FGFU-2022-0012, by the Russian Ministry of Health, Project AAAA19-119012590191-3. The equipment for the study was purchased as part of a grant in the form of a subsidy from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation under the program for updating the instrument base of leading organizations performing research and development (internal number 08-07-S6/2021/82930).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 14.01.2023

Accepted 26.01.2023

Published 17.03.2023

Введение

При ишемии мозга и инсульте вокруг зоны необратимого поражения возникает переходная область, пенумбра, в которой отмечена повышенная концентрация основного возбуждающего нейромедиатора центральной нервной системы – глутамата (Glu). Избыточная стимуляция глутаматом рецепторов в пенумбре считается лидирующим фактором гибели нейронов [1]. Исследования первичных культур нейронов из различных отделов мозга показали, что Glu вызывает гиперактивацию ионотропных рецепторов, в результате которой происходит перегрузка нейронов ионами кальция, ведущая к дисфункции митохондрий, энергетическому коллапсу, оксидативному стрессу и ряду других процессов, кульминацией которых является гибель нейронов [2–4]. Другим важнейшим фактором, по мнению некоторых исследователей, является формирование областей избыточной концентрации ионов K^+ и метаболический стресс вследствие распространяющейся кортикальной депрессии [1]. Поэтому актуальным является комплексное исследование нарушений метаболизма и ионного гомеостаза нейронов в моделях *in vivo* и *in vitro* с использованием трансгенных животных (мышей) и первичных нейрональных культур из мозга, в условиях, имитирующих патофизиологические состояния центральной нервной системы.

Трансгенные животные, в клетках которых экспрессируются флуоресцентные белковые сенсоры, по-

зволяющие отслеживать изменения внутриклеточного гомеостаза, становятся все более важной моделью для изучения фундаментальных процессов в живом организме [5, 6]. Чтобы полученные данные были максимально приближены к тому, что происходит в организме людей, используются трансгенные млекопитающие, чаще всего лабораторные линии мышей [7–9]. Наиболее популярный пример такого подхода – это исследования изменений внутриклеточных концентраций свободного Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$), который служит универсальным вторичным мессенджером во всех типах эукариотических клеток. Вместе с тем, изменения $[Ca^{2+}]_i$ в интактном организме могут происходить под влиянием нескольких факторов, каждый из которых трудно контролировать. Поэтому культуры клеток, полученные из трансгенного организма и содержащие флуоресцентный белковый сенсор, являются полезной моделью для проверки ответа на контролируемые воздействия.

В настоящей работе были использованы трансгенные мыши, экспрессирующие в нейронах белковый сенсор ионов кальция GCaMP6f. Исследование выполнено с использованием мультимедийной системы широкопольной оптической нейровизуализации (ШОН) флуоресцентных сигналов коры головного мозга живой мыши. Параллель-

но в первичных нейроглиальных культурах из коры головного мозга этой же линии мышей проведены мультиволновые измерения методом флуоресцентной микроскопии средней концентрации свободного Ca^{2+} в цито- и нуклеоплазме ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), а также митохондриального потенциала и уровня эндогенного NADH. Показано, что в нейроглиальной культуре изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и изменения $[\text{Ca}^{2+}]_c$ в цитозоле ($[\text{Ca}^{2+}]_c$), индуцированные нейротоксическим действием Glu, согласуются. Вместе с тем, на разных стадиях развития ишемии и последующего восстановления мозга после фотоиндуцированного инсульта, $[\text{Ca}^{2+}]_c$ может быть занижена за счет влияния цитозольного pH на флуоресценцию белкового сенсора.

Методика

Эксперименты с животными. В экспериментах была использована линия трансгенных мышей C57BL/6J-Tg(Thy1-GCaMP6f)GP5.17Dkim/J (JAX stock #025393), экспрессирующих в нейронах флуоресцентный сенсор Ca^{2+} GCaMP6f [10]. Мышей содержали в стандартных условиях (22 °C, 12-часовой цикл день/ночь) с неограниченным доступом к воде и пище. В эксперименте использовали животных обоих полов.

Эксперименты проводились с учетом рекомендаций директивы № 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях. Протокол исследований был одобрен локальными этическими комитетами ФГБНУ «НИИОПП» (№05-06/12 от 14.12.2017) и ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» (протокол заседания №1 от 30.01.2018).

Подготовка животных к ШОН. Мышам в возрасте 4-6 нед была проведена операция по истончению костей черепа и установке краниального окна для дальнейшего наблюдения активности коры больших полушарий методом ШОН. Использовали протокол, как в статье [11] с небольшими изменениями. Вкратце, с дорзальной поверхности головы снимали скальп, удаляли соединительные ткани. Затем, используя скоростную микродрель 78001 (RWD, Китай), алмазную фрезу №803165524040 (HDFREZA, Россия) и силикон-алмазные полиры №803104243524030, №803104243514030, №803104243504030 (Acurata, Германия), удаляли верхние слои черепных костей до достижения прозрачности. Диаметр краниального окна составлял примерно 10 мм. В процессе полировки череп непрерывно орошали холодным физраствором. Подготовленные кости покрывали цианакрилатным клеем LOCTITE 401 (Henkel, Германия) и слоем двух прозрачных полимеров SN BC и SN-TC-01 (Brigitte Bottier, Россия), затвердевающих под

воздействием USB-LED-лампы мощностью 3W (Solomeya, Великобритания) в течение 30 с. К голове мыши при помощи цианакрилатного клея LOCTITE 401 и стоматологической пластмассы Villacryl S V2 (Zhermack, Польша) крепили титановый холдер для фиксации животного в установке для ШОН. Холдер представлял из себя ободок по форме краниального окна с 4 выступающими пластинами для крепления в штативе. В качестве анестезии во время проведения операции была использована интраперитонеальная инъекция смеси Золетила 100 (Virbac Sante Animale, Франция) и Ксилы (Interchemie werken De Adelaar B.V., Эстония) в дозах 100 и 8 мг/кг соответственно. После операции животными подкожно вводили смесь Кетонала (8.5 мг/кг) и антибиотика Марбобел (8 мг/кг) 1 раз в сут в течение 4 дней.

Через неделю после операции животных постепенно приучали к съемкам в установке ШОН в бодрствующем состоянии. Приучение включало 3 этапа в течение 6 дней с интервалом в 2 дня: 1-й этап – 30-минутная адаптация к комнате с установкой ШОН, исследование платформы и приучение к фиксации головы в руках экспериментатора; 2-й этап – трехкратная фиксация мыши в установке не более чем на 1 мин, 3-й этап – 5-минутная фиксация мыши с включением светодиодов.

Установка для широкопольной оптической нейровизуализации (ШОН). Флуоресценцию GCaMP6f возбуждали, используя светодиод с длиной волны 470 нм (BLS-LCS-0470-14-22, Mightex, США). Излучение светодиода направляли к образцу через светофильтр ET470/24m (Chroma, США) и комбинированный светоделитель (LCS-BC25-0495, Mightex, США), световод (Mightex, США), широкополосный светофильтр ET470/40x, (Chroma, США), светоделитель T495lpxg (Chroma, США) и фокусировали на коре головного мозга с помощью 4x-эпиобъектива (P/N OBJ-MAO-04, Mightex, США). Испускаемый GCaMP6f свет регистрировали в конфигурации прямого микроскопа, используя светофильтр ET525/50m (Chroma, США).

Частота регистрации кадров составила 20 Гц. Сигнал детектировали скоростной высокочувствительной камерой (CXE-V013-U, Mightex, США).

Для получения изображений голову мыши закрепляли под объективом микроскопа, фиксируя холдер в штативе. Свобода передвижения бодрствующему животному обеспечивалась с помощью левитирующей на воздушной подушке платформы (Neurotar, Финляндия).

Моделирование инсульта. Через 2 нед после операции животных случайным образом, но с учетом ра-

венства полов, распределили на 2 группы: «Контроль» и «Фототромбоз». Мышам из группы «Фототромбоз» ($n = 9$) проводили моделирование инсульта методом фотоиндуцированной ишемии (ФИ) [12]. Фотосенсибилизатор Бенгальский розовый (БР, 20 мг/кг) (Sigma-Aldrich®, Германия) вводили в правую или левую яремную вену через катетер, установленный за 2 дня до индукции инсульта. Локальный тромбоз получали при помощи облучения в течение 10 мин лазером ($\lambda = 532$ нм) с диаметром пучка 2 мм и мощностью 10 мВт. Лазер включали через 5 мин после введения БР. Центр лазерного пучка фокусировали относительно брегмы в сенсомоторной области коры левого полушария (AP = -1; ML = -2). С животными из группы «Контроль» ($n = 9$) проводили те же манипуляции, кроме введения БР. С целью минимизации влияния наркоза, фототромбоз индуцировали бодрствующим животным, закрепленным в установке для ШОН. Регистрацию изображений коры мозга проводили за 2 дня до ФИ и через 3 мин (в течение последующих 7,3 мин) после окончания индукции ишемии. Регистрацию изображений повторяли спустя 1 и 7 сут после ФИ.

Гистологическое окрашивание. На 20-е сут после фотоиндуцированного инсульта, животных усыпляли, используя эфир. Далее проводили транскардиальную перфузию 4% параформальдегидом (Sigma-Aldrich®, Германия). Извлекали головной мозг и фиксировали образцы в 10% формалине в фосфатно-солевом буфере (Биовитрум, Россия).

Срезы толщиной 35 мкм нарезали при помощи вибратома Leica vt1200s (Leica, Германия). Срезы наносили на покрытые желатином и квасцами (Sigma-Aldrich®, Германия) покровные стекла и высушивали при комнатной температуре. Через сутки проводили окрашивание по Нисслию, используя краситель крезиловый фиолетовый (Servicebio, Китай). Окрашенные срезы заключали под покровные стекла, используя в качестве среды для заключения Канадский бальзам (Panreac, Испания).

Приготовление нейроглиальных культур. Нейроглиальные культуры получали из коры головного мозга новорожденных мышей (P0-P2) линии C57BL/6J-Tg(Thy1-GCaMP6f)GP5.17Dkim/J (JAX stock #025393) по стандартной методике [13, 14]. Нейрональная специфичность синтеза флуоресцентного белкового сенсора GCaMP6f обеспечивалась нейрон-специфичным промотором Thy-1; один из родителей был гемизиготен, второй дикого типа. Вкратце, мышей анестезировали, декапитировали, кору выделяли и отделяли от мозговых оболочек. Извлеченные ткани промыли раствором Хенкса, не содержащим Ca^{2+} и Mg^{2+} ,

измельчали скальпелем, инкубировали в растворе папаина (12 мин, 37 °C) и диссоциировали в свежей MEM. Однородную суспензию дважды центрифугировали (200 g, 5 мин, 4 °C). Осадок ресуспендировали до концентрации 10^6 клеток/мл в нейробазальной среде (NBM, Gibco, США) с добавлением саплимента B-27 и пенициллина/стрептомицина. Аликвоты клеточной суспензии (250 мкл) переносили в лунки 35 мм чашек Петри, дном которых служили покровные стекла, прикрепленные к лункам с внешней стороны (MatTeck, США). Клетки хранили в CO_2 -инкубаторе при 37 °C, в атмосфере 95% воздуха, 5% CO_2 и относительной влажности 100%. Через 2-3 дня в среду добавляли цитозинарабинозид (Ara C, 5 мкМ) для предотвращения пролиферации глиальных клеток. Клетки снабжали питательными веществами, заменяя 1/3 среды на свежую, через каждые 3-4 суток. Культуры использовали в экспериментах через 14-16 дней после посева (14-16 days *in vitro*, DIV).

Все использованные реактивы производства Sigma-Aldrich® (Германия), если не указано иное.

Флуоресцентно-микроскопические измерения. Флуоресцентно-микроскопические измерения выполнены, как описано в [15, 16] на 2 установках. Одна система анализа изображений была на основе микроскопа Olympus IX-71 (Япония), оснащенного системой освещения образца Lambda 10-2 (Sutter Instruments Co, США), CCD-камерой CoolSNAP HQ2 (Photometrics, США), управляемой через компьютерную программу MetaFluor (Universal Imaging Corp., США). Другая система состояла из инвертированного микроскопа Nikon Ti2 Eclipse (Япония), оснащенного объективами 20x/NA=0.75 и 40x/NA=1.30 Oil. Возбуждающее излучение создавалось светодиодами устройствами pE-340fura и pE-300ultra (CoolLED, Англия). Излучаемый и проходящий свет шёл через эмиссионные фильтры, встроенные в колесо перед sCMOS камерой Prime BSI Express (Teledyne Photometrics, США). Вся система управлялась через программу Nikon NIS-Elements (Япония).

Генотипирования новорожденных не проводили, объединяя клетки коры мозга 4 мышат. По этой причине количество нейронов, синтезировавших GCaMP6f и имевших зеленую флуоресценцию (возбуждение 485 нм, регистрация 525 нм), было различным в культурах, приготовленных из разных пометов (4 серии по 2 эксперимента в каждой; 20 мышат от 4 самок, 4 независимые посадки). Доля культивируемых нейронов, экспрессировавших GCaMP6f колебалась в поле наблюдения от 2 до 20%.

Эндогенная флуоресценция клеток, обусловленная NADH, а также флуоресценция синтетических флуо-

ресцентных Ca^{2+} индикаторов Fura-2 и Fura-FF, белкового Ca^{2+} сенсора GCaMP6f, pH-чувствительного индикатора BCECF, митохондриального потенциал-чувствительного зонда TMRM имеют хорошо разделенные спектры возбуждения и испускания флуоресценции. Благодаря этому мы смогли выполнить одновременные измерения сразу двух или трех из перечисленных выше параметров в одних и тех же клетках.

TMRM, а также ацетоксиметилловые эфиры Fura-2, Fura-FF и BCECF приобретены у ThermoFisher (США). Нагрузку клеток ацетоксиметилловыми эфирами указанных Ca^{2+} - и pH-индикаторов проводили как описано ранее [15, 16].

Обработка результатов и статистический анализ.

Анализ изображений мозга животных осуществляли с помощью программы с открытым исходным кодом для анализа и обработки изображений ImageJ (National Institutes of Health, США). Статистический анализ данных проводили в программе GraphPad Prizm (GraphPad Software, США).

Результаты

Широкопольная нейровизуализация мозга мыши.

Площадь пораженной поверхности мозга является важным показателем степени тяжести повреждения. Результаты измерения размера области, подвергшейся ишемии, представлены на **рисунке 1**. Преимуществом ШОН является возможность прижизненной оценки повреждения в динамике (в данном эксперименте измерения проводили через 3 мин, 10 мин, 1 день и 7 дней после окончания облучения лазером). Поскольку подобных измерений методом ШОН, насколько нам известно, ранее не проводили, была выполнена валидация данного метода как способа оценки размера зоны некроза. Для этого результаты обсчета снимков ШОН были сопоставлены с классическим методом — окрашиванием гистологических срезов по Нисслию [17].

У здоровых животных интенсивность флуоресценции GCaMP6f довольно равномерна по поверхности коры больших полушарий (**рис. 1, Г**). При анализе видеозаписей ШОН перед фотоиндукцией ишемии видны спонтанные флуктуации флуоресценции, соответствующие увеличению или снижению концентрации свободного кальция в цитоплазме ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) группы нейронов. На первых минутах после фотоиндуцированной ишемии (ФИ) в группе «Фототромбоз» наблюдалось резкое (более, чем на 200%, по сравнению с исходным) увеличение уровня флуоресценции сенсора в центре области, в которой был индуцирован тромбоз сосудов (**рис. 1, А, Г**), что свидетельствует о входе большого количества ионов Ca^{2+} в клетки очага ише-

мии. От 3-й к 10-й мин область высокой флуоресценции расширялась у всех мышей группы ($1,14 \pm 0,34 \text{ мм}^2$ и $1,34 \pm 0,33 \text{ мм}^2$ соответственно, ср. ар. \pm ст. ош. ср., $p = 0.02$, $n = 9$, двухфакторный дисперсионный анализ для связанных выборок с поправкой Тукей). Расширение области высокой флуоресценции обусловлено, вероятно, увеличением количества нейронов со стабильно высокой $[\text{Ca}^{2+}]_c$.

Значительный рост (в среднем, до $6,03 \pm 0,82 \text{ мм}^2$, $p = 0.0002$) площади высокой флуоресценции GCaMP6f происходил через 1 сут после ФИ. Затем развивался противоположный эффект уменьшения площади и к 7-м сут она снижалась до почти исходной величины ($1,69 \pm 0,19 \text{ мм}^2$, $p = 0.0015$). Можно предположить, что на 1-е сут после ФИ большая часть нейронов (в среднем, 15% площади дорзальной проекции левого полушария) имела стабильно высокую $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Притом большая часть этих клеток восстанавливала низкую $[\text{Ca}^{2+}]_c$ к 7-м сут после ФИ (**рис. 1, Г**), а также функциональный статус, о чем свидетельствует возобновление спонтанных флуктуаций $[\text{Ca}^{2+}]_c$ в данных областях (данные не показаны).

В группе «Контроль» средний уровень флуоресценции и амплитуда его флуктуаций (средняя амплитуда $2,2 \pm 1,8\%$, ср.ар. \pm ст.откл., макс. = $9,6\%$, расчет относительно среднего уровня $\Delta F/\text{Fo} \cdot 100\%$, $n = 9$) не изменялись после ложной ФИ.

Описанные динамические измерения площади поверхности поражения (поверхность с высокой интенсивностью флуоресценции) не позволяют однозначно оценить размер зоны некроза, поэтому ее размеры были дополнительно определены гистологически. Диаметр области некроза на дорзальной проекции кортекса и на фронтальном срезе мозга должен совпадать, поэтому именно этот параметр был сопоставлен (**рис. 1, Б**). Зоной некроза считали очаг совместно с глиальным рубцом. Как видно из рисунка, ближе всего к значениям, полученным классическим гистологическим методом, лежат величины, полученные методом ШОН на 3-й мин после ФИ, между этими данными корреляция высокая ($r = 0,70$, $p = 0,035$, корреляция Пирсона).

У 5/9 мышей в период 3–10 мин после окончания облучения лазером (13–20 мин после начала фотоиндукции ишемии) была зарегистрирована распространяющаяся кортикальная деполяризация (РКД). Притом у 1 мыши это была первичная РКД, поскольку до ее начала флуоресценция во всем полушарии была на среднем уровне, а после окончания волны деполяризации сформировался очаг яркой флуоресценции. Как недавно показано Н.Т. Zhao с коллегами [18], количество

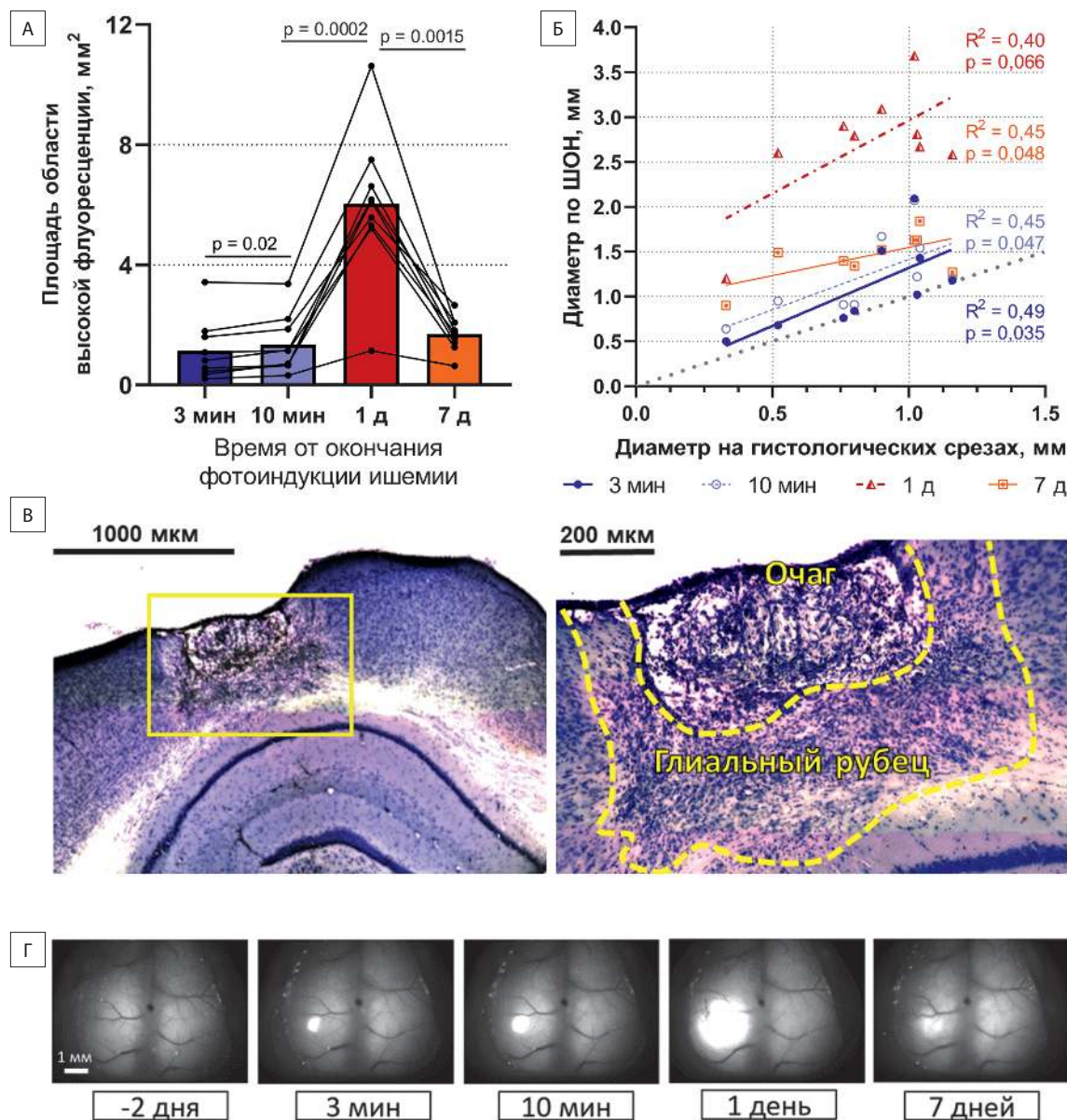


Рис. 1. Определение размера области ишемии в мозге мыши. (А) Площадь области с высокой интенсивностью флуоресценции GfCaMP6f на снимках ШОН ($n=9$, ср. арифм., двухфакторный дисперсионный анализ для связанных выборок с поправкой Тукей); (Б) Сопоставление диаметра области инсульта, определенного по ШОН, с диаметром инсульта, определенного по гистологическим срезам (корреляция Пирсона); (В) Репрезентативное изображение среза мозга, окрашенного по Нисслю. (Г) Репрезентативные флуоресцентные изображения поверхности коры больших полушарий, полученные методом ШОН для одной мыши; изображения представлены без обработки. Измерения методом ШОН проводили на бодрствующих подвижных мышах. Увеличение интенсивности флуоресценции GfCaMP6f-сенсора соответствует увеличению концентрации кальция в цитозоле нейронов. Съемку ШОН проводили при возбуждении 470 нм, регистрация флуоресценции 525 ± 25 нм. Фотоиндукцию ишемии проводили лазером 532 нм (10 мВт, 10 мин, диаметр светового пучка 2 мм); Бенгальский розовый (20 мг/кг) вводили в/в.

Fig. 1. Ischemic area size measurements in the mouse brain. (A) The square of the region with high intensity of GfCaMP6f fluorescence in the WFOI images ($n=9$, Mean, Two-Way ANOVA with Tukey); (B) Comparison of the stroke diameter, determined by WFOI, with the stroke diameter, determined by histological sections (Pearson's correlation); (C) Representative image of a Nissl-stained brain section. (D) Representative fluorescent images of the cerebral cortex surface, obtained by WFOI for one mouse; images are presented without processing. Measurements by WFOI were carried out on awake moving mice. An increase in the GfCaMP6f fluorescence corresponds to an increase in the cytosolic calcium concentration. WFOI images were obtained at excitation 470 nm, registration of fluorescence 520 ± 20 nm. Photothrombotic stroke modeling was performed with a 532 nm laser (10 mW, 10 min, the light beam diameter 2 mm); Rose Bengal (20 mg/kg) was administered intravenously.

волн РКД индивидуально для каждого животного, поэтому нельзя точно знать, какой по счету была зарегистрированная РКД у других животных. Характеристика волн не отличается от описанных [18] и заключается в том, что массовая деполяризация нейронов, детектируемая по увеличению флуоресценции GCaMP6f, распространяется по ишемизированному полушарию

от очага ишемии, с последующим периодом депрессии – снижением активности нейронов в полушарии относительно исходного уровня [19, 20]. Ширина фронта и временные характеристики могут различаться между различными РКД (рис. 2), что согласуется с данными литературы [18]. Также отмечено, что протекание РКД способствует скачкообразному расширению об-

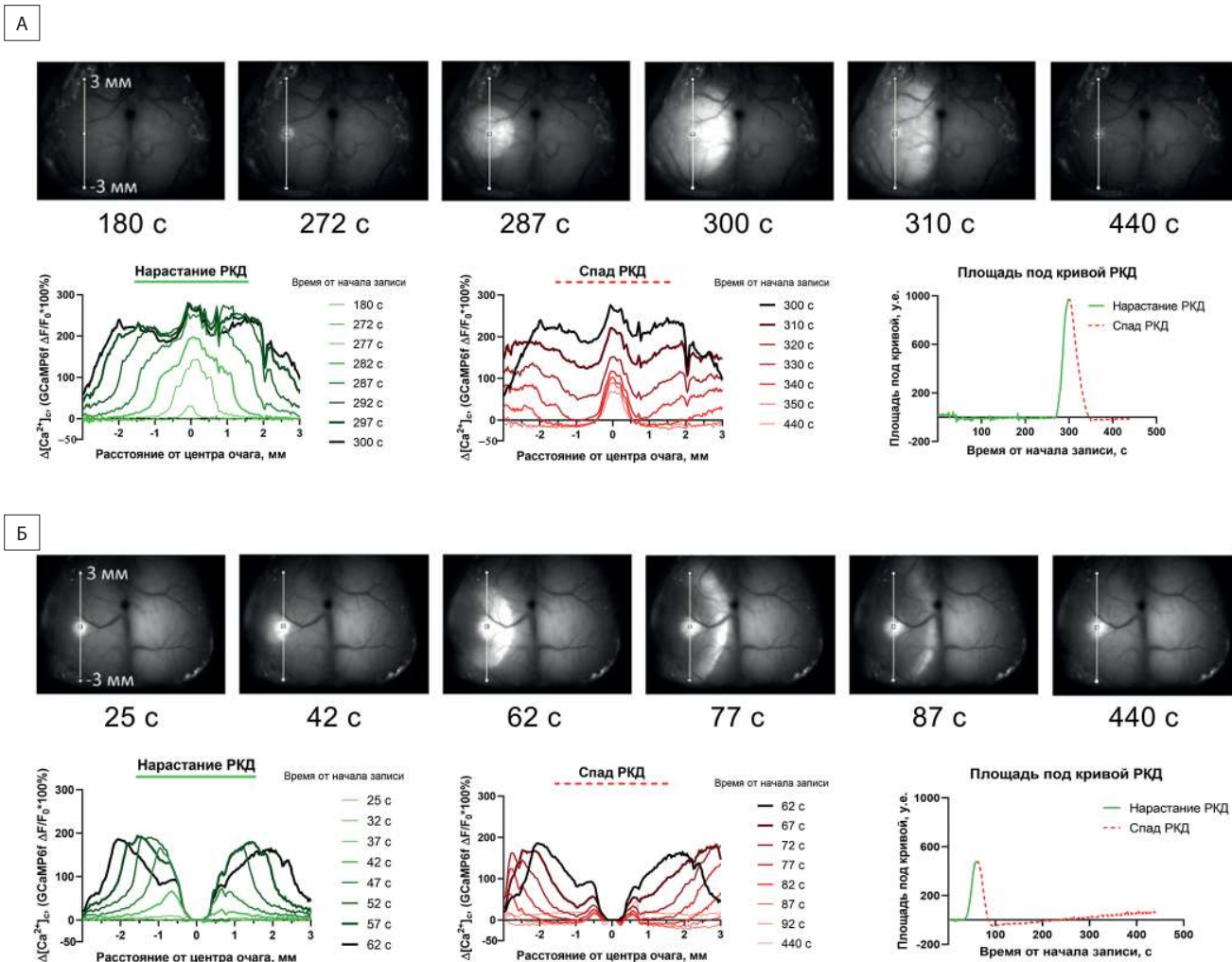


Рис. 2. Распространяющаяся кортикальная деполяризация (РКД) через 3-10 мин после фотоиндукции ишемии. Представлены репрезентативные изображения, полученные от 2 мышей, отображающие 2 различных сценария протекания РКД. (А) Первичная РКД с широким фронтом; (Б) Не первичная РКД с узким фронтом (изменений в очаге ишемии нет, т.к. там исходно высокая флуоресценция). Представлены (последовательно): репрезентативные необработанные изображения на различных временных промежутках записи (длина отрезка 6 мм); $\Delta F/F_0 * 100\%$ на различных этапах нарастания и спада РКД (профиль интенсивности построен вдоль прямой, прочерченной на изображениях мозга); площадь под кривой $\Delta F/F_0 * 100\%$ в течение всей записи. На графиках представлены изменения флуоресценции GCaMP6f относительно исходного уровня (принят за 0%).

Fig. 2. Cortical spreading depolarization (CSD) recorded 3-10 min after photothrombotic stroke. Representative images from two mice are shown, illustrating two different CSDs scenarios. (A) Wide primary CSD; (B) Narrow non-primary CSD (there are no changes in the ischemic core, since it initially has high fluorescence). Presented (consequently): raw images at various recording time intervals (segment length 6 mm); $\Delta F/F_0 * 100\%$ at various stages of CSD rise and fall (intensity profile plotted along a straight line drawn on brain images); area under the curve $\Delta F/F_0 * 100\%$ during the entire recording. The graphs show the changes in GCaMP6f fluorescence relative to the initial level (taken as 0%).

ласти с повышенной $[Ca^{2+}]_c$, тогда как в другие отрезки времени расширение области повышенной $[Ca^{2+}]_c$ происходит равномерно.

Измерения внутриклеточных концентраций кальция, митохондриального потенциала и pH в нейроглиальных культурах. В использованной линии трансгенных мышей Ca^{2+} -сенсор GCaMP6f не имеет адресной пептидной последовательности для доставки в какой-либо внутриклеточный компартмент и после синтеза на рибосомах должен оставаться в цитозоле. Анализ изображений подтверждает, что флуоресценция GCaMP6f сосредоточена в цитозоле и не обнаруживается в ядре (рис. 3, А). Примерно такое же распределение в клетке демонстрирует митохондриальный зонд TMRM, поскольку митохондрии в ядре отсутствуют. Очевидно, размер молекулы GCaMP6f (Мол. масса около 51 кДа) [21] превышает размер ядерной поры и без адресной метки сенсор не может попасть в ядро, и поэтому изменения сигнала GCaMP6f отражают изменения концентрации Ca^{2+} в цитозоле ($[Ca^{2+}]_c$). Это наблюдение важно в связи с тем, что синтетические Ca^{2+} -индикаторы, в том числе, использованные в данной работе Fura-2 или Fura-FF, имеют малый размер (около 1 кДа), легко проникают в ядро и их сигналы отражают изменения концентрации Ca^{2+} , усредненные по цито- и нуклеоплазме ($[Ca^{2+}]_i$).

Основная часть клеток, экспрессировавших GCaMP6f, имела в невозбужденном состоянии (перед добавлением Glu) стабильно низкую концентрацию

Ca^{2+} , регистрируемую как по флуоресценции белкового сенсора, так и с помощью синтетических кальциевых индикаторов Fura-FF и Fura-2. Добавление глутамата (Glu, 10 мкМ, глицин 10 мкМ, безмагневый буфер) вызывало транзиторный скачок сигнала обоих типов индикаторов Ca^{2+} , вслед за которым следовал вторичный подъем $[Ca^{2+}]_i$ (отсроченная кальциевая дизрегуляция, ОКД), четко регистрируемый с помощью Fura-FF (рис. 4, А) и Fura-2 (не показано). Сигналы GCaMP6f показали только начало вторичного подъема $[Ca^{2+}]_c$ (рис. 4, Б). Амплитуда этого подъема в большинстве клеток не превышала первоначальный скачок $[Ca^{2+}]_c$ в момент добавления Glu.

Митохондриальный потенциал начинает резко падать в тот момент, когда в нейронах развивается ОКД [22]. В данном эксперименте это отчетливо видно из сопоставления графиков на рисунке 4, В (сплошная красная кривая и зеленая пунктирная) и хорошо согласуется с опубликованными ранее данными [22, 23].

Изменения сигналов Fura-FF и TMRM в клетках, не экспрессировавших GCaMP6f, имели такой же характер, как и представленные на рисунке 4 (данные не показаны).

Ранее было показано, что воздействие токсических доз глутамата сопровождается закислением внутриклеточной среды [24]. Все флуоресцентные белки уменьшают свечение при падении pH ниже определенного порога, характерного для каждого сенсора [25]. Экспрессия флуоресцентного белкового pH-сенсора YFP

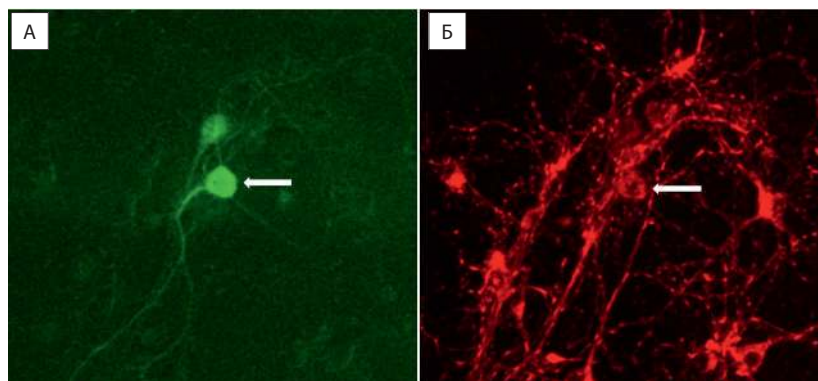


Рис. 3. Изображения первичной нейроглиальной культуры из кортекса мозга трансгенных мышей, экспрессирующих флуоресцентный белковый Ca^{2+} -сенсор GCaMP6f и окрашенных потенциал-чувствительным митохондриальным зондом TMRM. Стрелка указывает на нейрон, а также служит масштабной мерой (длина стрелки соответствует 20 мкм). Флуоресценцию GCaMP6f (А, зеленое изображение) возбуждали при 485 нм и регистрировали при 525 нм; флуоресценцию TMRM (Б, красное изображение); возбуждали при 565 нм регистрировали при ≥ 610 нм). Возраст культуры 14 дней. Объектив 40x/NA=1.35, Oil.

Fig. 3. Images of primary neuroglial culture from the brain cortex of transgenic mice expressing the fluorescent protein Ca^{2+} sensor GCaMP6f and stained with the voltage-sensitive mitochondrial dye TMRM. The arrow points to the neuron and also serves as a scale measure (the length of the arrow is 20 μ m). GCaMP6f fluorescence (A, green image) was excited at 485 nm and recorded at 525 nm; TMRM fluorescence (B, red image); excited at 565 nm recorded at ≥ 610 nm). Culture was 14 days in vitro (DIV). Lens 40x/NA=1.35, Oil.

в цитозоле культивируемых нейронов позволила показать, что при нейротоксическом действии глутамата рН цитозоля (рН_c) опускается ниже 6 [15, 26, 27], причем закисление цитозоля прекращалось после развития ОКД до стадии высокого [Ca²⁺]_i плато. Значение рК для структурных аналогов GCaMP6f находится вблизи рН 7,1 [21] и поэтому следует ожидать тушения его флуоресценции при действии Glu.

Мы проверили, как изменяется рН в культурах нейронов, полученных из коры головного мозга трансгенных мышей с генетически-кодируемым GCaMP6f. На рис. 5 представлены изменения [Ca²⁺]_i и внутриклеточного рН (среднее рН в цито- и нуклеоплазме, рН_i)

в 2 представительных нейронах, которые отличались характером изменений [Ca²⁺]_i в ответ на добавление Glu (10 мкМ, 5 мин). Обращает внимание, что после удаления Glu, восстановление низкой [Ca²⁺]_i происходит быстрее по сравнению с рН_i. Этот эффект объясняется тем, что митохондрии эффективно захватывают Ca²⁺ из цитозоля. На это указывает резкое увеличение [Ca²⁺]_i при добавлении протонифора FCCP (1 мкМ) в бескальциевом буфере (рис. 5). Несмотря на яркое отличие в Ca²⁺ сигналинге, изменения рН_i в обоих нейронах очень похожи. Это, вероятно, связано с тем, что восстановление исходного рН_i сопряжено с трансмембранным градиентом концентрации Na⁺, который (градиент) остается не-

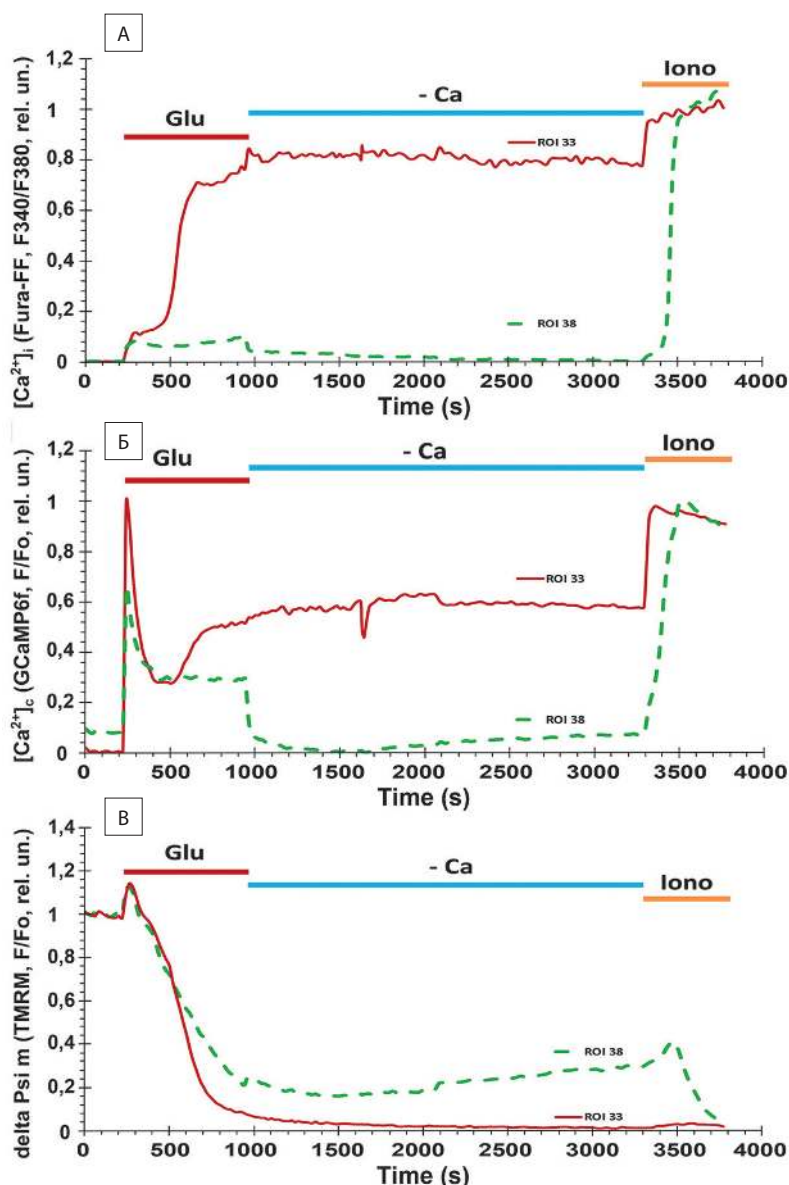


Рис. 4. Изменения средней по клетке внутриклеточной концентрации свободного Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) в цитозоле ([Ca²⁺]_c) и трансмембранного потенциала митохондрий (ΔΨ_m) в нейронах первичной нейроглиальной культуры из кортекса мозга мыши. Возраст культуры 13 сут. Приведены графики для 2 представительных нейронов (ROI 33, ROI 38), экспрессировавших GCaMP6f, в одном из которых (ROI 33) за время действия глутамата (Glu, 10 мкМ) развилась отсроченная кальциевая дисрегуляция (ОКД), а во втором ОКД не состоялась (ROI 38). Относительные измерения [Ca²⁺]_i выполнены с помощью (А) синтетического флуоресцентного индикатора Fura-FF (возбуждение 340 и 380 нм, регистрация 525 нм) и (Б) эндогенного Ca²⁺-сенсора GCaMP6f (возбуждение 485 нм, регистрация 525 нм); (В) измерения ΔΨ_m выполнены с использованием флуоресцентного зонда TMRM (возбуждение 565 нм, регистрация ≥610 нм). Снижение флуоресценции TMRM соответствует падению ΔΨ_m в результате вытекания TMRM из клетки [22]. Значения Ca²⁺ в покоящихся нейронах приняты за 0; максимальные сигналы Fura-FF и GCaMP6f приняты за 1, достигнуты добавлением Ca²⁺-ионофора иономицина (Iono, 1 мкМ, [Ca²⁺]_i в буфере 5 мМ). Изменения ΔΨ_m нормированы относительно исходных значений в покоящихся нейронах.

Fig. 4. Average intracellular concentration of free Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) dynamics, changes in the cytosolic calcium ([Ca²⁺]_c) and transmembrane potential of mitochondria (ΔΨ_m) in neurons of the primary neuroglial culture from the mouse cortex. 13 DIV. Graphs are shown for two representative neurons (ROI 33, ROI 38) expressing GCaMP6f, in one of which (ROI 33) delayed calcium dysregulation (DCD) developed during the action of glutamate (Glu, 10 μM), and in the second one, DCD did not take place (ROI 38). Relative measurements of [Ca²⁺]_i were performed using (A) synthetic fluorescent indicator Fura-FF (excitation 340 and 380 nm, emission 525 nm) and (B) endogenous Ca²⁺ sensor GCaMP6f (excitation 485 nm, emission 525 nm); (B) ΔΨ_m measurements were made using a TMRM fluorescent probe (excitation 565 nm, emission ≥610 nm). A decrease in TMRM fluorescence corresponds to a decrease in ΔΨ_m as a result of TMRM leakage from the cell [22]. Ca²⁺ values in resting neurons are taken as 0; the maximum signals of Fura-FF and GCaMP6f were taken as 1, achieved by adding the Ca²⁺ ionophore ionomycin (Iono, 1 μM, [Ca²⁺]_i = 5 mM, in buffer solution). Changes in ΔΨ_m shown as relative to the initial values in resting neurons.

большим после удаления Glu, даже если восстановление низкой $[Ca^{2+}]_i$ уже произошло [16].

Таким образом, данные измерений pH_i (рис. 5) подтверждают предположение, что пониженное значение $[Ca^{2+}]_c$ в период ОКД может быть вызвано рН-чувствительностью GCaMP6f к закислению цитозоля.

Неожиданной особенностью культуры клеток из коры головного мозга трансгенных мышей оказалось способность нейронов к спонтанным изменениям $\Delta\Psi_m$, синхронным с изменениями $[Ca^{2+}]_c$, зарегистрированными с помощью GCaMP6f. Пример таких синхронных изменений показан на рис. 6, А. Доля таких клеток составляла ~10% (8 клеток из 78, 2 выделения из 8 животных с разницей в 1 нед). Эти изменения относятся именно к цитозолу поскольку GCaMP6f, как уже отмечалось, не имеет адресной пептидной последовательности и не может попадать во внутриклеточные органеллы. Кроме того, в покое нейронах GCaMP6f не мо-

жет пассивно диффундировать в ядро, вероятно, потому что этого не позволяют размеры ядерных пор (рис. 3).

Сопоставление сигналов зонда TMRM и кальциевого сенсора GCaMP6f показало, что быстрые транзиторные флуктуации флуоресценции TMRM совпадают по продолжительности с падениями концентрации Ca^{2+} в цитозоле (рис. 6, верхние графики). Учитывая высокую аффинность GCaMP6f по отношению к Ca^{2+} (K_d в диапазоне 100-300 нМ; [21]), а также то, что в покое нейронах $[Ca^{2+}]_i$ не превышает 100 нМ [28], транзиторные изменения $[Ca^{2+}]_c$ составляют не более нескольких десятков наномолей/литр. Очевидно, этого количества Ca^{2+} достаточно для активации дыхательной цепи, но недостаточно для сильной деполяризации внутренней митохондриальной мембраны. Вторым вариантом реализуется при поступлении большого количества Ca^{2+} в матрикс митохондрий, которое происходит при нейротоксическом действии Glu (рис. 4).

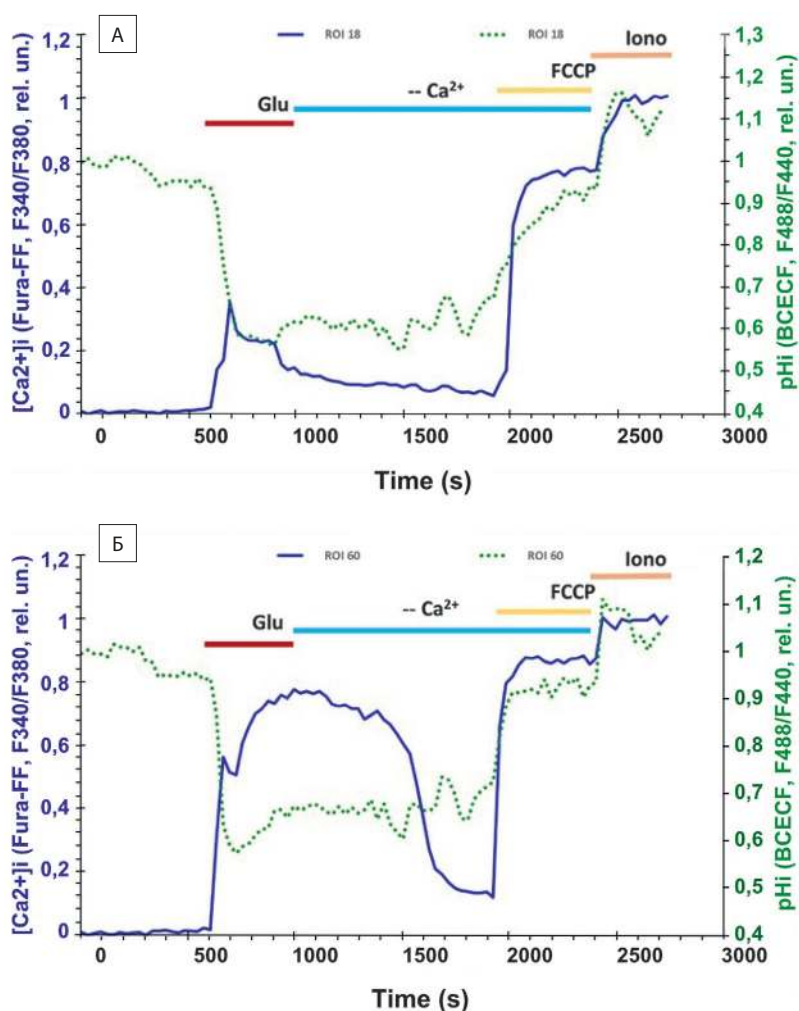


Рис. 5. Изменения $[Ca^{2+}]_i$ и внутриклеточного рН (pH_i) в первичной нейроглиальной культуре из мозга мыши. Показаны $[Ca^{2+}]_i$ и pH_i сигналы 2 представительных клеток, в одной из которых Glu не вызвал развития отсроченной кальциевой дисрегуляции (А), во второй ОКД развилась через 2 мин после добавления Glu (Б). Изменения $[Ca^{2+}]_i$ (синяя сплошная линия) представлены левой шкалой ординат, изменения pH_i (зеленая точечная линия) – правой шкалой. Концентрация Glu 10 мкМ (10 мкМ глицина, безмагниевого буфера); удаление Glu и добавление протонифора FCCP (1 мкМ) проводили в бескальциевом буфере (2 мМ Mg^{2+}). Внутриклеточные сигналы низкоаффинного Ca^{2+} -индикатора Fura-FF регистрировали как указано на рисунке 2. Для записи сигналов флуоресцентного рН-индикатора BCECF использовали возбуждение на 440 и 485 нм, регистрация на 525 нм. Калибровку максимального сигнала Fura-FF осуществляли, добавляя иономицин (см. рис. 2). Калибровку сигналов рН-индикатора BCECF не проводили, однако см. [15]. Возраст культуры 14 сут.

Fig. 5. Changes in $[Ca^{2+}]_i$ and intracellular pH (pH_i) in primary neuroglial culture from mouse brain (14 DIV). Changes in $[Ca^{2+}]_i$ (solid blue line) are represented by the left ordinate axis, pH_i changes (green dotted line) are represented by the right ordinate axis. Adding of Glu 10 μ M (10 μ M glycine, magnesium-free buffer), removal of Glu, and adding of protonophore FCCP (1 μ M) were performed in calcium-free buffer (2 mM Mg^{2+}). Intracellular signals of the low-affinity Ca^{2+} indicator Fura-FF were recorded as indicated for Fura-2 in Fig. 2. To record the signals of the fluorescent pH indicator BCECF, the conditions indicated in Fig. 1 for GCaMP6f were used. Calibration of the maximum Fura-FF signal was performed by adding ionomycin (see Fig. 2). Calibration of the signals of the pH indicator BCECF was not performed, however, see [15].

Для увеличения $\Delta\Psi_m$ требуется ускорение работы ферментов дыхательной цепи и, соответственно, усиленного потребления их субстратов, в первую очередь NADH, субстрата комплекса I [29]. Поэтому одновременно с измерениями $[Ca^{2+}]_c$ и $\Delta\Psi_m$ были выполнены измерения уровня внутриклеточного NADH, около 70% которого заключено в митохондриях [30]. Сопоставление сигналов зонда TMRM с изменениями эндогенной флуоресценции, обусловленной NADH показало, что скачки гиперполяризации (кратковременного роста $\Delta\Psi_m$) совпадают с падениями флуоресценции NADH (рис. 6, нижняя панель). Такие изменения NADH согласуются с каноническими представлениями о том, что для увеличения $\Delta\Psi_m$ необходимо ускорение работы ферментов дыхательной цепи митохондрий и, соответственно, увеличение потребления NADH комплексом I. Если бы скачкообразные увеличения $\Delta\Psi_m$ были связаны с быстрыми временными уменьшениями ионной проницаемости внутренней мембраны митохондрий, то в этом случае следовало

ожидать сокращения потребления NADH комплексом I и, соответственно, роста флуоресценции NADH. Однако имеет место противоположный феномен и, следовательно, более вероятной причиной скачкообразных транзиторных увеличений $\Delta\Psi_m$ является кратковременный рост скорости дыхания.

Чтобы уточнить изменениями какого из параметров, $[Ca^{2+}]_c$ или pH обусловлены спонтанные флуктуации флуоресценции GCaMP6f, первичную нейроглиальную культуру из мозга мышей, экспрессирующую этот кальциевый сенсор, окрасили синтетическим кальциевым индикатором Fura-2. Fura-2 является высоко аффинным индикатором и имеет константу диссоциации комплекса с Ca^{2+} $K_d=224$ nM [31], что соответствует аффинности комплексов GCaMP-белков с Ca^{2+} ($K_d = 100-400$ nM) [32, 33]. Сопоставление сигналов GCaMP6f и Fura-2 показало, что ни в одной клетке, продемонстрировавшей изменения флуоресценции GCaMP6f, не происходило изменений рэйшио-метрического сигнала Fura-2 (данные не показаны).

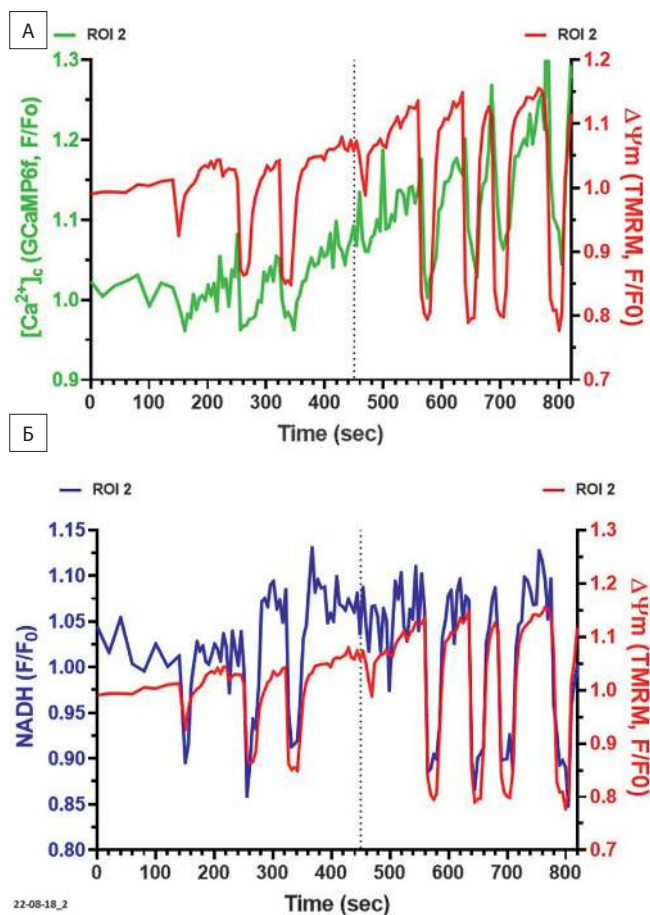


Рис. 6. Изменения трансмембранного потенциала внутренней мембраны митохондрий ($\Delta\Psi_m$), концентрации Ca^{2+} в цитозоле ($[Ca^{2+}]_c$) и уровня эндогенного NADH в первичной нейроглиальной культуре из мозга трансгенной мыши. Изменения $[Ca^{2+}]_c$ (А, зеленая кривая, левая шкала ординат) регистрировали, как сказано в подписи к рисунку 4. Изменения $\Delta\Psi_m$ регистрировали с помощью TMRM (правые шкалы ординат), как описано на рисунке 4. Снижение флуоресценции TMRM в данном протоколе соответствует увеличению $\Delta\Psi_m$ (см. в тексте). Изменения уровня NADH (Б, синяя кривая, левая шкала ординат) измеряли по интенсивности эндогенной флуоресценции, возбуждаемой при 360 нм и регистрируемой при 450 нм. Концентрацию TMRM (20 нМ) во всех буферных растворах подбирали таким образом, чтобы при увеличении $\Delta\Psi_m$ и захвате зонда митохондриями происходило концентрационно-зависимое самотушение флуоресценции TMRM в матриксе митохондрий [22].

Fig. 6. Changes in the transmembrane potential of the mitochondrial inner membrane ($\Delta\Psi_m$), Ca^{2+} concentration in the cytosol ($[Ca^{2+}]_c$) and endogenous NADH level in the primary neuroglial culture from the brain of a transgenic mouse. Changes in $[Ca^{2+}]_c$ (upper panel, green curve, left ordinate scale) were recorded as indicated in the caption to Fig.4. Changes in $\Delta\Psi_m$ were recorded using TMRM (right ordinate scales) as described in Fig. 4. The decrease in TMRM fluorescence in this protocol corresponds to an increase in $\Delta\Psi_m$ (see text). Changes in the level of NADH (lower panel, blue curve, left ordinate) were measured by the intensity of endogenous fluorescence excited at 360 nm and recorded at 450 nm. The concentration of TMRM (20 nM) in all buffer solution was chosen so that with an increase in $\Delta\Psi_m$ and capture of the probe by mitochondria, concentration-dependent self-quenching of TMRM fluorescence in the mitochondrial matrix occurred [22].

Из этого следует, что синхронные осцилляции $\Delta\Psi_m$ и $[Ca^{2+}]_c$ вызваны, по крайней мере отчасти, колебаниями рН цитозоля.

Обсуждение

При ишемии и инсульте мозга ключевая роль Glu, длительное действие которого приводит к чрезмерной активации глутаматных рецепторов ионотропного типа и последующему дисбалансу ионного гомеостаза, прежде всего Ca^{2+} , нарушению функций митохондрий, энергетическому коллапсу, окислительному стрессу и, в итоге, к гибели нейронов, не вызывают сомнения [2, 4, 34, 35]. Вместе с тем, появились данные, полученные на нейрональных культурах [36], и при исследованиях живого мозга, что в развитии глутаматной нейротоксичности критичны нарушения гомеостаза не только Ca^{2+} , но и одновалентных ионов Na^+ и K^+ [1, 33]). В этой связи представляются важными исследования Ca^{2+} гомеостаза на живом мозге трансгенных животных, экспрессирующих флуоресцентный сенсор ионов кальция GCaMP6f параллельно с исследованиями нейроглиальных культурах, полученных из животных той же линии.

В данной работе методом широкопольной оптической нейровизуализации (ШОН) выполнены измерения изменений $[Ca^{2+}]_c$ дорзальной поверхности коры больших полушарий у мышей, экспрессирующих GCaMP6f и подвергнутых фотоиндуцированной ишемии (ФИ) в участке сенсомоторной коры. Скачкообразное расширение области с повышенной $[Ca^{2+}]_c$ после завершения распространяющейся кортикальной деполяризации (РКД) подтверждает участие РКД в эскалации ишемического повреждения (рис. 2). Вклад глутамата, K^+ , Na^+ , воспалительных процессов и других причин в формирование области устойчивого повышения $[Ca^{2+}]_c$ через 1 сут после ФИ не может быть определен в данном дизайне исследования.

Динамика флуоресценции GCaMP6f показала, что сенсор сохраняется даже в очаге поражения в течение не менее недели. Хотя GCaMP6f синтезируется под нейрон-специфичным Thy-1 промотором, нельзя исключить того, что в какой-то степени сенсор экспрессируется или поглощается после гибели нейронов другими клетками, выжившими в очаге поражения или хотя бы сохранившими целостность клеточной мембраны. Поэтому даже при полной гибели нейронов в очаге некроза сохраняется флуоресценция GCaMP6f. Было обнаружено, что максимальный рост $[Ca^{2+}]_c$ приходится на 1-е сут после ФИ и, спустя 1 нед, восстанавливается в пенумбре (но не в очаге некроза) до уровня, предшествующего ФИ (рис. 1, А, Г). Диаметр очага

поражения, вычисленный на основании изображений ШОН статистически значимо коррелировал с диаметром зоны некроза, определенным классическим окрашиванием срезов мозга. Притом на 3 мин записи ШОН корреляция была высокой, а у 6/9 мышей значения, вычисленные двумя различными методами, практически совпали (рис. 1, Б, В). Это позволяет считать, что ШОН можно адекватно применять для определения размеров некротического очага при ФИ.

Конструктивные особенности оптической системы ШОН, позволяют наблюдать изменения в большом поле зрения, но с малым пространственным разрешением [9, 37]. Поэтому изменения интенсивности флуоресценции в каждом пикселе изображения представляют собой суммарные изменения $[Ca^{2+}]_c$ в группе нейронов, чьи индивидуальные ответы объединены общими сигналами в каждом пикселе. Поэтому нельзя утверждать, что на 1 д. ФИ высокую $[Ca^{2+}]_c$ имели все нейроны в области яркой флуоресценции. Это может объяснить, почему в большей части данной области к 7 д. ФИ произошел возврат $[Ca^{2+}]_c$ к уровню, предшествующему ФИ (рис. 1, 2). Стоит отметить, что размер области поражения по ШОН на 7 д превышал размеры некротического очага, определенного гистологически. Это может быть обусловлено тем, что часть нейронов пенумбры, дающих вклад в общий сигнал пикселя, восстановила $[Ca^{2+}]_c$ до исходного уровня, а другая часть нейронов сохранила высокую $[Ca^{2+}]_c$, соответствующую максимальному подъему на 1-е сут после ФИ. Степень возврата к исходному уровню и динамика этого процесса, определяется, в этом случае, соотношением нейронов, которые смогли удержать или восстановить низкую $[Ca^{2+}]_c$.

Основанием для такой интерпретации данных ШОН служат результаты, полученные методом эпифлуоресцентной микроскопии на нейроглиальных культурах, приготовленных из той же линии трансгенных мышей. В популяции клеток в поле наблюдения микроскопа, доля экспрессировавших GCaMP6f составляла ~20% (см. раздел «Методика»). Примерно в половине этих клеток развивался вторичный подъем $[Ca^{2+}]_c$, тогда как в остальных клетках, экспрессировавших GCaMP6f, ОКД не возникала (рис. 4).

При анализе изменений $[Ca^{2+}]_c$ следует учесть рН-чувствительность флуоресценции белковых сенсоров [25], включая белки, аналогичные GCaMP6f [21]. На рис. 5 видно, что одна из клеток смогла удерживать относительно низкий уровень $[Ca^{2+}]_i$ в течение действия Glu (рис. 5, А), тогда как в другой произошло развитие ОКД через 2 мин после добавления Glu (рис. 5, Б). Обращает внимание то, что изменения

pH_i во время действия Glu в обоих нейронах очень похожи. Это объясняется тем, что восстановление pH_i осуществляет Na^+/H^+ -обменник плазматической мембраны [38, 39], для работы которого требуется восстановление градиента концентрации Na^+ через плазматическую мембрану и электрического трансмембранного потенциала плазмалеммы. Оба эти параметра зависят от эффективности переноса ионов натрия и калия Na/K-АТФазой плазмалеммы, на работу которой затрачивается почти половина синтезируемого нейронами АТФ [15, 16]. Восстановление трансмембранного градиента концентрации Na^+ и потенциала плазмалеммы происходит значительно медленнее, чем восстановление $[Ca^{2+}]_i$ (рис. 5) из-за гораздо больших затрат АТФ Na/K-АТФазой, чем Ca^{2+} -АТФазой, которая способна функционировать при $[АТФ] = 0,01-0,1$ мМ [40]. Поэтому, вероятно, pH_i сохраняется на низком уровне (концентрация протонов в цитоплазме остается высокой) дольше, чем высокая $[Ca^{2+}]_i$.

Заслуживает упоминания то, что на 7-е сут после ФИ происходит не только восстановление физиологической $[Ca^{2+}]_c$ в большей части нейронов в пенумбре, но и восстановление функционального статуса клеток, о чем свидетельствует возобновление спонтанных флуктуаций $[Ca^{2+}]_c$. Спонтанные флуктуации $[Ca^{2+}]_c$ были обнаружены также примерно в 10% культивируемых нейронов, имевших GCaMP6f (рис. 6). Примечательно, что эти осцилляции прекращались после добавления экзогенного Glu (10 мкМ). Необходимо подчеркнуть, что осцилляции $[Ca^{2+}]_c$ происходили синхронно с изменениями митохондриального потенциала ($\Delta\Psi_m$). В отсутствие Glu и, соответственно, низкой ионной проводимости плазмалеммы, потенциал плазматической мембраны постоянен (около -60 мВ) и вытекания TMRM не происходит [22, 23]. В этих условиях снижение флуоресценции TMRM соответствуют увеличению $\Delta\Psi_m$ (рис. 6, А).

Природа флуктуаций $[Ca^{2+}]_c$ в коре головного мозга, обнаруженных методом ШОН и спонтанных флуктуаций $[Ca^{2+}]_i$ в нейроглиальной культуре, едва ли одинаковая, однако позволяет предположить, что флуктуации $[Ca^{2+}]_c$ в коре мозга могут зависеть от функциональной активности митохондрий [4].

Поскольку поддержание $\Delta\Psi_m$ определяется эффективностью работы цикла трикарбоновых кислот, прежде всего, количеством производимого NADH в матриксе митохондрий, мы проверили изменения уровня этого динуклеотида, регистрируя его флуоресценцию (рис. 6, Б). Оказалось, что флуоресценция

NADH колеблется синхронно, но в противофазе с изменениями $\Delta\Psi_m$ (падение флуоресценции TMRM на рис. 6 соответствует росту $\Delta\Psi_m$). Такие изменения NADH согласуются с каноническими представлениями о том, что для увеличения $\Delta\Psi_m$ необходимо ускорение работы ферментов дыхательной цепи митохондрий рост скорости дыхания и, соответственно, увеличение потребления NADH комплексом I дыхательной цепи.

Эти данные показывают, что для поддержания колебаний $[Ca^{2+}]_c$ важна не только концентрация Glu, но и локализация действия этого нейротрансмиттера [20, 33]. Участие митохондрий также необходимо для поддержания осцилляций $[Ca^{2+}]_c$ [4].

Заключение

Регистрация активности коры головного мозга методом ШОН позволила количественно охарактеризовать динамику развития распространяющейся кортикальной деполяризации после фотоиндуцированного инсульта, детектировать *in vivo* некротическое ядро и зону пенумбры, а также наблюдать процесс восстановления $[Ca^{2+}]_c$ в части коры больших полушарий у трансгенных мышей, экспрессирующих в нейронах GCaMP6f. Сочетание ШОН с использованием первичных нейроглиальных культур из коры головного мозга мышей той же линии позволило более корректно интерпретировать данные, полученные для живого мозга, в частности, учитывать pH-зависимость сигналов GCaMP6f. Обнаружено, что ~10% популяции культивируемых нейронов имеют спонтанные флуктуации $[Ca^{2+}]_c$, $\Delta\Psi_m$ и [NADH], которые прекращаются при добавлении Glu.

Благодарность. Авторы приносят благодарность А.Е. Згодовой и А.А. Некрасовой за помощь при приготовлении клеточных культур, а также И.Ю. Поповой за помощь в проведении гистологического окрашивания.

Литература

(п.п. 1-8; 10-14; 17-26; 28-40 см. References)

- Лизунова Н.В., Кислухина Е.Н., Сурин А.М. Перинатальный инсульт: модели и возможности нейровизуализации. *Российский педиатрический журнал*. 2022; 25(2): 128–38. <https://doi.org/10.46563/1560-9561-2022-25-2-128-138>
- Сурин А.М., Горбачева Л.Р., Савинкова И.Г., Шарипов Р.Р., Ходоров Б.И., Пинелис В.Г. Исследование изменений [АТФ] в цитозоле индивидуальных нейронов при развитии глутамат-индуцированной дисрегуляции кальциевого гомеостаза. *Биохимия*. 2014; 79(2): 196–208.
- Шарипов Р.Р., Красильникова И.А., Пинелис В.Г., Горбачева Л.Р., Сурин А.М. Исследование механизма сенситизации нейронов к повторному действию глутамата. *Биологические*

Мембраны. 2018; 35(5): 384–97. <https://doi.org/10.1134/S0233475518040138>

27. Сурин А.М., Горбачева Л.Р., Савинкова И.Г., Шарипов Р.Р., Пинелис В.Г. Изменения рН в матриксе митохондрий и цитозоле при индуцированной глутаматом дисрегуляции Ca²⁺-гомеостаза в культивируемых нейронах гиппокампа крысы. *Биологические Мембраны*. 2022; 39(4): 307–18. <https://doi.org/10.31857/S0233475522040089>
1. Andrew R.D., Farkas E., Hartings J.A., Brennan K.C., Herrerias O., Müller M., et al. Questioning Glutamate Excitotoxicity in Acute Brain Damage: The Importance of Spreading Depolarization. *Neurocritical Care*. 2022; 37(Suppl 1): 11–30. <https://doi.org/10.1007/s12028-021-01429-4>
2. Khodorov B. Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurones. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2004; 86(2): 279–351. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2003.10.002>
3. Campbell B.C. V., Silva D.A. De, Macleod M.R., Coutts S.B., Schwamm L.H., Davis S.M., et al. Ischaemic stroke. *Nature Reviews Disease Primers*. 2019; 5(1): 1–22. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0118-8>
4. Plotegher N., Filadi R., Pizzo P., Duchen M.R. Excitotoxicity revisited: mitochondria on the verge of a nervous breakdown. *Trends in Neurosciences*. 2021; 44(5): 342–51. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2021.01.001>
5. Broussard G.J., Liang R., Tian L. Monitoring activity in neural circuits with genetically encoded indicators. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2014; 7: 97. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00097>
6. Bregestovski P., Waseem T., Mukhtarov M. Genetically encoded optical sensors for monitoring of intracellular chloride and chloride-selective channels activity. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2009; 2: 15. <https://doi.org/10.3389/neuro.02.015.2009>
7. Vanni M.P., Murphy T.H. Mesoscale Transcranial Spontaneous Activity Mapping in GCaMP3 Transgenic Mice Reveals Extensive Reciprocal Connections between Areas of Somatomotor Cortex. *Journal of Neuroscience*. 2014; 34(48): 15931–46. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1818-14.2014>
8. West S.L., Aronson J.D., Popa L.S., Feller K.D., Carter R.E., Chiesl W.M., et al. Wide-Field Calcium Imaging of Dynamic Cortical Networks during Locomotion. *Cerebral Cortex*. 2022; 32(12): 2668–87. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhab373>
9. Lizunova N.V., Kislukhina E.N., Surin A.M. Perinatal stroke: modelling and the potential of neurovisualization. *Rossiyskiy Pediatricheskii Zhurnal (Russian Pediatric Journal)*. 2022; 25(2): 128–38. (In Russian). <https://doi.org/10.46563/1560-9561-2022-25-2-128-138>
10. Dana H., Chen T.W., Hu A., Shields B.C., Guo C., Looger L.L., et al. Thyl-GCaMP6 transgenic mice for neuronal population imaging in vivo. *PLoS ONE*. 2014; 9(9): e108697. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108697>
11. Ma Y., Shaik M.A., Kim S.H., Kozberg M.G., Thibodeaux D.N., Zhao H.T., et al. Wide-field optical mapping of neural activity and brain haemodynamics: considerations and novel approaches. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2016; 371(1705): 20150360. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0360>
12. Galkov M., Gulyaev M., Kiseleva E., Andreev-Andrievskiy A., Gorbacheva L. Methods for detection of brain injury after photothrombosis-induced ischemia in mice: Characteristics and new aspects of their application. *Journal of Neuroscience Methods*. 2020; 329: 108457. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2019.108457>
13. Krasil'nikova I., Surin A., Sorokina E., Fisenko A., Boyarkin D., Balyasin M., et al. Insulin Protects Cortical Neurons Against Glutamate Excitotoxicity. *Frontiers in Neuroscience*. 2019; 13. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01027>
14. Bakaeva Z., Lizunova N., Tarzhanov I., Boyarkin D., Petrichuk S., Pinelis V., et al. Lipopolysaccharide From *E. coli* Increases Glutamate-Induced Disturbances of Calcium Homeostasis, the Functional State of Mitochondria, and the Death of Cultured Cortical Neurons. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2022; 14: 347. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.811171>
15. Surin A.M., Gorbacheva L.R., Savinkova I.G., Sharipov R.R., Khodorov B.I., Pinelis V.G. Study on ATP concentration changes in cytosol of individual cultured neurons during glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis. *Biochemistry Moscow* 2014; 79: 146–57. <https://doi.org/10.1134/S0006297914020084>
16. Sharipov R.R., Krasilnikova I.A., Pinelis V.G., Gorbacheva L.R., Surin, A.M. Study of the Mechanism of the Neuron Sensitization to the Repeated Glutamate Challenge. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*. 2018; 12: 369-81. <https://doi.org/10.1134/S1990747818050057>
17. Ding S., Wang T., Cui W., Haydon P.G. Photothrombosis ischemia stimulates as sustained astrocytic Ca²⁺ signaling in vivo. *GLIA*. 2009; 57(7): 767–76. <https://doi.org/10.1002/glia.20804>
18. Zhao H.T., Tuohy M.C., Chow D., Kozberg M.G., Kim S.H., Shaik M.A., et al. Neurovascular dynamics of repeated cortical spreading depolarizations after acute brain injury. *Cell Reports*. 2021; 37(1): 109794. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109794>
19. Pietrobon D., Moskowitz M.A. Chaos and commotion in the wake of cortical spreading depression and spreading depolarizations. *Nature Reviews Neuroscience*. 2014; 15(6): 379–393. <https://doi.org/10.1038/nrn3770>
20. Andrew R.D., Hartings J.A., Ayata C., Brennan K.C., Dawson-Scully K.D., Farkas E., et al. The Critical Role of Spreading Depolarizations in Early Brain Injury: Consensus and Contention. *Neurocritical Care*. 2022; 37(Suppl 1): 83–101. <https://doi.org/10.1007/s12028-021-01431-w>
21. Akerboom J., Rivera J.D.V., Rodríguez Guilbe M.M., Malavé E.C.A., Hernandez H.H., et al. Crystal structures of the GCaMP calcium sensor reveal the mechanism of fluorescence signal change and aid rational design. *Journal of Biological Chemistry*. 2009; 284(10): 6455–64. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807657200>
22. Duchen M.R., Surin A., Jacobson J. Imaging mitochondrial function in intact cells. *Methods in Enzymology*. 2003; 361: 353–89. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(03\)61019-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(03)61019-0)
23. Ward M.W., Rego A.C., Frenguelli B.G., Nicholls D.G. Mitochondrial membrane potential and glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *Journal of Neuroscience*. 2000; 20(19): 7208–19. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-19-07208.2000>
24. Guang Jian Wang, Randall R.D., Thayer S.A. Glutamate-induced intracellular acidification of cultured hippocampal neurons demonstrates altered energy metabolism resulting from Ca²⁺ loads. *Journal of Neurophysiology*. 1994; 72(6): 2563–9. <https://doi.org/10.1152/jn.1994.72.6.2563>
25. Chudakov D.M., Matz M. V., Lukyanov S., Lukyanov K.A. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiological Reviews*. 2010; 90(3): 1103–63. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2009>

26. Bolshakov A.P., Mikhailova M.M., Szabadkai G., Pinelis V.G., Brustovetsky N., Rizzuto R., et al. Measurements of mitochondrial pH in cultured cortical neurons clarify contribution of mitochondrial pore to the mechanism of glutamate-induced delayed Ca²⁺ deregulation. *Cell Calcium*. 2008; 43(6): 602–14. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2007.10.005>
27. Surin, A.M., Gorbacheva, L.R., Savinkova, I.G., Sharipov R.R., Pinelis V.G. pH Changes in the Mitochondrial Matrix and Cytosol under Glutamate Deregulation of Ca²⁺ Homeostasis in Cultured Rat Hippocampal Neurons. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A*. 2022; 16(3): 236–45. <https://doi.org/10.1134/S1990747822040079>
28. Kiedrowski L. N-methyl-D-aspartate excitotoxicity: Relationships among plasma membrane potential, Na⁺/Ca²⁺ exchange, mitochondrial Ca²⁺ overload, and cytoplasmic concentrations of Ca²⁺ H⁺ and K⁺. *Molecular Pharmacology*. 1999; 56(3): 619–632. <https://doi.org/10.1124/mol.56.3.619>
29. Denton R.M. Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. 2009; 1787(11): 1309–16. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.01.005>
30. Li D., Zheng W., Qu J.Y. Time-resolved spectroscopic imaging reveals the fundamentals of cellular NADH fluorescence. *Optics Letters*. 2008; 33(20): 2365. <https://doi.org/10.1364/ol.33.002365>
31. Grynkiwicz G., Poenie M., Tsien R.Y. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry*. 1985; 260(6): 3440–50. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)83641-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)83641-4)
32. Chen T.W., Wardill T.J., Sun Y., Pulver S.R., Renninger S.L., Baohan A., et al. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature*. 2013; 499(7458): 295–300. <https://doi.org/10.1038/nature12354>
33. Hinzman J.M., DiNapoli V.A., Mahoney E.J., Gerhardt G.A., Hartings J.A. Spreading depolarizations mediate excitotoxicity in the development of acute cortical lesions. *Experimental Neurology*. 2015; 267: 243–53. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.03.014>
34. Duchen M.R. Mitochondria, calcium-dependent neuronal death and neurodegenerative disease. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 2012; 464(1): 111–21. <https://doi.org/10.1007/s00424-012-1112-0>
35. Lai T.W., Zhang S., Wang Y.T. Excitotoxicity and stroke: Identifying novel targets for neuroprotection. *Progress in Neurobiology*. 2014; 115(C): 157–88. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.11.006>
36. Brittain M.K., Brustovetsky T., Sheets P.L., Brittain J.M., Khanna R., Cummins T.R., et al. Delayed calcium dysregulation in neurons requires both the NMDA receptor and the reverse Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Neurobiology of Disease*. 2012; 46(1): 109–17. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.12.051>
37. Nietz A.K., Popa L.S., Streng M.L., Carter R.E., Kodandaramaiah S.B., Ebner T.J. Wide-Field calcium imaging of neuronal network dynamics *in vivo*. *biology*. 2022; 11(11): 1601. <https://doi.org/10.3390/biology11111601>
38. Blaustein M.P., Lederer W.J. Sodium/calcium exchange: Its physiological implications. *Physiological Reviews*. 1999; 79(3): 763–854. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.3.763>
39. Raley-Susman K.M., Cragoe E.J., Sapolsky R.M., Kopito R.R. Regulation of intracellular pH in cultured hippocampal neurons by an amiloride-insensitive Na⁺/H⁺ exchanger. *Journal of Biological Chemistry*. 1991; 266(5): 2739–45. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)49907-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)49907-3)
40. Saris N.E.L., Carafoli E. A historical review of cellular calcium handling, with emphasis on mitochondria. *Biokhimiya*. 2005; 70(2): 231–9.

Сведения об авторах:

Кислухина Евгения Николаевна, лаборант-исследователь, лаб. нейробиологии и основ развития мозга ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России;

Лизунова Наталья Владимировна, аспирант биологического факультета, ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», мл. науч. сотр. лаб. нейробиологии и основ развития мозга ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России;

Лисина Оксана Юрьевна, науч. сотр., лаб. фундаментальных и прикладных проблем боли ФГБНУ НИИОПП;

Шарипов Ринат Рашидович, канд. биол. наук, науч. сотр., лаб. фундаментальных и прикладных проблем боли ФГБНУ НИИОПП;

Красильникова Ирина Александровна, науч. сотр., лаб. нейробиологии и основ развития мозга ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России;

Бакаева Занда Валериевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр., лаб. нейробиологии и основ развития мозга ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, доцент каф. медицины, общей биологии и физиологии ФГБОУ ВО «Калмыцкий государственный университет им. Б.Б. Городовикова»;

Пинелис Всеволод Григорьевич, доктор мед. наук, проф., гл. науч. сотр. лаб. нейробиологии и основ развития мозга ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России;

Сурин Александр Михайлович, доктор биол. наук, гл. науч. сотр. лаб. фундаментальных и прикладных проблем боли ФГБНУ НИИОПП, e-mail: surin_am@mail.ru