

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

На правах рукописи

Матлашов Михаил Егорович

**Молекулярные инструменты для модуляции редокс-статуса и
мониторинга активности нейронов.**

специальность – 03-01-03 – молекулярная биология

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Доктор биологических наук
Белоусов Всеволод Вадимович

Москва 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
ВВЕДЕНИЕ.....	4
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	7
1.1 Синаптическая передача электрического сигнала и её регуляция	
1.1.1 Молекулярные основы синаптической передачи	7
1.1.2 Синаптические структуры как самостоятельные клеточные компартменты.....	11
1.2 Регуляция pH в нейронах и его влияние на синаптическую проводимость	
1.2.1 Влияние электрической активности на pH в нейронах	12
1.2.2 Регуляция pH в мозге	15
1.2.3 Влияние цитоплазматического pH на синаптическую активность.....	17
1.3 Активные формы кислорода и их роль в функционировании нейронов	
1.3.1 Биология активных форм кислорода.....	19
1.3.2 Источники активных форм кислорода в нейронах.....	22
1.3.3 Антиоксидантные системы нейронов	29
1.3.4 Влияние активных форм кислорода на синаптическую активность нейронов	32
1.3.5 Участие активных форм кислорода в развитии нейродегенеративных заболеваний	35
1.4 Способы регистрации и модуляции метаболической и электрической активности в нейронах	
1.4.1 Способы мониторинга pH в нейронах	40
1.4.2 Детекция уровня активных форм кислорода в нейронах.....	44
1.4.3 Система для направленной продукции пероксида водорода	46
ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ	49
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	50
2.1 Материалы	
2.1.1 ДНК-Вектора.....	50
2.1.2 Реактивы и расходные материалы для клонирования	50
2.1.3 Оборудование и программное обеспечение для клонирования	50
2.1.4 Эукариотические клеточные линии, культуральные среды и расходные материалы	51
2.1.5 Оборудование для работы с клеточными линиями.....	51
2.1.6 Оборудование и програмное обеспечение для имаджинга.....	52
2.1.7 Использованные для имаджинга химические вещества	52
2.2 Методы	
2.2.1 Получение генетических конструкций	52

2.2.2	Культивирование и трансфекция клеточных линий HeLa и NIH/3T3	54
2.2.3	Выделение и трансфекция первичной эмбриональной культуры гипокампальных нейронов	54
2.2.4	Флуоресцентная микроскопия	56
2.2.5	Калибрование индикаторов по pH	56
2.2.6	Компьютерная обработка изображений.....	57
Результаты и обсуждение		59
3.1 Регистрация динамики pH в нейронах		
3.1.1	Разработка генетически кодируемого индикатора с повышенной яркостью в клетках....	59
3.1.2	Характеристика динамики значения цитоплазматического pH в диссоциированной культуре нейронов.	62
3.1.3	DPI вызывает закисление цитоплазмы нейронов	67
3.1.4	Получение синаптических конструкций с SynHer2	69
3.1.5	Экспрессия SynHer2 в короткоживущих срезах мозга мыши	72
3.2 Система для контролируемой локальной продукции пероксида водорода		
3.2.1	Оксидаза D-аминокислот может продуцировать пероксид водорода в ответ на добавление D-аланина к клеткам	74
3.2.2	Продукция пероксида водорода в нейронах.....	78
ВЫВОДЫ		82
ЗАКЛЮЧЕНИЕ		83
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ		86
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ		89

ВВЕДЕНИЕ

Достижения современных методов молекулярной биологии и флуоресцентной микроскопии сделали нейробиологию одной из самых быстроразвивающихся наук. Применение генетически кодируемых флуоресцентных индикаторов и методов оптогенетики делают возможным мониторинг и даже управление физиологическими процессами отдельных нейронов мозга, функционирующего в режиме реального времени. Несомненно, технология продолжает развиваться, и разработка новых молекулярных инструментов для регистрации и модуляции нейрональной активности востребована как в фундаментальных, так и в прикладных исследованиях.

Биохимические процессы, протекающие в нейронах, одновременно весьма сложны и интересны для изучения. Прямым следствием физиологической функции нейронов - генерации, обработки и передачи электрических сигналов - является высокая динамичность параметров внутриклеточной среды. В процессе генерации электрического сигнала внутриклеточная концентрация ионов Na^+ , K^+ , Ca^{2+} меняется на порядки, причём весь этот процесс занимает лишь несколько миллисекунд. В свою очередь, активация Na^+/K^+ , H^+ и Ca^{2+} АТФаз для поддержания ионных градиентов требует больших затрат энергии и ускорения процессов катаболизма. Поддержание баланса между процессами жизнедеятельности и функционирования нейронов требует наличия тонкой системы регуляции этих процессов.

Известно, что транспорт ионов Ca^{2+} и ускорение процессов катаболизма, сопровождающие повышенную электрическую активность, могут вызывать закисление цитоплазмы нейронов. Значение рН является одним из важнейших параметров внутренней среды клеток, так как оно влияет на структуру, активность и взаимодействие многих клеточных белков, следовательно, на эффективность протекания многих метаболических процессов, скорость ионного транспорта и др. Электрическая активность нейронов не является исключением. Так, проводимость NMDA рецепторов и потенциал-чувствительных кальциевых каналов подавляется подкислением цитоплазмы нейронов, транспорт нейромедиаторов в синаптические везикулы происходит по градиенту рН и т.д. Отсюда следует, что модуляция клеточного рН может являться одним из механизмов регуляции синаптической передачи нейронов.

Другим не менее важным параметром внутриклеточной среды является окислительно-восстановительный статус клетки. С тех пор, как было обнаружено, что клетки практически всех тканей животных организмов способны продуцировать активные формы кислорода и использовать их в регуляции важнейших клеточных процессов от дифферен-

цировки до клеточной гибели, изучение редокс-сигналинга стало одной из самых популярных направлений биологии передачи сигнала. Высокий интерес вызывает редокс-сигналинг в нейронах, поскольку, с одной стороны, есть данные, позволяющие говорить об участии аниона супероксида и пероксида водорода в регуляции синаптической передачи, а с другой стороны, активные формы кислорода, могут быть вовлечены в развитие нейродегенеративных заболеваний.

Таким образом, изучение параметров внутриклеточной среды является важной задачей для понимания основ функционирования нейронов и механизмов развития патологии. Однако эта задача осложняется тем, что нейроны обладают очень сложной морфологией: имеется тело, содержащие ядро клетки, и отростки - аксоны и дендриты, каждый из которых может дополнительно ветвиться. К тому же во многих основных типах нейронов, в том числе в пирамидальных нейронах гиппокампа, синаптические окончания дендритов находятся на особых выростах, называемых дендритными шипиками. Существует предположение, что за счёт частичной пространственной обособленности синаптических структур друг от друга и от основной части цитоплазмы, в синапсах может создаваться индивидуальное химическое микроокружение. Например, в дендритных шипиках могут происходить изменения концентрации ионов, которые не распространяются на остальную часть дендрита и др. За счёт этого возможно осуществление тонкой регуляции синаптической передачи на уровне отдельных синапсов.

Генетически кодируемые индикаторы, биосенсоры, позволяют исследовать различные биохимические процессы в индивидуальных компартментах живых клеток. В настоящий момент лишь очень немногие биосенсоры были успешно применены для исследования процессов, происходящих непосредственно в структурах, отвечающих за синаптическую передачу.

В 2006 году в нашей лаборатории был получен флуоресцентный индикатор уровня пероксида водорода в клетке - *HyPer*. Поскольку изучение редокс-регуляции синаптической передачи нейронов является весьма интересной и востребованной темой, первоначально перед нами стояла задача исследовать продукцию перекиси в нервных клетках с помощью *HyPer*. Однако случайно мы обнаружили несколько эффектов, связанных с изменением рН в электрически активной культуре нейронов. Значение внутриклеточного рН оказывает непосредственное влияние на физиологическую функцию нейронов, однако до сих пор не проводилась детальная количественная характеристика спонтанных рН колебаний в культуре нейронов и оценка их потенциального физиологического значения в мозге. В связи с этим, часть данной работы посвящена количественной и качественной характеристике динамики рН в теле и синаптических структурах в первичной культуре

нейронов.

Известно, что эффект пероксида водорода зависит не только от уровня продукции, но и от источника пероксида в клетке. Это особенно важно для нейронов, в которых некоторые клеточные структуры, в частности пре- и постсинаптические окончания, разделены значительными расстояниями. Наличие надёжного способа стимулировать локальную продукцию пероксида водорода в индивидуальных клеточных компартментах позволило бы более детально изучать редокс-сигналинг, в том числе влияние продукции пероксида в различных компартментах нейрона на эффективность синаптической передачи. Разработка генетически кодируемой системы контролируемой продукции пероксида водорода составила вторую часть данной работы.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Синаптическая передача электрического сигнала и её регуляция

1.1.1 Молекулярные основы синаптической передачи

Как известно [1,2], нейроны характеризуются способностью генерировать и проводить электрические сигналы. Это происходит благодаря особому набору белков, функционирование которых позволяет создавать на мембране нейронов электрический потенциал. Na^+/K^+ -АТРаза использует энергию гидролиза АТФ для переноса двух ионов K^+ внутрь клетки и трёх ионов Na^+ во внеклеточное пространство. За счёт работы Na/K -насоса внутриклеточные концентрации ионов Na^+ и K^+ составляют приблизительно 10 и 140 мМ, а внеклеточные - 145 и 5 мМ соответственно. При этом мембрана нейронов, непроницаемая для ионов Na^+ , остаётся полупроницаемой для ионов K^+ , которые движутся из клетки по градиенту концентрации, создавая на внутренней стороне мембраны отрицательный заряд. Потенциал, формирующийся за счёт разницы электрических зарядов снаружи и внутри клетки, называется потенциалом покоя и в клетках млекопитающих как правило составляет величину порядка -70 мВ. Его можно теоретически определить для каждого иона согласно уравнению Нернста (при температуре 25 °С):

$$E_x = \frac{58 \text{ mV}}{z} \log \frac{[X]_o}{[X]_i} \quad \text{Уравнение Нернста}$$

где z - заряд иона, $[X]_o$ и $[X]_i$ - внеклеточная и внутриклеточная концентрации иона, соответственно.

Мембранный потенциал может понижаться (гиперполяризация) или повышаться (деполяризация) под действием различных факторов. Как правило, генерация электрического сигнала в нейронах достигается за счёт открытия лиганд-зависимых и/или потенциал-зависимых Na^+ и Ca^{2+} каналов, что приводит к быстрому росту мембранного потенциала до +40 мВ. Этот потенциал, называемый потенциалом действия, способен распространяться от дендритов к аксонам нейронов и передаваться на другие нервные клетки.

Передача электрического сигнала между нейронами происходит посредством особых клеточных контактов - синапсов. Синапс образуют пресинаптическое окончание аксона одного нейрона, постсинаптическое окончание, находящееся на дендрите, иногда теле или аксоне второго нейрона, и разделяющее их пространство - синаптическая щель. Передача сигнала через синаптическую щель осуществляется путём выделения из преси-

наптического окончания химического вещества – нейромедиатора (химический синапс) или пассивного тока ионов (электрический синапс).

В электрическом синапсе передача сигнала осуществляется через плотные клеточные контакты без посредничества медиаторов. Вследствие этого, передача через такие синапсы производится без задержек, по возможности регуляции синаптической проводимости значительно ограничены [3].

В химических синапсах (Рисунок 1.1) потенциал действия вызывает открытие кальциевых каналов, что вызывает слияние синаптических везикул, содержащих Нейромедиатор, с мембраной пресинаптического окончания. Выделившийся в синаптическую щель нейромедиатор связывается с рецепторами постсинаптического окончания, что вызывает открытие (или закрытие) ионных каналов. Это, в свою очередь, приводит к деполяризации (Na^+ и Ca^{2+} каналы) или гиперполяризации (Cl^- каналы) постсинаптической мембраны нейрона. Деполяризация постсинаптической мембраны выше определённого порога приводит к активации потенциал-чувствительных Na^+ каналов и возникновению потенциала действия. Потенциал действия распространяется от дендритов к аксонам и, таким образом, электрический сигнал передаётся дальше по цепи нейронов.

На сегодняшний день известно около десятка различных нейромедиаторов. Каждый нейрон может синтезировать и выделять только определённый набор медиаторов. Эти вещества запасаются в синаптических пузырьках пресинаптических окончаний, куда они транспортируются белками-переносчиками в обмен на протон. Заполненные везикулы поступают в активную зону на синаптической мембране, где в нужный момент происходит выброс медиатора путём экзоцитоза, причём количество сливающихся везикул и, следовательно, высвобождаемого нейромедиатора напрямую зависит от количества поступающего в окончание Ca^{2+} . Нейромедиатор затем захватывается путём активного транспорта нейронами непосредственно или через глиальные клетки и используется повторно.

Каждому нейромедиатору соответствует несколько рецепторов, располагающихся на постсинаптической (часто и на пресинаптической) мембране, где они образуют гигантские комплексы - постсинаптическую плотность [4]. Нередко постсинаптические окончания находятся на выростах дендритов - так называемых дендритных шипиках [5].

Рецепторы нейромедиаторов делятся на два типа: ионотропные и метаботропные. Связывание лиганда с ионотропным рецептором вызывает открытие ионного канала, являющегося частью структуры рецептора. Так, глутамат, являющийся одним из самых распространённых нейромедиаторов в центральной нервной системе (ЦНС), связывается с каинатными, AMPA и NMDA рецепторами, активация которых вызывает вход ионов Na^+ и Ca^{2+} в клетку, что в свою очередь приводит к деполяризации постсинаптической мем-

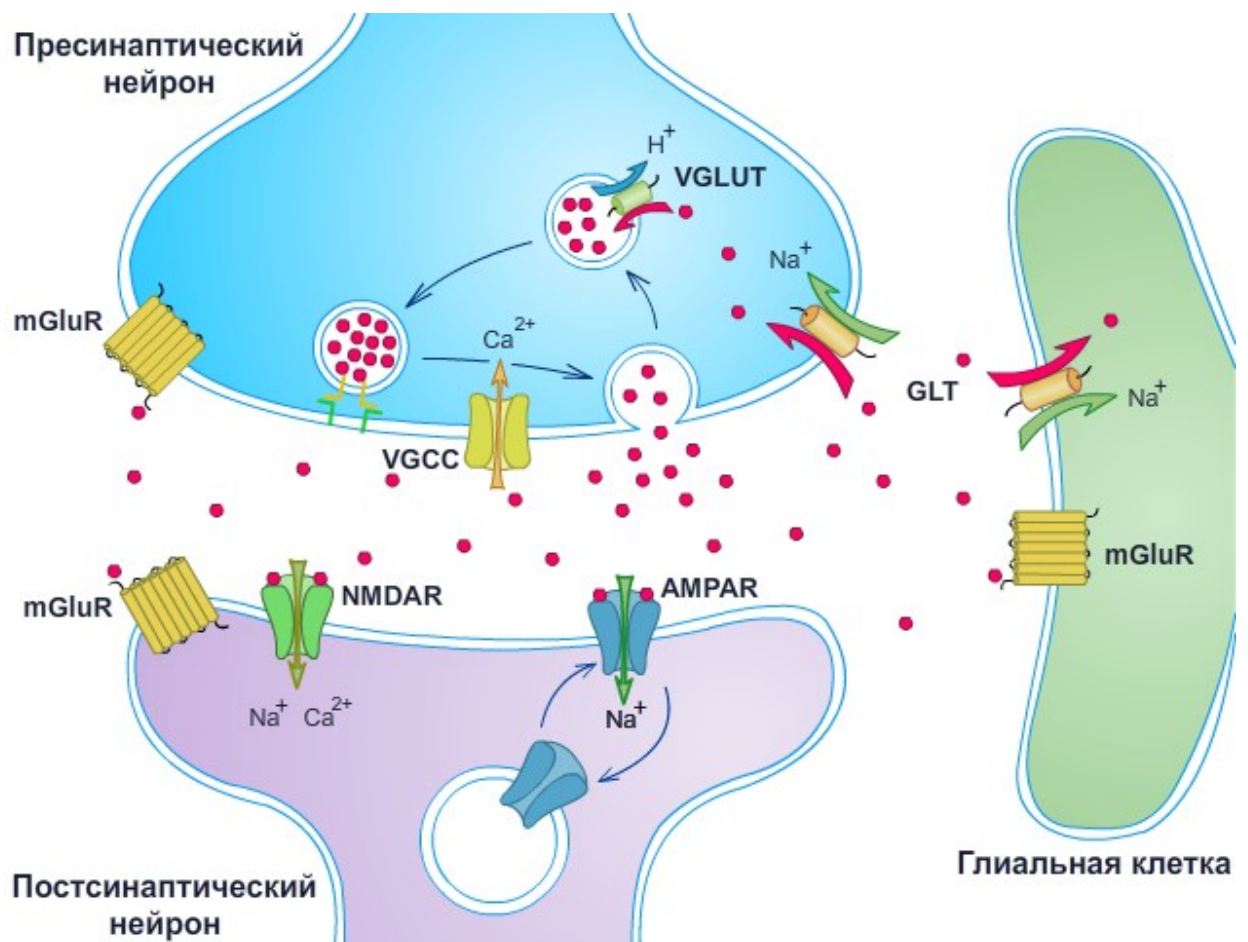


Рисунок 1.1 Синаптическая передача сигнала глутаматергическим нейроном. Потенциал действия в пресинаптическом окончании вызывает открытие кальциевых каналов, что приводит к высвобождению нейромедиатора в синаптическую щель. Связывание нейромедиатора с ионотропными AMPA и NMDA рецепторами активирует токи Na^+ и Ca^{2+} , вызывает деполяризацию постсинаптической мембраны и активацию потенциала. Нейромедиатор захватывается переносчиками на мембране пресинаптического нейрона и глиальных клеток для повторного использования. Активация метаботропных и NMDA рецепторов запускает сигнальные каскады, отвечающие за долговременное усиление или подавление синаптической передачи. NMDAR и AMPAR - NMDA и AMPA рецепторы, mGluR - метаботропные глутаматные рецепторы, VGCC - потенциал-чувствительные кальциевые каналы, GLT, VGLUT - глутаматные транспортеры. Приведено из [6] с изменениями.

браны. Ионотропные рецепторы глицина и γ -аминомасляной кислоты (ГАМК) пропускают ионы Cl^- , что, как правило, вызывает гиперполяризацию мембраны и затрудняет возбуждение потенциала действия. Активация ионотропных рецепторов вызывает быстрые, но недолговечные изменения мембранного потенциала

Однако глутамат, ГАМК и некоторые другие медиаторы могут также связываться с метаботропными рецепторами, которые могут вызывать более долговременные изменения синаптической проводимости через вторичные посредники. Как правило, эти рецепторы обладают тирозин киназной активностью или ассоциированы с G-белками, и могут оказывать как стимулирующее, так и подавляющее действие на синаптическую проводимость.

Активация некоторых глутаматных метаботропных рецепторов активирует продукцию инозитол 1,4,5-трифосфата и диацилглицерола, что приводит к увеличению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} и активации протеинкиназы С; активация последней в постсинаптическом окончании приводит к включению интернализированных AMPA-рецепторов в мембрану, что увеличивает синаптическую проводимость [7]. Активация других глутаматных и ГАМК метаботропных рецепторов приводит к подавлению активности протеинкиназы А. Этот фермент фосфорилирует K^+ -каналы что приводит к их закрытию; подавление же его активности увеличивает проницаемость мембраны для ионов K^+ и уменьшает синаптическую проводимость [8].

Помимо изменения активности или локализации ионных каналов, активация ионотропных и метаботропных рецепторов в определённых условиях может приводить к долговременным изменениям проводимости синапсов, сохраняющихся в течение нескольких дней и даже месяцев [9]. Так, например, многократная стимуляция нейронов поля СА1 гиппокампа непродолжительными высокочастотными электрическими импульсами приводит к развитию долговременного увеличения амплитуды постсинаптического потенциала [10]. Активация NMDA и метаботропных глутаматных рецепторов приводит к увеличению концентрации кальция в синапсе и активации кальмодулин-зависимой киназы СаМКII и РКС. СаМКII фосфорилирует AMPA-рецепторы и другие синаптические белки, приводя к увеличению проницаемости отдельного синапса. Активация СаМКII, РКС и других киназ активирует синтез белка, клеточный транспорт и другие процессы, что приводит к росту постсинаптической плотности за счёт накопления каналов и регуляторных белков и закрепляет увеличение синаптической проводимости.

Таким образом, синаптическая передача, особенно в химическом синапсе, - сложный процесс, который может регулироваться на многих уровнях. Проводимость синапса может изменяться как за счёт изменения количества высвобождаемого из пресинаптического окончания медиатора, так и за счёт изменения количества или активности ионных каналов постсинаптической мембраны. Это может происходить за счёт активации сигнальных каскадов в клетке, что приводит к долговременным изменениям синаптической проводимости.

Помимо этого, возможна модуляция активности нейронов, вызываемая изменениями параметров внутриклеточной среды: внутриклеточной концентрации АТР, Ca^{2+} , рН и редокс-статуса цитоплазмы и др. Эти параметры могут влиять на активность каналов, транспортёров медиатора, взаимодействие белков и на активность регуляторных белков - киназ и фосфатаз, контролирующих синаптическую проводимость [11–13]. Возникает во-

прос, могут ли изменения внутриклеточных параметров происходить локально и осуществлять модуляцию отдельных синапсов.

1.1.2 Синаптические структуры как самостоятельные клеточные компартменты

Постсинаптические окончания глутаматергических синапсов, как правило, образуются в специализированных клеточных органеллах, называемых дендритными шипиками, при этом одна такая структура может содержать лишь один синапс [14]. Морфологически шипик представляет собой головку размером менее микрометра, отделённую от дендрита тонкой ножкой [15]. Головка содержит постсинаптическую плотность, которая представляет из себя сложный комплекс ионных каналов, регуляторных ферментов и адаптерных белков. Тонкая шейка ограничивает возможность диффузии веществ в и из шипика, таким образом изолируя биохимическое окружение постсинаптической плотности от цитоплазмы дендрита.

Так, анализ динамики кальция в дендритных шипиках нейронов поля CA1 гиппокампа показал, что в случае единичного акта передачи сигнала, Ca^{2+} удаляется из постсинаптического окончания раньше, чем он успевает попасть в цитоплазму дендрита. В результате высокочастотной стимуляции в дендритном шипике может происходить независимое от соседних синапсов накопление Ca^{2+} , что вызывает локальную активацию регуляторных протеинкиназ и является ключевым фактором в некоторых моделях развития долговременной потенциации [16].

Не менее интересная ситуация наблюдается в пресинаптических окончаниях с концентрацией важнейшего источника энергии - АТФ. Процессы поддержания мембранного потенциала, накопление и высвобождение нейромедиатора, рециркуляция синаптических везикул, работа регуляторных систем - всё это требует значительных расходов энергии. Логично, что повышенные затраты АТФ привело к тому, что пресинаптические окончания заполнены ферментами гликолиза и митохондриями [11]. Что интересно, роль гликолитических ферментов и митохондрий в обеспечении синаптических процессов различается. Так, было обнаружено, что ферменты гликолиза - глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа и фосфоглицерат-киназа, активность которых приводит к образованию АТФ, находятся в связанном состоянии с синаптическими везикулами, и ингибирование гликолиза приводит прежде всего к нарушению транспорта нейромедиатора в синаптические везикулы [17]. Митохондрии же участвуют в активации резервного пула синаптических везикул посредством увеличения продукции сАМР [11,18].

Таким образом, за счёт структурной организации белковых комплексов и органелл в пре- и постсинаптических окончаниях, в них образуется особое биохимическое микро-

окружение. Это делает возможным протекание локальных сигнальных процессов в отдельных синапсах. К молекулам- локальным модуляторам синаптической активности могут относиться ионы [5,19], циклические нуклеотиды [20], глюкоза [21], АТФ [22], активные формы кислорода [23] и др.

Как в пре-, так и в постсинаптическом окончании осуществляются процессы, способные вызывать повышение или понижение внутриклеточной концентрации H^+ , то есть вызывать закисление или защелачивание цитоплазмы [13,24,25]. Значение внутриклеточного рН влияет на взаимодействие и активность многих клеточных белков, следовательно может влиять и на синаптическую передачу. В связи с этим интересно рассмотреть подробнее регуляцию рН в нейронах и его влияние на электрическую активность.

1.2 Регуляция рН в нейронах и его влияние на синаптическую проводимость

Отрицательный десятичный логарифм концентрации протонов, рН, является одним из важнейших биохимических показателей. В реакциях обмена веществ часто происходит выделение или поглощение H^+ . Также транспорт веществ через цитоплазматическую мембрану нередко сопряжён с перемещением протона в или из клетки. Это тем более заметно в нейронах, которые характеризуются как активным ионным транспортом, так и высоким уровнем метаболизма.

Значение внутриклеточного рН может влиять на протекание многих клеточных процессов. Некоторые аминокислотные остатки - гистидин, цистеин и др., могут существовать в протонированной или депротонированной формах в зависимости от рН. Нередко такие остатки находятся в активных центрах белков или в участках их взаимодействия с другими белками. В связи с этим, клетках, в том числе и в нервных, существуют системы для регулирования внутриклеточного рН. Тем не менее, высокая электрическая активность нейронов может вызывать значительные сдвиги рН, что играть как регуляторную роль, так и вызывать нарушения функции нейронов.

1.2.1 Влияние электрической активности на рН в нейронах

Известно, что рН в нейронах является в большой степени динамичной величиной. Так, нейроны, выделенные из новорождённых крысят, отличались между собой по значениям внутриклеточного рН. Используя химический флуоресцентный индикатор SNARF было показано, часть нейронов обладала рН в среднем около 6.7, а другие обладали более щелочным рН, около 7.3 [26], была показана корреляция этих значений с активностью в клетке систем регуляции рН.

О том, что нейрональная электрическая активность может вызывать закисление цитоплазмы, свидетельствуют многие данные. Так, деполяризация мембраны нейронов, вызванная добавлением в клеточную среду активатора глутаматных рецепторов NMDA [24,27], повышением концентрации K^+ [25,28], а также электрической стимуляцией [29]. Сдвиги внутриклеточного рН в сторону кислых значений в нейронах чаще всего связывают транспортом Ca^{2+} и аккумуляцией продуктов метаболизма (Рисунок 1.2).

Как известно, электрическая активность нейронов ассоциирована с повышением внутриклеточной концентрации кальция, поскольку открываются потенциал-чувствительные кальциевые каналы, активируются NMDA и рианодиновые рецепторы и др. Транспорт кальция из цитоплазмы во внеклеточное пространство и клеточные органеллы осуществляется посредством активного транспорта АТРазами и Na^+/Ca^{2+} обменниками. В ряде работ причину закисления цитоплазмы связывали с активацией системы кальциевых насосов, о чём говорит подавление вызванного NMDA закисления ионами Ln^{3+} , VO_4^{3-} , Cd^{2+} и Ni^{2+} , ингибирующими АТР-зависимый транспорт ионов Ca^{2+} [24,30]. Инъекции $CaCl_2$ в нейроны улитки также вызывало падение рН [31]. На мышечных клетках было показано, что как Ca^{2+} -АТРаза плазматической мембраны (PMCA), так и саркоплазматического ретикулума (SERCA) могут обменивать ион Ca^{2+} в зависимости от различных факторов, в том числе на один-три протона [32,33]. Существуют также данные об участии митохондрии в Ca^{2+} -зависимом закислении в нейронах спинального ганглия крысы, хотя механизм этого явления не совсем понятен [34].

Поддержание работы Ca^{2+} -, Na^+/K^+ -АТРаза и других процессов, обуславливающих синаптическую передачу, требует значительных затрат энергии. Активации метаболизма глюкозы, вызванная интенсивной нейрональной активностью, также может приводить к закислению. То, что высокочастотная стимуляция синаптической передачи вызывает активацию процессов катаболизма, было подтверждено экспериментально [22]. В исследованиях на гиппокампальных нейронах в срезах мозга было обнаружено индуцируемое химическими агентами (NMDA, K^+) стимуляцией Ca^{2+} -независимое закисление на 0,1 - 0,2 единицы рН, и подавляемое на 2/3 заменой глюкозы на пируват [25]. Действительно, в процессе гликолиза, окисление одной молекулы гликолиза происходит с выделением двух протонов [35]. В другой работе на культивируемых гиппокампальных нейронах было показано, что вызванное глутаматом закисление подавляется ингибитором гликолиза - дезоксиглюкозой - и частично разобщителями протонного градиента митохондрий, на основании чего был сделан вывод о падении значения рН было вызвано накоплением органических кислот - продуктов метаболизма [36].

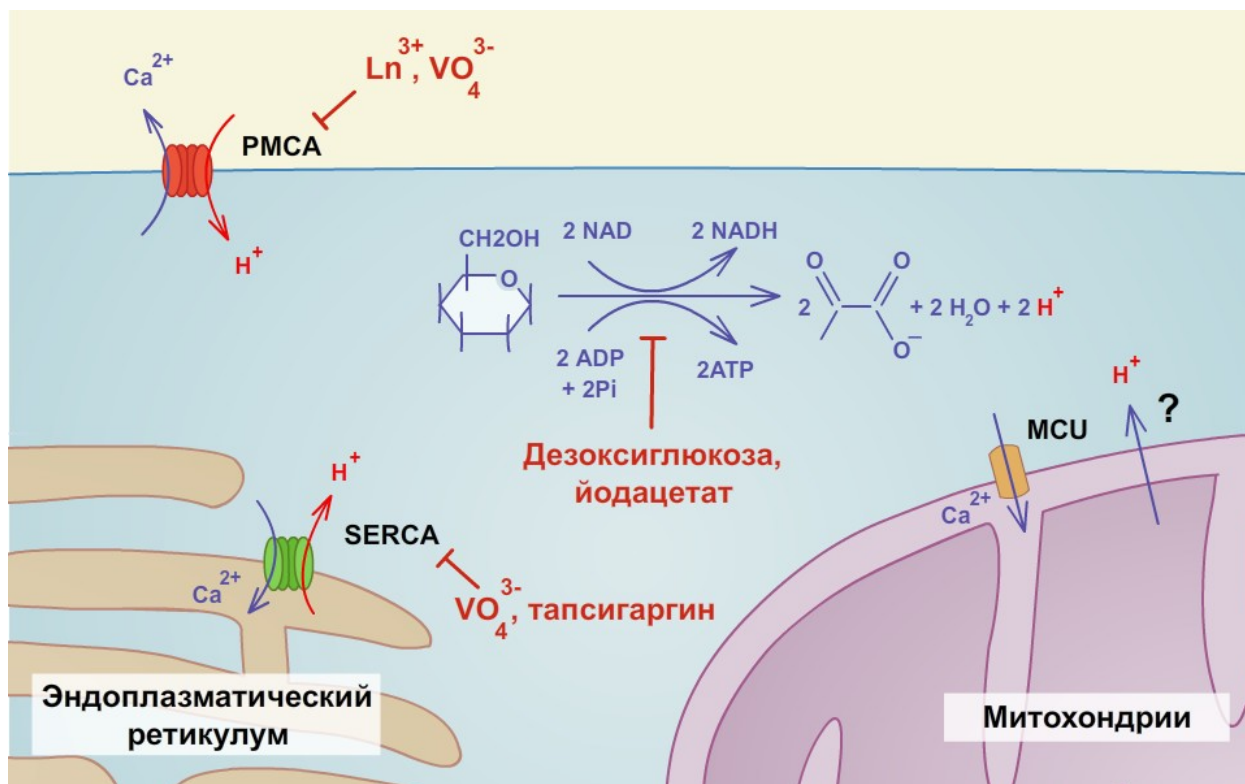


Рисунок 1.2 Возможные механизмы закисления, ассоциированного с нейрональной активностью. Активация электрической активности нейронов связана с повышением концентрации внутриклеточного кальция, а также с активацией катаболических процессов. Кальциевые АТФазы плазматической мембраны (PMCA) и эндоплазматического ретикулума (SERCA) производят обмен ионов Ca^{2+} на H^+ . Увеличение потребления АТФ приводит к активации гликолиза, в ходе которого окисление молекулы глюкозы сопровождается выделением двух протонов. В некоторых случаях закисление может быть связано с Ca^{2+} транспортом и разобщением протонного градиента в митохондриях, механизм до конца не известен. Указаны некоторые наиболее часто применяемые ингибиторы АТФаз и гликолиза. По [13] с дополнениями.

Имеются и такие данные, что вызванная K^+ деполяризация нейронов мозжечка вызывала сначала защелачивание цитоплазмы, затем сменяющееся закислением по Ca^{2+} -зависимому механизму [37].

Существуют и другие механизмы вызванных нейрональной активностью кислотно-основных сдвигов цитоплазматического рН. Так, например, в некоторых условиях источником закисления служили ГАМК-рецепторы, активация которых вызывала сдвиг внутриклеточного рН в сторону кислых значений, что объяснялось проницаемостью каналов для ионов HCO_3^- [38]. Стимуляция нейронов активаторами метаболитических глутаматных рецепторов 1-го типа также вызывало небольшое закисление [39], механизм которого до конца не выяснен.

Кроме того, V-АТФаза, отвечающая за создание необходимого для погрузки нейромедиатора протонного градиента на мембране синаптических везикул, может вызывать защелачивание цитоплазмы пресинаптических окончаний [40].

Таким образом, хотя имеются различные мнения по поводу механизмов, в целом было многие исследователи сходятся во мнении, что электрическая активность нейронов может приводить к значительному падению внутриклеточного рН. Впрочем, такие различные оценки источников закисления в нейронах могли быть вызваны недостатками инструментов измерения рН и низкой специфичностью ингибиторов. Так, химический флуоресцентный индикатор рН BCECF способен ингибировать Ca^{2+} -АТФазу плазматической мембраны [41], а используемый в качестве ингибитора Са-АТФаз ванадат (VO_4^{3-}) влияет и на митохондриальный кальциевый обмен [42]. К тому же результаты, по-видимому, сильно зависят от способа стимуляции (деполяризация КСl и глутаматом или электрическая) и от модели (возраст и тип нейронов, диссоциированная культура или срезы мозга и др.).

1.2.2 Регуляция рН в мозге

Регуляция рН - важный процесс, осуществляемая всеми тканями организма. Механизмы, которые регулируют H^+ во внутриклеточном и внеклеточном пространстве особенно важны в мозге, поскольку электрическая активность может сопровождаться быстрыми изменениями рН с обеих сторон мембраны [13]. Закисление или защелачивание, в свою очередь, может изменить активности различных ионных каналов, таким образом влияя на генерацию и проводимость электрического сигнала. Как и в других тканях, механизмы, отвечающие за регуляцию внутриклеточного рН в мозге, осуществляются за счёт пассивных или Na^+ -зависимых токов ионов H^+ , Na^+ , Cl^- , и HCO_3^- [13]. При этом экспрессия и активность различных рН-регулирующих белков зависят от типов нейронов и выполняемых ими функций.

Na^+/H^+ -обменники (NHE)

Белки семейства Na^+/H^+ -обменников были обнаружены в нейронах и глиальных клетках многих отделах мозга и представлены, по крайней мере, семью изоформами [43,44], которые различаются по своей клеточной локализации и чувствительностью к блокаторам - производным амилорида. Их основная функция, по-видимому, поддержание внутриклеточного рН и приведение его к нормальным значениям после закисления, например, во время эпилептических припадков [45,46]. Некоторые изоформы вовлечены в регуляцию клеточного объёма [47].

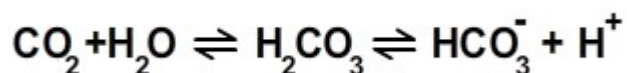
Имеются интересные данные о влиянии активности Na^+/H^+ -обменников на формирование ЛТР. Было показано, что добавление к культурам срезов гиппокампа крыс ингибитора NHE широкого действия EIPA увеличивало устойчивость долговременной потенциации, развивающейся под действием высокочастотной стимуляции [44].

Относительно недавно были получены результаты в первичной культуре гиппокампальных нейронов, инкубация которых с 20 мкМ бикикуллина, ингибитора ГАМК-рецепторов и стимулятора спонтанной электрической активности, в течение 48 часов приводила к увеличению количества NHE5 на поверхности мембраны. Индукция LTP путём инкубации с 200 мкМ глицина в присутствии ТТХ и бикикуллина в течение 3х минут приводила к транслокации NHE5 на вершину дендритных шипиков. Выключение с помощью shRNA экспрессии NHE5 приводило к увеличению плотности дендритных шипиков, а также небольшому увеличению их диаметра, в том числе после стимуляции глицином, этот эффект подавлялся инкубацией клеток с помощью ингибитора NMDA-рецепторов D-AP5 [48].

Таким образом, Na^+/H^+ -обменники являются не только регуляторами pH в нейронах, но также могут быть вовлечены в регуляцию электрической передачи в отдельных синапсах.

Na-зависимый транспорт HCO_3^-

Анион бикарбоната HCO_3^- является важнейшим клеточным буфером pH [49] благодаря устанавливаемому в клетке равновесию:



Ферменты карбонангидразы способствует скорейшему установлению данного равновесия, в связи с чем они способствуют локализации сдвигов pH в присутствии ионов бикарбоната [50].

$\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ котранспортеры и Na^+ -зависимые $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ обменники были обнаружены во многих отделах ЦНС и обеспечивают нормализацию pH в клетках после закисления [51]. На мышинной модели хронического ацидоза было продемонстрировано увеличение экспрессии $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ котранспортера, значительная часть которого локализовалась с белками постсинаптической плотности [52].

В работе на выделенных синаптических окончаниях - синаптосомах - было показано, что ни базовое значение pH, ни его восстановление после закисления не зависели от присутствия в среде HCO_3^- [53].

Впрочем, более недавняя работа показала, что Na^+ -зависимый $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ обменник локализуется в пресинаптических окончаниях нейронов и регулирует выброс нейромедиатора [54]. Кроме того, мыши, нокаутированные по гену *Slc4a8*, кодирующему обменник, были более менее подвержены эпилептическим припадкам.

Другие регуляторы pH

В нейронах существуют также и Na^+ -независимые $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ обменники. Их работа

приводит к закислению клетки и функция таких обменников, по-видимому, заключается в защите клетки от защелачивания [55].

Также относительно недавно в клетках млекопитающих были обнаружены потенциал-чувствительные протонные каналы H^+ , активируемые при деполяризации клеточной мембраны и играющие большую роль в компенсации заряда во время окислительного взрыва в иммунных клетках [56]. В нейронах беспозвоночных были обнаружены H^+ -каналы, которые могут участвовать в защите клеток от закисления, однако в нейронах позвоночных об участии H^+ -канала в регуляции pH пока можно судить лишь по косвенным данным [57].

1.2.3 Влияние цитоплазматического pH на синаптическую активность.

Активность многих белков, участвующих в синаптической передаче сигнала, зависит от внутриклеточного значения pH. К таким белкам относятся NMDA и ГАМК рецепторы, потенциал-чувствительные Ca^{2+} -каналы и рианодиновые рецепторы и др. (Рисунок 1.3). Поскольку модуляция передачи сигнала может осуществляться как пре-, так и пост синаптически, рассмотрим отдельно процессы, происходящие в этих компартментах.

Пресинаптическое окончание

Существуют данные, что нарушение регуляции pH в нейронах нарушало выброс глутамата из пресинаптического окончания [54]. Этому может быть три объяснения, хотя вполне вероятно, что все указанные ниже процессы вносят вклад. Транспорт нейромедиаторов в синаптические везикулы происходит против градиента концентрации протонов, следовательно закисление цитоплазмы может напрямую нарушать созревание синаптических везикул [58]. Кроме того, увеличение концентрации кальция, необходимое для слияния синаптических везикул с клеточной мембраной, также является pH-зависимым, поскольку протоны могут связываться с порой потенциал-чувствительных кальциевых каналов, понижая их проводимость [59]. Рианодиновые рецепторы и рецепторы инозитолтрифосфата, через которые осуществляется высвобождение кальция из эндоплазматического ретикулума, также обнаруживают сильную pH-чувствительность [60,61].

Постсинаптическое окончание

В постсинаптических окончаниях всё обстоит не так понятно. Известна высокая pH-чувствительность NMDA-рецепторов к внеклеточному и внутриклеточному pH [62], при этом подкисление внеклеточной среды ингибирует активность NMDA рецепторов, а внутриклеточное - активирует. Это тем более интересно, поскольку продолжительную активацию NMDA-рецепторов считают одним из основных факторов, вызывающих гибель нейронов во время ишемии [63]. Кроме того, активность Na^+/Ca^{2+} обменников регулирует-

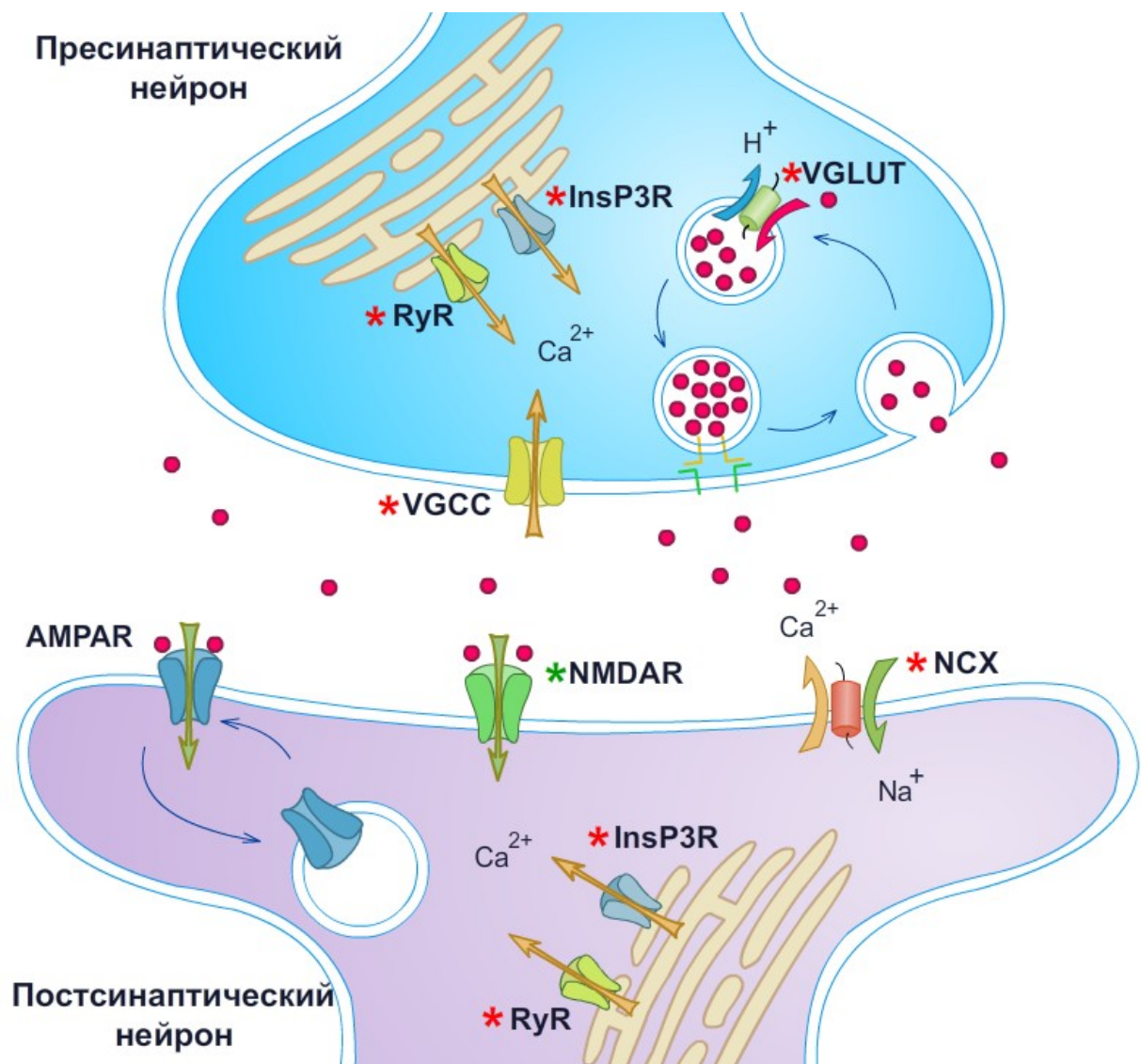


Рисунок 1.3 Влияние цитоплазматического рН на передачу сигнала в глутаматергическом синапсе. Красная звёздочка указывает белки, активация которых подавляется внутриклеточным падением рН, зелёная указывает на увеличение эффективности активации. В пресинаптическом окончании закисление цитоплазмы приводит к ингибированию протон-зависимого транспорта нейромедиатора в синаптические везикулы; а также к понижению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} через подавление активности кальциевых каналов, что приводит к уменьшению эффективности слияния синаптических везикул с мембраной. В постсинаптическом окончании активация NMDA-рецепторов и ингибирование Na^{2+}/Ca^{2+} -обменника может приводить к увеличению внутриклеточной концентрации кальция, что может способствовать развитию долговременной потенциации. NMDAR и AMPAR - NMDA и AMPA рецепторы, VGCC - потенциал-чувствительные кальциевые каналы, VGLUT - везикулярные глутаматные транспортеры, RyR-рианодиновые рецепторы, InsP3R - рецепторы инозитолтрифосфата, NCX - Na^{2+}/Ca^{2+} - обменники. На основании [58] с дополнениями.

ся рН, что влияет на внутриклеточную концентрацию кальция [64]. Есть данные о том, что ингибирование Na^{+}/H^{+} -обменников стимулирует развитие долговременной потенциации в постсинаптических окончаниях и увеличение объёма дендритных шипиков [44,48]. По-видимому, в постсинаптическом окончании закисление внутриклеточного значения рН

может осуществлять положительную долговременную регуляцию синаптической передачи, а в пресинаптическом - отрицательную кратковременную регуляцию.

Таким образом, значение рН не только модулируется нейрональной активностью, но и может влиять на синаптическую передачу, причём на разных уровнях и в отдельных клеточных компартментах (Рисунок 1.3).

Помимо кислотно-основного статуса клетки не менее важным показателем внутриклеточной среды является окислительно-восстановительный статус клетки. Окислительно-восстановительные пары клетки - $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, NAD^+/NADH , GSH/GSSG - участвуют в регуляции многих клеточных процессов. Другие важные молекулы - активные формы кислорода - долгое время считались вредными продуктами работы дыхательной цепи и других окислительно-восстановительных реакций, однако последние десятилетия активно изучается регуляторная роль этих молекул, в том числе и в нервной системе.

1.3 Активные формы кислорода и их роль в функционировании нейронов

Одними из самых интересных молекул, способных играть функцию модуляторов физиологической активности клеток, считаются активные формы кислорода. Эти соединения являются в высшей степени реакционноспособными окислителями, способными повреждать клеточные структуры. В то же время, практически все клетки организма производят некоторые из них, супероксид-анион и пероксид водорода, и используют их в регуляции многих клеточных процессов. Приведём общие сведения о АФК, их регуляторных эффектах, а также их роли в патологии.

1.3.1 Биология активных форм кислорода

Активные формы кислорода (АФК) являются продуктами неполного восстановления кислорода, которое в норме происходит во всех клетках организма. АФК включают в себя нейтральные молекулы, например пероксид водорода (H_2O_2), ионы (супероксид-анион O_2^-) или радикалы (гидроксил-радикал, $\text{OH}\cdot$). Все активные формы кислорода характеризуются наличием неспаренных электронов или нестабильных химических связей. В высоких концентрациях АФК взаимодействуют с белками, липидами, углеводами и нуклеиновыми кислотами, часто вызывая необратимое повреждение молекул. Благодаря своей нестабильности, АФК могут легко превращаться из одних форм в другие [65] (Рисунок 1.4).

Активные формы кислорода образуются как побочный продукт функционирования

дыхательной цепи митохондрий [66], ферментами NADPH-оксидазами [63], ксантин-оксидазой [67], ферментами эндоплазматического ретикулума [68] и др. Как правило, в результате реакции одноэлектронного восстановления молекулы кислорода образуется супероксид-анион. Это заряженная молекула, которая не может диффундировать через клеточные мембраны и обладает коротким временем жизни в клетке, поскольку спонтанно или каталитически (под действием фермента супероксид дисмутазы) превращается в пероксид водорода. Пероксид водорода обладает большей стабильностью и может диффундировать через клеточные мембраны [69]. При взаимодействии супероксида с оксидом азота (NO) образуется очень сильный окислитель пероксинитрит (ONOO^-). Пероксид водорода, в свою очередь, может участвовать в реакциях, катализируемых пероксидазой, приводящих к образованию хлорноватистой кислоты (HClO), синглетного кислорода ($^1\text{O}_2$) и других АФК. Наконец, в результате реакции Габера-Вейса, катализируемой катионами железа, супероксид анион и пероксид водорода могут превращаться в чрезвычайно реакционноспособные гидроксил радикалы [70].

АФК обладают высокой токсичностью, поскольку они способны окислять клеточные биомолекулы, что может приводить к нарушению функционирования клеточных процессов, образованию белковых агрегатов [71], нарушению экспрессии генов [72] и др. В связи с этим, в клетках существуют системы антиоксидантов, которые отвечают за эффективную нейтрализацию свободных АФК, а также по возможности восстановление окисленных молекул. К такой системе, в частности, относятся фермент супероксиддисмутаза (SOD), катализирующая превращение аниона супероксида в пероксид водорода, каталаза и глутатионпероксидаза, вызывающие разрушение H_2O_2 с образованием молекул воды и кислорода, и др. [73,74].

Роли окислительных повреждений тканей организма под действием активных форм кислорода в различных заболеваниях посвящено много работ. Показано губительное участие АФК в развитии сосудистых, аутоиммунных и нервных заболеваниях [65,75]. В частности, повышение продукции кислородных радикалов и повышенное окислительное повреждение клеточных структур было показано у больных болезнью Альцгеймера и Паркинсона [76,77], а также больных шизофренией [78].

В то же время активные формы кислорода могут выполнять важные функции в организме: защита от патогенов, регуляция клеточных процессов, а также участие в биохимических реакциях. Исследование функционального значения образования АФК в организме началось с обнаружения в нейтрофилах фермента NADPH оксидазы (NOX), вырабатывающего кислородные радикалы для защиты организма от патогенов [79]. Позднее

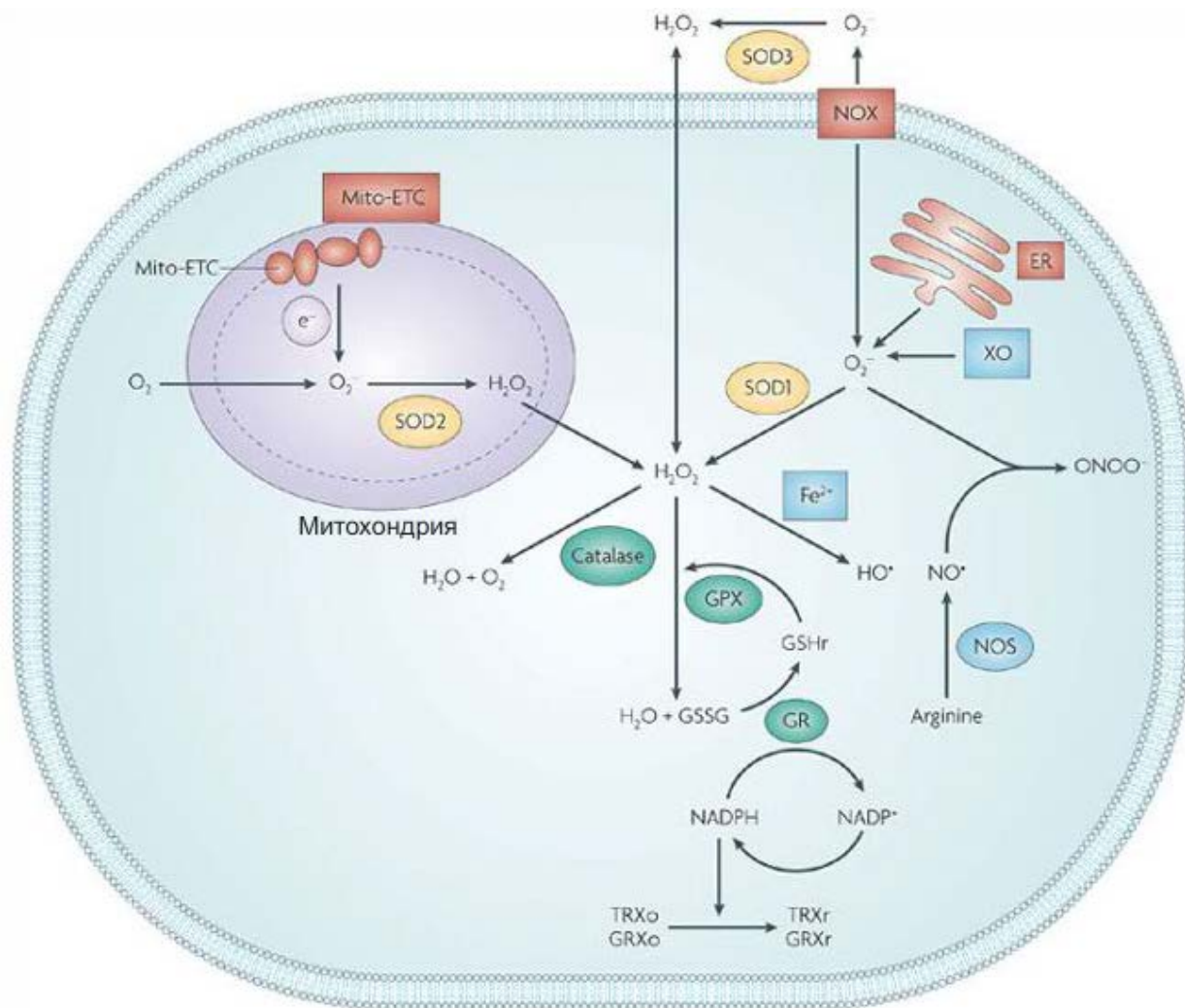


Рисунок 1.4 *Производство и превращения активных форм кислорода в клетке. Указаны основные участники производства и превращений активных форм кислорода, включая ферменты антиоксидантной системы клетки. ER-эндоплазматический ретикулум, GPX - глутатионпероксидаза, GR - глутатионредуктаза, GRXr, GRXo - восстановленный и окисленный глутаредоксин, GSHr, GSSG - восстановленный и окисленный глутатион, Mito-ETC - дыхательная цепь митохондрий, SOD - супероксиддисмутаза, TRXr, TRXo - восстановленный и окисленный тиоредоксин, XO- ксантиноксидаза. Приведено из [80].*

этот фермент и его изоформы были обнаружены и в других тканях, и появились данные, свидетельствующие в пользу участия АФК в регуляции клеточного сигналинга и метаболизма [73,81]. На сегодняшний день показано участие АФК в регуляции клеточного деления, дифференцировки, клеточной подвижности и других процессов [65,82].

В последнее время активно изучается физиологическая роль пероксида водорода в качестве сигнальной молекулы, поскольку, в отличие от заряженного супероксид-аниона, эта молекула способна диффундировать сквозь клеточные мембраны и обладает большим временем жизни, т.е. способна действовать не только локально, но и на некотором рас-

стоянии от места продукции. Одним из механизмов физиологического действия пероксида водорода является окисление цистеинового остатка, находящегося в активном центре тирозинфосфатаз – важнейших регуляторов рецепции PDGF, EGF, инсулинового сигналинга и др. Имеются также сведения о способности H_2O_2 непосредственно активировать тирозиновые киназы [73,82].

1.3.2 Источники активных форм кислорода в нейронах

Активные формы кислорода выделяются в процессе многих окислительно-восстановительных реакций в клетке. Одним из главных источников АФК являются ферменты дыхательной цепи митохондрий [66]. Не менее важными вырабатывающими пероксид ферментами являются моноамин оксидаза и NO-синтаза. Особого внимания заслуживает фермент NADPH-оксидаза, способная специфически вырабатывать пероксид водорода при воздействии внешних сигналов [83]. Какой из этих и других источников вносит основной вклад в регуляцию синаптической активности до сих пор остаётся невыясненным.

Митохондрии

Продукция активных форм кислорода в митохондриях неразрывно связана с процессами окислительного фосфорилирования. В нескольких участках в дыхательной цепи электроны могут напрямую взаимодействовать с кислородом с образованием свободных радикалов [84]. Продукции активных форм кислорода в митохондриях приписывают возрастные нарушения ДНК, причём митохондриальная ДНК более подвержена окислительным повреждениям [85]. Для защиты клеточных и митохондриальных структур от супероксида, в митохондриях экспрессируются супероксиддисмутаза SOD2.

Поскольку мозг является крайне метаболически активным органом, в процессе окислительного фосфорилирования в митохондриях нейронов образуется значительное количество супероксида, больше, чем во многих других тканях [23]. Действительно, в многочисленных исследованиях была показана роль вырабатываемых в митохондриях АФК при старении и в различных нейропатологиях [86,87]. На мышах было показано, что применение митохондриальных органических антиоксидантов задерживало накопление окислительных повреждений в мозге [88].

Наличие митохондрий в синаптических окончаниях позволяет предполагать о возможности регуляции митохондриальными АФК синаптической передачи [11]. Было показано, что уровень продукции пероксида в митохондриях нейронов может увеличиваться в ответ на электрическую стимуляцию и вход кальция клетки, при этом наблюдалось фосфорилирование регуляторных ферментов - РКА и CaMKII, подавляемое добавлением антиоксидантов [89]. В то же время, исследования на мышах, обладающих повышенной экс-

прессией митохондриальной супероксиддисмутазы SOD2 и, следовательно, пониженной продукцией супероксида, не выявили никаких дефектов в обучении и памяти [87]. Следует отметить, что это исследование не вносит ясности в роль митохондриальной перекиси водорода, поскольку SOD2 не снижает уровень вырабатываемой перекиси. В другом исследовании путём ингибиторного анализа было показано, что именно митохондриальный пероксид способен взаимодействовать с АТР-чувствительными K^+ -каналами, регулируя выброс дофамина в нейронах полосатого тела [66].

Также было показано, митохондриальные АФК увеличивают эффективность ГАМК-опосредованной передачи сигнала в клетках мозжечка путём увеличения концентрации ГАМК-рецепторов на постсинаптическом окончании за счёт передислокации каналов, обладающих определённой субъединицей, которое подавлялось ингибитором комплекса III антимицином А [90].

Моноаминоксидаза

Другой источник АФК - фермент моноаминоксидаза (МАО) - располагается на внешней мембране митохондрий и осуществляет окислительное дезаминирование моноаминов, таких как дофамин, адреналин, серотонин и др., с выделением пероксида водорода. Экспрессия моноаминоксидазы в большом количестве обнаруживается в нейронах и глиальных клетках [91]. Мыши, нокаутированные по генам МАО, обнаруживали нарушение эмбрионального развития что, что, по-видимому, было связано с нарушением метаболизма нейроактивных моноаминов [92].

Было показано, что ингибиторы моноаминоксидазы подавляют окислительный стресс в дофаминергических нейронах [93], что может иметь большое значение для терапии болезни Паркинсона. Есть также данные об подавлении ингибиторами МАО развития долговременной потенциации в серотонергических нейронах крысы [94], однако на мышиных моделях ингибирование МАО не оказывало значительного влияния на поведение животных [95].

NO-синтаза

NO-синтаза (NOS) – ещё один важный источник АФК в клетке, вырабатывающий оксид азота NO с использованием L-аргинина, NADPH и кислорода. В то же время, при определённых условиях *in-vitro* NOS способна производить супероксид анион, причём продукция АФК зависит от внутриклеточной концентрации кальция [96]. Кроме того, взаимодействие NO с супероксид анионом приводит к образованию пероксинитрила.

Известно три основных изоформы NO-синтазы млекопитающих, различающихся по тканеспецифичности и характеру экспрессии [97]. В нейронах существует две изофор-

мы: nNOS, постоянно экспрессируемая и локализуемая в постсинаптической плотности и активируемая повышением внутриклеточной концентрацией кальция [98], и индуцируемая iNOS, цитоплазматическая изоформа, транскрипция которой активируется в ответ на внешние стимулы, например, провоспалительные цитокины [99].

Есть данные об участии NOS в окислительном повреждении нейронов после ишемии [100]. В то же время, в нейронах NO участвует в активации cGMP синтазы, влияющей на работу некоторых ионных каналов, а также активирует CREB-зависимую экспрессию генов [101], а также, в силу способности диффундировать через клеточные мембраны, может выполнять роль нейромедиатора [102]. С помощью ингибиторного анализа на срезах мозга было показано, что NO является критически необходимой регуляторной молекулой, необходимой для индукции LTP [103].

Существуют также косвенные данные, свидетельствующие в пользу участия продуцируемого NO-синтазой супероксида в регуляции синаптической активности. Например, было показано, что в эндотелиальных клетках оверэкспрессия супероксиддисмутазы подавляет NOS-зависимую активацию MAP-киназного каскада [104]. Возможно, более тщательные исследования с использованием биосенсоров помогут внести ясность в механизм NOS-сигналинга в нейронах.

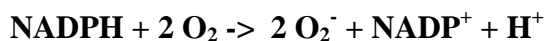
Ксантинооксидаза

Цитоплазматический металлопротеин ксантинооксидаза участвует в катаболизме пуринов, катализируя превращение гипоксантина в мочевую кислоту, при этом выделяется супероксид анион [105]. Известно, что ксантинооксидаза может вызывать окислительные повреждения мозга после ишемии [67], однако о возможности участия фермента в регуляции синаптической передачи мало известно. Тем не менее, система ксантин/ксантинооксидаза часто используется в качестве внешнего источника супероксида в экспериментах по изучению влияния АФК на синаптическую передачу [106].

NADPH оксидаза

За последние десятилетия учёные всё больше внимания уделяют мембранному ферменту NADPH оксидазе (NOX), главной функцией которой является синтез супероксид аниона. Первоначально этот фермент был открыт в нейтрофилах, однако его изоформы были позже обнаружены практически во всех тканях организма [107]. Этот фермент особенно интересен тем, что способен эффективно вырабатывать значительные количества супероксида в ответ на внешние стимулы [83]. В пользу участия NOX в регуляции синаптической передачи говорят исследования, показывающие локализацию NOX в синаптических окончаниях [108,109], а также функциональные исследования [110,111].

NADPH оксидаза – трансмембранный белковый комплекс, осуществляющий окисление NADPH и перенос электрона через мембрану клетки на кислород с образованием супероксид аниона.



Всего известно семь изоформ NOX, отличающихся различным распределением в тканях и клеточных компартментах, а также различными способами регуляции их активности и, по-видимому, выполняемыми функциями клетке [83]. Белки NOX1, NOX2, NOX3 и NOX5 продуцируют супероксид анион, который в последствии разлагается супероксид дисмутазой до пероксида, в то время как NOX4, Duox1 и Duox2 напрямую продуцируют пероксид водорода. Кроме того, хотя все белки семейства NOX располагаются на плазматической мембране, различные изоформы NOX могут также находиться на мембранах других органелл: в ядре, эндоплазматическом ретикулуме, митохондриях, фагосомах и др. Считается, что важнейшая функция ферментов семейства NOX является продукция АФК, посредством которых они обеспечивают защиту организма от патогенов, регулируют различные киназные каскады, активируют факторы транскрипции и системы транспорта ионов [112,113].

Первоначально NADPH оксидаза была открыта в макрофагах, с тех пор эта форма была хорошо охарактеризована. Она состоит из шести белков: две мембраносвязанные субъединицы: каталитическая (так называемая gp91phox или β-цепь цитохрома b-245, она же NOX2) и p22 phox, и четыре цитоплазматические: p40phox, p47phox и p67phox и гоGTPаза (обычно, Rac1 или Rac2) [114] (Рисунок 1.5).

Для активации NOX2 необходима сборка мембранных и цитоплазматических компонентов в комплекс на плазматической мембране. Порядок взаимодействия субъединиц до конца не выяснен. Было показано, что минимально для активации транспорта электронов в NOX необходимо её связывание с p67phox и Rac, однако присутствие p47phox значительно повышает сродство комплекса к NADPH. В активации белков NADPH оксидазы могут участвовать киназы, в том числе протеинкиназа C и Rac. Действительно, было продемонстрировано увеличение степени фосфорилирования субъединиц p40phox, p67phox и p47phox в стимулированных нейтрофилах [114]. Кроме того, p40phox и p47phox могут взаимодействовать с продуктами PI3-киназы, такими как PI(3,4)P₂ и PI(3,4,5)P₃, что может быть необходимо для их локализации на клеточной мембране [115].

При окислении NADPH электроны передаются сначала на FAD, затем на атомы железа в гемах и, наконец, на кислород. Доступность кислорода заметно влияет на скорость переноса электронов по цепи переносчиков [114]. При этом через клеточную мембрану переносится отрицательный заряд, что приводит к её деполяризации. С помощью

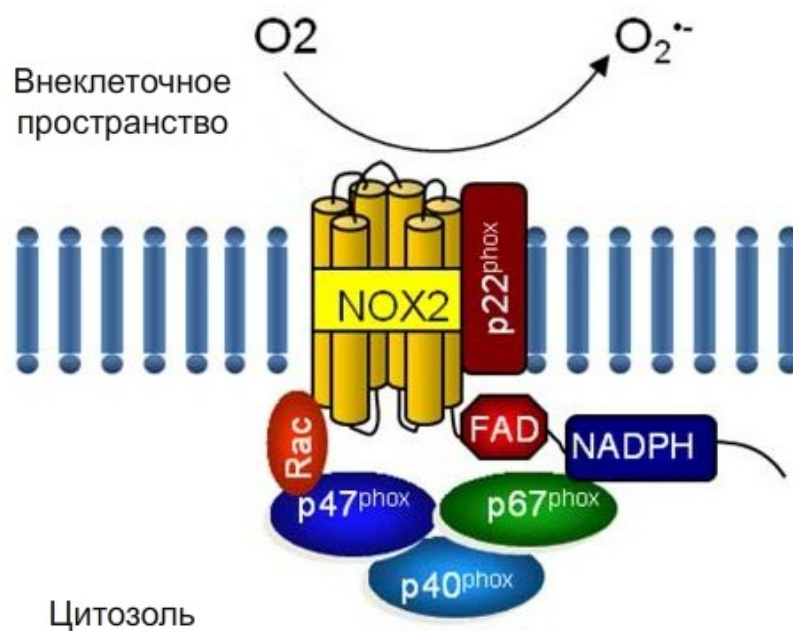


Рисунок 1.5 Структура комплекса NADPH-оксидазы на примере оксидазы макрофагов. Указана каталитическая субъединица, мембранная и цитоплазматические компоненты. NADPH связывается на цитоплазматической стороне комплекса, а выделение аниона супероксида происходит во внешнюю среду. Приведено из [116] с изменениями.

метода patch-clamp было обнаружено, что активация NADPH оксидазы в эозинофилах может приводить к росту мембранного потенциала до 100 mV [117]. Теоретически, вызываемая NOX деполяризация синаптической мембраны, если таковая действительно имеет место быть, должна повышать синаптическую активность нейронов.

Продукция АФК в нейронах долгое время считалась маловероятным событием из-за повышенной чувствительности нейронов к окислительным повреждениям. Тем не менее, с помощью антител была обнаружена экспрессия NOX2, NOX4 и других субъединиц NADPH оксидазы в гиппокампе, коре головного мозга, таламусе, миндалевидном теле и других структурах [118,119], а также NOX1 на уровне мРНК [83].

Также известно, что стимуляция срезов гиппокампа форболовыми эфирами вызывают транслокацию регуляторных субъединиц NOX в синаптические мембраны [109]. Срезы мозга мышей с нарушенной экспрессией NADPH оксидазы также обнаруживали нарушения формирования ранней формы LTP (обусловленной посттрансляционными модификациями белков), но не поздней формы (обусловленной экспрессией генов). У этих мышей наблюдались умеренные нарушения способности к обучению в водном тесте Морриса [111].

Как уже упоминалось выше, NADPH оксидаза может участвовать в клеточных регуляторных каскадах. Наиболее изученный механизм её действия - через окисление редокс-активных цистеинов в активном центре протеин-фосфатаз. Так, протеин тирозин

фосфатазы (РТР) регулируют степень фосфорилирования многих белков-участников сигнальных путей клетки, управляющих клеточной пролиферацией, дифференциацией, метаболизмом и т.д. Активные формы кислорода подавляют активность фосфатаз, повышая степень фосфорилирования тирозинов белков, таким образом влияя на активность различных сигнальных каскадов [120,121].

Помимо этого, активные формы кислорода, вырабатываемые NADPH оксидазой, могут напрямую активировать некоторые киназы. Так, тирозинкиназа Src содержит в своём составе редокс-чувствительные остатки цистеина [122]. Она активируется в гладкой мускулатуре сосудов в ответ на стимуляцию IGF и VEGF, предположительно, через NOX-зависимый механизм. Помимо SCR, другие тирозин киназы, например инсулиновый рецептор, EGF и VEGF рецепторы и др. могут подвергаться прямому окислению NOX [123].

NADPH оксидазы могут также напрямую регулировать активность мембранных и внутриклеточных ионных каналов. Было предположено, что продуцируемые NOX активные формы кислорода могут регулировать активность K^+ -каналов, мембранных и эндоплазматических Ca^{2+} -каналов. Так, в нейронах стимуляция ангиотензином II ведёт к повышению концентрации Ca^{2+} и понижению концентрации K^+ внутри клетки - процесс, в котором участвуют белки семейства NOX [124]. Активные формы кислорода могут увеличивать активность потенциал-чувствительных Ca^{2+} -каналов L-типа [125] и P/Q типа [126], однако механизм регуляции до сих пор не выяснен. Вероятно, в активации каналов играет роль окисление редокс-чувствительных аминокислот в составе канала. NOX также регулирует активность эндоплазматических Ca^{2+} -каналов, увеличивая активность рианодиновых рецепторов [127] и рецепторов инозитолтрифосфата [128].

Известно, что АФК участвуют в регуляции экспрессии генов, в том числе, отвечающих за экспрессию различных цитокинов. В клетке существуют редокс-зависимые сигнальные белки, такие как MAP-киназы [129], а также некоторые транскрипционные факторы [130], в регуляции которых могут участвовать NOX. Таким образом, NADPH оксидаза может контролировать процессы клеточной пролиферации, дифференцировки и клеточной гибели. Так, недавно было показано участие NOX в развитии эмбрионального головного мозга [131]. В клетках феохромоцитомы PC12 NOX1 негативно регулирует NGF-зависимый рост нейритов [132]. Кроме того, АФК стимулируют развитие предшественников нейронов, тем самым стимулируя нейрогенез во взрослом мозге [133].

Наконец, АФК, продуцируемые NOX, могут взаимодействовать с другими низкомолекулярными соединениями, такими как оксид азота, вторичного посредника и важного регулятора многих клеточных процессов [104,134,135]. Это, с одной стороны, приводит к снижению уровня NO в клетке, а с другой - приводит к образованию другого активного

соединения - пероксинитрила. Методом электронной микроскопии было показано, что NADPH оксидаза колокализуется с NMDA рецептором и NOS [108], и что, возможно, NO-синтаза участвует в NMDA-зависимой активации NOX.

На данный момент не существует специфического ингибитора NADPH оксидаз. Один из наиболее часто используемых - дифенилен йодониум (DPI), необратимо блокирует перенос электрона, ковалентно взаимодействуя с флавиновой группой NOX. DPI не обладает специфичностью к определённым изоформам NOX [136]. При этом, DPI также проявляет ингибирование NO синтазы, ксантин оксидазы и митохондриального комплекса I. DPI подавляет симптомы, ассоциированные с окислительными повреждениями тканей после реперфузии, а также снижает уровень ROS в нормальных тканях [112].

Другой популярный ингибитор - апоцинин. Апоцинин был описан как низкоаффинный ингибитор окислительного взрыва фагоцитов. Ингибирующее действие осуществляется посредством блокирования ассоциацию p47phox с мембранными субъединицами комплекса NADPH оксидазы. Поскольку некоторые изоформы NOX могут быть активированы не зависимо от присутствия p47phox, апоцинин по-разному влияет на активность различных изоформ NOX. Было показано, что наиболее эффективно апоцинин подавляет NOX2, в меньшей степени - NOX4 и NOX5. Кроме того, для перехода молекулы апоцинина в активную форму необходимо присутствие в клетках активности миелопероксидазы, поэтому его эффективность в различных тканях будет отличаться. Эффективность апоцинина в качестве ингибитора NOX в нервных клетках до конца не выяснена [83,137].

Сейчас разрабатываются новые, более специфичные ингибиторы NOX, такие как VAS2870 и VAS3947. Было показано, что ингибиторы VAS подавляют продукцию АФК в макрофагах в ответ на стимуляцию PMA, в PDGF-стимулированных клетках гладкомышечной мускулатуры, а также в мышинной модели ишемии/реперфузии и др. При этом, данные ингибиторы не блокируют активность других флавопротеинов, таких как NO-синтазы и ксантин оксидазы, и не являются антиоксидантами сами по себе [113].

Помимо этого, существуют мышинные линии с нокаутом по одной их изоформ NOX. Мыши с нокаутом NOX2 были получены в качестве модели болезни хронического грануломатоза [138]. Отсутствие NADPH-оксидазной активности сильно ухудшает способность иммунной системы сопротивляться патогенным организмам. Мыши с нокаутом по NOX1 обладали пониженным артериальным давлением и ослабленный ответ на ангиотензин-2. Нокаут NOX3 вызывает нарушения чувства равновесия и пространственной ориентации мышей [139]. Мышиные линии с нокаутом NOX4 не показали значительных

изменений фенотипа, однако обнаруживали значительно меньшие повреждения тканей после индукции ишемии [113].

Наконец, существует заболевание человека, хронический грануломатоз (CGD), связанное с нарушением работы NADPH оксидазы макрофагов. У больных CGD сильно ухудшена сопротивляемость организма ко многим патогенным организмам. Также, клинические данные свидетельствуют о повышенной встречаемости когнитивных нарушений среди больных CGD людей [140]. Также, было показано умеренное нарушение памяти, выявленное в некоторых тестах у мышей, нокаутированных по NOX2 и p47phox [111].

Глиальные клетки

Следует добавить, что, поскольку пероксид водорода, будучи незаряженной молекулой, может проходить сквозь клеточные мембраны, нельзя оставлять без внимания возможный вклад регуляцию синаптической активности АФК, генерируемых в клетках астроглии и микроглии, которыми окружены нейроны. Известно, что астроглия влияет на морфологию и активность синапсов, может регулировать передачу путём высвобождения дополнительных нейромедиаторов [141]. Вполне ожидаемо, что активация NADPH-оксидазы в астроцитах может приводить к повышению уровня пероксида водорода в синаптических окончаниях [142].

Кроме того, воспалительные процессы в мозге могут приводить к активации микроглии, что способствует генерации в них активных форм кислорода. Имеется много данных о роли глиальных АФК в качестве повреждающего фактора в нейродегенеративных заболеваниях [137,143]. Кроме того, есть предположение об участии NO-синтазы микроглии в подавлении LTP в мышинной модели болезни Альцгеймера [144].

1.3.3 Антиоксидантные системы нейронов

Для защиты клеток от окислительного стресса существует набор ферментов и биологических соединений, осуществляющий превращение активных форм кислорода в менее токсичные соединения, а также восстановление окисленных биомолекул, в частности остатков цистеина в белках (Рисунок 1.4).

Супероксиддисмутаза

Супероксиддисмутаза катализирует превращение двух молекул супероксид аниона и двух протонов в молекулу пероксида водорода и молекулярный кислород. Этот фермент широко распространён как у про-, так и у эукариот, поскольку супероксид анион часто образуется в окислительно-восстановительных каскадах с участием кислорода и обладает

чрезвычайно высокой токсичностью. У человека существует три изоформы SOD: цитоплазматическая, митохондриальная и экстраклеточная [145]. Эти ферменты существуют в виде ди- или тетрамеров; цитоплазматическая и экстраклеточная SOD содержат в активном центре ионы меди и цинка, митохондриальная - марганца.

Было показано, что экспрессия митохондриальной супероксиддисмутазы увеличивается в мозге при заболевании Альцгеймера [146], а делеция гена, кодирующего SOD, способствует развитию болезни [147]. Кроме того, митохондриальная супероксиддисмутаза играет важнейшую роль в защите нейронов от гибели после ишемии [148]. Похожие результаты были получены для мышей с делецией экстраклеточной супероксиддисмутазы [149]. Мыши с делецией цитоплазматической супероксиддисмутазы практически не отличались по фенотипу от мышей дикого типа, однако их двигательные нейроны хуже переживали механические повреждения [150].

В то же время, оверэкспрессия SOD1 приводила к некоторым расстройствам обучения и памяти у мышей [151], что показывает необходимость баланса АФК и антиоксидантов в клетках.

Каталаза

Не менее важным антиоксидантным ферментом является каталаза, которая находится в клеточных органеллах - пероксисомах. Каталаза участвует в реакции разложения двух молекул пероксида водорода с образованием воды и молекулярного кислорода [152]. Нейроны мозжечка мышей с оверэкспрессией каталазы были более устойчивы к ишемии [153].

Глутатионпероксидаза

Глутатионпероксидаза участвует в реакции восстановления пероксида водорода или органических перекисей с образованием воды или спирта соответственно. В качестве субстрата-восстановителя глутатионпероксидаза использует трипептид глутатион.



Окисленный глутатион затем восстанавливается ферментом глутатионредуктазой, использующей NADPH в качестве субстрата [154].

У человека обнаружено по крайней мере пять изоформ этого фермента, все содержат в активном центре остаток селеноцистеина. Глутатионпероксидазы участвуют в восстановлении в цитоплазматических и митохондриальных белков, некоторые изоформы защищают цитоплазматическую мембрану от окисления [155].

В мозге больных болезнью Паркинсона наблюдалась повышенная экспрессия глутатионпероксидаз [156], а оверэкспрессия глутатионпероксидазы 4 способствовала устойчивости мышечных нейронов к окислительному стрессу [155].

Пероксиредоксины

Ещё одним семейством ферментов, отвечающих за восстановление пероксида и органических перекисей, являются пероксиредоксины. Они локализованы в основном в цитоплазме, но присутствуют также в митохондриях, пероксисомах и других органеллах [157]. Пероксиредоксины имеют в активном центре один или два остатка цистеина, участвующих в акте катализа. Восстановление окисленных остатков происходит под действием фермента сульфиредоксина.

Активность пероксиредоксинов в клетке несколько ниже, чем активность каталаз и глутатионпероксидаз, однако интересная особенность пероксиредоксинов заключается в регулируемости их активности фосфорилированием, что даёт основание считать их потенциальными регуляторами перекисного сигналинга [158].

Показана неравномерность экспрессии пероксиредоксинов в мозге, причём очень низкий уровень экспрессии наблюдался в дофаминергических нейронах чёрного тела и пирамидальных нейронов гиппокампа - клеток, окислительное повреждение которых наблюдается во время болезни Паркинсона и Альцгеймера [159]. К тому же, оверэкспрессия различных изоформ пероксиредоксинов защищала нейроны от окислительного стресса после ишемии и реперфузии [160,161].

Тиоредоксины и глутаредоксины

Белки суперсемейства тиоредоксин-подобных белков - тиоредоксины и глутаредоксины - участвуют в реакциях восстановления дисульфидных связей в белках. Это осуществляется благодаря особому мотиву - два остатка цистеина, разделенных двумя аминокислотами - расположенному на поверхности белка. Тиоредоксины и глутаредоксины могут взаимодействовать с мономерными белками с внутримолекулярными S-S мостиками, димерными а также глутатионилированными белками. Кроме того, тиоредоксины способны восстанавливать нитрозилированные остатки цистеинов [162]. Окисленные остатки цистеина тиоредоксина восстанавливаются тиоредоксинредуктазой, использующей в качестве субстрата NADPH, а глутаредоксина - глутатионом без посредничества ферментов [163], хотя для восстановления глутатиона необходима глутатионредуктаза.

У человека известны цитоплазматическая и митохондриальная изоформы тиоредоксина и соответствующих тиоредоксинредуктаз, а так же цитоплазматическая и две митохондриальные формы глутаредоксинов. Существует также несколько гомологичных тиоредоксину и глутаредоксину белков, содержащих тот же каталитический домен [164], а также селенопротеиноксидоредуктаза, способная осуществлять восстановление как тиоредоксинов, так и глутатиона [165].

Конечно, глутаредоксины и тиоредоксины участвуют в защите нервных клеток от окислительного стресса [166,167].

Таким образом, антиоксидантные системы клетки чрезвычайно сложны и разнообразны, к тому же множество органических молекул, таких как витамины С и Е, карнозин и др., также могут регулировать редокс-статус клеток [168]. В мозге это системы в основном рассматриваются с точки зрения их защитного действия от окислительного стресса, однако остаются неясные моменты, например, почему дофаминергические нейроны чёрного тела более подвержены окислительному стрессу, или могут ли пероксиредоксины регулировать пероксидный сигналинг в нейронах. Дальнейшее изучение, вероятно, позволит ответить на эти вопросы.

1.3.4 Влияние активных форм кислорода на синаптическую активность нейронов

Данные о влиянии пероксида водорода и супероксид аниона на нейрональную активность нередко противоречивы. Как правило основными источниками "регуляторного" пероксида считают митохондрии или NADPH-оксидазы, поскольку продукция АФК в этих компартментах может происходить в ответ на внешние стимулы [89,90,108,124]. Исследования осложняются недостатком специфических ингибиторов продукции АФК в митохондриях и NOX, а также инструментов для её мониторинга. Кроме того, действие активных форм кислорода зависит от их концентрации и источника продукции в клетке, а также и от самой модели изучения.

Так, в гиппокампальным срезам крысы присутствие 20 мкМ пероксида водорода вызывало ингибирование развития долговременной потенциации при высокочастотной стимуляцией и стимулировало развитие долговременной депрессии при низкочастотной стимуляции. В то же время добавление 1 мкМ пероксида водорода подавляло развитие долговременной депрессии и значительно увеличивало развитие долговременной потенциации [12]. Авторы показали, что эффект 1 мкМ, но не 20 мкМ пероксида блокировался ингибитором потенциал-чувствительных кальциевых каналов, в то же время оба эффекта блокировались ингибиторами кальциневрина - кальций-зависимой фосфатазы, участие который было показано как в регуляции пресинаптического высвобождения нейромедиатора, так и в модуляции ионных каналов на постсинаптической мембране [169,170].

В других исследованиях на срезах гиппокампа было показано, что внесение 1-5 мкМ супероксида с помощью системы ксантин/ксантинооксидаза уже само по себе было достаточно для развития долговременной потенциации, при этом эффект ингибировался в присутствии каталазы. Было показано, что в срезах, инкубированных с ксантинооксидазой,

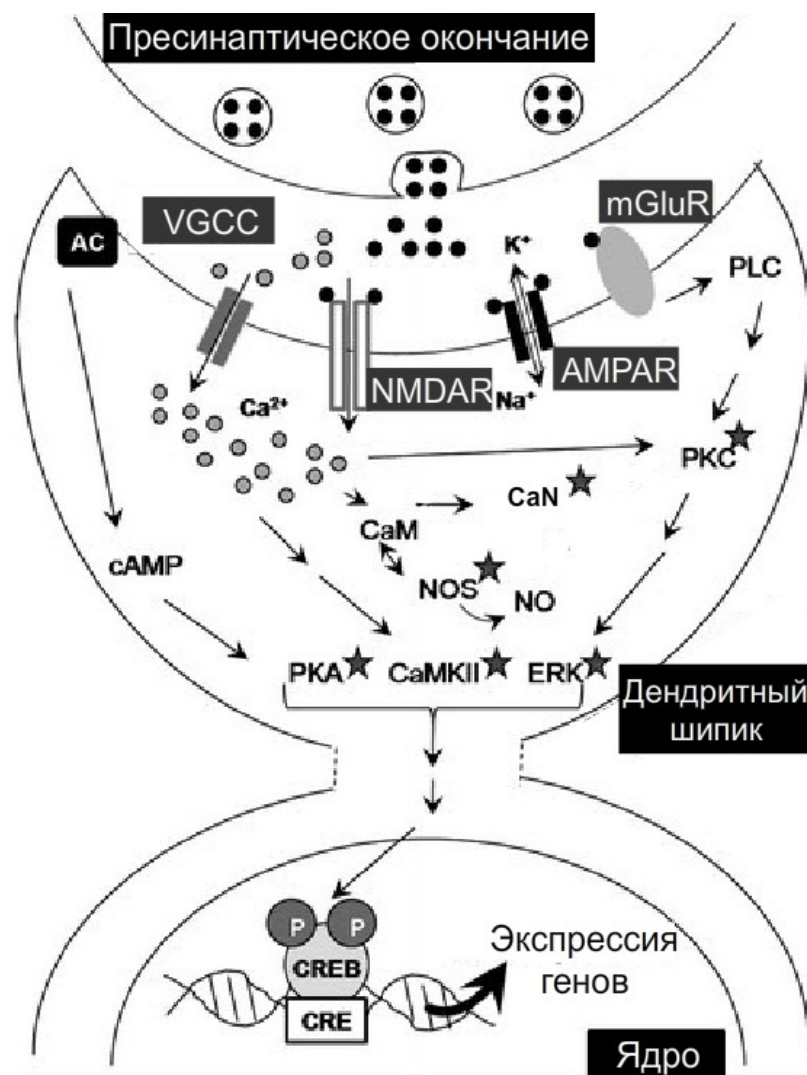


Рисунок 1.6 Редокс-регуляция передачи сигнала в глутаматергическом синапсе. Звёздочкой помечены регуляторные белки, активность которых модулируется активными формами кислорода. AC - аденилатциклаза, AMPAR - AMPA рецептор, CaM - кальмодулин, CaMKII - кальмодулин-зависимая киназа II, CaN - кальциневрин, CRE - элемент ДНК, регулируемый cAMP сигналингом, CREB - CRE-связывающий белок, ERK - киназа, регулируемая экстраклеточными сигналами, mGluR - метаботропный глутаматный рецептор, NMDAR - NMDA рецептор, NOS - NO-синтаза, PKA, PKC - протеинкиназы A, C, PLC - фосфолипаза C, VGCC - потенциал-чувствительные кальциевые каналы. Приведено из [23] с изменениями.

наблюдалась активация PKC и ERK [171,172]. Известно, что регулируемая внеклеточными сигналами киназа ERK участвует в активации CREB, которая необходима для экспрессии генов, обеспечивающих формирование и поддержание LTP [173] (Рисунок 1.6). Протеинкиназа C (PKC), в свою очередь, регулирует транслокацию AMPA-рецепторов на постсинаптическую мембрану и увеличивает проводимость синапса [7]. Вероятно, в норме в процессе активации ERK участвует NADPH оксидаза [110].

Интересные исследования были проведены на трансгенных мышах с оверэкспрессией SOD-1, фермента, осуществляющего превращение супероксид радикала в перекись

водорода в цитоплазме. Было показано, что такие мышцы хуже проявляли себя в водном тесте Морриса, а исследования на срезах мозга этих мышечей показали нарушение формирования LTP, которое было обратимо добавлением каталазы [151]. Однако позже было показано, что добавление 50 мкМ, но не 20 мкМ пероксида водорода к срезам мозга двухмесячных мышечей нормализовало формирование LTP. Кроме того, в стареющих мышцах этой линии наблюдалось более эффективное формирование LTP по сравнению мышцами дикого типа, и этот эффект подавлялся добавлением 50 мкМ пероксида водорода [174]. Было также показано необходимое участие кальциневрина в наблюдаемых эффектах.

Помимо кальциневрина известны и другие белки, способные подвергаться редокс-регуляции. Активация NMDA рецептора считается одним из важнейших факторов формирования некоторых форм долговременной потенциации, поскольку этот рецептор отвечает за регулируемый вход кальция в постсинаптическое окончание из внешней среды [23]. Оказалось, что NMDA рецептор содержит целых шесть цистеиновых остатков, способные участвовать в окислительно-восстановительной регуляции его работы [175]. В указанной статье приводится механизм, по которому нитрозилирование одного из остатков цистеина в присутствии Zn^{2+} приводит к инактивации канала.

Многие исследования показывают, что сигналинг АФК непосредственно связан с модуляцией внутриклеточной концентрации кальция. Так, стимуляция ангиотензином II ведёт к повышению концентрации Ca^{2+} и понижению концентрации K^+ в нейронах - процесс, который блокируется ингибиторами белков семейства NOX [124]. Активные формы кислорода могут увеличивать активность потенциал-чувствительных Ca^{2+} -каналов L-типа [125] и P/Q типа [126], однако механизм регуляции до сих пор не выяснен. Вероятно, в активации каналов играет роль окисление редокс-чувствительных аминокислот в составе канала. NOX также регулирует увеличивает активность рианодиновых рецепторов [127] и рецепторов инозитолтрифосфата [128], одновременно являющимися кальциевыми каналами эндоплазматического ретикулума; этот эффект подавлялся ингибиторами протеинкиназы C, фосфоинозитид 3-киназы, также активация рецепторов инозитолтрифосфата отсутствовала в мышцах с делецией GTPазы Rac1.

Поскольку кальций участвует в регуляции выброса нейромедиатора в пресинаптическом окончании, повышение его внутриклеточной концентрации приводит к увеличению синаптической активности. Так, активация NMDA рецепторов и последующая продукция активных форм кислорода при участии NOX регулирует выделение нейротрансмиттера ГАМК (гамма-аминомасляная кислота) в крысиных синапсосомах [176]. Митохондриальные АФК, по-видимому, также могут принимать участие в регуляции пресинаптической передачи. Так, эксперименты на срезах полосатого тела мозга морских свинок

показали участие активных форм кислорода, продуцируемых митохондриями в ответ на стимуляцию глутаматом, в регуляции выброса дофамина через ингибирование АТР-зависимых K^+ -каналов [66].

Наконец, молекула пероксида водорода, продуцируемые в нейронах, может диффундировать в соседние клетки, в том числе астроциты и олигодендроциты, которые также влияют на развитие и электрическую активность нейронов. Так, стимуляция гиппокампальных нейронов приводит к АФК-зависимому фосфорилированию основного белка миелина в олигодендроцитах, которое блокируется антиоксидантами и ингибиторами NO-синтазы [177]. Это способствует миелинизации нервных волокон, увеличивая их электрическую проводимость.

Таким образом, окислительно-восстановительная регуляция синаптической активности может происходить на многих уровнях: непосредственное действие на активность каналов или модуляция активности регуляторных белков, контролирующих активность, локализацию и синаптических белков и экспрессию их генов. Вместе с тем, роль различных участников этого регуляторного процесса до сих пор остаётся во многом загадочной. Неясно, почему характер окислительно-восстановительной регуляции меняется с возрастом, как связаны между собой продукция пероксида NOX и митохондриями, играет ли роль продукция пероксида в синапсах на проводимость соседних и т.д. К тому же, во многих моделях уровень пероксида водорода в клетке повышался путём добавления внеклеточной перекиси или системы ксантин/ксантиноксидаза, которые не позволяют различать, например, эффекты, оказываемые АФК на пост- и пресинаптические окончания или на отдельные синапсы. Мы уверены, с появлением новых индикаторов пероксида, ингибиторов его источников, а также инструментов для направленной продукции пероксида будет способствовать быстрому разрешению этих вопросов.

1.3.5 Участие активных форм кислорода в развитии нейродегенеративных заболеваний

Как уже упоминалось выше, хотя АФК и могут выполнять регуляторную роль, они являются токсичными молекулами, способными вызывать значительные повреждения ДНК, белков и других клеточных структур. Так, окислительный стресс может вызывать дисфункцию эндотелия сосудов, воспаление, апоптоз, нарушения клеточной миграции, фиброз и другие нарушения сердечнососудистой системы [112]. В нервной системе эти нарушения играют особенно существенную роль, где повышение продукции АФК или нарушение их утилизации, вызванные старением, болезнями или травматическими повреж-

дениями, может приводить к значительным нарушениям работы нейронов и даже их гибели [23].

Старение

Известно, что когнитивные дисфункции, вызванные старением, связаны в том числе с нарушением формирования LTP [76]. Существуют данные, свидетельствующие в пользу участия АФК в развитии этих нарушений. Так, известно, что в стареющем мозге накапливаются окислительные повреждения [75], а оверэкспрессия цитоплазматической супероксид дисмутаза в мышцах защищала их от связанных с возрастом когнитивных нарушений [87]. Предполагается, что повышенный уровень продукции АФК в стареющем мозге приводит к активации сигнальных путей окислительного стресса, которые подавляют индукцию LTP и способствуют развитию LTD [178,179].

Предполагают, что одной из причин окислительного стресса в нейронах, связанного со старением, является изменение активности фагоцитарных иммунных клеток мозга - микроглии. В норме эти клетки находятся в спящем состоянии, однако при определённой стимуляции активируются - быстро изменяют свою морфологию, увеличивают экспрессию функциональных белков, начинают презентацию антигена. Было показано, что активация микроглии приводит к увеличению продукции АФК ферментом NADPH оксидазой [180]. С возрастом же обнаруживается нарушение регуляции активности микроглии интерлейкинами [181].

Вероятно, вызванный активацией микроглии окислительный стресс обуславливает нарушения синаптической активности и при некоторых нейродегенеративных заболеваниях, а также при травматических повреждениях мозга [78,182].

Также роль в старении приписывают нарушению функции митохондрий - одновременно источнику энергии и продуценту АФК (Рисунок 1.7). Митохондриальная ДНК более подвержена окислительному стрессу, чем ядерная, и с возрастом в ней накапливается большое количество окисленных азотистых оснований [183]. Вероятно, в связи с этим в с возрастом нарушается работа белков дыхательной цепи, особенно тех, которые кодируются митохондриальной ДНК [184]. Помимо этого, митохондрии играют важную роль в регуляции апоптоза клеток [185], что также может быть фактором нейродегенерации.

Болезнь Альцгеймера

С возрастом также повышается риск развития многих нейрогенеративных заболеваний. Болезнь Альцгеймера – тяжёлое нейродегенеративное заболевание, сопровождающееся тяжёлыми когнитивными нарушениями и расстройствами памяти. Эта болезнь связана с накоплением в тканях мозга бляшек несвёрнутых белков – бета-амилоида и таубелка - и повышенной смертностью нейронов, в особенности нейронов CA1 поля гиппо-

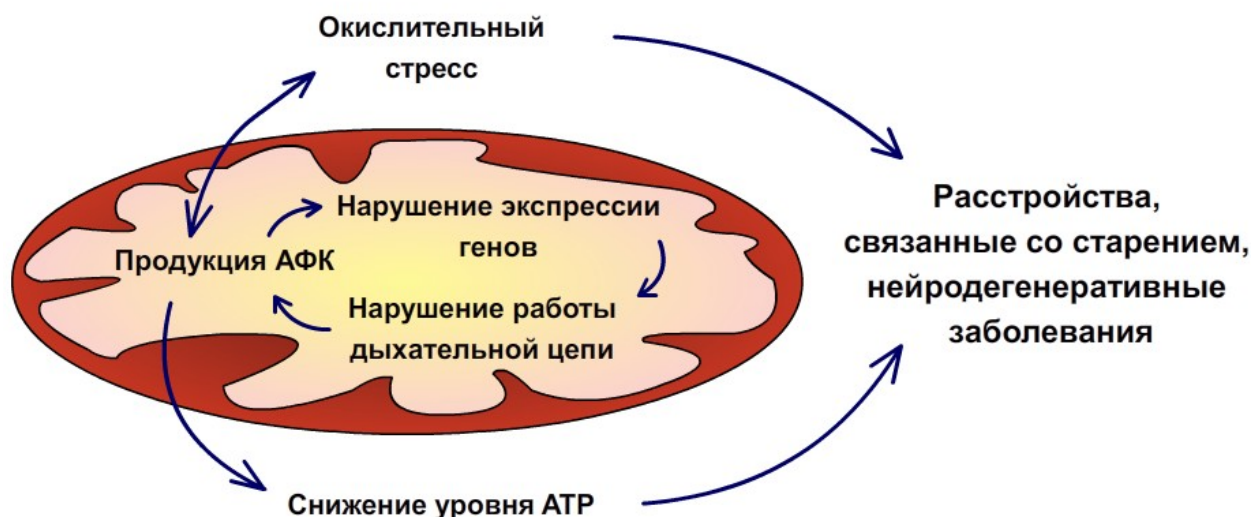


Рисунок 1.7 Участие митохондрий в развитии нервных расстройств, связанных со старением. Окислительный стресс, происходящий в результате продукции активных форм кислорода дыхательной цепью и внешними источниками, приводит к накоплению мутаций в митохондриальной ДНК. В свою очередь, это приводит к нарушению работы дыхательной цепи и увеличению продукции активных форм кислорода. Развивающийся с возрастом окислительный стресс совместно с нарушением продукции АТФ приводит к нарушению нейрональной функции и приводит к развитию заболеваний. На основании [186].

кампа [186,187]. Белок предшественник амилоида - трансмембранный белок, в большом количестве встречающийся в нейронах и регулирующий в частности формирование синапсов и модулирующий синаптическую пластичность. Однако в определённых условиях от этого белка отщепляется бета-амилоид, отложения которого формируют амилоидные бляшки. В мозге пациентов обнаруживается значительная степень окислительных повреждений [86]. Было показано, что отложения бета-амилоида вызывают продукцию АФК в митохондриях [77], клетками микроглии [188], а также вызывают NADPH-зависимую активацию киназы ERK, участвующей в регуляции формирования LTP [189].

В то же время, одна из последних гипотез развития болезни заключается в том, что именно нарушение работы митохондрий является первопричиной накопления бета-амилоида [190]. Вероятно, нарушение энергетической функции митохондрий приводит к нарушению процессинга белка предшественника амилоида. Почему нейроны гиппокампа особенно подвержены гибели во время заболевания пока остаётся неясным.

Болезнь Паркинсона

Второе по встречаемости после болезни Альцгеймера нейродегенеративное расстройство - болезнь Паркинсона. Симптоматически болезнь проявляется в появлении двигательных, нередко - психиатрических расстройств; физиологически болезнь связана с ги-

белю нейронов, особенно дофаминергических нейронов чёрного тела, и астроцитов, накоплением бляшек α -синуклеина а также активацией микроглии [191]. Было показано, что окислительный стресс способствует накоплению агрегированного α -синуклеина [192].

Дофаминергические нейроны особенно подвержены окислительному процессу, поскольку в процессе метаболизма дофамина выделяются активные формы кислорода при участии фермента моноаминоксидазы (МАО) [193]. Исследователи рассматривают ингибиторы МАО в качестве терапевтических препаратов болезни Паркинсона и других нейрогенеративных заболеваний [194].

Как и в случае болезни Альцгеймера, нарушение функции митохондрий считается также одной из основных причин. У пациентов были обнаружены мутации и делеции митохондриальной ДНК, связанные с комплексами дыхательной цепи, а также митохондриальной полимеразой [195,196].

Рассеянный склероз

Рассеянный склероз - хроническое воспалительное заболевание мозга, ассоциированное с демиелинизацией нервных волокон и нейродегенерацией. Это заболевание ассоциировано с рядом симптомов включая умственные и психиатрические расстройства, и как правило связано с патологической активацией иммунной системы или нарушением функции миелин-продуцирующих клеток [197].

Основной причиной повреждений считается атака иммунитета человека на клетки собственной нервной системы. В то же время, по крайней мере у некоторых пациентов было показано накопление окислительных повреждений в олигодендритах и нейронах [198]. Существует гипотеза, что ассоциированная с болезнью нейродегенерация прежде всего связана с нарушением функции митохондрий в пресинаптических окончаниях [199].

Ишемия мозга

Ишемия означает временное нарушение кровоснабжения тканей мозга, что приводит к нарушению работы нейронов и их гибели. В условиях пониженных концентраций кислорода и глюкозы, нейроны теряют способность поддерживать мембранный потенциал, что приводит к деполяризации мембраны, высвобождению глутамата и повышению внутриклеточной концентрации кальция через потенциал-чувствительные каналы и глутаматные рецепторы, а также патологической активации регуляторных каскадов. Восстановление кровоснабжения (реперфузия) приводит к повышенной продукции АФК и развитию окислительного стресса [182], что, совместно с нарушением кальциевого сигналинга, приводит к высвобождению митохондриями цитохрома С, активации каспаз и гибели клеток (Рисунок 1.8).

По-видимому, в этом процессе участвуют сразу многие клеточные источники АФК.

Было показано, что ингибиторы NADPH оксидазы [200], а также первого комплекса дыхательной цепи митохондрий [201], приводят к значительному уменьшению продукции активных форм кислорода после реперфузии. Кроме того, ишемия вызывает активацию микроглии, которые также вносят вклад в развитие окислительного стресса в нейронах [202]. Хотя на сегодняшний день проблема уменьшения повреждения ткани мозга после ишемии пока остаётся нерешённой, имеются обнадеживающие наблюдения, что применение антиоксидантов смягчает воздействие индуцированной ишемии крыс на их способность обучению и памяти [203].

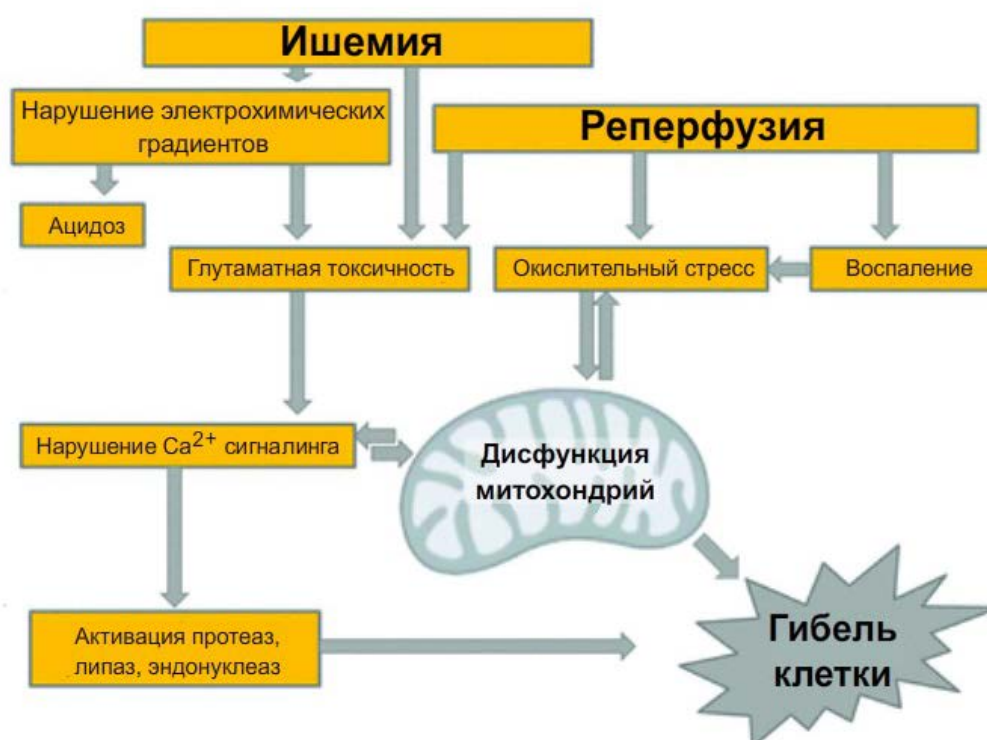


Рисунок 1.8 Схема ключевых процессов, приводящих к гибели клеток в результате ишемии/реперфузии. Ишемия с последующей реоксигенацией приводят к нарушению регуляторных процессов, а также развитию окислительного стресса, которые в сумме приводят к гибели клеток. Приведено из [182].

Таким образом, нарушение окислительно-восстановительного баланса в нейронах приводит к нарушению синаптической активности в нейронах. Нарушение митохондриальной функции и развитие окислительного стресса играют центральную роль в развитии многих нейродегенеративных заболеваний. Также было показано, что применение антиоксидантов в некоторых случаях смягчает эффекты нейродегенеративных заболеваний на способность к обучению и формированию памяти. Однако для разработки способов эффективного лечения, необходимо дальнейшее детальное изучение роли АФК в регуляции нейрональной активности и развитии нейропатологий.

1.4 Способы регистрации и модуляции метаболической и электрической активности в нейронах

Итак, мы разобрали, каким образом такие важнейшие факторы внутренней среды как рН и окислительно-восстановительный статус клетки могут влиять на синаптическую передачу в нейронах, а в случае активных форм кислорода, и участвовать в развитии нейрогенеративных заболеваний. Несмотря на активное изучение, особенно редокс-сигналинга, остаётся очень много нерешённых вопросов, что часто связано с недостатком инструментов изучения.

Поскольку речь идёт о крайне лабильных соединениях - АФК, а в случае рН - изменению концентрации протонов, изучение кислотно-основного и редокс-сигналинга было бы невозможно без специальных инструментов - индикаторов. Первые индикаторы были химическими молекулами, которые было необходимо либо специально вводить в клетку, либо модифицировать, чтобы они могли проникать через клеточную мембрану. Однако современные методы молекулярной биологии позволяют создавать генетически кодируемые индикаторы, которые можно локализовать практически в любой клеточной структуре. Это очень важное качество, поскольку, как было указано выше, на клеточный ответ влияет не столько сам факт изменения рН или продукции пероксида, сколько количественные характеристики и место в клетке, в котором происходят эти изменения.

Рассмотрим способы мониторинга рН и активных форм кислорода в нейронах, а затем поговорим о способах искусственной модуляции АФК в нейронах.

1.4.1 Способы мониторинга рН в нейронах

Химические флуоресцентные рН-индикаторы

Один из наиболее часто используемых химических индикаторов является 2',7'-бис(2-карбок시에тил)-5(6)-карбоксиифлуорисцеин (BCECF) и его гомологи[204]. Он позволяет проводить измерения в диапазоне 6.5 - 7.5 единиц рН. Одним из преимуществ этого индикатора является его ратиометрический сигнал: для измерения рН определяют отношение интенсивностей флуоресценции, испускаемой при 535 нм, при возбуждении светом длины волны 503 нм и 439 нм. Это позволяет количественно измерять рН независимо от концентрации индикатора в клетке. BCECF равномерно распределяется по клетке и относительно медленно "вымывается", его сигнал не зависит от ионной силы. Кроме того, BCECF существует также в форме нефлуоресцирующего ацетоксиметилового эфира, что позволяет ему проникать в клетку, где он гидролизуеться с выделением флуоресцентного индикатора; при этом, впрочем, также выделяются вредные для клетки вещества - метанол

и уксусная кислота.

Однако, у этого индикатора есть и недостатки. Один из главных - достаточно быстрая скорость фотоинактивации, сопровождающейся продукцией активных форм кислорода [205]. Это особенно неудобно в случае нейронов, поскольку изменения pH в них происходят быстро, а значит, чтобы их зарегистрировать, облучать клетку приходится часто. Кроме того, BCECF может ингибировать Ca^{2+} -АТФазу цитоплазматической мембраны - одного из возможных участников изменения клеточного pH в нейронах [41].

Другой распространённый индикатор - карбокси-SNARF 1 [206,207]. Спектр эмиссии SNARF значительно изменяется с pH: в протонированной форме они испускают флуоресценцию при 580 нм, в то время как в щелочной среде максимум эмиссии флуоресценции наблюдается при 640 нм. Это позволяет, как и в случае BCECF, измерять ратиометрический сигнал индикатора. Кроме того, этот индикатор также существует в форме ацетоксиметилового эфира. SNARF относительно устойчив к фотоинактивации и долго задерживается в клетках [208]. Наконец, красная флуоресценция индикатора позволяет использовать его совместно с другими, например, индикаторами кальция, а также уменьшает воздействие облучения на клетки. Тем не менее, у SNARF также есть недостатки. В частности, интенсивность флуоресценции SNARF меняется в зависимости от окружения в клетках [207].

Генетически кодируемые флуоресцентные pH-индикаторы

Несомненный плюс использования генетически-кодируемых флуоресцентных индикаторов - это возможность неинвазивно производить измерение pH в специфических клеточных популяциях и клеточных компартментах. Генетически кодируемые флуоресцентные индикаторы основаны на зелёном флуоресцентном белке медузы *Aequorea victoria* (GFP) [209] или красном флуоресцентном белке из коралла *Discosoma sp.* (dsRed) [210].

Структурно GFP представляет из себя β -бочонок, внутри которого остатки серина, тирозина и глицина способны самопроизвольно вступать в реакцию циклизации с образованием хромофора. Аминокислотные остатки, формирующие окружение хромофора, выступают в роли доноров и акцепторов протонов и определяют флуоресцентные свойства GFP (Рисунок 1.9). Некоторые генетически модифицированные варианты GFP изменяют свои флуоресцентные свойства в пределах физиологических значений pH. Один из таких вариантов - superescliptic pHluorin - увеличивает интенсивность флуоресценции, возбуждаемой при 475 нм, при переходе от кислотных к щелочным значениям pH с pKa 7,1 [211].

Существует также красный флуоресцентный pH индикатор - pHTomato [212], также увеличивающий интенсивность флуоресценции при защелачивании среды и обладающий

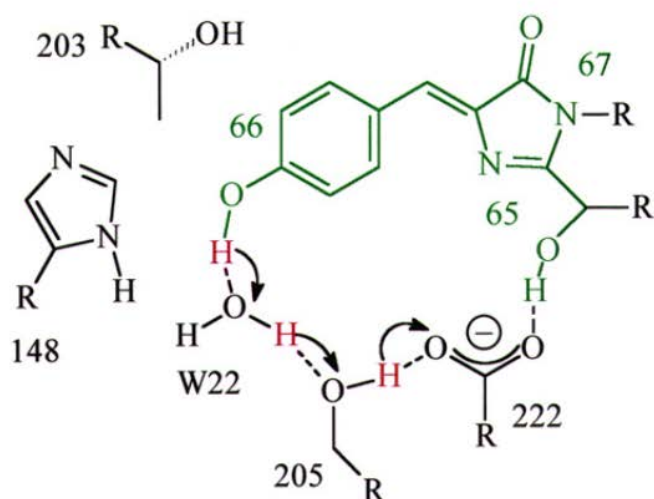
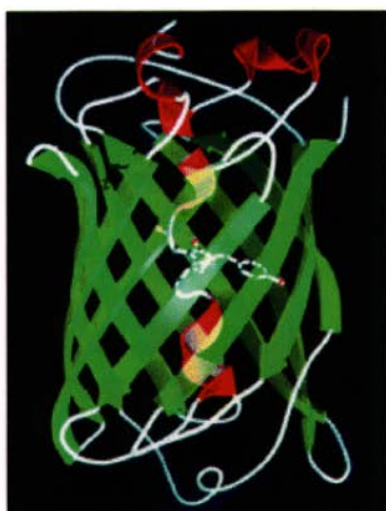


Рисунок 1.9 *Пространственная структура и строение хромофора GFP. Указаны аминокислотные остатки, принимающие участие в протонировании/депротонировании хромофора. Приведено из [213].*

pKa 7,8. Это позволяет использовать его совместно с многими другими индикаторами, обладающими флуоресценцией в зелёной части спектра, каких большинство.

В нейронах генетически кодируемые индикаторы были использованы в качестве индикаторов синаптической активности [211,212]. Для этого были получены гибридные белки, объединяющие флуоресцентный индикатор с мембранным белком VAMP или синаптофизинном так, чтобы индикатор находился внутри синаптической везикулы. В зрелой синаптической везикуле pH кислый, однако во время экзоцитоза нейромедиатора индикатор попадает в нейтральное окружение внешней среды. Таким образом, высвобождение медиатора, связанное с синаптической передачей, вызывает рост интенсивности флуоресценции индикатора.

В конце 2013 года Vidhya Rangaraju была опубликована работа, посвященная измерению продукции АТФ в пресинаптических окончаниях в диссоциированной культуре нейронов. В этой работе было также осуществлено измерение pH в пресинаптических компартментах с помощью сенсора pHluorin [22]. Было обнаружено, что электрическая стимуляция частотой 10 Гц стимулировала закисление цитоплазмы, которое подавлялось ингибиторами гликолиза, но не подавлялось отсутствием внеклеточного кальция (Рисунок 1.10). По-видимому, это первый случай измерения pH в синаптическом окончании при помощи генетически-кодируемого индикатора и ещё одно свидетельство в пользу гипотезы о метаболической природе закисления, связанного с электрической активностью в нейронах.

Однако существенным недостатком описанных индикаторов с точки измерения внутриклеточного pH является то, что их сигналом является изменение интенсивности

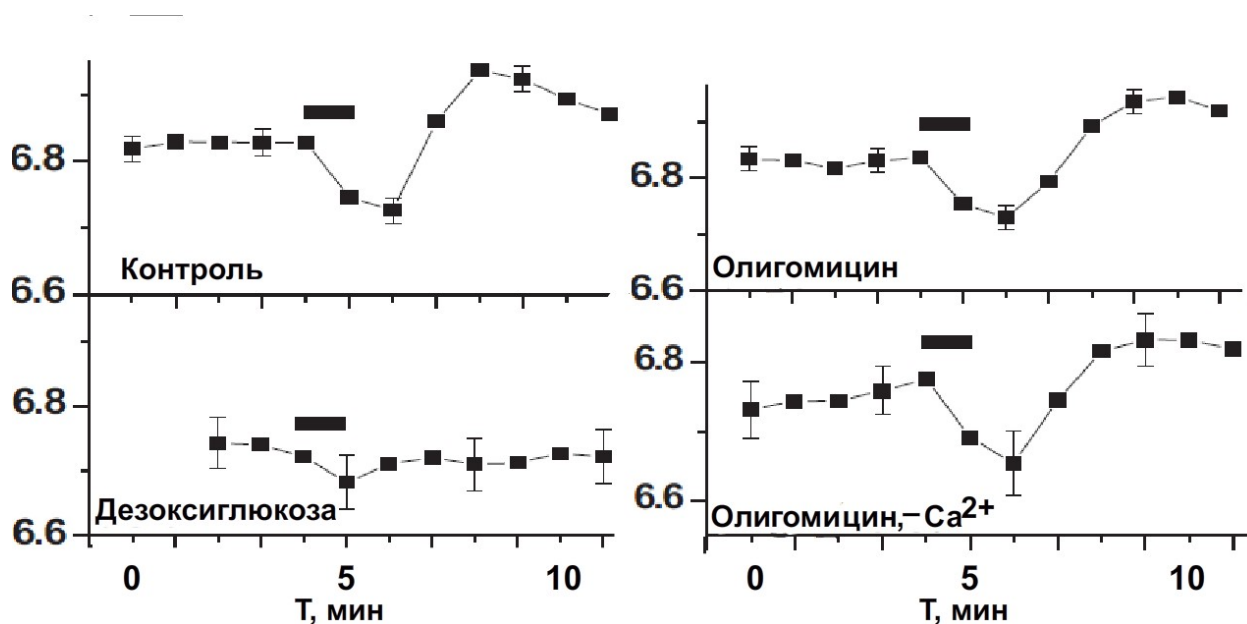


Рисунок 1.10. Измерение изменений внутриклеточного рН в пресинаптическом окончании в ответ на электрическую стимуляцию. Представлена динамика изменения цитоплазматического рН в пресинаптическом окончании в растворе ACSF в присутствии дезоксиглюкозы, а также олигомицина в присутствии или отсутствии внеклеточного кальция. Приведено из [22].

флуоресценции индикатора, а не отношение интенсивностей как в случае SNARF и BCECF. Это означает, что изменение концентрации белка в клетке а также фотоинактивация будут существенно влиять на показания индикатора.

На основе флуоресцентного индикатора пероксида водорода Нурег, разработанного в нашей лаборатории (см. ниже) был получен флуоресцентный рН-индикатор SypHer [214] и успешно применён для измерения рН в митохондриях. В отличие от рНluorin и рНTomato, флуоресценция SypHer при 535 нм имеет два максимума возбуждения: 420 нм и 490 нм. При увеличении рН, интенсивность флуоресценции, возбуждаемой светом длинной волны 490 нм, значительно увеличивается, а возбуждаемая при 420 нм падает. Путём вычисления отношения интенсивности флуоресценции, возбуждаемой при 490 нм, к интенсивности флуоресценции, возбуждаемой при 420 нм, можно получить рациометрический сигнал, что очень удобно для количественного измерения рН.

Значительным недостатком SypHer является его высокое значение рКа > 8.1 (8.7 по данным литературы) [214]. Из этого следует, что при физиологических значениях рН (6.9 - 7.4) интенсивность флуоресценции индикатора достаточно низка. В связи с этим, для применения рациометрического индикатора в нейронах мы прежде всего попытались получить индикатор с более высокой яркостью флуоресценции.

1.4.2 Детекция уровня активных форм кислорода в нейронах

Химические флуоресцентные индикаторы АФК

Одними из наиболее часто используемых красителей являются дихлорофлуоресцеин диацетат (DCFH-DA) и N-ацетил-3,7-дихлорфеноксазин (Amplex Red).

Дифлуоресцеин диацетат превращается в флуоресцирующий продукт при окислении пероксидом водорода. Этот индикатор свободно проникает в клетки, где подвергается гидролизу с высвобождением дифлуоресцеин карбоксилата, который накапливается в клетке. К сожалению, этот индикатор под действием пероксида водорода претерпевает достаточно сложные химические превращения, поэтому не может быть использован для определения концентрации пероксида. Кроме того, DCFH может также окисляться другими АФК, такими как NO_3^- и HOCl [215].

Amplex Red также образует флуоресцентный продукт при окислении H_2O_2 в присутствии пероксидазы хрена. Однако большой недостаток Amplex Red является его способность продуцировать активные формы кислорода в присутствии клеточных восстановителей, таких как NADPH и глутатион, поэтому он не может быть использован для детекции АФК внутри клетки [216].

Генетически кодируемые флуоресцентные индикаторы АФК

В последние десятилетия были разработаны генетически кодируемые флуоресцентные индикаторы АФК, такие как roGFP и HyPer.

Индикатор roGFP был получен путём замены нескольких аминокислот на цистеины, способные к образованию дисульфидной связи при окислении [217]. Для повышения специфичности индикатора к различным окислителям, были получены конструкторы, в которых roGFP был сшит с глуторедоксином или пероксидазой дрожжей ORP1 для детекции окисленной формы глутатиона и пероксида водорода, соответственно. Пероксид водорода окисляет сульфидные группы пероксидазы, которые, в свою очередь, восстанавливаются за счёт окисления сульфидов roGFP. При этом изменяется отношение возбуждения флуоресценции при 520 нм светом длины волны 488 нм к таковому при возбуждении светом 405 нм [218]. Тем не менее, поскольку для передачи сигнала пероксида на roGFP должно установиться равновесие его цистеиновых остатков с остатками Orp1, ответ индикатора на увеличение концентрации пероксида происходит с некоторой задержкой.

В нашей лаборатории был получен другой генетически кодируемый биосенсор - HyPer. Для его разработки, циклически-пермутированный жёлтый флуоресцентный белок (cpYFP) был встроен в бактериальный сенсор пероксида водорода, транскрипционный фактор OxyR (Рисунок 1.11). Спектр возбуждения флуоресценции HyPer содержит два

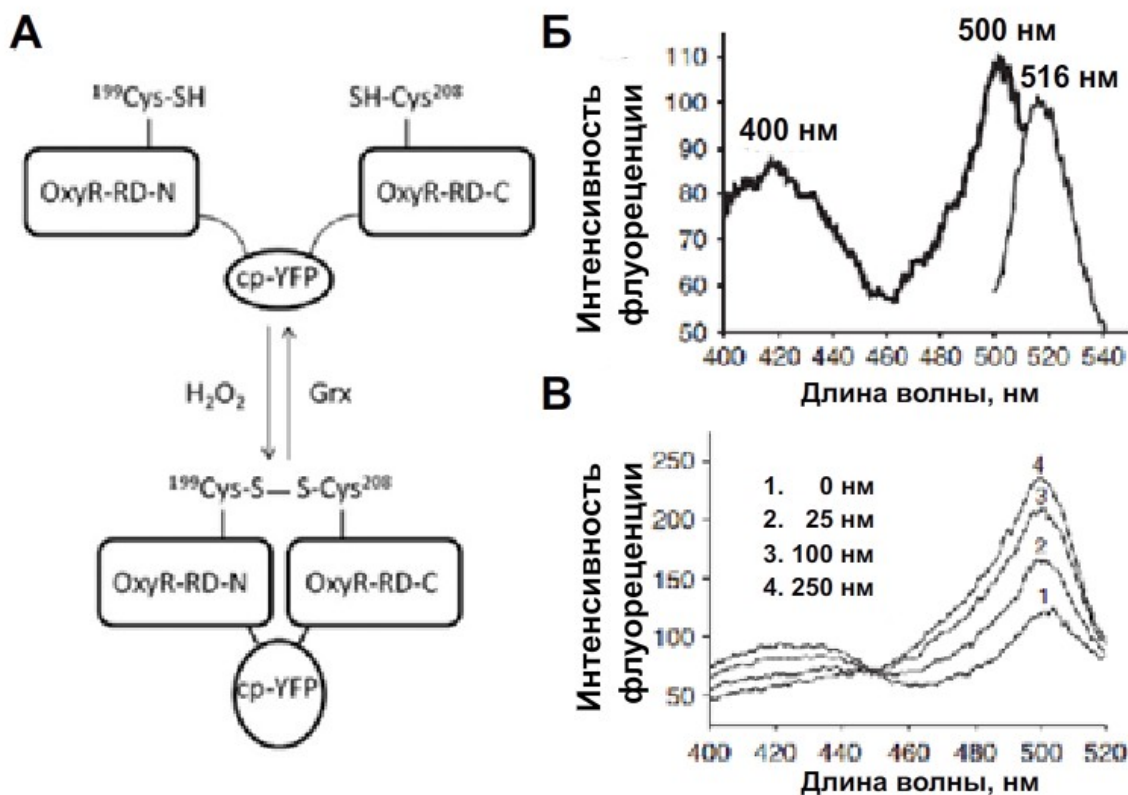


Рисунок 1.11 Структура и принцип работы биосенсора Huper. А. Биосенсор состоит из циклически-пермутированного YFP, встроенного в бактериальный транскрипционный фактор OxyR. Под действием пероксида водорода, остатки цистеина на С- и N-концевых доменах OxyR образуют дисульфидную связь, которая в клетке восстанавливается под действием глутаредоксина (Grx) или других восстановителей. Б. Спектры возбуждения (отмечен жирным) Huper имеет два максимума поглощения - приблизительно при 400 и 500 нм. В. Окисление цистеиновых остатков при добавлении H₂O₂ к препарату выделенного белка приводит к росту максимума поглощения при 500 нм и падению поглощения при 400 нм. Цифрами указана концентрация пероксида водорода. Приведено из [219].

максимума поглощения: при 400 и 500 нм, длина волны испускаемой флуоресценции - 516 нм. Пероксид водорода окисляет цистеиновые остатки N- и C-концевых фрагментов OxyR, образующих дисульфидную связь. Это вызывает конформационные перестройки в OxyR, что приводит изменению спектра поглощения cpYFP таким образом, что при увеличении концентрации пероксида водорода, отношение возбуждения флуоресценции при 500 нм к возбуждению при 400 нм растёт [219].

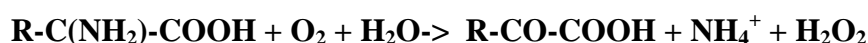
Huper был успешно использован для детекции АФК в различных компартментах клетки [220,221]. Однако, существенный недостаток этого сенсора заключается в высокой рН-чувствительности cpYFP является крайне рН-чувствительным белком. Как уже упоминалось выше, путём внедрения в Huper замены С199S был получен индикатор, не чувствительный к пероксиду водорода, но обладающий сходной рН-чувствительностью [214].

Сейчас уже существуют новые версии сенсора HyPer с повышенным динамическим диапазоном чувствительности к пероксиду водорода [222,223]. По нашим наблюдениям, в клетках, трансфицированных индикатором HyPer2, наблюдалась в среднем более высокая интенсивность флуоресценции по сравнению с остальными версиями индикатора (неопубликованные данные). На основании этого наблюдения мы решили попробовать получить рН-индикатор с увеличенной яркостью флуоресценции в клетках, что стало одной из задач в данной работе.

1.4.3 Система для направленной продукции пероксида водорода

Как правило, большинство исследований редокс-регуляции синаптической передачи проводилось путём ингибирования возможных продуцентов активных форм кислорода или увеличением экспрессии белков антиоксидантной системы/ внесением антиоксидантов. Однако иногда требуется обратная ситуация - симулировать эффект повышенной продукции пероксида водорода, что, как правило достигается путём подавления антиоксидантных систем клетки или путём внесения пероксида водорода непосредственно или с помощью фотоактивных химических веществ и систем фермент/субстрат, например ксантин/ ксантиноксидаза или глюкоза/глюкозооксидаза [224]. Однако все эти методы обладают существенными недостатками. Подавление антиоксидантной системы не позволяет идентифицировать источники активных форм кислорода, участвующих в сигналинге или вызывающих окислительный стресс. Системы продукции пероксида водорода также не могут быть применены для направленной продукции пероксида водорода в клетке, например, в определённых клеточных компартментах. Это не говоря уже о том, что как правило вносится существенное количество перекиси, вероятно, превышающее физиологические концентрации и вызывающие окислительный стресс.

Существуют ферменты, оксидазы D-аминокислот (DAO), осуществляющие превращения D-аминокислот и других веществ в клетках многих живых организмов, в том числе у человека [225]. Эти ферменты могут окислять D-аминокислоты с выделением соответствующих α -кетокислот, иона аммония и пероксида водорода:



У человека оксидаза D-аминокислот впервые была обнаружена в полиморфоядерных лейкоцитах, где, по-видимому, может выполнять защитную роль в борьбе с болезнетворными организмами [226]. Позже экспрессию DAO обнаружили в печени, почках, тонком кишечнике и других тканях. Интересно, что DAO экспрессируется в мозге в астроцитах, где она регулирует уровень D-серина - важного модулятора активности NMDA-рецепторов [227].

В настоящий момент охарактеризовано огромное количество DAO различных ор-

ганизмов. В частности, было охарактеризовано множество DAO в дрожжах, где эти ферменты осуществляют превращения некоторых метаболитов или участвуют в детоксикации вредных веществ. Некоторые из этих белков уже используются в промышленности для биосинтеза антибиотиков ряда цефалоспорино-С [228]. Одним из таких белков, оксидаза D-аминокислот дрожжей *Rhodospodium toruloides*, белок массой 40 кДа, образующий димеры и обладающий почти в 100 раз большей активностью, чем DAO человека [229].

Мы решили проверить, можно ли использовать дрожжевую оксидазу D-аминокислот как инструмент для направленной продукции пероксида водорода в нейронах.

Подведём итог всему сказанному выше. В нейронах мозга перекисный сигналинг вызывает особенный интерес. С одной стороны, есть данные, позволяющие предполагать участие пероксида в регуляции синаптической передачи, а следовательно, в модуляции высшей нервной деятельности. С другой стороны, окислительные повреждения в клетках накапливаются в течение всей жизни организма, поскольку, в отличие от эпителиальных тканей, повреждённая нервная ткань не регенерирует.

Однако данные о локализации продукции пероксида водорода и его роли в регуляции синаптической передачи до сих пор не систематизированы и нередко противоречивы. Это происходит отчасти потому, что набор инструментов для изучения динамики H_2O_2 в нейронах чрезвычайно ограничен, и роли определённого источника АФК нередко приходится судить по косвенным данным. Так, например, для определения вклада продукции пероксида водорода NADPH оксидазами нередко использовали вещество DPI, обладающее широким спектром действия на флавин-содержащие белки, так что в отсутствие инструментов для определения уровня локальной продукции пероксида эти данные трудно интерпретировать [230]. Кроме того, во многих экспериментах [231–236] эффекты H_2O_2 исследовали путём выключения антиоксидантных белков или добавлением пероксида водорода извне, при этом трудно оценить влияние неизбежных побочных процессов, вызванных в результате окислительного стресса клеток.

В связи с этим одна из задач нашей лаборатории стала разработка инструментов для локальной продукции, а также регистрации уровня пероксида водорода, в том числе локализованных в синаптических структурах. При попытке регистрации продукции перекиси в нейронах с помощью биосенсора NuPer мы обнаружили интересный эффект, связанный с изменением pH в электрически активных нейронах. Поскольку данных pH является одним из важнейших физиологических параметров клетки, мы решили охарактеризовать наблюдаемое явление. Для изучения этого эффекта мы разработали новую версию

pH-индикатора, SynHer2, и использовали его в качестве инструмента количественного определения pH в синаптических структурах и оценке уровня электрической активности в различных культурах нейронов, чему посвящена первая часть данной работы.

До недавнего времени эффект продукции пероксида водорода пытались имитировать внесением перекиси извне, что неизбежно должно было приводить к массовым окислительным повреждениям клеточных структур [233–236]. Сейчас уже стало ясно, что эффект пероксида водорода может быть совершенно различным в зависимости от количества, места и времени продукции его в клетке. Существование системы контролируемой продукции пероксида водорода значительно расширило бы возможности изучения перекисного сигналинга, поскольку позволила бы симулировать продукцию пероксида водорода в физиологических концентрациях и в отдельных субклеточных компартментах, например, только в аксонах или только в дендритах нейронов. В связи с этим, вторая часть данной работы была посвящена созданию генетически-кодируемого инструмента для контролируемой локальной продукции пероксида водорода.

ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

Целью данной работы было усовершенствование генетически кодируемого рН-индикатора *SypHer* для мониторинга физиологической активности нейронов, а также получение генетически-кодируемого инструмента для контролируемой генерации пероксида водорода в синаптических структурах на основе дрожжевой оксидазы D-аминокислот.

Для выполнения данной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Внесение замены C199S в индикатор *HyPer2* и анализ рН-чувствительности и яркости полученного индикатора в клетках.
2. Регистрация динамики рН в электрически активных диссоциированной культуре нейронов, а также в срезах мозга мыши.
3. Получение конструкций с синаптической локализацией индикатора и анализ динамики рН в синаптических окончаниях нейронов.
4. Получение синтетических конструкций оксидазы D-аминокислот и характеристика продукции пероксида водорода в клетках.
5. Получение конструкции оксидазы D-аминокислот для локальной синаптической продукции пероксида водорода в нейронах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы

2.1.1 ДНК-Вектора

pAAV-EF1a-DOI-ChRh, pTorPE-R-GECO1, pCAG-DsRed (Addgene, США). Вектора pHyPer-C, pHyPer-N, pHyper2-C были разработаны в нашей лаборатории; вектора, кодирующие синаптические белки Homer1 и Synaptophysin, были любезно предоставлены Shigeo Okabe, University of Tokyo. Оптимизированный ген оксидазы D-аминокислот *Rhodospiridium toruloides* был синтезирован в компании GenScript (США).

2.1.2 Реактивы и расходные материалы для клонирования

Для получения генетических конструкций использовались: набор реактивов для ПЦР Tersus, готовая смесь для ПЦР ScreenMix, наборы для очистки ДНК из геля и реакционных смесей Cleanup Standard и Cleanup Mini, набор для выделения плазмидной ДНК Plasmid Miniprep (Евроген, Россия), набор для выделения плазмидной ДНК Plasmid Midi Kit (Qiagen, Нидерланды), ферменты рестрикции Vsp1 (Ase1), Asu NH1 (Nhe1), BamH1, CciN1 (Not1), EcoR1, Xho1, HindIII и соответствующие буферы рестрикции, ДНК-маркеры 1Kb (SibEnzyme, Россия), T4 ДНК лигаза (Promega, США). Синтез праймеров и секвенирование полученных конструкций осуществлялся в компании Евроген. Бактериальные химические и электрические компетентные клетки *E. coli* штамм X11 Blue (Invitrogen, США). Также были использованы стерильные пластиковые чашки Петри, кюветы для электропорации (Bio-Rad, США), бакто-агар, канамицин (ПанЭко, Россия), микробиологические среды LB (1% бакто-триптон, 0.5% дрожжевой экстракт, 0.5% NaCl, pH 7.5) и SOB (2% бакто-триптон, 0,55% дрожжевой экстракт, 10 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM MgCl, 10 mM MgSO₄, pH 8.0), агароза, бромистый этидий, Трис-ацетатный буфер (40 mM Трис-ацетат, 1 mM ЭДТА, pH 8.0) и буфер нанесения для ДНК электрофореза (50% глицерин, 0.25% бромфеноловый синий).

2.1.3 Оборудование и программное обеспечение для клонирования

Аmplifikator PTC-200 Thermal Cycler (MJ Research, Канада), электропоратор MicroPulser (BioRad, США), термостат-шейкер Excella 25 (Eppendorf, Германия), камера для горизонтального электрофореза с источником питания EC370 Minicell (E-C Apparatus, США), гель-анализатор Alpha Imager 2000 (Alpha-InnoTech, США), суховоздушный, водный и твёрдотельные термостаты.

Для конструирования векторов и анализа ДНК-последовательностей использовали программы Vector NTI (Life technologies, США), а также EditSeq и SeqMan пакета Laser-gene (DNASTAR, США).

2.1.4 Эукариотические клеточные линии, культуральные среды и расходные материалы

Клетки NIH/3T3 были приобретены в ATCC, клеточная линия Hela Kyoto была любезно предоставлена Carsten Schultz, EMBL.

Среды DMEM, Opti-MEM, HBSS, раствор Версена, трипсин сухой, пенициллин-стрептомицин, эмбриональная бычья сыворотка (FBS), глутамин (ПанЭко, Россия). Реактив для трансфекции X-tremeGENE 9 приобретён в Roche (Швейцария). Также были использованы 75 см² флаконы (ЛабТэк, Россия), пластиковые пробирки на 15 и 50 мл, клеточное сито на 70 мкм (Falcon, USA), 35 мм чашки со стеклянным дном (MatTek, США), восьми луночные слайды (Ibidi, Германия).

Для культивирования первичной диссоциированной культуры нейронов использовали: среда Neurobasal, инактивированная эмбриональная бычья сыворотка, поли-D-лизин 150 кДа, добавки B27, GlutaMax, соли Tyrode, бескальциевый раствор HBSS, набор для кальциевой трансфекции Calcium Phosphate Transfection Kit, цитарабин (Invitrogen, США), лёд, деионизированная вода.

Для выделения и имажинга срезов мозга использовали раствор ACSF (2.5 mM KCl, 1.0 mM MgSO₄, 1.25 mM NaH₂PO₄, 26 mM NaHCO₃, 20 mM D-глюкозы, 2,0 mM CaCl₂, 125 mM NaCl, pH 7.4).

Для калибрования pH были использованы глюконат натрия, глюконат калия, нигерицин, монензин (Sigma, США), буферы MES, Hepes, Tris (Хеликон, Россия).

2.1.5 Оборудование для работы с клеточными линиями

Ламинарный бокс 2го класса защиты (ESI-FluFrance), микроскоп Optihot (Nikon, Япония), бинокулярный микроскоп Микромед (Китай), камера Горяева, CO₂ инкубатор, водный термостат, вихревая мешалка, набор хирургических инструментов: ножницы, пинцеты, офтальмологические пинцеты.

Helios Gene Gun и набор для баллистической трансфекции приобретён в Bio-Rad (США), ультразвуковой соникатор Sonic Dismembrator (Fisher Scientific, США); спермидин приобретён в Invitrogen (США). Также были использованы сжатые гелий и азот, 96% этанол.

Срезы мозга получали на вибротоме Leica VT1200S (Германия).

2.1.6 Оборудование и программное обеспечение для имаджинга

Широкопольный флуоресцентный микроскоп Leica DMI 6000 B (Германия), оборудованный флуоресцентной лампой X-Cite (Lumen Dynamics, Канада), наборами фильтров CFP/YFP и TX2 (Leica), 20x воздушным и HCX PL APO ibd.Vl. 63 x 1.4 NA масляным объективами, подогреваемой CO₂ камерой.

Конфокальный сканирующий флуоресцентный микроскоп Leica TCS SP2, оборудованный аргоновым лазером (488 нм) и подогреваемой CO₂ камерой.

Конфокальный сканирующий микроскоп Zeiss LSM 5 Duo (Германия), оборудованный Achromplan 40x/0,80w объективом, аргоновым (488 нм) и диодным (561) лазерами и системой для перфузии, включающей в себя водяной термостат, перистальтический насос и перфузионную камеру.

Анализ изображений проводился в программе ImageJ (EMBL, Германия), обработка данных проводилась в программе OriginPro (OriginLab, США).

2.1.7 Используемые для имаджинга химические вещества

Для регистрации динамики pH в нейронах были использованы: 1,2-бис(2-аминофенокси)этан-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты тетра ацетоксиметировый эфир (ВАРТА-АМ), LnCl₃, 2',7'-бис(2-карбоксиэтил)-5(6)-карбоксифлуорисцеина ацетоксиметировый эфир (BCECF-АМ), бикикуллин, тетродотоксин (ТТХ), дифенилен йодониум (DPI), карбонил цианид м-хлорфенил гидразон (СССР), дезоксиглюкоза, пируват натрия, тапсигаргин (Sigma, США).

Для анализа продукции пероксида водорода DAO использованы: H₂O₂, L-аланин (Диа-М, россия), D-аланин (Sigma, США).

2.2 Методы

2.2.1 Получение генетических конструкций

Чтобы внести замену С199S в ген *HyPer2* мы амплифицировали два его фрагмента, используя следующие пары праймеров: 5'-tccgctagcgccaccatggagatggcaagccag-3', 5'-atcgcgcaaaagagtgaccatct-3', и 5'-agatggctactctttgcgcat-3', 5'-atcaagcttttaaaccgctgtt-3', используя матрицу *pHyPer2-C*, а затем объединили полученные фрагменты, используя праймеры 5'-tccgctagcgccaccatggagatggcaagccag-3' and 5'-atcaagctt ttaaaccgctgtt-3'. Полученный ген клонировали в вектор *pHyPer-C*, используя рестриктазы *NheI* и *HindIII*.

Индикатор *RGeco* был переклонирован в *pHyPer-C* вектор с помощью праймеров 5'- TGAGCTAGCGCCACCATGGTCGACTCATCACGTCG-3' и 5'- TCGAAGCTTCTACT-

TCGCTGTCATCATTTG-3' из матрицы pTopPE-R-GECO1 в вектор pHyper-C по сайтам рестрикции NheI и HindIII.

Для получения конструкции с постсинаптической локализацией, мы поднимали фрагмент белка Homer1, используя праймеры 5'- TTCGAATTCATGGGGGAACAACCTATC-3' и 5'- GGTGGATCCTTAGCTGCATTCTAGTAGC-3', затем клонировали фрагмент в вектор pSynHer2-C с использованием рестриктаз EcoRI и BamHI. Для получения индикатора с пресинаптической локализацией мы переклонировали SynHer2 в pHyper-N вектор, используя 5'-TCCGGACTTACCGGTGCCACCATGGAGATGGCAAGCCAG-3' и 5'-ATCGCGGCCGCTTTAAACCGCCTGTT-3' праймеры и рестриктазы BamHI и NotI. Затем мы амплифицировали фрагмент белка Synaptophysin с помощью праймеров 5'-TCCGCTAGCATGGACGTGGTGAATCAG-3' и 5'-GAGCTCGAGCATCTGATTGGAGAAGG-3' и клонировали его в вектор pSynHer2-N с использованием рестриктаз NheI и XhoI.

Последовательность нуклеотидов оксидазы D-аминокислот была взята из базы данных EMBL-EBI (идентификационный номер U60066), модифицирована для оптимальной трансляции в млекопитающих с использованием таблицы частоты использования кодонов (http://www.genscript.com/cgi-bin/tools/codon_freq_table), сигнал локализации в микротельцах, 2 концевые аминокислоты, удалён. Модифицированная таким образом ДНК была синтезирована в компании GenScript. Для получения Hyper-DAO и SynHer-DAO конструкций, оксидаза D-аминокислот была амплифицирована с использованием праймеров 5'- AGTCAAGCTTACACAGCCAGAAGAGGGTG -3' и 5'-AGTCAAGCTTAGAGCTC-GAGATGCCGCTC -3'. ПЦР-продукт был обработан эндонуклеазами рестрикции HindIII и BamHI и клонирован в вектор pHyper-C или pSynHer.

Для получения гибридной оксидазы с пресинаптической локализацией мы переклонировали DAO в pSynaptophysin-SynHer2 вектор, используя 5'- AGTCAAGCTTACACAGCCAGAAGAGGGTG -3' и 5'- AGTCGCGGCCGCTCAGCTCTCCCTAGCTGC -3' праймеры и рестриктазы HindIII и NotI.

Чтобы избежать сайленсинга CMV промотора в диссоциированной культуре нейронов, мы заменили его на EF1a промотор. Для этого мы получили ПЦР фрагмент, используя праймеры 5'-GT-TATTAATAAGCTTTGCAAAGATGGATAA -3' и 5'-GGCGCTAGCTCACGACACCTG-AAATGGAAG -3' и вектор pAAV-EF1a-DOI-ChRh в качестве матрицы. Полученный фрагмент клонировали по сайтам рестрикции AseI и NheI в вектора pSynHer2-C, pRGeco-C, pSynaptophysin-SynHer2, pSynHer2-Homer1 и pSynaptophysin-DAO.

Целостность полученных последовательностей были подтверждены секвенированием.

2.2.2 Культивирование и трансфекция клеточных линий HeLa и NIH/3T3

Клетки NIH/3T3 и HeLa Kyoto культивировались в DMEM с 10% FBS при 37 °C в присутствии 5% CO₂. Клетки пересаживали раз в 2-3 дня с использованием 0.25% раствора трипсин-ЭДТА.

Для имаджинга клетки высаживали на чашки со стеклянным дном или восьмилучные слайды. 24 часа спустя клетки были трансфицированы смесью ДНК и X-tremeGene 9 согласно протоколу производителя. Для этого смешивали 3 мкл реагента трансфекции и 100 мкл Opti-MEM (на один слайд - 4 мкл реагента и 130 мкл OptiMEM) и инкубировали 5 минут на комнатной температуре. Затем добавляли суммарно 1 мкг очищенной для трансфекции ДНК (1.3 мкг на слайд) и инкубировали ещё 25 минут. Затем трансфекционную смесь добавляли к клеткам и инкубировали в течение ночи. На следующий день питательную среду заменяли свежей, эксперименты ставили в тот же день.

2.2.3 Выделение и трансфекция первичной эмбриональной культуры гиппокампальных нейронов

Для получения смешанной первичной культуры гиппокампальных нейронов (по [237] с изменениями), мы брали мышей линии C57Bl/6, полученных из Пушинского вивария. Перед выделением, центр 35 мм чашки со стеклянным дном покрывали 100 мкл 0.1 мг/мл раствора поли-D-лизина в течение нескольких часов в CO₂ инкубаторе.

На 17м дне беременности мышь декапитировали, эмбрионы анестезировали в ледяной HBSS с низким содержанием Mg²⁺ и Ca²⁺; под бинокулярным микроскопом экстрагировали мозг, полушария отделяли от остальных отделов мозга, тщательно очищали от оболочек мозга и вырезали гиппокампы офтальмологическим пинцетом. Гиппокампы собирали в 15 мл пробирку с HBSS на льду, затем трижды промывали в HBSS и инкубировали в 0.25% трипсин-ЭДТА в течение 15 минут на водяной бане при 37 °C. По окончании инкубации гиппокампы трижды промывали в тёплом DMEM с добавлением 10% FBS и 4 mM глутамина и осторожно разбивали на клетки путём десятикратного набирания и сбрасывания в 1 мл наконечник автоматической пипетки. Клетки сажали в центр покрытых поли-D-лизином 35 мм чашек со стеклянным дном плотностью $15 \cdot 10^4$ клеток в 100 мкл среды DMEM. 1-2 часа спустя среду заменяли 2 мл среды Neurobasal medium с добавлением B27, 5% инактивированной FBS, 2 mM GlutaMax и пенициллина-стрептомицина (нейробазальная среда). Каждые 2-3 дня 1/3 объёма среды заменяли на свежую нейробазальную среду (Рисунок 2.1).

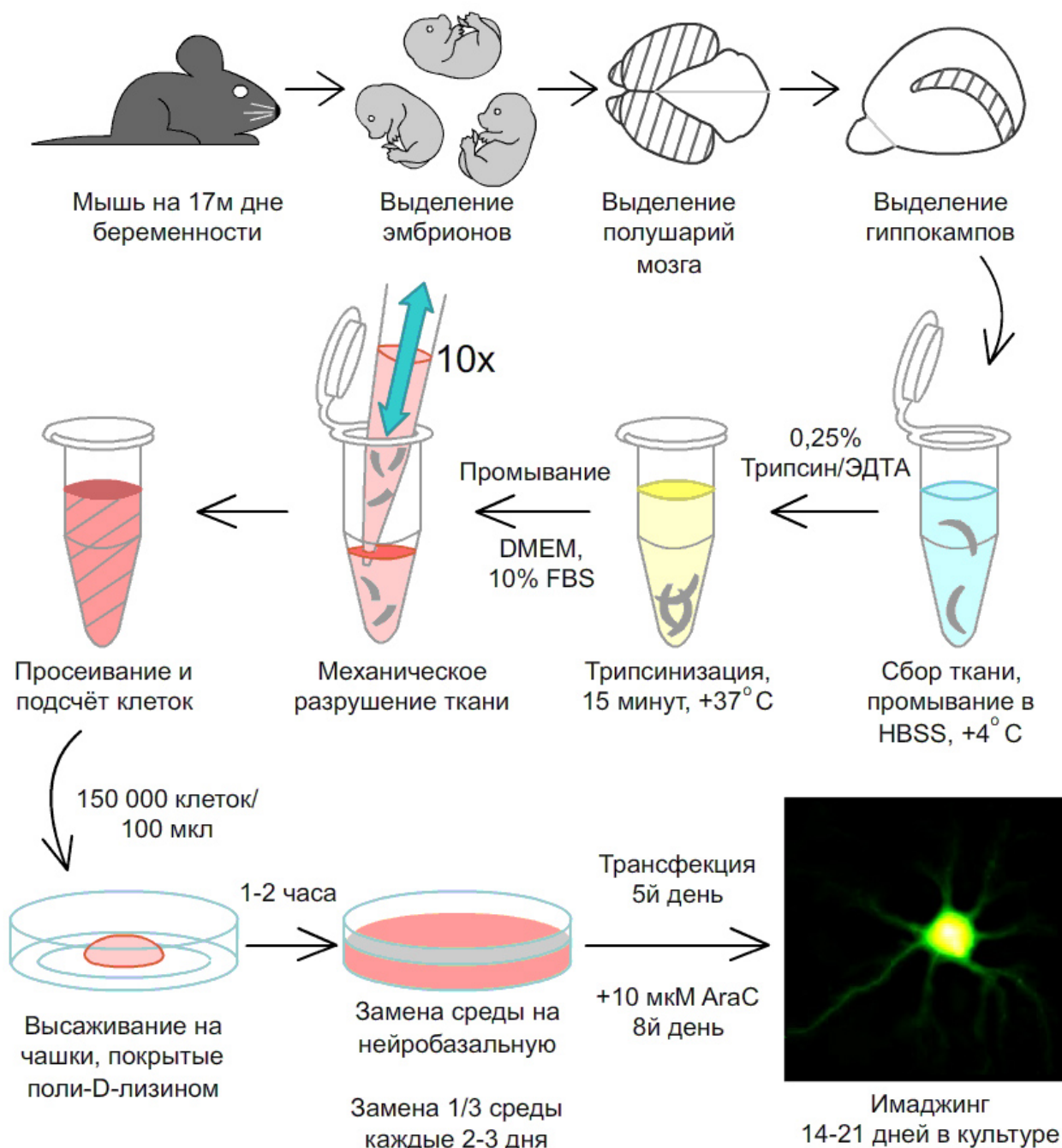


Рисунок 2.1 Схема выделения диссоциированной культуры гиппокампальных нейронов мыши. Пояснения в тексте.

На 5й день в культуре клетки трансфецировали набором для Са-фосфатной трансфекции (по [238] с изменениями). За 1 час перед трансфекцией культуральную среду отбирали в 50 мл пробирку (кондиционированная среда), а к культуре клеток добавляли 1,5 мл среды DMEM без добавок. На каждую 35мм чашку, к 100 мкл 2xHBSS по каплям добавляли 100 мкл смеси, содержащей суммарно 3 мкг очищенной ДНК и 250 мМ CaCl₂, при непрерывном перемешивании пробирки с HBSS на вихревой мешалке на низкой скорости. После 25 минутной инкубации, к клеткам добавляли 200 мкл раствора трансфекции и инкубировали в течение 15-20 минут в 5% CO₂ инкубаторе. По завершении трансфекции, нейроны дваж-

ды промывали средой DMEM, затем добавляли 2 мл кондиционированной нейробазальной среды.

На 8й день в культуре в среду добавляли 10 мкМ цитарабина (AraC) для подавления глиальной пролиферации.

2.2.4 Флуоресцентная микроскопия

Зависимость активности оксидазы от концентрации D-аланина в среде определяли на клетках, высаженных на 8ми луночные слайды; через 5 минут после начала инкубации добавляли 0.0-8.0 мМ D-аланина в среде HBSS.

Для сравнения яркости биосенсоров, клетки высаживали на 35мм чашки с пластиковым дном, съёмку проводили при увеличении 20х; считали среднюю интенсивность всех клеток, находящихся в поле зрения.

Во всех остальных случаях флуоресценцию регистрировали на 35 мм чашках со стеклянным дном при увеличении 63х.

Имаджинг клеток HeLa/Kyoto и NIH/3T3 производили на микроскопе Leica DMI 6000 B в среде HBSS с 20 мМ Hepes, pH 7.4, при 37 °C. Флуоресценция возбуждалась последовательно светом 405 и 488 нм, эмиссия индикатора регистрировалась при 520 нм каждые 30 или 60 секунд.

Имаджинг клеток первичной диссоциированной культуры нейронов производили на 14-21 день в культуре на микроскопе Leica DMI 6000 B в среде Tyrode с 20 мМ Hepes, pH 7.4, 20 мМ D-глюкозы при 37 °C. Перед каждым экспериментом, кроме экспериментов с DPI, клетки инкубировали 5 минут с 50 мкМ бикуккуллина для стимуляции электрической активности. Флуоресценция НуPer или SurPer возбуждалась последовательно светом 405 и 488 нм, эмиссию регистрировали при 520 нм каждые; флуоресценцию RGes0 возбуждали при 560 нм, регистрировали при 600 нм. Измерения проводили каждые 3 секунды.

Сигнал синаптических конструкций SurPer2 регистрировали на микроскопе Leica TCS SP2 в растворе Tyrode как указано выше. Флуоресценцию SurPer возбуждали при 488 нм на минимально возможной интенсивности, регистрацию осуществляли в режиме линейного сканирования при 520 нм со скоростью 500 кадров в секунду.

2.2.5 Калибрование индикаторов по pH

Калибрование НуPer и SurPer в клетках проводили в буферах с высоким содержанием K^+ (130 мМ глюконата калия, 20 мМ глюконата натрия, 0.5 мМ $MgSO_4$, 0.2 мМ ЭДТА и 30 мМ Tris (pH 8.1 - 9.0), HEPES (pH 6.9 - 8.0), или MES (pH 6.0 - 6.8)) в присутствии ионофоров 5 мкМ нигерицина и 5 мкМ монензина. Инкубация с каждым буфером произ-

водилась не менее 3-4х минут для уравнивания внеклеточного и внутриклеточного рН.

2.2.6 Компьютерная обработка изображений

Полученные изображения были проанализированы в программе ImageJ. Для расчёта радиометрического сигнала NuPer или SupHer, изображения, полученные при возбуждении флуоресценции индикатора светом 405 и 488 нм, после вычитания фона были переведены в 32х битный формат. Для изображений, соответствующие облучению 405 нм, был установлен порог фильтрования шума, сигнал фона был приравнен к значению NaN (пустое значение). Затем для каждого кадра изображения, полученные при облучении светом 488 нм, были разделены на соответствующие 405-нм изображения. В каждой точке измерялся средний уровень сигнала в выделенной области внутри каждой отдельной клетки.

Изображения, полученные с помощью линейного сканирования, обрабатывали в программе OriginPro с использованием FFT фильтрации шума.

2.2.7 Получение, трансфекция и имаджинг короткоживущих срезов мозга мыши

Приготовление пуль для баллистической трансформации проводилось согласно протоколу производителя (Bio-Rad). 8 мкг 1.6 мкм частиц золота ресуспендировали в 50 мкл 0,05 М спермидина с использованием соникатора для лучшего разделения частиц. К взвеси золота добавили 50 мкг ДНК pSupHer2-C в 50 мкл деионизированной воды, затем при постоянном перемешивании добавили по каплям 100 мкл 1 М CaCl₂ и инкубировали частицы 10 минут при комнатной температуре для осаждения ДНК. Частицы трижды отмывали в 96% этаноле, затем ресуспендировали в 3,5мл ~0,005% раствора поливинил пирролидина на этаноле. Полученную суспензию переместили в предоставленную в наборе пластиковую трубку, предварительно высушенную сжатым азотом, инкубировали 5 минут; затем жидкость убрали 20 мл шприцом, трубку инкубировали 5 минут при постоянном вращении и пропускании через неё азота. Полученную трубку, покрытую частицами золота, нарезали фрагменты длиной ~1.5 см, которые использовали в качестве пуль для генной пушки Gelios Gene Gun. Пули хранили при +4 °С с в присутствии осушителя.

Для получения культуры срезов мозга одного-двух десятидневных мышат C57 Bl/6 декапитировали, мозг извлекали в ACSF на льду; полушария заключали в агарозные блоки и получали фронтальные срезы толщиной 300 мкм на вибротоме. Срезы помещали на бумажную подложку в камеру, наполненную тёплой средой ACSF на 37 °С, аэрированную смесью 95% O₂ + 5% CO₂. Через 5-10 минут проводили баллистическую трансфекцию с помощью генной пушки Helios Gene Gun. Для этого из камеры отбирали раствор так, что-

бы срезы оказались на воздухе; проводили трансфекцию при давлении 240 PSI, затем осторожно возвращали среду в камеру. Срезы инкубировали в течение ночи (10-12 часов).

На следующий день срез перемещали в перфузионную камеру при постоянном протоке ACSF со скоростью ~4 мл/мин, нагреваемой до 35 °С и аэрированной смесью 95% O₂/ 5% CO₂. Регистрация сигнала SynHer2 осуществлялась на конфокальном микроскопе Zeiss LSM 5 Duoscan в режиме линейного сканирования со скоростью 500 кадров в секунду, возбуждении флуоресценции производили светом 488 нм. Стимуляция электрической активности осуществлялась заменой раствора перфузии на ACSF, содержащий 40 мМ KCl.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Регистрация динамики рН в нейронах.

3.1.1 Разработка генетически кодируемого индикатора с повышенной яркостью в клетках.

В нашей лаборатории был разработан флуоресцентный индикатор HyPer, способный количественно определять концентрацию пероксида водорода в живых клетках. Важное преимущество генетически-кодируемых индикаторов - возможность их локализации в определённых клеточных компартментах.

Ранее нами была предпринята попытка измерения уровня пероксида в культуре гиппокампальных нейронов мыши. Было обнаружено, что в трёхнедельной диссоциированной культуре нейронов обнаруживаются колебания сигнала HyPer (Рисунок 3.1). Колебания характеризовались резким падением сигнала индикатора, сопровождающимся фазой восстановления исходного уровня сигнала. Частота колебаний менялась от выделения к выделению и в зависимости от возраста культуры, и составляла от 30 секунд до 2 минут. Более того, ингибитор NADPH оксидазы DPI вызывал резкое понижения сигнала HyPer и подавлял колебания.

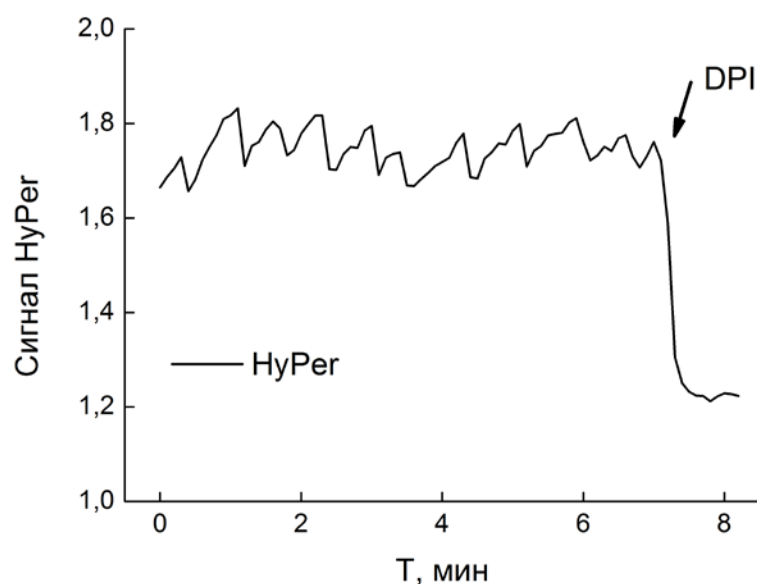


Рисунок 3.1 Изменение сигнала индикатора HyPer в культуре гиппокампальных нейронов. Регистрация осуществлялась сенсором HyPer, экспрессированного в цитоплазме мышечных гиппокампальных нейронов в смешанной диссоциированной культуре. Мы наблюдали периодическое падение и возрастание сигнала в функционирующих нейронах и резкое падение сигнала после добавления 10 мкМ ингибитора NADPH оксидазы DPI.

Тем не менее, позже стало ясно, что сигнал *HuPer* является чувствительным к значению pH среды. При этом, имелись данные об изменении pH в электрически активных нейронах. Поэтому мы решили разработать pH-контроль для проверки сигнала *HuPer* в нейронах. Ранее уже была охарактеризована нечувствительная к пероксиду версия индикатора - *SypHer*, которая успешно применялась в качестве ратиометрического pH индикатора [214]. Однако этот белок обладал очень низкой интенсивностью флуоресценции в клетках, что могло бы стать проблемой при регистрации pH в субклеточных структурах или в толще ткани. Вероятно, по этой причине при попытке вирусной трансдукции гиппокампальных нейронов мыши мы смогли зарегистрировать лишь очень слабый сигнал *SypHer*, малоприспособный для регистрации динамики pH.

Мы решили разработать новый, более яркий pH-индикатор. Для этого мы взяли за основу *HuPer2*, вариант индикатора, разработанный в нашей лаборатории, отличающийся повышенной яркостью в эукариотических клетках [222]. Мы внесли в *HuPer2* замену *Cys199Ser*, поскольку цистеин является ключевым остатком, окисление которого и обуславливает чувствительность индикатора к пероксиду водорода.

Мы проанализировали pH-чувствительность и яркость полученного индикатора, *SypHer2*, в культурах клеток HeLa Kyoto и NIH/3T3 (Рисунок 3.2). Для этого мы использовали метод с добавлением специальных буферных растворов определённого pH, содержащих ионофоры нигерицин и монензин в сочетании с повышенным содержанием K^+ и пониженным содержанием Na^+ и Cl^- . Нигерицин действует в качестве H^+/K^+ антипортера, а монензин в качестве H^+/K^+ антипортера, совместное действие этих ионофоров приводит к уравниванию внутриклеточного значения pH с внешней средой и позволяет калибровать pH индикатор непосредственно в клетках. Это минимизирует возможную погрешность сигнала индикатора вызванным белковым окружением цитоплазмы, по сравнению с калиброванием индикатора в виде выделенного белка.

Сравнение pH-чувствительности индикаторов *HuPer* и *SypHer2* не выявило заметных различий (Рисунок 3.3). Оба индикатора отвечали нарастанием отношения интенсивности флуоресценции, возбуждаемой при 405 и 488 нм, при повышении pH. *SypHer2* обладает pK_a около 8.1, линейным участком приблизительно от pH 7.5 до pH 8.5 с изменением сигнала в 4 раза на этом участке. Такое значение pK_a значительно превышает pH цитоплазмы, ~7.3-7.4, тем не менее, *SypHer2* может количественно измерять pH и в диапазоне pH 6.9-7.5, в котором сенсор изменяет сигнал приблизительно в 2 раза. К тому же, поскольку кривые pH-чувствительности *HuPer* и *SypHer2* практически совпадают (сигнал *HuPer* несколько выше сигнала *SypHer2*, что отражает, видимо, влияние окисления остат-

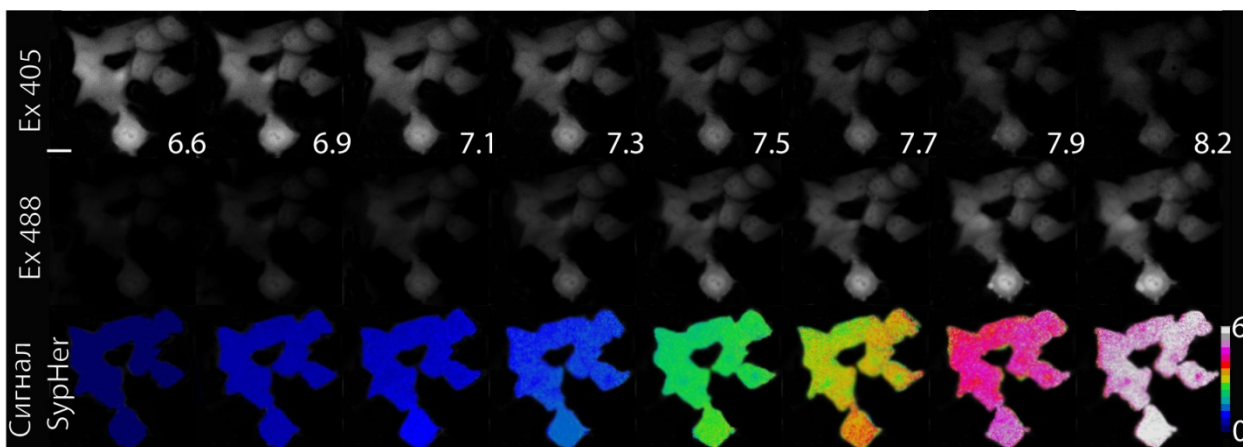


Рисунок 3.2 Калибровка индикатора SypHer 2 в клетках. Представлены фотографии клеток HeLa Kyoto, флуоресценция SypHer в которых возбуждалась светом 405 нм (верхний ряд), 488 нм (средний ряд), а также отношение интенсивности флуоресценции, возбуждаемой при 488 и 405 нм. Величина сигнала индикатора отображена псевдоцветами как указано на цветовой шкале в правом нижнем углу. Цифрами обозначены значения pH калибровочных буферов. Шкала 25 мкм.

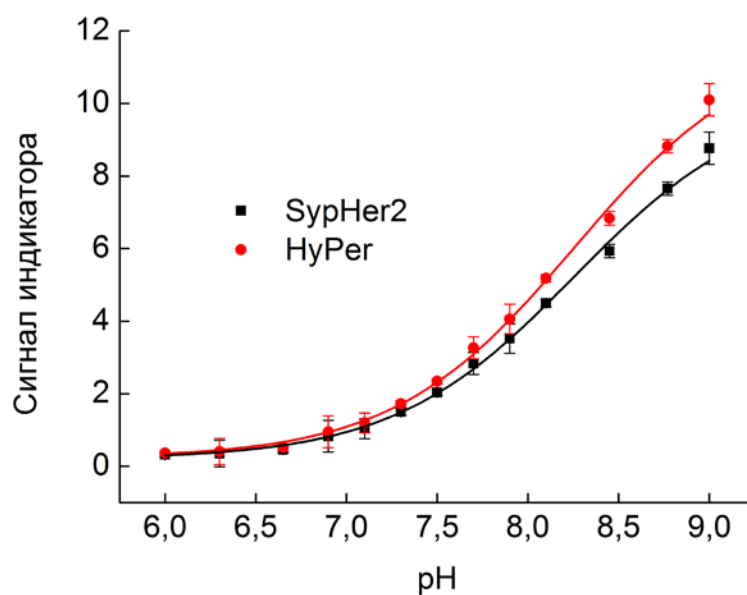


Рисунок 3.3 Калибровка индикатора HyPer и SypHer 2 в клетках. Представлена зависимость сигнала индикаторов в клетках HeLa Kyoto от pH калибровочных буферов. Данные для каждого сенсора были получены не менее чем с 20 клеток. Для каждой точки указана стандартная ошибка среднего.

ка цистеина индикатора), SypHer2 является оптимальным кандидатом для контроля pH в экспериментах с HyPer.

Мы заметили, что HyPer2 по неизвестным пока причинам, обладает более яркой флуоресценцией в клетках эукариот, чем исходный вариант HyPer. Сравнение интенсивностей флуоресценции SypHer и SypHer2 на клетках HeLa Kyoto и NIH/3T3 также показало, что новый вариант pH-индикатора обладает более чем вдвое большей интенсивностью

флуоресценции, чем исходный (Рисунок 3.4). Это достаточно интересное наблюдение, учитывая что выделенный белок SypHer2 не отличается по яркости от SypHer. Одной из возможных причин может являться то, что точечная замена A233V каким-то образом стабилизирует структуру SypHer2, замедляя его деградацию в клетке. Как бы то ни было, мы считаем такое увеличение интенсивности значительным, так как это позволяет более точное определение рН при измерениях с высоким уровнем шума.

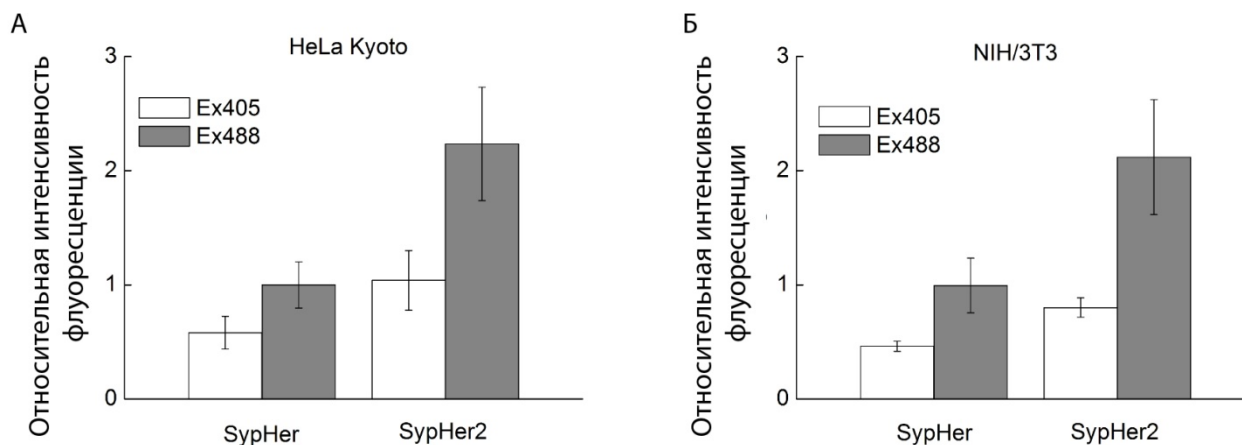


Рисунок 3.4 Сравнение яркости индикаторов SypHer и SypHer2. Показана относительная средняя интенсивность флуоресценции SypHer, возбуждаемая при 405 и 488 нм в клетках HeLa (А) и NIH/3Т3 (Б). За единицу в каждой клеточной линии была принята интенсивность флуоресценции SypHer, возбуждаемая светом 488 нм. Средняя интенсивность для каждой линии вычислялась не менее чем с 15 клеток, указана стандартная ошибка среднего.

Таким образом, мы получили более яркий по сравнению с SypHer рН-индикатор с радиометрическим сигналом, позволяющий количественное определение рН в клетках. Для нас разработка рН-индикатора на основе НуPer имело особенное значение, поскольку мы планировали использование его не только в качестве рН-индикатора как такового, но и в качестве контроля в экспериментах с измерением уровня пероксида с помощью сенсора НуPer. В том числе, мы хотели узнать, регистрировал ли НуPer колебания пероксида или же рН в экспериментах на культуре нейронов.

3.1.2 Характеристика динамики значения цитоплазматического рН в диссоциированной культуре нейронов.

Следующим этапом нашей работы стала регистрация рН в диссоциированной эмбриональной культуре гиппокампальных нейронов мыши. Для того мы котрансфецировали нейроны векторами, кодирующими SypHer2 и кальциевый индикатор RGeco, который позволял нам наблюдать синаптическую активность клеток по увеличению внутриклеточ-

ной концентрации кальция. RGeco нами был выбран потому, что его сигнал, интенсивность флуоресценции в красном диапазоне спектра, не перекрывается с сигналом SyrHer.

Следует отметить, что в условиях нашего эксперимента индикатор RGeco позволяет измерять только массовый всплеск активности нейронов, когда происходит одновременное возбуждение всех нейронов на чашке и длится до нескольких секунд. Такая модель симулирует в культуральной чашке эпилептическую припадочную активность [239], хотя подобные "всплески" активности могут в некоторых условиях наблюдаться и в нормально функционирующем мозге [130].

Известно, что в культуре нейронов нередко наблюдается спонтанная активность, которая выражается в одновременной активации потенциала действия всей популяции нейронов [240,241]. Действительно, при определённых условиях мы наблюдали спонтанные вспышки активности в культуре, однако их вероятность их появления варьировала в зависимости от возраста культуры и менялась от препарата к препарату. Чтобы стимулировать спонтанную активность, мы добавляли в культуральную чашку 50 мкМ бикуккуллина, ингибитора ГАМК рецепторов, перед каждым экспериментом. Съёмку производили каждые 3 секунды. Для количественного определения значений рН в конце каждого эксперимента производилась калибровка индикатора в клетках в калибровочных буферах в присутствии ионофоров (рН 7.1 - 7.5) как было указано выше.

Регистрация сигнала SyrHer2 в активной культуре нейронов показала, что показатель рН меняется с периодичностью и амплитудой, повторяющей изменение сигнала индикатора НуPer, наблюдаемое ранее (Рисунки 3.5, 3.6). Исходный уровень рН в клетках составлял ~ 7.4. Приблизительно 1-2 раза в минуту рН падало на 0.1 единицу, после чего плавно достигало исходного значения. Параллельная регистрация активности нейронов и цитоплазматического рН показали: закисление происходило сразу после момента входа кальция в клетку (Рисунок 3.5). Это говорит о том, что падение рН связано со спонтанной электрической активностью нейронов. Это подтверждается тем, что добавление ингибитора Na⁺ каналов тетродотоксина или внутриклеточного хелатора кальция ВАРТА-АМ полностью подавляло как вход кальция в клетку, так и изменения внутриклеточного рН.

Очевидно, изменения сигнала НуPer, зарегистрированные нами ранее, соответствуют изменению рН, а не изменению концентрации пероксида водорода. Это подтверждает необходимость применения рН контроля в экспериментах с НуPer, особенно в такой динамичной системе, как нервные клетки. В то же время, сами колебания рН также представляют интерес. Хотя существует много работ, свидетельствующих об изменении рН при долговременной деполяризации мембран, ещё не было проведено количественной оценки этих изменений во время спонтанной активности нейронов.

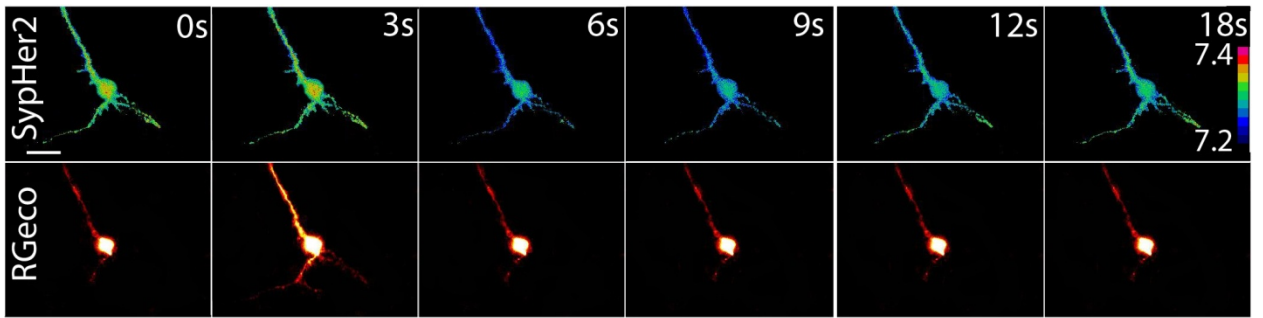


Рисунок 3.5 Регистрация внутриклеточного значения pH и концентрации Ca^{2+} в электрически активной культуре нейронов. Значение pH регистрировали с помощью индикатора SypHer2 (верхняя панель), кальция - с помощью индикатора RGeco (нижняя панель). Значение pH отображено псевдоцветами как указано на цветовой шкале. Цифрами указано время с начала съёмки в секундах, шкала 40 мкм.

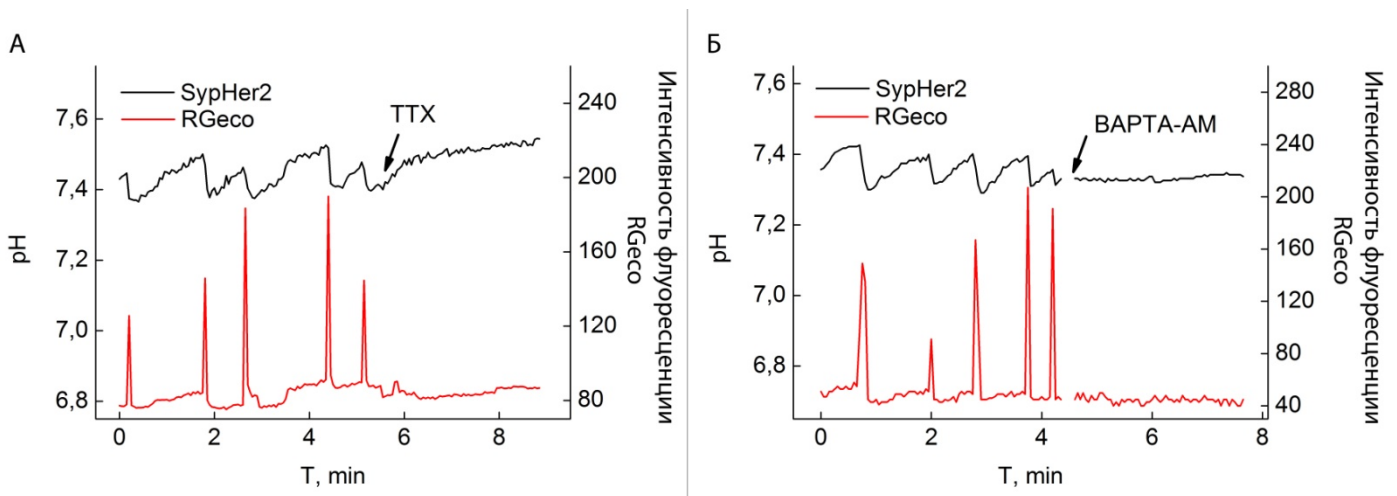


Рисунок 3.6 Регистрация колебаний pH в культуре нейронов. Представлен результат измерения pH и Ca^{2+} в теле отдельных нейронов, котрансфецированных SypHer2 и RGeco. Максимумы на графике интенсивности флуоресценции RGeco соответствуют входу кальция в клетки. Для подавления электрической активности в среду добавляли 100 нМ тетродотоксина, TTX (А), или 1 мМ BAPTA-AM (Б).

Значение цитоплазматического pH 7.4 значительно расходится со значением 6.8, полученным ранее в культуре нейронов с помощью индикатора pHluorin [22]. Этот результат нам трудно объяснить. Ошибка в калибровке индикатора SypHer в клетках маловероятна, поскольку калибровочная кривая практически идентична кривой, полученной для индикатора в форме выделенного белка в буферных растворах (не приведено). В то же время, в упомянутой выше работе электрическая стимуляция нейронов в течение 60 секунд частотой 10 Гц приводила к изменению pH на 0,1 единицу (Рисунок 1.10), что соответствует наблюдаемой нами величине изменения pH в результате всплеска спонтанной активности.

Следует отметить, что в нашем эксперименте съёмка осуществлялась в комнатной атмосфере, а не в присутствии 5% CO_2 . Ион бикарбоната действительно может участво-

вать в регуляции pH за счёт работы Na-зависимых $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ обменников, к тому же карбонатный буфер, среди прочего, определяет буферную ёмкость цитоплазмы [13]. Однако, мы убедились, что в присутствии 5% CO_2 и 20 мМ HCO_3^- в среде имаджинга, динамика pH не отличаются существенно ни по форме графика, ни по амплитуде от колебаний, наблюдаемых в комнатной атмосфере. Имеются данные, что основной вклад в регуляцию pH в нейронах вносят Na/H обменники, не зависящие от концентрации бикарбоната [53]. В связи с этим, для простоты мы проводили дальнейшие эксперименты в комнатной атмосфере.

Среди прочих основными причинами закисления цитоплазмы нейронов считают вызванную входом кальция в клетки активацию $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ обменников, или активацию процессов гликолиза вследствие повышения уровня метаболизма активной клетки [24,25].

При активации потенциала действия в нейроне значительно увеличивается внутриклеточная концентрация Ca^{2+} , который затем откачивается в межклеточное пространство, а также в эндоплазматический ретикулум посредством Ca^{2+} -АТФаз и $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменников, часть переносится в митохондрии посредством белков-переносчиков. При этом Ca^{2+} -АТФазы цитоплазматической мембраны (PMCA) и SERCA на эндоплазматическом ретикулуме перемещают один протон в цитоплазму в обмен на ион кальция. Таким образом, в условиях длительного повышения концентрации кальция в цитоплазме Ca^{2+} -АТФазы гипотетически могут вызывать закисление цитоплазмы нейронов.

Мы решили проверить, вызовет ли ингибирование Ca^{2+} -АТФаз изменение характера колебаний pH (Рисунок 3.7). В наших условиях, ни добавление 500 мкМ LnCl_3 , ингибирующего PMCA, ни 10 мкМ тапсигаргина, ингибитора SERCA, не вызвало видимых изменений в амплитуде или частоте изменений внутриклеточного pH, хотя об ингибировании SERCA можно судить по увеличению фоновой флуоресценции RGeco, соответствующей увеличению внутриклеточной концентрации кальция в клетке. Добавление более 1 мМ LnCl_3 подавляло нервную активность, по-видимому, за счёт общего нарушения входа кальция в пресинаптическое окончание и высвобождения медиатора. Таким образом, активность кальциевых АТФаз не является основной причиной связанного с активностью закисления цитоплазмы нейронов.

Другой причиной закисления цитоплазмы во время длительной деполяризации мембраны может являться активация гликолитических процессов. Исследователями было показано, что активация различных АТФаз - Na^+/K^+ насоса, Ca^{2+} -АТФаз и протонного насоса синаптических везикул - приводит к ускоренному потреблению АТФ, что, в свою очередь, вызывает ускорение катаболических процессов [242,243]. В ходе гликолиза одна молекула глюкозы превращается в две молекулы пировиноградной кислоты с выделением

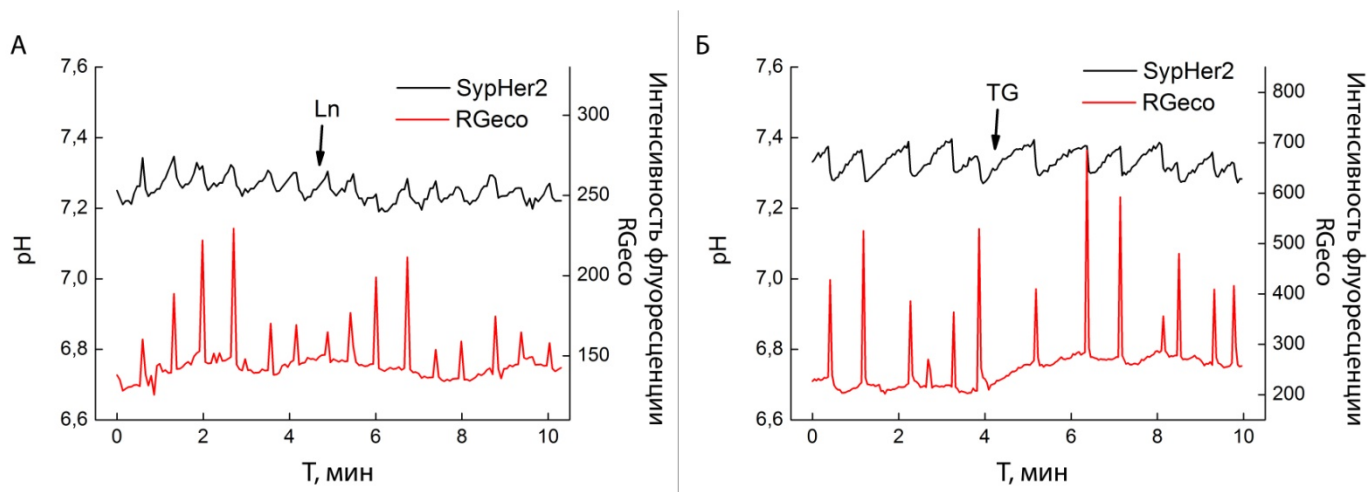


Рисунок 3.7 Ингибирование Ca^{2+} -АТФаз не влияет на характер колебаний рН в культуре нейронов. Представлен результат параллельного измерения рН и уровня Ca^{2+} теле нейрона, котрансфецированного SypHer2 и RGeCo. Стрелкой указан момент добавления 0,5 мМ LnCl_3 (А) или 10 мкМ тапсигаргина (Б) для подавления PMCA и SERCA, соответственно.

двух протонов. Следовательно, периодическая активация гликолиза может приводить к колебаниям значения рН.

Для проверки этой гипотезы мы заменяли среду имаджинга с содержанием 10 мМ D-глюкозы на среду, содержащую 1 мМ дезоксиглюкозы, обратимого ингибитора фосфоглюкоизомеразы, и 20 мМ пирувата в качестве источника энергии (Рисунок 3.8). После замены среды мы наблюдали двукратное уменьшение амплитуды рН-колебаний через 4 минуты после смены среды. При этом наблюдалось постепенное падение среднего значения рН, что, вероятно, является следствием активации протон-зависимого транспорта пирувата в клетку. Уменьшение амплитуды колебаний рН могло бы объясняться снижением электрической активности за счёт нарушения везикулярного транспорта в пресинаптических окончаниях [17]. Тем не менее, мы не заметили существенного изменения характера электрической активности, о чём свидетельствует динамика внутриклеточной концентрации кальция. Неполное подавление рН-колебаний может объясняться неполным подавлением гликолиза за время съёмки или существованием других причин закисления цитоплазмы.

Таким образом, замена D-глюкозы на пируват и ингибирование процесса гликолиза приводит к частичному подавлению колебаний рН, в то время как ингибирование Ca^{2+} -АТФаз не приводило к существенному изменению характера рН-колебаний. Это наблюдение является достаточно важным, поскольку позволяет предсказывать механизм процессов, происходящих в нейронах как в норме, так и во время эпилептической активности. Закисление, наблюдаемое нами во время всплесков активности в культуре нейронов, мо-

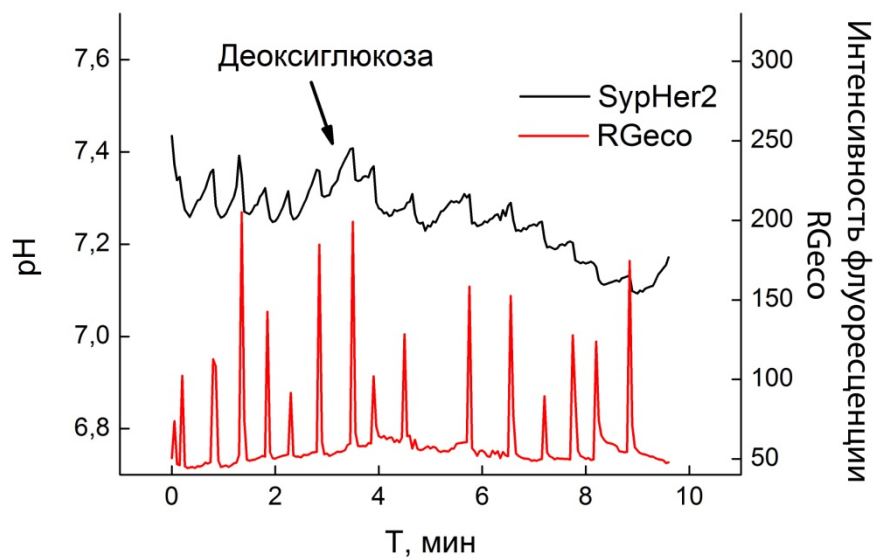


Рисунок 3.8 Влияние ингибирования гликолиза на характер колебаний pH в культуре нейронов. Представлен результат параллельного измерения pH и уровня Ca^{2+} теле нейрона, котрансфецированного SypHer2 и RGeCo. Стрелкой указан момент замены среды имаджинга на содержащую 1 mM дезоксиглюкозы и 20 mM пирувата.

жет иметь регуляторное значение, поскольку активность многих ионных каналов, участвующих в передаче электрического импульса, является pH-зависимой. Кроме того, в случае продолжительных припадков и нарушения работы pH-регуляции в нейронах, закисление цитоплазмы нейронов может приводить к нарушению функционирования клеток, и знание причины нарушения гомеостаза может способствовать обнаружению мишеней для осуществления терапии нервных заболеваний.

3.1.3 DPI вызывает закисление цитоплазмы нейронов

Мы уделили внимание ещё одному эффекту, зарегистрированному в нейронах с помощью биосенсора NuPer, но, по-видимому, не относящемуся к электрической активности. Как было указано в начале главы, добавление DPI вызвало значительное падение сигнала индикатора NuPer в нейронах в течение нескольких минут. Дифенилен йодониум широко используется в мире в качестве ингибитора NADPH оксидазы [111,244]. Ввиду значительной pH-чувствительности сигнала NuPer, мы проверили, вызывает ли DPI закисление в нейронах.

Оказалось, добавление 10 мкМ DPI вызывает быстрое падение цитоплазматического значения pH на ~0.4 единицы до pH 7.0 (Рисунок 3.9). Данные о закислении цитоплазматического pH в нейронах подтверждались с помощью химического pH-индикатора BCECF-AM (не приведено). Падение pH в ответ на DPI наблюдалось при добавлении 1

мкМ вещества и более. Поскольку, как известно из литературы, константа ингибирования NADPH оксидаз для DPI составляет порядка 100 нМ [245], наблюдаемый нами эффект едва ли можно считать следствием подавления продукции АФК.

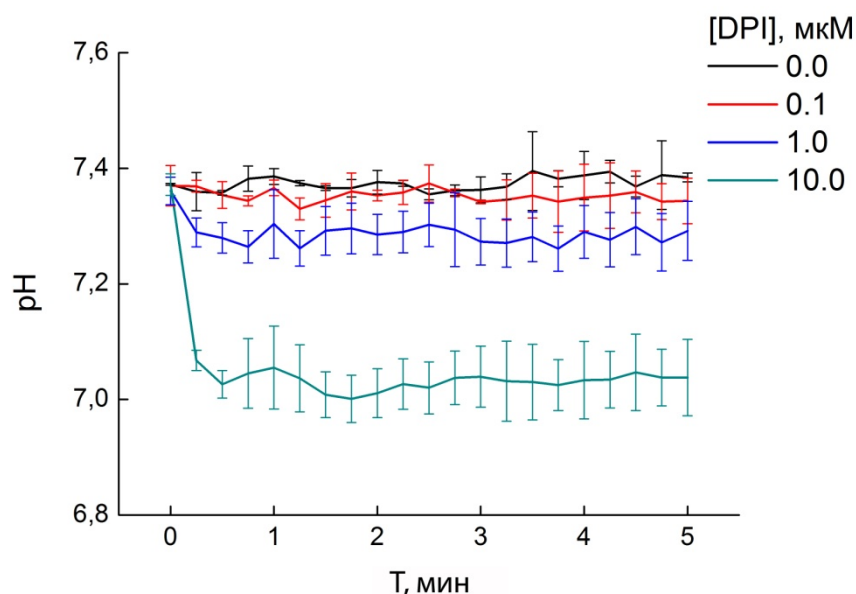


Рисунок 3.9 Зависимость закисления цитоплазмы нейронов от концентрации DPI в среде. Представлены графики среднего значения внутриклеточного pH, измеренного в группе (3-4) нейронов с помощью *SyrHer2* после добавления DPI до указанной в легенде концентрации; указана стандартная ошибка среднего.

Нам не удалось определить, каков механизм столь сильного закисления цитоплазмы. То, что DPI действительно вызывал закисление, подтверждалось нами в экспериментах с использованием химического индикатора pH - BCECF. Гипотеза о том, что DPI в больших концентрациях может играть роль ионофора, не подтвердилась, поскольку характер закисления мало зависел от концентрации Na^+ , Ca^{2+} и Cl^- , а также pH раствора имаджинга. Известно, что DPI способен нарушать работу дыхательной цепи митохондрий [136], но непонятно, может ли это являться причиной закисления цитоплазмы. Следует заметить, что добавление протонного разобщителя CCCP также вызывало быстрое закисление цитоплазмы нейрона, сопоставимого с наблюдаемым в случае использования DPI (данные не приведены).

Тем не менее, за последнее десятилетие было опубликовано значительное количество работ, в котором авторы использовали микромолярные концентрации DPI и не проверяли возможного влияния pH на полученные результаты [109,111,246]. Мы надеемся, что наши данные будут побуждать исследователей относиться с осторожностью к интерпретации результатов, полученных ранее с использованием высоких концентраций этого вещества.

Таким образом, с помощью нового индикатора SypHer2 нам удалось зарегистрировать и количественно охарактеризовать спонтанные колебания pH в культуре нейронов, а также показали участие метаболических процессов в их формировании. Мы задались вопросом, если в пре- и постсинаптических структурах происходят разные метаболические процессы, отличается ли характер колебаний pH в этих компартментах.

3.1.4 Получение синаптических конструкций с SypHer2

Как известно, в синапсах происходят ключевые процессы передачи сигнала в нейронах. В синаптических окончаниях сосредоточены комплексы ионных каналов и регуляторных белков, обеспечивающих поддержание ионных градиентов, транспорт нейромедиаторов, и выполняющих иные процессы, обуславливающие синаптическую передачу. Кроме того, нередко синаптические структуры оказываются структурно обособлены в клетке, как это происходит с дендритными шипиками гиппокампальных нейронов, что способствует образованию микроокружения, уникального для каждого синапса. Суммируя указанные особенности, мы предполагаем, что биохимические параметры, в том числе и pH, могут изменяться независимо друг от друга в синаптических компартментах.

В связи с этим, мы поставили перед собой задачу получить варианты SypHer2, локализующиеся в пре- и постсинаптических окончаниях, и количественно оценить в этих компартментах изменения pH, связанные с активностью. Для разработки индикатора с пресинаптической локализацией мы присоединили SypHer2 к С-концу мембранного белка синаптических везикул Synaptophysin через гибкий 22-аминокислотный линкер, так чтобы SypHer2 находился на цитоплазматической стороне мембраны. Этот белок мы выбрали благодаря его специфической локализации в синаптических компартментах и поскольку он уже был успешно применён для локализации других флуоресцентных индикаторов [22]. Для достижения постсинаптической локализации мы присоединили через 13-аминокислотный линкер с С-конца SypHer2 структурный белок постсинаптической плотности Homer1 (PSD-Zip45) (Рисунок 3.10). Homer1 - тетрамерный белок, участвующий в организации постсинаптической плотности; белок, меченый GFP, был применяется для идентификации постсинаптических окончаний нейронов [247].

Проекспрессировав Synaptophysin-SypHer2 в культивируемых гиппокампальных нейронах, мы наблюдали небольшие включения флуоресцирующего белка в аксонах нейронов, при этом флуоресценции индикатора в теле и дендритах нейронов не наблюдалось. В случае белка Homer-SypHer2 мы наблюдали включения индикатора в теле и дендритах при отсутствии сигнала в аксоне нейрона. При этом мы детектировали небольшую фоновую флуоресценцию индикатора, отражающую, по-видимому, фракцию Homer1, не участ-

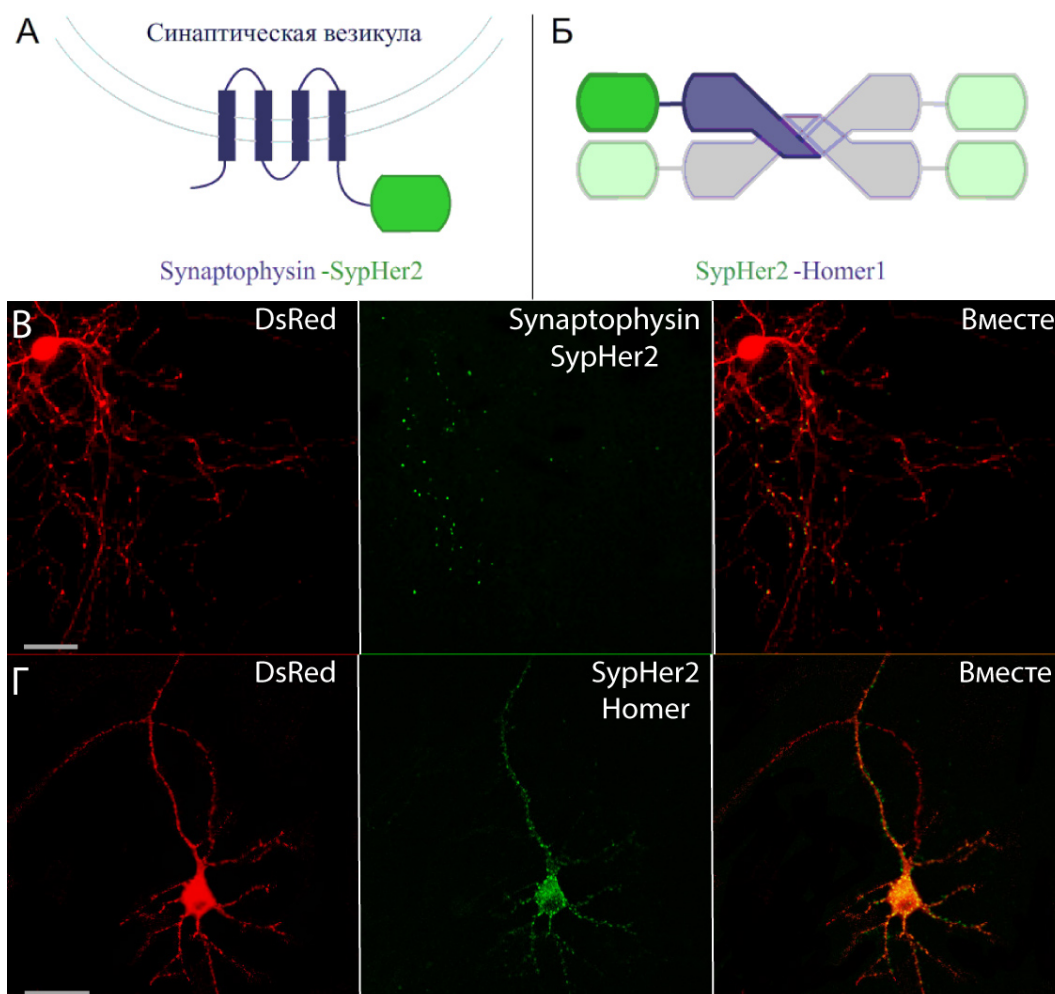


Рисунок 3.10 Синаптическая локализация SypHer2 в нейронах. *А) Схема гибридного белка Synaptophysin-SypHer2, локализованного на мембране синаптической везикулы в пресинаптическом окончании. Б) Схема гибридного белка SypHer2-Homer1, локализованного в постсинаптическом окончании; на рисунке изображён тетрамерный комплекс белка. В, Г) Фотографии гиппокампальных нейронов в культуре, котрансфицированных DsRed и Synaptophysin-SypHer2 (Б) или SypHer2-Homer1 (В). Экспрессия красного флуоресцирующего белка DsRed осуществлялась для рассмотрения морфологии нейронов. Масштаб 40 мкм.*

вующую в формировании постсинаптической плотности. Эти результаты хорошо согласуются с данными по экспрессии флуоресцентно меченых белков Synaptophysin и Homer1, известными из литературы [248,249].

Регистрация сигнала синаптически локализованных индикаторов в активной культуре гиппокампальных нейронов позволила нам обнаружить различия в динамике рН в пре- и постсинаптических структурах (Рисунок 3.11). В пресинаптическом окончании мы наблюдали изменения рН в пределах 0.1 единицы рН, что согласуется с данными, полученными для индикатора с цитоплазматической локализацией. В то же время, сигнал сенсора, локализованного с Homer1 в дендритах, как правило показывал практически вдвое большую амплитуду колебаний, до 0.2 единиц рН. Это наблюдение было справедливо в различных препаратах нейронов и независимо от среднего значения цитоплазматического

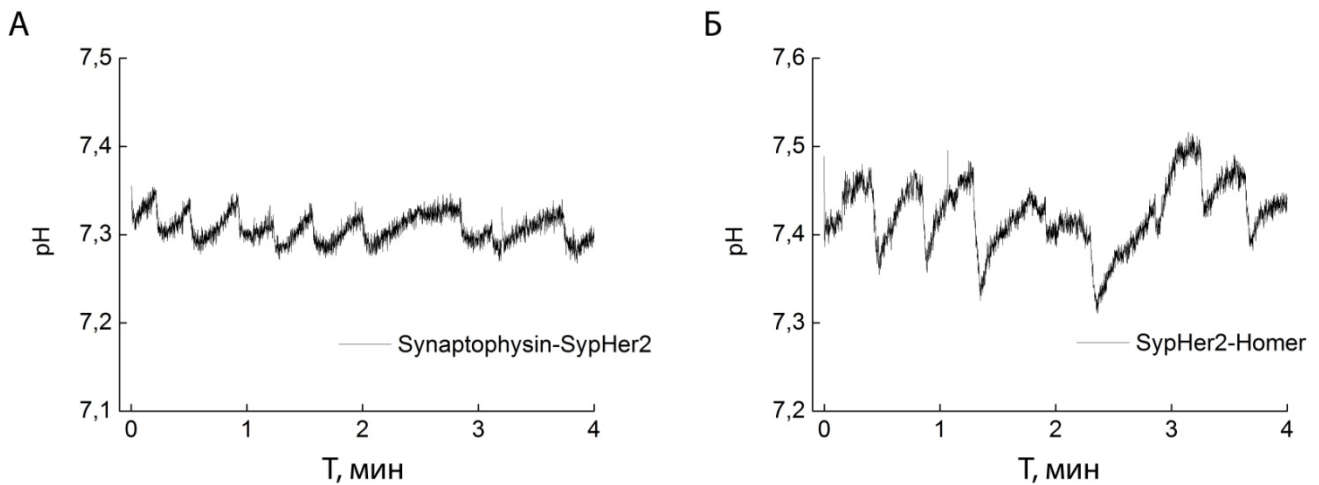


Рисунок 3.11 Регистрация колебаний рН в синаптических окончаниях нейронов в культуре. Представлен результат измерения спонтанных колебаний рН в нейронах, трансфицированных Synaptophysin-SypHer2 (А) и SypHer2-Homer (Б). Максимумы на графике интенсивности флуоресценции RГесо соответствуют входу кальция в клетки.

рН. Кроме того, если анализировать форму графиков, в постсинаптическом окончании переход от закисления к восстановлению выражен более отчётливо, а кривые, соответствующие восстановлению рН, показывают значительно большую скорость роста сигнала.

Таким образом, по нашим наблюдениям колебания рН в постсинаптических окончаниях оказались значительно более выражены, чем в цитоплазме и пресинаптических окончаниях нейронов. Из наших предыдущих экспериментов мы предположили, что ускорение метаболических процессов, в частности гликолиза, является основной причиной закисления цитоплазмы в нейронах. Возможно всплески активности вызывают большее потребление энергии в постсинаптических окончаниях и, как следствие, более активное протекание метаболических процессов. Действительно, анализ потребления кислорода в срезах мозга показал, более половины энергетических затрат нейронов является прямым следствием активации ионных токов через NMDA рецепторы и генерации постсинаптического потенциала [250]. Разница в скорости восстановления рН после закисления в синаптических структурах может свидетельствовать о более активной работе системы рН-регуляции в постсинаптических окончаниях. Возможно это выражается в более высокой концентрации белков-регуляторов рН, таких как Na/H обменников, как это было показано для NHE5 [48]. Логично предположить, что это является прямым следствием более заметных изменений рН в этих компартментах.

Насколько нам известно, мы впервые показали различие динамики рН в пре- и постсинаптических окончаниях с помощью генетически-кодируемого индикатора. То, что динамика значения рН в активных нейронах отличается в постсинаптических окончаниях и в основном объёме цитоплазмы свидетельствует в пользу гипотезы о существовании ло-

кального микроокружения в постсинаптических структурах, таких как дендритные шипики. Вполне вероятно, что регуляция синаптической передачи в отдельных синапсах может осуществляться на уровне рН, хотя мы пока не смогли зарегистрировать различий в динамике рН в соседних дендритах. Генетически кодируемые биосенсоры позволяют изучение процессов регуляции рН на уровне отдельных клеточных структур, и если изменение рН действительно отражает уровень энергетического потребления в нейроне, это может быть использовано в целях мониторинга метаболической активности в отдельных синапсах.

Однако достаточно ли яркий *SypHer2* для регистрации рН в более сложных системах, таких как срезы мозга?

3.1.5 Экспрессия *SypHer2* в короткоживущих срезах мозга мыши

Увеличение яркости флуоресценции индикатора особенно ценно для имаджинга *in vivo* в условиях высокого уровня шума вследствие автофлуоресценции в тканях и заниженного уровня сигнала вследствие поглощения и рассеивания света. Для проверки эффективности индикатора в первичной культуре нервной ткани, мы осуществили экспрессию *SypHer* под CMV промотором в культуре срезов мозга мыши. Доставка вектора осуществлялась на частицах коллоидного золота путём биолиственной трансфекции.

Нам удалось зарегистрировать флуоресценцию *SypHer2* через 12 часов после трансфекции (Рисунок 3.12). Большинство нейронов, расположенных на поверхности среза, погибли из-за механических повреждений, полученных во время приготовления среза, что выражалось в вакуолизации аксонов и дендритов. Однако яркости флуоресценции индикатора было достаточно, чтобы рассмотреть морфологию нейронов в более глубоких слоях среза, не выказывающих признаков клеточной гибели.

Чтобы проверить функциональность сенсора, мы индуцировали электрическую активность нейронов путём перфузии срезов в присутствии 40 мМ KCl. Из литературы известно [251,252], что такая концентрация K⁺ вызывает деполяризацию нейронов и появление спонтанной, "припадочной" активности, подобной наблюдаемой нами в культуре нейронов.

Действительно, замена базового раствора перфузии на раствор, содержащий 40 мМ KCl, позволила нам наблюдать спонтанные колебания сигнала *SypHer*, которые быстро затухали после возврата исходного раствора перфузии. К сожалению, по техническим причинам нам не удалось откалибровать зависимость сигнала индикатора от рН в срезе. Тем не менее, мы подтвердили, что индуцированная электрическая активность нейронов в

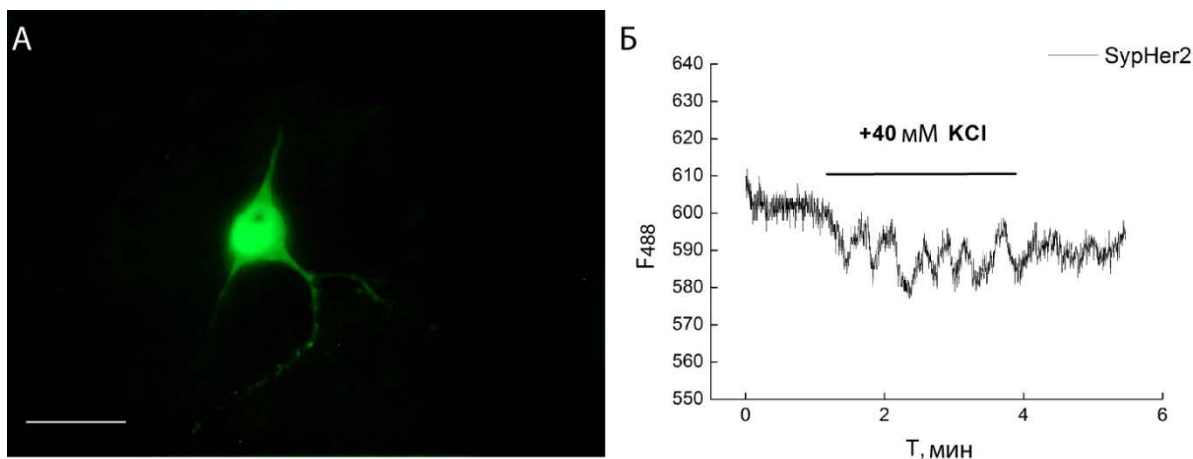


Рисунок 3.12 Экспрессия *SypHer2* и мониторинг динамики рН в гиппокампальных нейронах среза мозга. А) Экспрессия сенсора *SypHer2* в гиппокампальном нейроне в срезе через 12 часов после трансформации с помощью генной пушки. Масштаб 30 мкм. Б) Регистрация флуоресцентного сигнала *HyPer* в гиппокампальном нейроне среза мозга. Черта указывает время перфузии среза раствором, содержащим 40 мМ КСl. Флуоресценцию *HyPer* возбуждали светом с длиной волны 488 нм.

культуре срезов мозга может вызывать спонтанные колебания цитоплазматического рН. Этот результат хорошо согласуется с данными Ren-Zhi Zhan [25], которые в своих исследованиях использовали химический индикатор SNARF.

Таким образом, нам удалось получить более яркую версию рН-индикатора *SypHer* и использовать его в качестве инструмента для регистрации повышенной электрической активности нейронов посредством мониторинга скорости протекания в них метаболических процессов. В дальнейшем мы планируем попытаться использовать индикатор для изучения динамики рН в синаптических компартментах *ex vivo* и *in vivo*.

Роль рН в регуляции метаболизма и синаптической передачи в нейронах активно изучается уже десятки лет, и количество научных открытий в этой области с каждым годом только растёт. Мы уверены, что инструмент для мониторинга рН в нейронах, в том числе, в их синаптических структурах расширит понимание происходящих в нормально функционирующем мозге процессов, а также поможет обнаруживать нарушения в регуляции гомеостаза и физиологической активности нейронов.

Высокая динамичность показателя рН в нейронах затрудняет измерение рН с помощью биосенсора *HyPer*. Сейчас в нашей лаборатории ведётся разработка перекисного индикатора с флуоресценцией в красной области спектра, что позволит регистрировать количество пероксида с учётом вклада рН в изменение сигнала *HyPer*. Однако помимо возможности детекции пероксида водорода, мы считаем не менее важным уделить внимание возможности направленной продукции H_2O_2 в клетке.

3.2 Система для контролируемой локальной продукции пероксида водорода

3.2.1 Оксидаза D-аминокислот может продуцировать пероксид водорода в ответ на добавление D-аланина к клеткам

В качестве кандидата на роль генетически-кодируемого источника АФК мы выбрали дрожжевую оксидазу D-аминокислот (DAO) из *Rhodotorula gracilis*. Как было показано выше, этот фермент окисляет некоторые D-аминокислоты с выделением соответствующих α -кетокислот, иона аммония и пероксида водорода. Выбранная нами DAO используется в промышленности в одной из стадий биосинтеза антибиотика цефамандола из цефалоспоринона-С, поэтому активность фермента и его специфичность к различным D-аминокислотам были хорошо изучены [229,253]. Дрожжевая оксидаза D-аминокислот обладает сравнительно высокой активностью по сравнению аналогичными белками других организмов, к тому же использование животных DAO может привести к их нежелательному взаимодействию с естественными белками-партнёрами в клетке. Кроме того, субстрат оксидазы относительно недорогой и может быть легко введён в организм, например с едой (этот способ, впрочем, может не работать у некоторых животных, экспрессирующих собственную DAO в кишечнике, например, речной карп [225]). При этом собственные D-аминокислоты эукариот не вовлечены в основные биохимические процессы в организме, что снижает риск побочных эффектов от введения D-аминокислот и сверхэкспрессии DAO.

Мы решили проверить, можно ли использовать DAO в качестве генетически-кодируемого инструмента для продукции пероксида водорода в клетках. Для этого мы получили ген дрожжевой оксидазы D-аминокислот, оптимизированный для экспрессии в животных и удалённым сигналом локализации в микротельцах. Затем мы получили гибридные белки, в которых к C- или N-концу DAO через гибкие линкеры присоединили флуоресцентный индикатор пероксида водорода HyPer (или пероксид-нечувствительный вариант, SupHyPer, в качестве контроля на pH). В дальнейшем оказалось, что в случае конструкции, в которой HyPer находился с C-конца DAO, мы не наблюдали изменения сигнала в ответ на добавление D-аланина. При этом HyPer демонстрировал рост флуоресценции в ответ на добавление H_2O_2 , что означало нарушение функции DAO, но не HyPer в гибридном белке. В связи с этим в дальнейших экспериментах мы использовали N-концевую конструкцию, HyPer-DAO.

Мы трансфецировали клетки HeLa Kyoto вектором, кодирующим гибридный белок HyPer-DAO, или смесью плазмид, кодирующих HyPer и DAO (Рисунок 3.13). Наличие

флуоресценции в цитоплазме подтверждало нормальное сворачивание гибридного белка. Добавление 4 мМ D-аланина вызывало рост сигнала HyPer в течение нескольких минут, что соответствует увеличению концентрации перекиси водорода в клетке. Как правило, ~ через 10 минут после добавления D-аланина рост флуоресценции останавливался, а при длительной инкубации часто наблюдалось падение флуоресцентного сигнала на 20-30%. Возможно, падение сигнала было вызвано ингибированием DAO накапливающимися продуктами окисления. Добавление L-аланина вместо D-аланина не приводило к изменениям сигнала (не приведено).

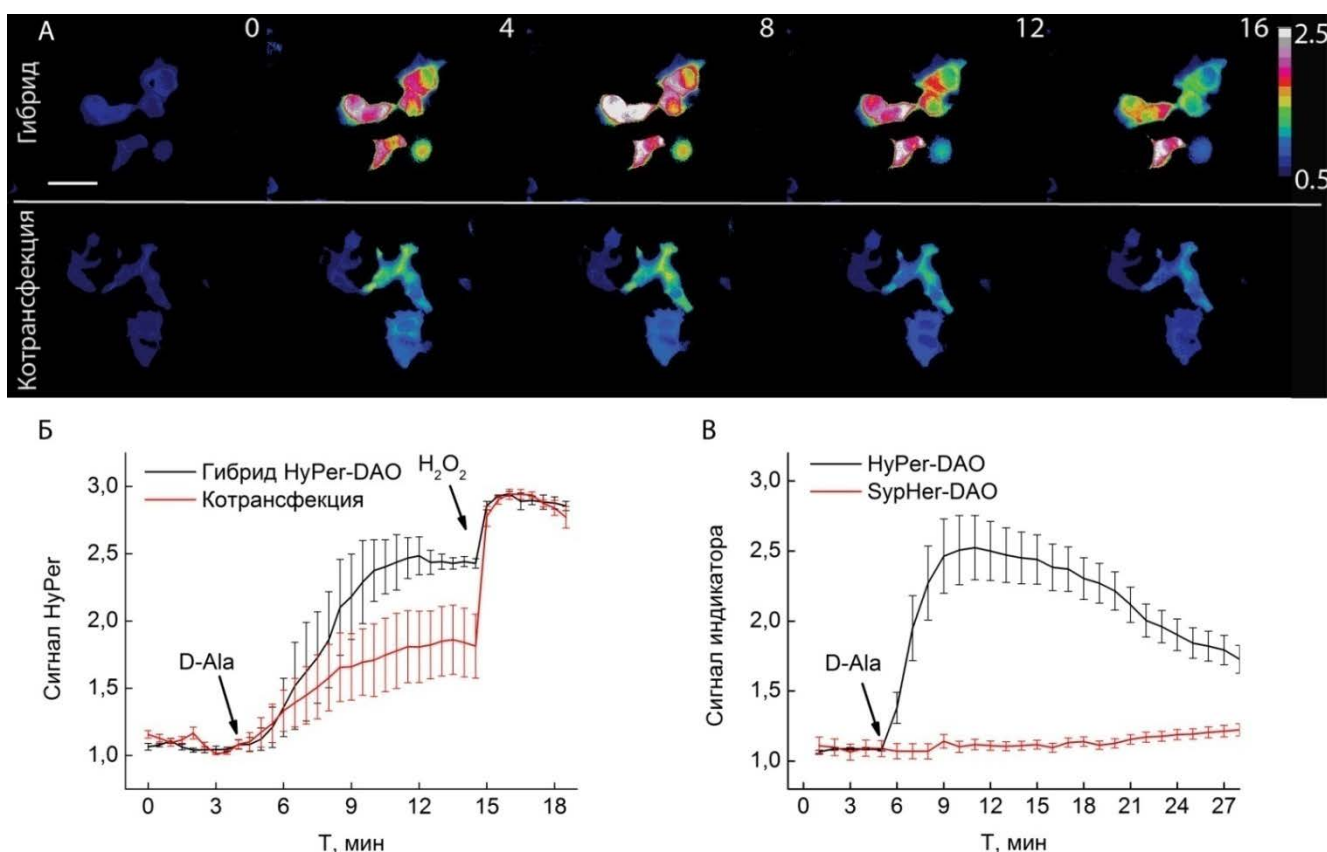


Рисунок 3.13 *Производство пероксида водорода в клетках HeLa Kyoto в ответ на добавление D-аланина. А)* Показаны фотографии клеток HeLa Kyoto, экспрессирующих гибридный белок HyPer-DAO (верхний ряд) или DAO и HyPer отдельно (нижний ряд). Величина сигнала индикатора отображена псевдоцветами как указано на цветовой шкале. Цифрами обозначено время после добавления D-аланина в минутах. Шкала 25 мкм. **Б)** Динамика продукции пероксида водорода в ответ на добавление 8 мМ D-аланина в клетках HeLa Kyoto, трансфицированных гибридным белком HyPer-DAO (чёрный) или котрансфицированных HyPer и DAO в отдельных векторах. **В)** Сравнение сигналов, полученных с помощью гибридных белков HyPer-DAO и пероксид-нечувствительного SypHer-DAO, используемого в качестве рН-контроля. В **Б)** и **В)** представлены значения сигнала HyPer, усреднённые не менее чем по 20 клеткам, указана стандартная ошибка среднего. Стрелки отмечают момент добавления D-аланина до концентрации 8 мМ, или 100 мкМ пероксида водорода.

Мы обнаружили, что максимальное изменение сигнала НуPer в гибридном белке в ответ на добавление D-аланина практически вдвое превышает максимальное увеличение сигнала в системе с коэкспрессией индивидуальных белков. При этом добавление 100 мкМ пероксида водорода для полного окисления НуPer вызывает одинаковый ответ индикатора в обеих системах, что означает, что разница в сигналах не связана с изменением динамического диапазона НуPer в гибридном белке.

Очевидно, объединение НуPer и DAO в единый конструктор приводит к увеличению эффективности окисления НуPer в несколько раз. Этот результат не является неожиданностью, поскольку пероксид водорода является крайне лабильной молекулой и быстро разрушается в клетке ферментами антиоксидантных систем. Это свойство может быть использовано для направленного окисления исследуемого белка, например, для изучения влияния редокс-активных цистеинов на активность киназ или фосфатаз.

Одним из продуктов реакции окисления D-аланина является ион аммония, который гипотетически может приводить к защелачиванию среды, что также может приводить к росту сигнала НуPer вследствие pH-чувствительности его хромофора. Чтобы проверить, вызывает ли добавление D-аланина к DAO-экспрессирующим клеткам изменение внутриклеточного pH, мы трансфецировали HeLa гибридным белком SypHer-DAO. SypHer обладает идентичной pH-чувствительностью с НуPer, при этом нечувствителен к пероксиду водорода, поэтому он являлся оптимальным pH-контролем в нашем эксперименте. В такой системе 4 мМ D-аланина не вызывало изменения сигнала, следовательно, реакция окисления D-аланина DAO в наших условиях не вызывает существенного защелачивания цитоплазмы.

Мы решили проверить, будет ли отличаться чувствительность систем с гибридным белком и свободно экспрессируемой DAO к различным концентрациям D-аланина. Мы ожидали, что при достаточно низких концентрациях D-аланина система с гибридным белком позволит детектировать небольшие количества продуцируемого пероксида водорода, не детектируемые или практически не детектируемые в системе с коэкспрессией индивидуальных белков.

Выяснилось (Рисунок 3.14), что в клетках HeLa Kyoto рост радиометрического сигнала в обеих системах наблюдался только в присутствии в среде 4 мМ D-аланина и более; в присутствии 2 мМ D-аланина продукции пероксида не наблюдалось. К нашему удивлению, в другой клеточной линии, NIH 3T3, мы регистрировали продукцию перекиси водорода уже в присутствии 1 мМ D-аланина. Ещё одно наблюдение заключалось в том, что, максимальный уровень продукции пероксида в двух клеточных линиях наблюдался в при-

сутствии 4 мМ D-аланина, а дальнейшее увеличение концентрации D-аланина нередко приводило к снижению уровня продукции.

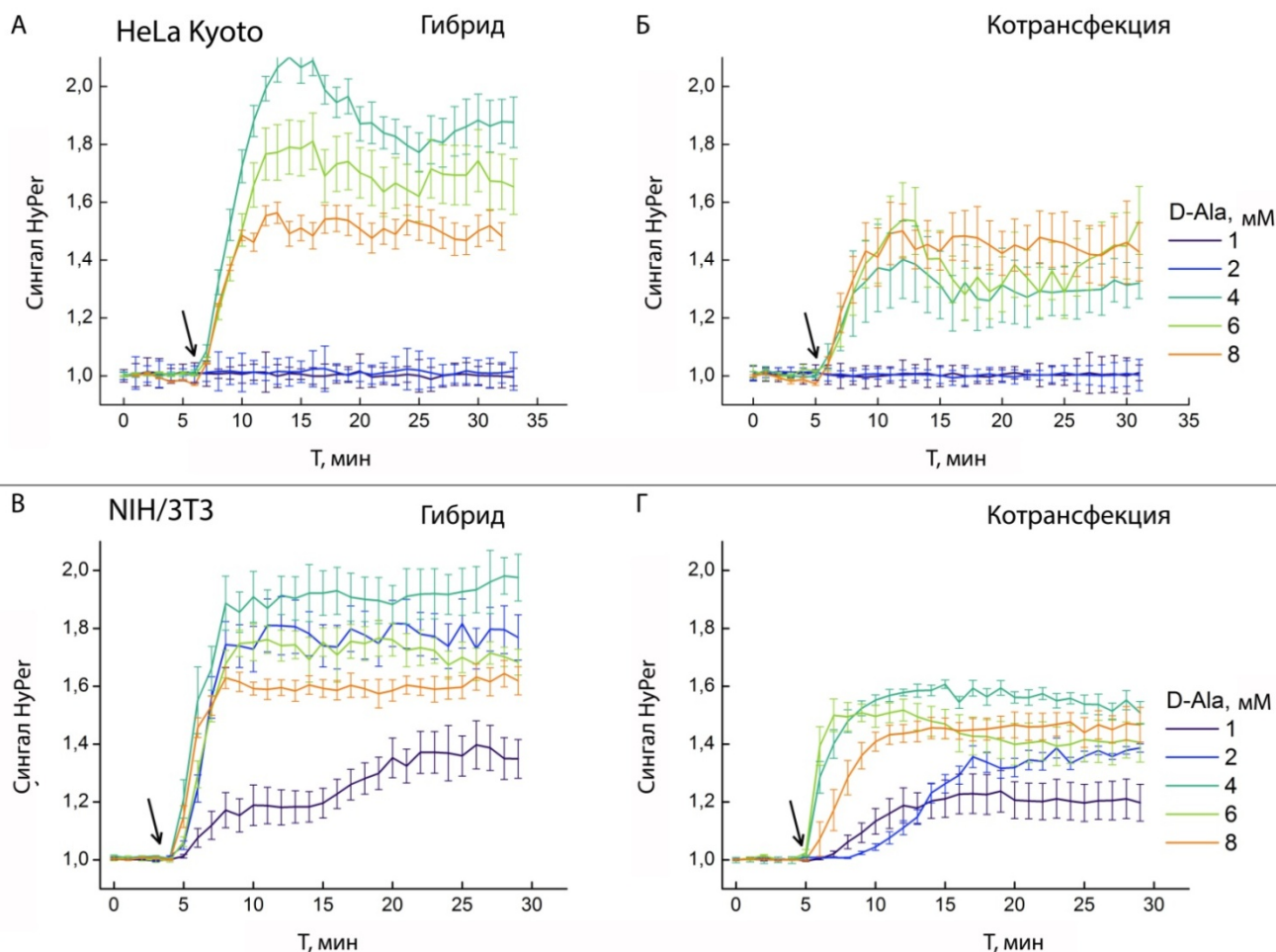


Рисунок 3.14 Зависимость динамики продукции пероксида водорода в клетках *HeLa Kyoto* и *NIH/3T3* от концентрации D-аланина. Представлены значения сигнала *H₂O₂*, усреднённые не менее чем по 20 клеткам *HeLa Kyoto* (А,Б) и *NIH/3T3* (В,Г), указана стандартная ошибка среднего. Стрелка отмечает момент добавления D-аланина до концентрации, указанной в легенде.

По-видимому, в исследованных клеточных линиях транспорт аминокислот осуществляется с различной активностью. Это свойство полезно учитывать в работе с различными тканями или организмами. Мы ожидаем, что в более активно делящихся клетках транспорт D-аланина, а следовательно и эффективность продукции пероксида должны осуществляться более эффективно. Совместная экспрессия DAO и *H₂O₂* позволяет подобрать оптимальные условия для продукции пероксида водорода клетками.

Поскольку дрожжевая DAO обладает относительно низким сродством к D-аланину (~ около 1 мМ по данным литературы [225]), проблема проницаемости клеток может стать существенной для использования нашего инструмента *in vivo*, ведь в клетку проникает только часть добавленного D-аланина. В связи с этим возникает вопрос, можно ли

улучшить проницаемость клеток для D-аминокислот. На основании данных по эффективности транспорта радиоактивно меченых D-аминокислот и селективности оксидазы D-аминокислот мы пришли к выводу, что D-аланин, D-фенилаланин и в меньшей степени D-метионин являются оптимальными субстратами для продукции пероксида водорода в клетках [253,254]. При этом транспорт D-фенилаланина и D-метионина, по-видимому, осуществляется разными транспортными белками (транспортёры аминокислот L- и ASC-типа). Возможно, в некоторых клеточных линиях целесообразно использовать другие аминокислоты, нежели D-аланин. Альтернативным вариантом может стать химическая модификация аминокислот, например, использование сложных эфиров, легче проникающих через клеточную мембрану и разрушающихся внутри клеток с высвобождением аминокислоты. Наконец, ещё одним способом улучшения эффективности продукции пероксида является поиск DAO с более высоким сродством к D-аминокислотам.

Можем ли мы количественно оценить уровень продукции пероксида в клетках? Основываясь на данных, полученных путём калибровки сигнала выделенного белка HyPer в ответ на добавление пероксида водорода, концентрация пероксида водорода, при которой наблюдается полумаксимальное окисление сенсора HyPer, составляет 100-150 нМ. На основании этого мы утверждаем, что использование нескольких миллимоль внеклеточного D-аланина позволяет локально продуцировать в пределах 25 - 250 нМ пероксида, что близко к наблюдаемым в физиологических условиях концентрациям эндогенно вырабатываемых АФК. Для сравнения, чтобы добиться подобной внутриклеточной концентрации пероксида водорода по нашим оценкам необходимо поддерживать постоянную концентрацию внеклеточного H₂O₂ порядка 5-20 мкМ.

3.2.2 Продукция пероксида водорода в нейронах

Получив систему для локальной продукции пероксида водорода, мы решили проверить, можно ли добиться локальной продукции пероксида водорода в синаптических окончаниях. Для этого мы получили конструкцию Synaptophysin-DAO с пресинаптической локализацией и провели котрансфекцию с биосенсором HyPer первичной культуры гиппокампальных нейронов мыши. При разработке конструкции для постсинаптической продукции пероксида водорода мы столкнулись с проблемой сворачивания белка DAO в конструкторе с белком Homer1, в данный момент мы занимаемся оптимизацией конструкции.

Как мы и ожидали (Рисунок 3.15), добавление D-аланина к нейронам вызывало продукцию пероксида в аксонах, но не в дендритах и телах нейронов. При этом рост

сигнала *HuPer* происходил не равномерно по всему аксону, а сначала в небольших участках, и только потом распространялся на остальную его часть. По-видимому, эти небольшие участки соответствуют местонахождению пресинаптических окончаний аксона. Интересно, что даже через значительный промежуток времени пероксидный сигнал распространяется по аксону, но не достигает тела и дендритов нейронов. Это происходит вследствие того, что пероксид водорода разрушается в клетке антиоксидантными системами. Вероятно, это делает возможным локализацию пероксидного сигналинга, т.е. пероксид, вырабатываемый в аксонах и дендритах могут модулировать различные биохимические процессы.

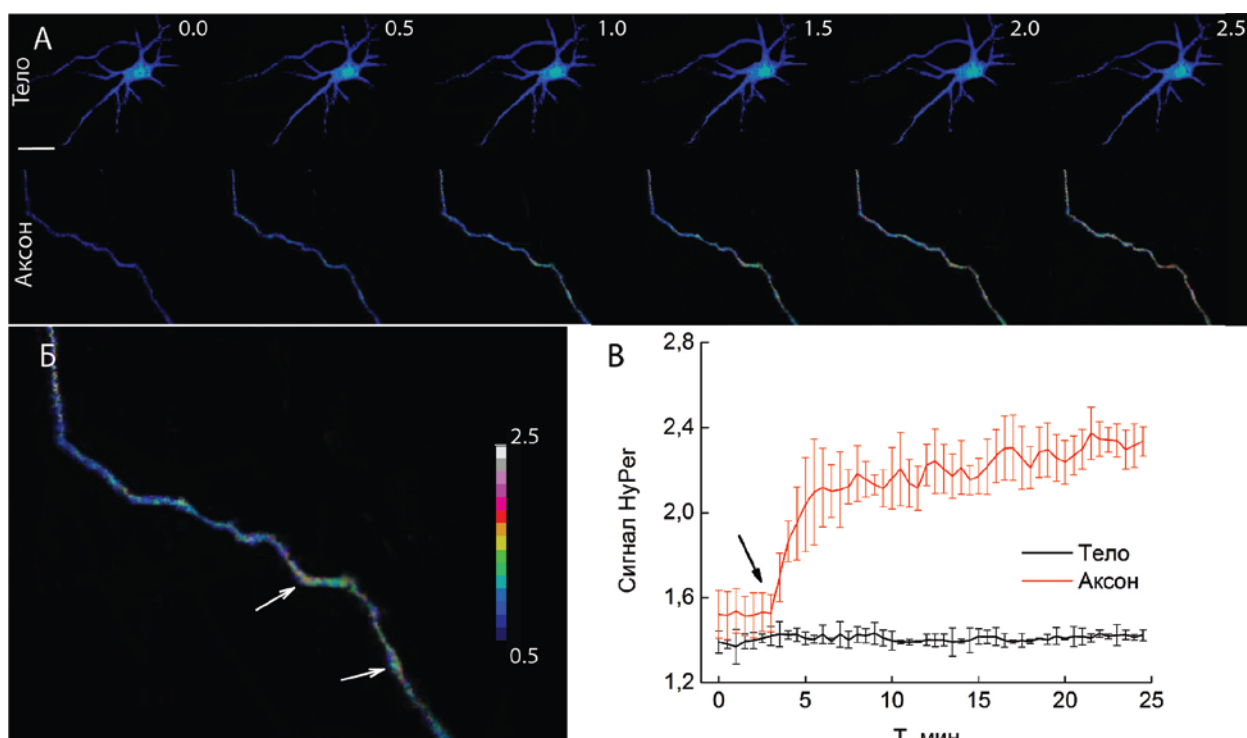


Рисунок 3.15 Визуализация продукции пероксида водорода в аксоне нейрона. *А)* Представлены фотографии тела (верхний ряд) и аксона (нижний ряд) нейрона, котрансфицированного *Synaptophysin-DAO* и *HuPer*. Цифры указывают время в минутах после добавления 4 мМ D-аланина. Масштаб 40 мкм. *Б)* Увеличенная фотография аксона через 1.5 минуты после добавления D-аланина. Стрелками обозначены два участка аксона, в которых наблюдается продукция пероксида водорода. *В А) и Б)* величина сигнала индикатора отображена псевдоцветами как указано на цветовой шкале в *Б)*. *В)* Динамика продукции пероксида водорода *Synaptophysin-DAO* в теле и аксоне нейрона. Представлено среднее значение сигналов от 3х гиппокампальных нейронов, указана стандартная ошибка. Стрелка обозначает момент добавления 4 мМ D-аланина.

Из литературы известны данные о том, что пероксид водорода влияет на выброс нейромедиатора через изменение концентрации кальция в пресинаптических окончаниях [255]. Наличие генетически-кодируемого инструмента для продукции пероксида водорода позволит, например, отделить влияние H_2O_2 в пресинаптических окончаниях на

синаптическую проводимость от других эффекта продукции АФК в постсинаптических и других клеточных структурах. Однако такие исследования потребуют получения высокого процента клеток, экспрессирующих DAO в культуре нейронов. В связи с этим нашими ближайшими задачами помимо разработки новых конструкций DAO, локализованных в постсинаптическом компартменте, станет разработка вирусных векторов для трансдукции нейронов в культуре и *in vivo*.

Мы предполагаем, что DAO может использоваться в трансгенных животных для продукции пероксида водорода, в том числе в мозге. Локальная экспрессия пероксида водорода позволила бы изучать роль АФК в нейродегенеративных заболеваниях и старении и тестировать лекарства, в том числе на основе антиоксидантов. При этом не стоит забывать про присутствие естественных D-аминокислот, например, D-серина в мозге: во взрослом мозге концентрация D-серина может достигать порядка 300 нм/г мокрого веса головного мозга. Оверэкспрессия DAO может вызывать некоторые изменения в регуляции работы MNDA-рецепторов, следовательно, и в поведении животных, а также повышать фоновую продукцию пероксида водорода, поэтому необходимые контроли должны быть соблюдены. С другой стороны, метаболизм D-аминокислот эукариот сосредоточен в пероксисомах, поэтому концентрация D-аминокислот в цитоплазме крайне мала, и продукция активных форм кислорода цитоплазматической DAO, вероятно, будет незначительна.

Таким образом, мы показали, что оксидаза D-аминокислот в сочетании с HyPer позволяют направленно продуцировать и визуализировать пероксид водорода в клетках животных. По нашим данным, на сегодняшний день это единственная в своём роде система контролируемой продукции пероксида водорода в клетках. Нам удалось стимулировать продукцию пероксида водорода в пресинаптических окончаниях нейрона и показать, что продуцируемый пероксид быстро разрушается и не распространяется на тело и дендриты того же нейрона. Такая система значительно расширяет возможности изучения пероксидного сигналинга и окислительного стресса в различных клеточных компартментах. В дальнейшем мы планируем опробовать полученный инструмент *in vivo* и исследовать эффект продукции пероксида водорода DAO в синаптических окончаниях на поведение мышей.

Сейчас нейродегенеративные заболевания являются одной из самых главных проблем здравоохранения. Однако применение антиоксидантов может вызвать отрицательные результаты, поскольку пероксид водорода может выполнять важную регуляторную роль в нейронах, в связи с этим необходимо тщательное изучение локализации продукции "вредного" пероксида. Мы уверены, наша система позволит

эффективно находить и проверять мишени для терапии заболеваний, вызванных окислительными повреждениями.

ВЫВОДЫ

1. Получен флуоресцентный индикатор SypHer2, обладающий повышенной яркостью флуоресценции в эукариотических клетках. pK_a сенсора составляет 8,1, отношение пиков возбуждения флуоресценции при изменении значения pH от 7.5 до 8.5 увеличивается в 4 раза. Радиометрический сигнал сенсора позволяет количественно оценивать показатель pH в клетках в режиме реального времени.

2. С помощью нового индикатора зарегистрированы колебания значения внутриклеточного pH в электрически активной диссоциированной первичной культуре гиппокампальных нейронов, а также в нейронах переживающих срезов мозга мыши. Наблюдаемые изменения pH имеют метаболическую природу. Фаза закисления совпадает с возникновением потенциала действия и отражает временное повышение метаболизма, сопряженное с нейрональной активностью.

3. С помощью версий индикатора SypHer2, локализованных в синапсах нейронов, проведена количественная оценка изменений pH в пре- и постсинаптических окончаниях нейронов. Обнаруженные различия в динамике и амплитуде изменений pH в этих компартментах свидетельствуют о высокой степени локализации метаболических процессов в нейронах.

4. Получена рекомбинантная система генерации и детекции пероксида водорода в клетках млекопитающих, основанная на оксидазе D-аминокислот дрожжей, сопряженной с генетически кодируемым сенсором HyPer. Система эффективно продуцирует пероксид водорода в цитоплазме клеток в ответ на добавление D-аланина. Визуализация активности оксидазы осуществляется по изменению сигнала сенсора HyPer.

5. Оксидаза D-аминокислот, локализованная в пресинаптических окончаниях нейронов, позволяет локально повышать уровень пероксида водорода в аксонах, не затрагивая дендриты и тело клетки. При этом диффузии пероксида водорода из аксона в другие компартменты нейрона не происходит, что свидетельствует о высокой активности антиоксидантных систем в нейроне.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нервные клетки - один из самых изучаемых объектов современной биологии. Биохимические процессы, протекающие в отдельных нейронах, определяют их физиологическое состояние и активность, и в совокупности оказывают влияние на важнейшие процессы нервной деятельности, в том числе и на мышление и память, а также могут служить причиной опаснейших нервных заболеваний, от которых по сей день нет лекарства. Новейшие методы молекулярной биологии позволяют создавать инструменты для наблюдения за различными внутриклеточными параметрами живых нейронов, а также модулировать их активность.

В данной работе мы сосредоточились на двух параметрах, способных влиять на синаптическую передачу: рН и уровне активных форм кислорода.

На основе индикатора HyPer2 мы получили генетически кодируемый рациометрический индикатор SynHer2, обладающий более яркой флуоресценцией в клетках, чем его предшественник, и позволяющий количественно измерять значение внутриклеточного рН. Используя Ca^{2+} -индикатор R-Geco, нам удалось обнаружить, что спонтанная синхронная активность нейронов в культуре сопряжена с изменениями рН ~ на 0,1 единицу. При этом похожую динамику рН мы наблюдали в срезах мозга мыши, что может означать, наблюдаемые нами процессы теоретически могут возникать *in vivo*. Мы также провели ингибиторный анализ, который позволяет предполагать, что изменения рН связаны скорее с активацией метаболизма, а не с транспортом ионов кальция, как это ранее считалось. Это наблюдение может иметь терапевтическое значение, поскольку синхронная активность наблюдается в мозге во время эпилептических припадков. Используя генетически кодируемый индикатор можно выяснить, происходят ли изменения рН в интактном мозге оказывают ли они влияние на течение болезни. Одной из наших дальнейших задач будет разработка моделей для исследования динамики рН *in-vivo*.

Используя несомненные преимущества нашего индикатора по сравнению с химическими красителями - возможность локализации индикатора в субклеточных структурах и количественного измерения, мы получили конструкцию с пре- и постсинаптической локализацией и сравнили динамику рН в этих структурах в электрически активной культуре нейронов. Мы обнаружили, что в исследованных компартментах динамика рН различается, причём в постсинаптическом окончании амплитуда рН-колебаний практически вдвое выше, что должно отражать существование различного биохимического окружения в этих структурах. На следующем этапе мы планируем провести анализ изменения рН различных синаптических окончаниях одного и того же нейрона. Если окажется верно, что значение

pH может изменяться независимо в соседних синаптических окончаниях, значит pH может являться одним из регуляторов синаптической активности на уровне отдельных синапсов.

Кроме того мы обнаружили существенный побочный эффект DPI - вещества, которое во многих статьях использовалось как эффективный ингибитор NADPH оксидаз. Хотя нам не удалось установить причину вызванного DPI закисления цитоплазмы нейронов, мы всё же показали, что данные, полученные с использованием микромолярных и выше концентраций DPI, нужно интерпретировать крайне осторожно.

Помимо pH-индикатора, в нашей работе мы получили инструмент для направленной контролируемой продукции пероксида водорода. Для этого мы использовали оксидазу D-аминокислот дрожжей *Rhodospiridium toruloides*, поскольку этот фермент достаточно хорошо изучен, обладает достаточно высокой активностью и константой связывания D-аминокислот и с меньшей вероятностью имеет естественных партнёров в клетке в отличие от животных аналогов.

С помощью биосенсора HyPer мы наблюдали продукцию пероксида водорода в клетках, трансфицированных DAO, в ответ на добавление D-аланина в клеточную среду. Мы показали, что в различных клеточных линиях чувствительность инструмента к внешнему D-аланину различна, что, видимо, связано с различиями в эффективности транспорта D-аминокислот; это свойство нужно учитывать при выборе условий для эксперимента. Помимо этого, мы обнаружили, что белок, присоединяемый к N-кону DAO, окисляется в 2 или более раз эффективнее, чем свободно диффундирующий белок в том же компартменте. Это даёт возможность направленного окисления определённых клеточных белков и одновременно демонстрирует лабильность молекулы пероксида водорода в клетке.

Мы также получили конструкцию для пресинаптической локализации DAO в нейронах. Мы показали, что продуцируемый в аксоне пероксид водорода не попадает в тело и дендриты того же нейрона. Таким образом, DAO может использоваться для изучения перекисного сигналинга в различных клеточных компартментах.

В отличие от экзогенно добавляемых оксидантов или мышей с нокаутированными ферментами-антиоксидантами, DAO позволяет производить перекись в физиологических количествах, различать сигналинг в различных клеточных компартментах и минимизировать риск побочных эффектов, вызванных окислительным стрессом клеток. Исследованная система может быть использована как модель для изучения тонкой редокс-регуляции клеточных процессов, а также для изучения антиоксидантных систем клетки и анализа эффективности антиоксидантных препаратов. Мы уверены, полученный нами инструмент может найти применение как в фундаментальных, так и в прикладных исследованиях.

Таким образом, в нашей работе был усовершенствован инструмент, с помощью которого удалось охарактеризовать явление изменений рН, связанных с физиологической активностью нейронов, а также получен принципиально новый инструмент для модуляции редокс-статуса в клетках путём контролируемой генерации перекиси водорода. Дальнейшей целью мы видим совершенствование полученных систем и разработку моделей *in vivo* для изучения влияния параметров внутриклеточной среды на физиологическую активность и развитие патологий в мозге.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК - активные формы кислорода

ГАМК - γ -аминомасляная кислота

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

мРНК - матричная рибонуклеиновая кислота

ЦНС - центральная нервная система

ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота

АС - аденилатциклаза

ACSF - искусственная спинномозговая жидкость

АМРА - альфа-аминометилизоксазолпропионовая кислота

AMPA - глутаматный рецептор, активируемый АМРА

AraC - цитарабин

АТСС - Американская коллекция клеточных культур

АТФ - аденозинтрифосфат

ВАРТА-АМ - 1,2-бис(2-аминофенокси)этан-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты тетра ацетоксиметиловый эфир

ВСЕСФ-АМ - 2',7'-бис(2-карбоксиитил)-5(6)-карбоксиифлуорисцеина ацетоксиметировый эфир, химический флуоресцентный рН-индикатор

СамКII - кальмодулин-зависимая киназа 2

cAMP - циклический аденозинмонофосфат

CaN - кальциневрин

СССР - карбонил цианид м-хлорфенил гидразон

cGMP - циклический гуанозинмонофосфат

CREB - транскрипционный фактор, связывающий ДНК-последовательность ответа на сигнал cAMP

срYFP - циклически пермутированный YFP

DAO - оксидаза D-аминокислот

D-AP5 - D-2-амино-5-фосфоновалерат

DCFH-DA - дихлорофлуорисцеин диацетат

DMEM - модифицированная Дульбекко среда Игла

DPI - дифенилен йодониум

Duox - двойная оксидаза

EGF - эпидермальный фактор роста

EIPA - этил-изопропил амилорид
ER-эндоплазматический ретикулум
ERK - киназа, регулируемая экстраклеточными сигналами
ETC - электрон-транспортная цепь митохондрий
FAD - флавинадениндинуклеотид
FBS - бычья эмбриональная сыворотка
FFT - быстрое преобразование Фурье
Fos - транскрипционный фактор
GFP - зелёный флуоресцентный белок
GLT - переносчик глутамата
GPX - глутатионпероксидаза
GR - глутатионредуктаза
GRX - глутаредоксин
GSH/GSSG - глутатион восстановленная/окисленная формы
HBSS - раствор солей Хэнкса
HeLa - линия клеток раковой опухоли шейки матки пациентки по имени Henrietta Lacks
HEPES - 2-[4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазин]-этансульфоновая кислота
Hv1 - потенциал-чувствительный протонный канал 1.
IGF - инсулиноподобный фактор роста
InsP3R - рецептор инозитолтрифосфата
JNK - киназа N-конца Jun
LTP - долговременная потенцияция
LTD - долговременная депрессия
MAO - моноаминоксидаза
MAPK - митоген-активируемая протеинкиназа
MES - 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота
NAD/NADH - никотинамидадениндинуклеотид окисленная/восстановленная формы
NADP/NADPH - никотинамидадениндинуклеотидфосфат окисленная/восстановленная формы
NCX - $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменники
NGF - фактор роста нервов
NHE - Na^+/H^+ -обменник
NIH/3T3 - линия раковых клеток, полученная из эмбриональных фибробластов мыши
NMDA - N-метиласпартат
NMDAR - глутаматный рецептор, активируемый N-метиласпартатом

NOS - NO-синтаза
NOX - NADPH оксидаза
ORP1 - глутатионпероксидаза дрожжей
OxyR - бактериальный транскрипционный фактор, сенсор пероксида водорода
PDGF - тромбоцитарный фактор роста
pKa - обратный десятичный логарифм константы диссоциации кислоты
PKA - протеинкиназа А
PKC - протеинкиназа С
PLC - фосфолипаза С
PMA - 4-форбол-12-миристат-13-ацетата
PSI - фунт на квадратный дюйм = 6894,76 Па
PTP - тирозинфосфатаза
PI3K - фосфоинозитид 3-киназа
roGFP - редокс-активный GFP
SERCA - Ca²⁺-АТРаза сарко/эндоплазматического ретикулума
Rac - один из белков семейства малых GTPаз
RyR - рианодиновые рецепторы
SNARF-1 - карбокси-семинафтородафлюор-1, химический флуоресцентный pH-индикатор
SOD - супероксид дисмутаза
Src - нерецепторная тирозинкиназа
TRX - тиоредоксин
TTX - тетродотоксин
Tris - трис(гидроксиметил)аминометан
VAMP - мембранный белок синаптических везикул
VAS2870 - 1,3-бензоксанол-2-ил-3-бензил-3Н-(1,2,3)триазоло(4,5-d)пиримидин-7-ил
сульфид, ингибитор NADPH-оксидаз
VEGF - фактор роста эндотелия сосудов
VGCC - потенциал-чувствительные кальциевые каналы
VGLUT - везикулярный переносчик глутамата
ХО- ксантиноксидаза

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kandel E.R. Principles of Neural Science. 5th ed. New York: McGraw-Hill Medical, 2013. Vol. 45. P. 1709.
2. Purves D. Neuroscience. 5th ed. Sunderland: Sinauer Associates, Inc., 2012. P. 759.
3. Haas J.S., Landisman C.E. Bursts modify electrical synaptic strength // *Brain Res.* 2012/07/10 ed. 2012. Vol. 1487. P. 140–149.
4. Okabe S. Molecular anatomy of the postsynaptic density. // *Mol. Cell. Neurosci.* 2007. Vol. 34, № 4. P. 503–518.
5. Chen Y., Sabatini B.L. Signaling in dendritic spines and spine microdomains // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2012. Vol. 22. P. 389–396.
6. Popoli M. et al. The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission // *Nat. Rev. Neurosci.* 2011.
7. Boehm J. et al. Synaptic incorporation of AMPA receptors during LTP is controlled by a PKC phosphorylation site on GluR1 // *Neuron.* 2006/07/19 ed. 2006. Vol. 51, № 2. P. 213–225.
8. Hoffman D.A., Johnston D. Downregulation of transient K⁺ channels in dendrites of hippocampal CA1 pyramidal neurons by activation of PKA and PKC. // *J. Neurosci.* 1998. Vol. 18. P. 3521–3528.
9. Abraham W.C. How long will long-term potentiation last? // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2003. Vol. 358. P. 735–744.
10. Lisman J., Yasuda R., Raghavachari S. Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation // *Nat. Rev. Neurosci.* 2012.
11. Ly C. V, Verstreken P. Mitochondria at the synapse. // *Neuroscientist.* 2006. Vol. 12. P. 291–299.
12. Kamsler A., Segal M. Hydrogen peroxide modulation of synaptic plasticity // *J Neurosci.* 2003/01/07 ed. 2003. Vol. 23, № 1. P. 269–276.
13. Chesler M. Regulation and modulation of pH in the brain. // *Physiol. Rev.* 2003. Vol. 83. P. 1183–1221.
14. Alvarez V.A., Sabatini B.L. Anatomical and physiological plasticity of dendritic spines. // *Annu. Rev. Neurosci.* 2007. Vol. 30. P. 79–97.
15. Tashiro A., Yuste R. Structure and molecular organization of dendritic spines. // *Histol. Histopathol.* 2003. Vol. 18. P. 617–634.
16. Matsuzaki M. et al. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. // *Nature.* 2004. Vol. 429. P. 761–766.

17. Ikemoto A., Bole D.G., Ueda T. Glycolysis and glutamate accumulation into synaptic vesicles. Role of glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and 3-phosphoglycerate kinase. // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278. P. 5929–5940.
18. Verstreken P. et al. Synaptic mitochondria are critical for mobilization of reserve pool vesicles at *Drosophila* neuromuscular junctions // *Neuron*. 2005. Vol. 47. P. 365–378.
19. Wardle R.A., Poo M. Brain-derived neurotrophic factor modulation of GABAergic synapses by postsynaptic regulation of chloride transport. // *J. Neurosci.* 2003. Vol. 23. P. 8722–8732.
20. Threlfell S., West A.R. Modulation of striatal neuron activity by cyclic nucleotide signalling and phosphodiesterase inhibition // *Basal Ganglia*. 2013. Vol. 3. P. 137–146.
21. Bittner C.X. et al. Fast and reversible stimulation of astrocytic glycolysis by K⁺ and a delayed and persistent effect of glutamate. // *J. Neurosci.* 2011. Vol. 31. P. 4709–4713.
22. Rangaraju V., Calloway N., Ryan T. Activity-driven local ATP synthesis is required for synaptic function // *Cell*. 2014. Vol. 156. P. 825–835.
23. Massaad C.A., Klann E. Reactive oxygen species in the regulation of synaptic plasticity and memory // *Antioxid Redox Signal*. 2010/07/24 ed. 2011. Vol. 14, № 10. P. 2013–2054.
24. Wu M.L. et al. Novel role of the Ca²⁺-ATPase in NMDA-induced intracellular acidification. // *Am. J. Physiol.* 1999. Vol. 277. P. C717–C727.
25. Zhan R.Z. et al. Intracellular acidification induced by membrane depolarization in rat hippocampal slices: roles of intracellular Ca²⁺ and glycolysis // *Brain Res*. 1998/02/25 ed. 1998. Vol. 780, № 1. P. 86–94.
26. Yao H. et al. Intracellular pH regulation of CA1 neurons in Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ isoform 1 mutant mice. // *J. Clin. Invest.* 1999. Vol. 104. P. 637–645.
27. Reynolds I.J., Hastings T.G. Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation. // *J. Neurosci.* 1995. Vol. 15. P. 3318–3327.
28. Xiong Z.Q., Saggau P., Stringer J.L. Activity-dependent intracellular acidification correlates with the duration of seizure activity. // *J. Neurosci.* 2000. Vol. 20. P. 1290–1296.
29. Trapp S. et al. Acidosis of rat dorsal vagal neurons in situ during spontaneous and evoked activity. // *J. Physiol.* 1996. Vol. 496 (Pt 3. P. 695–710.
30. Schwiening C.J., Kennedy H.J., Thomas R.C. Calcium-hydrogen exchange by the plasma membrane Ca-ATPase of voltage-clamped snail neurons. // *Proc. Biol. Sci.* 1993. Vol. 253. P. 285–289.
31. Meech R.W., Thomas R.C. Effect of measured calcium chloride injections on the membrane potential and internal pH of snail neurones. // *J. Physiol.* 1980. Vol. 298. P. 111–129.

32. Inesi G., Tadini-Buoninsegni F. $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ exchange, lumenal Ca^{2+} release and $\text{Ca}^{2+}/\text{ATP}$ coupling ratios in the sarcoplasmic reticulum ATPase // *J. Cell Commun. Signal.* 2013. P. 1–7.
33. DeSantiago J. et al. $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ exchange via the plasma membrane Ca^{2+} ATPase in skeletal muscle. // *Front. Biosci.* 2007. Vol. 12. P. 4641–4660.
34. Werth J.L., Thayer S.A. Mitochondria buffer physiological calcium loads in cultured rat dorsal root ganglion neurons. // *J. Neurosci.* 1994. Vol. 14. P. 348–356.
35. Nelson D.L., Cox M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry* // *Biol. Membr.* 2005. Vol. 4th editio. P. 1100.
36. Wang G.J., Randall R.D., Thayer S.A. Glutamate-induced intracellular acidification of cultured hippocampal neurons demonstrates altered energy metabolism resulting from Ca^{2+} loads. // *J. Neurophysiol.* 1994. Vol. 72. P. 2563–2569.
37. Gaillard S. et al. Characteristics of calcium currents and of pH regulation in Purkinje cells maintained in primary culture. // *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 1989. Vol. 582. P. 38.
38. Pasternack M., Voipio J., Kaila K. Intracellular carbonic anhydrase activity and its role in GABA-induced acidosis in isolated rat hippocampal pyramidal neurones. // *Acta Physiol. Scand.* 1993. Vol. 148, № 2. P. 229–231.
39. Amos B.J., Mathie A., Richards C.D. Activation of group I metabotropic glutamate receptors elicits pH changes in cultured rat cortical glia and neurons // *Neuroscience.* 1998. Vol. 86. P. 1109–1120.
40. Beyenbach K.W., Wieczorek H. The V-type H^{+} ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. // *J. Exp. Biol.* 2006. Vol. 209, № Pt 4. P. 577–589.
41. Gatto C., Milanick M.A. Inhibition of the red blood cell calcium pump by eosin and other fluorescein analogues. // *Am. J. Physiol.* 1993. Vol. 264. P. C1577–C1586.
42. Kosterin S.A. et al. [Effect of inhibitors of energy-dependent Ca^{2+} -transporting systems on calcium pumps of a smooth muscle cell]. // *Ukr. Biokhim. Zh.* Vol. 68, № 6. P. 50–61.
43. Ma E., Haddad G.G. Expression and localization of $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ exchangers in rat central nervous system // *Neuroscience.* 1997. Vol. 79. P. 591–603.
44. R??nicke R. et al. The $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ exchanger modulates long-term potentiation in rat hippocampal slices // *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 2009. Vol. 379. P. 233–239.
45. Siesjö B.K. et al. Extra- and intracellular pH in the brain during seizures and in the recovery period following the arrest of seizure activity. // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1985. Vol. 5. P. 47–57.
46. Gu X.Q., Yao H., Haddad G.G. Increased neuronal excitability and seizures in the $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ exchanger null mutant mouse. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2001. Vol. 281, № 2. P. C496–503.

47. Wakabayashi S., Shigekawa M., Pouyssegur J. Molecular physiology of vertebrate Na⁺/H⁺ exchangers. // *Physiol. Rev.* 1997. Vol. 77. P. 51–74.
48. Diering G.H. et al. Regulation of dendritic spine growth through activity-dependent recruitment of the brain-enriched Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger NHE5 // *Mol Biol Cell.* 2011/05/10 ed. 2011. Vol. 22, № 13. P. 2246–2257.
49. Cordat E., Casey J.R. Bicarbonate transport in cell physiology and disease. // *Biochem. J.* 2009. Vol. 417. P. 423–439.
50. Ruusuvuori E., Kaila K. Carbonic anhydrases and brain pH in the control of neuronal excitability. // *Subcell. Biochem.* 2014. Vol. 75. P. 271–290.
51. Schwiening C.J., Boron W.F. Regulation of intracellular pH in pyramidal neurones from the rat hippocampus by Na⁽⁺⁾-dependent Cl⁽⁻⁾-HCO₃⁻ exchange. // *J. Physiol.* 1994. Vol. 475. P. 59–67.
52. Park H.J. et al. Neuronal expression of sodium/bicarbonate cotransporter NBCn1 (SLC4A7) and its response to chronic metabolic acidosis. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2010. Vol. 298. P. C1018–C1028.
53. Sánchez-Armass S. et al. Regulation of pH in rat brain synaptosomes. I. Role of sodium, bicarbonate, and potassium. // *J. Neurophysiol.* 1994. Vol. 71. P. 2236–2248.
54. Sinning A. et al. Synaptic glutamate release is modulated by the Na⁺-driven Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger Slc4a8. // *J. Neurosci.* 2011. Vol. 31, № 20. P. 7300–7311.
55. Irie T. et al. Chloride concentration in cultured hippocampal neurons increases during long-term exposure to ammonia through enhanced expression of an anion exchanger // *Brain Res.* 1998. Vol. 806. P. 246–256.
56. DeCoursey T.E. Voltage-gated proton channels: molecular biology, physiology, and pathophysiology of the H(V) family. // *Physiol. Rev.* 2013. Vol. 93. P. 599–652.
57. Sheldon C., Church J. Intracellular pH response to anoxia in acutely dissociated adult rat hippocampal CA1 neurons. // *J. Neurophysiol.* 2002. Vol. 87. P. 2209–2224.
58. Sinning A., Hübner C.A. Minireview: pH and synaptic transmission // *FEBS Lett.* 2013. Vol. 587. P. 1923–1928.
59. Tombaugh G.C., Somjen G.G. Differential sensitivity to intracellular pH among high- and low-threshold Ca²⁺ currents in isolated rat CA1 neurons. // *J. Neurophysiol.* 1997. Vol. 77. P. 639–653.
60. Tsukioka M., Iino M., Endo M. pH dependence of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca²⁺ release in permeabilized smooth muscle cells of the guinea-pig. // *J. Physiol.* 1994. Vol. 475. P. 369–375.
61. Ma J. et al. Ryanodine receptor of skeletal muscle is a gap junction-type channel. // *Science.* 1988. Vol. 242. P. 99–102.

62. Chen Y.H., Wu M.L., Fu W.M. Regulation of presynaptic NMDA responses by external and intracellular pH changes at developing neuromuscular synapses. // *J. Neurosci.* 1998. Vol. 18. P. 2982–2990.
63. Brennan A.M. et al. NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. // *Nat. Neurosci.* Nature Publishing Group, 2009. Vol. 12, № 7. P. 857–863.
64. Besancon E. et al. Beyond NMDA and AMPA glutamate receptors: emerging mechanisms for ionic imbalance and cell death in stroke // *Trends Pharmacol. Sci.* 2008. Vol. 29. P. 268–275.
65. Brieger K. et al. Reactive oxygen species: from health to disease // *Swiss Med Wkly.* 2012/08/21 ed. 2012. Vol. 142. P. w13659.
66. Bao L. et al. Mitochondria are the source of hydrogen peroxide for dynamic brain-cell signaling // *J Neurosci.* 2009/07/17 ed. 2009. Vol. 29, № 28. P. 9002–9010.
67. Al-Gonaiah M., Smith R.A., Stone T.W. Xanthine oxidase-induced neuronal death via the oxidation of NADH: Prevention by micromolar EDTA // *Brain Res.* 2009. Vol. 1280. P. 33–42.
68. Murphy M.P. Mitochondrial dysfunction indirectly elevates ROS production by the endoplasmic reticulum // *Cell Metab.* 2013. Vol. 18. P. 145–146.
69. Guzik T.J. et al. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. // *Circ. Res.* 2000. Vol. 86. P. E85–E90.
70. Koppenol W.H. The Haber-Weiss cycle--70 years later. // *Redox Rep.* 2001. Vol. 6. P. 229–234.
71. Davies K.J. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. // *J. Biol. Chem.* 1987. Vol. 262. P. 9895–9901.
72. Wiseman H., Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. // *Biochem. J.* 1996. Vol. 313 (Pt 1. P. 17–29.
73. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. // *Physiol. Rev.* 2002. Vol. 82, № 1. P. 47–95.
74. Winterbourn C.C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. // *Nat. Chem. Biol.* 2008. Vol. 4, № 5. P. 278–286.
75. Poon H.F. et al. Free radicals and brain aging // *Clin Geriatr Med.* 2004/06/09 ed. 2004. Vol. 20, № 2. P. 329–359.
76. Beal M.F. Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases // *Ann Neurol.* 1995/09/01 ed. 1995. Vol. 38, № 3. P. 357–366.

77. Manczak M. et al. Differential expression of oxidative phosphorylation genes in patients with Alzheimer's disease: implications for early mitochondrial dysfunction and oxidative damage // *Neuromolecular Med.* 2004/04/13 ed. 2004. Vol. 5, № 2. P. 147–162.
78. Ciobica A. et al. Oxidative stress in schizophrenia - focusing on the main markers // *Psychiatr Danub.* 2011/10/04 ed. 2011. Vol. 23, № 3. P. 237–245.
79. Rada B., Leto T. Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox Family NADPH oxidases // *Contrib. Microbiol.* 2008. Vol. 15. P. 164–187.
80. Trachootham D., Alexandre J., Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2009. Vol. 8. P. 579–591.
81. Rhee S.G. et al. Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. // *Sci. STKE.* 2000. Vol. 2000, № 53. P. pe1.
82. Rhee S.G. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling // *Science (80-.). American Association for the Advancement of Science*, 2006. Vol. 312, № 5782. P. 1882.
83. Bedard K., Krause K.-H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. // *Physiol. Rev.* 2007. Vol. 87, № 1. P. 245–313.
84. Cadenas E., Davies K.J.A. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging // *Free Radic. Biol. Med.* 2000. Vol. 29. P. 222–230.
85. Yakes F.M., Van Houten B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997. Vol. 94. P. 514–519.
86. Mohsenzadegan M., Mirshafiey A. The immunopathogenic role of reactive oxygen species in Alzheimer disease // *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2012/09/06 ed. 2012. Vol. 11, № 3. P. 203–216.
87. Hu D. et al. Hippocampal long-term potentiation, memory, and longevity in mice that overexpress mitochondrial superoxide dismutase // *Neurobiol Learn Mem.* 2006/11/30 ed. 2007. Vol. 87, № 3. P. 372–384.
88. Liu J. et al. Delaying brain mitochondrial decay and aging with mitochondrial antioxidants and metabolites. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2002. Vol. 959. P. 133–166.
89. Hongpaisan J., Winters C.A., Andrews S.B. Strong calcium entry activates mitochondrial superoxide generation, upregulating kinase signaling in hippocampal neurons // *J Neurosci.* 2004/12/03 ed. 2004. Vol. 24, № 48. P. 10878–10887.
90. Accardi M. V et al. Mitochondrial reactive oxygen species regulate the strength of inhibitory GABA-mediated synaptic transmission. // *Nat. Commun.* 2014. Vol. 5. P. 3168.
91. Nicotra A. et al. Monoamine Oxidase Expression during Development and Aging // *Neurotoxicology.* 2004. Vol. 25. P. 155–165.

92. Wang C.C. et al. Monoamine oxidase a expression is vital for embryonic brain development by modulating developmental apoptosis. // *J. Biol. Chem.* 2011. Vol. 286. P. 28322–28330.
93. Chipana C. et al. Protection against MDMA-induced dopaminergic neurotoxicity in mice by methyllycaconitine: Involvement of nicotinic receptors // *Neuropharmacology*. 2006. Vol. 51. P. 885–895.
94. Blier P., de Montigny C. Serotonergic but not noradrenergic neurons in rat central nervous system adapt to long-term treatment with monoamine oxidase inhibitors. // *Neuroscience*. 1985. Vol. 16. P. 949–955.
95. Barbelivien A. et al. Inhibition of MAO-A activity enhances behavioural activity of rats assessed using water maze and open arena tasks // *Pharmacol Toxicol.* 2001/07/17 ed. 2001. Vol. 88, № 6. P. 304–312.
96. Heinzl B. et al. Ca²⁺/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase // *Biochem J.* 1992/02/01 ed. 1992. Vol. 281 (Pt 3. P. 627–630.
97. Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. // *Biochem. J.* 2001. Vol. 357. P. 593–615.
98. Christopherson K.S. et al. PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. P. 27467–27473.
99. Greent S.J. et al. Nitric Oxide: Cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens // *Immunol. Lett.* 1994. Vol. 43. P. 87–94.
100. Rivera L.R. et al. Deleterious effects of intestinal ischemia/reperfusion injury in the mouse enteric nervous system are associated with protein nitrosylation. // *Cell Tissue Res.* 2011. Vol. 344. P. 111–123.
101. Steinert J.R., Chernova T., Forsythe I.D. Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia // *Neuroscientist.* 2010/09/08 ed. 2010. Vol. 16, № 4. P. 435–452.
102. Jacklet J.W. Nitric oxide is used as an orthograde cotransmitter at identified histaminergic synapses. // *J. Neurophysiol.* 1995. Vol. 74. P. 891–895.
103. Bon C.L., Garthwaite J. On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation // *J Neurosci.* 2003/03/12 ed. 2003. Vol. 23, № 5. P. 1941–1948.
104. Wang W. et al. Signaling by eNOS through a superoxide-dependent p42/44 mitogen-activated protein kinase pathway // *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001/07/10 ed. 2001. Vol. 281, № 2. P. C544–54.
105. Ichikawa M., Nishino T., Ichikawa a. Subcellular localization of xanthine oxidase in rat hepatocytes: high-resolution immunoelectron microscopic study combined with biochemical analysis. // *J. Histochem. Cytochem.* 1992. Vol. 40. P. 1097–1103.

106. Colton C. et al. The effect of xanthine/xanthine oxidase generated reactive oxygen species on synaptic transmission. // *Free Radic. Res. Commun.* 1991. Vol. 14. P. 385–393.
107. Ushio-Fukai M. Localizing NADPH oxidase-derived ROS. // *Sci. STKE.* 2006. Vol. 2006, № 349. P. re8.
108. Girouard H. et al. NMDA receptor activation increases free radical production through nitric oxide and NOX2 // *J Neurosci.* 2009/02/27 ed. 2009. Vol. 29, № 8. P. 2545–2552.
109. Tejada-Simon M. V et al. Synaptic localization of a functional NADPH oxidase in the mouse hippocampus // *Mol Cell Neurosci.* 2005/05/04 ed. 2005. Vol. 29, № 1. P. 97–106.
110. Kishida K.T. et al. NADPH oxidase is required for NMDA receptor-dependent activation of ERK in hippocampal area CA1 // *J Neurochem.* 2005/07/07 ed. 2005. Vol. 94, № 2. P. 299–306.
111. Kishida K.T. et al. Synaptic plasticity deficits and mild memory impairments in mouse models of chronic granulomatous disease. // *Mol. Cell. Biol.* 2006. Vol. 26, № 15. P. 5908–5920.
112. Kleniewska P. et al. The NADPH oxidase family and its inhibitors // *Arch Immunol Ther Exp.* 2012/06/15 ed. 2012. Vol. 60, № 4. P. 277–294.
113. Altenhofer S. et al. The NOX toolbox: validating the role of NADPH oxidases in physiology and disease // *Cell Mol Life Sci.* 2012/06/01 ed. 2012. Vol. 69, № 14. P. 2327–2343.
114. Vignais P. V. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism // *Cell Mol Life Sci.* 2002/11/21 ed. 2002. Vol. 59, № 9. P. 1428–1459.
115. Brown G.E. et al. A novel assay system implicates PtdIns(3,4)P(2), PtdIns(3)P, and PKC delta in intracellular production of reactive oxygen species by the NADPH oxidase // *Mol Cell.* 2003/01/22 ed. 2003. Vol. 11, № 1. P. 35–47.
116. Paik Y.-H., Brenner D.A. NADPH oxidase mediated oxidative stress in hepatic fibrogenesis // *Korean J. Hepatol.* 2011. Vol. 17. P. 251.
117. Schrenzel J. et al. Electron currents generated by the human phagocyte NADPH oxidase // *Nature.* 1998/05/16 ed. 1998. Vol. 392, № 6677. P. 734–737.
118. Kim M.J. et al. Immunohistochemical study of p47Phox and gp91Phox distributions in rat brain // *Brain Res.* 2005/04/05 ed. 2005. Vol. 1040, № 1-2. P. 178–186.
119. Vallet P. et al. Neuronal expression of the NADPH oxidase NOX4, and its regulation in mouse experimental brain ischemia // *Neuroscience.* 2005/04/02 ed. 2005. Vol. 132, № 2. P. 233–238.
120. Lee S.-R. Reversible Inactivation of Protein-tyrosine Phosphatase 1B in A431 Cells Stimulated with Epidermal Growth Factor // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273, № 25. P. 15366–15372.

121. Chiarugi P. et al. Reactive oxygen species as essential mediators of cell adhesion: the oxidative inhibition of a FAK tyrosine phosphatase is required for cell adhesion. // *J. Cell Biol.* 2003. Vol. 161, № 5. P. 933–944.
122. Li Q. et al. Endosomal NADPH oxidase regulates c-Src activation following hypoxia/reoxygenation injury. // *Biochem. J.* 2008. Vol. 411. P. 531–541.
123. Corcoran A., Cotter T.G. Redox regulation of protein kinases // *FEBS J.* 2013/03/07 ed. 2013. Vol. 280, № 9. P. 1944–1965.
124. Sun C. et al. NAD(P)H oxidase inhibition attenuates neuronal chronotropic actions of angiotensin II // *Circ Res.* 2005/03/05 ed. 2005. Vol. 96, № 6. P. 659–666.
125. Zimmerman M.C., Sharma R. V, Davisson R.L. Superoxide mediates angiotensin II-induced influx of extracellular calcium in neural cells // *Hypertension.* 2005/02/09 ed. 2005. Vol. 45, № 4. P. 717–723.
126. Li A. et al. Oxidation regulates cloned neuronal voltage-dependent Ca²⁺ channels expressed in *Xenopus* oocytes // *J Neurosci.* 1998/08/26 ed. 1998. Vol. 18, № 17. P. 6740–6747.
127. Hidalgo C. et al. A transverse tubule NADPH oxidase activity stimulates calcium release from isolated triads via ryanodine receptor type 1 S -glutathionylation // *J Biol Chem.* 2006/06/10 ed. 2006. Vol. 281, № 36. P. 26473–26482.
128. Hu Q. et al. NADPH oxidase activation increases the sensitivity of intracellular Ca²⁺ stores to inositol 1,4,5-trisphosphate in human endothelial cells // *J Biol Chem.* 2000/04/05 ed. 2000. Vol. 275, № 21. P. 15749–15757.
129. Go Y.M. et al. H₂O₂-dependent activation of GCLC-ARE4 reporter occurs by mitogen-activated protein kinase pathways without oxidation of cellular glutathione or thioredoxin-1 // *J Biol Chem.* 2003/11/26 ed. 2004. Vol. 279, № 7. P. 5837–5845.
130. Riquelme D. et al. High-frequency field stimulation of primary neurons enhances ryanodine receptor-mediated Ca²⁺ release and generates hydrogen peroxide, which jointly stimulate NF-kappaB activity // *Antioxid Redox Signal.* 2010/09/15 ed. 2011. Vol. 14, № 7. P. 1245–1259.
131. Coyoy A. et al. Role of reactive oxygen species and NADPH-oxidase in the development of rat cerebellum. // *Neurochem. Int.* 2013. Vol. 62, № 7. P. 998–1011.
132. Ibi M. et al. NOX1/NADPH oxidase negatively regulates nerve growth factor-induced neurite outgrowth // *Free Radic Biol Med.* 2006/05/09 ed. 2006. Vol. 40, № 10. P. 1785–1795.
133. Le Belle J.E. et al. Proliferative neural stem cells have high endogenous ROS levels that regulate self-renewal and neurogenesis in a PI3K/Akt-dependant manner // *Cell Stem Cell.* 2011/01/08 ed. 2011. Vol. 8, № 1. P. 59–71.
134. Cooke R.M. et al. Nitric oxide synthesis and cGMP production is important for neurite growth and synapse remodeling after axotomy // *J Neurosci.* 2013/03/29 ed. 2013. Vol. 33, № 13. P. 5626–5637.

135. Walton J.C. et al. Neuronal nitric oxide synthase and NADPH oxidase interact to affect cognitive, affective, and social behaviors in mice // *Behav. Brain Res.* 2013. Vol. 256. P. 320–327.
136. Aldieri E. et al. Classical inhibitors of NOX NAD(P)H oxidases are not specific. // *Curr. Drug Metab.* 2008. Vol. 9. P. 686–696.
137. Sorce S., Krause K.H., Jaquet V. Targeting NOX enzymes in the central nervous system: therapeutic opportunities // *Cell Mol Life Sci.* 2012/05/31 ed. 2012. Vol. 69, № 14. P. 2387–2407.
138. Pollock J.D. et al. Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide production // *Nat Genet.* 1995/02/01 ed. 1995. Vol. 9, № 2. P. 202–209.
139. Opitz N. et al. The “A”s and “O”s of NADPH oxidase regulation: a commentary on “Subcellular localization and function of alternatively spliced Noxo1 isoforms” // *Free Radic Biol Med.* 2006/12/27 ed. 2007. Vol. 42, № 2. P. 175–179.
140. Pao M. et al. Cognitive function in patients with chronic granulomatous disease: a preliminary report // *Psychosomatics.* 2004/05/05 ed. 2004. Vol. 45, № 3. P. 230–234.
141. Ben Achour S., Pascual O. Astrocyte-neuron communication: functional consequences // *Neurochem Res.* 2012/06/07 ed. 2012. Vol. 37, № 11. P. 2464–2473.
142. Abramov A.Y. et al. Expression and modulation of an NADPH oxidase in mammalian astrocytes. // *J. Neurosci.* 2005. Vol. 25. P. 9176–9184.
143. Sorce S., Krause K.H. NOX enzymes in the central nervous system: from signaling to disease // *Antioxid Redox Signal.* 2009/03/25 ed. 2009. Vol. 11, № 10. P. 2481–2504.
144. Wang Q., Rowan M.J., Anwyl R. Beta-amyloid-mediated inhibition of NMDA receptor-dependent long-term potentiation induction involves activation of microglia and stimulation of inducible nitric oxide synthase and superoxide. // *J. Neurosci.* 2004. Vol. 24. P. 6049–6056.
145. Landis G.N., Tower J. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. // *Mech. Ageing Dev.* 2005. Vol. 126, № 3. P. 365–379.
146. De Leo M. et al. Oxidative stress and overexpression of manganese superoxide dismutase in patients with Alzheimer’s disease // *Neurosci. Lett.* 1998. Vol. 250, № 3. P. 173–176.
147. Esposito L. et al. Reduction in mitochondrial superoxide dismutase modulates Alzheimer’s disease-like pathology and accelerates the onset of behavioral changes in human amyloid precursor protein transgenic mice. // *J. Neurosci.* 2006. Vol. 26, № 19. P. 5167–5179.
148. Jung J.E. et al. Regulation of Mn-superoxide dismutase activity and neuroprotection by STAT3 in mice after cerebral ischemia. // *J. Neurosci.* 2009. Vol. 29, № 21. P. 7003–7014.

149. Sheng H. et al. Extracellular superoxide dismutase deficiency worsens outcome from focal cerebral ischemia in the mouse. // *Neurosci. Lett.* 1999. Vol. 267, № 1. P. 13–16.
150. Reaume A.G. et al. Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. // *Nat. Genet.* 1996. Vol. 13, № 1. P. 43–47.
151. Gahtan E. et al. Reversible impairment of long-term potentiation in transgenic Cu/Zn-SOD mice // *Eur J Neurosci.* 1998/09/28 ed. 1998. Vol. 10, № 2. P. 538–544.
152. ZIMATKIN S.M., LINDROS K.O. DISTRIBUTION OF CATALASE IN RAT BRAIN: AMINERGIC NEURONS AS POSSIBLE TARGETS FOR ETHANOL EFFECTS // *Alcohol Alcohol.* 1996. Vol. 31, № 2. P. 167–174.
153. Gu W. et al. Catalase over-expression protects striatal neurons from transient focal cerebral ischemia. // *Neuroreport.* 2004. Vol. 15, № 3. P. 413–416.
154. Brigelius-Flohé R., Maiorino M. Glutathione peroxidases. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2013. Vol. 1830, № 5. P. 3289–3303.
155. Ran Q. et al. Transgenic mice overexpressing glutathione peroxidase 4 are protected against oxidative stress-induced apoptosis. // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279, № 53. P. 55137–55146.
156. Damier P. et al. Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease // *Neuroscience.* 1993. Vol. 52, № 1. P. 1–6.
157. Wood Z.A. et al. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins // *Trends Biochem. Sci.* 2003. Vol. 28, № 1. P. 32–40.
158. Rhee S.G. et al. Peroxiredoxin Functions as a Peroxidase and a Regulator and Sensor of Local Peroxides // *J. Biol. Chem.* 2012. Vol. 287. P. 4403–4410.
159. Goemaere J., Knoop B. Peroxiredoxin distribution in the mouse brain with emphasis on neuronal populations affected in neurodegenerative disorders. // *J. Comp. Neurol.* 2012. Vol. 520, № 2. P. 258–280.
160. Hattori F. et al. Mitochondrial peroxiredoxin-3 protects hippocampal neurons from excitotoxic injury in vivo // *J. Neurochem.* 2003. Vol. 86, № 4. P. 860–868.
161. Gan Y. et al. Transgenic overexpression of peroxiredoxin-2 attenuates ischemic neuronal injury via suppression of a redox-sensitive pro-death signaling pathway. // *Antioxid. Redox Signal.* 2012. Vol. 17. P. 719–732.
162. Benhar M. et al. Regulated protein denitrosylation by cytosolic and mitochondrial thioredoxins. // *Science.* 2008. Vol. 320. P. 1050–1054.
163. Meyer Y. et al. Thioredoxins and glutaredoxins: unifying elements in redox biology. // *Annu. Rev. Genet.* 2009. Vol. 43. P. 335–367.
164. Funato Y., Miki H. Nucleoredoxin, a novel thioredoxin family member involved in cell growth and differentiation. // *Antioxid. Redox Signal.* 2007. Vol. 9. P. 1035–1057.

165. Sun Q.A. et al. Selenoprotein oxidoreductase with specificity for thioredoxin and glutathione systems. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001. Vol. 98. P. 3673–3678.
166. Daily D. et al. Glutaredoxin protects cerebellar granule neurons from dopamine-induced apoptosis by activating NF-kappa B via Ref-1. // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276, № 2. P. 1335–1344.
167. Ichimiya S. et al. Murine thioredoxin peroxidase delays neuronal apoptosis and is expressed in areas of the brain most susceptible to hypoxic and ischemic injury. // *DNA Cell Biol.* 1997. Vol. 16. P. 311–321.
168. Fang Y.Z., Yang S., Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition // *Nutrition.* 2002. Vol. 18. P. 872–879.
169. Yakel J.L. Calcineurin regulation of synaptic function: from ion channels to transmitter release and gene transcription. // *Trends Pharmacol. Sci.* 1997. Vol. 18. P. 124–134.
170. Baumgartel K., Mansuy I.M. Neural functions of calcineurin in synaptic plasticity and memory // *Learn. Mem.* 2012. Vol. 19. P. 375–384.
171. Kanterewicz B.I., Knapp L.T., Klann E. Stimulation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinases by reactive oxygen species and nitric oxide in hippocampus // *J Neurochem.* 1998/03/07 ed. 1998. Vol. 70, № 3. P. 1009–1016.
172. Knapp L.T., Klann E. Potentiation of hippocampal synaptic transmission by superoxide requires the oxidative activation of protein kinase C // *J Neurosci.* 2002/02/05 ed. 2002. Vol. 22, № 3. P. 674–683.
173. Poser S., Storm D.R. Role of Ca²⁺-stimulated adenylyl cyclases in LTP and memory formation // *Int J Dev Neurosci.* 2001/05/30 ed. 2001. Vol. 19, № 4. P. 387–394.
174. Kamsler A., Segal M. Paradoxical actions of hydrogen peroxide on long-term potentiation in transgenic superoxide dismutase-1 mice. // *J. Neurosci.* 2003. Vol. 23. P. 10359–10367.
175. Lipton S.A. et al. Cysteine regulation of protein function--as exemplified by NMDA-receptor modulation // *Trends Neurosci.* 2002/08/17 ed. 2002. Vol. 25, № 9. P. 474–480.
176. Tarasenko A., Krupko O., Himmelreich N. Reactive oxygen species induced by presynaptic glutamate receptor activation is involved in [(3)H]GABA release from rat brain cortical nerve terminals // *Neurochem Int.* 2012/08/07 ed. 2012. Vol. 61, № 7. P. 1044–1051.
177. Atkins C.M., Sweatt J.D. Reactive oxygen species mediate activity-dependent neuron-glia signaling in output fibers of the hippocampus // *J Neurosci.* 1999/08/25 ed. 1999. Vol. 19, № 17. P. 7241–7248.
178. Milton V.J. et al. Oxidative stress induces overgrowth of the *Drosophila* neuromuscular junction // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011/10/12 ed. 2011. Vol. 108, № 42. P. 17521–17526.
179. Serrano F., Klann E. Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus // *Ageing Res Rev.* 2004/11/16 ed. 2004. Vol. 3, № 4. P. 431–443.

180. Block M.L., Zecca L., Hong J.-S. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2007. Vol. 8. P. 57–69.
181. Ye S.M., Johnson R.W. An age-related decline in interleukin-10 may contribute to the increased expression of interleukin-6 in brain of aged mice. // *Neuroimmunomodulation.* 2001. Vol. 9, № 4. P. 183–192.
182. Pundik S., Xu K., Sundararajan S. Reperfusion brain injury: focus on cellular bioenergetics // *Neurology.* 2012/10/04 ed. 2012. Vol. 79, № 13 Suppl 1. P. S44–51.
183. Mecocci P. et al. Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain. // *Ann. Neurol.* 1993. Vol. 34, № 4. P. 609–616.
184. Navarro A., Boveris A. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2007. Vol. 292. P. C670–C686.
185. Budihardjo I. et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol. Annual Reviews* 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, 1999. Vol. 15. P. 269–290.
186. Swerdlow R.H. Brain aging, Alzheimer's disease, and mitochondria. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2011. Vol. 1812. P. 1630–1639.
187. Padurariu M. et al. Hippocampal neuronal loss in the CA1 and CA3 areas of Alzheimer's disease patients. // *Psychiatr. Danub.* 2012. Vol. 24. P. 152–158.
188. Meda L. et al. Activation of microglial cells by β -amyloid protein and interferon- γ // *Nature.* 1995. Vol. 374. P. 647–650.
189. Serrano F. et al. NADPH oxidase mediates beta-amyloid peptide-induced activation of ERK in hippocampal organotypic cultures // *Mol Brain.* 2009/10/07 ed. 2009. Vol. 2. P. 31.
190. Swerdlow R.H., Khan S.M. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: An update // *Exp. Neurol.* 2009. Vol. 218. P. 308–315.
191. Kumar H. et al. The Role of Free Radicals in the Aging Brain and Parkinson's Disease: Convergence and Parallelism // *Int. J. Mol. Sci.* 2012. Vol. 13. P. 10478–10504.
192. Hashimoto M. et al. Oxidative stress induces amyloid-like aggregate formation of NACP/alpha-synuclein in vitro. // *Neuroreport.* 1999. Vol. 10. P. 717–721.
193. Youdim M.B.H., Bakhle Y.S. Monoamine oxidase: isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness. // *Br. J. Pharmacol.* 2006. Vol. 147 Suppl 1. P. S287–S296.
194. Naoi M., Maruyama W. Monoamine oxidase inhibitors as neuroprotective agents in age-dependent neurodegenerative disorders. // *Curr. Pharm. Des.* 2010. Vol. 16. P. 2799–2817.
195. Bender A. et al. High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. // *Nat. Genet.* 2006. Vol. 38. P. 515–517.

196. Davidzon G. et al. Early-onset familial parkinsonism due to POLG mutations // *Ann. Neurol.* 2006. Vol. 59. P. 859–862.
197. Nakahara J. et al. Current concepts in multiple sclerosis: Autoimmunity versus oligodendrogliaopathy // *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2012. Vol. 42. P. 26–34.
198. Haider L. et al. Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. // *Brain.* 2011. Vol. 134. P. 1914–1924.
199. Mahad D.J. et al. Mitochondrial changes within axons in multiple sclerosis // *Brain.* 2009. Vol. 132. P. 1161–1174.
200. Chen H., Song Y.S., Chan P.H. Inhibition of NADPH oxidase is neuroprotective after ischemia-reperfusion. // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2009. Vol. 29. P. 1262–1272.
201. Piantadosi C.A., Zhang J. Mitochondrial generation of reactive oxygen species after brain ischemia in the rat. // *Stroke.* 1996. Vol. 27. P. 327–331; discussion 332.
202. Weinstein J.R., Koerner I.P., Möller T. Microglia in ischemic brain injury // *Future Neurol.* 2010. Vol. 5. P. 227–246.
203. Noor J.I. et al. Short-term administration of a new free radical scavenger, edaravone, is more effective than its long-term administration for the treatment of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy // *Stroke.* 2005/10/08 ed. 2005. Vol. 36, № 11. P. 2468–2474.
204. Boens N. et al. Photophysics of the fluorescent pH indicator BCECF // *J. Phys. Chem. A.* 2006. Vol. 110. P. 9334–9343.
205. Weiner I.D., Hamm L.L. Use of fluorescent dye BCECF to measure intracellular pH in cortical collecting tubule. // *Am. J. Physiol.* 1989. Vol. 256. P. F957–F964.
206. Buckler K.J., Vaughan-Jones R.D. Application of a new pH-sensitive fluoroprobe (carboxy-SNARF-1) for intracellular pH measurement in small, isolated cells. // *Pflugers Arch.* 1990. Vol. 417. P. 234–239.
207. Liu J., Diwu Z., Leung W.Y. Synthesis and photophysical properties of new fluorinated benzo[c]xanthene dyes as intracellular pH indicators // *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 2001. Vol. 11. P. 2903–2905.
208. Balut C. et al. Measurement of cytosolic and mitochondrial pH in living cells during reversible metabolic inhibition. // *Kidney Int.* 2008. Vol. 73. P. 226–232.
209. Scharnagl C., Raupp-Kossmann R., Fischer S.F. Molecular basis for pH sensitivity and proton transfer in green fluorescent protein: protonation and conformational substates from electrostatic calculations. // *Biophys. J.* 1999. Vol. 77. P. 1839–1857.
210. Matz M. V et al. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. // *Nat. Biotechnol.* 1999. Vol. 17. P. 969–973.
211. Miesenböck G., De Angelis D.A., Rothman J.E. Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. // *Nature.* 1998. Vol. 394. P. 192–195.

212. Li Y., Tsien R.W. pHTomato, a red, genetically encoded indicator that enables multiplex interrogation of synaptic activity // *Nat. Neurosci.* 2012. Vol. 15. P. 1047–1053.
213. Jung G. et al. Confocal microscopy of single molecules of the green fluorescent protein // *Bioimaging.* 1998. Vol. 6. P. 54–61.
214. Poburko D., Santo-Domingo J., Demarex N. Dynamic regulation of the mitochondrial proton gradient during cytosolic calcium elevations // *J Biol Chem.* 2011/01/13 ed. 2011. Vol. 286, № 13. P. 11672–11684.
215. Kalyanaraman B. et al. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: Challenges and limitations // *Free Radic. Biol. Med.* 2012. Vol. 52. P. 1–6.
216. Maghzal G.J. et al. Detection of reactive oxygen species derived from the family of NOX NADPH oxidases // *Free Radic Biol Med.* 2012/09/18 ed. 2012. Vol. 53, № 10. P. 1903–1918.
217. Hanson G.T. et al. Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators. // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. P. 13044–13053.
218. Gutscher M. et al. Proximity-based protein thiol oxidation by H₂O₂-scavenging peroxidases // *J Biol Chem.* 2009/09/17 ed. 2009. Vol. 284, № 46. P. 31532–31540.
219. Belousov V. V et al. Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide // *Nat. Methods.* 2006. Vol. 3, № 4. P. 281–286.
220. Malinouski M. et al. Hydrogen peroxide probes directed to different cellular compartments // *PLoS One.* 2011/02/02 ed. 2011. Vol. 6, № 1. P. e14564.
221. Mishina N.M. et al. Chapter Eleven - Imaging H₂O₂ Microdomains in Receptor Tyrosine Kinases Signaling // *Methods Enzymol.* / ed. Enrique C., Lester P. Academic Press, 2013. Vol. Volume 526. P. 175–187.
222. Markvicheva K.N. et al. A genetically encoded sensor for H₂O₂ with expanded dynamic range // *Bioorganic Med. Chem.* 2011. Vol. 19. P. 1079–1084.
223. Bilan D.S. et al. HyPer-3: A genetically encoded H₂O₂ probe with improved performance for ratiometric and fluorescence lifetime imaging // *ACS Chem. Biol.* 2013. Vol. 8. P. 535–542.
224. Valencia A., Morán J. Reactive oxygen species induce different cell death mechanisms in cultured neurons. // *Free Radic. Biol. Med.* 2004. Vol. 36. P. 1112–1125.
225. Pollegioni L. et al. Physiological functions of D-amino acid oxidases: From yeast to humans // *Cell. Mol. Life Sci.* 2007. Vol. 64. P. 1373–1394.
226. Cline M.J., Lehrer R.I. D-amino acid oxidase in leukocytes: a possible D-amino-acid-linked antimicrobial system. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1969. Vol. 62. P. 756–763.
227. Wang L.-Z., Zhu X.-Z. Spatiotemporal relationships among D-serine, serine racemase, and D-amino acid oxidase during mouse postnatal development. // *Acta Pharmacol. Sin.* 2003. Vol. 24. P. 965–974.

228. Pollegioni L. et al. Catalytic properties of D-amino acid oxidase in cephalosporin C bioconversion: a comparison between proteins from different sources. // *Biotechnol. Prog.* Vol. 20, № 2. P. 467–473.
229. Pollegioni L. et al. Yeast D-amino acid oxidase: Structural basis of its catalytic properties // *J. Mol. Biol.* 2002. Vol. 324. P. 535–546.
230. Li Y., Trush M.A. Diphenyliodonium, an NAD(P)H oxidase inhibitor, also potently inhibits mitochondrial reactive oxygen species production. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998. Vol. 253. P. 295–299.
231. Levin E.D. et al. Molecular manipulations of extracellular superoxide dismutase: Functional importance for learning // *Behav. Genet.* 1998. Vol. 28. P. 381–390.
232. Jiang D. et al. Chronic brain oxidation in a glutathione peroxidase knockout mouse model results in increased resistance to induced epileptic seizures // *Exp Neurol.* 2000. Vol. 164. P. 257–268.
233. Bogumil R. et al. Inactivation of calcineurin by hydrogen peroxide and phenylarsine oxide: Evidence for a dithiol-disulfide equilibrium and implications for redox regulation // *Eur. J. Biochem.* 2000. Vol. 267. P. 1407–1415.
234. Seutin V. et al. Hydrogen peroxide hyperpolarizes rat CA1 pyramidal neurons by inducing an increase in potassium conductance. // *Brain Res.* 1995. Vol. 683. P. 275–278.
235. Langeveld C.H. et al. Differential sensitivity to hydrogen peroxide of dopaminergic and noradrenergic neurotransmission in rat brain slices // *Free Radic. Biol. Med.* 1995. Vol. 19. P. 209–217.
236. Lin H.H. et al. Hydrogen peroxide increases the activity of rat sympathetic preganglionic neurons in vivo and in vitro // *Neuroscience.* 2003. Vol. 121. P. 641–647.
237. Seibenhener M.L., Wooten M.W. Isolation and Culture of Hippocampal Neurons from Prenatal Mice // *J. Vis. Exp.* 2012.
238. Jiang M., Chen G. High Ca²⁺-phosphate transfection efficiency in low-density neuronal cultures. // *Nat. Protoc.* 2006. Vol. 1, № 2. P. 695–700.
239. Heyer E.J., Nowak L.M., MacDonald R.L. Membrane depolarization and prolongation of calcium-dependent action potentials of mouse neurons in cell culture by two convulsants: Bicuculline and penicillin // *Brain Res.* 1982. Vol. 232. P. 41–56.
240. Walker A.S., Burrone J., Meyer M.P. Functional imaging in the zebrafish retinotectal system using RGECO. // *Front. Neural Circuits.* 2013. Vol. 7. P. 34.
241. Chiappalone M. et al. Dissociated cortical networks show spontaneously correlated activity patterns during in vitro development // *Brain Res.* 2006. Vol. 1093. P. 41–53.
242. Ames A. CNS energy metabolism as related to function // *Brain Res. Rev.* 2000. Vol. 34. P. 42–68.

243. Zala D. et al. Vesicular glycolysis provides on-board energy for fast axonal transport // *Cell*. 2013. Vol. 152. P. 479–491.
244. Jana A., Pahan K. Fibrillar amyloid-beta peptides kill human primary neurons via NADPH oxidase-mediated activation of neutral sphingomyelinase. Implications for Alzheimer's disease. // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. P. 51451–51459.
245. Garrido-Urbani S. et al. Targeting vascular NADPH oxidase 1 blocks tumor angiogenesis through a PPAR α mediated mechanism // *PLoS One*. 2011. Vol. 6.
246. Suzukawa K. Nerve Growth Factor-induced Neuronal Differentiation Requires Generation of Rac1-regulated Reactive Oxygen Species // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275, № 18. P. 13175–13178.
247. Nicolai L.J.J. et al. Genetically encoded dendritic marker sheds light on neuronal connectivity in *Drosophila*. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010. Vol. 107. P. 20553–20558.
248. Li L. et al. Visualizing the distribution of synapses from individual neurons in the mouse brain // *PLoS One*. 2010. Vol. 5.
249. Sergé A. et al. Receptor activation and homer differentially control the lateral mobility of metabotropic glutamate receptor 5 in the neuronal membrane. // *J. Neurosci.* 2002. Vol. 22. P. 3910–3920.
250. Hall C.N. et al. Oxidative phosphorylation, not glycolysis, powers presynaptic and postsynaptic mechanisms underlying brain information processing. // *J. Neurosci.* 2012. Vol. 32, № 26. P. 8940–8951.
251. Carmignoto G., Pasti L., Pozzan T. On the role of voltage-dependent calcium channels in calcium signaling of astrocytes in situ. // *J. Neurosci.* 1998. Vol. 18. P. 4637–4645.
252. Lombardi G. et al. The depolarization-induced outflow of D-[3H]aspartate from rat brain slices is modulated by metabotropic glutamate receptors. // *Neurochem. Int.* 1994. Vol. 24. P. 525–532.
253. Gabler M., Hensel M., Fischer L. Detection and substrate selectivity of new microbial D-amino acid oxidases // *Enzyme Microb. Technol.* 2000. Vol. 27. P. 605–611.
254. Shikano N. et al. Transport of d-[1-14C]-amino acids into Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells: implications for use of labeled d-amino acids as molecular imaging agents // *Nucl. Med. Biol.* 2007. Vol. 34. P. 659–665.
255. Takahashi A., Mikami M., Yang J. Hydrogen peroxide increases GABAergic mIPSC through presynaptic release of calcium from IP3 receptor-sensitive stores in spinal cord substantia gelatinosa neurons // *Eur. J. Neurosci.* 2007. Vol. 25. P. 705–716.