

На правах рукописи

Котова Дарья Андреевна

***In vivo* исследование редокс-процессов в клетках головного мозга при развитии ишемического инсульта на животных моделях с помощью генетически кодируемых биосенсоров**

Специальность 1.5.3.- Молекулярная биология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2022

Работа выполнена в отделе метаболизма и редокс-биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова российской академии наук (ИБХ РАН).

Научный руководитель:

кандидат биологических наук **Билан Дмитрий Сергеевич**

Официальные оппоненты:

Силачев Денис Николаевич, доктор биологических наук, заведующий лабораторией биохимии двигательных систем Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В.Ломоносова, отдел функциональной биохимии биополимеров

Демьяненко Светлана Викторовна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, лаборатория молекулярной нейробиологии Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета

Ведущая организация:

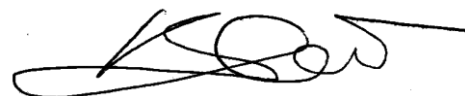
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук

Защита состоится «26» октября 2022 года в 11:00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, а также на сайте института www.ibch.ru.

Автореферат разослан «...».....2022 г

**Ученый секретарь диссертационного совета,
д.ф.-м.н. В.А. Олейников**



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

По данным Всемирной Организации Здравоохранения, инсульт головного мозга находится на втором месте в числе болезней, приводящих к летальному исходу. Из 15 миллионов людей, страдающих от данного заболевания, треть из них становится неработоспособной, а треть – погибает. Согласно современной классификации, инсульт подразделяется на два типа: ишемический и геморрагический, при этом доля пациентов, страдающих от ишемического инсульта, составляет более 85% всех случаев. Причиной развития ишемического инсульта является ограничение кровотока вследствие стеноза и тромбоза сосудов головного мозга. Поскольку мозг является одним из самых энергозатратных органов организма, даже кратковременное прекращение кровотока (ишемия), приводит к необратимым повреждениям клеток головного мозга. Ишемия может быть перманентной и кратковременной с последующим восстановлением кровотока (реперфузией). Именно ишемия-реперфузия более распространена при патогенезе у человека. Примечательно, что как при ишемии, так и при ишемии-реперфузии происходит дисфункция и гибель нейронов, однако считается, что молекулярные механизмы этих двух состояний значительно отличаются.

За последние 30 лет были выявлены патофизиологические основы инсульта. Церебральная ишемия приводит к запуску целой серии физиологических, биохимических, молекулярных и генетических механизмов. В результате происходит снижение нейронной активности из-за нарушения клеточной целостности, возникает ионный дисбаланс, глутамат-опосредованная эксайтотоксичность, нарушается регуляция внутриклеточного кальция, развивается окислительный стресс, дисфункция митохондрий и апоптоз. Все это приводит к реакциям нейровоспаления и массовой гибели разных типов клеток в области повреждения.

Понимание молекулярных механизмов, которые лежат в основе клеточной гибели при ишемии, является важнейшей задачей для современных исследований в биологии и медицине, в том числе для поиска эффективных нейропротекторных лекарств. Несмотря на большой объем экспериментальных данных, исследования метаболических изменений, происходящих в ткани головного мозга в острой фазе ишемического инсульта, по-прежнему затруднены. Особенно это касается реакций, протекающих с участием соединений с высокой реакционной способностью. В частности, общепринятым мнением является участие в патогенезе инсульта активных форм кислорода, которые при неконтролируемой генерации приводят к окислительному стрессу. Окислительный стресс в тканях мозга при инсульте неоднократно подтверждался, но косвенными методами. Динамика самих активных форм кислорода (АФК) в тканях мозга *in vivo* в режиме реального времени до этого никогда не исследовалась напрямую из-за отсутствия экспериментальных подходов. То же самое касается и других активных соединений, время жизни которых в клетках ограничено из-за многочисленных реакций, в которые они вступают с различными мишенями в своем окружении. В первую очередь, это низкомолекулярные соединения, вовлеченные в окислительно-восстановительные реакции, которые представляют большой фундаментальный и практический интерес, так как участвуют как в нормальной физиологии, так и в патогенезе различных заболеваний.

На сегодняшний день существует большое количество методов исследования биохимических параметров в тканях мозга животных при развитии ишемического инсульта. К классическим методам относят измерения параметров с помощью биохимических тестов на выделенных образцах тканей и гистологическое окрашивание. Однако использование данных подходов не позволяет наблюдать за развитием изменений интересующих параметров клеток мозга в динамике. За последние десятилетия появились подходы, позволяющие прижизненно регистрировать изменения клеточных параметров в тканях мозга при различных патологических процессах. Это прежде всего методы на

основе МРТ, КТ и ПЭТ. Тем не менее, даже такие современные технологии не позволяют измерять динамику различных короткоживущих молекул, таких как АФК.

Мощнейший инструментарий в нейробиологических исследованиях представляют оптические методы, которые успешно применяют на лабораторных животных. При их реализации животным проводят *in vivo* регистрацию различных биохимических параметров в тканях мозга посредством имплантированных волокон или через краниальные окна для наблюдения событий в коре головного мозга экспериментального животного. В подобного рода исследованиях активно используют различные индикаторы, в частности, используют генетически кодируемые биосенсоры на основе флуоресцентных белков.

Генетически кодируемые флуоресцентные биосенсоры позволили вывести медико-биологические исследования на новый уровень. Такие биосенсоры, которые по своей природе представляют белковые молекулы, позволяют регистрировать биохимические параметры в живых системах разного уровня сложности: от клеточных культур до тканей модельных организмов *in vivo*. К настоящему моменту исследователю доступна обширная коллекция генетически кодируемых биосенсоров, которые позволяют регистрировать динамику концентрации различных ионов, метаболитов, сигнальных молекул, включая соединения с высокой реакционной способностью.

Цель работы: исследовать динамику некоторых биохимических параметров (в частности, рН, концентрацию H_2O_2 , соотношение НАД⁺/НАДН) в тканях головного мозга крысы *in vivo* при развитии ишемического инсульта с помощью генетически кодируемых биосенсоров.

В рамках поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. С использованием биосенсоров *SypHer3s*, *Hyper7* и *SoNar* исследовать динамику рН, концентрации H_2O_2 и соотношения НАД⁺/НАДН в цитозоле и митохондриальном матриксе культивируемых нейронов мыши, выделенных из гиппокампов эмбрионов, в условиях гипоксии/реоксигенации.
2. Исследовать динамику рН, концентрации H_2O_2 и соотношения НАД⁺/НАДН в тканях мозга при развитии ишемического инсульта в режиме реального времени. Исследовать, как данные биохимические параметры изменяются при патологии в разных типах клеток (в нейронах и астроцитах) и их компартментах (в цитозоле и матриксе митохондрий).
3. На примере рН-биосенсора *SypHer3s* отработать подход тестирования флуоресцентных генетически кодируемых биосенсоров в режиме двухфотонной микроскопии.

Научная новизна работы

В рамках настоящей работы впервые с помощью высокочувствительного биосенсора *Hyper7* и разработанной оптоволоконной техники регистрации сигнала была визуализирована динамика H_2O_2 в клетках мозга крыс *in vivo* при развитии ишемического инсульта. Было обнаружено, что в клетках поврежденной области мозга генерация H_2O_2 медленно нарастает, достигая максимальных значений на следующие сутки с момента окклюзии артерии. На поздней стадии развития инсульта (от 20 часов) производство H_2O_2 в митохондриях астроцитов выше, чем в нейронах поврежденной области.

С помощью биосенсора *SypHer3s* мы визуализировали динамику рН *in vivo* в тканях мозга крыс при ишемическом инсульте. В течение нескольких секунд после начала ишемии ткань мозга испытывает значительный ацидоз (рН повсеместно снижается на ~0,5 единиц).

Кроме того, были охарактеризованы свойства рН-биосенсора *SypHer3s* в режиме двухфотонной микроскопии на препарате белка *in vitro*, а также в культуре живых клеток

и на срезах мозга грызунов. Данное описание представляет большую практическую значимость, поскольку подход двухфотонной микроскопии через краниальные окна позволяет регистрировать не только флуоресцентный сигнал биосенсора, но и визуализировать клетки в глубоких слоях коры головного мозга.

В рамках данного исследования также была создана установка для моделирования условий гипоксии/реоксигенации для первичной культуры нейронов. Используя аналогичные биосенсоры, было показано, что биохимические процессы, происходящие в культивируемых клетках, значительно отличаются от событий, которые происходят при патогенезе *in vivo*. Тем не менее, исследования на клеточных культурах могут быть эффективно использованы для разработки систем скрининга и тестирования компонентов, влияющих на динамику биохимических процессов в условиях гипоксии.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в расширении нашего понимания биохимических процессов, происходящих во время ишемического инсульта. В данной работе была проведена демонстрация существенного различия в динамике исследуемых процессов в нейронах в условиях гипоксии *in vitro* и *in vivo*. Кроме того, результаты, полученные в ходе выполнения данной диссертационной работы, расширили наше понимание процессов, происходящих в острой фазе ишемического инсульта. Также мы показали, что скорость продукции H₂O₂ в митохондриях астроцитов по сравнению с нейронами поврежденной области мозга на поздней стадии развития инсульта различается. Это наблюдение может в дальнейшем представлять интерес при выборе терапевтической мишени для разработки лекарственных средств.

Практическая значимость данной работы заключается в том, что созданная в настоящей работе платформа исследования с применением генетически кодируемых биосенсоров может быть применена для выполнения любых других задач по изучению процессов в тканях мозга в норме и патологии. Возможность не только выбрать интересующий биосенсор, но и локализовать его в определенном типе клеток и отдельных их компартментах, обеспечивает высокую информативность данного экспериментального подхода и гибкость в постановке задач.

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Исследования проведены с использованием современных молекулярно-биологических, физиологических, биохимических и физических методов и подходов: В работе широко используются методы клонирования генетических конструкций, культивирования иммортализованных клеточных линий, выделения и культивирования первичной культуры клеток. Данная работа включает в себя проведение хирургических операций на животных (крысы) таких как: стереотаксическая операция для инъекции аденоассоциированных вирусных частиц в головной мозг крысы по заданным координатам и дальнейшим введением оптоволоконных ферул по этим же координатам, проведение операции по окклюзии средней мозговой артерии для моделирования ишемического инсульта у грызунов. Для оценки эффективности доставки биосенсоров при помощи аденоассоциированных вирусных частиц, а также для оценки динамики флуоресценции биосенсоров в экспериментальных условиях, нами были проведены предварительные эксперименты с использованием клеточных культур и тканей в контрольных условиях и в условиях гипоксии. Для включения животного в экспериментальную выборку руководствовались следующими критериями: выживаемость животных после операции по окклюзии средней мозговой артерии; наличие и размер инсульта в экспериментальной группе животных (при помощи окрашивания трифенилтетразолием-2,3,5 хлоридом витальных участков срезов мозга); колокализация экспрессии и флуоресценции биосенсора с оптическими волокнами. Кроме того, каждый эксперимент был продублирован с использованием контрольной группы животных. В контрольную выборку были включены ложнооперированные животные, которым

проводили аналогичную операцию, однако без осуществления окклюзии средней мозговой артерии на заключительном этапе операции. Для подтверждения отсутствия влияния микроинъекций вирусных частиц на результаты исследования нами были проведены контрольные эксперименты, которые включали в себя стереотаксическую операцию и имплантацию оптических волокон, однако в этом случае не осуществляли микроинъекцию вирусных частиц, несущих гены флуоресцентных биосенсоров.

Помимо этого, в работе применялись подходы с использованием широкопольной флуоресцентной микроскопии, мультифотонной микроскопии и оптоволоконной регистрации флуоресцентного сигнала. Результаты исследований были обработаны с использованием известных статистических критериев в соответствии с числом сравниваемых параметров.

Материал, представленный в работе, опубликован в зарубежных рецензируемых научных журналах.

Структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 119 страницах и состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 307 ссылок. Диссертация содержит 31 рисунок и 1 таблицу.

Апробация работы

Основные результаты работы были представлены на 4 конференциях: на всероссийской мультikonференции с международным участием «БИОТЕХНОЛОГИЯ - МЕДИЦИНЕ БУДУЩЕГО», Новосибирск, 29 июня – 2 июля 2019; на девятой конференции специалистов по лабораторным животным (Rus-LASA-9), 2-4 декабря 2021 г, Сколтех; на Нейрокампусе 2022 «Нейротехнологии будущего», 4-7 сентября 2022 года, Иркутская область, поселок Большие Коты; на III Объединённом научном форуме (VII Съезд биохимиков и молекулярных биологов России и X Российский симпозиум «Белки и пептиды»), 3-7 октября 2022, Сочи;

По материалам работы было опубликовано 8 статей в рецензируемых журналах.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Литературный обзор

Обзор литературы представлен в первой главе и состоит из 3 разделов. Первый раздел посвящен молекулярным механизмам, происходящим во время ишемического инсульта. Во втором разделе описаны биологические и физические методы исследования механизмов патогенеза ишемического инсульта. Третий раздел посвящён описанию генетически кодируемых биосенсоров и их роли в современных биомедицинских исследованиях.

2. Экспериментальная часть

Данная работа посвящена изучению динамики редокс-параметров и динамики рН в клетках головного мозга крыс *in vivo* при ишемическом инсульте с помощью генетически кодируемых флуоресцентных биосенсоров. Несмотря на общепризнанную теорию о том, что АФК образуются в острой фазе ишемического инсульта, генерация и дальнейшая динамика АФК никогда ранее не были визуализированы *in vivo* напрямую из-за отсутствия подходящих методов. В настоящем исследовании мы использовали биосенсор нового поколения НуPer7, который отличается выраженной амплитудой ответа и высокой чувствительностью к H₂O₂. В отличие от редокс-событий, некоторые биохимические параметры, в частности изменения рН, были исследованы с помощью других подходов.

Ранее было показано, что в ишемизированных областях происходит снижение рН. Для визуализации динамики рН мы использовали биосенсор *SypHer3s*.

Существующие на сегодняшний день подходы позволяют прижизненно регистрировать изменения клеточных параметров в тканях мозга при различных патологических процессах. Широкую популярность приобрели методы на основе позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) и магнитно-резонансной томографии (МРТ). Однако данные подходы не позволяют регистрировать внутримолекулярные быстро протекающие процессы. Для наблюдения за редокс-процессами в нейробиологических исследованиях часто прибегают к оптическим методам. В этом случае регистрацию флуоресцентного сигнала в тканях мозга *in vivo* осуществляют с помощью оптической установки через оптические волокна, которые имплантируют одновременно с инъекцией вирусных частиц или с использованием мультифотонной спектроскопии через краниальные окна. Для изучения различных биохимических событий с применением оптических методов часто используют синтетические индикаторы, спектральные характеристики которых изменяются при определенных условиях, например, при взаимодействии с интересующим соединением в образце. Однако применение синтетических красителей в условиях *in vivo* осложнено их доставкой в клетки, а в некоторых случаях, токсичностью. На сегодняшний день оптические подходы прижизненной регистрации биологических процессов приобрели широкомасштабное применение в медико-биологических исследованиях благодаря появлению генетически кодируемых биосенсоров на основе флуоресцентных белков. По своей природе такой биосенсор представляет собой белковую молекулу, которая закодирована геном (рисунок 1). Таким образом, такой ген может быть интегрирован практически в любую биологическую систему. Добавление к биосенсору полипептидных сигнальных последовательностей позволяет локализовать его в интересующих внутриклеточных компартментах.

В настоящий момент имеется большое разнообразие генетически кодируемых флуоресцентных сенсоров. В большинстве случаев такая молекула состоит из сенсорного домена, специфично взаимодействующего с определенным метаболитом, сигнальным соединением или определенным внутриклеточным параметром, и флуоресцентной части, состоящей из 1-го или 2-ух флуоресцентных белков, которые визуализируют данные взаимодействия. Функционирование таких биосенсоров построено на конформационных перестройках в структуре белка. Сенсорный домен такого химерного белка при взаимодействии с определенным параметром, например, при связывании своего лиганда, претерпевает конформационные преобразования в структуре, которые передаются на структуру флуоресцентного белка, изменяя его спектральные свойства. Таким образом, динамика флуоресцентного сигнала такой молекулы отражает динамику исследуемого параметра, например, изменение концентрации соединения, с которым взаимодействует сенсорная часть биосенсора (рисунок 1).

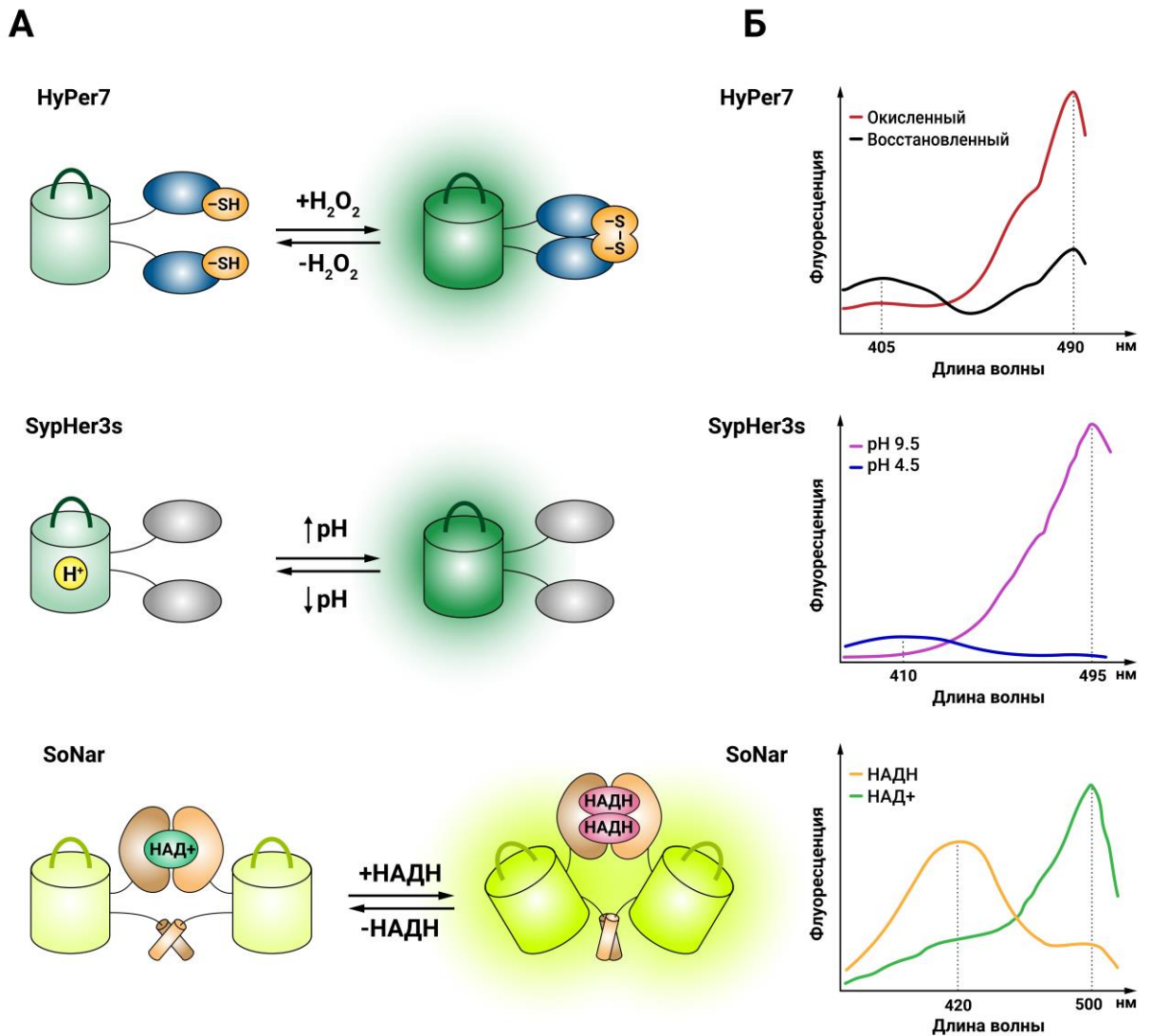


Рисунок 1 Биосенсоры HyPer7, SypHer3s и SoNar и их спектральные характеристики. А. Упрощенная схема, иллюстрирующая работу генетически кодируемых флуоресцентных биосенсоров HyPer7, SypHer3s и SoNar. Б. Спектры возбуждения флуоресценции биосенсоров HyPer7, SypHer3s и SoNar.

Главное преимущество генетически кодируемых биосенсоров в том, что они позволяют исследовать внутриклеточные биохимические процессы в живых системах любых уровней сложности в режиме реального времени. В качестве сенсорных доменов в биосенсорах при разработке используют природные белки, которые в клетках выполняют ту же роль – осуществляют взаимодействие с определенным соединением, запуская при этом определенную функцию, например, транскрипционный ответ или ферментативную реакцию. Таким образом, идеи создания биосенсоров неисчерпаемы по своей природе. Действительно, на сегодняшний день исследователям доступна мировая коллекция подобных молекулярных инструментов для исследования самых разнообразных биохимических процессов. Некоторые из таких биосенсоров не имеют альтернативы в качестве подходов исследований. К таковым относятся биосенсоры для регистрации в живых системах высоко реакционноспособных соединений с коротким временем жизни в среде, поскольку после своего образования очень быстро реагируют со множеством мишеней. К таким активным соединениям, например, можно отнести различные активные формы кислорода, азота, серы, галогенов. Они формируют сложную сеть редокс-преобразований в регуляции многочисленных внутриклеточных процессов. Исследование внутриклеточной динамики некоторых из этих соединений стало

возможным благодаря разработке специфичных биосенсоров на основе флуоресцентных белков.

В данной работе мы использовали технологию оптоволоконного интерфейса в сочетании с генетически кодируемыми сенсорами для исследования динамики некоторых биохимических параметров в тканях головного мозга крыс *in vivo* при развитии ишемического инсульта с первых секунд патогенеза. Также при помощи флуоресцентной микроскопии нами были исследованы изменения динамики тех же биохимических параметров в нейрональной культуре в условиях гипоксии и последующей реоксигенации. Таким образом, нами было проведено сравнение результатов, полученных на моделях *in vivo* и *in vitro*. С помощью высокочувствительного биосенсора HyPer7 мы регистрировали в исследуемых системах динамику H₂O₂, который является распространенной в клетке разновидностью активных форм кислорода и служит основным маркером окислительного стресса. С использованием биосенсора SoNar нами было зарегистрировано соотношение НАД⁺/НАДН. Редокс-состояние пула НАД (соотношение НАД⁺/НАДН) отражает не только общий редокс-статус клетки, но и является ее важнейшим энергетическим параметром. Также нами была зарегистрирована динамика изменения рН при помощи биосенсора SypHer3s. Известно, что многие патологические состояния, сопровождающиеся глобальными метаболическими изменениями, влияют на значение рН внутриклеточной среды.

Для исследования развития динамики рН, H₂O₂ и соотношения НАД⁺/НАДН в первичной культуре нейронов и тканях головного мозга крыс мы доставляли гены используемых в работе биосенсоров: SypHer3s (регистрация рН) и HyPer7 (регистрация H₂O₂), SoNar (для регистрации соотношения НАД⁺/НАДН) с помощью вирусных частиц. Для этого на первом этапе данной работы были собраны вирусные конструкции с помощью молекулярно-генетических методов.

2.1. Получение и тестирование генетических конструкций биосенсоров для регистрации H₂O₂, рН и соотношения НАД⁺/НАДН в тканях мозга крыс

В этой работе мы исследовали динамику некоторых биохимических процессов в клетках мозга, поэтому использовали специфичные промоторы GFAP (промотор глиального фибриллярного кислого белка) для экспрессии гена нужного биосенсора в астроцитах и нейрональный синапсиновый промотор hSyn1 для экспрессии в нейронах.

Нами были получены AAV вирусные вектора, содержащие гены выбранных биосенсоров, промоторы для специфичной их экспрессии в нейронах и астроцитах, а также сигнальную последовательность для получения в некоторых случаях версий с локализацией в митохондриальном матриксе (рисунок.2).

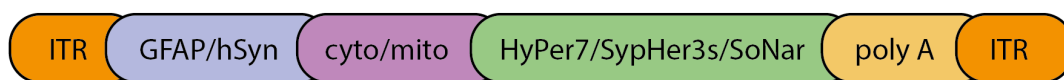


Рисунок 2. Схема генетических конструкций для аденоассоциированных вирусных частиц. На схеме ITR - инвертированные концевые повторы, GFAP – промотор, специфичный для астроцитов, hSyn1 – промотор, специфичный для нейронов; mito – митохондриальная сигнальная последовательность MST2, позволяющая локализовать сенсор в матриксе митохондрий, cyto – отсутствие специфичной сигнальной последовательности, что позволяет биосенсору локализоваться в цитозоле клетки; HyPer7 – генетически кодируемый флуоресцентный биосенсор для измерения динамики концентрации H₂O₂, SypHer3s – генетически кодируемый флуоресцентный биосенсор для измерения динамики рН, SoNar – генетически кодируемый флуоресцентный биосенсор для измерения соотношения НАД⁺/НАДН, poly A – полиаденилированный «хвост».

Для реализации поставленных нами задач мы выбрали серотип AAV9, который отвечает всем необходимым требованиям и демонстрирует, по данным из других работ, высокую эффективность заражения.

В результате были получены вирусные частицы AAV9 с генами биосенсоров SoNar, SypHer3S, HyPer7. Для анализа функциональности полученных вирусных частиц мы трансдуцировали первичную культуру гиппокампальных нейронов, добавив в клеточную среду суспензию вируса из расчета 10 000 вирусных частиц на клетку. Через 2 недели проводили визуализацию клеток с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ti2 (рисунок 3).

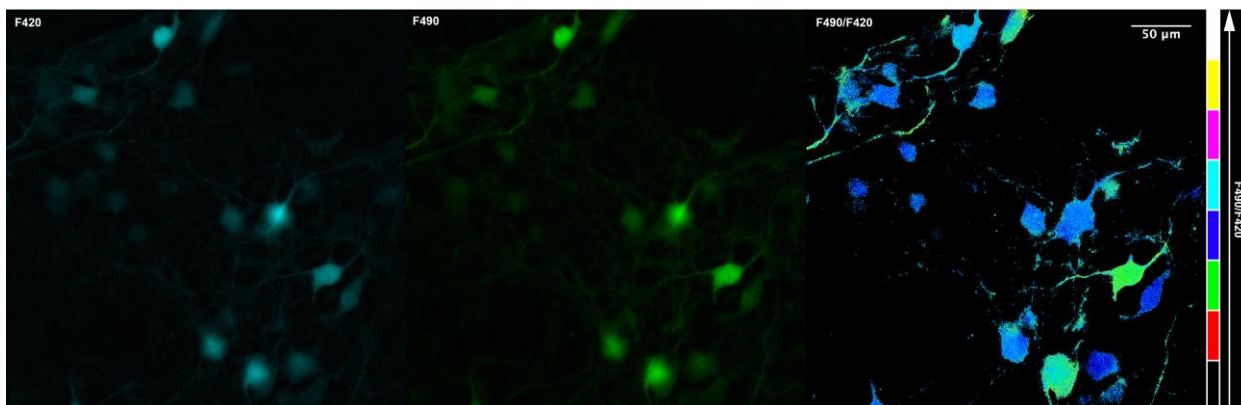


Рисунок 3. Первичная культура клеток, выделенная из гиппокампа эмбрионов мыши, экспрессирующая ген биосенсора *SypHer3s* в цитоплазме нейронов через 2 недели после трансдукации вирусными частицами AAV-*hSyn1-SypHer3S*. Сигнал pH-биосенсора представлен в разных флуоресцентных каналах (слева направо: циановый - F420, зеленый - F490, рациометрический сигнал - F490/F420 - приведен в псевдоцвете).

В результате проделанной работы нами были получены и протестированы все запланированные конструкции биосенсоров с локализациями в цитозоле и митохондриях нейронов и астроцитов. Оценку локализации биосенсоров производили путем морфологического анализа клеточных структур. На основе полученных вирусных конструкций были созданы вирусные частицы серотипа 9 (AAV9), которые в дальнейшем использовали как в экспериментах *in vitro*, так и в экспериментах *in vivo*.

Прежде чем приступить к экспериментам *in vivo*, мы решили провести измерение динамики биохимических процессов с помощью биосенсоров SypHer3s, HyPer7 и SoNar в первичной культуре нейронов в условиях гипоксии и последующей реоксигенации.

2.2 Динамика внутриклеточной концентрации H₂O₂, соотношения НАД⁺/НАДН и pH в первичных гиппокампальных нейронах мыши в условиях гипоксии.

Для исследования влияния гипоксии на динамику внутриклеточных биохимических параметров мы создали экспериментальную установку, позволяющую регулировать и точно контролировать содержание кислорода в клеточной среде с одновременной микроскопией исследуемого объекта (рисунок 4). От коммерческих аналогов сконструированная нами установка выгодно отличается тем, что позволяет изменять концентрацию кислорода в среде, окружающей клетки, за несколько минут. Данная установка позволила нам с высокой точностью контролировать уровень кислорода в окружении клеток.

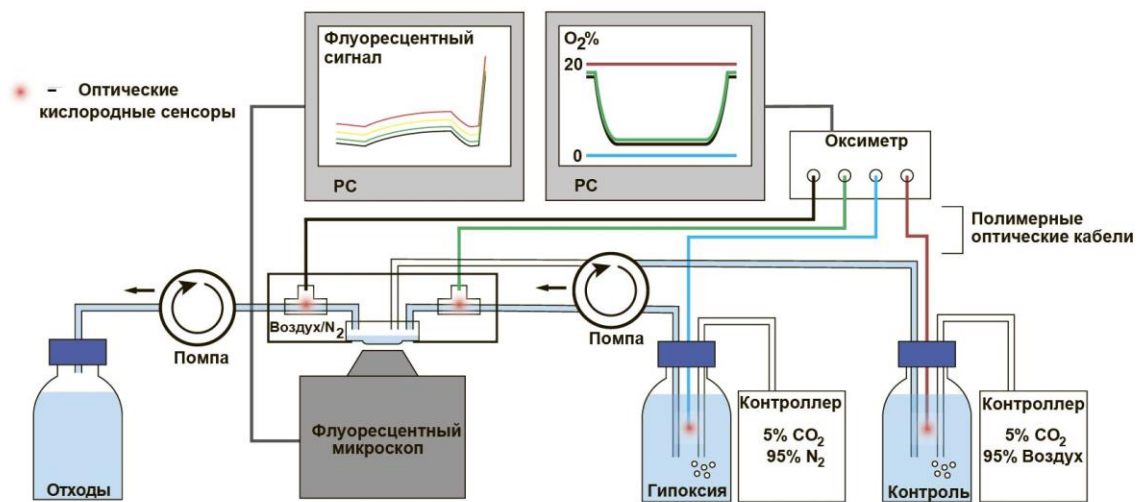


Рисунок 4. Схема созданной установки для моделирования гипоксии/реоксигенации клеточной культуры.

Перед экспериментом культуру гиппокампальных нейронов мыши заражали вирусами AAV9 с генами биосенсоров *HyPer7* (регистрация H_2O_2), *SypHer3s* (регистрация pH) и *SoNar* (регистрация соотношения НАД⁺/НАДН). Через неделю после трансдукции нейроны демонстрировали выраженную флуоресценцию. Клетки помещали в установку для моделирования гипоксии и начинали регистрацию сигнала с помощью флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ti2. Во время съемки концентрацию кислорода в среде снижали со значений $pO_2 \sim 150 \text{ mmHg}$ до $pO_2 < 5 \text{ mmHg}$. Продолжительность гипоксии составляла 35 минут, что было подобрано экспериментально, после чего уровень кислорода восстанавливали.

Внутриклеточное соотношение НАД⁺/НАДН отражает уровень оксигенации клеток. В нашем эксперименте мы подтвердили эти процессы в культивируемых нейронах с помощью биосенсора *SoNar*. Мы показали, что с момента начала гипоксии в цитозоле нейронов происходит увеличение доли НАДН. Изменения сигнала биосенсора достигают своего максимального значения в течение 20 минут. При этом, реоксигенация приводила к стремительному окислению пула НАД, однако соотношение НАД⁺/НАДН не достигало исходных значений (рис.5А). Соотношение НАД⁺/НАДН находится в равновесии с метаболической парой пируват/лактат, осуществляемым ферментом лактатдегидрогеназой. Поэтому добавка в среду к клеткам лактата или пирувата, которые транспортируются монокарбоксилатными транспортерами, мгновенно скажется на соотношении НАД⁺/НАДН. Действительно, в исследуемой системе пируват приводил к резкому увеличению НАД⁺/НАДН, а последующее добавление избытка лактата – к снижению (рис. 5А). Амплитуда изменений флуоресцентного сигнала *SoNar* была соизмерима с амплитудой ответа, наблюдаемой в этих же клетках в условиях гипоксии/реоксигенации.

Таким образом, регистрация соотношения НАД⁺/НАДН, динамику которого мы могли предсказать по результатам других исследований, позволила нам провести тестирование созданной экспериментальной установки. Мы не использовали *SoNar* с митохондриальной локализацией. Соотношение в разных клеточных компартментах может существенно отличаться, в частности, матрикс митохондрий отличается от цитозоля гораздо более восстановленным пулом НАД. Из-за высокой константы связывания к НАДН в таких условиях *SoNar* будет полностью пребывать в НАДН-связанной форме, что не позволит регистрировать реальную динамику этого параметра. Поэтому *SoNar* не рекомендован к использованию в условиях с низким значением НАД⁺/НАДН, который свойственен для митохондрий.

В следующей серии экспериментов мы регистрировали динамику рН в цитоплазме и митохондриях нейронов в условиях гипоксии/реоксигенации с помощью биосенсора *SypHer3s*. На графиках, представленных на рисунке 5 Б видно, что в условиях гипоксии происходит резкое падение рН в обоих наблюдаемых компартментах в течение первых нескольких минут. Более выраженное развитие ацидоза мы наблюдали в цитозоле. Восстановление нормального уровня кислорода в системе приводило к возвращению рН до исходных значений.

Согласно общепринятому мнению мирового научного сообщества, активные формы кислорода (АФК) являются главным внутриклеточным повреждающим фактором при патологических процессах, вызванных гипоксией/реоксигенацией. Примечательно, что динамика окислительного стресса никогда ранее не была показана напрямую в живых системах в режиме реального времени. Для этой цели в данной работе мы использовали биосенсор *HyPer7*, который отличается высокой чувствительностью к H_2O_2 , что позволяет его использовать в качестве надежного инструмента для визуализации даже физиологических колебаний H_2O_2 в небольших диапазонах концентраций. Используя

HyPer7 в исследуемой модели гипоксии в клеточной культуре нейронов нам не удалось зафиксировать значительных изменений флуоресцентного сигнала как в цитозоле, так и митохондриальном матриксе. При этом внешняя добавка H_2O_2 в среду приводит к мгновенному максимально возможному изменению сигнала, что свидетельствует о функционировании *HyPer7* в данной системе (Рис.5 В). При более детальном анализе динамики *HyPer7* в данной системе (рис.5 Г) мы обнаружили, что в момент гипоксии происходит медленное незначительное восстановление биосенсора, причем такая динамика оказалась более выраженной в матриксе митохондрий. Наблюдаемую динамику восстановления *HyPer7* в условиях гипоксии можно связать со снижением базового уровня H_2O_2 , который на некотором уровне образуется в клетках и при физиологических условиях. После реоксигенации сигнал *HyPer7* возвращался к своему исходному значению и далее не изменялся, что свидетельствует о том, что в исследуемой системе генерации активных форм кислорода не происходит.

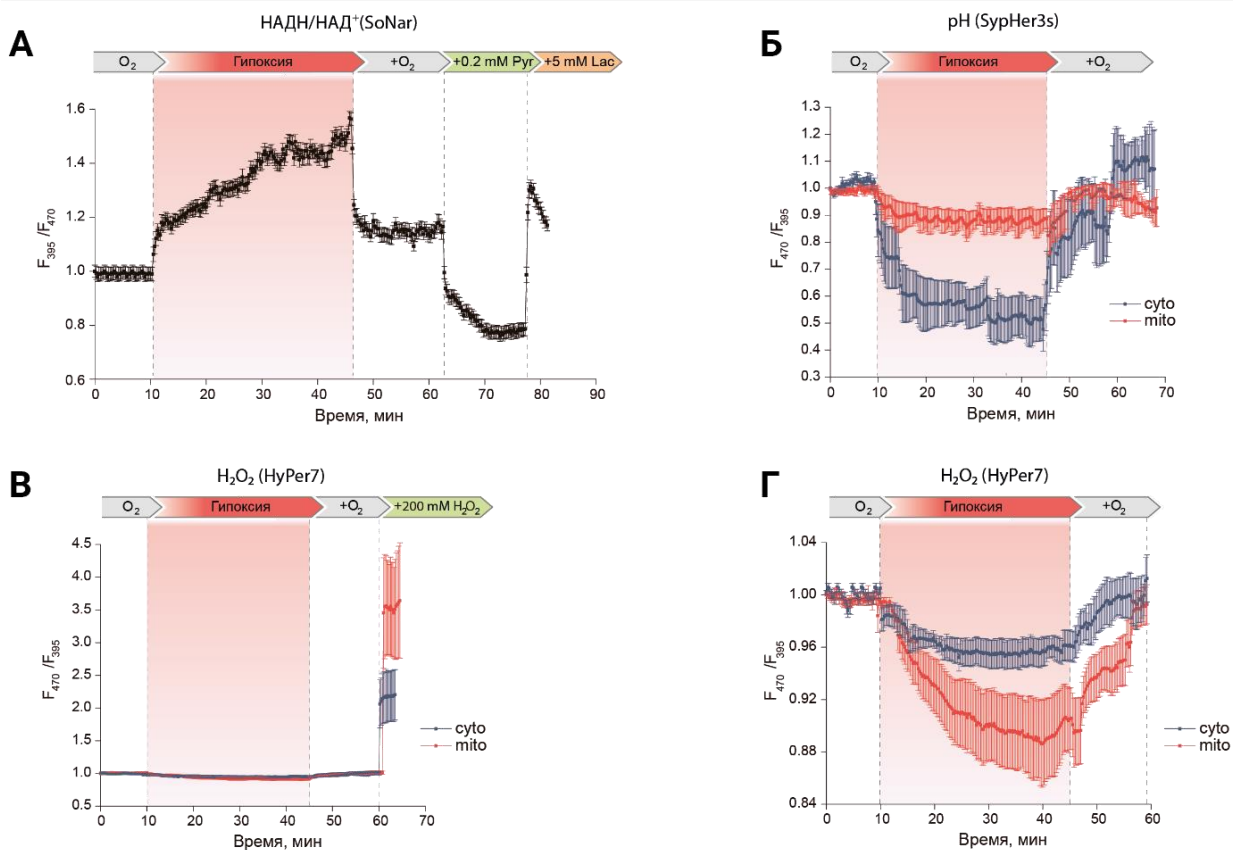


Рисунок 5. Регистрация динамики изменения соотношения НАД⁺/НАДН, pH и концентрации H₂O₂ с помощью генетически кодируемых флуоресцентных биосенсоров в цитозоле и митохондриальном матриксе культивируемых первичных нейронов гиппокампа мыши в течение 35 минут гипоксии и последующей реоксигенации. (А) Динамика соотношения НАД⁺/НАДН при гипоксии/реоксигенации в нейронах. Нормализованный сигнал SoNar (соотношение F₃₉₅ / F₄₇₀) был усреднен по 21 нейрону в 2 экспериментах. Более высокий рациометрический сигнал SoNar соответствует более высокому соотношению НАДН / НАД⁺. (Б) Динамика pH во время гипоксии / реоксигенации в нейронах. Нормализованный сигнал SypHer3s (соотношение F₄₇₀ / F₃₉₅) был усреднен по 184 нейронам с локализацией в митохондриальном матриксе в 8 экспериментах и 94 нейронам с цитоплазматической локализацией в 6 экспериментах. Более высокий рациометрический сигнал SypHer3s соответствует более щелочному значению pH. (В) Динамика концентрации H₂O₂ при гипоксии / реоксигенации в нейронах. Нормализованный сигнал HyPer7 (соотношение F₄₇₀ / F₃₉₅) усредняли по 68 нейронам с митохондриальной локализацией биосенсора и 120 нейронам с локализацией в цитозоле (по 4 эксперимента в каждом случае). Более высокий рациометрический сигнал HyPer7 соответствует более высокой концентрации H₂O₂. В конце эксперимента к клеткам была добавлена насыщающая концентрация H₂O₂ для определения максимального диапазона ответа HyPer7. (Г) Динамика концентрации H₂O₂ при гипоксии / реоксигенации в нейронах. Нормализованный сигнал HyPer7 (соотношение F₄₇₀ / F₃₉₅) усредняли по 203 нейронам с локализацией биосенсора в митохондриальном матриксе в 13 экспериментах и 216 нейронам с локализацией в цитозоле в 7 экспериментах. На всех графиках планки погрешностей соответствуют стандартной ошибке среднего.

Созданная нами система моделирования гипоксии/реоксигенации клеточной культуры позволяет также искать и исследовать воздействия, влияющих на динамику биохимических процессов при развитии патологического состояния. Так, например, одним из основных факторов риска возникновения ишемического инсульта у человека является гипергликемия. Известно, что при повышенной концентрации глюкозы, которое характерно для больных диабетом, последствия ишемического инсульта более тяжелые. У таких больных наблюдается более выраженный объем повреждения мозга, в т. ч. отек, ацидоз клеток и накопление глутамата.

С использованием гипоксической установки мы исследовали динамику изменения концентрации H_2O_2 в нейронах смешанной культуры в модели гипоксии/реоксигенации при повышенной концентрации глюкозы в клеточной среде. В данной серии экспериментов мы регистрировали сигнал биосенсора *NuPer7* в митохондриях, т. к. они являются наиболее чувствительными к гипоксии/реоксигенации клеточными органеллами. Для проведения данного эксперимента мы предварительно инкубировали смешанную культуру нейронов в течение 5 дней в среде с повышенным содержанием глюкозы (60 мМ) и далее проводили регистрацию флуоресцентного сигнала, полученного от биосенсора *NuPer7* в условиях гипоксии/реоксигенации. В результате мы зафиксировали скачок флуоресцентного сигнала *NuPer7* в условиях гипоксии в митохондриях нейронов, предварительно инкубированных в среде с повышенной глюкозой (рис.6). Далее в течение всего периода гипоксии биосенсор *NuPer7* демонстрировал динамику медленного восстановления до значения немного ниже исходного, при этом реоксигенация не вызвала значительных изменений сигнала. В исследуемой системе мы впервые зарегистрировали генерацию АФК, что позволяет сделать предположение о том, что содержание глюкозы в клеточной среде влияет на внутриклеточный редокс-статус. Примечательно, что небольшое изменение сигнала высокочувствительного биосенсора было зафиксировано именно в момент начала гипоксии.

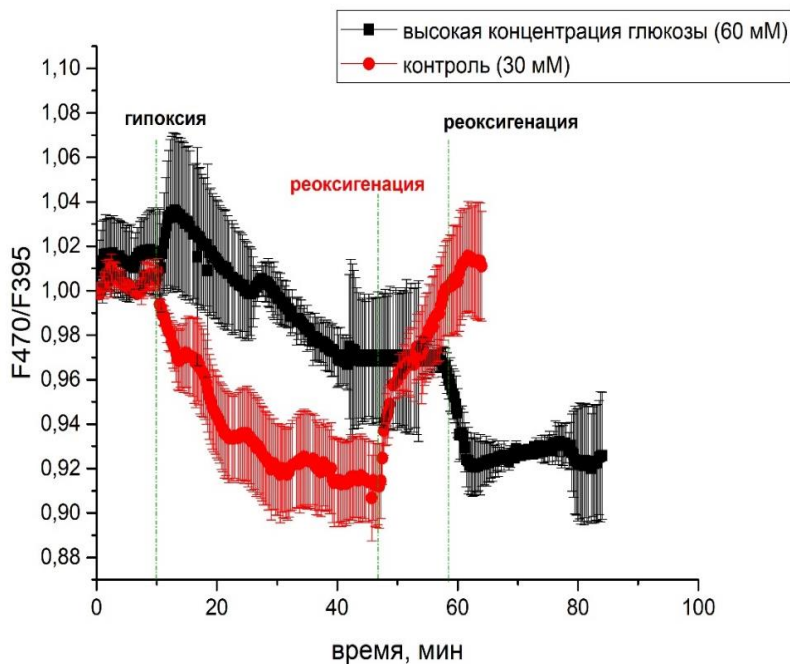


Рисунок 6. Регистрация динамики изменения концентрации H_2O_2 с помощью генетически кодируемого флуоресцентного биосенсора *NuPer7* в митохондриальном матриксе культивируемых первичных нейронов гиппокампа мыши в условиях кислородно-глюкозной депривации. Красной линией обозначен нормализованный сигнал биосенсора *NuPer7* (F470/F395), усредненный по 89 нейронам в 3 экспериментах, культивируемых в нормальных условиях. Черной линией обозначен

нормализованный сигнал биосенсора *NuPer7* (F470/F395), усредненный по 117 нейронам в 4 экспериментах, культивируемых в течение 5 дней в среде с повышенной концентрацией глюкозы (60 мМ). Планки погрешности на графике соответствуют стандартной ошибке среднего.

Еще одним важным метаболитом, концентрация которого значительно увеличивается при ишемии головного мозга, является лактат. Он накапливается во внеклеточном пространстве за счет анаэробного метаболизма глюкозы. Обмен лактатом между клетками осуществляется через семейство монокарбоксилатных транспортеров – МСТ. В тканях головного мозга широко распространены типы МСТ1, МСТ2 и МСТ4. Они осуществляют перенос лактата в симпорте с H^+ в стехиометрии 1:1. Таким образом, динамика лактата в мозге напрямую связана с изменением pH. Для разных типов клеток характерен разный тип МСТ. Например, нейроны экспрессируют МСТ2, для астроцитов характерны МСТ1 и МСТ4, а эндотелиальные клетки, формирующие в мозге кровеносные сосуды, экспрессируют только МСТ1. Примечательно, что при патологических

состояниях ткани, вызванных гипоксией, уровень экспрессии переносчиков в клетках также изменяется. В качестве ингибитора монокарбоксилатных транспортеров мы использовали альфа-циано-4-гидроксикоричную кислоту (4-CIN), данное соединение ингибирует поглощение лактата нейронами, но при этом не препятствует глиальному экспорту. Перед началом эксперимента мы инкубировали в течение 16 часов смешанную культуру клеток, выделенных из гиппокампа эмбрионов мыши, в среде с содержанием 100 мкМ 4-CIN. Мы обнаружили, что воздействие ингибитора нейрональных монокарбоксилатных транспортеров существенно изменяет динамику рН во время кислородно-глюкозной депривации (рис. 7). В нейронах, обработанных 4-CIN, мы не обнаружили развитие выраженного ацидоза, который обычно наблюдаем в условиях гипоксии. Таким образом, с помощью данного подхода мы показали, что динамика рН в значительной степени зависит от функционирования монокарбоксилатных транспортеров.

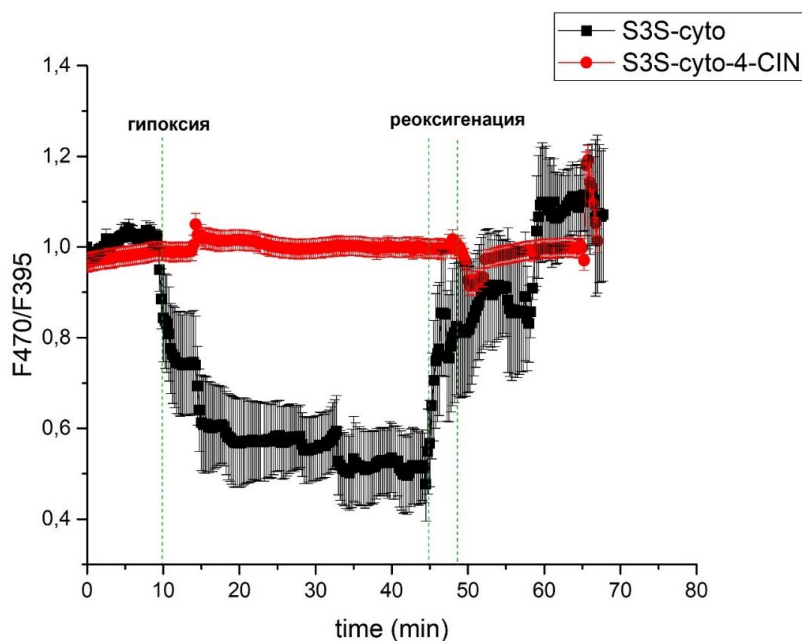


Рисунок 7. Исследование динамики рН с помощью генетически кодируемого биосенсора SypHer3s в цитозоле гиппокампальных нейронов мыши в условиях кислородно-глюкозной депривации. Черной линией обозначен нормализованный сигнал биосенсора SypHer3s (соотношение F470 / F395), усредненный по 94 нейронам в 6 экспериментах, культивируемых в обычных условиях (из рисунка 5 Б). Красной линией обозначен нормализованный сигнал биосенсора SypHer3S (соотношение F470 / F395), усредненный по 99 нейронам в 3 экспериментах. Нейроны предварительно инкубировали в

течение 16 часов в среде с содержанием 100 мкМ ингибитора монокарбоксилатных транспортеров – 4-CIN. На всех графиках планки погрешностей соответствуют стандартной ошибке среднего.

2.3 Исследование *in vivo* динамики ацидоза и концентрации H₂O₂ в тканях мозга крыс при развитии ишемического инсульта

Далее мы приступили к исследованию динамики рН, H₂O₂ и соотношения НАД⁺/НАДН в тканях головного мозга крыс в условиях ишемии. Для моделирования ишемического инсульта у грызунов нами была выбрана широко используемая во всем мире модель окклюзии средней мозговой артерии (МСАО). При таком подходе через внутреннюю сонную артерию вводится окклюдер до закупорки средней мозговой артерии, в результате чего в ткани мозга, омываемой этой артерией, наступает ишемия. Восстановление кровотока после извлечения окклюдера приводит к состоянию реперфузии ткани. Для того чтобы исследовать биохимические изменения на ранних стадиях патогенеза ткани, необходимо проводить регистрацию непосредственно в центральной области инсульта. Для этой цели мы использовали технику регистрации сигнала через имплантированные в головной мозг оптические волокна.

Полученные на предыдущем этапе вирусные частицы AAV9 с генами биосенсоров NuPer7, SypHer3s, SoNag были инъецированы в область структуры хвостатого ядра обоих полушарий мозга крыс линии SHR. Для одного животного всегда был инъецирован один вид вирусных частиц. Мы регистрировали сигнал одновременно в двух полушариях, при этом вызывали инсульт в левом, используя сигнал в здоровом правом в качестве контроля.

Одновременно с инъекций вирусных частиц в эти же координаты мозга мы имплантировали оптические волокна длиной 5,2 мм, которые закрепляли на черепе посредством керамических ферул. Через 3 недели в тканях мозга животных развивался флуоресцентный сигнал в результате экспрессии гена выбранного биосенсора.

Работу по измерению биохимических процессов в тканях мозга крыс посредством оптических волокон проводили в сотрудничестве с исследователями из лаборатории фотоники и нелинейной спектроскопии МГУ под руководством А. М. Жёлтикова. Схема экспериментальной установки представлена на рисунке 8 Г.

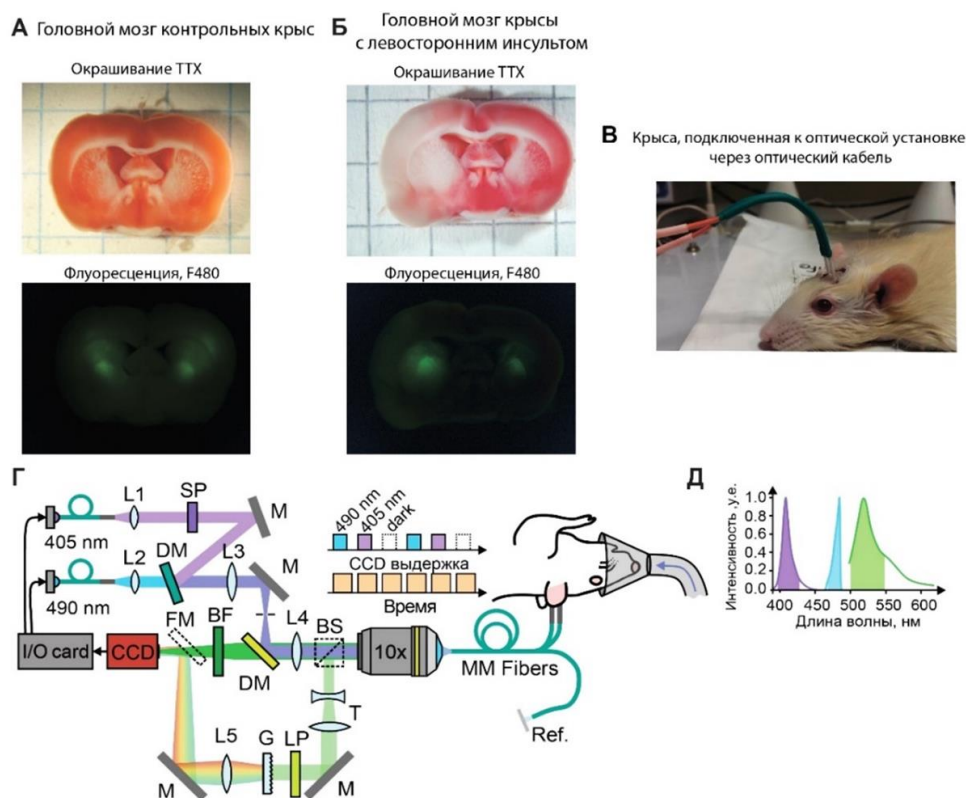


Рисунок 8. Регистрация флуоресцентного сигнала биосенсоров в тканях головного мозга крыс в модели ишемического инсульта. (А) На рисунке вверху изображен окрашенный ТТХ срез мозга ложнооперированных крыс после 24 ч с момента проведения операции. Для среза характерно равномерное окрашивание, поврежденные области не визуализируются. Ниже изображен тот же срез во флуоресцентном канале для визуализации области экспрессии гена биосенсора на примере *HyPer7*. (Б) На рисунке изображен окрашенный ТТХ срез мозга после 24 часов с момента окклюзии средней мозговой артерии. Непрокрашенная область в левом полушарии соответствует области повреждения. Ниже изображен этот же срез во флуоресцентном канале. Область экспрессии гена биосенсора на примере *HyPer7* перекрывается с поврежденной тканью. (В) Крыса с имплантированными оптическими волокнами во время регистрации сигнала. (Г) Схема оптической установки для двухканальной оптоволоконной фотометрии ратиометрических биосенсоров. Оптическая установка: диэлектрические зеркала (М); дихроичные зеркала (ДМ); многофункциональное устройство ввода-вывода (плата ввода-вывода); камера научного класса (CCD); полосовой фильтр (BF); фильтр короткого пропускания (SP); объектив микроскопа (10x); длинные многомодовые волокна (MM Fibers). Диаграмма считывания флуоресценции с временным разрешением с разделением по длине волны показана на вставке. (Д) Спектры возбуждения флуоресценции с помощью двух светодиодных источников (фиолетовый, 405 нм и голубой, 490 нм) и спектр эмиссии биосенсоров (зеленый).

Для регистрации динамики pH, H₂O₂, соотношения НАД⁺/НАДН в тканях мозга крыс во время ишемического инсульта использовали соответствующие биосенсоры *SypHer3s*, *HyPer7* и *SoNar*. При этом биосенсор *SypHer3s* использовали с локализацией в цитозоле нейронов, а *HyPer7* с локализацией в митохондриальном матриксе. Выбор подобной локализации биосенсоров был обусловлен результатами наших экспериментов с

клеточной культурой. Мы выбрали компартменты, для которых были характерны наиболее выраженные изменения с указанными сенсорами в культивируемых нейронах в ответ на гипоксию/реоксигенацию. Это позволило сократить количество животных в экспериментах. Кроме того, согласно ранее полученным данным в нашей лаборатории известно, что H_2O_2 , образующийся в цитозоле, быстро диффундирует в митохондриальный матрикс, однако противоположное направление диффузии ограничено. Следовательно, *HyPer7*, локализованный в матриксе митохондрий способен обнаруживать H_2O_2 независимо от места его продукции. В данной работе мы не проводили регистрацию НАД⁺/НАДН *in vivo* с использованием биосенсора *SoNar*, поскольку согласно ранее полученным данным, рН-компонента вносит существенный вклад в сигнал данного биосенсора. *SoNar*, как и многие другие биосенсоры на основе *srYFP* чувствителен к изменениям рН в физиологическом диапазоне, что накладывает ряд ограничений в применении в моделях с существенными колебаниями рН.

2.3.1 *In vivo* исследование динамики рН в тканях мозга крыс при развитии ишемического инсульта

Для преобразования ратиометрического флуоресцентного сигнала биосенсора *SupHer3s* в конкретные значения внутриклеточного рН перед экспериментами *in vivo* мы провели калибровку его сигнала на очищенном препарате белка. Для этого оптическое волокно погружали в кюветы с растворами белка *SupHer3s* (500 нМ) в различных буферных системах в диапазоне рН от 5,0–11,0 и регистрировали флуоресцентный сигнал. В дальнейшем полученную калибровочную кривую, представленную на рисунке 9 А, использовали в *in vivo* исследованиях для определения значений рН в нейронах.

Используя описанный выше подход, мы показали, что в цитозоле нейронов рН значительно изменяется при ишемии в тканях мозга крысы *in vivo*. В нейронах структуры хвостатого ядра рН снижается от первоначального значения $7,25 \pm 0,08$ до $6,7 \pm 0,15$ уже в первые несколько секунд с момента окклюзии сосуда (рисунок 9 В). Однако практически сразу после достижения своего минимального значения рН медленно начинает повышаться. После восстановления кровотока эта тенденция сохраняется, у некоторых животных рН начинает увеличиваться быстрее. При этом за время регистрации в течение часа после реперфузии рН не достиг первоначальных значений у большинства животных в экспериментальной группе. Мы также регистрировали сигнал *SupHer3s* на следующие сутки. У некоторых животных рН в нейронах в ишемизированной области также оставался пониженным. Однако у некоторых животных рН все же возвращался к исходным значениям. Примечательно, что тяжесть инсульта никак не коррелировала с тем, возвращается рН нейронов к исходным значениям или нет.

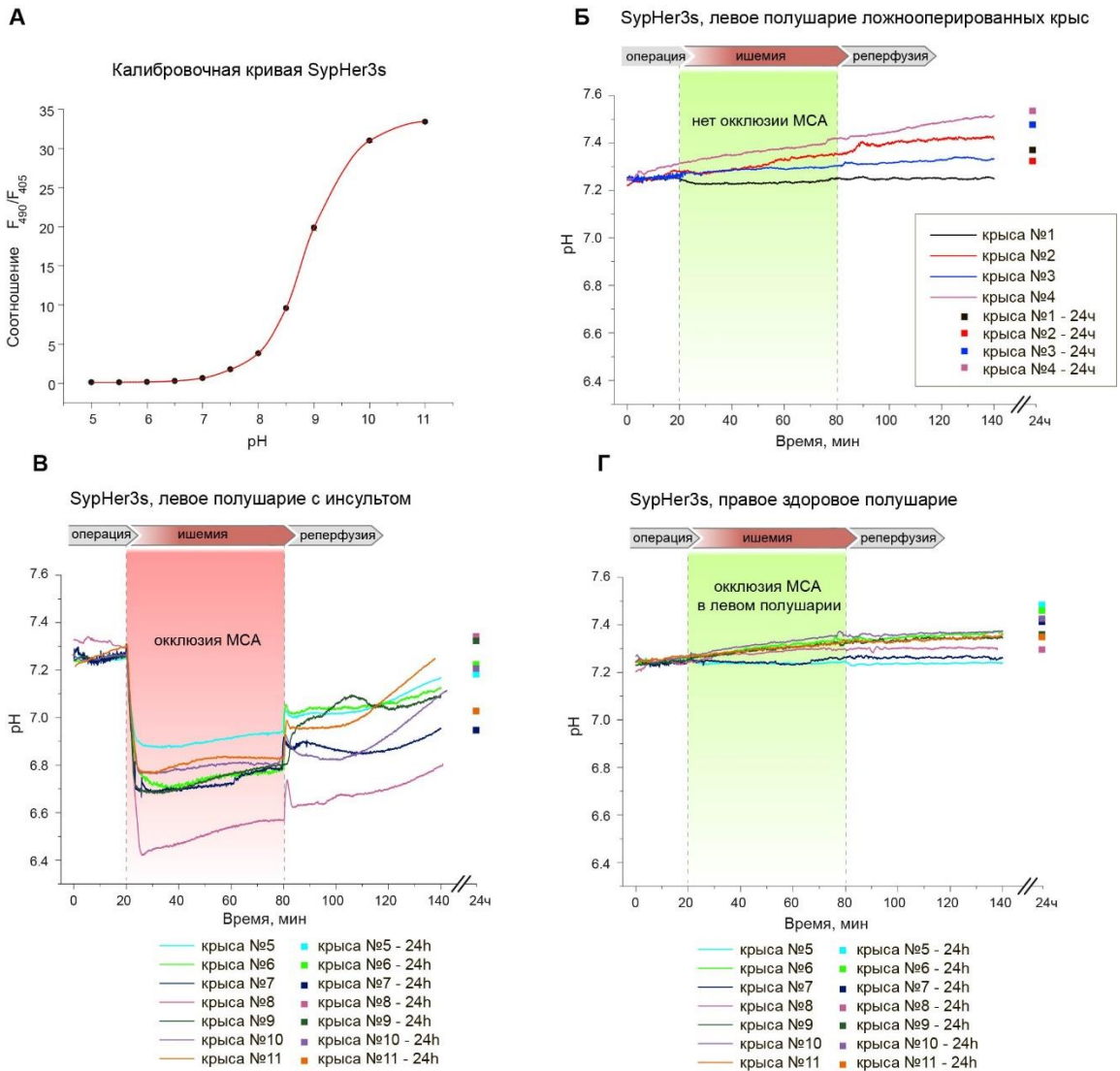


Рисунок 9. Регистрация динамики pH *in vivo* в тканях мозга крыс при развитии ишемического инсульта с помощью генетически кодируемого биосенсора SupHer3s. (А) Калибровочная кривая зависимости сигнала SupHer3s от значения pH, полученная на препарате очищенного белка *in vitro*. Планки погрешностей соответствуют стандартному отклонению, $n \geq 3$. (Б) Динамика изменения pH, измеренная с помощью биосенсора SupHer3s, в левом полушарии мозга крыс из группы ложнооперированных животных. (В, Г) Регистрация динамики pH в ишемизированном и здоровом полушариях мозга крыс. Для каждой крысы представлено по два графика. Каждый график на рисунках Б-Г отражает динамику pH у индивидуальной крысы. Отдельные точки на графиках обозначают значения pH, измеренные на следующие сутки.

2.3.2. *In vivo* исследование динамики H₂O₂ в тканях мозга крыс при развитии ишемического инсульта.

Аналогичные серии экспериментов мы проводили с крысами, в ткани мозга которых экспрессировался ген биосенсора HyPer7 для регистрации динамики концентрации H₂O₂. Для данной серии экспериментов мы выбрали локализацию биосенсора в матриксе митохондрий нейронов. С помощью HyPer7 ранее было показано, что H₂O₂, продуцируемый в цитозоле, быстро диффундирует в митохондриальный матрикс, при этом обратное направление диффузии ограничено. Таким образом, митохондрии действительно являются одними из наиболее чувствительных к окислительному стрессу органеллами. Поэтому, локализовав HyPer7 в митохондриях, мы обнаружим увеличение H₂O₂ независимо от источника его происхождения.

Наблюдая за изменениями сигнала HyPer7-mito в острой фазе инсульта, мы обнаружили, что биосенсор окисляется как при начале ишемии, так и резко при реперфузии. Однако максимальное изменение сигнала биосенсора в поврежденном

полушарии мы обнаружили на следующие сутки (рис. 10 В). Сигнал увеличился более чем в два раза, что соответствует практически максимальному окислению биосенсора по полученным нами данным *ex vivo* (рис. 10 А). Таким образом, при ишемическом инсульте действительно развивается окислительный стресс, однако динамика его развития оказалась отличной от общепринятых представлений. Вероятно, какое-то время масштабное образование АФК в клетках сдерживается антиоксидантами системами защиты, однако в результате тотальной метаболической недостаточности ткани развивается окислительный стресс.

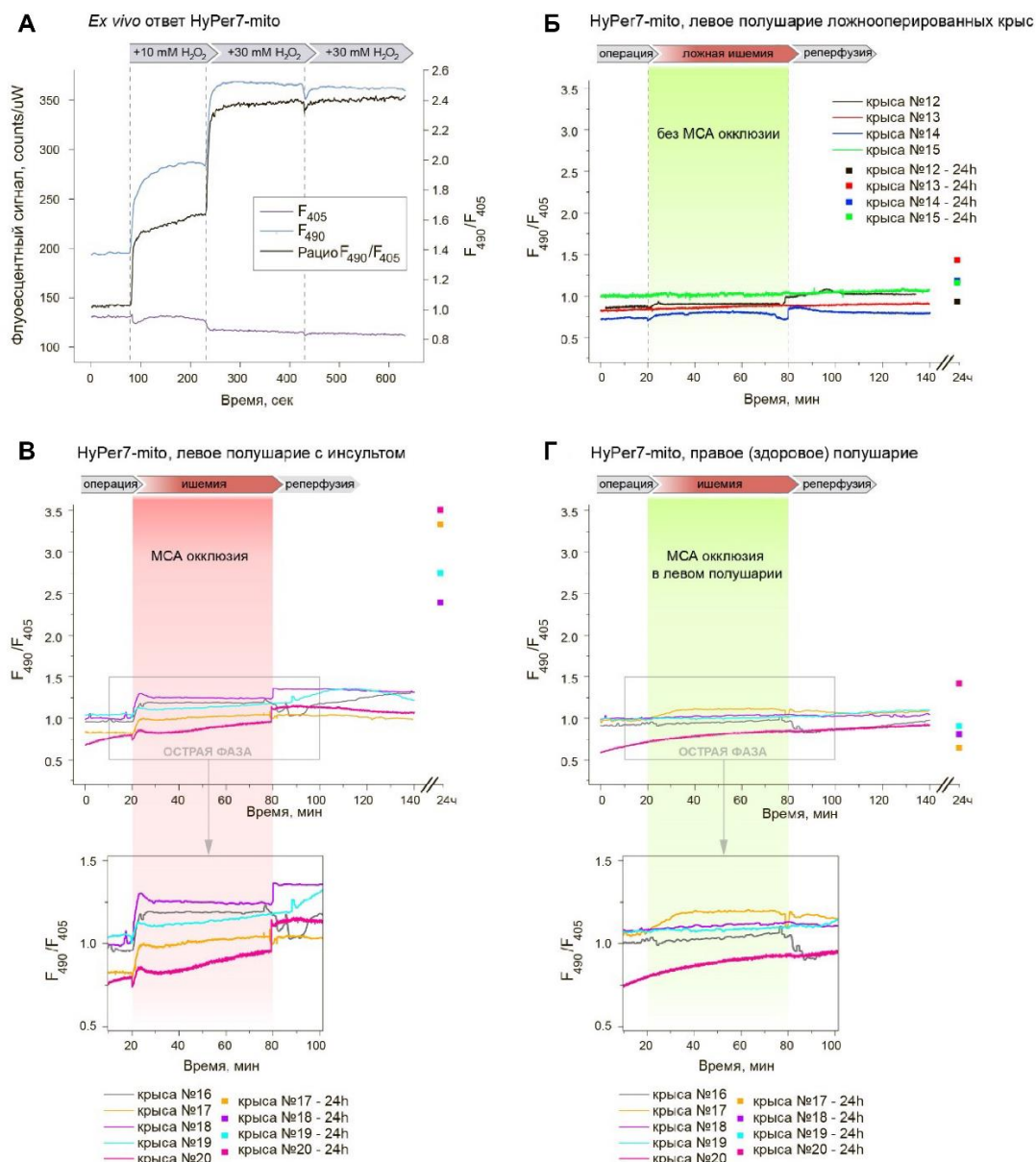


Рисунок 10. Регистрация динамики H_2O_2 *in vivo* в тканях мозга крыс при развитии ишемического инсульта с помощью генетически кодируемого биосенсора HyPer7. (А) Регистрация флуоресцентного сигнала HyPer7-mito в тканях мозга крыс *ex vivo* в ответ на экзогенное добавление H_2O_2 . (Б) Динамика HyPer7-mito в левом полушарии крыс из группы ложнооперированных животных. (В, Г) Регистрация сигнала HyPer7-mito в ишемизированном и здоровом полушариях крыс. Для каждой крысы представлено по два графика. Каждый график на рисунках Б-Г отражает динамику сигнала HyPer7-mito у индивидуальной крысы. Отдельные точки на графиках обозначают значения сигнала, измеренные на следующие сутки.

На следующем этапе мы регистрировали сигнал биосенсора HyPer7 в тканях мозга крыс при развитии ишемического инсульта в течение более длительного времени, чтобы

определить точный момент образования H_2O_2 . Для сравнения мы также регистрировали динамику окислительного стресса в астроцитах, используя вирусные конструкции с GFAP промотором. Эксперименты проводились по аналогии с предыдущими с той лишь разницей, что после проведения операции сигнал биосенсора регистрировали в течение 40 часов с временным интервалом в 5 часов за исключением ночного периода.

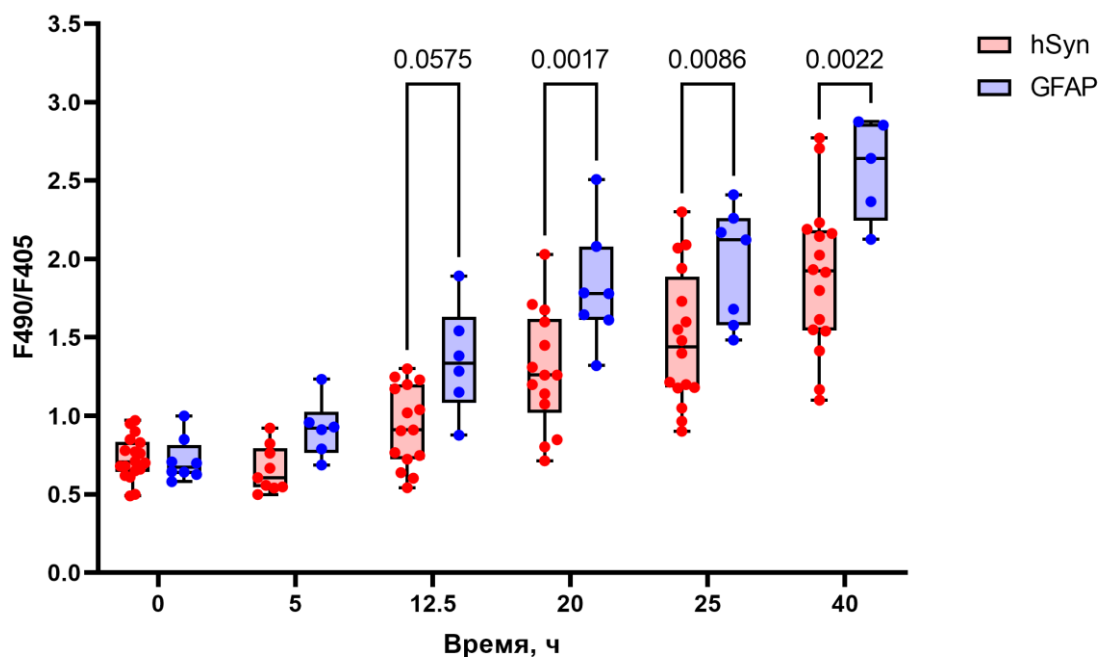


Рисунок 11. Сравнение динамики изменения концентрации H_2O_2 в нейронах (hSyn) и астроцитах (GFAP) в течение 40 часов после МСАО. Группа hSyn включала в себя 14 животных, группа GFAP – 8. Статистический анализ проведен с применением двухфакторного дисперсионного анализа (two-way ANOVA) с апостериорным тестом на множественные сравнения Бонферрони.

В данных экспериментах не было обнаружено существенных различий в динамике концентрации H_2O_2 в астроцитах и нейронах в течение острой фазы ишемического инсульта. Однако согласно графику, представленному на рисунке 11, видно, что начиная с 12 часов после МСАО флуоресцентный сигнал биосенсора НуPer7 в нейронах увеличивается медленнее, чем в астроцитах (GFAP). Согласно двухфакторному дисперсионному анализу (two-way ANOVA) с апостериорным тестом на множественные сравнения Бонферрони, через 20, 25 и 40 часов после окклюзии средней мозговой артерии сигнал НуPer7 в нейронах статистически достоверно ниже ($p < 0.05$), чем сигнал биосенсора в группе животных с локализацией в астроцитах.

Для астроцитов характерно наличие астроцитарных пероксисом. Астроцитарные пероксисомы важны для поддержания структуры миелина в головном мозге. В то же время пероксисомы, в которых жирные кислоты с очень длинной цепью подвергаются β -окислению, считаются одним из источников АФК. Известно, что пероксисомы глиальных клеток защищают нейроны от воздействия перекиси, поэтому сбой в работе этих органелл приводит к различному поражению. Возможно, этим отличием обусловлена разница в динамике окислительного стресса в сравниваемых нами типах клеток. Кроме того, астроциты активируются вследствие ишемического инсульта и вовлечены в процессы воспаления и нейротоксичности. Так, во время ишемии, астроциты усиливают развитие воспалительной реакции, высвобождая большое количество воспалительных факторов, способствуют активации и инфильтрации других воспалительных клеток и запускают каскад различных воспалительных реакций. Таким образом, различия в динамике

изменения концентрации H_2O_2 в астроцитах и нейронах могут быть связаны также с реакциями нейровоспаления, которые приводят окислительному стрессу.

Подводя итог по вышеприведенным результатам, необходимо отметить, что в настоящей работе мы использовали метод оптоволоконной регистрации сигнала глубоко в тканях мозга, поскольку при используемой модели инсульта зона повреждения формируется в стриатуме. Однако для многих исследований функционирования мозга в норме и патологии необходимо регистрировать изменения в коре головного мозга. И в этом случае гораздо удобнее использовать подход мультифотонной микроскопии через краниальные окна, поскольку он позволяет не только регистрировать флуоресцентный сигнал биосенсора, но и визуализировать клетки в глубоких слоях коры головного мозга. Поэтому очень важно проводить работы по определению свойств биосенсора в режиме многофотонного возбуждения флуоресценции. В рамках данной работы мы провели детальное тестирование свойств pH-биосенсора SypHer3s в двухфотонном режиме микроскопии.

2.4. Изучение спектральных характеристик pH-биосенсора SypHer3S в режиме мультифотонной микроскопии

Подход мультифотонного возбуждения хромофоров позволяет проводить микроскопию различных структур в тканях с высоким пространственным разрешением. Молекула флуоресцентного биосенсора в такой системе одновременно поглощает несколько инфракрасных фотонов (2 или даже 3), при этом эмиссия регистрируется в видимом диапазоне спектра. Примечательно, что спектры мультифотонного возбуждения флуоресценции биосенсоров на основе даже одного и того же флуоресцентного ядра могут существенно различаться. Кроме того, по известному спектру однофотонного возбуждения нельзя предсказать форму многофотонного. Поэтому мы охарактеризовали в режиме двухфотонной микроскопии спектральные характеристики одного из ключевых биосенсоров в нашем исследовании SypHer3s.

Для тестирования биосенсора SypHer3s *in vitro* мы получили его белковый препарат из биомассы бактериальных клеток *E. coli*, используя металл-аффинную хроматографию и гель-фильтрационные методы очистки. Далее белок SypHer3s помещали в кювету в раствор с заданным значением pH, после чего регистрировали спектр в двухфотонном режиме возбуждения флуоресценции. Были проведены измерения в диапазоне pH от 5.0 до 10.5 (рис. 12 Б).

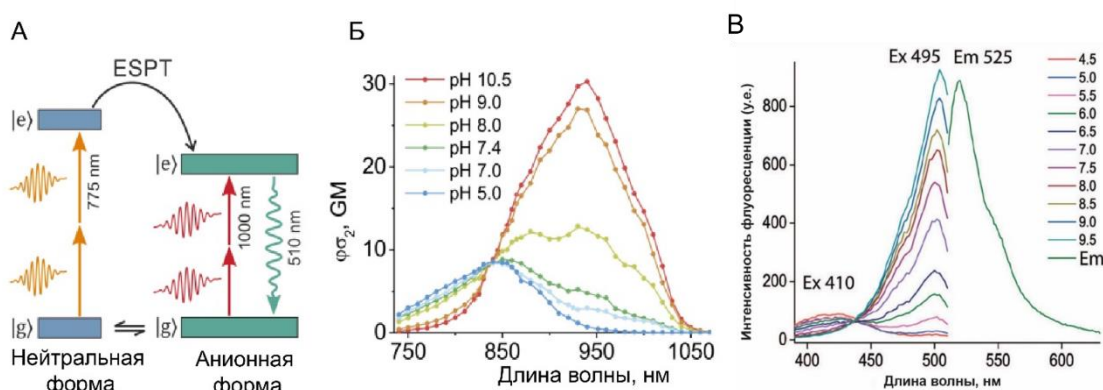


Рисунок 12. Спектральные характеристики pH-биосенсора SypHer3s в режиме двухфотонного возбуждения флуоресценции. А. На схеме представлены протонированное и депротонированное состояния хромофора, при переходе в возбужденное состояние происходит одновременное поглощение двух фотонов (оранжевые и красные вертикальные стрелки). Процесс переноса протона в возбужденном состоянии (ESPT) показан черной стрелкой. Зеленая волнистая линия означает процесс излучения анионной формой хромофора. Б. Спектр двухфотонного возбуждения флуоресценции pH-биосенсора SypHer3s. В. Спектр однофотонного возбуждения флуоресценции pH-биосенсора SypHer3s (приведено с изменениями по Ertaikova Y.G.

et al. SypHer3s: a genetically encoded fluorescent ratiometric probe with enhanced brightness and an improved dynamic range // Chem Commun (Camb). 2018. Vol. 54, № 23. P. 2898–2901.

Далее мы протестировали биосенсор SypHer3s в двухфотонном режиме возбуждения флуоресценции в живых клетках HeLa Kyoto и в первичной культуре гиппокампальных нейронов (рис.13 А, Б). Характеристики белка в естественном внутриклеточном окружении могут существенно отличаться от наблюдаемых в растворе *in vitro*. Поэтому мы также исследовали зависимость спектральных характеристик SypHer3s от значения pH в цитозоле клеток (рис.13).

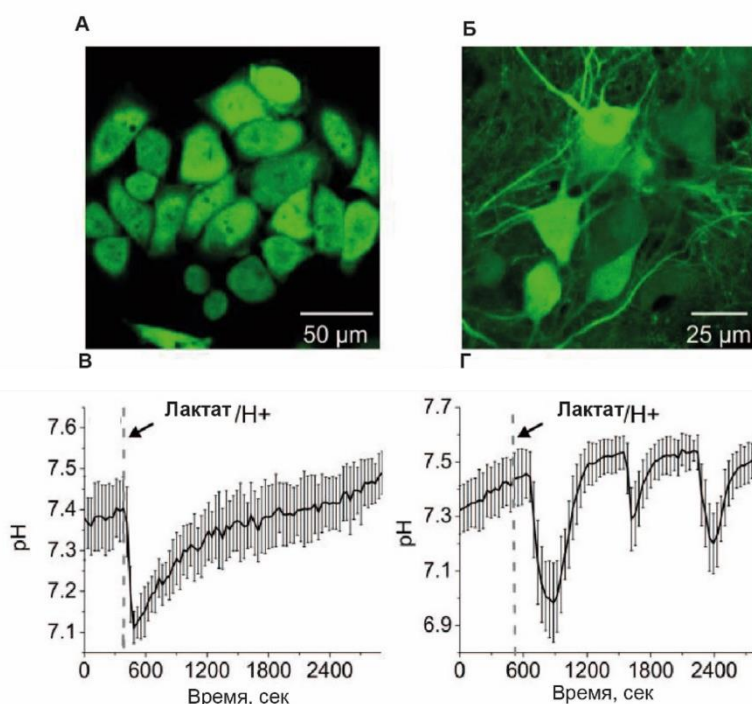


Рисунок 13. Регистрация pH с помощью pH-биосенсора SypHer3s в режиме двухфотонной микроскопии. А. Изображения клеток HeLa Kyoto с экспрессией SypHer3s в режиме двухфотонного возбуждения флуоресценции (для канала с длиной волны 775 нм); график ниже отражает динамику pH в этих клетках (усреднение по 20 клеткам) при добавлении 20 мМ лактата. Б – аналогичные результаты для первичной культуры нейронов, выделенных из гиппокампа мыши (усреднение по 7 клеткам). На всех графиках планки погрешностей соответствуют стандартной ошибке среднего.

Благодаря высокому пространственному разрешению в биологических образцах двухфотонная микроскопия представляет огромный интерес для визуализации *in vivo*. Для тестирования SypHer3s мы инъектировали в кору головного мозга крыс линии SHR вирусные частицы AAV9, несущие ген биосенсора SypHer3S. Через 3 недели после инъекции вирусных частиц получали срезы мозга. На срезах фокусировались на флуоресцентной области и последовательно записывали трехмерные z-стэки с постоянным чередованием возбуждения на 775 нм и 1000 нм с временным шагом 30–40 с. При обработке на каждом z-стэке выбирали слой с оптимальной фокусировкой на тело нейрона и измеряли среднюю яркость флуоресценции (рис. 14 А, Б). При увеличении концентрации лактата во внешней среде мы также зафиксировали падение pH в нейронах в составе свежесыведенной ткани (рисунке 14 В, Г).

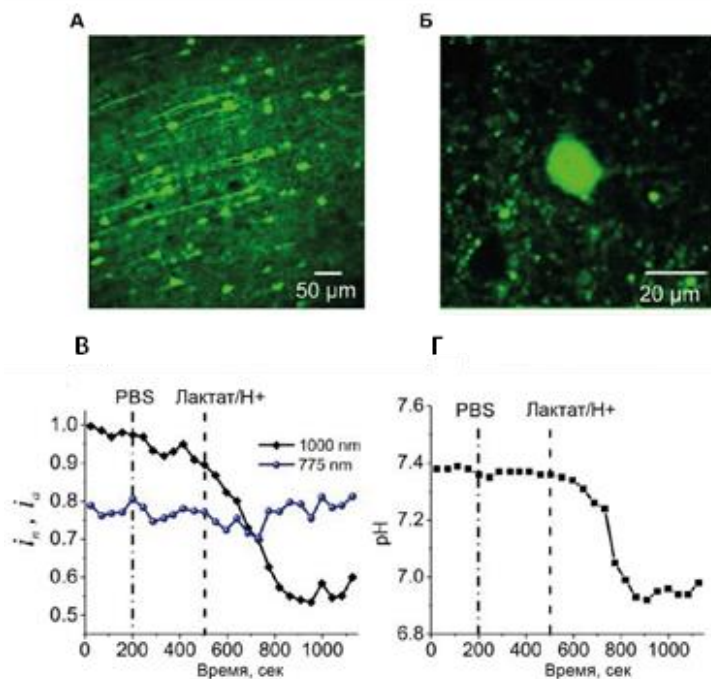


Рисунок 14. Изображения области (А) фиксированного 4% раствором параформальдегида в течение 24 часов и (Б) интактного срезов мозга крысы, нейроны которого экспрессировали ген биосенсора *SypHer3s* в режиме двухфотонного возбуждения флуоресценции. (В) Временная динамика сигнала флуоресценции при двухфотонном возбуждении сенсора *SypHer3s* в нейроне в свежесыведенном срезе мозга крысы на длина волн 775 нм (черный) и 1000 нм (синий) при добавлении в среду буфера (в качестве контроля) и лактата. (Г) Временная динамика ратиометрического сигнала биосенсора *SypHer3s* в нейроне в свежесыведенном срезе мозга крысы, который получен как соотношение сигналов при возбуждении на 1000 нм к 775 нм, представленных на рисунке В. Значения сигнала переведены в конкретные значения pH.

Таким образом, в рамках данной работы мы полностью охарактеризовали свойства pH-биосенсора *SypHer3s* в режиме двухфотонного возбуждения флуоресценции в системах *in vitro*, в живых клетках и срезах тканей головного мозга крыс. В дальнейшем *SypHer3s* может быть использован для прижизненной визуализации событий в клетках коры головного мозга лабораторных животных через краниальные окна. Эта техника успешно применяется во многих нейробиологических исследованиях. Поэтому тестирование новых биосенсоров в данном режиме микроскопии имеет огромный потенциал. В дальнейшем по отработанной методике мы планируем протестировать другие широко используемые биосенсоры.

В настоящей работе мы показали, что генетически кодируемые биосенсоры в сочетании с подходом оптоволоконной регистрацией сигнала представляют собой мощный инструмент для исследования патологий мозга. Современная коллекция биосенсоров позволяет исследовать динамику многих биохимических параметров, в том числе тех, изучение которых было недоступно до недавнего времени. В частности, динамика генерации H_2O_2 в клетках мозга крысы при развитии ишемического инсульта была визуализирована нами впервые. Таким образом, предложенные нами подходы составляют хороший задел для будущих исследований функционирования мозга в норме и патологии.

ВЫВОДЫ

1. Впервые с помощью высокочувствительного биосенсора NuPer7 и разработанной оптоволоконной техники регистрации сигнала была визуализирована динамика H₂O₂ в клетках мозга крыс *in vivo* при развитии ишемического инсульта. В клетках поврежденной области мозга генерация H₂O₂ медленно нарастает, достигая максимальных значений на следующие сутки с момента окклюзии артерии. На поздней стадии развития инсульта (от 20 часов) производство H₂O₂ в митохондриях астроцитов выше, чем в нейронах поврежденной области.
2. В культивируемых гиппокампальных нейронах в условиях гипоксии/реоксигенации не происходило образования H₂O₂. Незначительная и кратковременная генерация H₂O₂ была обнаружена при гипоксии нейронов, содержащихся в среде с 2-кратным повышением глюкозы по концентрации.
3. С помощью биосенсора SypHer3s была визуализирована *in vivo* динамика pH в тканях мозга крыс при ишемическом инсульте. В течение нескольких секунд после начала ишемии ткань мозга испытывает значительный ацидоз (pH повсеместно снижается на ~0,5 единиц).
4. В условиях гипоксии культивируемые гиппокампальные нейроны также испытывают резкое снижение pH. Эффект более выражен в цитозоле, чем в митохондриальном матриксе. Ингибирование монокарбоксилатных транспортеров предотвращает развитие ацидоза в культуре нейронов в выбранных условиях гипоксии/реоксигенации.
5. Охарактеризованы свойства pH-биосенсора SypHer3s в режиме двухфотонной микроскопии на препарате белка *in vitro*, а также в культуре живых клеток и на срезах мозга грызунов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Kelmanson IV*, Shokhina AG*, **Kotova DA***, Pochechuev MS, Ivanova AD, Kostyuk AI, Panova AS, Borodinova AA, Solotenzov MA, Stepanov EA, Raevskii RI, Moshchenko AA, Pak VV, Ermakova YG, van Belle GJC, Tarabykin V, Balaban PM, Fedotov IV, Fedotov AB, Conrad M, Bogeski I, Katschinski DM, Doepfner TR, Bähr M, Zheltikov AM, Belousov VV, Bilan DS. *In vivo* dynamics of acidosis and oxidative stress in the acute phase of an ischemic stroke in a rodent model // Redox Biology. – 2021. – Т. 48. – С. 102178. *Авторы внесли равный вклад в работу.
2. Chebotarev AS, Pochechuev MS, Lanin AA, Kelmanson IV, **Kotova DA**, Fetisova ES, Panova AS, Bilan DS, Fedotov AB, Belousov VV, Zheltikov AM. Enhanced-contrast two-photon optogenetic pH sensing and pH-resolved brain imaging // Journal of Biophotonics. – 2021. – Т. 14. – №. 3. – С. e202000301.
3. Pochechuev MS, Bilan DS, Fedotov IV, Kelmanson IV, Solotenzov MA, Stepanov EA, **Kotova DA**, Ivanova AD, Kostyuk AI, Raevskii RI, Lanin AA, Fedotov AB, Belousov VV, Zheltikov AM. Real-time fiber-optic recording of acute-ischemic-stroke signatures // Journal of Biophotonics. – 2022. – С. e202200050.
4. Lanin AA, Pochechuev MS, Chebotarev AS, Kelmanson IV, Bilan DS, **Kotova DA**, Tarabykin VS, Ivanov AA, Fedotov AB, Belousov VV, Zheltikov AM. Cell-specific three-photon-fluorescence brain imaging: neurons, astrocytes, and gliovascular interfaces // Optics Letters. – 2020. – Т. 45. - №.4. – С.836-839.

5. Lanin AA, Chebotarev AS, Pochechuev MS, Kelmanson IV, **Kotova DA**, Bilan DS, Ermakova YG, Fedotov AB, Ivanov AA, Belousov VV, Zheltikov AM. Two- and three-photon absorption cross-section characterization for high-brightness, cell-specific multiphoton fluorescence brain imaging //Journal of Biophotonics. – 2020. – Т. 13. – №. 3. – С. e201900243.

6. Pochechuev MS, Lanin AA, Kelmanson IV, Bilan DS, **Kotova DA**, Chebotarev AS, Tarabykin V, Fedotov AB, Belousov VV, Zheltikov AM. Stain-free subcellular-resolution astrocyte imaging using third-harmonic generation // Optics Letters. – 2019. – Т. 44. – №. 12. – С. 3166-3169.

7. Kostyuk AI, Demidovich AD, **Kotova DA**, Belousov VV, Bilan DS. Circularly Permuted Fluorescent Protein-Based Indicators: History, Principles, and Classification // International journal of molecular sciences. – 2019. – Т. 20. – №. 17. – С. 4200.

8. Kostyuk AI, **Kotova DA**, Demidovich AD, Panova AS, Kelmanson IV, Belousov VV, et al. Lipid metabolic changes in rat brain during permanent cerebral ischemia //Bulletin of Russian State Medical University. – 2019. – №. 1. – С. 46-52.

Тезисы докладов на конференциях:

1. **Котова Д.А.**, Кельмансон И.В., Почечуев М.С., Иванова А.Д., Ланин А.А., Федотов А.Б., Федотов И.В., Желтиков А.М., Белоусов В.В., Билан Д.С. Регистрация внутриклеточных параметров в режиме реального времени в модели ишемии/реперфузии *in vitro* и *in vivo* ///Девятая конференция специалистов по лабораторным животным (Rus-LASA-9), 2-4 декабря 2021 г, Сколтех,

2. **Котова Д.А.**, Иванова А.Д., Кельмансон И.В., Белоусов В.В., Билан Д.С. Исследование динамики изменения внутриклеточных параметров нейронов в условиях гипоксии-реоксигенации. Научные труды. Том II. Под редакцией А.Г. Габибова и М.А. Островского. ///III Объединённый научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов. (VII Съезд биохимиков и X Российский симпозиум «Белки и пептиды»), 3-8 октября 2021, Сочи-Дагомыс.

3. Кельмансон И.В., Иванова А.Д., **Котова Д.А.**, Почечуев М.С., Ланин А.А., Федотов И.В., Федотов А.Б., Желтиков А.М., Белоусов В.В., Билан Д.С. Динамика изменений рН и внутриклеточной концентрации H₂O₂ в очаге ишемического инсульта. Научные труды. Том II. Под редакцией А.Г. Габибова и М.А. Островского. ///III Объединённый научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов. (VII Съезд биохимиков и X Российский симпозиум «Белки и пептиды»), 3-8 октября 2021, Сочи-Дагомыс.

4. Кельмансон И.В., Почечуев М.С., **Котова Д.А.**, Костюк А.И., Панова А.С., Бородинова А.А., Федотов И.В., Ланин А.А., Мартынов Г.Н., Балабан П.М., Федотов А.Б., Желтиков А.М., Белоусов В.В., Билан Д.С. *In vivo* регистрация динамики изменения рН в тканях головного мозга крыс при ишемическом инсульте /// БИОТЕХНОЛОГИЯ - МЕДИЦИНЕ БУДУЩЕГО. Материалы всероссийской мультikonференции с международным участием. Новосибирск, 2019

5. **Котова Д.А.**^{1,2}, Иванова А.Д.^{1,3}, Кельмансон И.В., Храмова Ю.В.^{1,3}, Почечуев М.С.³, Ланин А.А.^{3,4}, Федотов И.В.^{3,4,5}, Федотов А.Б.^{3,4}, Желтиков А.М.^{3,5}, Белоусов В.В.^{1,2,6}, Билан Д.С.^{1,2} *In vivo* регистрация внутриклеточных биохимических параметров в клетках головного мозга крыс при ишемическом инсульте //Нейрокампус 2022, «Нейротехнологии будущего», 4-7 сентября 2022 года, Иркутская область, поселок Большие Коты.

