

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки ИНСТИТУТ
БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ

им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

Российской академии наук

(ИБХ РАН)

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

1.5.3.- Молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

к.б.н., с.н.с. Билан Дмитрий Сергеевич

Москва, 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ:

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	7
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1. Молекулярные механизмы ишемического инсульта	10
1.1.1. Эксайтотоксичность	10
1.1.2. Окислительный стресс при развитии ишемии головного.....	11
1.1.3. Клеточная модуляция проницаемости ГЭБ при ишемическом инсульте	16
1.1.4. Нейровоспалительные реакции.....	18
1.1.5. Роль глиальных клеток в патогенезе ишемического инсульта	20
1.2. Методы исследования механизмов патогенеза ишемического инсульта	25
1.2.1. <i>In vitro</i> методы	25
1.2.2. <i>In vivo</i> методы	27
1.2.3. Методы визуализация молекулярно-биохимических процессов при ишемическом инсульте	31
1.3. Биосенсоры	35
1.3.1. Структура и свойства генетически кодируемых флуоресцентных биосенсоров	35
1.3.2. Типы биосенсоров.....	37
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	49
2.1. Молекулярно-генетические методы	49
2.1.1. Амплификация ДНК	49
2.1.2. Электрофорез в агарозном геле.....	49
2.1.3. Рестрикция	50
2.1.4. Лигирование	50
2.1.5. Очистка и выделение ДНК.....	50
2.1.6. Трансформация компетентных клеток	50
2.1.7. Выделение плазмидной ДНК.....	51
2.1.8. Определение нуклеотидной последовательности ДНК.....	51
2.1.9. Создание аденоассоциированных вирусных частиц	51
2.2. <i>In vitro</i> методы	52
2.2.1. Ведение культур эукариотических клеток.....	52
2.2.2. Трансфекция эукариотических клеток	52
2.2.3. Получение смешанной гиппокампальной культуры	52

2.2.4. Трансдукция смешанной гиппокампальной культуры с помощью аденоассоциированных вирусных частиц.....	53
2.2.5. Получение очищенного препарата белка.....	53
2.2.6. рН - калибровка флуоресцентного сигнала биосенсора <i>SypHer3S</i>	54
2.2.7. Проведение биохимических анализов тканей мозга после МСАО.....	54
2.3. Регистрация динамики биохимических параметров <i>in vitro</i>	55
2.3.1. Установка для создания условий гипоксии/реоксигенации	55
2.3.2. Исследование динамики концентрации H_2O_2 и рН в первичной гиппокампальной культуре клеток в условиях гипоксии/реоксигенации	56
2.4. Оптоволоконная регистрация динамики биохимических параметров <i>in vivo</i> и <i>ex vivo</i>	56
2.4.1. Микроинъекция вирусных частиц в область стриатума и коры головного мозга крысы.	56
2.4.2. Проведение хирургической операции по окклюзии средней мозговой артерии	57
2.4.3. Оптоволоконная регистрация динамики изменения рН и H_2O_2 с помощью биосенсоров <i>SypHer3s</i> и <i>HyPer7</i> в тканях головного мозга крыс при развитии ишемического инсульта.....	59
2.4.4. <i>Ex vivo</i> тест <i>HyPer7</i> в тканях головного мозга.....	60
2.5. Мультифотонная микроскопия с использованием рН-биосенсора <i>SypHer3s</i>	60
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	62
3.1. Получение и тестирование генетических конструкций биосенсоров для регистрации H_2O_2 , рН и соотношения НАД ⁺ /НАДН в тканях мозга крыс	64
3.2. Изучение спектральных характеристик рН-биосенсора <i>SypHer3s</i> в режиме мультифотонной микроскопии	68
3.3. Динамика внутриклеточной концентрации H_2O_2 , соотношения НАД ⁺ /НАДН и рН в первичных гиппокампальных нейронах мыши в условиях гипоксии/реоксигенации.....	73
3.4. Исследование <i>in vivo</i> динамики ацидоза и концентрации H_2O_2 в тканях мозга крыс при развитии ишемического инсульта.....	81
3.4.1. <i>In vivo</i> исследование динамики рН в тканях мозга крыс при развитии ишемического инсульта.....	85
3.4.2. <i>In vivo</i> исследование динамики H_2O_2 в тканях мозга крыс при развитии ишемического инсульта.....	87
4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	94
ВЫВОДЫ.....	97
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	98

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

4-CIN - α -cyano-4-hydroxycinnamate;

AAV- adeno-associated virus;

BMVEC - brain microvascular endothelial cells;

CAG - chicken β -actin;

CCA - common carotid artery;

CMV – cytomegalovirus;

cpYFP- circularly permuted yellow fluorescent protein;

EC - external carotid artery;

EF1a - elongation factor 1-alpha;

ESPT - excited-state proton transfer;

FBS – fetal bovine serum;

GDNF – glial cell line-derived neurotrophic factor;

GEFI – genetically encoded fluorescent indicators;

GSH-PX - glutathione peroxidase;

HBSS/HEPES - hanks' balanced salt solution;

ICA – internal carotid artery;

IFN- β - interferon- β ;

IL - interleukin;

iPSCs - induced pluripotent stem cells;

KRS –Krebs-Ringer Solution;

MCA – middle cerebral artery;

MCAO – middle cerebral artery occlusion;

MCP-1 – monocyte chemotactic protein 1;

MCT – monocarboxylate transporter;

MIP-1 α – macrophage inflammatory proteins-1 α ;

NAD – nicotinamide adenine dinucleotide: NADH (reduced) and NAD⁺(oxidized);

NADPH – nicotinamide adenine dinucleotide phosphate;

NMDAR – N-methyl-D-aspartat;

NOS – nitric oxide synthases;

NOX – NADPH-oxidase;

PPA – pterygopalatine artery;

Rho – Rho family of GTPases;

SDF-1 – stromal cell-derived factor-1;

SHR – spontaneously hypertensive rat;

SV40 – simian virus 40;

TGF- β – transforming growth factor beta;

TNF α – tumor necrosis factor alpha;

ZO – *zonulae occludens*;

АМФ – аденозинмонофосфат;

АТФ – аденозинтрифосфат;

АФК – активные формы кислорода;

И/Р – ишемия/реперфузия;

КГД – кислородно-глюкозной депривации;

КТ – компьютерная томография;

ММП – матриксная металлопероксидаза;

МРТ – магнитно-резонансная томография;

МСОТ – мультиспектральная оптоакустическая томография;

НАД⁺ – никотинамидадениндинуклеотид;

НАДФ⁺ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат;

НБГ – нормобарическая гипероксия;

ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография;

СОД-1 – супероксиддисмутаза-1;

ТТХ - 2,3,5-трифенилтетразолий хлорид;

УФ – ультрафиолет;

фМРТ – функциональная магнитно-резонансная томография;

ФЭУ – фотоэлектронный умножитель;

ЦНС – центральная нервная система;

ЭТЦ – электрон-транспортная цепь.

ВВЕДЕНИЕ

По данным Всемирной Организации Здравоохранения инсульт головного мозга находится на втором месте в числе болезней, приводящих к летальному исходу [1]. Из 15 миллионов людей, страдающими от данного заболевания, треть из них становится неработоспособной, а треть – погибает [1]. 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 [2]. Поскольку мозг является одним из самых энергозатратных органов, даже кратковременное прекращение кровотока (ишемия), приводит к необратимым повреждениям клеток головного мозга. Ишемия может быть либо перманентной, либо 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 (АФК), которые при неконтролируемой генерации приводят к окислительному стрессу. Окислительный стресс в тканях мозга при инсульте неоднократно подтверждали, но косвенными методами. Из-за отсутствия экспериментальных подходов ранее было невозможно исследовать напрямую динамику АФК в тканях мозга *in vivo* в режиме реального времени. 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, участвующие в окислительно-восстановительных реакциях, которые представляют большой фундаментальный и практический интерес, так как участвуют как в нормальной физиологии, так и в патогенезе различных заболеваний.

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.

В рамках настоящей работы мы исследовали, как развивается динамика pH и динамика концентрации пероксида водорода (H_2O_2), как одного из биологически значимых видов АФК, в различных типах клеток тканей мозга крыс при развитии ишемического инсульта в режиме реального времени с первых секунд патогенеза. Для этого гены биосенсоров *SypHer3s* (регистрация pH) и *HyPer7* (регистрация H_2O_2) были доставлены в ткани мозга животных с помощью вирусных частиц. Регистрацию сигнала осуществляли через имплантированные оптические волокна. Во время регистрации сигнала животным моделировали ишемический инсульт путем окклюзии средней мозговой артерии. В рамках данного исследования мы также создали установку для моделирования условий гипоксии/реоксигенации для первичной культуры нейронов. Используя аналогичные биосенсоры, мы показали, что биохимические процессы, происходящие в культивируемых клетках, значительно отличаются от событий, которые происходят при патогенезе *in vivo*. Однако исследования на клеточных культурах могут быть эффективно использованы для разработки систем скрининга и тестирования компонентов, влияющих на динамику биохимических процессов в условиях гипоксии.

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 компартаментах, обеспечивает высокую информативность данного экспериментального подхода и гибкость в постановке задач.

В связи с вышесказанным **цель** данной 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**:

- 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.
- 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).
- На примере рН-биосенсора SypHer3s отработать подход тестирования флуоресцентных генетически кодируемых биосенсоров в режиме двухфотонной микроскопии.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Молекулярные механизмы ишемического инсульта

1.1.1. Эксайтотоксичность

Сосудистая окклюзия, возникающая при ишемическом инсульте, ограничивает доставку кислорода и метаболитических субстратов к нейронам, что приводит к снижению концентрации АТФ и истощению запасов энергии. Возникающий при этом дефицит глюкозы и кислорода приводит к запуску механизмов, ведущих к гибели нейронов. При этом клетки головного мозга все же располагают небольшим запасом энергии: гликогеном, лактатом и жирными кислотами, которые служат источниками АТФ в процессах гликолиза и окислительного фосфорилирования. Однако при прекращении циркуляции кровотока и поступления кислорода останавливаются процессы окислительного фосфорилирования в митохондриях. Таким образом, из-за нехватки кислорода резко снижается концентрация молекул АТФ. Снижение концентрации АТФ стимулирует гликолитический метаболизм остаточной части глюкозы и гликогена, вызывая накопление протонов и лактата, что приводит к быстрому внутриклеточному подкислению и увеличению расхода АТФ [3]. Дефицит глюкозы и кислорода, в результате которого останавливаются процессы окислительного фосфорилирования, приводит к ускоренному расходу молекул АТФ за счет обратной работы АТФ-синтазы [3,4].

Все перечисленные выше события способствуют ингибированию плазматической Na^+/K^+ -АТФазы нейронов, что сопровождается сильным падением ионного градиента и последующей деполяризацией нейронов и астроцитов [5]. Изменение градиентов концентраций натрия и калия приводит к активации потенциал-зависимых кальциевых каналов. В результате происходит чрезмерное высвобождение возбуждающих нейромедиаторов во внеклеточное пространство, в частности, глутамата [6]. Одновременно с этим снижается поглощение нейромедиаторов из внеклеточного пространства [7,8]. Увеличение внеклеточной концентрации глутамата активирует петлю положительной обратной связи с дальнейшей активацией глутаматных ионотропных рецепторов нейронов. В результате всё больше ионов Na^+ проходит через каналы, которые уменьшают ионные градиенты и потребляют АТФ, что опять же способствует дальнейшему высвобождению глутамата [9]. Выраженное и длительное повышение концентрации глутамата приводит к гибели нейронов. Состояние, при котором излишний глутамат в синапсах активирует ионотропные глутаматные рецепторы, вызывая клеток в результате токсического действия возбуждающих аминокислот, называется эксайтотоксичностью [6,10].

Механизмы эксайтотоксичности, которые приводят к гибели клеток мозга, включают в себя генерацию АФК [11,12], дисфункцию митохондрий [13,14] и участие различных транскрипционных факторов в качестве активаторов экспрессии генов [15]. Все эти механизмы, действуя синергически, могут разрушать клеточные белки [16], липиды [17] и ДНК [18], что приводит к ухудшению состояния клетки и её сигналинга (рис.1).

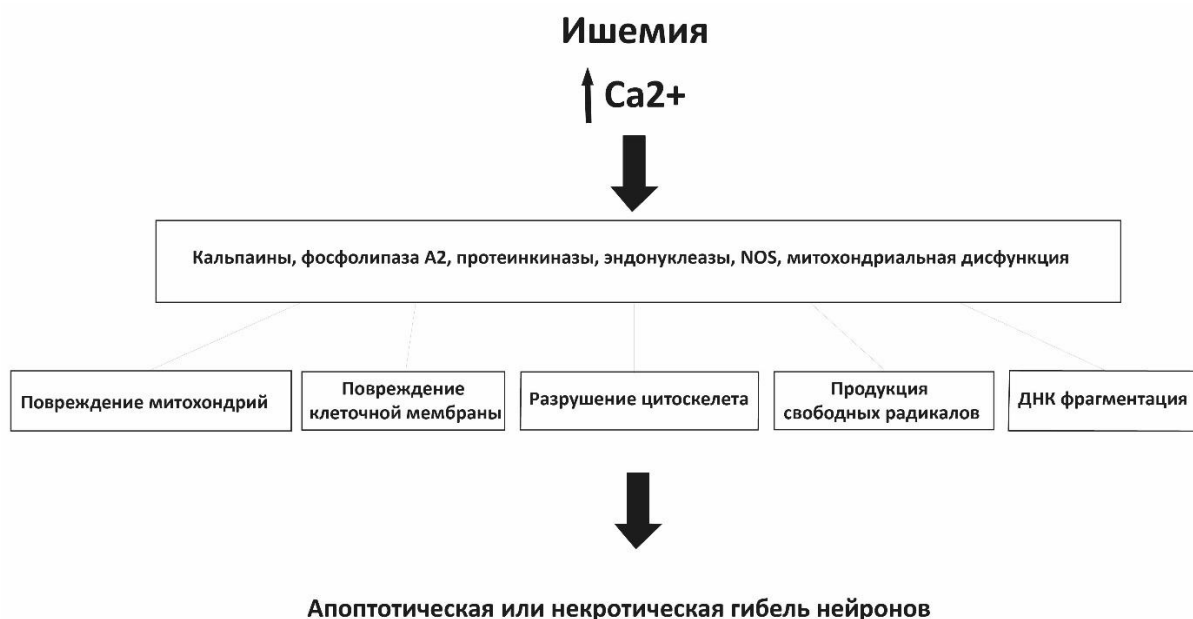


Рисунок 1. Эффекты, возникающие вследствие высокой концентрации внутриклеточного кальция. Эксцитотоксичность приводит к увеличению концентрации цитоплазматического кальция в нейронах после ишемии, что в дальнейшем активировать сигнальные пути, приводящие к апоптотической и некротической гибели клетки. Активация кальпаинов, каспаз, различных протеаз, киназ и эндонуклеаз приводит к сбою в работе митохондрий, гиперпродукции свободных радикалов и фрагментации ДНК. Адаптировано из [19].

1.1.2. Окислительный стресс при развитии ишемии головного

Важную роль в патогенезе ишемического инсульта играет окислительный стресс, который сопряжен с образованием АФК [11,20]. Митохондриальная дисфункция является одной из причин возникновения окислительного стресса [21]. Впервые о роли дыхательной цепи в процессах образования АФК стало известно в 1966 году [22]. В 1977 г. Chance и др. продемонстрировали образование пероксида водорода изолированными митохондриями [23,24]. А затем был показан и механизм образования H_2O_2 в митохондриях, в основе которого лежит процесс дисмутации супероксид анион радикала ($O_2^{\cdot-}$) [25]. Известно, что митохондрии содержат свою собственную супероксиддисмутазу (СОД) [26]. В норме поток электронов по дыхательной цепи митохондрий сопряжен с переносом протонов через мембрану и осуществляется благодаря

работе трансмембранных белковых комплексов, в результате чего происходит генерация протонного потенциала, который далее используется АТФ-синтазой для образования молекул АТФ [25]. Однако сбой в работе ЭТЦ приводит к нарушению потока электронов на уровне I и III трансмембранных комплексов и образованию $O_2^{\cdot-}$ [27].

Хотя сбой в работе электрон-транспортной цепи митохондрий считается одной из главных причин возникновения окислительного стресса, в клетке существуют и другие источники образования АФК и свободных радикалов. Так, например, еще одним источником $O_2^{\cdot-}$ являются трансмембранные НАДФН-оксидазы (NOX). Данные ферменты используют НАДФН в качестве донора электронов, а кислород - в качестве акцептора. Таким образом, НАДФН-оксидазы осуществляют перенос электронов через клеточную мембрану, в результате чего образуется супероксид анион радикал [28].

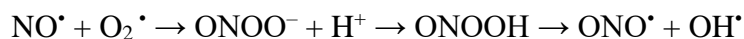
На сегодняшний день идентифицировано несколько типов семейств NOX: NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 и DUOX2. В лейкоцитах NOX2 (*gp91phox*-содержащий NOX) образует $O_2^{\cdot-}$, что играет важную роль в иммунных реакциях для борьбы с патогенами. Однако NOX2 характерен не только для иммунных клеток, но и для некоторых других, например, для глиальных и эндотелиальных клеток, в которых уровень экспрессии гена NOX2 ниже чем в лейкоцитах, но тем не менее этот белок также играет ключевую роль в образовании АФК [29]. Считается, что белки семейства NOX вовлечены в патогенез инсульта. Ранее Walder и др. показали, что генетическая делеция *gp91phox*, гена кодирующего каталитическую субъединицу NOX2, уменьшает последствия от ишемического инсульта у мышей [30]. В другом исследовании ученые показали, что нарушение гематоэнцефалического барьера, вызванного ишемическим инсультом, было в значительной степени меньше у *gp91phox*-дефицитных мышей по сравнению с мышами дикого типа [31]. Также было показано, что лечение нормобарической гипероксией (НБГ, 95% O_2) защищает от повреждений гемато-энцефалический барьер (ГЭБ) после инсульта [32]. С использованием мышиной модели окклюзии средней мозговой артерии (Middle Cerebral Artery Occlusion – МСАО) было выявлено, что НБГ защищает ГЭБ через ингибирование NOX2. Мыши C57/BL6 дикого типа и мыши, нокаутированные по гену *gp91phox*, подвергались НБГ (95% O_2) или нормоксии (21% O_2) в течение 90-минутной процедуры МСАО с последующей 22,5-часовой реперфузией. Повреждение ГЭБ оценивали количественно путем измерения объема окрашенной области с помощью специального красителя Эванса синего. Уровни белка матричной металлопротеиназы-9 (ММП-9), белка плотных контактов, окклюдина и NOX2 оценивали с помощью метода вестерн-блоттинга. У мышей дикого типа церебральная ишемия и реперфузия приводили к значительному повреждению ГЭБ, значительно повышались уровни NOX2 и ММП-9 при одновременном снижении уровня окклюдина в ишемизированной ткани

головного мозга. Мыши, нокаутированные по гену *gp91phox*, характеризовались гораздо меньшим повреждением ГЭБ, а изменения уровня ММП-9 и окклюдина были гораздо меньше по сравнению с диким типом. Таким образом, лечение с использованием НБГ значительно снижало изменения всех измеряемых параметров у мышей дикого типа, при этом не улучшало показатели у мышей, нокаутированных по гену *gp91phox* [32]. Данные результаты свидетельствуют о том, что после ишемического инсульта активация NOX2 приводит к индукции ММП-9, уменьшению уровня окклюдина с последующим нарушением ГЭБ, в то время как ингибирование NOX2 влияет на механизмы, лежащие в основе защиты ГЭБ, обеспечиваемой НБГ [32].

Помимо NOX2 другая изоформа NOX4 также вовлечена в патофизиологию церебральной ишемии [33,34]. NOX4 наиболее распространена в сосудах, причем её экспрессия выше в церебральных, чем в периферических сосудах [35]. Кроме того, было обнаружено, что при инсульте происходит индукция данной изоформы [36]. Kleinschnitz и др. показали, что через 24 часа после МСАО уровень мРНК и количество белка NOX4 в мозге мышей повышались. Кроме того, у мышей с дефицитом NOX4 наблюдается значительное снижение повреждения, вызванного окислительным стрессом, как после временной, так и перманентной МСАО по сравнению с мышами дикого типа [34].

Помимо АФК вклад в развитие окислительного стресса вносят активные формы азота. В частности, синтазы оксида азота занимают важное место в патогенезе ишемического инсульта. При ишемии продукция NO в головном мозге резко увеличивается за счет активации нейрональных и индуцибельных изоформ синтаз оксида азота [37]. На сегодняшний день известно о существовании трех типов синтаз оксида азота (NO): нейрональных (nNOS), эндотелиальных (eNOS) и индуцибельных (iNOS). Они ответственны за синтез NO, а также в качестве побочного продукта образуют $O_2^{\cdot-}$. Известно, что активность NOS повышается после церебральной ишемии. Так, было показано, что активность eNOS увеличивается в эндотелии головного мозга, а активность nNOS возрастает в нейронах через сутки после ишемии [38]. Большой приток Ca^{2+} через NMDA-рецепторы может привести к активации nNOS и увеличению продукции NO [39]. Кроме того, после временной ишемии головного мозга у крыс было зафиксировано повышение уровня мРНК iNOS, при этом концентрация фермента с повышенной активностью была обнаружена в нескольких типах клеток, включая микроглию и внесосудистые нейтрофилы [40,41]. Схема активации нитрозативного стресса представлена на рисунке 2. Известно, что ингибирование активности NOS предотвращает снижение внутриклеточного pH в модели очаговой ишемии головного мозга у кроликов [42], что позволяет предположить опосредованное участие NO в процессе ишемического ацидоза.

В отличие от eNOS и nNOS, которые образуют небольшое количество NO, iNOS способна продуцировать NO в высокой концентрации (диапазон мкМ–мМ) в ответ на такие стимулы, таких как повышение уровня липополисахаридов, цитокинов и при гипоксии/ишемии [43]. При повышенной активности iNOS, NO в высокой концентрации способен реагировать с различными субстратами в клетке, в том числе и с радикалом O_2^{\bullet} , в результате чего могут быть образованы, например, NO^{\bullet} и пероксинитрит [44]:



Пероксинитрит является еще одним высокореакционноспособным соединением, которое усиливает ишемическое повреждение мозга [45]. NO-индуцированный пероксинитрит является неспецифическим агрессивным агентом, поражающим различные органеллы в т. ч. митохондрии. Пероксинитрит приводит к дисфункции митохондрий и последующему увеличению свободных радикалов кислорода, в частности, гидроксильного радикала [16,45].

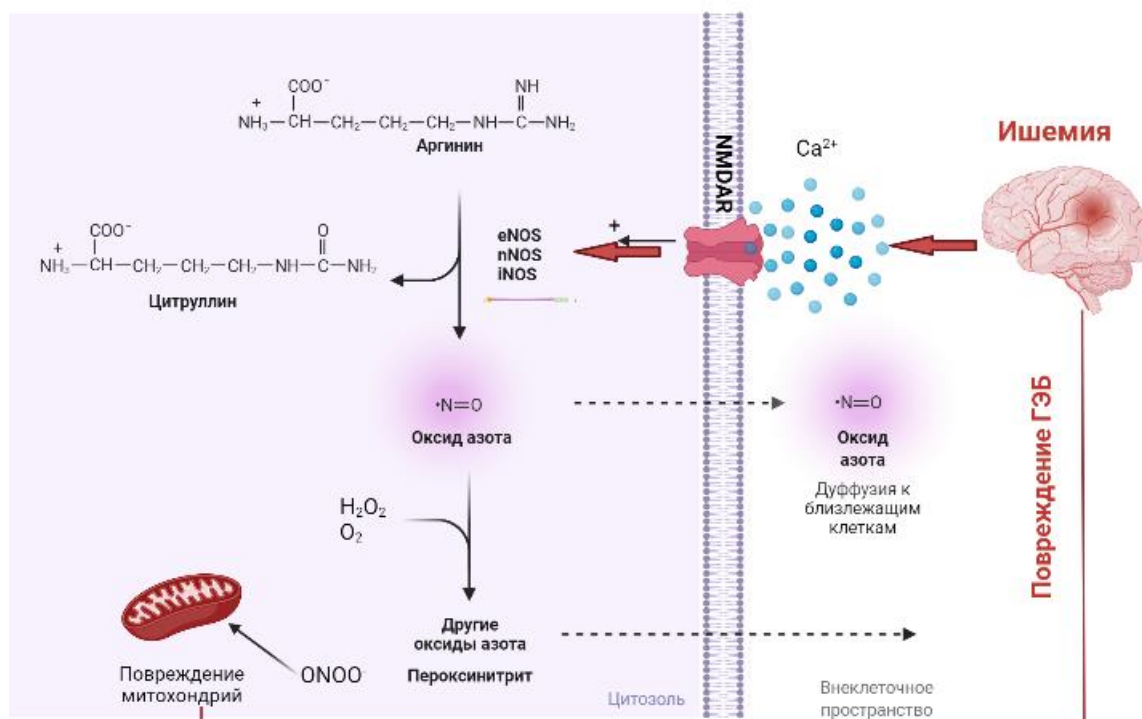


Рисунок 2. Активация нитрозативного стресса при ишемии головного мозга.
(Иллюстрация создана с помощью программы BioRender).

Окислительный/нитрозативный стресс может вызывать повреждение различных клеточных компонентов, включая окисление мембранных липидов [46], жизненно важных клеточных белков [47,48] и ДНК [49], а также инициировать каскадные реакции, приводящие к дисфункции митохондрий, активации каспаз [50] и активации сигнальных путей [51], что в конечном итоге приводит к гибели нейронов.

Помимо перечисленных источников в образовании АФК участвуют и другие белки: ксантиноксидаза, циклооксигеназы [52].

Существенный вклад в редокс-состояние клеток головного мозга при ишемии вносят важные антиоксидантные ферменты такие как медь/цинковая супероксиддисмутаза-1 (СОД-1), каталазы, пероксиредоксины, глутатионпероксидазы, а также тиоредоксиновая система. Так, например, было показано, что мыши, нокаутированные по гену, кодирующему СОД-1, были крайне уязвимы к ишемии головного мозга по сравнению с животными дикого типа. В тоже время сверхэкспрессия гена, кодирующего СОД-1, наоборот, препятствовала повреждению ГЭБ и повторной ишемической атаке [53].

Также к антиоксидантным системам относится семейство каталаз – ферменты, участвующие в разложении пероксида водорода. [54]. Каталаза повсеместно экспрессируется нейронами и глиями ЦНС [55]. Исследование активности антиоксидантных ферментов показало, что у пациентов, перенесших ишемический инсульт или страдающих болезнью Паркинсона, активность каталазы в головном мозге была снижена [56]. В результате повышение активности каталазы начали рассматривать в качестве потенциальной терапевтической стратегии при ишемическом инсульте. Так, например, было показано, что нейроны в стриатуме, которые сверхэкспрессируют каталазу, менее подвержены повреждению после временной МСАО [57]. Две независимые группы продемонстрировали, что введение каталазы, конъюгированной с полиэтиленгликолем, уменьшает общий размер повреждения головного мозга после временной МСАО [58].

В физиологических и патофизиологических условиях ряд ферментов отвечает за регуляцию окислительно-восстановительного баланса в нейронах. Некоторые из этих ферментов защищают нейроны от окислительного стресса путем поддержания нормальной концентрации антиоксиданта - глутатиона. Глутатион содержит остаток цистеина, который действует как нуклеофил, отдавая электроны для разрыва дисульфидных связей окисленных белков. После восстановления эти белки не могут реагировать с другими клеточными компонентами и вызывать дальнейшее повреждение. Окисленные молекулы глутатиона образуют дисульфидные связи между собой, пока не превратятся в восстановленный глутатион под действием глутатионредуктазы [59]. Несмотря на то, что в экспериментах *in vitro* было показано, что концентрация глутатиона в нейронах невысокая, астроциты все же могут защищать нейроны, синтезируя и секретирова высокие уровни глутатиона. Кроме того, нейрональный синтез глутатиона в значительной степени зависит от высвобождения цистеин-глицинового дипептида из астроцитов [60].

В дополнение к своим эндогенным антиоксидантным возможностям глутатион служит кофактором для семейства ферментов глутатионпероксидаз (glutathione peroxidase - GSH-PX). Ферменты GSH-PX содержат аминокислоту селеноцистеин. Исследования показывают, что более высокая реакционная способность селена позволяет селенопротеинам более эффективно удалять пероксиды [61]. На животных моделях нейродегенерации было показано, что активация GSH-PX может происходить в ответ на окислительное повреждение [62]. Повышение активности GSH-PX также демонстрирует нейропротекторное действие на животных моделях инсульта. В моделях временной МСАО на грызунах показано, что повышенная экспрессия ферментов GSH-PX, а также применение миметика GSH-PX – эбселена -способствовали защите от окислительного повреждения [63,64].

Таким образом, антиоксидантные системы регулируют концентрацию H₂O₂ в живых организмах. Работа данных антиоксидантных систем необходима для нормального протекания множества внутриклеточных процессов. При этом дисбаланс продукции и утилизации свободных радикалов и АФК приводит к тяжелым последствиям при разных нейропатологиях, в частности при ишемическом инсульте.

1.1.3. Клеточная модуляция проницаемости ГЭБ при ишемическом инсульте

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) представляет собой защитный мембранный барьер, ограничивающий проникновение молекул и лейкоцитов из системного кровотока в центральную нервную систему (ЦНС). Он функционирует для поддержания гомеостатического баланса внеклеточной жидкости головного мозга, тем самым обеспечивая его нормальное функционирование. ГЭБ состоит из базальных мембран капилляров, эндотелиальных клеток микрососудов головного мозга (Brain MicroVascular Endothelial Cells – BMVEC), астроцитарных концевых ножек и перицитов [65].

Эндотелий ГЭБ морфологически отличается от периферического эндотелия. В эндотелиальных клетках сосудов головного мозга отсутствуют фенестрации, они обладают минимальной пиноцитарной активностью [66], образуют плотные контакты, имеют большое количество митохондрий, обладающих высокой метаболической активностью [67,68]. Плотные контакты между соседними эндотелиальными клетками образованы трансмембранными белками: окклюдинами, клаудинами и соединительной молекулой адгезин-1, а также другими вспомогательными цитозольными белками, такими как ZO-1, цингулин и пр. (рис.3). Межэндотелиальная локализация этих белковых комплексов необходима для формирования барьера и низкой парацеллюлярной проницаемости ГЭБ. В эндотелиальных клетках головного мозга экспрессируется множество транспортеров, которые необходимы для поглощения

глюкозы, гормонов, незаменимых аминокислот и кофакторов. Кроме того, известно, что эндотелиальные клетки головного мозга имеют низкую экспрессию молекул адгезии, что объясняет неспособность периферических иммунных клеток проникать в здоровую ЦНС [69].

Плотные контакты и адгезионные контакты вносят дополнительный вклад в барьерные свойства ГЭБ, ограничивая парацеллюлярную диффузию. В то время как адгезионные контакты образованы за счет трансмембранных белков кадгерина и катенина, плотные контакты – за счет окклюдина и клаудинов. Известно, что экспрессия данных трансмембранных белков тесно связана с проницаемостью ГЭБ. Так, например, повышенная экспрессия окклюдина снижает парацеллюлярный транспорт и, таким образом, снижает проницаемость ГЭБ [70], в то время как экспрессия клаудина-5 препятствует прохождению больших молекул через барьер [71]. Окклюдина и клаудина связаны с актиновым цитоскелетом эндотелиальных клеток через цитоплазматические белки из семейства *zonulae occludens* (ZO). Вместе с сигнальными молекулами, такими как Rho, PI3K и ионами кальция (Ca^{2+}), все перечисленные выше компоненты регулируют целостность плотных контактов и проницаемость ГЭБ.

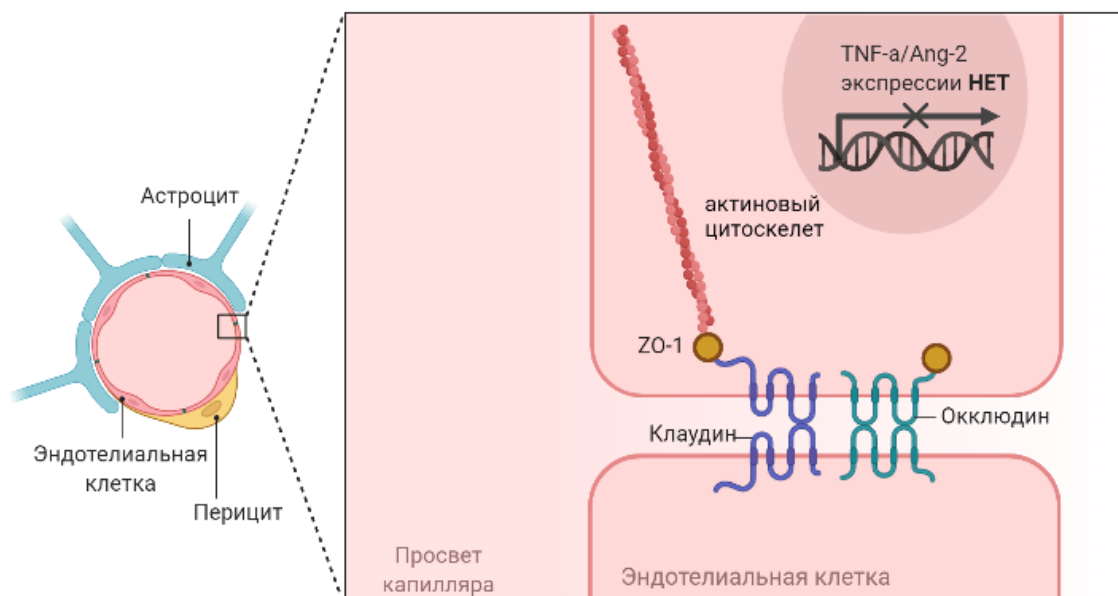


Рисунок 3. Клеточные контакты между эндотелиальными клетками в ГЭБ.
(Иллюстрация создана с помощью программы BioRender).

Целостность ГЭБ может быть нарушена при увеличении потока молекул через парацеллюлярный или трансцеллюлярный пути. Это происходит либо за счет увеличения пиноцитарной активности, либо за счет нарушения плотных контактов. Хорошо известно, что повреждение ГЭБ наблюдается при некоторых нейропатологиях, таких как черепно-мозговая травма, рассеянный склероз и инсульт [72–74]. Характерной особенностью всех перечисленных

патологий является возникновение окислительного стресса. Также существует предположение, что активные формы кислорода способствуют повышению проницаемости ГЭБ [75].

1.1.4 Нейровоспалительные реакции

При острых патологиях головного мозга, в том числе при ишемическом поражении, значительный вклад в патогенез вносят реакции нейровоспаления [76]. Ишемический инсульт приводит к сильной воспалительной реакции, которая начинается в микроциркуляторном русле и затрагивает несколько типов клеток. Иммунная система активно участвует в патогенезе ишемического инсульта через ряд событий, которые включают: инфильтрацию лейкоцитов и моноцитов в мозг, активацию резидентных клеток, включая микроглию, астроциты и эндотелиальные клетки, а также повышенную продукцию воспалительных молекул, таких как цитокины. Выброс цитокинов происходит как в поврежденную ткань, так и в кровь. Цитокины являются важными медиаторами иммуновоспалительных реакций, наблюдаемые при ишемическом повреждении мозга, и соответственно, влияют на тяжесть и исход заболевания. Таким образом, иммунитет и воспаление являются ключевыми элементами при патогенезе острой церебральной ишемии, и, следовательно, могут являться важными терапевтическими мишенями [77].

Основными участниками воспалительных каскадов считаются цитокины, главным образом, IL-1, IL-6, TNF- α , TGF- β , молекулы адгезии (селектины, интегрины и иммуноглобулины), эйкозаноиды, а также индуцибельная и нейрональная синтазы оксида азота. Синтез перечисленных молекул начинается через несколько часов после начала ишемии и продолжается в течение нескольких дней [78]. Активация воспалительных реакций способствует необратимому повреждению клеток головного мозга и включает взаимодействие между эндотелиальными клетками, астроцитами, клетками микроглии и лейкоцитами (гранулоцитами, моноцитами/макрофагами и лимфоцитами) (рис.4). Митоген-активируемые киназы p38, ERK 1/2 и SAPK/JNK также участвуют в регуляции экспрессии воспалительных генов, включая IL-6, iNOS, TNF- α и IL-1 β , а также генов, связанных с внеклеточным матриксом. Кроме того, окислительный стресс запускает экспрессию ряда провоспалительных генов через факторы транскрипции, такие как NF- κ B [79].

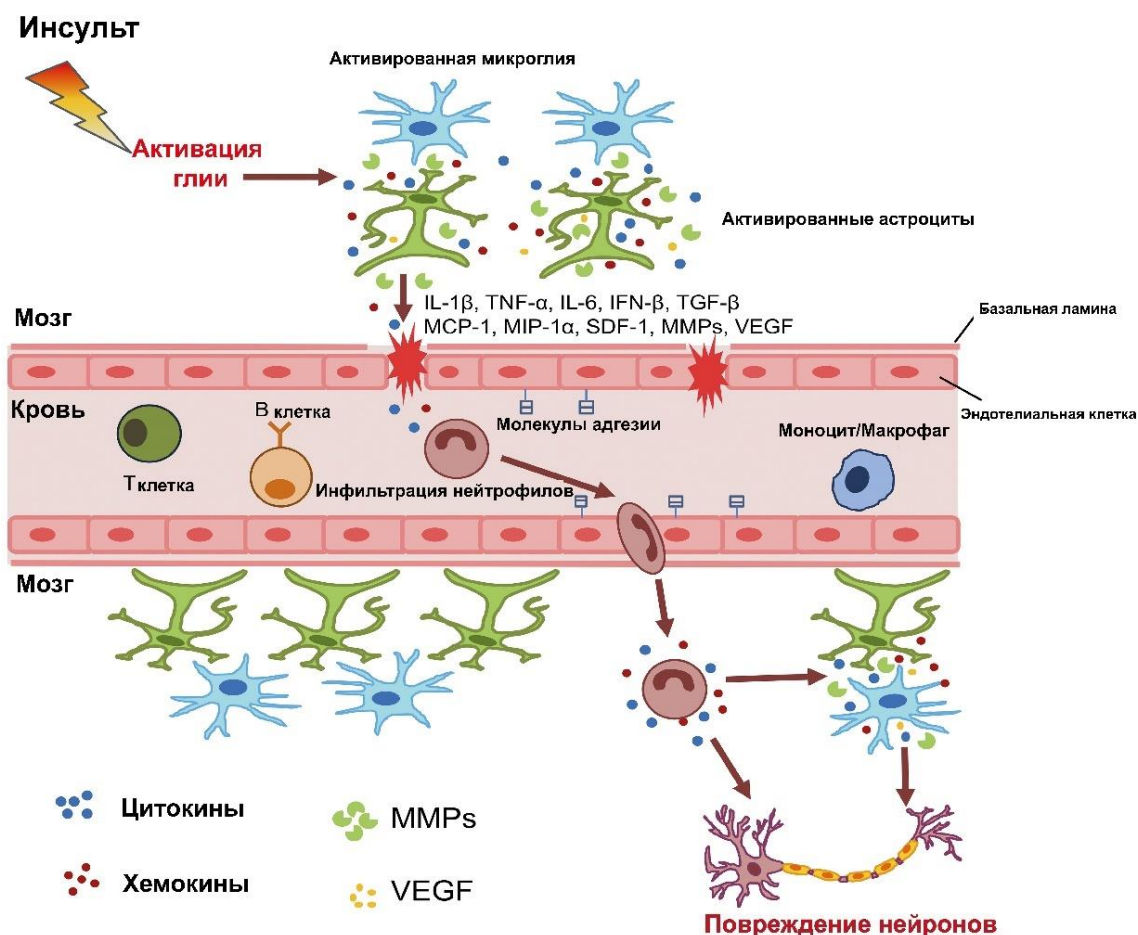


Рисунок 4. Постишемическое воспаление, нарушение ГЭБ и повреждение нейронов при инсульте. Активация микроглии и астроцитов после ишемии приводит к увеличению продукции цитокинов, фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), хемокинов, матриксных металлопротеиназ (ММП) в ишемизированной ткани головного мозга. Эти медиаторы воспаления и протеазы разрушают ГЭБ и приводят к усилению эндотелиальной регуляции молекул адгезии и инфильтрации из крови воспалительных клеток, в основном нейтрофилов. Активированные нейтрофилы способны высвобождать цитокины/хемокины, которые вызывают дальнейшую активацию глиальных клеток. Данные каскады реакций приводят к гибели нейронов после инсульта. IL - интерлейкин; TNF α - фактор некроза опухоли- α ; TGF- β - трансформирующий фактор роста- β ; IFN- β , интерферон- β ; MCP-1 - хемоаттрактантный белок-1 моноцитов; SDF-1 - фактор 1, полученный из стромальных клеток; MIP-1 α - макрофагальный воспалительный белок-1 α . Адаптировано из [80].

В процессах нейровоспаления также участвует миелопероксидаза (МПО), которая представляет собой провоспалительный фермент, интенсивно секретируемый активированными миелоидными клетками, полиморфноядерными нейтрофилами, моноцитами, микроглией и макрофагами. МПО способна образовывать высокорекреационноспособные соединения, включая хлорноватистую кислоту (НОСl) и другие гипогалогеновые кислоты, которые могут повреждать ткани и усиливать образование провоспалительных цитокинов [81]. Известно, что МПО в сочетании с повышенной концентрацией пероксида водорода способствует дисфункции

эндотелиальных клеток, активации iNOS и перекисному окислению липидов, которые усиливают воспаление [82–84].

Ранее было показано, что при инсульте у человека высокие уровни МПО коррелировали с большим объемом пораженной ткани [85]. Kim с соавторами в своем исследовании показали, что уменьшение активности МПО с помощью специфического ингибитора гидразида 4-аминобензойной кислоты (АВАН) у мышей дикого типа (WT), либо у мутантных мышей МПО^{-/-}, дефицитных по гену МПО, приводит к снижению гибели клеток при ишемии головного мозга [86]. Более того, исследователи показали, что ингибирование МПО снижало количество активированных миелоидных клеток после ишемии, а также увеличивало уровень продукции цитопротекторного белка теплового шока 70 (Hsp70) на 70% и p-Akt на 60%, в то же время наблюдали снижение уровня апоптотического маркера p53 на 62% [86]. Примечательно, что ингибирование МПО значительно улучшило неврологический исход после инсульта, по всей видимости, за счет снижения рекрутирования воспалительных клеток и увеличения экспрессии факторов выживания. Таким образом, ингибирование МПО может представлять собой многообещающую терапевтическую стратегию для лечения инсульта [86].

Воздействие на воспалительный процесс с помощью различных подходов, включая ингибирование МПО и лейкоцитарной инфильтрации, использование селективных антагонистов воспалительных молекул, антител, ингибирование MAPK-зависимой передачи сигналов, рассматривают в настоящий момент в качестве терапии постинсультных состояний пациентов.

1.1.5. Роль глиальных клеток в патогенезе ишемического инсульта

Метаболические изменения при ишемии мозга происходят как в нейронах, так и в клетках глии. Среди глиальных клеток различают микроглию и макроглию, к которой относятся эпендимальные клетки, олигодендроциты и астроциты. Олигодендроциты и их предшественники составляют основной процент глиальных клеток, ответственных за миелинизацию аксонов [87]. Миелинизация необходима для правильной передачи нервных импульсов, распространения аксональных электрических сигналов, поддержания диаметра аксона и выживания нейронов [88,89]. При ишемии головного мозга олигодендроциты мигрируют к поврежденным нейронам и способствуют ремиелинизации их аксонов.

Микроглия представляет собой первичные иммунные клетки ЦНС, которые в норме имеют разветвленную форму, но переходят в активированную амебоидную форму при нарушении клеточного гомеостаза головного мозга [90]. Активированная микроглия высвобождает различные клеточные продукты, такие как хемокины, протеолитические ферменты, активные формы кислорода/азота, провоспалительные цитокины, глутамат и АТФ.

Микроглия в активированном состоянии осуществляет фагоцитоз как различных патогенов, так и поврежденных клеток головного мозга [91].

Астроциты занимают главенствующую роль в процессах поддержания жизнеспособности нейронов [92], обеспечивая нейроны питанием, а также выделяя различные нейромедиаторы [93]. Таким образом, астроциты участвуют в поддержании нормальной функции мозга, поскольку являются важнейшей структурной и функциональной частью трёхсторонних синапсов и сосудисто-нервного блока, а также взаимодействуют со многими типами клеток: нейронами, олигодендроцитами и эндотелиальными клетками [94,95].

При патогенезах различной природы астроциты выполняют множество функций. Так, например, эксайтотоксичность и механическое повреждение приводят к активации астроцитов, что в свою очередь, способствует образованию глиальных рубцов. При патогенезе инсульта происходит развитие т.н. реактивного астроглиоза [96]. Данный процесс включает в себя: пролиферацию астроцитов, экспрессию белков промежуточных филаментов и активацию иммунных ответов наряду с высвобождением цитокинов и хемокинов [97]. Реактивный астроглиоз приводит к образованию глиального рубца в области пенумбры – преинфарктной области [98]. Кроме того, показано, что в реактивных астроцитах снижается продукция глиального нейротрофического фактора (Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor GDNF), который относится к классу трансформирующего фактора роста β (TGF- β) и является ключевым нейротрофическим фактором, способствующим образованию синапсов, дифференцировке нейропредшественников и выживанию нейронов [99]. Ингибирование глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в реактивных астроцитах, вызванное дефицитом GDNF, усиливало окислительный стресс и степень повреждения нейронов [99].

Кроме того, известно, что астроциты являются более устойчивыми к кислородно-глюкозной депривации (КГД) по сравнению с нейронами. В *in vitro* модели ишемии было показано, что большинство нейронов в смешанных культурах головного мозга погибает уже после 60-90 мин голодания, в то время как необратимое повреждение астроцитов происходит только через 4-6 часов [100]. На животных моделях инсульта было показано, что бóльшая доля астроцитов остается жизнеспособной и метаболически активной на ранних этапах после реперфузии [101]. Таким образом, астроциты обеспечивают увеличение жизнеспособности нейронов, сохраняя их функции [102].

Роль лактата при ишемическом поражении клеток мозга

Глюкоза является основным энергетическим субстратом мозга, однако иные промежуточные метаболиты, такие как лактат, также могут быть использованы в качестве

альтернативного источника энергии [103–105]. Во время ишемического инсульта лактат накапливается во внеклеточном пространстве за счет анаэробного метаболизма глюкозы. Концентрация лактата может увеличиваться от 1,5 - 3,5 мМ в здоровом мозге и до 15-25 мМ в ишемизированном [94,106]. На протяжении длительного времени было принято считать, что накопление лактата при ишемии является негативным признаком. Однако в ряде экспериментов было показано, что лактат может оказывать нейропротекторное действие, например, при эксайтотоксичности, вызванной воздействием высоких концентраций глутамата на кору головного мозга крыс [107]. В более поздних исследованиях был показан нейропротекторный эффект лактата на модели временной МСАО при ишемическом инсульте [108,109]. Было установлено, что размер поврежденной области мозга меньше, а неврологические показатели лучше у животных, получавших внутривенные инъекции лактата в течение 1 часа после реперфузии. Кроме того, на срезах гиппокампа было продемонстрировано, что лактат и пируват поддерживают синаптическую функцию мозга и его морфологическую целостность во время глюкозной депривации [110]. Исследования на культуре кортикальных нейронов показали, что лактат и пируват проявляют свои нейропротекторные эффекты за счет увеличения выработки АТФ [105].

К настоящему моменту известно, что после ишемии в мозге увеличивается концентрация лактата и нейротрофических факторов, которые способствуют выживанию нейронов [112]. В частности, при развитии инсульта, лактат, продуцируемый астроцитами, снабжает нейроны энергией посредством гликолиза и глюкотолиза, что предотвращает их гибель [113]. Таким образом, протекция нейронов во время ишемии, возникающей вследствие инсульта, осуществляется посредством увеличения концентрации лактата и увеличения экспрессии переносчиков монокарбоновых кислот (monocarboxylate transporter - МСТ), которые участвуют в транспорте лактата.

Глюкоза является основным источником энергии в ЦНС и обеспечивает нервные клетки большим количеством АТФ [114]. В частности, глюкоза, поступающая в астроциты, метаболизируется до лактата, транспортируется между клетками и снабжает энергией такие клетки как микроглия [115]. Глутамат, нейроактивные пептиды и АТФ действуют на астроциты, индуцируя и регулируя выработку лактата, который затем поступает в нейроны [116]. Данная транспортная модель, в которой глюкоза в астроцитах метаболизируется до лактата, откуда затем поступает в нейроны для использования в качестве источника энергии, называется гипотезой лактатного челнока между астроцитами и нейронами [117]. Суть гипотезы заключается в том, что в условиях ишемии лактат является более предпочтительным источником

получения энергии, чем глюкоза [118]. Схематическое представление данной гипотезы отображено на рисунке 5.

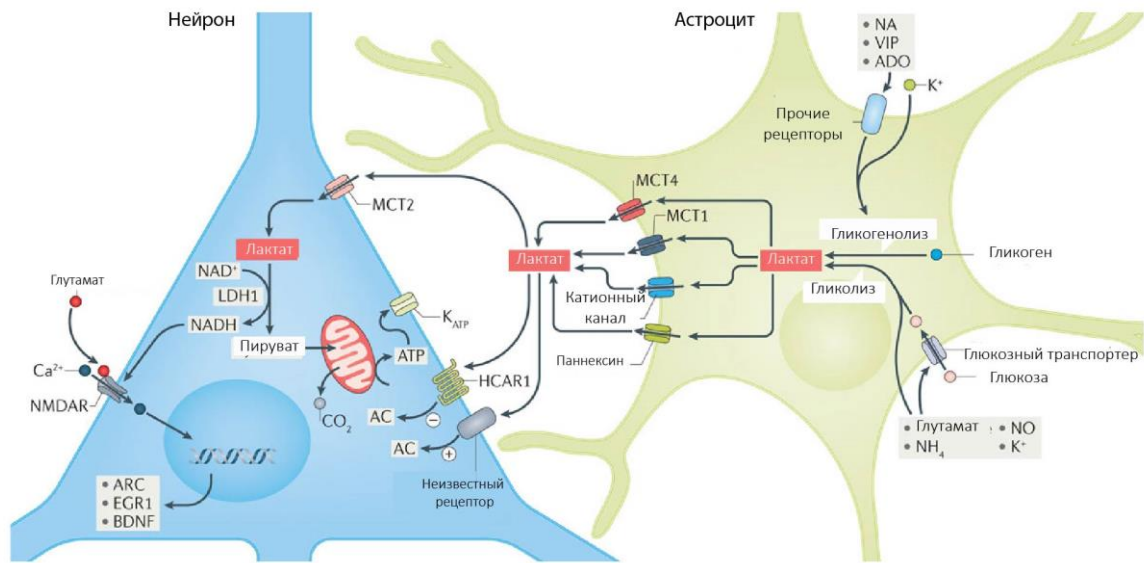


Рисунок 5. Схема, иллюстрирующая гипотезу лактатного челнока в нейронах и астроцитах. Лактат синтезируется астроцитами в процессе гликогенолиза и гликолиза. Норадреналин (NA), вазоактивный интестинальный пептид (VIP), аденозин (ADO) и K^+ способствуют гликогенолизу, тогда как поглощение глюкозы и образование лактата запускаются глутаматом, аммонием (NH_4), оксидом азота (NO) и K^+ . Лактат высвобождается астроцитами тремя способами: через трансмембранные монокарбоксилатные транспортеры (MCT1 и MCT4), через катионные каналы и паннексины. Лактат активирует сигнальные каскады в нейронах посредством двух основных механизмов: посредством трансмембранного транспорта через MCT2 и путем воздействия на специфические рецепторы. Был идентифицирован рецептор, связанный с G-белком, называемый рецептором гидрокарбоновой кислоты 1 (hydrocarboxylic acid receptor 1 (HCAR1), который связывает лактат и отрицательно связан с аденилатциклазой (AC). Второй, неидентифицированный тип рецепторов, положительно связанный с AC, присутствует на норадренергических нейронах. Поступление лактата в цитоплазму нейронов через переносчиков MCT2 приводит к продукции НАДН и АТФ. Превращение лактата в пируват под действием лактатдегидрогеназы 1 (ЛДГ1) приводит к образованию НАДН, который влияет на окислительно-восстановительное состояние нейрона. Увеличение НАДН положительно модулирует активность рецепторов NMDA (NMDAR), что приводит к усилению Ca^{2+} -токов, активации внутриклеточных сигнальных каскадов и индукции экспрессии генов, связанных с пластичностью — например тех, которые кодируют регулирующий активность белок, ассоциированный с цитоскелетом, - ARC (activity-regulated cytoskeleton-associated protein), белок раннего ответа EGR1 (early growth response protein 1) и нейротрофический фактор мозга - BDNF (brain-derived neurotrophic factor). Пируват, образующийся из лактата, проникает в митохондрии и способствует образованию АТФ. АТФ поддерживает энергетические потребности активных нейронов и обеспечивает сигнал, который модулирует активность АТФ-зависимых калиевых (K_{ATP}) каналов, что приводит к деполаризации. Предполагается, что пируват может непосредственно активировать K_{ATP} каналы [118].

Глутамат, высвобождаемый из возбуждающих синапсов нейронов, проникает в астроциты через переносчики глутамата (GLT/GLAST1) [119], где он индуцирует образование лактата из

глюкозы и способствует его внеклеточному высвобождению через транспортеры монокарбоновых кислот (МСТ) [120]. Впоследствии внеклеточно высвобождаемый лактат поглощается нервными клетками через МСТ [120]. Известные к настоящему моменту четырнадцать семейств МСТ опосредуют транспорт монокарбоновых кислот с короткой цепью, включая пируват, масляную и молочную кислоты [121,122]. Быстрый транспорт лактата между клетками мозга через МСТ необходим для метаболизма углеводов, липидов и аминокислот. Кроме того, данное семейство переносчиков играет важную роль в выживаемости клеток [121]. Известно, что гены МСТ1 и МСТ2 экспрессируются в эндотелиальных клетках сосудов и нейронах соответственно, тогда как МСТ1 и МСТ4 экспрессируются в астроцитах. Данные МСТ присутствуют в клеточной мембране и участвуют в транспорте лактата в головном мозге [122]. Экспрессия генов МСТ тонко регулируется различными факторами, что позволяет нервным клеткам оперативно реагировать на изменения внешних условий при различных патологиях. Так, например, известно, что дефицит глюкозы увеличивает экспрессию генов МСТ4 в астроцитах [123].

Известно, что снижение уровня глюкозы в мозге и повышенная активность нейронов приводят к распаду гликогена, хранящегося в астроцитах [124]. Благодаря этому лактат, продуцируемый астроцитами, поступает в нейроны в соответствии с их энергетическими потребностями и является источником энергии для поддержания основных функций, включая возбудимость нейронов, пластичность, интеграцию памяти и регуляцию нейронального гомеостаза [125]. В модели церебральной ишемии крыс ограничение транспорта лактата способствовало повреждению и дисфункции нейронов [126], что является дополнительным доказательством того, что лактат может предотвращать повреждение нейронов, вызванное церебральной ишемией [127].

Таким образом, увеличение продукции лактата астроцитами и повышенная экспрессия МСТ могут уменьшить степень повреждения нейронов во время ишемического инсульта. В настоящее время большой интерес представляют исследования, направленные на выяснение взаимосвязи между экспрессией ряда нейротрофических факторов, которые увеличивают выживаемость нейронов во время ишемического инсульта, и транспортом лактата в нейроны. Исследование взаимосвязи между уровнями лактата при инсульте и повреждением нейронов необходимо для лучшего понимания роли лактата при ишемии [128].

1.2. Методы исследования механизмов патогенеза ишемического инсульта

Для исследования патогенеза церебральной ишемии в настоящее время доступен широкий выбор моделей. Например, модели эмболического инсульта применяют для тестирования новых тромболитических препаратов, модели фокальной ишемии используются для исследования роли антиоксидантов и противовоспалительных веществ в патогенезе заболевания. Однако, учитывая сложный патогенез инсульта, разрабатываемые терапевтические методы лечения должны демонстрировать доклиническую эффективность в ряде различных моделей, в т. ч. и на разных видах животных.

1.2.1. *In vitro* методы

Для исследования механизмов патогенеза ишемического инсульта были разработаны различные экспериментальные *in vitro* и *in vivo* модели. Несмотря на то, что *in vivo* исследования являются более приоритетными, *in vitro* модели могут предоставить ценную информацию о безопасности лекарств, а также позволяют проводить экономически эффективные скрининговые анализы [129]. Кроме того, с появлением новых клеточных технологий и молекулярно-генетических методов появилась возможность разработки *in vitro* систем для моделирования инсульта и улучшения процесса разработки лекарств [130].

Модель ишемии в клеточной культуре можно воссоздать как путем кислородно-глюкозной депривации, так и путем химического или ферментативного ингибирования метаболизма клеток. Ранее исследователи провели сравнительный анализ этих двух подходов в модели клеток почечного эпителия, в ходе которого выяснили, что повреждение клеток химическими ингибиторами является более воспроизводимым, имеет более быстрый ответ, но менее физиологичен [131]. Для создания кислородно-глюкозной депривации клеткам заменяют среду, снижая глюкозу и замещая O_2 на N_2 с помощью гипоксической камеры. Несмотря на то, что зачастую для моделирования инсульта *in vitro*, проводят именно кислородно-глюкозную депривацию, в ряде исследований было показано, что одно только отсутствие кислорода в атмосфере вызывает серьезные изменения в актиновом цитоскелете эндотелиальных клеток и локализации белков плотных контактов в моделях ГЭБ [132]. При этом, на первичной культуре коры, выделенной из мыши, было показано, что скорость гибели нейронов при гипоксии зависит от концентрации глюкозы в среде [133].

Модели *in vitro* также позволяют изучать эксайтотоксичность изолированно от ишемического повреждения путем применения агонистов рецепторов глутамата, таких как N-метил-D-аспартат или глутамат [134]. Использование специфических агонистов позволяет

исследовать участие различных подтипов рецепторов глутамата в процессах эксайтотоксичности.

Культуры клеток

В качестве основных объектов для проведения *in vitro* исследований используют различные культуры клеток. Хотя культуры клеток лишены физиологической архитектуры, они позволяют проводить высокопроизводительный клеточный скрининг терапевтических агентов, а также позволяют оценить вклад отдельных типов клеток в патологические процессы [135].

Первичные культуры

В нейробиологических исследованиях во многих *in vitro* моделях чаще всего используются культуры первичных нейрональных и глиальных клеток. Молекулярные свойства и дифференцировка этих клеток в культуре хорошо отражают их фенотип *in vivo* [136,137]. Тем не менее выделение и очистка первичных культур клеток требуют большой затраты ресурсов при ограниченном выходе клеточной массы. Кроме того, неоднородность клеточного состава культуры ухудшает воспроизводимость результатов.

Клеточные линии

Основным преимуществом immortalized клеточных линий является их доступность и возможность использовать человеческие клетки при проведении скрининговых тестов. Так, например, из клеточной линии NT2, полученной из тератомы человека могут быть получены нейроны, астроциты и олигодендроциты [138]. Однако следует отметить, что подобные клетки содержат онкогены, отличающие их от физиологических клеток. Они также отличаются повышенной пролиферацией, адгезивными способностями и разнообразием морфологии.

Стволовые клетки

Благодаря эмбриональным стволовым клеткам можно получить нейронные клетки-предшественники с их последующей специфической дифференцировкой в нейроны, астроциты или олигодендроциты [139]. Однако широкое распространение данного типа клеток для применения в *in vitro* моделях ишемического инсульта ограничено различными этическими проблемами. Решить данную задачу помогает перепрограммирование соматических клеток в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (Induced pluripotent stem cells - iPSCs) [140].

Срезы мозга

Исследования патологий различных заболеваний на срезах мозга является хорошей экспериментальной моделью для изучения сигнальных путей и молекулярных механизмов, лежащих в основе дисфункции нервных клеток. Кроме того, *ex vivo* подход позволяет исследовать ответы клеток при воздействии различными фармакологическими агентами, таким образом, может представлять собой систему высокопроизводительного скрининга для поиска терапевтических средств и мишеней при меньшей затрате животных [141].

Срезы мозга могут быть получены из спинного мозга и различных областей головного мозга, включая гиппокамп, стриатум, кору, таламус и мозжечок [142–144]. Гиппокампальные культуры срезов мозга чаще всего используют для изучения действия терапевтических агентов на нейроны, микроглию, астроциты, а также для оценки нейрогенеза.

Преимущество сохранения клеточной архитектуры головного мозга заключается в том, что можно изучать механизмы, которые приводят непосредственно к гибели нейронов, а также оценить эффекты ишемии независимо от цереброваскулярных осложнений [145].

Органотипическая клеточная культура

Органотипическая клеточная культура является промежуточным звеном между срезом мозга и первичной клеточной культурой. Эти культуры получают из различных анатомических областей мозга, извлекаемых у новорожденных животных, и их последующим созреванием *in vitro*. Хотя данный подход позволяет поддерживать структурную организацию головного мозга, тем не менее, многие культуры испытывают синаптическую перестройку из-за отсутствия внешних афферентных и эфферентных сигналов *in vitro* [146].

Органотипические культуры срезов гиппокампа можно выращивать в течение длительного времени, тем самым создавая культуру срезов, которая может использоваться для изучения процессов развития мозга, включая регуляцию генов, экспрессию белков и синаптическую активность [147].

1.2.2. In vivo методы

Исследования процессов *in vitro* не отражают полной картины патогенеза ишемического инсульта в живых системах. Многие вопросы, касающиеся взаимосвязи метаболических путей, остаются малоизученными. Таким образом, *in vivo* модели инсульта являются незаменимым инструментом исследования патогенеза заболевания. Несмотря на то, что ишемический инсульт у человека имеет чрезвычайно разнообразные проявления, причины и анатомическую локализацию, в экспериментальных животных моделях возможно добиться хорошей

воспроизводимости результатов за счет стандартизации и контроля данных моделей. Кроме того, зачастую молекулярные, генетические, биохимические и физиологические исследования патогенеза требуют прямого и инвазивного доступа к ткани головного мозга, что можно осуществить только на лабораторных животных.

Крысы являются наиболее подходящим видом животных для изучения инсульта из-за сходства патогенеза инсульта у крыс и человека [148]. В последние годы также возросла важность применения мышиных за счет развития технологий с использованием трансгенных или нокаутированных животных [149].

Исследования патогенеза ишемического инсульта на животных моделях внесли неоценимый вклад в наше понимание механизмов данной патологии [149]. Одной из наиболее популярных моделей ишемического инсульта является временная или постоянная окклюзия средней мозговой артерии (МСаО) у крыс и мышей [149]. Это связано с тем, что у человека ишемический инсульт чаще всего возникает именно в бассейне средней мозговой артерии (МСа) [150–152]. Доступ к средней мозговой артерии может быть получен напрямую через краниальное окно в черепе, в результате сосуд может быть перекрыт электрокоагуляцией [153] или с помощью зажима [154]. Также, ишемия может быть вызвана фармакологически, например, инъекцией эндотелина-1 [155]. Сравнение наиболее часто используемых моделей ишемического инсульта представлено в таблице 1.

Нарушение целостности черепа, приводящая к повреждению оболочек мозга, повышенный вазогенный отек, наблюдаемый в модели фототромбоза, а также неконтролируемая длительность ишемии в модели с применением инъекции эндотелина-1, являются ограничениями для исследования молекулярных механизмов патогенеза ишемического инсульта. Менее травматичная и наиболее часто используемая модель основана на окклюзии средней мозговой артерии с помощью специального филамента, который вводится через внутреннюю сонную артерию [156] (схема этой хирургической процедуры приведена на рисунке 6.)

Таблица 1. Преимущества и недостатки наиболее используемых моделей инсульта грызунов. Адаптировано из [135].

	Достоинства	Недостатки
Модель МСАО	Затрагивает область пенумбры	Не подходит для исследования тромболизиса
	Высокая воспроизводимость	
	Отсутствует краниотомия	
Модель краниотомии	Высокая выживаемость в течение длительного времени	Инвазивность и риск осложнений после операции
	Визуальное подтверждение успешной МСАО	
Модель фототромбоза	Позволяет точно определить локализацию ишемического поражения	Вызывает ранний вазогенный отек, нехарактерный для инсульта человека
	Высокая воспроизводимость	Не подходит для исследования нейропротекторных средств
	Мало инвазивная	
Модель эндотелин-1	Мало инвазивная	Неконтролируемая длительность ишемии
	Низкая смертность	Низкая воспроизводимость
	Ишемическое поражение в корковых или подкорковых областях	

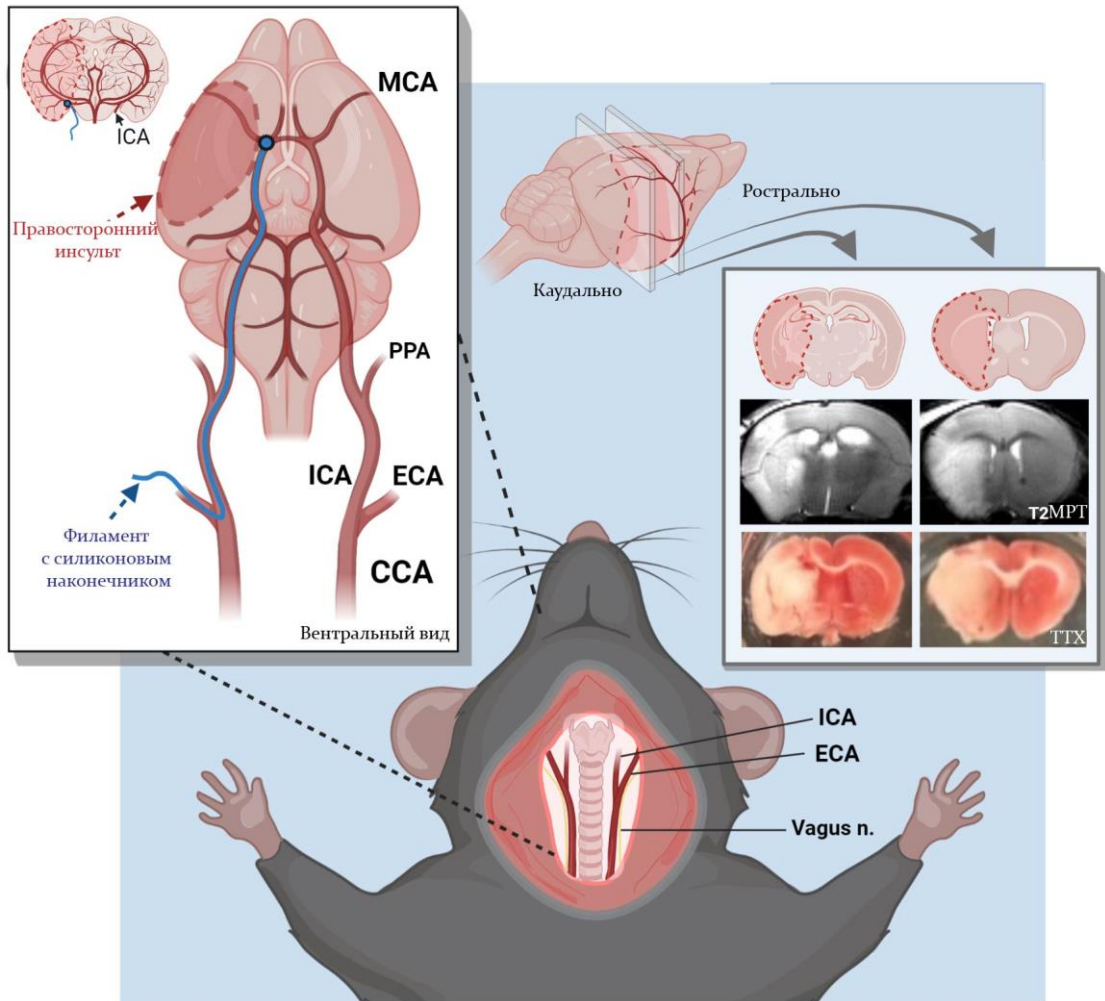


Рисунок 6. Окклюзия средней мозговой артерии и оценка объема поврежденной ткани при помощи магнитно-резонансной томографии (МРТ) и окрашивания 2,3,5-трифенилтетразолий хлоридом (ТТХ) [157]. На рисунке ССА - общая сонная артерия; МСА – средняя мозговая артерия; ICA – внутренняя сонная артерия; PPA - крылонебная артерия; ECA - наружная сонная артерия [158].

Для оценки объема повреждения ткани мозг извлекают и получают срезы, которые затем окрашивают красителями, например 2,3,5-трифенилтетразолий хлоридом (ТТХ), кризоловым фиолетовым, гематоксилином или эозином. Метод магнитно-резонансной томографии (МРТ) позволяет визуализировать объем инсульта прижизненно, таким образом, с помощью данного подхода можно регистрировать динамику размера поврежденной области. Однако данные, полученные методом МРТ, не дают полной картины возникшей патологии на молекулярном уровне. Поэтому использование подходящего инструмента для визуализации патологии при возникновении инсульта, является ключевым этапом для определения молекулярных механизмов и направленной борьбы с заболеванием.

1.2.3. Методы визуализация молекулярно-биохимических процессов при ишемическом инсульте

Традиционно для наблюдения за изменениями клеточных параметров в головном мозге при ишемическом инсульте используют биохимические анализы [159,160], морфологические анализы [161,162] и электрофизиологические исследования [163–165]. Технологические разработки последних двух десятилетий позволили по-новому взглянуть на исследования мозга на тканевом, клеточном и молекулярном уровнях. Появились такие мощные методы функциональной диагностики мозга, как магнитно-резонансная томография (МРТ) [166] и позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) [167].

Два основных метода визуализации мозга, ПЭТ и функциональная МРТ (фМРТ), позволяют получить сигналы, непосредственно связанные с доставкой и использованием энергии в клетках головного мозга. Например, для ПЭТ распределение зондов, меченных позитрон-излучающими изотопами, такими как ^{18}F или ^{15}O , позволяет выявить изменения мозгового кровотока при помощи воды, меченной ^{15}O , и изменения метаболических параметров, таких как утилизация глюкозы с помощью ^{18}F -меченой 2-дезоксиглюкозы (2-DG) [168]. Кроме того, с помощью ПЭТ можно определить процент потребления кислорода с помощью $^{15}\text{O}_2$, что отражает метаболическую активность мозга. Для фМРТ нет специфического контрастирующего вещества, сигнал фМРТ формируется за счет измерения соотношения окси- и дезоксигемоглобина, которое меняется в зависимости от кровотока и объема циркулирующей крови, а также от интенсивности протекания различных метаболических процессов [169]. Таким образом, с помощью фМРТ можно получить *in vivo* изображения микроциркуляторного русла головного мозга, которые будут отражать уровень кислорода в крови. Изменение уровня кислорода в крови может быть связано с изменениями вдыхаемых газовых смесей, инсулин-зависимой гипогликемией, изменениями метаболических потребностей организма и кровотока.

Оба этих метода, фМРТ и ПЭТ, дополняют друг друга и могут быть использованы совместно, например, для оценки нейронной активности [169].

Еще одним многообещающим методом визуализации различных заболеваний, в т.ч. нейропатологий, стала мультиспектральная оптоакустическая томография (МСОТ) – технология визуализации для получения оптических изображений высокого разрешения, в т.ч. в биологических тканях [170]. Основными светопоглощающими молекулами в тканях живых организмов являются меланин, вода и гемоглобин, которые могут служить эндогенными контрастными агентами для МСОТ [170]. Используя визуализацию МСОТ, Ni с соавторами провели *in vivo* исследование изменений оксигенации ткани головного мозга в течение одного

часа после временной МСАО и через 48 часов после реперфузии при параллельном изучении изменений активности матричной металлопротеиназы (ММП) с использованием ММП-активируемого зонда [171]. Сигналы дезокси-/оксигемоглобина и активность ММП регистрировали совместно с проведением МРТ в экспериментальных животных. Ni с соавторами показали, что насыщение тканей кислородом было значительно ниже в течение одного часа после временной МСАО и восстановилось после 48 часов реперфузии у экспериментальных животных по сравнению с ложнооперированными мышами. При этом через 48 ч после реперфузии в пораженных участках мозга происходит увеличение активности ММП по сравнению с контрольной группой [171].

В настоящее время все большее распространение получает применение Рамановской спектроскопии для оценки степени повреждения нейронов и астроцитов, а также для изучения эффективности применяемой лекарственной терапии. Спектроскопия комбинационного рассеяния света или Рамановская спектроскопия — это метод неупругого рассеяния монохроматического света, который предоставляет информацию о веществе на основе уникальных колебательных режимов интересующей молекулы [172,173]. Метод Рамановской спектроскопии обладает высокой специфичностью и чувствительностью с высоким пространственным и спектральным разрешением. Рамановская спектроскопия может предоставить быструю информацию без дополнительных меток в режиме реального времени, что имеет решающее значение при исследовании нейробиологических процессов [174]. Так, например, с помощью Рамановской спектроскопии Jung с соавторами показали возможность исследования ряда биохимических изменений в области гиппокампа головного мозга крыс после ишемии и последующей реперфузии, а также оценили влияние ингибитора nNOS на состояние тканей мозга [175].

Важным методом визуализации молекулярно-биохимических процессов является метод оптической генерации третьей гармоники (THG). THG является мощным и универсальным инструментом для визуализации живого мозга. Генерация третьей гармоники представляет собой нелинейно-оптическое явление, при котором свет с угловой частотой ω преобразуется в свет с угловой частотой 3ω , который в три раза выше [176]. Свет состоит фотонов, а нелинейная среда обеспечивает процесс, при котором три фотона с частотой ω аннигилируют, создавая один фотон с частотой 3ω [176]. Так, например, с помощью метода оптической генерации третьей гармоники Witte с соавторами демонстрируют высококонтрастную визуализацию живой ткани головного мозга с высоким разрешением на уровне отдельных клеток [177]. Исследователям удалось визуализировать нейроны, структуры белого вещества, а также кровеносные сосуды [177]. Согласно авторам цитируемой статьи, данное исследование является важным шагом на пути

микроскопической визуализации живого мозга без дополнительных меток, а также может послужить основой для разработки методов микрохирургии [177].

Еще одним многообещающим методом в нейробиологических исследованиях является двухфотонная лазерная сканирующая микроскопия (2PLSM), которая представляет собой мощный и неинвазивный инструмент для визуализации живых биологических образцов с высоким разрешением. Комбинация методов флуоресценции с двухфотонной лазерной сканирующей микроскопией (2PLSM) стала предпочтительным инструментом для визуализации мозга *in vivo*, поскольку изображения с высоким разрешением могут быть получены на относительно большой глубине (> 500 мкм) от поверхности ткани [178]. Для возбуждения флуорофора используются ультракороткие инфракрасные лазерные импульсы, которые дают слабое рассеяние света образца ткани или живым мозгом. Кроме того, нелинейная природа возбуждения 2PLSM гарантирует, что обнаруженные фотоны поступают от излучения флуорофора исключительно в фокальной плоскости [179]. Хотя оптические методы, основанные на 2PLSM, обеспечивают достаточное разрешение, они нуждаются во флуоресцентных красителях для обеспечения контраста изображения [180].

На сегодняшний день известен обширный класс флуоресцентных синтетических красителей, которые позволяют метить определенные клеточные структуры, а также визуализировать изменения некоторых клеточных параметров. Примером могут служить красители, позволяющие регистрировать в живых клетках Ca^{2+} [181]. Почти все синтетические сенсоры кальция основаны на использовании высокоселективного и обратимого хелатора Ca^{2+} - ВАРТА (1,2-бис-аминофенокси)этан-N,N,N,N-тетрауксусной кислоты) [182]. Слияние фрагмента флуоресцеина с ВАРТА, впервые предложенное Tsien, привело к созданию коммерчески доступных индикаторов Fluo-3 и Fluo-4, которые демонстрируют более чем 100-кратное усиление флуоресценции при связывании кальция [183]. Включение фрагмента ВАРТА в структуру родамина привело к созданию кальциевых красителей, пик флуоресценции которых смещен в красно-волновую область. Примером такого синтетического индикатора может служить CaRubyNano, который демонстрирует почти 50-кратное увеличение флуоресценции при связывании кальция [184].

Тем не менее, использование синтетических красителей сопряжено с рядом существенных недостатков, таких как, высокая токсичность и ограничения локализации синтетического индикатора в различных клетках и компартментах живого организма.

Открытие GFP-подобных белков (green fluorescent protein – GFP) и создание на их основе молекулярных инструментов вывели исследования биохимических процессов в тканях *in vivo* на

новый уровень. Такие биосенсоры кодируются геном, а значит могут быть доставлены в клетки с помощью широко используемых в лабораторной практике вирусных частиц. Локализацию биосенсора можно направить с помощью подбора промотора и добавления сигнальных последовательностей, которые позволят локализовать флуоресцирующую молекулу в определенных компартментах выбранного типа клеток. Но главное, что строение и функционирование такого биосенсора определяется самой природой. Выбор сенсорного домена определяет какой параметр будет регистрировать данный сенсор. На сегодняшний день получена обширная коллекция разнообразных сенсоров для регистрации различных внутриклеточных параметров. Биосенсоры отличаются по типам строения. Но все они дают неоспоримое преимущество в исследованиях – позволяют регистрировать динамику изучаемого процесса в режиме реального времени. Следует отметить, что исследование некоторых процессов *in vivo* до появления соответствующих биосенсоров было попросту невозможно. Так, например, были разработаны биосенсоры, позволяющие регистрировать *in vivo* даже такие высоко реакционноспособные соединения, как активные формы кислорода, галогены и многие другие редокс-активные компоненты клеток.

1.3. Биосенсоры

1.3.1. Структура и свойства генетически кодируемых флуоресцентных биосенсоров

Генетически кодируемые индикаторы на основе GFP-подобных белков широко применяют для регистрации множества внутриклеточных параметров. Они позволяют исследовать динамику изменения концентрации ионов, сигнальных или метаболических молекул, ферментативную активность некоторых белков.

GFP-подобные белки обладают способностью излучать свет. Хромофор данных белков формируется автокаталитически путем циклизации трех аминокислотных остатков в центральном положении альфа-спирали (рисунок 7), поглощает свет и испускает его в более длинноволновой области. Как и любую другую белковую молекулу, конструкции на основе флуоресцентного белка можно легко локализовать внутри клеток, а также соединить с белком интереса [185]. На сегодняшний день найдено и получено в результате модификаций большое количество GFP-подобных белков, различающиеся по своим свойствам, в том числе спектральным [186]. Существующая коллекция перекрывает всю область видимого света. Некоторые из версий были получены путем внесения лишь нескольких точечных мутаций в окружение хромофора, и этого оказалось достаточно для изменения различных свойств [187]. Так, например, в результате замены серина на треонин в хромофоре avGFP, был получен зеленый флуоресцентный белок с одним пиком поглощения EGFP (Enhanced GFP). Внесение дополнительной замены Ala206Lys позволило получить мономерную версию белка [188]. Также известно, что и другие аминокислотные остатки расположенные вблизи хромофора могут влиять на спектральные свойства флуоресцентного белка [189]. Так например, путем замены аминокислотного остатка триптофана на тирозин (Thr203Tyr) в avGFP был получен белок с новыми спектральными свойствами – YFP, максимум эмиссии флуоресценции которого был сдвинут в более длинноволновую область [190].

В настоящее время существует большое разнообразие биосенсоров разного уровня сложности. В простейшем случае биосенсор представлен молекулой флуоресцентного белка, которая изменяет свои флуоресцентные свойства в зависимости от микроокружения [186]. Например, от pH окружения зависит то, в каком состоянии находится хромофор, в протонированном или депротонированном. Спектральные характеристики хромофора могут спектрально различаться в данных состояниях. При уменьшении pH наблюдается увеличение пика анионной формы хромофора, а при увеличении pH – уменьшение пика протонированной формы [186,187].

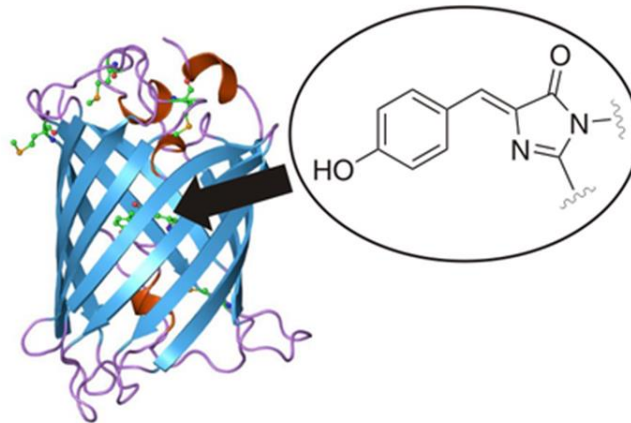


Рисунок 7. Схема строения GFP-подобных белков и хромофора, состоящего из 3 аминокислотных остатков Ser65 (или Thr65)-Tyr66-Gly67. Синим обозначены β -листы; красным – α -спираль, формирующая хромофор, который располагается посередине и состоит из трёх аминокислот; структура хромофора вынесена крупным планом; а неупорядоченный структуры белка обозначены фиолетовым цветом [189].

В более сложных биосенсорах к флуоресцентному домену добавлен сенсорный, также белковой природы. Данные конструкции получают на уровне гена. В таких индикаторах сенсорный домен взаимодействует с определенным внутриклеточным параметром, например, связывает конкретный метаболит, а флуоресцентный домен позволяет визуализировать эти взаимодействия. Чаще всего принцип работы построен на конформационных изменениях структуры. Конформационные перестройки сенсорного домена передаются на флуоресцентный, в результате смещений микроокружения хромофора происходят изменения спектральных свойств. Таким образом, флуоресцентный сигнал отражает динамику интересующего процесса в живой системе. Как правило, такие биосенсоры специфичны, обладают высокой чувствительностью и низкой токсичностью, демонстрируют обратимый сигнал [187],[191].

Генетически кодируемые флуоресцентные биосенсоры делятся на два типа: интенсимоетрические и рациометрические. Данный показатель определяет в скольких флуоресцентных каналах происходит регистрация сигнала биосенсора. Интенсимоетрические биосенсоры регистрируются в одном канале: подается с определенной волной возбуждение (E_x) и регистрируется эмиссия с определенной волной (E_m). Рациометрические сенсоры работают в двух каналах. В этом случае, например, в составе биосенсора могут присутствовать два флуоресцентных белка, что характерно для сенсоров на основе FRET, тогда для каждого белка характерны свои параметры E_x/E_m . Однако рациометрическим типом сигнала может обладать биосенсор и на основе одного белка. Некоторые флуоресцентные белки в своем спектре возбуждения имеют два пика, что связано с состояниями хромофора, при этом независимо от возбуждения эмиссия будет одинаковой. Поэтому для таких белков флуоресценция

регистрируется в двух каналах, соответствующих максимумам в спектре возбуждения флуоресценции этого белка. Значение сигнала таких биосенсоров рассчитывается как соотношение интенсивностей в двух каналах. Преимуществом обладают именно ратиометрические биосенсоры, поскольку позволяют количественно измерять регистрируемый параметр, а также избегать артефактов, связанных с разным уровнем экспрессии биосенсора в исследуемой культуре, изменением формы или движением объекта [187].

1.3.2 Типы биосенсоров

По дизайну строения биосенсоров можно выделить две главные категории: биосенсоры с двумя флуоресцентными белками на основе FRET взаимодействий и биосенсоры, состоящие из одного флуоресцентного белка. Существует и другие варианты, но в рамках данной работы мы остановимся именно на этих биосенсорах, которые к тому же составляют большинство от существующих.

Фёрстеровский перенос энергии (FRET - fluorescence resonance energy transfer) представляет процесс, в результате которого происходит перенос энергии от возбужденного донорного флуорофора к акцепторному, при этом спектр флуоресценции донора должен перекрываться со спектром поглощения акцептора [192]. Для этого необходимо, чтобы донор и акцептор находились на расстоянии не более 50 Å друг от друга [193,194]. В ином случае при возбуждении донора будет наблюдаться только его собственная флуоресценция. В случае, когда молекулы или отдельные части одной молекулы сближены в пространстве, при возбуждении донора будет наблюдаться эмиссия акцептора [187]. FRET-пары в составе биосенсора подобного типа представляют собой два спектрально различающихся флуоресцентных белка, например, циановый (CFP) и желтый (YFP) флуоресцентные белки [195]. Конформационные изменения в биосенсоре, происходящие благодаря взаимодействию сенсорного домена с определенным лигандом, приводят к изменению расстояния между FRET-парой, в результате чего происходит изменение флуоресцентного сигнала (рисунок 8) [193] [186].

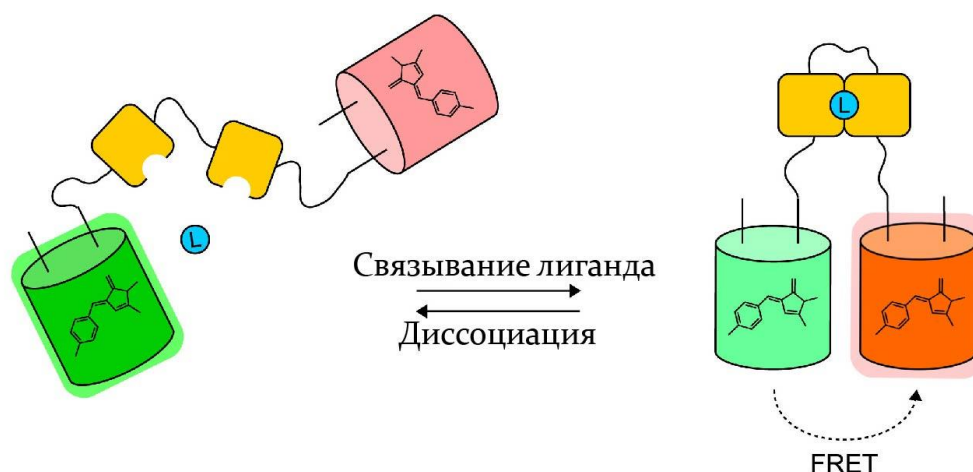


Рисунок 8. Биосенсоры на основе флуоресцентных белков, осуществляющих FRET взаимодействие. Разноцветные цилиндры – флуоресцентные белки, жёлтые – сенсорные домены. Два флуоресцентных белка присоединены к сенсорному домену, конформационные изменения которого влияют на эффективность FRET между этими флуоресцентными белками [196].

Универсальность и относительная простота такой конструкции привели к созданию многочисленных индикаторов на основе FRET, в том числе биосенсоров для измерения концентрации Ca^{2+} [197], [198], [199], [200] глутамата [201], триптофана [202], циклических нуклеотидов - cGMP [203] и cAMP [204], активности ГТФазы [200] и различных киназ [205,206].

Однако биосенсоры на основе FRET имеют ряд существенных недостатков, главными из которых являются низкая амплитуда ответа, большой размер конструкции [187].

Другая группа биосенсоров разработана на основе одного флуоресцентного белка. Нативный GFP-подобный белок имеет жесткую структуру и представляет собой «бета-бочонок», состоящий из 11 бета-листов и одной хромофор-образующей альфа-спирали [189]. Подобная структура крайне устойчива к различным физико-химическим воздействиям и мало подвержена конформационным изменениям. Метод круговой пермутации позволяет существенно увеличить подвижность хромофорного окружения белка и, следовательно, повысить лабильность его спектральных свойств [207]. Суть метода круговой пермутации заключается во внесении разрыва в определенную область первичной структуры белка, при этом нативные N- и C-концы сшиваются при помощи полипептидного линкера (рис.9)[208]. Таким образом, в образованном круговом пермутанте флуоресцентного белка новые N- и C-концы находятся вблизи хромофора и могут влиять на его микроокружение [208].

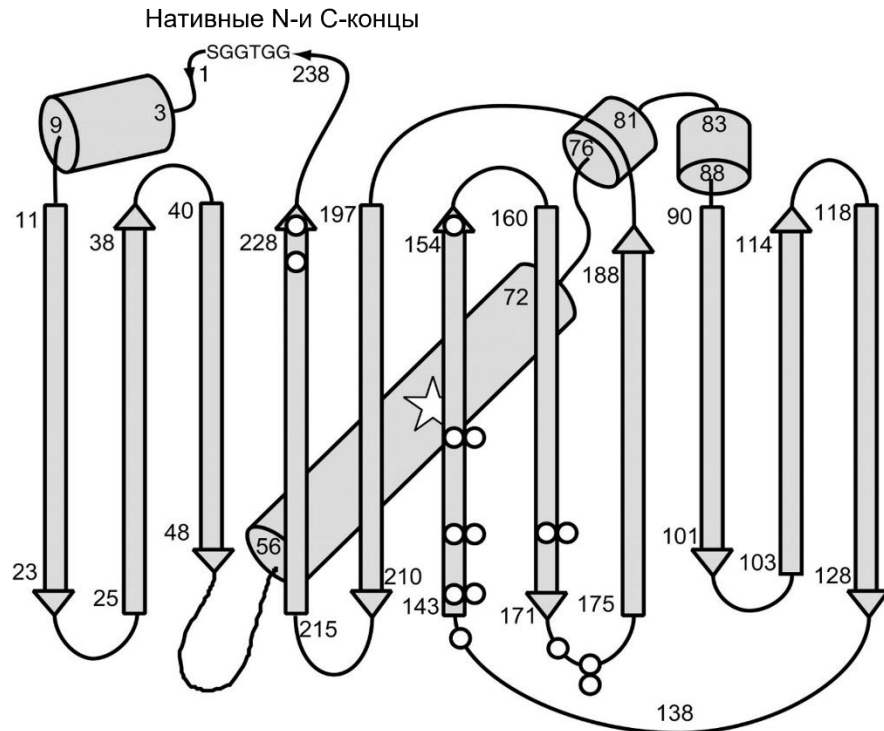


Рисунок 9. Схематическое изображение вторичной структуры GFP с объединенными с помощью полипептидного линкера (GGTGGG) нативными N- и C-концами. Места внесения разрывов в структуре белка на схеме указаны кружками (○), расположение хромофора обозначено звездочкой (★). Двойные кружки (○○) указывают места внесения разрывов для получения круговых пермутантов с двумя разными концевыми аминокислотами [208].

При создании биосенсоров на основе круговых пермутантов флуоресцентных белков необходимо учитывать, что внесение изменений в структуру молекулы может поменять ее флуоресцентные свойства. Также создание биосенсоров такого типа представляет собой более трудоёмкий процесс, однако их применение имеет большее распространение по сравнению с другими типами биосенсоров за счет того, что они обладают гораздо более широким динамическим диапазоном ответа и меньшим молекулярным весом [187].

Разработка любого генетически кодируемого индикатора на основе кругового пермутанта флуоресцентного белка требует выбора соответствующего чувствительного домена, который в свою очередь представляет собой белок или белковый домен, способный подвергаться выраженной конформационной перестройке при взаимодействии с определенным клеточным параметром. Данный принцип лежит в основе разработки таких популярных флуоресцентных зондов, как GCaMP [209], Pericams [210] для регистрации Ca^{2+} , Pink Flamindo для регистрации cAMP [211], Perceval для регистрации соотношения АТФ/АДФ [212], SoNar для регистрации соотношения НАДН/НАД⁺ [213] и др.

Генетически-кодируемые флуоресцентные сенсоры для визуализации окислительно-восстановительных реакций

Поддержание нормального окислительно-восстановительного состояния необходимо для функционирования клеточных систем. Нарушение окислительно-восстановительного статуса связано с повышенным образованием АФК [214]. Изучение окислительно-восстановительных процессов наиболее затруднительно в живых системах, поскольку участники этих реакций отличаются высокой реакционной способностью и коротким временем жизни [186]. К настоящему моменту разработана целая коллекция биосенсоров, которые позволяют изучать окислительно-восстановительные процессы *in vivo*. Принцип функционирования таких биосенсоров основан также на конформационных изменениях сенсорного домена, передающихся на флуоресцентную часть. Сенсорный домен может связывать свой лиганд, но при этом только его окисленная или восстановленная форма индуцирует конформационные изменения. Другие биосенсоры вступают в окислительно-восстановительные реакции напрямую и при переходах в окисленное/восстановленное состояние изменяют спектральные характеристики (рис. 10).

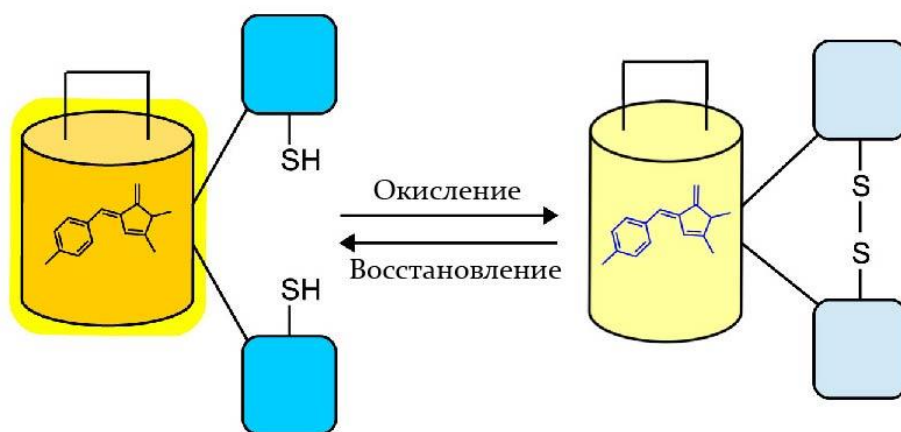


Рисунок 10. Схема генетически-кодируемого сенсора для регистрации окислительно-восстановительных реакций. Синим изображены сенсорные домены, желтым – жёлтый флуоресцентный белок, подвергнутый методу круговой пермутации. При окислении происходит формирование дисульфидной связи по специфичным аминокислотным остаткам, в результате чего происходят конформационные перестроения и изменяется флуоресцентный сигнал [196].

Далее мы подробнее остановимся на свойствах биосенсоров, которые будем использовать в настоящей работе.

Биосенсоры семейства *HyPer* для регистрации H_2O_2

Флуоресцентный биосенсор *HyPer* (Hydrogen Peroxide) [215] позволяет исследовать динамику концентрации H_2O_2 в различных биохимических процессах, происходящих в клетке и ее компартментах. Данный биосенсор состоит из транскрипционного фактора *E.coli* *OxyR*,

представляющий сенсорный домен, и кругового пермутанта желтого флуоресцентного белка - *cpYFP* [186,215].

В природе транскрипционный фактор *OxyR* регулирует экспрессию определенных генов при увеличении концентрации H_2O_2 . С-концевая часть *OxyR* является регуляторной, а N-концевая - ответственна за связывание ДНК. Механизм активации экспрессии заключается в образовании дисульфидной связи в регуляторном домене *OxyR* между цистеинами (Cys-199 и Cys-208) в присутствии H_2O_2 , что в свою очередь приводит к конформационным изменениям всего белка *OxyR*. В составе биосенсора *HuPer* белок *OxyR* выполняет ту же функцию [215], однако в его структуре отсутствует ДНК-связывающий домен. *cpYFP* интегрирован в аминокислотную последовательность *OxyR* (между 205 и 206 АК) посредством коротких пептидных линкеров Ser-Ala-Gly и Gly-Thr [186]. Таким образом, взаимодействие биосенсора *HuPer* с перекисью водорода приводит к конформационным изменениям регуляторного домена *OxyR*, которые отражаются изменением флуоресценции *cpYFP*. Спектр возбуждения флуоресценции биосенсора *HuPer* имеет два пика с максимумами при 420 нм и при 500 нм, спектр эмиссии представлен одним пиком с максимумом при 516 нм. В присутствии H_2O_2 биосенсор окисляется, а в его спектре возбуждения флуоресценции наблюдается пропорциональное увеличение интенсивности при 500 нм и уменьшение при 420 нм [216]. Сигнал рассчитывается как соотношение F_{500}/F_{420} .

HuPer-2 – первая усовершенствованная версия сенсора *HuPer*, которая демонстрирует более широкий диапазон ответа при взаимодействии с H_2O_2 . Сигнал F_{500}/F_{420} у *HuPer-2* изменяется в 6–7 раз при насыщающей концентрации H_2O_2 , что в 2 раза больше, чем у исходной версии *HuPer*. *HuPer-2* отличается от *HuPer* всего лишь одной точечной мутацией Ala406Val [217], которая локализована в области *OxyR*-домена, ответственной за олигомерное состояние. В результате биосенсор *HuPer-2* представлен в клетках в виде димера в отличие от своей предыдущей версии. Кроме того, *HuPer-2* имеет более низкие скорости взаимодействия с H_2O_2 и последующим восстановлением в клетках, чем у *HuPer* [217].

Другая версия *HuPer-3* [218] отличается мутацией His34Tyr в той же области, ответственной за олигомерное состояние. Несмотря на то, что динамический диапазон *HuPer-3* сопоставим с динамическим диапазоном *HuPer-2* (в 6–7 раз), скорость реакции окисления и восстановления *HuPer-3* выше по сравнению с предыдущей версией сенсора. Кроме того, *HuPer-3* представлен в виде мономера, как и *HuPer*. Сочетая в себе преимущества обеих предыдущих версий, *HuPer-3* стал перспективным биосенсором для измерения динамики H_2O_2 , в том числе в режиме реального времени в различных животных моделях [186].

Как и большинство биосенсоров на основе *srYFP*, описанные представители семейства *HyPer* чувствительны к изменениям pH. Это свойство обусловлено особенностями хромофора *srYFP*. Для многих GFP-подобных белков характерна pH чувствительность [219,220]. Причем круговые пермутанты флуоресцентных белков еще более чувствительны к изменениям pH по сравнению с исходным вариантом. Это, вероятно, связано с большей доступностью хромофора. В частности, *srYFP* с pK_a 8.6 (при возбуждении 485 нм) [221] более чувствителен к внутриклеточным изменениям pH по сравнению с *EYFP* с его значением pK_a 7.1 [222,223].

Таким образом, закисление окружающей среды приводит к увеличению интенсивности пика возбуждения при 420 нм и уменьшению при 500 нм, что имитирует процесс восстановления *HyPer* [215]. Зашелачивание, в свою очередь, приводит к противоположному эффекту. Поэтому для большинства биосенсоров на основе *srYFP* крайне рекомендуется использовать индикаторы для контроля pH в исследуемой системе. При сильных изменениях pH необходимо учитывать эту компоненту в сигнале биосенсора.

Позднее была получена еще одна версия биосенсора - *HyPer7*, сигнал которой устойчив к изменениям pH. *HyPer7* также построен на основе *srYFP*, который интегрирован в сверхчувствительный домен *OxyR* из *Neisseria meningitidis*. При изменении pH у *HyPer7* тоже изменяются спектральные свойства, однако в спектре возбуждения интенсивность обоих пиков изменяется в одну и ту же сторону. Поэтому их соотношение не изменяется при разных pH (рис.11 Б). При окислении для *HyPer7* характерно привычное ратиометрическое изменение сигнала: уменьшение интенсивности в спектре возбуждения при 400 нм и увеличение пика при 499 нм (рис. 11 А). Из других преимуществ *HyPer7* отличается высокой чувствительностью и яркостью [224]. Кроме того, *HyPer7* демонстрирует большую скорость ответа по сравнению с предыдущими версиями сенсора. Начальная скорость *HyPer7* примерно в 60 и 86 раз выше по сравнению с *HyPer* и *HyPer-3* [224].

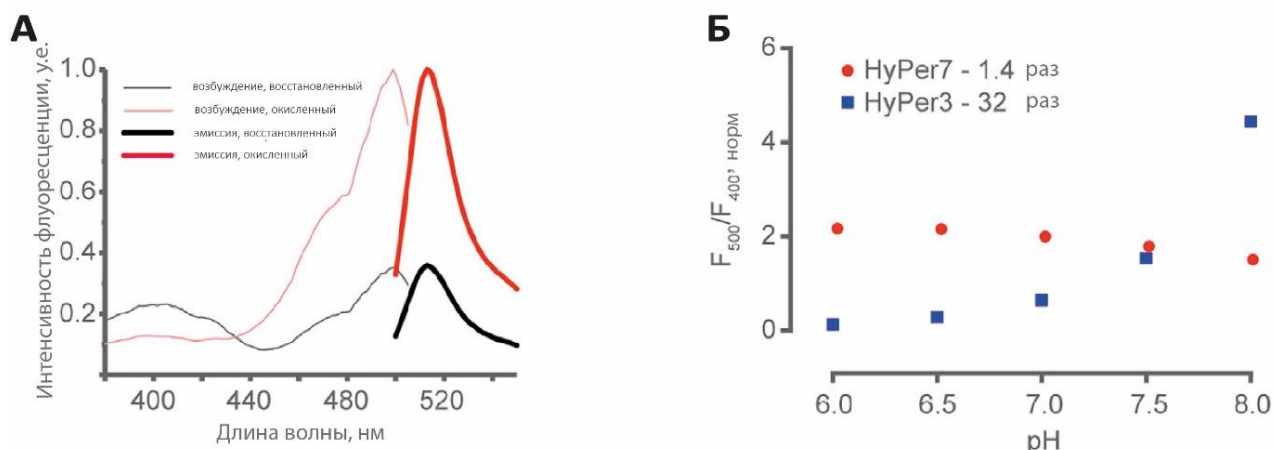


Рисунок 11. *In vitro* характеристика биосенсора HyPer7. (А) Спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции сенсора HyPer7, находящегося в окисленном и восстановленном состоянии. (Б) pH-зависимость HyPer7 и HyPer3 в физиологическом диапазоне pH. F_{500} и F_{400} — интенсивности флуоресценции, возбуждаемые при 500 и 400 нм, соответственно [224].

Среди представителей рассматриваемого семейства биосенсоров также следует выделить версию HyPerRed, которая построена на красном флуоресцентном белке crmApple [225]. Для HyPerRed характерен один пик в спектре возбуждения флуоресценции (575 нм) и один пик эмиссии (605 нм). Биосенсоры с различающимися спектральными характеристиками можно использовать одновременно в системе. Так, например, биосенсоры HyPer-3, HyPer7 и HyPerRed могут использоваться в различных комбинациях для мультипараметрических исследований окислительно-восстановительных процессов.

pH-биосенсоры семейства SynHer

pH является одним из основных физиологических параметров, который точно регулируется сложным взаимодействием переносчиков протонов, реакциями производства и потребления H^+ [226]. Продолжительные флуктуации pH в различных клеточных компартментах приводят к метаболическим и сигнальным изменениям, а при высокой степени выраженности к клеточному стрессу и апоптозу [227].

На сегодняшний день известен целый ряд флуоресцентных зондов для измерения динамики pH в клетках живых организмов. Так, например, существуют синтетические pH-чувствительные красители такие, как PDMPO, BCECF и SNARF, однако область их применения ограничена отсутствием возможности направленно локализовать данные зонды в определенных типах клеток в составе тканей или специфических органеллах в пределах клетки. Еще одним существенным недостатком синтетических зондов является узкий диапазон pH, который близок к их значениям pK_a [228]. Поэтому создание генетически кодируемых флуоресцентных индикаторов для измерения динамики pH также было актуальной задачей. На сегодняшний день

существует ряд подобных биосенсоров для измерения динамики рН, включая рациометрические – рНluorin [228], RaVC [229] и SypHer1/2 [230,231].

Ранее мы описывали биосенсоры семейства HyPer. В сенсорном домене OxyR расположен функциональный аминокислотный остаток Cys-199, который необходим для взаимодействия с H₂O₂. Для подтверждения функциональной активности HyPer этот ключевой остаток был заменен на Ser199. В результате полученная версия HyPer-C199S не реагирует на H₂O₂ и имитирует полностью восстановленный HyPer [215]. HyPer-C199S полностью схож с HyPer по своим свойствам, в том числе имеет одинаковую чувствительность рН и то же значение рКа. Т.е. HyPer-C199S изменяет сигнал при изменении рН, но не окисляется H₂O₂. Впоследствии эта версия была представлена в качестве хорошего рН-сенсор, который получил название SypHer [230]. Данный биосенсор хорошо охарактеризован и широко применяется для визуализации изменений рН в различных биологических системах [230].

SypHer имеет спектральные свойства, аналогичные HyPer, поэтому оба биосенсора могут быть использованы в параллельных экспериментах при одинаковых настройках микроскопа. Благодаря этому биосенсор SypHer является оптимальным рН-контролем для всех версий семейства HyPer на основе cpYFP. В дальнейшем были предприняты попытки по улучшению свойств SypHer в качестве рН-биосенсора. Так, например, был получен SypHer2 [231] - версия, которая отличается более высокой яркостью и обладает более широким диапазоном ответа. В дальнейшем в ходе проведения мутагенеза была получена версия SypHer3s, отличающаяся мутациями Y145F, D129G и Q197L, а также укороченной на 9 аминокислот последовательностью с N-конца. SypHer3s обладает высокой яркостью, а также большим динамическим диапазоном (рисунок 12) [232]. При увеличении рН в спектре возбуждения флуоресценции наблюдается уменьшение интенсивности пика при длине волны 410 нм и увеличение - при длине волны 495 нм (рис. 12 А) [232]. Таким образом, увеличение рН ведет к увеличению сигнала F495/F410 (рис. 12 Б).

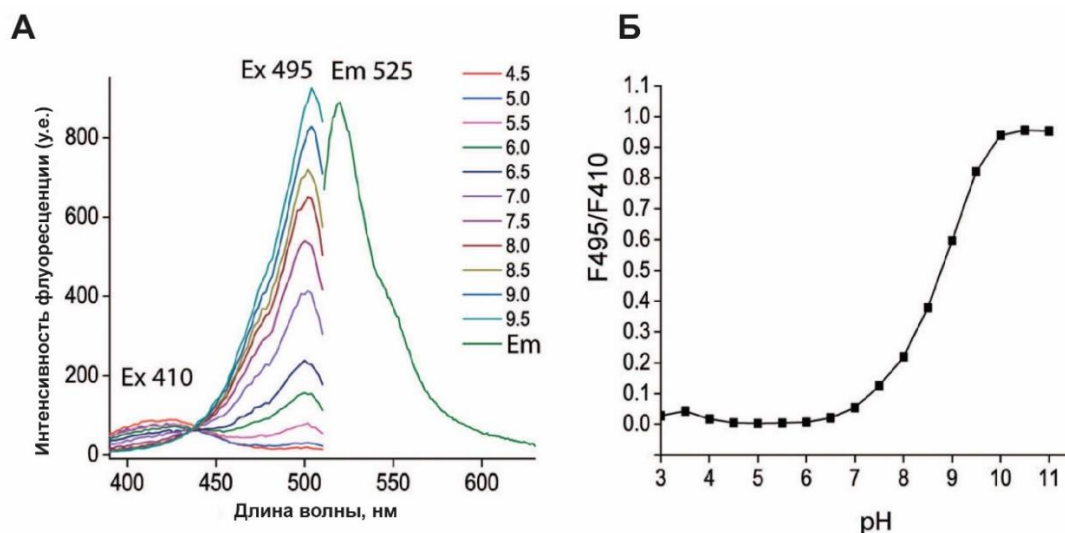


Рисунок 12. Характеристика SypHer3s in vitro. (А) Спектр возбуждения флуоресценции SypHer3s при различных значениях pH (4,5-9,5), эмиссия приведена при pH 9,0. (Б) Калибровочная кривая, приведенная для SypHer3s при различных pH (3,0–10,55), измеренные в различных буферах, содержащих 130 mM KCl, 30 mM NaCl, 0,5 mM MgCl₂, 0,2 mM EGTA (pH 3,0–4,5), 30 mM HCl–NaH₂C₆H₅O₇ (pH 5,0–7,5), 15 mM KH₂PO₄–Na₂HPO₄, 20 mM (pH 8,0–11,0) Na₂B₄O₇–HCl/NaOH. Адаптировано из [232].

Сенсоры для измерения соотношения НАД⁺/НАДН

Важную роль в жизни клетки занимает поддержание соотношения НАД⁺/НАДН. Известно, что соотношение НАД⁺/НАДН является параметром, отражающим общий окислительно-восстановительный статус клетки, который определяет не только её энергетический метаболизм, но и множество других важных биологических процессов, таких как поддержание функций митохондрий и гомеостаза кальция [233]. Кроме того, изменение соотношения НАД⁺/НАДН влияет на регуляцию антиоксидантной функции клетки, модулирует экспрессию генов, поддерживает иммунологическую активность, влияет на процессы старения и клеточной гибели [234,235]. Эти биологические процессы определяются НАД-зависимой регуляцией активности таких ферментов как сиртуины, АДФ-рибозилциклазы, дегидрогеназы и другие [186,236].

На сегодняшний день существует множество генетически кодируемых биосенсоров для измерения соотношения НАД⁺/НАДН такие как, Peredox [237], биосенсоры из семейства Ftex [238], RexYFP [239] и SoNar [213]. Все перечисленные биосенсоры основаны на представителях семейства транскрипционных факторов Rex. Бактериальные белки Rex чувствительны к окислительно-восстановительному состоянию пула НАД(Н). Белок Rex является гомодимером и может находиться в трех основных состояниях. В том случае, когда в среде мало свободных нуклеотидов, белок находится в переходном состоянии: частично в свободном, частично – в слабом комплексе с ДНК [240]. В присутствии кислорода равновесие в системе НАД⁺/НАДН

сдвинуто в сторону НАД⁺. Тогда белок Rex образует прочный комплекс с ДНК и молекулой НАД⁺, выступая в качестве репрессора транскрипции некоторых генов [240]. В условиях гипоксии соотношение НАД⁺/НАДН снижается, а транскрипционный фактор Rex связывает две молекулы НАДН, т. к. имеет к нему большее сродство, чем к НАД⁺. При связывании НАДН Rex претерпевает конформационные изменения и в таком состоянии не связывает ДНК [240], в результате чего начинается активная экспрессия генов, продукты которых позволяют клеткам выжить в условиях недостатка кислорода [241]. В частности, цитохром-bd-оксидаза более эффективно использует доступный кислород, а различные дегидрогеназы превращают часть избыточного количества НАДН в НАД⁺ [186,240]. Временный недостаток кислорода для бактериальных клеток приводит к активации экспрессии ключевых генов, которые в присутствии кислорода заблокированы репрессором Rex.

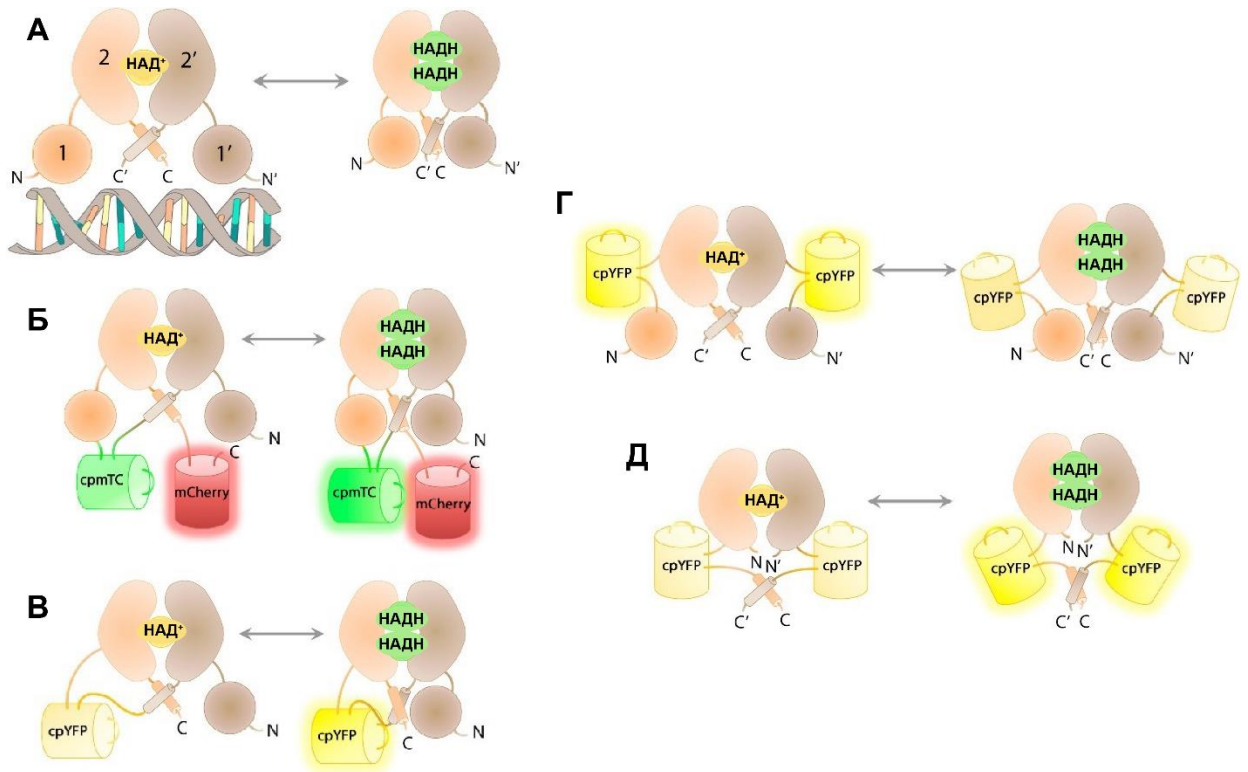


Рисунок 13. Графические схемы изображения генетически кодируемых флуоресцентных сенсоров для регистрации соотношения НАД⁺/НАДН [236]. (А) Нативные репрессоры из семейства Rex. (Б) Peredox. (В) Frex family probes. (Г) RexYFP. (Д) SoNar.

Таким образом, на основе бактериального механизма адаптации к гипоксическим условиям были созданы генетически кодируемые биосенсоры для регистрации соотношения НАД⁺/НАДН. В случае Peredox [237] и Frex [238] флуоресцентные белки были интегрированы между двумя мономерами Rex (рисунок 13). Изменения флуоресцентного сигнала данных биосенсоров связаны с взаимодействиями мономеров белка Rex в зависимости от показателя соотношения НАД⁺/НАДН [238]. Благодаря высокой чувствительности Peredox не может быть

использован в компартментах клетки с высоким содержанием НАДН, например, в митохондриях [237]. Биосенсор Fretх представлен несколькими версиями, имеющих различное сродство к НАДН. Отдельные варианты этого сенсора предпочтительнее использовать в митохондриях или цитоплазме, что также не позволяет проводить прямое сравнение динамики изменений соотношения НАД⁺/НАДН между этими клеточными компартментами [186]. Биосенсоры SoNag [213] и RexYFP [239] были созданы путем вставки сpYFP мономер T-Rex из *Thermus aquaticus*, причем в случае с SoNag был удален ДНК-связывающий домен (рисунок 13). Преимущество биосенсора RexYFP в том, что он позволяет исследовать динамику как в цитозоле, так и матриксе митохондрий [239]. Преимуществом SoNag являются яркость и высокий динамический диапазон ответа. Спектральные характеристики SoNag типичны для биосенсора на основе сpYFP: два пика в спектре возбуждения флуоресценции с максимумами при 420 и 500 нм и один пик эмиссии с максимумом при 518 нм. SoNag связывает как окисленную, так и восстановленную форму НАД. Связывание НАДН увеличивает интенсивность пика с максимумом 420 нм и пропорционально снижает интенсивность пика при 500 нм, в то время как связывание НАД⁺ увеличивает только интенсивность пика в спектре возбуждения с максимумом при 500 нм [190,213].

Биосенсор для регистрации концентрации (псевдо)гипогалогенных кислот -Hypocrates

Hypocrates является первым генетически кодируемым биосенсором для регистрации гипогалогенных кислот и их производных, которые играют важную роль в развитии воспалительных реакций организма. Биосенсор Hypocrates состоит из сpYFP, интегрированного в структуру репрессора транскрипции NemR из *Escherichia coli* (рисунок 14). Было показано, что данный бактериальный белок специфично изменяет свою конформацию при окислении гипогалогенными кислотами и регулирует, таким образом, транскрипционный ответ в клетке в условиях гипогалогенного стресса [242]. Построенный на базе NemR биосенсор Hypocrates демонстрирует радиометрическое изменение сигнала при окислении гипогалогенными кислотами. Для Hypocrates был проведен рентгеноструктурный анализ, что позволило определить пространственную организацию данного биосенсора [242]. С помощью данного биосенсора был впервые визуализирован гипогалогенный стресс у бактерий, фагоцитируемых нейтрофилами [242].

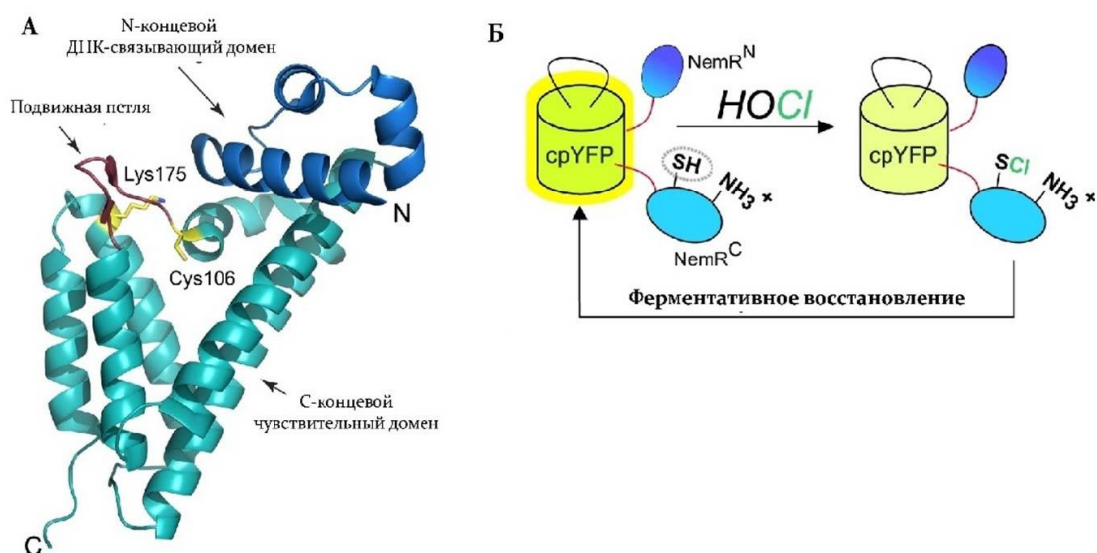


Рисунок 14. А. Структура *NemRC106* (PDB: 4YZE) с обозначенным N-концевым ДНК-связывающим доменом (синий), C-концевым сенсорным доменом (голубой); отмечены ключевые аминокислотные остатки, участвующие в окислении, Cys106 и Lys175 (окрашены в желтый цвет), а также подвижная петля (окрашена в красный цвет), в которую интегрирован cpYFP. **Б.** Предполагаемая схема функционирования биосенсора *NemR-cpYFP* [242].

Современные генетически кодируемые флуоресцентные биосенсоры являются надежными инструментами исследования в различных биологических системах, в том числе *in vivo*. Описанные биосенсоры неоднократно успешно применялись для реализации различных задач в тканях многих организмов, используемых в лабораториях, таких как *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio*, *Caenorhabditis elegans*, *Xenopus laevis* и др.[243].

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Молекулярно-генетические методы

В данном разделе будут описаны методы получения вирусных конструкций и вирусных частиц, несущие гены биосенсоров HyPer7, SynHer3s, SoNar.

2.1.1. Амплификация ДНК

Клонирование осуществляли при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР). Амплификацию проводили на приборе C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad). Вирусные генетические конструкции, несущих гены флуоресцентных белков и соответствующих промоторов получали путем добавления к реакционной смеси матричной ДНК (10 нг), эквимольной смеси dNTP (0,5 мкМ), праймеров (0,5 мкМ), термостабильной полимеразы Tersus-полимеразы (Евроген), буфер Tersus buffer (Евроген). Смесь до нужного объема, равного 50 мкл, доводили водой со степенью очистки milliQ. Пары праймеров для амплификации ПЦР-фрагментов для каждой вирусной конструкции приведены в приложении 1. Программа ПЦР, включающая в себя 25 циклов амплификации: 95 С – 0:15, 62 С – 1:20, 72 С – 1:20.

ПЦР скрининг полученных конструкций проводили с использованием коммерческой смеси Screen Mix (Евроген). Процедуру скрининга проводили в соответствии с протоколом производителя. Программа ПЦР: включающая в себя 25 циклов амплификации: 95 С – 1:00, 95 С – 0:15, 62 С – 1:20, 72 С – 1:20.

2.1.2. Электрофорез в агарозном геле

Аналитический электрофорез в агарозном геле

Аналитический электрофорез проводили в 1% агарозном геле (агароза (Dia-M)), TAE буфер и 0,5 мкг/мл бромистого этидия. ПЦР-продукты или образцы ДНК смешивали с 2 мкл буфера для нанесения (Gel Loading Dye, Blue, Евроген). Для определения длины фрагмента ДНК в одну из лунок добавляли маркер 1 kb ladder (SibEnzyme). Электрофорез проводили в электрофоретической камере (Wide Mini-Sub Cell GT, Bio-Rad) при напряжении 170 В. Далее проводили анализ агарозного геля с помощью прибора Alpha Imager 200.

Препаративный электрофорез в агарозном геле

Для очистки ДНК в лунку наносили до 30 мкл раствора образца, предварительно смешанного с буфером для нанесения. Электрофорез проводили в электрофоретической камере (Wide Mini-Sub Cell GT, Bio-Rad) при напряжении 140 В. Для получения отдельного фрагмента ДНК, вырезали из геля фрагмент нужной длины с использованием УФ - трансиллюминатора TF20M.

2.1.3. Рестрикция

Для проведения рестрикции использовали эндонуклеазы рестрикции и соответствующие буферы фирмы Thermo Fisher Scientific (Fast Digest) для разных стадий клонирования в соответствии с прилагаемым протоколом производителя. Рестрикцию ПЦР-фрагментов и плазмидной ДНК проводили в 30 мкл рестрикционной смеси в течение 15 мин.

2.1.4. Лигирование

Лигирование ПЦР-фрагментов в аденоассоциированный вектор (pAAV) проводили, используя лигазу фага T4 (Evrogen). Для этого к 14 мкл реакционной смеси добавляли 1 мкл лигазы (20ед/мкл) и инкубировали в течение 16 часов при 14°C. Соотношение вектор: вставка составляло 1:4.

2.1.5. Очистка и выделение ДНК

Очистку ПЦР-фрагментов после препаративного электрофореза или после рестрикции проводили на специальных колонках, используя коммерческий набор реактивов (CleanUp Standard).

2.1.6. Трансформация компетентных клеток

Электрическая трансформация

Компетентные клетки штамма XL1Blue, используемые для электрической трансформации, смешивали с 100 нг плазмидной ДНК, растворенной в воде степени очистки milliQ. В предварительно охлажденные кюветы для электропорации вносили смесь компетентных клеток (40 мкл) с растворенной в них пДНК и проводили электрическую трансформацию, используя прибор MicroPulser (BioRad). Далее к суспензии клеток добавляли 800 мкл среды SOB и инкубировали в течение 45 минут при 600 rpm при температуре 37°C на термостатируемом шейкере (TS-100, Biosan). После чего 100 мкл суспензии клеток переносили на чашки Петри с ампициллином. Бактериальные чашки инкубировали в термостатируемом шкафу в течение 16 часов при 37°C.

Химическая трансформация

Компетентные клетки для химической трансформации штамма XL1Blue размораживали на льду, перемешивали и добавляли к ним 300 нг плазмидной ДНК, далее инкубировали на льду в течение 2 минут. Клетки помещали в термостатируемые лунки (TS-100, Biosan) на 1,5 минуты, температура которых составляла 42°C. Сразу после этого эппендорфы с суспензией клеток переносили на лед на 1,5 минуты. Далее к суспензии клеток добавляли среду SOB, предварительно прогретую до 37°C инкубировали клетки в течение 45 минут при температуре

37°C и высевали на бактериальные чашки с антибиотиком. Чашки Петри инкубировали при температуре 37°C в термостате в течение 16 часов.

2.1.7. Выделение плазмидной ДНК

Для выделения плазмидной ДНК выбирали бактериальную колонию, которую предварительно скринировали на наличие таргетной плазмиды с помощью коммерческого реагента Screen Mix (Evrogen). Отобранные колонии переносили в жидкую среду LB с антибиотиком (ампициллин) и инкубировали пробу в термостатируемом шейкере при температуре 37°C в течение 18 часов при постоянном перемешивании. Выделение плазмидной ДНК проводили на специальных колонках в соответствии с протоком производителя (Evrogen).

2.1.8. Определение нуклеотидной последовательности ДНК

Нуклеотидную последовательность ДНК полученных вирусных конструкций проводили в фирме Evrogen. Анализ последовательностей проводили с помощью онлайн программы Benchling.

2.1.9. Создание аденоассоциированных вирусных частиц

Аденовирусные частицы 9 серотипа, несущие гены биосенсоров SoNar, SypHer3s и SypHer3s-mito, находящиеся под hSyn1 промотором, были получены в институте Шарите, Берлин. AAV9, несущие гены биосенсоров HyPer7 и HyPer7-dmito, находящиеся под hSyn1 промотором, были получены в отделе разработки вирусов ИБХ РАН. Для сборки частиц аденоассоциированных вирусов серотипа 9 (AAV9) использовали адгезионную клеточную линию HEK293TN. Клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 10% FBS и 1% антибиотиков пенициллин/стрептомицин. За сутки до трансфекции клетки HEK293TN пересеивали из расчета 70-75 тыс.кл / см² площади культурального флакона. Трансфекцию клеток с использованием трансфекционного агента PEI MAX 40K проводили тремя плазмидами: плазмидой, несущей ген биосенсора HyPer7/SypHer3s или HyPer7-dMito/SypHer3s-dMito с соответствующими промоторами, а также плазмидами RepCap и rHelper, кодирующими гены белков капсида 9 серотипа. Через 3 суток после трансфекции клетки центрифугировали при 2000 g в течение 5 минут, а клеточный осадок, растворенный в PBS с 2 mM MgCl₂, подвергали трем циклам заморозки/разморозки. Полученный клеточный лизат инкубировали с DNASE I в течение 1 часа при температуре 37°C и далее снова центрифугировали при 2000 g. После получения осветленного клеточного лизата производили очистку вирусных частиц с помощью ультрацентрифугирования в градиенте йодиксанола в течение 2 часов при 65000 rpm (ротор Fixed- Angel Sorvall T-8100). Требуемую фракцию образовавшегося градиента, содержащую вирусные частицы, отбирали и концентрировали с помощью центрифужных концентраторов

Amicon с пределом отсечения 100 kDa. В них же производилась смена буфера на буфер для хранения (PBS + 0.001 % Pluronic F68). Количество вирусных частиц, несущих конструкцию с геном флуоресцентного биосенсора, определяли методом qPCR.

2.2. *In vitro* методы

2.2.1. *Ведение культур эукариотических клеток*

Клетки линии HeLa Kyoto (EMBL) культивировали в среде RPMI-1640 (ПанЭко), с 10% -ной FBS (Biosera) с добавлением 2 mM L-глутамина (ПанЭко), 100 мг/мл пенициллина/стрептомицина (ПанЭко) при 37°C и 5% CO₂ атмосфере. Пересев клеток осуществляли 1 раз в 2 дня, используя 1 мл 0,25% раствор Трипсин-Версена. За 2 дня до проведения экспериментов с применением метода флуоресцентной микроскопии, клетки рассаживали в 35 мм чашки со стеклянным дном (Corning).

2.2.2. *Трансфекция эукариотических клеток*

Временную трансфекцию клеток линии HeLa Kyoto проводили плазмидами, содержащими гены биосенсоров HyPer7, SynHer3S и SoNar, с помощью липофильного трансфекционного агента FuGENE HD (Promega), следуя инструкции производителя.

2.2.3. *Получение смешанной гиппокампальной культуры*

Культуру гиппокампальных нейронов выделяли из 17-дневных эмбрионов мышей линии C5BL/6, согласно протоколу [244]. Эвтаназию мышей проводили методом цервикальной дислокации. Эмбрионы извлекали через отверстие в брюшной полости, далее очищали их от оболочек и помещали в раствор HBSS/HEPES, декапитировали с помощью ножниц и пинцетов, открывая таким образом доступ к мозгу. Под бинокулярными микроскопом удаляли мозжечок, обонятельные доли и продолговатый мозг, с помощью пинцетов разделяли полушария. Каждое полушарие очищали от оболочек и промежуточного мозга [244]. Гиппокампы вырезали и помещали в 15 мл фалькон (Falcon, Eppendorf), предварительно заполненный раствором HBSS/HEPES. Полученные гиппокампы дважды промывали раствором HBSS/HEPES и далее инкубировали в 1 мл 0,25% растворе трипсина с ДНКазой (Thermo Scientific™) при 37°C в течение 15 минут. По окончании инкубации реакцию останавливали 3 мл ростовой среды MEM full. Далее полностью отбирали жидкость из пробирки и ресуспендировали ткань в 1 мл MEM full. Полученную клеточную суспензию пропускали через сеточку (d = 40 мкм). Подсчет количества клеток проводили с помощью камеры Горяева. Клеточную суспензию разбавляли до конечной концентрации $1,5 \cdot 10^6$ клеток/мл и переносили по 10 мкл на чашки со стеклянным дном, которые предварительно покрывали раствором Poly-D-Lysine (0,1 мг/мл). Далее в культуральные

чашки через 60 минут добавляли 2 мл среды. Затем каждые 2-3 дня заменяли треть среды на новую. На 5 день культуру трансдуцировали аденоассоциированными вирусными частицами [244].

Смешанную культуру первичных нейронов гиппокампа мыши культивировали в минимальной основной среде (MEM, Sigma), содержащей пенициллин/стрептомицин (1%, Gibco), эмбриональную бычью сыворотку (FBS, 5%, BioloT), HEPES (10 мМ, ПанЭко), D-глюкозу (0,6%, Helicon), бикарбонат натрия (2 г/л, Dia-M), GlutaMax (1%, Gibco) и добавку B27 (2%, Gibco) при 37 °С в 5% CO₂ и засев на 35-мм стекло покровные стекла, обработанные 0,1 мг/мл поли-d-лизина.

2.2.4. Трансдукция смешанной гиппокампальной культуры с помощью аденоассоциированных вирусных частиц

Для экспрессии биосенсоров в смешанной гиппокампальной культуре использовали векторы на основе AAV с клонированными генами, кодирующих биосенсоры HyPer7, SypHer3s или SoNar. Клетки инфицировали вирусными частицами при MOI 10 000 VG/клетку. Эффективность заражения полученных вирусов и уровень флуоресцентного сигнала проверяли через 2 недели после заражения.

2.2.5. Получение очищенного препарата белка

Очищенный препарат белка получали путем трансформации компетентных клеток *E.coli* штамма XL1Blue плазмидой pQE30-SypHer3S и pQE30-HyPer7-mito, согласно п.1.6.2. Через 16 часов после инкубации в термостатируемом шкафу отдельные колонии бактерий переносили в жидкую среду LB с добавлением ампициллина (100 мкг/мл) и инкубировали еще 24 часа в шейкере при комнатной температуре. Затем полученный клеточный лизат центрифугировали при 4 000 g в течение 15 минут. Полученный клеточный осадок ресуспендировали в буфере PBS (состав буфера: 137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 1.8 мМ KH₂PO₄, 10 мМ Na₂HPO₄, pH 7.4) до итогового объема суспензии – 30 мл. Для редокс-чувствительных белков к буферному раствору PBS добавляли 5 мМ 2-меркаптоэтанола. Далее проводили соникацию (Sonic Vibra cell) клеточной суспензии в течение 30 минут, согласно программе: цикл «5:10» с амплитудой 32%. После чего, полученный клеточный лизат центрифугировали при 20 000g при 4°С в течение 25 минут.

Дальнейшую очистку клеточного лизата проводили с помощью металл-аффинной хроматографии с использованием специальных колонок с носителем Talon Metal Affinity Resin, Clontech согласно рекомендациям производителя [245].

2.2.6. pH - калибровка флуоресцентного сигнала биосенсора SypHer3S

Флуоресцентный сигнал биосенсора SypHer3s переводили в конкретные значения внутриклеточного pH для экспериментов *in vivo*. Для получения калибровочной кривой флуоресцентного сигнала от биосенсора SypHer3S мы измеряли значения сигнала на очищенном препарате белка в растворе с точно заданными значениями pH в диапазоне 5,0–11,0 с помощью установки, регистрирующей сигнал в мозге животных, при тех же настройках. В этих экспериментах длинная часть волоконного зонда была соединена с его более коротким имплантируемым аналогом, который закрепляли на микрометрическом столике. Наконечник имплантируемого волоконного зонда погружали в кювету, содержащую чистый буферный раствор при комнатной температуре, и измеряли фоновые сигналы для обеих длин волн возбуждения, 405 и 490 нм. Состав pH-стандартных буферных растворов: pH = 5.0 (Na₂HPO₄ – 0.64 mM, KH₂PO₄ – 66.02 mM); pH = 5.5 (Na₂HPO₄ – 2.60 mM, KH₂PO₄ – 64.06 mM); pH = 6.0 (Na₂HPO₄ – 8.07 mM, KH₂PO₄ – 58.59 mM); pH = 6.5 (Na₂HPO₄ – 20.87 mM, KH₂PO₄ – 45.80 mM); pH = 7.0 (Na₂HPO₄ – 40.81 mM, KH₂PO₄ – 25.86 mM); pH = 7.5 (Na₂HPO₄ – 56.82 mM, KH₂PO₄ – 9.87 mM); pH = 8.0 (Na₂B₄O₇ – 27.93 mM, HCl – 44.14 mM); pH = 8.5 (Na₂B₄O₇ – 31.13 mM, HCl – 37.74 mM); pH = 9.0 (Na₂B₄O₇ – 42.80 mM, HCl – 14.40 mM); pH = 9.5 (Na₂B₄O₇ – 39.50 mM, NaOH – 21.00 mM); pH = 10.0 (Na₂B₄O₇ – 29.50 mM, NaOH – 41.00 mM); pH = 10.5 (Na₂B₄O₇ – 26.40 mM, NaOH – 47.20 mM); pH = 11.0 (Na₂B₄O₇ – 25.00 mM, NaOH – 50.00 mM). Оптическое волокно погружали в раствор очищенного белка с концентрацией ($C \approx 500$ nM) в буферный раствор с точно известным значением pH. Флуоресцентный сигнал регистрировали не менее 60 секунд.

2.2.7. Проведение биохимических анализов тканей мозга после МСАО

Подготовка ткани

Биохимические тесты проводили с тканью головного мозга крыс, которым была проведена временная МСАО. Животных разделили на 2 экспериментальные и 1 контрольную группу. Каждая группа включала в себя по 3 животных, которым проводили левостороннюю МСАО. Биохимический анализ ткани проводили через 0, 14 и 24 часа после окклюзии средней мозговой артерии. Головной мозг животных извлекали и удаляли мозжечок и обонятельные луковицы [246]. Ткань помещали в 1,5 мл пробирки типа Эппендорф с завинчивающимися крышками и помешали в емкость, предварительно заполненную жидким азотом. Далее полученный материал хранили при температуре -80°C до начала проведения биохимического теста.

Измерение концентрации белка в препаратах тканей мозга

Концентрацию белка определяли с помощью коммерческого набора (Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit, Sigma-Aldrich, Германия) в соответствии с инструкцией производителя [246]. Спектры поглощения образцов измеряли на приборе Tecan Reader Infinite® 200 PRO (Швейцария) при длине волны 562 нм [246].

Измерение активности миелопероксидазы в тканях мозга крыс

Измерение активности МПО в образцах ткани мозга проводили с использованием колориметрического коммерческого набора, согласно инструкции производителя (Abscam, ab105136 Myeloperoxidase Activity Assay Kit (Colorimetric)). Спектры поглощения измеряли с помощью планшетного ридера Tecan Reader Infinite® 200 PRO при длине волны 412 нм (Швейцария).

2.3. Регистрация динамики биохимических параметров *in vitro*

2.3.1. Установка для создания условий гипоксии/реоксигенации

Для регистрации биохимических процессов в клетках в состоянии гипоксии и последующей реоксигенации мы использовали инвертированный флуоресцентный микроскоп Nikon Eclipse Ti2, оснащённый газовым мини-инкубатором (TC-MIS, Bioscience tools), в который помещали чашку с исследуемыми клетками. К чашке подводили трубки с оксигенированным и деоксигенированным растворами, подача которых регулировалась с помощью зажимов. К другой стороне чашки с клетками подводили трубку для удаления перфузионного раствора, соединённую с аспиратором (BioSan FTA-1). В качестве перфузионного раствора использовали раствор Кребса-Рингера (120 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, 25 мМ Na₂CO₃, 5.5 мМ HEPES, 1 мМ D-глюкоза, pH 7.2-7.4). В резервуар с контрольным раствором подавали газовую смесь, состоящую из 5% CO₂ и 95% воздуха, в то время как в раствор для гипоксии подавали 5% CO₂ и 95% N₂. Подачу смеси газов осуществляли при помощи газовых контроллеров (CO₂-O₂-MI, Bioscience Tools). Содержание кислорода в растворах контролировали при помощи мультиканального оксиметра (Multi-Channel Oxygen Meter OXY-4 SMA (G3), PreSens Precision Sensing GmbH), соединённого с оптическими волокнами, регистрирующими сигнал от флуоресцентных сенсоров кислорода (FTC-PSt3, PreSens Precision Sensing GmbH) и программы PreSens Measurement Studio 2 (PreSens Precision Sensing GmbH) [247], установленной на компьютере. Сенсоры кислорода были установлены в обоих резервуарах с перфузионными растворами: в трубке, подающей деоксигенированный раствор в чашку, и в трубке, удаляющей раствор из чашки с клетками. Таким образом контролировали уровень кислорода в растворах непосредственно перед подачей на клетки и сразу после выхода из чашки.

Одновременно с подачей деоксигенированного раствора в мини-инкубатор подавали N_2 , вытесняя O_2 из внешней среды вокруг чашки. Более подробное описание представлено в разделе: «Результаты и обсуждение».

2.3.2. Исследование динамики концентрации H_2O_2 и pH в первичной гиппокампальной культуре клеток в условиях гипоксии/реоксигенации

За один час до начала эксперимента клеточную среду в чашках заменяли на буфер для флуоресцентного микроскопии – KRS (Krebs-Ringer Solution), содержащий 10 мМ D-глюкозы. Съемку проводили с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа (Nikon Ti2). В данной работе мы использовали флуоресцентные биосенсоры SoNar, HyPer7 и SynHer3s, для которых характерно два пика в спектре возбуждения флуоресценции с максимумами 420 нм и 490 нм. Таким образом, микроскопию мы проводили в двух каналах (F420 и F490), соответствующих двум длинам волн возбуждения флуоресценции. Сигнал таких биосенсоров определяется соотношением интенсивностей флуоресценции, независимо возбуждаемой в двух каналах (например, F490/F420).

2.4. Оптоволоконная регистрация динамики биохимических параметров *in vivo* и *ex vivo*

2.4.1. Микроинъекция вирусных частиц в область стриатума и коры головного мозга крысы.

В работе использовали животных обоего пола весом не более 280 г. Крыс анестезировали 2% изофлураном с помощью системы низкпоточной анестезии SomnoSuite (Kent Scientific, США). Голову животного фиксировали с помощью стереотаксической установки, после чего под кожу в место предполагаемого разреза вводили 0,25% бупивакаин (Бупивакаин раствор для инъекций 5 мг/мл 4 мл ампулы, 5 шт.). После разреза кожи соскабливали все прозрачные перикраниальные ткани и тщательно высушивали поверхность костей черепа. Два небольших фрезевых отверстия (0,4 мм) делали в черепе животных с помощью моторизованного бора под стереотаксическим контролем (цифровой стереотаксический инструмент, Stoelting Co) на 0,9 мм кзади от брегмы и 4,0 мм билатерально от срединной линии. Иглу 33G медленно вводили в каждое трепанационное отверстие на глубину 5,2 мм ниже поверхности черепа и медленно вводили 1 мкл суспензии AAV9 в область хвостатого ядра головного мозга с помощью 5-мкл шприца Hamilton, соединенного со стереотаксическим инжектором (Stoelting Co). После окончания инъекций в каждое отверстие с помощью стереотаксического манипулятора медленно вводили имплантируемые фибровые зонды и фиксировали керамические ферулы на поверхности черепа с помощью светоотверждаемого стоматологического композита (DentLight-Flow A3,

Vladmiva). Два костных анкерных винта вводили в дополнительное отверстие диаметром 1 мм, просверленное в задней части черепа. После чего, винты и ферулы с оптическим волокном крепили акриловым стоматологическим цементом (Stoelting Co.). По окончании операции проводили дополнительное обезболивание животного путем введения (5 мг/кг п/к) кетопрофена.

2.4.2. Проведение хирургической операции по окклюзии средней мозговой артерии

Окклюзия средней мозговой артерии является самой широко используемой экспериментальной моделью ишемии головного мозга. Данная процедура подразумевает проведение хирургической операции, в ходе которой перекрывается ствол общей сонной артерии. Среднюю мозговую артерию перекрывали с помощью специального окклюдера для грызунов, размер которого подбирали в соответствии с весом экспериментального животного. Окклюдер вводили через внутреннюю сонную артерию.

Упрощенная схема операции представлена на рисунке 15.

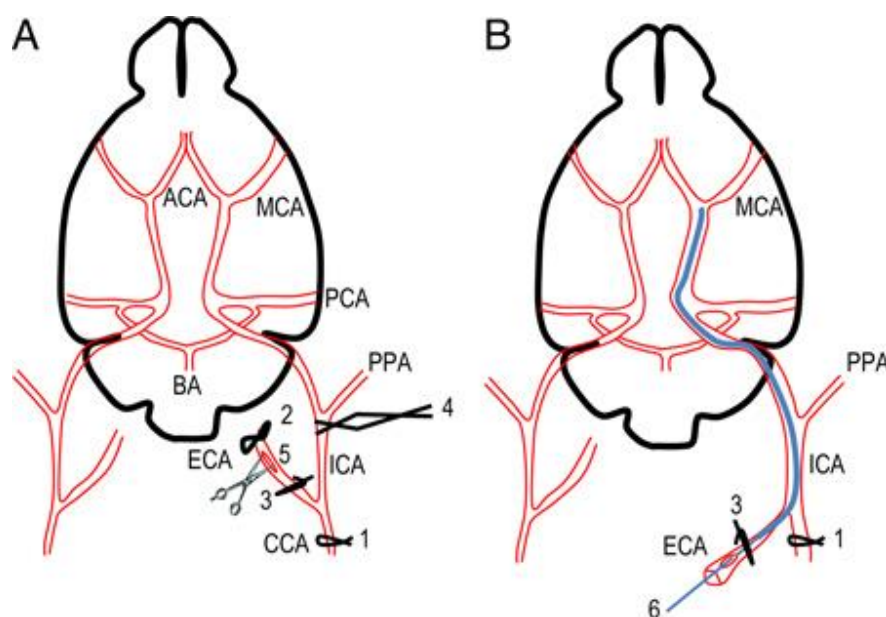


Рисунок 15. Модель окклюзии средней мозговой артерии. Упрощенная схема кровеносной системы головы крысы с введенным через внутреннюю сонную артерию силиконовым филаментом в область средней мозговой артерии (MCA). **А.** До введения окклюдера. **В.** После введения окклюдера. Ветви затылочной артерии (occipital artery - OA) и верхней щитовидной артерии (superior thyroid artery - ST) были перевязаны. (anterior cerebral artery (ACA) - передняя мозговая артерия; basilar artery (BA) - базилярная артерия; common carotid artery (CCA) - общая сонная артерия; external carotid artery (ECA) - наружная сонная артерия; internal carotid artery (ICA) - внутренняя сонная артерия; posterior cerebral artery (PCA) - задняя мозговая артерия; pterygopalatine artery (PPA) - крылонебная артерия). Адаптировано из [248].

Все манипуляции с животным проводили, используя ингаляционный наркоз – изофлуран. Введение изофлурана в специальной закрытой камере начинали с 5%, после чего обездвиженное животное укладывали на подогреваемый операционный столик, к которому также подводили ингаляционный наркоз, где поддерживали его концентрацию на уровне от 2 до 2,5%. Перед началом хирургических манипуляций вводили обезболивающее кетопрофен (5мг/кг) внутривенно. Во избежание пересушивания роговицы глаза во время операции крысам наносили защитный офтальмогель (Вита-ПОС). Во время всей операции производили температурный контроль тела. В качестве местного обезболивающего использовали бупивакаин (5 мг/мл). Далее очищали зону операции путем удаления шерсти. Делали срединный разрез шеи, рассекали поверхностную фасцию, отодвигали железистую ткань, так чтобы в поле зрения находились грудно-подъязычная, двубрюшная и грудинно-ключично-сосцевидная мышцы. Не повреждая их, аккуратно устанавливали ранорасширитель так, чтобы иметь доступ для манипуляции с общим стволом сонной артерии (ССА - common carotid artery). После чего изолировали общий ствол сонной артерии и его ветви: внешнюю (ЕСА) и внутреннюю (ІСА) сонные артерии. Блуждающий нерв, идущий латерально от ССА и ІСА, аккуратно отодвигали в сторону. Далее с помощью электрического коагулятора отсекали затылочную и верхнюю щитовидную артерии от ЕСА. После чего с помощью шелковой лигатуры затягивали внешнюю сонную артерию рядом с местом бифуркации внешней и внутренней артерии. Дополнительную лигатуру подводили под внешнюю сонную артерию в зоне бифуркации, не затягивая ее. Далее устанавливали микрохирургические зажимы на ССА, ІСА и крылонебную артерию (РРА). После приостановки кровяного тока в области операции с помощью микрохирургических ножниц делали надрез во внешней сонной артерии, через который вводили коммерческий окклюдер (Docol). Его фиксировали в артерии и отмечали на филamente расстояние 20-26 мм от места утолщения. Филамент, выполняющий функцию окклюдера, вводили в надрез в ЕСА и продвигали до места бифуркации и далее перекрывали внутреннюю сонную артерию. Снимали зажим с ІСА и продвигали филамент до начала сопротивления. Далее убирали зажимы с общей сонной и крылонебной артерий и зашивали рану. Далее через 60 минут после окклюзии рану расширяли, устанавливали расширители и зажимы на внутреннюю сонную артерию и общий ствол сонной артерии и приступали к реперфузии, извлекая окклюдер, перетягивали место введения филамента, восстанавливали кровоток и зашивали рану.

2.4.3. Оптоволоконная регистрация динамики изменения рН и H₂O₂ с помощью биосенсоров SupHer3s и HyPer7 в тканях головного мозга крыс при развитии ишемического инсульта

Динамику внутриклеточного рН и H₂O₂ в структурах мозга крыс регистрировали с помощью имплантируемых оптоволоконных зондов во время ишемического инсульта в режиме реального времени. Для этого нашими коллегами из лаборатории фотоники и нелинейной спектроскопии МГУ под руководством А.М. Жёлтикова была собрана высокочувствительная установка для возбуждения и детекции флуоресцентного сигнала через гибкие оптические волокна. Оптический кабель длиной более 1 м подключается к оптическому волокну, вживленному в мозг животного, с использованием специально разработанной керамической ферулы. Другой конец длинного кабеля закрепляется в оптической схеме. Благодаря тому, что все используемые в работе биосенсоры имеют рациометрический сигнал, то съемку проводили в двух независимых каналах, каждый из которых соответствует пикам возбуждения флуоресценции. Сигнал рассчитывали, как отношение интенсивности флуоресценции, возбуждаемой при 420 нм (F420), к интенсивности флуоресценции, возбуждаемой при 500 нм (F500). В качестве источников возбуждения в собранной установке использовали мощные светодиоды с длинами волн излучения 405 и 490 нм. Излучение светодиодов коллимировалось линзой с фокусным расстоянием F=50 мм, после чего сводилось с помощью полосового установленного под углом интерференционного фильтра (Chroma ET480/20x). Затем излучение разделялось делителем 50/50 на 2 одинаковых канала, после чего отражалось дихроичным зеркалом DMLP490 на объектив Olympus 20x и фокусировалось в оптическое волокно. Флуоресцентный сигнал, доставленный из клеток мозга, коллимировался тем же объективом, после чего, пройдя через дихроичное зеркало, детектировался фотоэлектронным умножителем (ФЭУ). Перед каждым ФЭУ были установлены интерференционные фильтры (FES0600 и FELH500) для выделения спектральной полосы регистрации 500–600 нм. В режиме непрерывного излучения, выходящая из волокна мощность составляла около 5 мкВт для каждого из источников. Для контроля стабильности мощности диодов малая доля излучения отражалась пленочным делителем пучка на фотодиод. Изменения мощности никогда не превышали 2% за время эксперимента. Для измерения флуоресцентного сигнала при разных длинах волн возбуждения, светодиодные источники включались поочередно в импульсном режиме со скважностью 20%. При этом частота следования импульсов составляла 111 Гц, таким образом, длительность импульса составляла около 2 мс, при периоде 9 мс. В это время происходило считывание флуоресцентного отклика. Также, в каждый период в течение 1 мс производилось считывание фонового сигнала при выключенных источниках. Для получения одной точки сигнал

накапливался в течение 200 мс. Все измерения производились сериями: временная динамика записывалась в течение 1 минуты, после чего измерения прекращались на 4 минуты. С учетом скажности импульсов и длительности измерений в сериях, средняя мощность накачки составляла не более 0,7 мкВт. Наблюдение временной динамики в пределах минутного интервала позволило сделать вывод об отсутствии случайных выбросов и артефактов измерения, после чего мы вычисляли среднее значение сигнала на интервале. Все указанные параметры съемки были подобраны экспериментально, так как было важно зафиксировать стабильный сигнал и при этом не допустить выгорания биосенсора.

2.4.4. Ex vivo тест HyPer7 в тканях головного мозга

Животное, в стриатуме головного мозга которого экспрессировался ген, кодирующий биосенсор HyPer7, умерщвляли избыточной концентрацией изофлурана с последующим смещением шейного отдела позвоночника. Далее животное обезглавливали, извлекали головной мозг и делали 2 мм поперечные срезы, которые далее помещали в чашку Петри. Радиометрический флуоресцентный сигнал регистрировали в тех же условиях, что и в экспериментах *in vivo*. Далее в чашку Петри добавляли растворы H₂O₂ в конечных концентрациях 10 мМ и 30 мМ. В результате чего добивались насыщающей концентрации H₂O₂, при которой радиометрическое изменение сигнала достигало максимума и не менялось при последующих добавках.

2.5. Мультифотонная микроскопия с использованием pH-биосенсора SypHer3s

Многофотонная микроскопия проводилась на специально сконструированном лазерном сканирующем микроскопе Thorlabs нашими коллегами из лаборатории фотоники и нелинейной спектроскопии МГУ под руководством А.М. Жёлтикова. Схема установки представлена на рисунке 16.

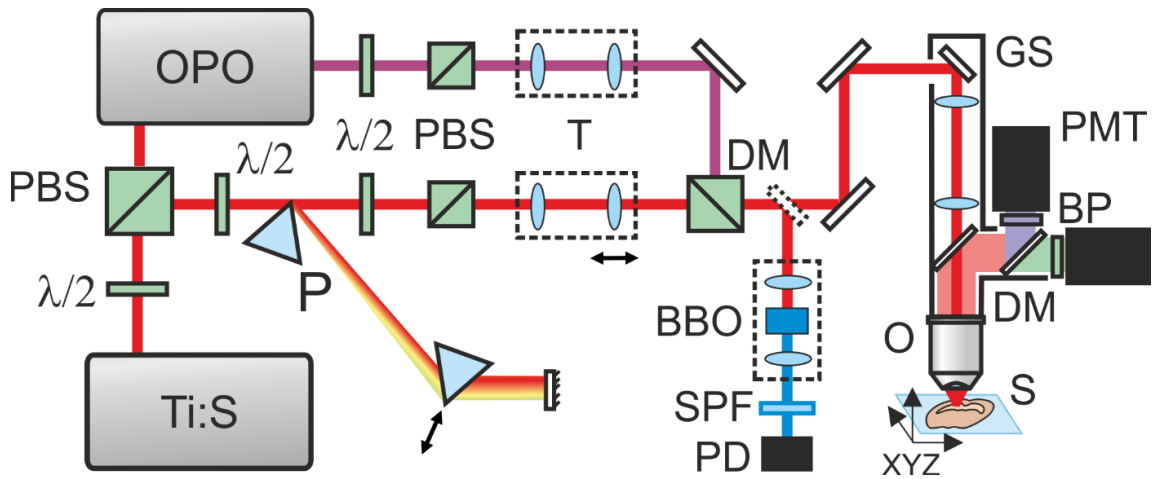


Рисунок 16. Схема экспериментальной установки: *Ti:S*, *Ti:Sapphire* лазер; *OPO*, параметрический генератор света; $\lambda/2$, полуволновая пластинка; *PBS*, поляризационный делитель света; *P*, призма; *T*, телескоп; *DM*, дихроичное стекло; *BBO*, кристалл бората бария; *SPF*, высокочастотный фильтр; *PD*, фотодиод; *GS*, гальваносканер; *PMT*, фотоэлектронный умножитель; *BP*, полосовой фильтр, *O*, объектив, *S*, образец.

Фокусировка излучения в образец осуществляли при помощи ИК объектива XLUMPlanFLN 20x NA1.00 (Olympus). Сигнал двухфотонной флуоресценции, вырезаемый спектральным фильтром в диапазоне 500–540 нм, записывался в обратном направлении с помощью ФЭУ Н7422РА-40. Для настройки лазерной системы в качестве тестового образца использовали полистироловые шарики диаметром 0.5 мкм. Более подробная схема установки описана статье, опубликованной в журнале *Journal of Biophotonics* [249].

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На сегодняшний день существует большое количество подходов изучения изменений биохимических параметров в тканях мозга животных при развитии ишемического инсульта. К классическим подходам относят измерения различных параметров с помощью биохимических тестов [159,160] на выделенных образцах тканей, гистологическое окрашивание срезов мозга [130]. Использование данных подходов не позволяет наблюдать за развитием изменений интересующих параметров клеток мозга в динамике. Кроме того, процедуры извлечения головного мозга животных и получение образцов в виде гомогенатов тканей или срезов сами по себе ведут к изменению внутриклеточных параметров, что может приводить к ошибкам в интерпретации получаемых результатов. Особенно это актуально в случае быстро протекающих биологических процессов, в частности, связанных с редокс-реакциями. Несмотря на существующие ограничения благодаря этим подходам к настоящему времени получена большая часть всех имеющихся данных о морфологических и биохимических изменениях тканей мозга при ишемическом инсульте.

За последние десятилетия появились подходы, позволяющие прижизненно регистрировать изменения клеточных параметров в тканях мозга при различных патологических процессах. Это прежде всего методы на основе позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) [250] и магнитно-резонансной томографии (МРТ) [166,251]. ПЭТ представляет собой радионуклидный томографический метод, основанный на регистрации пары гамма-квантов, которые возникают при аннигиляции позитронов с электронами. В свою очередь позитроны образуются при позитронном бета-распаде радионуклида, входящего в состав радиофармпрепарата, который вводится в организм перед исследованием [252]. В отличие от ПЭТ, принципы метода МРТ основаны не на регистрации ионизирующего излучения, а на явлении ядерно-магнитного резонанса. МРТ представляет собой информативный метод для получения томографических изображений внутренних органов, в частности, головного мозга, не требующий инвазивного вмешательства в живой организм [253].

Мощнейший инструментарий в нейробиологических исследованиях представляют оптические методы, которые успешно применяют на лабораторных животных. При их реализации животным проводят регистрацию *in vivo* морфологических и биохимических изменений посредством имплантированных волокон в глубокие ткани мозга или через краниальные окна для наблюдений событий в коре [254–257]. В подобного рода исследованиях активно используют синтетические индикаторы, спектральные характеристики которых изменяются при определенных условиях, например, при взаимодействии с интересующим соединением в образце [181,182]. Однако применение синтетических красителей в условиях *in*

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. 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 [187,243,258]. 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 [259]. Таким образом, динамика флуоресцентного сигнала такой молекулы отражает динамику исследуемого параметра, например, изменение концентрации соединения, с которым взаимодействует сенсорная часть биосенсора [259].

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 [215,224,225,247,260–264].

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 [224] 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 [213]. 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 SynHer3s [232]. Известно, что многие патологические состояния, сопровождающиеся глобальными метаболическими изменениями, влияют на значение рН внутриклеточной среды.

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

Адресная доставка генов с помощью вирусных частиц является одним из самых эффективных способов, при котором можно добиться долговременной или даже постоянной экспрессии интересующего гена в различных клетках и тканях экспериментальных животных. Вирусы попадают в клетки хозяина, связываясь с их рецепторами, и доставляют, таким образом, свой геном. Данный механизм транспорта генов активно применяют в качестве инструмента во многих медико-биологических исследованиях, а также при генной терапии [265]. На сегодняшний день доступны различные вирусные системы для решения разнообразных исследовательских задач. В современных исследованиях активно используют следующие типы вирусов: лентивирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы и гибридные системы. При работе с лабораторными животными в основном используют системы на основе аденоассоциированных (AAV) вирусов [265], поскольку они являются безопасными и эффективными инструментами доставки генов. Известно, что AAV не патогенны [266] и не

вызывают сильного иммунного ответа у человека и животных. Кроме того, AAV могут инфицировать не только делящиеся клетки, но и неделящиеся, что значительно увеличивает эффективность их трансдукции.

Геном дикого типа и рекомбинантных AAV состоит из линейной одноцепочечной ДНК, фланкированной палиндромными инвертированными концевыми повторами (Inverted Terminal Repeat - ITR), которые необходимы для упаковки фрагмента ДНК в вирусный капсид (рис. 17). Недостатком систем на основе AAV является их относительно небольшая емкость - около 4.7 тысяч пар нуклеотидов (включая два ITR элемента по 145 пар нуклеотидов каждый), что представляет собой существенное ограничение их использования [267]. Поэтому при использовании AAV необходимо учитывать размеры используемых конструкций. Биосенсоры на основе одного флуоресцентного белка чаще всего имеют небольшие размеры – около 1.5 тысяч пар нуклеотидов, что характерно и для используемых в нашей работе биосенсоров NuPer7, SypHer3s, SoNar. Однако помимо целевого гена между ITR элементами вирусного вектора должна быть также встроена последовательность промотора, определяющего специфичность экспрессии гена.

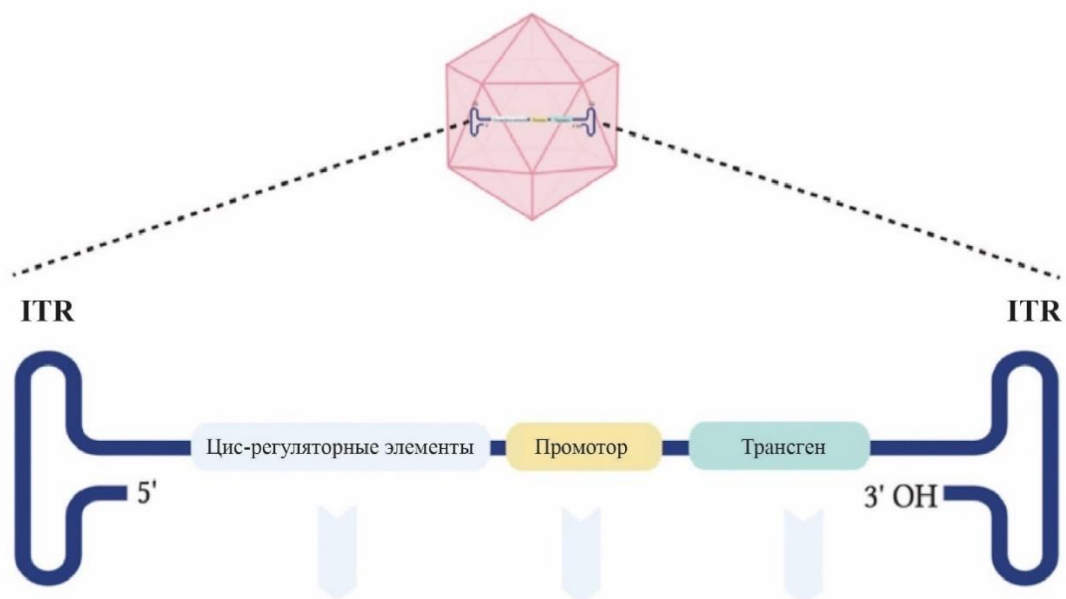


Рисунок 17. Схема строения генома AAV. Адаптировано из[268].

Для постоянной высокоэффективной экспрессии генов для большинства типов клеток часто используют CMV (цитомегаловирусный) промотор с энхансером, EF1a (фактор элонгации 1a), SV40 (simian virus 40), chicken β -actin и CAG (CMV, chicken β -actin, rabbit β -globin) [269]. В данной работе мы исследовали динамику некоторых биохимических процессов в клетках мозга,

поэтому использовали специфичные промоторы GFAP (промотор глиального фибриллярного кислого белка) [270] для экспрессии гена нужного биосенсора в астроцитах и нейрональный синапсиновый промотор hSyn1 [271] для экспрессии в нейронах. hSyn1 характеризуются высокой специфичностью, однако является низкопроизводительным. Поэтому мы усилили его эффективность вставкой CMV энхансера. Суммарный размер полученной нейрональной конструкции не превосходил допустимый для вставки в AAV. Однако суммарный размер астроцитарного GFAP промотора (2.2 тыс. пар нуклеотидов) вместе с целевым геном биосенсора (около 1.5 тыс. пар нуклеотидов) превышает емкость вирусного вектора. Для того чтобы последовательность между ITR не превышала 4.8 тыс. пар нуклеотидов, мы использовали укороченную версию GFAP промотора. Согласно исследованию, проведенному Lee и соавторами, использование укороченной версии GFAP промотора длиной 680 п.н. [gfaABC(1)D] может обеспечивать даже более высокий уровень экспрессии без потери специфичности [272].

Для того, чтобы локализовать молекулы биосенсора в определенных внутриклеточных компартментах, применяют сигнальные полипептидные последовательности, которые добавляют к N – или C-концам биосенсора на уровне гена. В данной работе помимо регистрации параметров в цитозоле, мы также регистрировали события в матриксе митохондрий. Для локализации в этом компартменте к N-концу белка добавляли митохондриальную сигнальную последовательность (duplicated mitochondrial targeting sequence - MTS2)[273].

Таким образом, нами были получены AAV вирусные вектора, содержащие гены выбранных биосенсоров, промоторы для их специфичной экспрессии в нейронах и астроцитах, а также сигнальную последовательность для получения в некоторых случаях версий с локализацией в митохондриальном матриксе (рис.18).

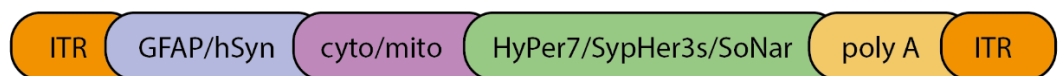


Рисунок 18. Схема генетических конструкций для аденоассоциированных вирусных частиц. На схеме ITR - инвертированные концевые повторы, GFAP – промотор, специфичный для астроцитов, hSyn1 – промотор, специфичный для нейронов; mito – митохондриальная сигнальная последовательность MST2, позволяющая локализовать 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 pH, SoNar – генетически кодируемый флуоресцентный биосенсор для измерения соотношения НАД⁺/НАДН, polyA – поли (А) хвост.

На следующем этапе мы приступили к анализу и выбору серотипа вирусных частиц. На сегодняшний день описано более 100 серотипов AAV [274]. Серотип определяется хелперными плазмидами, кодирующими гены белков капсида. Каждый серотип может инфицировать клетки многих видов тканей, но некоторые обладают повышенным тропизмом к определенным тканям. Например, широко используемый серотип 2 (AAV2) заражает клетки печени, мышц, легких и центральной нервной системы с умеренной эффективностью [275]. AAV9 демонстрирует схожий с AAV2 профиль трансдукции, хотя и с гораздо более высокой эффективностью [275]. AAV1 и AAV7 с большей эффективностью заражают клетки скелетных мышц [276]. Кроме того, часто используют гибридные системы. Известно, что гибриды некоторых серотипов обладают меньшей иммуногенностью и вызывают меньше негативных эффектов при генной терапии [277].

AAV разных серотипов не обладают уникальной селективностью по отношению к нейронам или астроцитам, однако есть сведения, что AAV8 естественным образом с большей эффективностью заражает астроциты [278], в то время как AAV-1, AAVrh-10, AAVhu-11 преимущественно заражают нейроны [279]. AAV5, AAV9 одинаково хорошо заражают как нейроны, так и астроциты. При этом, специфичные нейрональные и астроцитарные промоторы позволяют добиться эффективной направленной экспрессии нужного гена в рассматриваемых типах клеток [280]. Для реализации поставленных нами задач мы выбрали серотип AAV9, который отвечает всем необходимым требованиям и демонстрирует, по данным из других работ, высокую эффективность заражения. Кроме того, было показано, что AAV9 обладает наилучшим распределением по всей ЦНС за счет ретроградного и антероградного транспорта, а также прохождением через ГЭБ [274].

В результате были получены вирусные частицы AAV9 с генами биосенсоров SoNar, SynHer3S, NuPer7. 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 флуоресценции клеток с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ti2 (рис. 19). Все используемые в работе биосенсоры основаны на круговом пермутанте желтого флуоресцентного белка (сrYFP), для которого характерны два пика в спектре возбуждения флуоресценции с максимумами в области 420 нм и 490 нм и один пик в спектре эмиссии в области 520 нм. Таким образом, сигнал данных биосенсоров является ратиометрическим, и регистрация флуоресценции проводится в двух независимых каналах возбуждения: F420 и F490. Сигнал рассчитывается, как соотношение интенсивностей флуоресценции, полученных при независимом возбуждении хромофора длинами волн 420 нм и 500 нм – F490/F420.

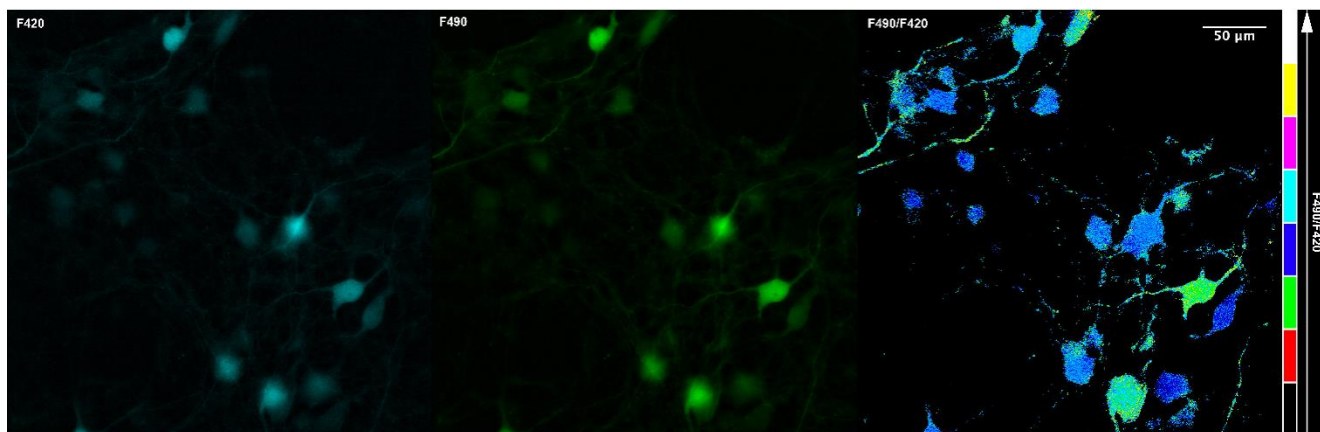


Рисунок 19. Первичная культура клеток, выделенная из гиппокампа эмбрионов мыши, экспрессирующая ген биосенсора *SypHer3s* в цитоплазме нейронов через 2 недели после трансдукции вирусными частицами *AAV-hSyn1-SypHer3S*. Сигнал pH-биосенсора представлен в разных флуоресцентных каналах (слева направо: циановый - 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.

3.2. 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*.

Схема фотофизического процесса, описывающего двухфотонное возбуждение хромофора *SypHer3s*, представлена на рисунке 20А. В хромофоре *srYFP* находится остаток тирозина (Tyr), который может находиться как в протонированной (нейтрально-фенольная), так и в депротонированной форме (анионно-фенолятная форма) [281,282]. Эти две формы хромофора на спектрах однофотонного возбуждения флуоресценции представлены в виде выраженных пиков с максимумами около 420 нм и 490 нм, соответствующих протонированному и

депротонированному состояниям хромофора [281,282]. Данный хромофор имеет один максимум эмиссии в области 500 нм, этот максимум соответствует депротонированной форме хромофора, возбуждаемой при 490 нм. При этом в результате возбуждения протонированной формы хромофора при 420 нм происходит изменение кислотности гидроксильной группы тирозина и протон акцептируется аминокислотным окружением хромофора. Этот процесс называется сверхбыстрым переносом протона в возбужденном состоянии - (excited-state proton transfer - ESPT) [283]. Таким образом, независимо от того, какая из форм хромофора поглотила квант света, излучающей формой является фенолят-анион. В случае с двухфотонным возбуждением хромофора происходят эти же процессы с той лишь разницей, что хромофор одновременно возбуждается двумя фотонами более длинноволнового света (рис. 20А).

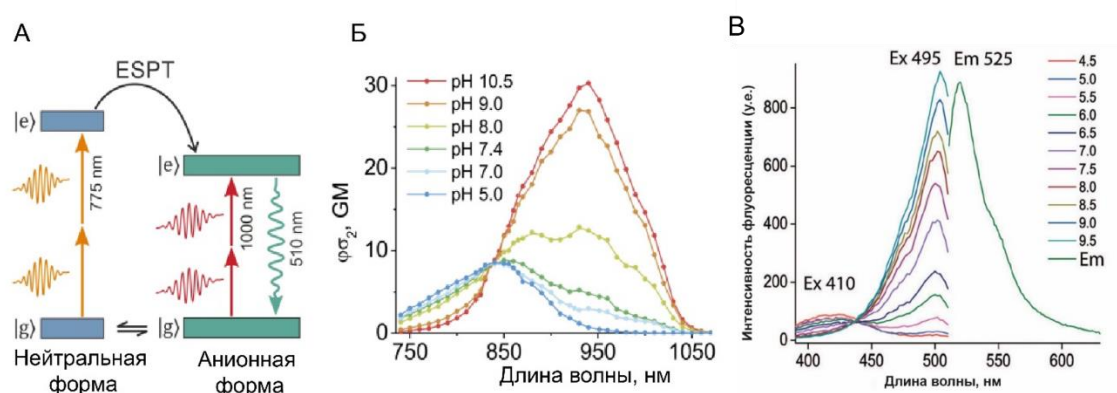


Рисунок 20. Спектральные характеристики pH-биосенсора SypHer3s. А. На схеме представлены протонированное и депротонированное состояния хромофора, при переходе в возбужденное состояние происходит одновременное поглощение двух фотонов (оранжевые и красные вертикальные стрелки). Процесс переноса протона в возбужденном состоянии (ESPT) показан черной стрелкой. Зеленая волнистая линия означает процесс излучения анионной формой хромофора. Б. Спектр двухфотонного возбуждения флуоресценции pH-биосенсора SypHer3s (Опубликовано в [249]). В. Спектр однофотонного возбуждения флуоресценции pH-биосенсора SypHer3s [232].

Для тестирования биосенсора SypHer3s 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. Концентрация белка во всех пробах была одинаковой (500нМ) (рис.20 Б). В результате мы обнаружили, что спектры двухфотонного и однофотонного возбуждения флуоресценции pH – биосенсора SypHer3s значительно различаются (рис.20 Б, В).

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. Для этого мы протестировали биосенсор SypHer3s в двухфотонном режиме возбуждения флуоресценции в живых клетках HeLa Kyoto (рис.21 А). В данных экспериментах мы использовали смесь ионофоров нигерицина и монензина, которые перфорируют клеточную мембрану, что позволяет быстро изменять pH внутриклеточной среды. Для этого клеткам заменяли питательную среду на буфер с заданным значением pH, благодаря перфорациям в клеточной мембране между внутриклеточной средой и внешним раствором быстро достигается равновесие. В результате кривые pH-титрования, полученные для SypHer3s в двухфотонном режиме *in vitro* и в живых клетках, полностью совпали. Мы также протестировали SypHer3s в данном режиме регистрации pH в целостных клетках на примере HeLa Kyoto (рис.21А) и нейронах мыши в первичной гиппокампальной культуре (рис.21Б). Один из способов быстро изменить pH в клетках – добавление лактата в среду, поскольку перенос лактата в клетки монокарбоксилатными транспортерами сопровождается симпортом протона [284]. Действительно, при добавлении лактата оба типа клеток демонстрировали выраженное изменение флуоресцентного сигнала в цитоплазме при двухфотонном возбуждении. Используя полученные калибровочные кривые, значения флуоресцентного сигнала биосенсора были переведены в конкретные значения pH (рис. 21).

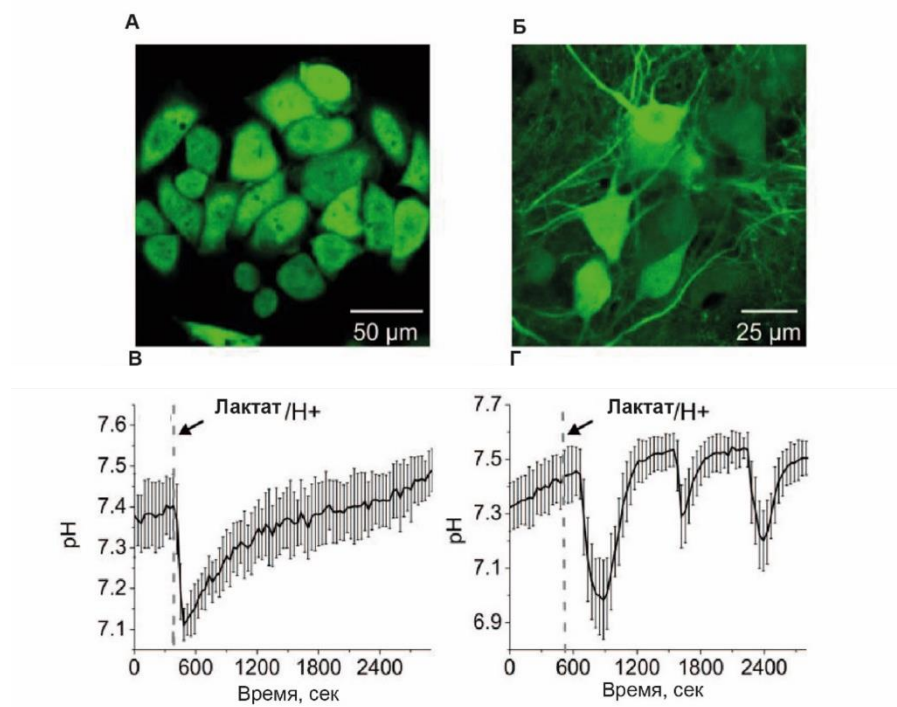


Рисунок 21. Регистрация pH с помощью pH-биосенсора SypHer3s в режиме двухфотонной микроскопии. А. Изображения клеток HeLa Kyoto с экспрессией SypHer3s в режиме двухфотонного возбуждения флуоресценции (для канала с длиной волны 775 нм); график ниже отражает динамику pH в этих клетках (усреднение по 20 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. (Опубликовано в [249]).

Благодаря высокому пространственному разрешению в биологических образцах двухфотонная микроскопия представляет огромный интерес для визуализации *in vivo*. Для тестирования SypHer3s мы инъецировали 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.22А, Б). При увеличении концентрации лактата во внешней среде мы также зафиксировали падение pH в нейронах в составе свежесыведенной ткани (рис. 22В, Г).

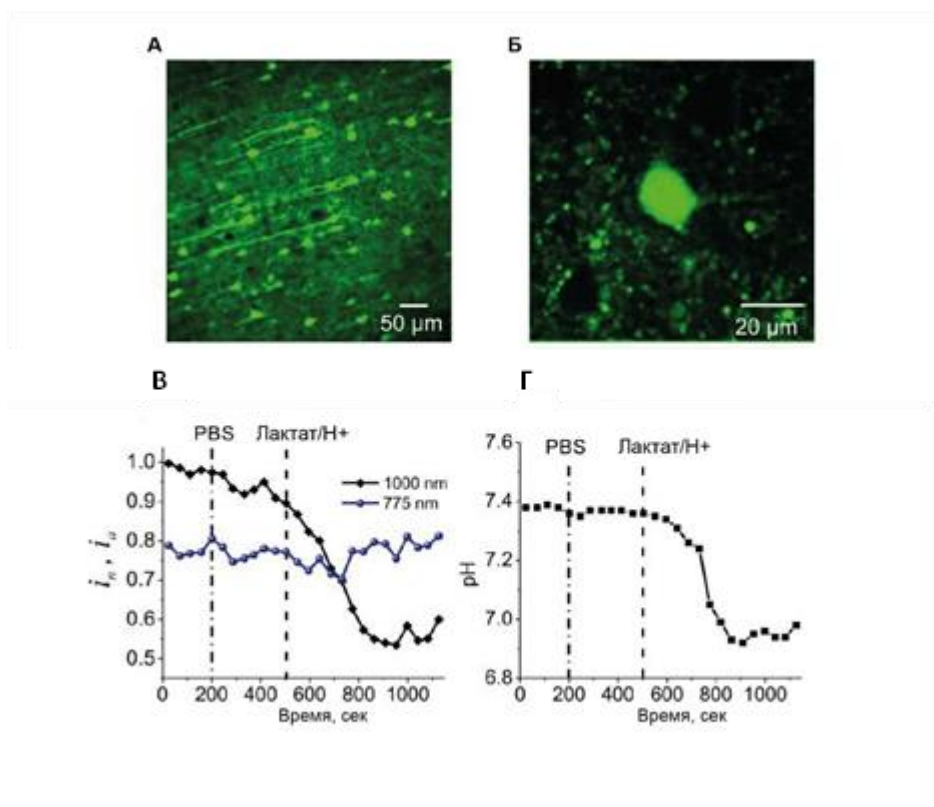


Рисунок 22. Изображения области (А) фиксированного 4% раствором параформальдегида в течение 24 часов и (Б) интактного срезов мозга крысы, нейроны которого экспрессировали ген биосенсора *SypHer3s* в режиме двухфотонного возбуждения флуоресценции. (В) Временная динамика сигнала флуоресценции при двухфотонном возбуждении сенсора *SypHer3s* в нейроне в свежесывиденном срезе мозга крысы на длинах 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 свежесывиденном 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 рН. (Опубликовано в [249]).

Мы полностью охарактеризовали свойства рН-биосенсора *SypHer3s* в режиме двухфотонного возбуждения флуоресценции в системах *in vitro*, в живых клетках и срезах тканей головного мозга крыс. Результаты наших исследований показывают, что 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 [285–287]. Поэтому использование новых биосенсоров в данном режиме микроскопии имеет огромный потенциал. В дальнейшем по отработанной методике мы планируем протестировать другие широко используемые биосенсоры.

3.3. Динамика внутриклеточной концентрации H_2O_2 , соотношения НАД⁺/НАДН и рН в первичных гиппокампальных нейронах мыши в условиях гипоксии/реоксигенации

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 регистрацией флуоресцентного сигнала исследуемого объекта. От коммерческих аналогов сконструированная нами установка выгодно отличается тем, что позволяет быстро изменять концентрацию кислорода в среде, окружающей клетки. Например, $pO_2 \sim 150$ мм рт. ст., характерное для нормального состояния культуры, в сконструированной нами установке возможно снизить до значения $pO_2 < 5$ мм.рт.ст. в течение нескольких секунд и также быстро повысить до нормальных значений. Данная установка позволила нам с высокой точностью контролировать уровень кислорода в окружении клеток. Изменение уровня pO_2 в установке обеспечено перфузионным модулем, который осуществляет постоянную подачу нормального или деоксигенированного раствора в чашку Петри. Специальные меры были приняты для того, чтобы не допустить обратного попадания кислорода из воздуха в буфер в процессе перфузии. В связи с этим мы использовали трубки из непроницаемого для кислорода материал Tygon, минимизировали количество соединений в системе, подобрали оптимальную скорость перфузионного потока. Измерение концентрации кислорода проводили как на входе, так и на выходе буфера из камеры. В результате оптимизации полученная установка позволила нам достигать условий аноксии (концентрация кислорода $< 0,05$ мг/л) в клеточной среде в течение 1–2 минут, а также проводить моментальную реоксигенацию омывающего клетки раствора. Итоговая схема созданной нами установки для моделирования гипоксии/реоксигенации представлена на рисунке 23. Перед началом эксперимента в резервуары с перфузионными растворами подавали смеси газов (для оксигенированного раствора: 5% CO_2 , 95% воздуха; для деоксигенированного раствора: 5% CO_2 , 95% N_2), добиваясь в них необходимой концентрации кислорода (~ 8.5 мг/л в оксигенированном и < 0.1 мг/л в деоксигенированном растворе). Чашку с клетками помещали в мини-инкубатор на микроскопе, устанавливали приводящие и отводящие перфузионные трубки. Далее открывали проток оксигенированного раствора и устанавливали фокус микроскопа на исследуемых клетках, после чего проводили регистрацию флуоресценции клеток в контрольных условиях в течение 10 минут. На десятой минуте перекрывали ток оксигенированного раствора и открывали ток деоксигенированного раствора, создавая условия гипоксии. Одновременно включали подачу азота в мини-инкубатор для вытеснения из него кислорода. При этом регистрировали уровень кислорода на входе в чашку – содержание кислорода в чашке с клетками снижалось до значений менее 0.05–0.1 мг/л в течение 1,5–2 минут. Регистрацию флуоресценции клеток в условиях

гипоксии проводили в течение 35 минут. Далее, перекрывали ток деоксигенированного раствора и подачу азота в камеру, открывая при этом ток оксигенированного раствора, запуская процесс реоксигенации. Регистрацию флуоресценции клеток в условиях реперфузии проводили в течение 10–30 минут. В конце эксперимента перфузию останавливали, в чашку с клетками добавляли пероксид водорода, лактат или пируват для измерения максимально возможного ответа соответствующего биосенсора в данной системе.

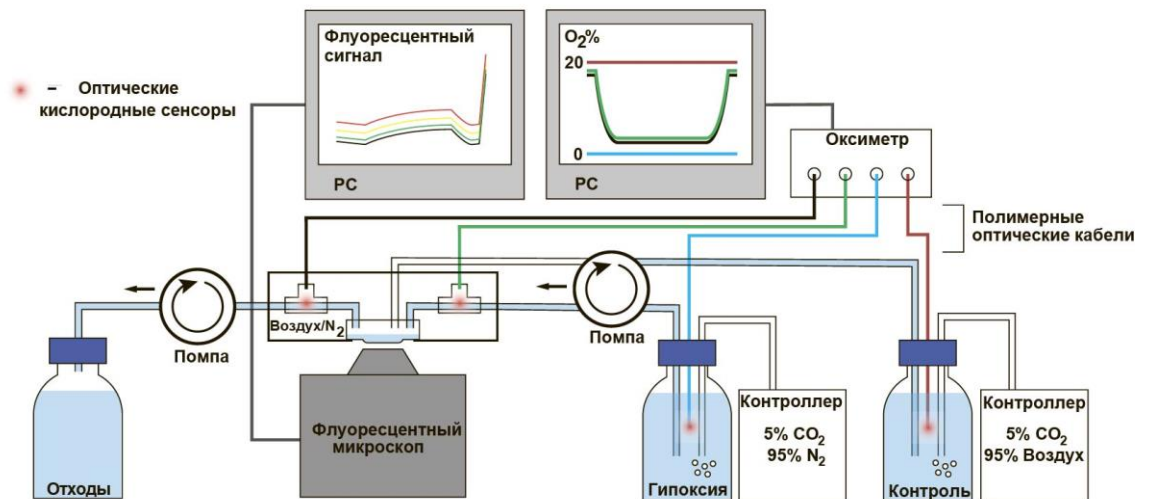


Рисунок 23. Схема созданной установки для моделирования гипоксии/реоксигенации клеточной культуры.

Перед экспериментом культуру гиппокампальных нейронов мыши заражали вирусами AAV9 с генами биосенсоров HyPer7 [224] (регистрация H₂O₂), SynHer3s [232] (регистрация pH) и SoNag [213] (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.

Внутриклеточное соотношение НАД⁺/НАДН отражает уровень оксигенации клеток. Согласно ранее полученным данным с помощью различных подходов, в том числе классических биохимических, известно, что в клетках в условиях гипоксии происходит восстановление пула НАД, который вновь окисляется при реоксигенации [288,289]. В нашем эксперименте с помощью биосенсора SoNag мы подтвердили, что эти процессы происходят и в культивируемых нейронах. 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.24 А). Известно, что

соотношение НАД⁺/НАДН находится в равновесии с метаболической парой пируват/лактат, которое поддерживается ферментом лактатдегидрогеназой [290]. Поэтому добавка в среду к клеткам лактата или пирувата, которые транспортируются монокарбоксилатными транспортерами, мгновенно отразится на соотношении НАД⁺/НАДН. Действительно, в исследуемой системе пируват приводил к резкому увеличению НАД⁺/НАДН, а последующее добавление избытка лактата – к снижению. 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. Стоит указать, что в экспериментах 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 [21]. 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 [213].

В следующей серии экспериментов мы регистрировали динамику рН в цитоплазме и митохондриях нейронов в условиях гипоксии/реоксигенации с помощью биосенсора *SypHer3s* [224]. На графиках, представленных на рисунке 24Б 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. Известно, что в условиях недостатка кислорода клетки переходят на анаэробный гликолиз, который происходит в цитозоле. В результате этого процесса накапливается лактат и образуется Н⁺ в результате гидролиза АТФ [291], что неоднократно было подтверждено экспериментальными данными [292,293]. Таким образом, глобальное закисление нейронов, вызванное гипоксией, по-видимому, начинается в цитозоле, что и отражается в динамике биосенсора *SypHer3s* в наших экспериментах.

Согласно общепринятому мнению мирового научного сообщества, АФК являются главным внутриклеточным повреждающим фактором при патологических процессах, вызванных гипоксией/реоксигенацией [294]. В ряде работ описана теория и приведены некоторые экспериментальные данные в пользу того, что в клетках образование АФК происходит во время гипоксии [295]. Другие исследователи сходятся же на том, что АФК образуются в клетках именно

в момент реоксигенации [296]. Примечательно, что несмотря на оживленные споры в этой области 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 [224]. 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.24 В). При более детальном анализе динамики HyPer7 в данной системе (рис.24 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.

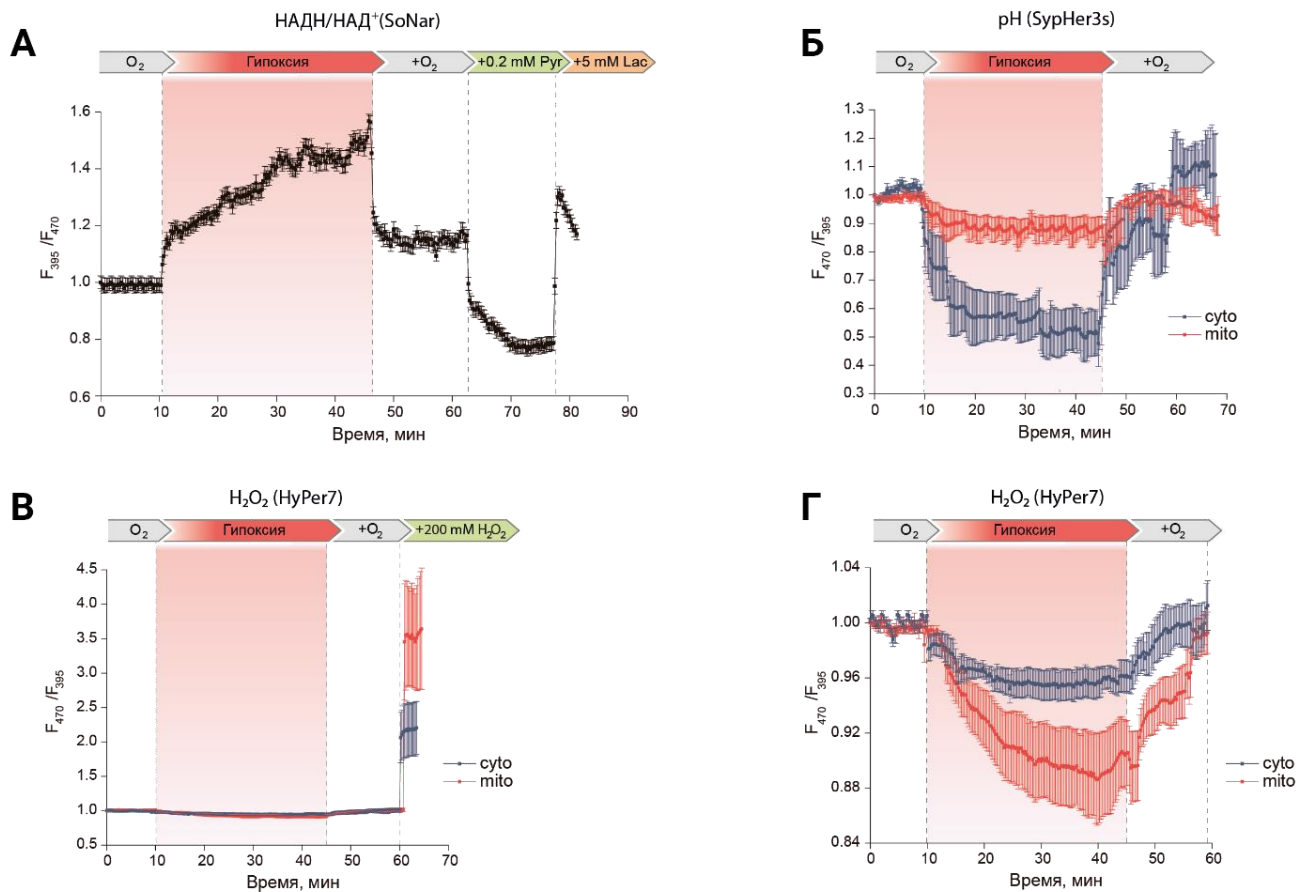


Рисунок 24. Регистрация динамики изменения соотношения НАД⁺/НАДН, pH и концентрации H₂O₂ с помощью генетически кодируемых флуоресцентных биосенсоров в цитозоле и митохондриальном матриксе культивируемых первичных нейронов гиппокампа мыши в течение 35 минут гипоксии и последующей реоксигенации. (А) Динамика соотношения НАД⁺/НАДН при гипоксии/реоксигенации в нейронах. Нормализованный сигнал SoNar (соотношение F₃₉₅ / F₄₇₀) был усреднен по 21 нейрону в 2 экспериментах. Более высокий ратиометрический 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 ратиометрический 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 ратиометрический 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. (Опубликовано в Kelmanson et al., *Redox Biology*, 2021 [297]).

Созданная нами система моделирования гипоксии/реоксигенации клеточной культуры позволяет также искать и исследовать воздействия, влияющие на динамику биохимических процессов при развитии патологического состояния. Так, например, одним из основных факторов риска возникновения ишемического инсульта у человека является гипергликемия [299,300]. Известно, что при повышенной концентрации глюкозы, которое характерно для больных диабетом, последствия ишемического инсульта более тяжелые [299]. У таких больных наблюдается более выраженный объем повреждения мозга, в т. ч. отек, ацидоз клеток и накопление глутамата.

С использованием установки для моделирования условий гипоксии/реоксигенации 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 HyPer7 в митохондриях, т.к. они являются наиболее чувствительными к гипоксии/реоксигенации клеточными органеллами [225]. 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 HyPer7 в условиях гипоксии/реоксигенации. В результате мы зафиксировали скачок флуоресцентного сигнала HyPer7 в условиях гипоксии в митохондриях нейронов, предварительно инкубированных в среде с повышенной глюкозой (рис.25). Далее в течение всего периода гипоксии биосенсор HyPer7 демонстрировал динамику медленного восстановления до значений немного ниже исходных, при этом, последующая 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.

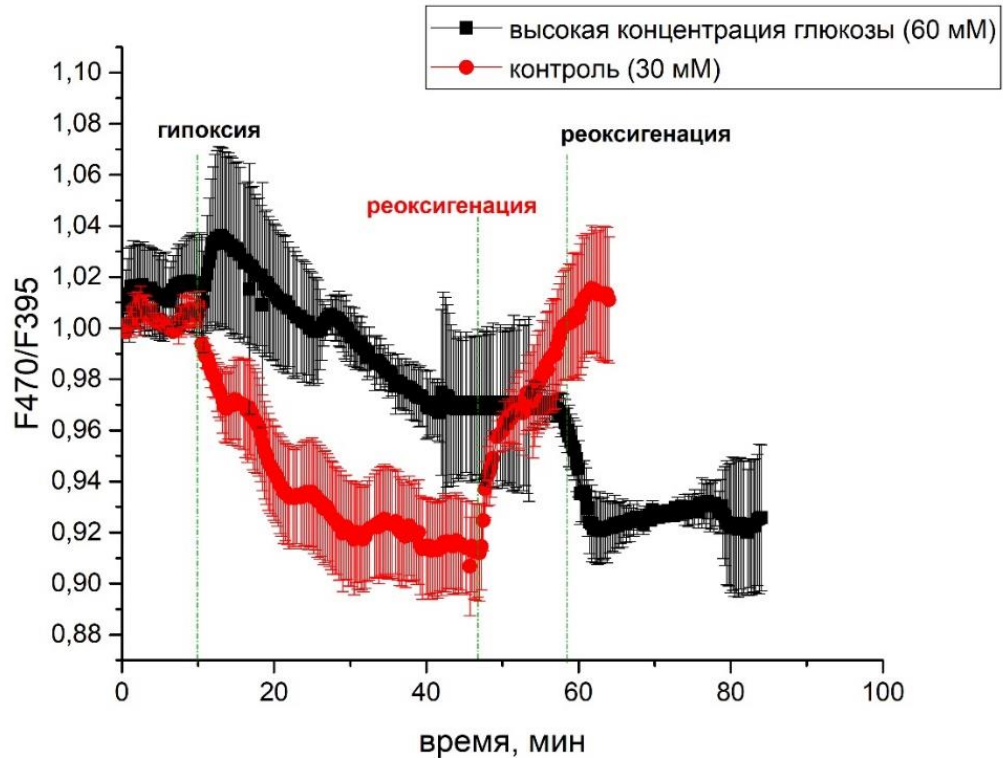


Рисунок 25. Регистрация динамики изменения концентрации H_2O_2 с помощью генетически кодируемого флуоресцентного биосенсора HuPer7 в митохондриальном матриксе культивируемых первичных нейронов гиппокампа мыши в условиях кислородно-глюкозной депривации. Красной линией обозначен нормализованный сигнал биосенсора HuPer7 (F470/ F395), усредненный по 89 нейронам в 3 экспериментах, культивируемых в нормальных условиях. Черной линией обозначен нормализованный сигнал биосенсора HuPer7 (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 [298]. В качестве ингибитора монокарбоксилатных транспортеров мы использовали альфа-циано-4-гидроксикоричную кислоту (4-CIN), данное соединение

ингибирует поглощение лактата нейронами [299], но при этом не препятствует глиальному экспорту [300]. 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 pH во время кислородно-глюкозной депривации (рис. 26). В нейронах, инкубированных с 4-CIN, мы не обнаружили развитие выраженного ацидоза, который обычно наблюдаем в условиях гипоксии. Таким образом, с помощью данного подхода мы показали, что динамика pH в значительной степени зависит от функционирования монокарбоксилатных транспортеров.

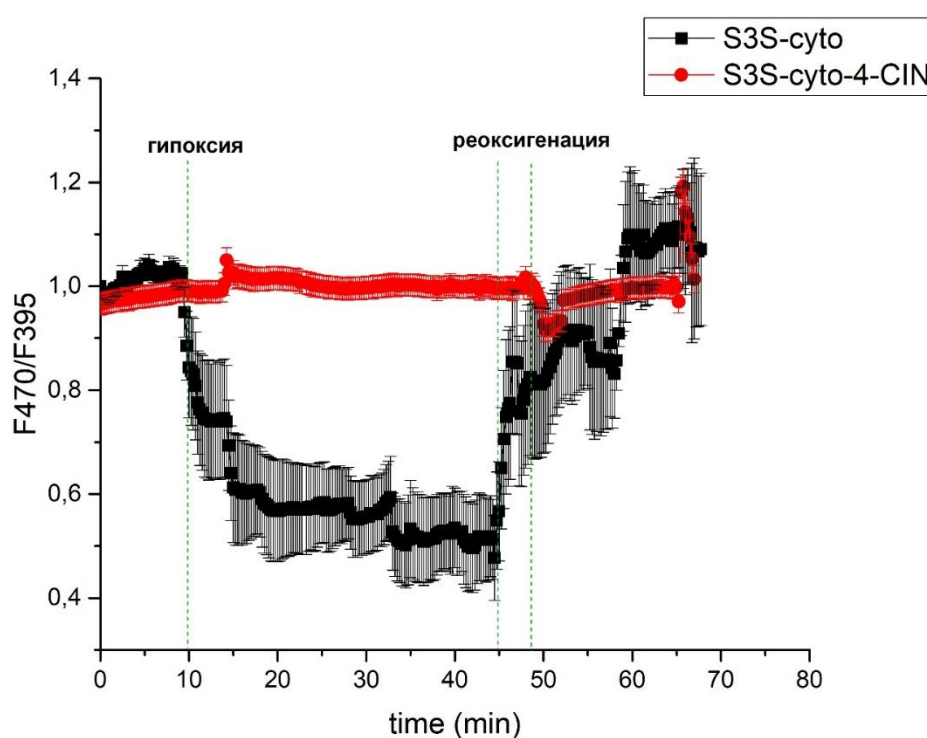


Рисунок 26. Исследование динамики pH с помощью генетически кодируемого биосенсора *SypHer3s* в цитозоле гиппокампальных нейронов мыши в условиях кислородно-глюкозной депривации. Черной линией обозначен нормализованный сигнал биосенсора *SypHer3s* (соотношение F470 / F395), усредненный по 94 нейронам в 6 экспериментах, культивируемых в обычных условиях (из рисунка 24Б). 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.

Таким образом, используемая в данной работе клеточная модель в сочетании с использованием гипоксической установки позволила зарегистрировать изменения таких биохимических параметров как H₂O₂ и pH при различных патологических состояниях. Мы

показали, что повышение глюкозы в среде приводит к внутриклеточной генерации H_2O_2 в условиях гипоксии, а ингибирование монокарбоксилатных транспортеров препятствует выраженному закислению клеток. Данная серия экспериментов позволила нам отработать регистрацию динамики концентрации H_2O_2 и pH в моделях различных патологий на культуре клеток.

Тем не менее важно отметить, что любые данные, полученные в экспериментах с культурами клеток, могут существенно отличаться от реальной картины процессов, происходящих *in vivo*. В частности, значение pO_2 для клеточных культур (в нашем случае ~150 мм рт. ст.) недостижимо в живых тканях, где этот показатель редко превышает 40 мм рт. [301]. При закупорке сосуда тромбом ткань испытывает не только недостаток кислорода (гипоксия), но и недостаток питательных веществ, такое состояние ткани называется ишемией. Ишемический инсульт головного мозга является одним из самых тяжелых заболеваний человека. Поэтому исследование динамики биохимических процессов при этой патологии является одной из первостепенных задач в современной биологии и медицине. Однако ишемический инсульт является сложным патологическим процессом, в развитии которого задействованы различные ткани и клетки организма. Именно поэтому динамика биохимических процессов в тканях мозга может значительно отличаться от динамики, наблюдаемой в клеточной культуре при гипоксии. На следующем этапе нашего исследования мы использовали преимущества генетически кодируемых флуоресцентных биосенсоров и провели регистрацию биохимических процессов в тканях мозга крыс *in vivo* при развитии ишемического инсульта.

3.4. Исследование *in vivo* динамики ацидоза и концентрации H_2O_2 в тканях мозга крыс при развитии ишемического инсульта

Для моделирования ишемического инсульта грызунов нами была выбрана широко используемая во всем мире модель окклюзии средней мозговой артерии (МСаО) [302] с небольшими изменениями, описанными в опубликованной нами статье [297]. 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. Как мы обсуждали ранее, способ регистрации сигнала биосенсора в тканях может быть осуществлен через краниальное окно с применением мультифотонной микроскопии. В частности, для этого подхода исследования мы детально охарактеризовали биосенсор SypHer3s. Однако мультифотонная микроскопия через краниальное окно позволит регистрировать лишь несколько поверхностных слоев коры головного мозга, при этом при МСаО зона инсульта начинает

формироваться гораздо глубже в области стриатума. Поражения в коре головного мозга образуются позже в так называемой зоне пенумбры инсульта. Поэтому 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 HyPer7, SynHer3s, SoNar были инъецированы в область структуры хвостатого ядра обоих полушариях мозга крыс линии SHR. В каждом отдельном животном 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 инъекцией 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 возможна регистрация флуоресцентного сигнала 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 28Г. Оптический кабель длиной более 1 м подключается к оптическому волокну, вживленному в мозг животного, с использованием специально разработанной керамической ферулы. Другой конец длинного кабеля закрепляется в оптической схеме. Благодаря тому, что все используемые в работе биосенсоры имеют ратиометрический сигнал, то съемку проводили в двух независимых каналах, каждый из которых соответствует пикам возбуждения флуоресценции. Сигнал рассчитывали как отношение интенсивности флуоресценции, возбуждаемой при 420 нм (F420), к интенсивности флуоресценции, возбуждаемой при 500 нм (F500). В качестве источников возбуждения в собранной установке использовали мощные светодиоды с длинами волн излучения 405 и 490 нм. Излучение светодиодов коллимировалось линзой с фокусным расстоянием $F=50$ мм, после чего сводилось с помощью полосового установленного под углом интерференционного фильтра (Chroma ET480/20x). Затем излучение разделялось делителем 50/50 на 2 одинаковых канала, после чего отражалось дихроичным зеркалом DMLP490 на объектив Olympus 20x и фокусировалось в оптическое волокно. Флуоресцентный сигнал, доставленный из клеток мозга, коллимировался тем же объективом, после чего, пройдя через дихроичное зеркало, детектировался фотоэлектронным умножителем (ФЭУ). Перед каждым ФЭУ были установлены

интерференционные фильтры (FES0600 и FELH500) для выделения спектральной полосы регистрации 500–600 нм. В режиме непрерывного излучения, выходящая из волокна мощность составляла около 5 мкВт для каждого из источников. Для контроля стабильности мощности диодов малая доля излучения отражалась пленочным делителем пучка на фотодиод. Изменения мощности никогда не превышали 2% за время эксперимента. Система позволяет регистрировать сигнал в режиме реального времени одновременно в нескольких флуоресцентных каналах в нескольких координатах мозга, таким образом, мы регистрировали сигнал одновременно в двух полушариях.

Во время регистрации животному под анестезией проводили хирургическую операцию, моделируя инсульт путем окклюзии средней мозговой артерии. Таким образом, мы проводили регистрацию динамики исследуемых внутриклеточных параметров мозга с первых секунд патогенеза. Запись сигнала биосенсоров была осуществлена непрерывно с интервалом в 300 мс с момента введения животного в наркоз. Продолжительность ишемии составляла 60 минут, после чего кровоток в артерии восстанавливали и записывали динамику сигнала в течение еще 60 минут. После завершения эксперимента животных оставляли на сутки с доступом к пище и воде с применением обезболивающих препаратов. Через 24 часа животных подвергали эвтаназии, срезы мозга прокрашивали краской тетразолия хлорида, которая позволяет визуализировать область повреждения ткани вследствие инсульта. Для каждого животного после эксперимента мы убеждались в наличии инсульта, а также в том, что область флуоресцентного сигнала перекрывается с областью повреждения (рис 27 Б). Контрольной группе животных были проведены аналогичные хирургические манипуляции за исключением доведения окклюдера до средней мозговой артерии, в результате чего инсульт у данной группы животных не развивался (рис. 27А).

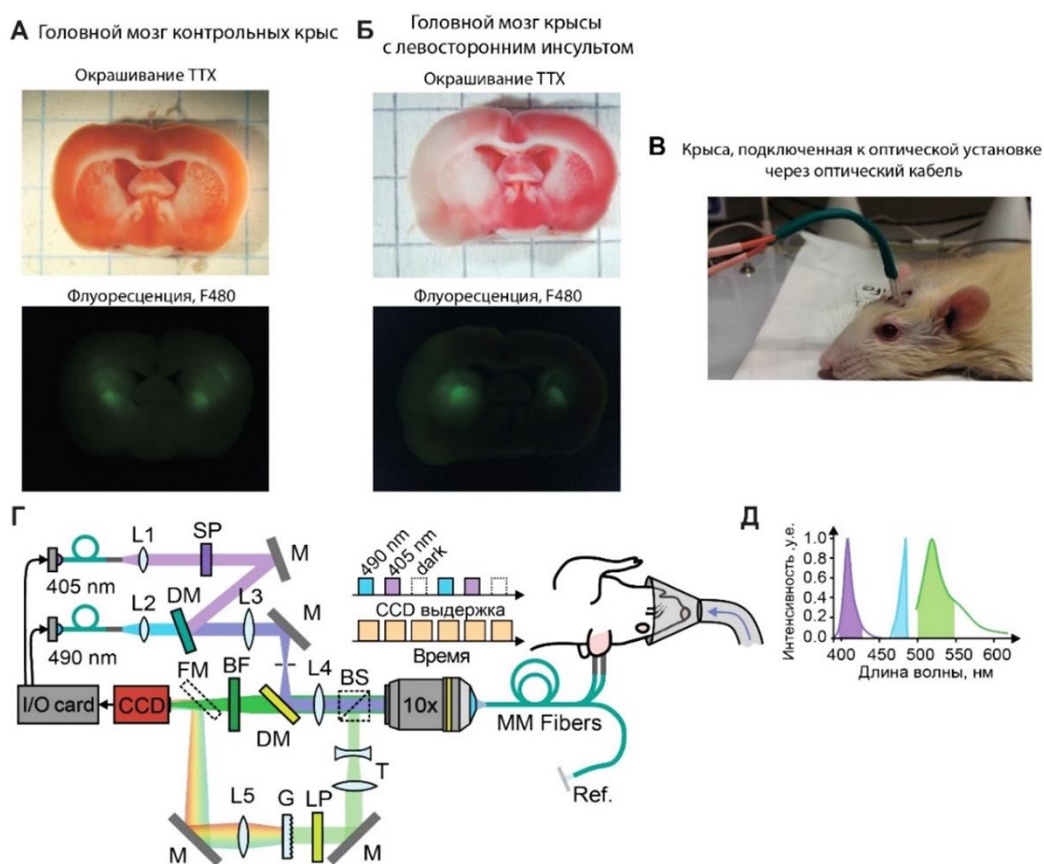


Рисунок 27. Регистрация флуоресцентного сигнала биосенсоров в тканях головного мозга крыс в модели ишемического инсульта. (А) На рисунке вверху изображен окрашенный TTX срез мозга ложнооперированных крыс после 24ч с момента проведения операции. Для среза характерна равномерное окрашивание, поврежденные области не визуализируются. Ниже изображен тот же срез во флуоресцентном канале для визуализации области экспрессии гена биосенсора на примере *HuPer7*. (Б) На рисунке изображен окрашенный TTX срез мозга после 24 часа 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 *HuPer7* 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 состоит из следующих элементов: 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 (ММ 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 эмиссия биосенсоров (зеленый). Опубликовано в *Kelmanson et al., Redox Biology, 2021* [297].

Для регистрации динамики pH, H₂O₂, соотношения НАД⁺/НАДН в тканях мозга крыс во время ишемического инсульта мы использовали соответствующие биосенсоры *SypHer3s* [232], *HuPer7* [224] и *SoNar* [213]. При этом биосенсор *SypHer3s* использовали с локализацией в цитозоле нейронов, а *HuPer7* 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 [224]. 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.

3.4.1. In vivo исследование динамики рН в тканях мозга крыс при развитии ишемического инсульта

Для преобразования ратиометрического флуоресцентного сигнала биосенсора SynHer3s 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 SynHer3s (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 28 А, использовали в *in vivo* исследованиях для определения значений рН в нейронах.

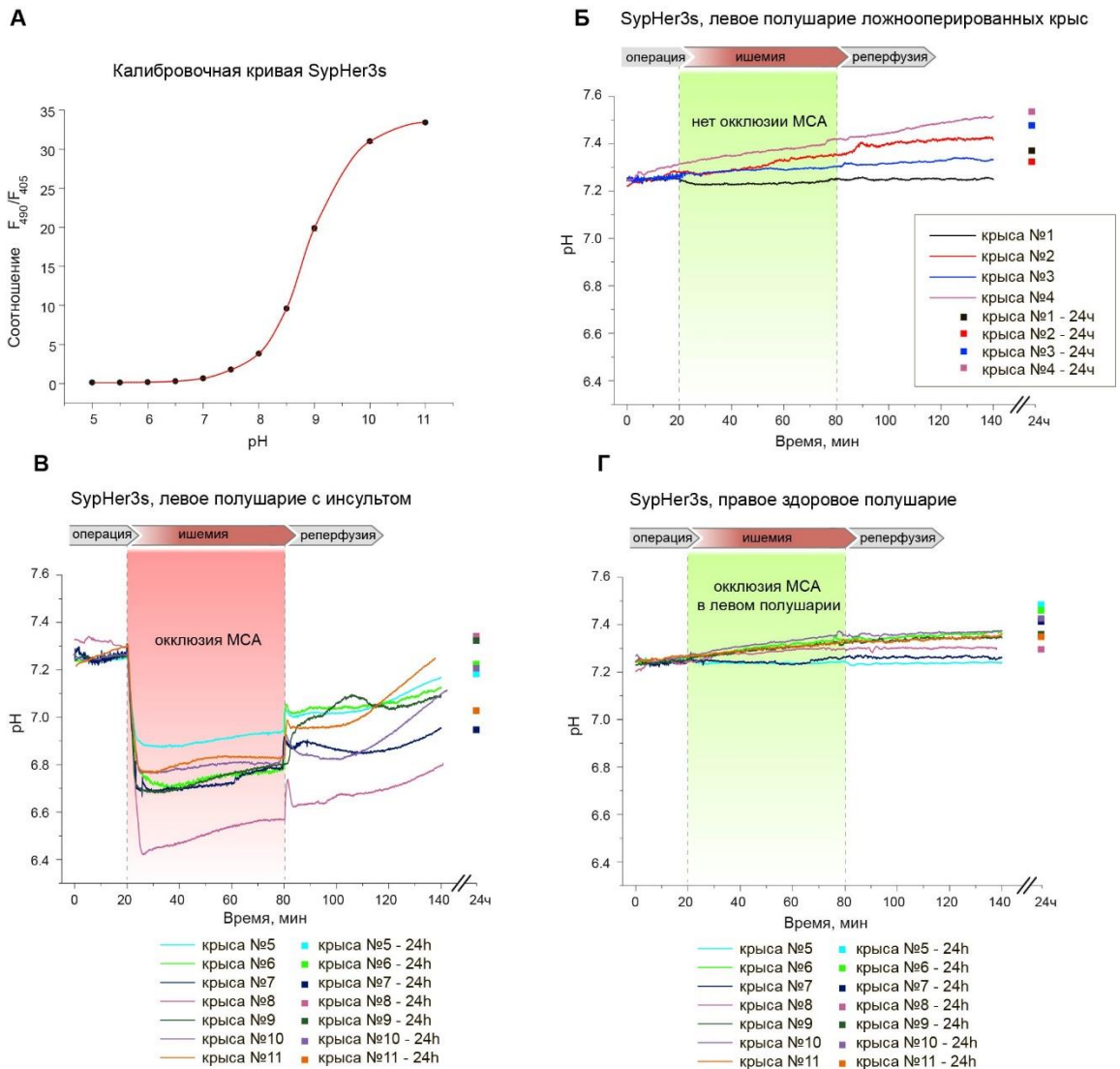


Рисунок 28. Регистрация динамики pH *in vivo* в тканях мозга крыс при развитии ишемического инсульта с помощью генетически кодируемого биосенсора SypHer3s. (А) Калибровочная кривая зависимости сигнала SypHer3s от значения pH, полученная на препарате очищенного белка *in vitro*. Планки погрешностей соответствуют стандартному отклонению, $n \geq 3$. (Б) Динамика изменения pH, измеренная с помощью биосенсора SypHer3s, 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. (Опубликовано в Kelmanson et al., *Redox Biology*, 2021 [297]).

Используя описанный выше подход, мы показали, что в цитозоле нейронов pH значительно изменяется при ишемии в тканях мозга крысы *in vivo*. В нейронах структуры хвостатого ядра pH снижается от первоначального значения $7.25 \pm 0,08$ до $6.7 \pm 0,15$ уже в первые несколько секунд с момента окклюзии сосуда (рис. 28В). Однако практически сразу после достижения своего минимального значения pH медленно начинает повышаться. После восстановления кровотока эта тенденция сохраняется, у некоторых животных pH начинает увеличиваться быстрее. При этом за время регистрации в течение часа после реперфузии pH не

достиг первоначальных значений у большинства животных в экспериментальной группе. Мы также регистрировали сигнал *SypHer3s* 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.

В данной работе мы также регистрировали динамику рН в тканях мозга крысы при развитии инсульта не только в нейронах, но и в астроцитах. А также сравнивали динамику рН-биосенсора *SypHer3s* в цитозоле и митохондриальном матриксе в этих типах клеток. Во всех случаях *SypHer3s* демонстрировал аналогичную динамику сигнала в зоне повреждения независимо от выбранных локализаций. Таким образом, ишемизированная область мозга испытывает глобальный ацидоз с повсеместным падением рН примерно на 0.5 единицы.

Важное отличие поведения динамики рН *in vivo* при ишемическом инсульте от наблюдаемых ранее изменений рН в культуре нейронов при гипоксии/реоксигенации в том, что рН в тканях мозга в зоне инсульта значительно дольше остается сниженным, в том числе на следующие сутки после реперфузии.

Ацидоз тканей головного мозга при ишемическом инсульте был подтвержден ранее с помощью различных подходов. Так, например, с помощью синтетических флуоресцентных зондов была зарегистрирована пространственно-временная динамика в поверхностных тканях головного мозга животных [303]. Ацидоз тканей при ишемии был зарегистрирован также с помощью подходов позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) [250] и магнитно-резонансной томографии (МРТ) [251,304]. Используемый в нашей работе подход регистрации рН с помощью генетически кодируемого биосенсора позволяет проводить исследования на принципиально новом уровне – наблюдать за регистрируемым процессом в выбранной координате мозга, определенном типе клеток и даже их компартментах.

3.4.2. 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 [224]. Таким образом, митохондрии действительно являются одними из наиболее

чувствительных к окислительному стрессу органеллами. Поэтому, локализовав HyPer7 митохондриях, мы обнаружим увеличение H_2O_2 независимо от источника его происхождения.

HyPer7 является высокочувствительным к окислению биосенсором. Даже выделенный препарат белка окисляется в обычной атмосфере из-за небольшого образования H_2O_2 в растворе. Поэтому перед началом экспериментов необходимо было убедиться, что HyPer7 в данной системе находится в рабочем состоянии. Инъекция вирусных частиц и имплантация волокон являются хирургическим вмешательством, и, хотя от момента этих процедур до начала эксперимента проходит месяц, мы все же опасались локального воспаления ткани, вызванного локальным микроповреждением. Поэтому мы провели ряд измерений на свежесыведенном мозге *ex vivo*. Для этого в ткани свежесыведенного головного мозга мы визуализировали флуоресцентную область и регистрировали сигнал от биосенсора HyPer7 с помощью оптических волокон. Все параметры регистрации сигнала были выбраны аналогичными тем, которые использовали для *in vivo* серий. Далее в среду, в которую был помещен мозг, мы добавляли H_2O_2 , непрерывно регистрируя сигнал биосенсора. При увеличении концентрации H_2O_2 сигнал биосенсора рациометрически изменялся. После достижения насыщающей концентрации сигнал биосенсора достигал максимального ответа и более не менялся (рисунок 30А). Таким образом, мы показали, что в данной системе биосенсор имеет потенциал к окислению и может быть использован для регистрации окислительного стресса.

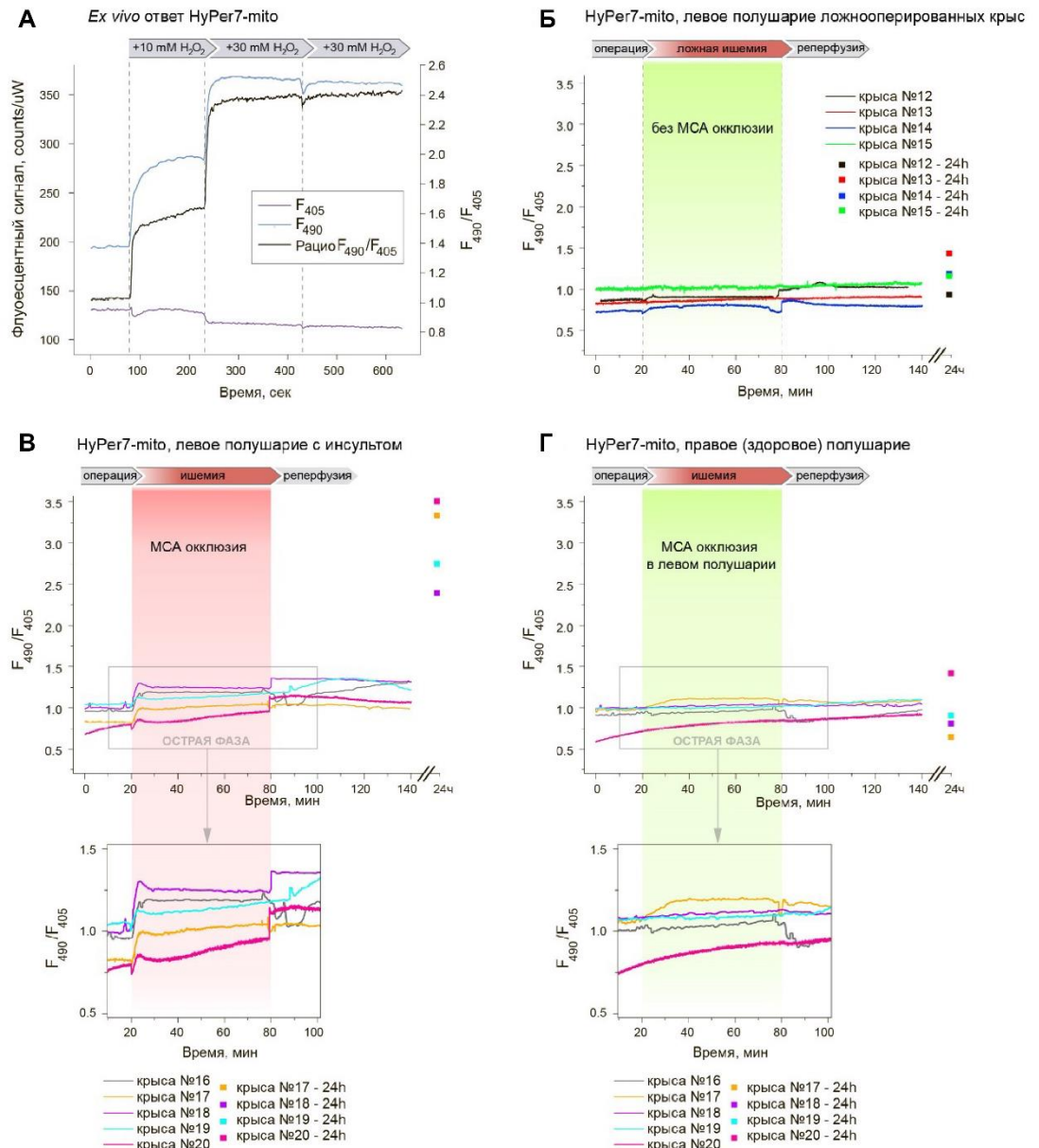


Рисунок 29. Регистрация динамики H₂O₂ *in vivo* в тканях мозга крыс при развитии ишемического инсульта с помощью генетически кодируемого биосенсора HyPer7. (А) Регистрация флуоресцентного сигнала HyPer7-mito в тканях мозга крыс *ex vivo* в ответ на экзогенное добавление H₂O₂. (Б) Динамика HyPer7-mito 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. (Опубликовано в Kelmanson et al., *Redox Biology*, 2021 [297]).

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 после реперфузии (рис. 29В). Сигнал увеличился более чем в два раза, что

соответствует практически максимальному окислению биосенсора по полученным нами данным *ex vivo* (рис. 29А). Таким образом, при ишемическом инсульте действительно развивается окислительный стресс, однако динамика его развития оказалась отличной от общепринятых представлений. Вероятно, некоторое время масштабное образование АФК в клетках сдерживается антиоксидантами системами защиты, однако в результате тотальной метаболической недостаточности ткани развивается окислительный стресс. В частности, тиоредоксиновая система клетки не способна более поддерживать биосенсор НуPer7 в восстановленном состоянии. С другой стороны, окислительный стресс в острой фазе ишемического инсульта может все же возникать, но не за счет образования перекиси водорода, а за счет перекисного окисления липидов. Действительно, известно, что перекисное окисление липидов связано с ишемическим/реперфузионным повреждением [305]. В таком случае НуPer7 не может отражать данный процесс, поскольку чувствителен именно к H₂O₂. В данных экспериментах нами было продемонстрировано, что АФК действительно играют, судя по всему, ключевую роль в данном патогенезе инсульта, поскольку через сутки наступает выраженный окислительный стресс. Стоит отметить, что развитие окислительного стресса может отражать последствия инсульта, которые могут возникать в результате развития воспалительного процесса, обусловленного активацией микроглии или инфильтрацией нейтрофилов.

На следующем этапе мы регистрировали сигнал биосенсора НуPer7 в тканях мозга крыс при развитии ишемического инсульта в течение более длительного времени, чтобы определить точный момент образования H₂O₂. Для сравнения мы также регистрировали динамику окислительного стресса в астроцитах, используя вирусные конструкции с GFAP промотором. Эксперименты проводили 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.

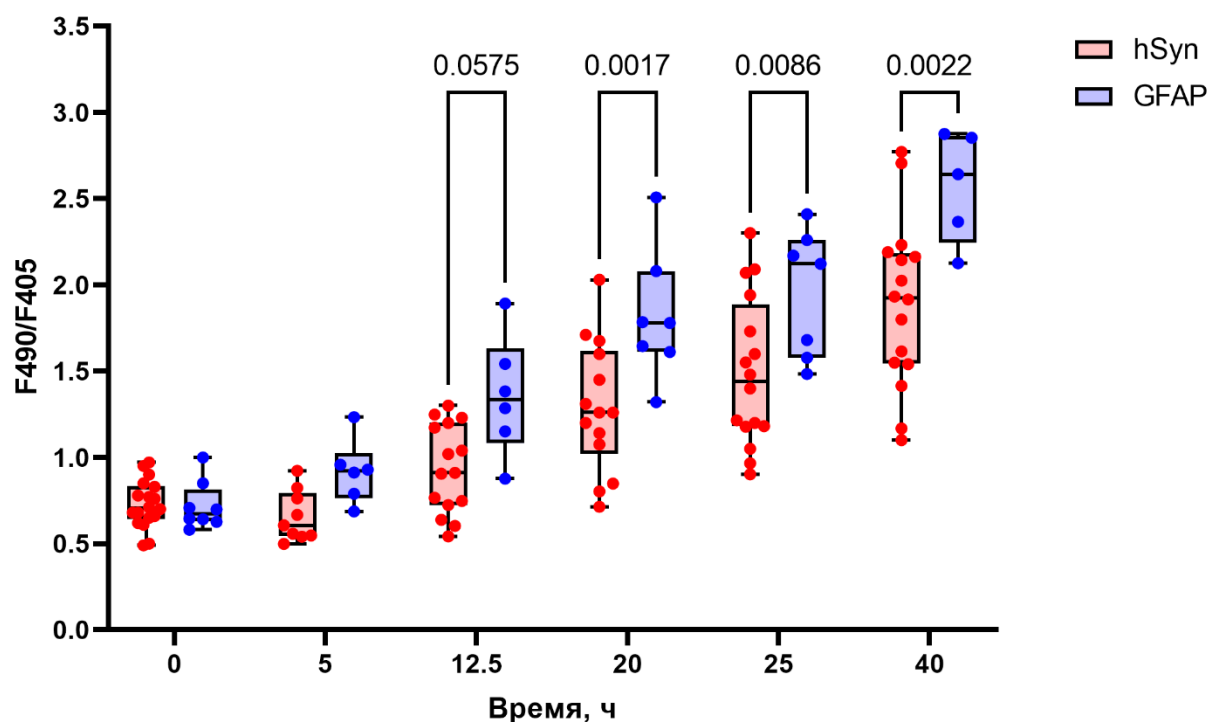


Рисунок 30. Сравнение динамики изменения концентрации H_2O_2 в нейронах (hSyn) и астроцитах (GFAP) в течение 40 часов после МСАО. Группа hSyn включала в себя 14 животных, группа GFAP – 8.

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 30, видно, что начиная с 12 часов после МСАО флуоресцентный сигнал биосенсора NuPer7 в нейронах увеличивается медленнее, чем в астроцитах (GFAP). Согласно двухфакторному дисперсионному анализу (two-way ANOVA) с апостериорным тестом на множественные сравнения Бонферонни, через 20, 25 и 40 часов после окклюзии средней мозговой артерии сигнал NuPer7 в нейронах статистически достоверно ниже ($p < 0.05$), чем сигнал биосенсора в группе животных с локализацией в астроцитах.

Известно, что для астроцитов характерно наличие астроцитарных пероксисом. Астроцитарные пероксисомы важны для поддержания структуры миелина в головном мозге. В тоже время, пероксисомы, в которых жирные кислоты с очень длинной цепью подвергаются β -окислению, считаются одним из источников АФК [306]. Известно, что пероксисомы глиальных клеток защищают нейроны от воздействия перекиси, поэтому сбой в работе этих органелл приводит к различным поражениям [306]. 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 [102,307]. 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 воспалительной реакции. 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.

Одним из важнейших маркеров воспалительных реакций является продукция гипогалогенных кислот, прежде всего хлорноватистой кислоты $HOCl$. Гипогалогенные кислоты образуются в реакциях, катализируемых гемовыми пероксидазами. Одним из таких примеров является миелопероксидаза, которую содержат нейтрофилы и тканевые макрофаги, например, активированные клетки микроглии. Недавно был разработан первый в своем роде генетически кодируемый биосенсор *Nurocrates* для визуализации гипогалогенного стресса в живых системах [242]. Мы предположили, что если регистрируемый нами с помощью *NuReg7* окислительный стресс в тканях мозга крыс при ишемическом инсульте имеет природу нейровоспаления, то помимо генерации АФК в поврежденных тканях также должны присутствовать продукты реакций гипогалогенного стресса. Однако прежде, чем создавать вирусные частицы с геном биосенсора *Nurocrates*, мы измерили активность миелопероксидазы в тканях мозга крыс *in vitro*. Для этого животным без экспрессии гена како-либо биосенсора была проведена стандартная операция по МСАО. Затем животных поделили случайным образом на 2 группы: у одной группы мозг извлекали через 14 часов после МСАО, у другой – через 24 часа. В качестве контроля использовали ткань мозга животных, которые не подвергались инсульту. Измерение активности МПО проводили в гомогенате ткани с помощью коммерческого кита отдельно для левого (ишемизированного) правого (здорового) полушарий. Согласно полученным данным, представленным на рисунке 31 видно, что значимых изменений активности МПО в тканях головного мозга крыс с помощью данного подхода обнаружить не удалось. Возможно, это связано с тем, что основные реакции нейровоспаления после ишемического инсульта начинаются позднее, чем через 24 часа после МСАО. В дальнейшем мы планируем применить биосенсор *Nurocrates* для визуализации гипогалогенного стресса, используя более длительные времена регистрации. Кроме того, регистрация окислительных событий с помощью данного биосенсора является более чувствительным подходом по сравнению с *in vitro* тестами, подразумевающими получение гомогенатов тканей.

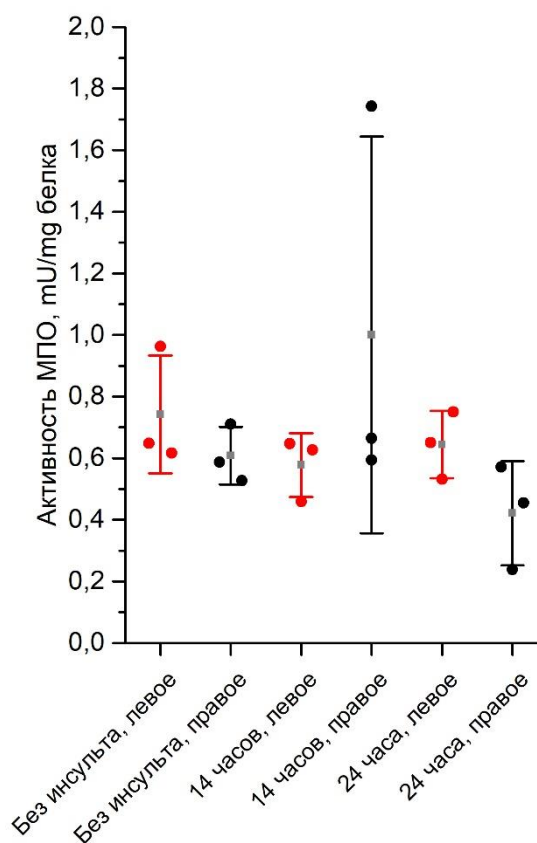


Рисунок 31. Активность МПО (mU/mg белка) в клетках головного мозга крыс правого и левого полушарий через разные промежутки времени от момента начала развития ишемического инсульта.

В настоящей работе мы показали, что генетически кодируемые биосенсоры в сочетании с подходом оптоволоконной регистрации сигнала представляют собой мощный инструментарий 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.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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 применяли биосенсор нового поколения *HyPer7*, который отличается выраженной амплитудой ответа и высокой чувствительностью к H_2O_2 . 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*.

Регистрацию флуоресцентного сигнала в тканях мозга *in vivo* мы осуществляли с помощью оптической установки через оптические волокна, которые имплантировали одновременно с инъекцией вирусных частиц. Преимущество такого подхода регистрации в том, что для исследования может быть выбрана любая координата мозга. Кроме того, подход может быть масштабирован. Например, в наших основных экспериментах мы одновременно осуществляли регистрацию биохимических процессов в двух полушариях мозга крыс. Мы также тестировали регистрацию в более чем двух координатах, например, одновременно в коре и стриатуме каждого полушария. Поэтому в дальнейшем этот подход может стать еще более информативным, позволяя исследовать события одновременно в разных структурах мозга. Данный метод исследования мозга значительно усиливается использованием генетически кодируемых биосенсоров, которые по своей природе являются белками. Это позволяет более гибко планировать дизайн исследования. Так, например, генетически кодируемый биосенсор можно локализовать в определенных типах клеток, а также отдельных их компартментах. В ходе выполнения данной работы мы показали, что при развитии ишемического инсульта у крыс в его центральной области ткани мозга испытывают глобальный ацидоз. За несколько секунд после окклюзии артерии рН снижается на 0,5 как в цитозоле, так и матриксе митохондрий нейронов и астроцитов. Примечательно, что вопреки общепринятому мнению значительного роста АФК в ишемизированной области мозга мы не зафиксировали в острой фазе. Выраженный окислительный стресс был детектирован лишь на следующие сутки. Мы также выявили, что продукция H_2O_2 после начала ишемии/реперфузии оказалось более выраженной в астроцитах после 20 часов МСАО по сравнению с нейронами. Таким образом, данный подход позволяет исследовать особенности, свойственные разным типам клеток.

Вместе с разработкой подходов для *in vivo* исследований мы также регистрировали динамику процессов с помощью этих же биосенсоров в первичной культуре нейронов в условиях гипоксии и последующей реоксигенации. Самым значимым результатом является наше наблюдение о том, что исследуемые процессы в клеточной культуре могут отличаться от этих аналогичных типов клеток, находящихся в условиях *in vivo*. Например, динамика pH в культивируемых нейронах отличалась тем, что после реоксигенации значения возвращались к исходным как в цитозоле, так и митохондриальном матриксе. В культуре нейронов в условиях гипоксии/реоксигенации мы не зарегистрировали образования H₂O₂, в отличие от используемой модели *in vivo*, где изменения сигнала чувствительного к H₂O₂ биосенсора были обнаружены как для начала ишемии, так и при реперфузии с дальнейшим развитием мощного окислительного стресса на следующие сутки. Это свидетельствует о том, что культура клеток не может являться релевантной моделью патогенеза таких заболеваний как ишемический инсульт. Однако несмотря на отличия в динамике биохимических процессов, развитие тест-систем на клеточных культурах не менее важно для медико-биологических исследований. В частности, на клеточных культурах гораздо проще проводить скрининговые исследования по выявлению условий, влияющих внутриклеточные параметры при гипоксии. Например, мы показали, что в созданной нами системе повышение глюкозы в среде приводит к внутриклеточной генерации H₂O₂ в условиях гипоксии. Ингибирование монокарбоксилатных транспортеров препятствует выраженному закислению клеток. Такие исследования гораздо проще проводить именно на простых клеточных моделях и в случае обнаружения эффекта переносить тестирования на модели с животными.

Сотни лабораторий по всему миру занимаются разработкой новых и усовершенствованием существующих генетически кодируемых биосенсоров. Таким образом, современному исследователю доступна обширная мировая коллекция инструментов для исследования роли самых разнообразных внутриклеточных соединений. Наряду с развитием этой области биологии совершенствуются оптические подходы регистрации сигнала в тканях *in vivo*. 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 настоящей работы мы провели детальное тестирование свойств pH-биосенсора SypHer3s в двухфотонном режиме микроскопии.

Генетически кодируемые биосенсоры открывают широчайшие возможности для исследования сложных биологических процессов на моделях *in vivo*. На сегодняшний день это один из наиболее динамично развивающихся экспериментальных подходов, что отражено применением в самых разнообразных исследованиях. Мы показали, как данные технологии могут быть успешно применены в режиме реального времени для исследования патологий мозга, в частности, ишемического инсульта головного мозга.

ВЫВОДЫ

1. Впервые с помощью высокочувствительного биосенсора HyPer7 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-х кратным повышением глюкозы по концентрации.

3. С помощью биосенсора SynHer3s 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 SynHer3s в режиме двухфотонной микроскопии на препарате белка *in vitro*, а также в культуре живых клеток и на срезах мозга грызунов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pega F. et al. WHO/ILO Joint Estimates of the Work-related Burden of Disease and Injury, 2000–2016: Global Monitoring Report. 2021.
2. Hinkle J.L., Guanci M.M. Acute ischemic stroke review // *J Neurosci Nurs*. 2007. Vol. 39, № 5. P. 285–293, 310.
3. Martin R.L., Lloyd H.G., Cowan A.I. The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? // *Trends Neurosci*. 1994. Vol. 17, № 6. P. 251–257.
4. Katsura K., Kristián T., Siesjö B.K. Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain // *Biochem Soc Trans*. 1994. Vol. 22, № 4. P. 991–996.
5. Hansen A.J., Nedergaard M. Brain ion homeostasis in cerebral ischemia // *Neurochem Pathol*. 1988. Vol. 9. P. 195–209.
6. Rothman S.M., Olney J.W. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic–ischemic brain damage // *Annals of Neurology*. 1986. Vol. 19, № 2. P. 105–111.
7. Camacho A., Massieu L. Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death // *Arch Med Res*. 2006. Vol. 37, № 1. P. 11–18.
8. Rossi D.J., Oshima T., Attwell D. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake // *Nature*. 2000. Vol. 403, № 6767. P. 316–321.
9. Hossmann K.A. Glutamate-mediated injury in focal cerebral ischemia: the excitotoxin hypothesis revised // *Brain Pathol*. 1994. Vol. 4, № 1. P. 23–36.
10. Lai T.W., Zhang S., Wang Y.T. Excitotoxicity and stroke: Identifying novel targets for neuroprotection // *Progress in Neurobiology*. 2014. Vol. 115. P. 157–188.
11. Siesjö B.K. et al. Glutamate, calcium, and free radicals as mediators of ischemic brain damage // *Ann Thorac Surg*. 1995. Vol. 59, № 5. P. 1316–1320.
12. Lau A., Tymianski M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration // *Pflugers Arch - Eur J Physiol*. 2010. Vol. 460, № 2. P. 525–542.
13. Solenski N.J. et al. Ultrastructural Changes of Neuronal Mitochondria After Transient and Permanent Cerebral Ischemia // *Stroke*. American Heart Association, 2002. Vol. 33, № 3. P. 816–824.
14. Nicholls D.G., Budd S.L. Mitochondria and neuronal glutamate excitotoxicity // *Biochim Biophys Acta*. 1998. Vol. 1366, № 1–2. P. 97–112.
15. Clemens J.A. Cerebral ischemia: gene activation, neuronal injury, and the protective role of antioxidants // *Free Radic Biol Med*. 2000. Vol. 28, № 10. P. 1526–1531.
16. Berlett B.S., Stadtman E.R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress // *J Biol Chem*. 1997. Vol. 272, № 33. P. 20313–20316.

17. Sakamoto A. et al. Relationship between free radical production and lipid peroxidation during ischemia-reperfusion injury in the rat brain // *Brain Research*. 1991.
18. Hayashi T. et al. Oxidative damage and breakage of DNA in rat brain after transient MCA occlusion // *Brain Res*. 1999. Vol. 832, № 1–2. P. 159–163.
19. Rama R., Rodríguez J. *Excitotoxicity and Oxidative Stress in Acute Ischemic Stroke*. 2012.
20. Niizuma K., Endo H., Chan P.H. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction as determinants of ischemic neuronal death and survival // *J Neurochem*. 2009. Vol. 109 Suppl 1. P. 133–138.
21. Murphy M.P. How mitochondria produce reactive oxygen species // *Biochem J*. 2009. Vol. 417, № 1. P. 1–13.
22. Jensen P.K. Antimycin-insensitive oxidation of succinate and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide in electron-transport particles I. pH dependency and hydrogen peroxide formation // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology and Biological Oxidation*. 1966. Vol. 122, № 2. P. 157–166.
23. Chance B., Sies H., Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. // *Physiological Reviews*. American Physiological Society, 1979. Vol. 59, № 3. P. 527–605.
24. Loschen G., Flohé L., Chance B. Respiratory chain linked H₂O₂ production in pigeon heart mitochondria // *FEBS Lett*. 1971. Vol. 18, № 2. P. 261–264.
25. Loschen G. et al. Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide // *FEBS Lett*. 1974. Vol. 42, № 1. P. 68–72.
26. Weisiger R.A., Fridovich I. Superoxide Dismutase: ORGANELLE SPECIFICITY // *Journal of Biological Chemistry*. 1973. Vol. 248, № 10. P. 3582–3592.
27. Raha S., Robinson B.H. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing // *Trends in Biochemical Sciences*. Elsevier, 2000. Vol. 25, № 10. P. 502–508.
28. 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.
29. Lassègue B., Clempus R.E. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation // *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. American Physiological Society, 2003. Vol. 285, № 2. P. R277–R297.
30. Walder C.E. et al. Ischemic Stroke Injury Is Reduced in Mice Lacking a Functional NADPH Oxidase // *Stroke*. American Heart Association, 1997. Vol. 28, № 11. P. 2252–2258.
31. Kahles T. et al. NADPH Oxidase Plays a Central Role in Blood-Brain Barrier Damage in Experimental Stroke // *Stroke*. American Heart Association, 2007. Vol. 38, № 11. P. 3000–3006.
32. Liu W. et al. Normobaric hyperoxia protects the blood brain barrier through inhibiting Nox2 containing NADPH oxidase in ischemic stroke // *Med Gas Res*. 2011. Vol. 1, № 1. P. 22.

33. Vallet P. et al. Neuronal expression of the NADPH oxidase NOX4, and its regulation in mouse experimental brain ischemia // *Neuroscience*. 2005. Vol. 132, № 2. P. 233–238.
34. Kleinschnitz C. et al. Post-Stroke Inhibition of Induced NADPH Oxidase Type 4 Prevents Oxidative Stress and Neurodegeneration // *PLOS Biology*. Public Library of Science, 2010. Vol. 8, № 9. P. e1000479.
35. Miller A.A. et al. NADPH Oxidase Activity and Function Are Profoundly Greater in Cerebral Versus Systemic Arteries // *Circulation Research*. American Heart Association, 2005. Vol. 97, № 10. P. 1055–1062.
36. McCann S.K., Dusting G.J., Roulston C.L. Early increase of Nox4 NADPH oxidase and superoxide generation following endothelin-1-induced stroke in conscious rats // *Journal of Neuroscience Research*. 2008. Vol. 86, № 11. P. 2524–2534.
37. Bolaños J.P., Almeida A. Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 1999. Vol. 1411, № 2. P. 415–436.
38. Leker R.R. et al. Expression of endothelial nitric oxide synthase in the ischemic penumbra: relationship to expression of neuronal nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor // *Brain Res*. 2001. Vol. 909, № 1–2. P. 1–7.
39. Sattler R. et al. Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein // *Science*. 1999. Vol. 284, № 5421. P. 1845–1848.
40. Ladecola C. et al. Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia // *J Cereb Blood Flow Metab*. 1995. Vol. 15, № 3. P. 378–384.
41. Garcia-Bonilla L. et al. Inducible nitric oxide synthase in neutrophils and endothelium contributes to ischemic brain injury in mice // *J Immunol*. 2014. Vol. 193, № 5. P. 2531–2537.
42. Anderson R.E., Meyer F.B. Nitric oxide synthase inhibition by L-NAME during repetitive focal cerebral ischemia in rabbits // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. American Physiological Society, 1996. Vol. 271, № 2. P. H588–H594.
43. Kirk S.J., Regan M.C., Barbul A. Cloned murine T lymphocytes synthesize a molecule with the biological characteristics of nitric oxide // *Biochem Biophys Res Commun*. 1990. Vol. 173, № 2. P. 660–665.
44. Fugen A. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation // *Life Sciences*. Pergamon, 2004. Vol. 75, № 6. P. 639–653.
45. Bolaños J.P., Almeida A. Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia // *Biochim Biophys Acta*. 1999. Vol. 1411, № 2–3. P. 415–436.
46. Kinuta Y. et al. Lipid peroxidation in focal cerebral ischemia // *J Neurosurg*. 1989. Vol. 71, № 3. P. 421–429.

47. Grune T., Reinheckel T., Davies K.J. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells // *FASEB J.* 1997. Vol. 11, № 7. P. 526–534.
48. Jurcau A. Insights into the Pathogenesis of Neurodegenerative Diseases: Focus on Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress // *Int J Mol Sci.* 2021. Vol. 22, № 21. P. 11847.
49. Cui J. et al. Oxidative DNA damage precedes DNA fragmentation after experimental stroke in rat brain // *FASEB J.* 2000. Vol. 14, № 7. P. 955–967.
50. Krupinski J. et al. Expression of caspases and their substrates in the rat model of focal cerebral ischemia // *Neurobiol Dis.* 2000. Vol. 7, № 4. P. 332–342.
51. Ferrer I., Planas A.M. Signaling of cell death and cell survival following focal cerebral ischemia: life and death struggle in the penumbra // *J Neuropathol Exp Neurol.* 2003. Vol. 62, № 4. P. 329–339.
52. Warner D.S., Sheng H., Batinić-Haberle I. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain // *Journal of Experimental Biology.* 2004. Vol. 207, № 18. P. 3221–3231.
53. Chan P. h. et al. Transgenic Mice and Knockout Mutants in the Study of Oxidative Stress in Brain Injury // *Journal of Neurotrauma.* Mary Ann Liebert, Inc., publishers, 1995. Vol. 12, № 5. P. 815–824.
54. Davis S.M., Pennypacker K.R. Targeting antioxidant enzyme expression as a therapeutic strategy for ischemic stroke // *Neurochem Int.* 2017. Vol. 107. P. 23–32.
55. Vainshtein B.K. et al. Three-dimensional structure of the enzyme catalase // *Nature.* 1981. Vol. 293, № 5831. P. 411–412.
56. Torre M.R. de la et al. Human aging brain disorders: role of antioxidant enzymes // *Neurochem Res.* 1996. Vol. 21, № 8. P. 885–888.
57. Gu W. et al. Catalase over-expression protects striatal neurons from transient focal cerebral ischemia // *NeuroReport.* 2004. Vol. 15, № 3. P. 413–416.
58. Liu T.H. et al. Polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase and catalase reduce ischemic brain injury // *Am J Physiol.* 1989. Vol. 256, № 2 Pt 2. P. H589-593.
59. Kidd P.M. Glutathione: Systemic protectant against oxidative and free radical damage // *Alternative Medicine Review.* 1997. Vol. 2. P. 155–176.
60. Dringen R., Pfeiffer B., Hamprecht B. Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione // *J Neurosci.* 1999. Vol. 19, № 2. P. 562–569.
61. Brigelius-Flohé R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases // *Free Radic Biol Med.* 1999. Vol. 27, № 9–10. P. 951–965.

62. Aksenov M.Y. et al. The expression of key oxidative stress-handling genes in different brain regions in Alzheimer's disease // *J Mol Neurosci*. 1998. Vol. 11, № 2. P. 151–164.
63. Weisbrot-Lefkowitz M. et al. Overexpression of human glutathione peroxidase protects transgenic mice against focal cerebral ischemia/reperfusion damage // *Brain Res Mol Brain Res*. 1998. Vol. 53, № 1–2. P. 333–338.
64. Dawson D.A. et al. The neuroprotective efficacy of ebselen (a glutathione peroxidase mimic) on brain damage induced by transient focal cerebral ischaemia in the rat // *Neurosci Lett*. 1995. Vol. 185, № 1. P. 65–69.
65. Ballabh P., Braun A., Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications // *Neurobiol Dis*. 2004. Vol. 16, № 1. P. 1–13.
66. Mooradian A.D. Effect of aging on the blood-brain barrier // *Neurobiol Aging*. 1988. Vol. 9, № 1. P. 31–39.
67. Schoknecht K., David Y., Heinemann U. The blood–brain barrier—Gatekeeper to neuronal homeostasis: Clinical implications in the setting of stroke // *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2015. Vol. 38. P. 35–42.
68. Serlin Y. et al. Anatomy and physiology of the blood-brain barrier // *Semin Cell Dev Biol*. 2015. Vol. 38. P. 2–6.
69. Ransohoff R.M., Engelhardt B. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system: 9 // *Nat Rev Immunol*. Nature Publishing Group, 2012. Vol. 12, № 9. P. 623–635.
70. Balda M.S. et al. Multiple domains of occludin are involved in the regulation of paracellular permeability // *J Cell Biochem*. 2000. Vol. 78, № 1. P. 85–96.
71. Nitta T. et al. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice // *J Cell Biol*. 2003. Vol. 161, № 3. P. 653–660.
72. Royo N.C. et al. Pharmacology of traumatic brain injury // *Curr Opin Pharmacol*. 2003. Vol. 3, № 1. P. 27–32.
73. Correale J., Villa A. The blood-brain-barrier in multiple sclerosis: functional roles and therapeutic targeting // *Autoimmunity*. 2007. Vol. 40, № 2. P. 148–160.
74. Heo J.H., Han S.W., Lee S.K. Free radicals as triggers of brain edema formation after stroke // *Free Radic Biol Med*. 2005. Vol. 39, № 1. P. 51–70.
75. Pun P.B.L., Lu J., Moolhalla S. Involvement of ROS in BBB dysfunction // *Free Radical Research*. Taylor & Francis, 2009. Vol. 43, № 4. P. 348–364.
76. Weiner H.L., Selkoe D.J. Inflammation and therapeutic vaccination in CNS diseases // *Nature*. 2002. Vol. 420, № 6917. P. 879–884.

77. Tuttolomondo A., Maida C., Pinto A. Inflammation and Inflammatory Cell Recruitment in Acute Cerebrovascular Diseases // *Current Immunology Reviews*. 2015. Vol. 11, № 1. P. 24–32.
78. Jin R., Yang G., Li G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells // *J Leukoc Biol*. 2010. Vol. 87, № 5. P. 779–789.
79. Vikman P. et al. Cerebral ischemia induces transcription of inflammatory and extracellular-matrix-related genes in rat cerebral arteries // *Exp Brain Res*. 2007. Vol. 183, № 4. P. 499–510.
80. Yang C. et al. Neuroinflammatory mechanisms of blood-brain barrier damage in ischemic stroke // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. American Physiological Society, 2019. Vol. 316, № 2. P. C135–C153.
81. Nussbaum C. et al. Myeloperoxidase: a leukocyte-derived protagonist of inflammation and cardiovascular disease // *Antioxid Redox Signal*. 2013. Vol. 18, № 6. P. 692–713.
82. Zhang R. et al. Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation // *J Biol Chem*. 2002. Vol. 277, № 48. P. 46116–46122.
83. Galijasevic S. et al. Myeloperoxidase up-regulates the catalytic activity of inducible nitric oxide synthase by preventing nitric oxide feedback inhibition // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003. Vol. 100, № 25. P. 14766–14771.
84. Malle E. et al. Myeloperoxidase-mediated oxidation of high-density lipoproteins: fingerprints of newly recognized potential proatherogenic lipoproteins // *Arch Biochem Biophys*. 2006. Vol. 445, № 2. P. 245–255.
85. Tang W.H.W. et al. Plasma myeloperoxidase levels in patients with chronic heart failure // *Am J Cardiol*. 2006. Vol. 98, № 6. P. 796–799.
86. Kim H.J. et al. Reducing myeloperoxidase activity decreases inflammation and increases cellular protection in ischemic stroke // *J Cereb Blood Flow Metab*. 2019. Vol. 39, № 9. P. 1864–1877.
87. Li L.-Z. et al. Potential microglia-based interventions for stroke // *CNS Neuroscience & Therapeutics*. 2020. Vol. 26, № 3. P. 288–296.
88. Kuhn S. et al. Oligodendrocytes in Development, Myelin Generation and Beyond: 11 // *Cells*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2019. Vol. 8, № 11. P. 1424.
89. Hernández I.H. et al. Glial Cells as Therapeutic Approaches in Brain Ischemia-Reperfusion Injury: 7 // *Cells*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2021. Vol. 10, № 7. P. 1639.
90. Illes P. et al. Regulation of Microglial Functions by Purinergic Mechanisms in the Healthy and Diseased CNS: 5 // *Cells*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2020. Vol. 9, № 5. P. 1108.
91. Franco R. et al. Microglial Adenosine Receptors: From Preconditioning to Modulating the M1/M2 Balance in Activated Cells: 5 // *Cells*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2021. Vol. 10, № 5. P. 1124.

92. Clarke L.E., Barres B.A. Emerging roles of astrocytes in neural circuit development: 5 // *Nat Rev Neurosci.* Nature Publishing Group, 2013. Vol. 14, № 5. P. 311–321.
93. Hirrlinger J., Dringen R. The cytosolic redox state of astrocytes: Maintenance, regulation and functional implications for metabolite trafficking // *Brain Research Reviews.* 2010. Vol. 63, № 1. P. 177–188.
94. Dienel G.A., Hertz L. Astrocytic contributions to bioenergetics of cerebral ischemia // *Glia.* 2005. Vol. 50, № 4. P. 362–388.
95. Hasan U., Singh S.K. The Astrocyte–Neuron Interface: An Overview on Molecular and Cellular Dynamics Controlling Formation and Maintenance of the Tripartite Synapse // *Astrocytes: Methods and Protocols* / ed. Di Benedetto B. New York, NY: Springer, 2019. P. 3–18.
96. Nedergaard M., Dirnagl U. Role of glial cells in cerebral ischemia // *Glia.* 2005. Vol. 50, № 4. P. 281–286.
97. Xu S. et al. Glial Cells: Role of the Immune Response in Ischemic Stroke // *Frontiers in Immunology.* 2020. Vol. 11.
98. Pekny M. et al. Astrocyte activation and reactive gliosis—A new target in stroke? // *Neuroscience Letters.* 2019. Vol. 689. P. 45–55.
99. Zhang N. et al. GLAST-CreERT2 mediated deletion of GDNF increases brain damage and exacerbates long-term stroke outcomes after focal ischemic stroke in mouse model // *Glia.* 2020. Vol. 68, № 11. P. 2395–2414.
100. Grabb M., Choi D. Ischemic Tolerance in Murine Cortical Cell Culture: Critical Role for NMDA Receptors // *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 1999. Vol. 19. P. 1657–1662.
101. Thoren A.E. et al. Astrocytic Function Assessed from 1-14C-Acetate Metabolism after Temporary Focal Cerebral Ischemia in Rats // *J Cereb Blood Flow Metab.* SAGE Publications Ltd STM, 2005. Vol. 25, № 4. P. 440–450.
102. Shen X.-Y. et al. Activation and Role of Astrocytes in Ischemic Stroke // *Frontiers in Cellular Neuroscience.* 2021. Vol. 15.
103. Castro M.A. et al. A metabolic switch in brain: glucose and lactate metabolism modulation by ascorbic acid // *J Neurochem.* 2009. Vol. 110, № 2. P. 423–440.
104. Zwingmann C., Leibfritz D., Hazell A.S. Brain energy metabolism in a sub-acute rat model of manganese neurotoxicity: an ex vivo nuclear magnetic resonance study using [1-13C]glucose // *Neurotoxicology.* 2004. Vol. 25, № 4. P. 573–587.
105. Schurr A. Lactate: The Ultimate Cerebral Oxidative Energy Substrate? // *J Cereb Blood Flow Metab.* SAGE Publications Ltd STM, 2006. Vol. 26, № 1. P. 142–152.

106. Rehncrona S. Brain acidosis // *Annals of Emergency Medicine*. Elsevier, 1985. Vol. 14, № 8. P. 770–776.
107. Ros J. et al. Lactate reduces glutamate-induced neurotoxicity in rat cortex // *Journal of Neuroscience Research*. 2001. Vol. 66, № 5. P. 790–794.
108. Berthet C. et al. New Evidence of Neuroprotection by Lactate after Transient Focal Cerebral Ischaemia: Extended Benefit after Intracerebroventricular Injection and Efficacy of Intravenous Administration // *CED*. Karger Publishers, 2012. Vol. 34, № 5–6. P. 329–335.
109. Berthet C. et al. Neuroprotective Role of Lactate after Cerebral Ischemia // *J Cereb Blood Flow Metab*. SAGE Publications Ltd STM, 2009. Vol. 29, № 11. P. 1780–1789.
110. Izumi Y. et al. Endogenous Monocarboxylates Sustain Hippocampal Synaptic Function and Morphological Integrity during Energy Deprivation // *J. Neurosci. Society for Neuroscience*, 1997. Vol. 17, № 24. P. 9448–9457.
111. Jourdain P. et al. L-Lactate protects neurons against excitotoxicity: implication of an ATP-mediated signaling cascade: 1 // *Sci Rep*. Nature Publishing Group, 2016. Vol. 6, № 1. P. 21250.
112. Banerjee A., Ghatak S., Sikdar S.K. l-Lactate mediates neuroprotection against ischaemia by increasing TREK1 channel expression in rat hippocampal astrocytes in vitro // *Journal of Neurochemistry*. 2016. Vol. 138, № 2. P. 265–281.
113. Hertz L., Peng L., Dienel G.A. Energy Metabolism in Astrocytes: High Rate of Oxidative Metabolism and Spatiotemporal Dependence on Glycolysis/Glycogenolysis // *J Cereb Blood Flow Metab*. SAGE Publications Ltd STM, 2007. Vol. 27, № 2. P. 219–249.
114. Hui S. et al. Glucose feeds the TCA cycle via circulating lactate: 7678 // *Nature*. Nature Publishing Group, 2017. Vol. 551, № 7678. P. 115–118.
115. Brooks G.A. Cell–cell and intracellular lactate shuttles // *The Journal of Physiology*. 2009. Vol. 587, № 23. P. 5591–5600.
116. Prebil M. et al. Astrocytes and energy metabolism // *Archives of Physiology and Biochemistry*. Taylor & Francis, 2011. Vol. 117, № 2. P. 64–69.
117. Magistretti P.J., Pellerin L. Astrocytes Couple Synaptic Activity to Glucose Utilization in the Brain // *Physiology*. American Physiological Society, 1999. Vol. 14, № 5. P. 177–182.
118. Brooks G.A. The Science and Translation of Lactate Shuttle Theory // *Cell Metabolism*. 2018. Vol. 27, № 4. P. 757–785.
119. Pellerin L., Magistretti P.J. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994. Vol. 91, № 22. P. 10625–10629.

120. Pierre K., Pellerin L. Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function // *Journal of Neurochemistry*. 2005. Vol. 94, № 1. P. 1–14.
121. Halestrap A.P., Wilson M.C. The monocarboxylate transporter family—Role and regulation // *IUBMB Life*. 2012. Vol. 64, № 2. P. 109–119.
122. Vijay N., Morris M.E. Role of Monocarboxylate Transporters in Drug Delivery to the Brain // *Current Pharmaceutical Design*. 2014. Vol. 20, № 10. P. 1487–1498.
123. Gao C. et al. Monocarboxylate transporter-dependent mechanism confers resistance to oxygen- and glucose-deprivation injury in astrocyte-neuron co-cultures // *Neuroscience Letters*. 2015. Vol. 594. P. 99–104.
124. Brown A.M., Ransom B.R. Astrocyte glycogen as an emergency fuel under conditions of glucose deprivation or intense neural activity // *Metab Brain Dis*. 2015. Vol. 30, № 1. P. 233–239.
125. Magistretti P.J., Allaman I. Lactate in the brain: from metabolic end-product to signalling molecule: 4 // *Nat Rev Neurosci*. Nature Publishing Group, 2018. Vol. 19, № 4. P. 235–249.
126. Schurr A. et al. Blockade of lactate transport exacerbates delayed neuronal damage in a rat model of cerebral ischemia // *Brain Research*. 2001. Vol. 895, № 1. P. 268–272.
127. Falkowska A. et al. Energy Metabolism of the Brain, Including the Cooperation between Astrocytes and Neurons, Especially in the Context of Glycogen Metabolism: 11 // *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2015. Vol. 16, № 11. P. 25959–25981.
128. Yamagata K. Lactate Supply from Astrocytes to Neurons and its Role in Ischemic Stroke-induced Neurodegeneration // *Neuroscience*. 2022. Vol. 481. P. 219–231.
129. Antonic A. et al. Human In Vitro Models of Ischaemic Stroke: a Test Bed for Translation // *Transl. Stroke Res*. 2012. Vol. 3, № 3. P. 306–309.
130. Holloway P.M., Gavins F.N.E. Modeling Ischemic Stroke In Vitro: Status Quo and Future Perspectives // *Stroke*. American Heart Association, 2016. Vol. 47, № 2. P. 561–569.
131. Kurian G.A., Pemaih B. Standardization of in vitro Cell-based Model for Renal Ischemia and Reperfusion Injury // *Indian J Pharm Sci*. 2014. Vol. 76, № 4. P. 348–353.
132. Brown R.C., Davis T.P. Hypoxia/aglycemia alters expression of occludin and actin in brain endothelial cells // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005. Vol. 327, № 4. P. 1114–1123.
133. Goldberg M.P., Choi D.W. Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury // *J. Neurosci*. Society for Neuroscience, 1993. Vol. 13, № 8. P. 3510–3524.

134. Engelhardt J. von et al. Excitotoxicity in vitro by NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors // *Neuropharmacology*. 2007. Vol. 53, № 1. P. 10–17.
135. Fluri F., Schuhmann M.K., Kleinschnitz C. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research // *Drug Des Devel Ther*. 2015. Vol. 9. P. 3445–3454.
136. Banker G.A., Cowan W.M. Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture // *Brain Research*. 1977. Vol. 126, № 3. P. 397–425.
137. Abney E.R., Bartlett P.P., Raff M.C. Astrocytes, ependymal cells, and oligodendrocytes develop on schedule in dissociated cell cultures of embryonic rat brain // *Developmental Biology*. 1981. Vol. 83, № 2. P. 301–310.
138. Haile Y. et al. Characterization of the NT2-derived neuronal and astrocytic cell lines as alternative in vitro models for primary human neurons and astrocytes // *Journal of Neuroscience Research*. 2014. Vol. 92, № 9. P. 1187–1198.
139. Selvaraj V. Differentiating human stem cells into neurons and glial cells for neural repair // *Front Biosci*. 2012. Vol. 17, № 1. P. 65.
140. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors // *Cell*. 2006. Vol. 126, № 4. P. 663–676.
141. Cho S., Wood A., Bowlby M.R. Brain slices as models for neurodegenerative disease and screening platforms to identify novel therapeutics // *Curr Neuropharmacol*. 2007. Vol. 5, № 1. P. 19–33.
142. Birgbauer E., Rao T.S., Webb M. Lysolecithin induces demyelination in vitro in a cerebellar slice culture system // *J Neurosci Res*. 2004. Vol. 78, № 2. P. 157–166.
143. Rytter A. et al. Mouse hippocampal organotypic tissue cultures exposed to in vitro “ischemia” show selective and delayed CA1 damage that is aggravated by glucose // *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003. Vol. 23, № 1. P. 23–33.
144. Krassioukov A.V. et al. An in vitro model of neurotrauma in organotypic spinal cord cultures from adult mice // *Brain Res Brain Res Protoc*. 2002. Vol. 10, № 2. P. 60–68.
145. Dong W.Q. et al. The rat hippocampal slice preparation as an in vitro model of ischemia. // *Stroke*. American Heart Association, 1988. Vol. 19, № 4. P. 498–502.
146. Vornov J.J., Tasker R.C., Coyle J.T. Delayed protection by MK-801 and tetrodotoxin in a rat organotypic hippocampal culture model of ischemia. // *Stroke*. American Heart Association, 1994. Vol. 25, № 2. P. 457–464.
147. Li Q., Han X., Wang J. Organotypic Hippocampal Slices as Models for Stroke and Traumatic Brain Injury // *Mol Neurobiol*. 2016. Vol. 53, № 6. P. 4226–4237.
148. Yamori Y. et al. Pathogenetic similarity of strokes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats and humans. // *Stroke*. American Heart Association, 1976. Vol. 7, № 1. P. 46–53.

149. Lo E.H. Experimental models, neurovascular mechanisms and translational issues in stroke research // *British Journal of Pharmacology*. 2008. Vol. 153, № S1. P. S396–S405.
150. Mhairi M.I. New models of focal cerebral ischaemia. // *British Journal of Clinical Pharmacology*. 1992. Vol. 34, № 4. P. 302–308.
151. Uluç K. et al. Focal cerebral ischemia model by endovascular suture occlusion of the middle cerebral artery in the rat // *J Vis Exp*. 2011. № 48. P. 1978.
152. Longa E.Z. et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats // *Stroke*. 1989. Vol. 20, № 1. P. 84–91.
153. Tamura A. et al. Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion // *J Cereb Blood Flow Metab*. 1981. Vol. 1, № 1. P. 53–60.
154. van Bruggen N. et al. VEGF antagonism reduces edema formation and tissue damage after ischemia/reperfusion injury in the mouse brain // *J Clin Invest*. 1999. Vol. 104, № 11. P. 1613–1620.
155. Macrae I.M. et al. Endothelin-1-induced reductions in cerebral blood flow: dose dependency, time course, and neuropathological consequences // *J Cereb Blood Flow Metab*. 1993. Vol. 13, № 2. P. 276–284.
156. Canazza A. et al. Experimental Models of Brain Ischemia: A Review of Techniques, Magnetic Resonance Imaging, and Investigational Cell-Based Therapies // *Frontiers in Neurology*. 2014. Vol. 5.
157. Lemmerman L.R. et al. Transient Middle Cerebral Artery Occlusion with an Intraluminal Suture Enables Reproducible Induction of Ischemic Stroke in Mice // *Bio-protocol*. 2021. Vol. 12, № 3. P. e4305–e4305.
158. Ганцгорн Е.В. Комплексный анализ нейропротекторной активности ноотропов и их комбинаций с мелаксеном при экспериментальной ишемии головного мозга: кандидат медицинских наук: 14.03.06. Волгоград, 2014. 237 p.
159. Hill M.D. et al. Biochemical markers in acute ischemic stroke // *CMAJ*. 2000. Vol. 162, № 8. P. 1139–1140.
160. Nayak A.R. et al. Evaluation of routinely performed hematological and biochemical parameters for the prognosis of acute ischemic stroke patients // *Neurol Sci*. 2011. Vol. 32, № 5. P. 855.
161. Heindl S. et al. Automated Morphological Analysis of Microglia After Stroke // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2018. Vol. 12.
162. Pantano P. et al. Motor recovery after stroke: Morphological and functional brain alterations // *Brain*. 1996. Vol. 119, № 6. P. 1849–1857.

163. Liu X.S. et al. Gene Profiles and Electrophysiology of Doublecortin-Expressing Cells in the Subventricular Zone after Ischemic Stroke // *J Cereb Blood Flow Metab.* SAGE Publications Ltd STM, 2009. Vol. 29, № 2. P. 297–307.
164. Weber R. et al. Early Prediction of Functional Recovery after Experimental Stroke: Functional Magnetic Resonance Imaging, Electrophysiology, and Behavioral Testing in Rats // *J. Neurosci. Society for Neuroscience*, 2008. Vol. 28, № 5. P. 1022–1029.
165. Haghani M. et al. Electrophysiology of cerebral ischemia and reperfusion: First evidence for the role of synapse in ischemic tolerance // *Synapse*. 2016. Vol. 70, № 9. P. 351–360.
166. Dijkhuizen R.M. et al. Functional MRI and Diffusion Tensor Imaging of Brain Reorganization After Experimental Stroke // *Transl. Stroke Res.* 2012. Vol. 3, № 1. P. 36–43.
167. Read S.J. et al. Identifying hypoxic tissue after acute ischemic stroke using PET and 18F-fluoromisonidazole // *Neurology*. Wolters Kluwer Health, Inc. on behalf of the American Academy of Neurology, 1998. Vol. 51, № 6. P. 1617–1621.
168. Magistretti P.J., Allaman I. A Cellular Perspective on Brain Energy Metabolism and Functional Imaging // *Neuron*. Elsevier, 2015. Vol. 86, № 4. P. 883–901.
169. Ogawa S. et al. Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1990. Vol. 87, № 24. P. 9868–9872.
170. Ntziachristos V., Razansky D. Molecular Imaging by Means of Multispectral Optoacoustic Tomography (MSOT) // *Chem. Rev.* American Chemical Society, 2010. Vol. 110, № 5. P. 2783–2794.
171. Ni R. et al. Noninvasive detection of acute cerebral hypoxia and subsequent matrix-metalloproteinase activity in a mouse model of cerebral ischemia using multispectral-optoacoustic-tomography // *NPh*. SPIE, 2018. Vol. 5, № 1. P. 015005.
172. Li Y.-S., Church J.S. Raman spectroscopy in the analysis of food and pharmaceutical nanomaterials // *J Food Drug Anal.* 2014. Vol. 22, № 1. P. 29–48.
173. Schmitt M., Popp J. Raman spectroscopy at the beginning of the twenty-first century // *undefined*. 2006.
174. Devitt G. et al. Raman Spectroscopy: An Emerging Tool in Neurodegenerative Disease Research and Diagnosis // *ACS Chem. Neurosci.* American Chemical Society, 2018. Vol. 9, № 3. P. 404–420.
175. Jung G.B. et al. Biochemical Characterization of the Brain Hippocampal Areas after Cerebral Ischemia-Reperfusion Using Raman Spectroscopy // *Appl Spectrosc.* 2018. Vol. 72, № 10. P. 1479–1486.

176. NONLINEAR OPTICS, BASICS | $\chi(3)$ –Third-Harmonic Generation. Elsevier, 2005. P. 223–228.
177. Witte S. et al. Label-free live brain imaging and targeted patching with third-harmonic generation microscopy // Proceedings of the National Academy of Sciences. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. Vol. 108, № 15. P. 5970–5975.
178. Theer P., Hasan M.T., Denk W. Two-photon imaging to a depth of 1000 μm in living brains by use of a Ti:Al₂O₃ regenerative amplifier // Opt. Lett., OL. Optica Publishing Group, 2003. Vol. 28, № 12. P. 1022–1024.
179. Svoboda K., Yasuda R. Principles of Two-Photon Excitation Microscopy and Its Applications to Neuroscience // Neuron. Elsevier, 2006. Vol. 50, № 6. P. 823–839.
180. Pérez-Alvarez A., Araque A., Martín E. Confocal microscopy for astrocyte in vivo imaging: Recycle and reuse in microscopy // Frontiers in Cellular Neuroscience. 2013. Vol. 7.
181. Deo C., Lavis L.D. Synthetic and genetically encoded fluorescent neural activity indicators // Curr Opin Neurobiol. 2018. Vol. 50. P. 101–108.
182. Tsien R.Y. New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures // Biochemistry. American Chemical Society, 1980. Vol. 19, № 11. P. 2396–2404.
183. Gee K.R. et al. Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca²⁺-indicator dyes // Cell Calcium. 2000. Vol. 27, № 2. P. 97–106.
184. Collot M. et al. CaRuby-Nano: a novel high affinity calcium probe for dual color imaging // eLife / ed. Raman I.M. eLife Sciences Publications, Ltd, 2015. Vol. 4. P. e05808.
185. D. Craggs T. Green fluorescent protein: structure, folding and chromophore maturation // Chemical Society Reviews. Royal Society of Chemistry, 2009. Vol. 38, № 10. P. 2865–2875.
186. Билан Д.С. Генетически кодируемые флуоресцентные сенсоры окислительно-восстановительных процессов в живых системах: кандидат биологических наук. Москва: ИБХ РАН, 2014. 127 p.
187. Chudakov D.M. et al. Fluorescent Proteins and Their Applications in Imaging Living Cells and Tissues // Physiological Reviews. American Physiological Society, 2010. Vol. 90, № 3. P. 1103–1163.
188. Zacharias D.A. et al. Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells // Science. 2002. Vol. 296, № 5569. P. 913–916.
189. Ormö M. et al. Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein // Science. 1996. Vol. 273, № 5280. P. 1392–1395.

190. Билан Д.С., Лукьянов С.А., Белоусов В.В. Генетически Кодированные Флуоресцентные Сенсоры Окислительно-Восстановительных Процессов // *Биоорганическая Химия*. 2015. Vol. 41, № 3. P. 231–244.
191. Сулова Е.А., Чудаков Д.М. Генетически кодируемые внутриклеточные сенсоры на основе флуоресцентных белков (обзор) // *Биохимия*. 2007. Vol. 72, № 7. P. 837–855.
192. Tsien R.Y., Bacskaï B.J., Adams S.R. FRET for studying intracellular signalling // *Trends in Cell Biology*. 1993. Vol. 3, № 7. P. 242–245.
193. Piston D.W., Kremers G.-J. Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly // *Trends in Biochemical Sciences*. 2007. Vol. 32, № 9. P. 407–414.
194. Захаров В.В. Лазерная сканирующая микроскопия периодических пространственных структур: кандидат физико-математических наук. Санкт-Петербург, 2014. 122 p.
195. Kremers G.-J. et al. Cyan and Yellow Super Fluorescent Proteins with Improved Brightness, Protein Folding, and FRET Förster Radius, // *Biochemistry*. American Chemical Society, 2006. Vol. 45, № 21. P. 6570–6580.
196. Kostyuk A.I. et al. Redox biosensors in a context of multiparameter imaging // *Free Radic Biol Med*. 2018. Vol. 128. P. 23–39.
197. Heim N., Griesbeck O. Genetically encoded indicators of cellular calcium dynamics based on troponin C and green fluorescent protein // *J Biol Chem*. 2004. Vol. 279, № 14. P. 14280–14286.
198. Mank M. et al. A FRET-based calcium biosensor with fast signal kinetics and high fluorescence change // *Biophys J*. 2006. Vol. 90, № 5. P. 1790–1796.
199. Mank M. et al. A genetically encoded calcium indicator for chronic in vivo two-photon imaging: 9 // *Nat Methods*. Nature Publishing Group, 2008. Vol. 5, № 9. P. 805–811.
200. Yoon S. et al. FRET-Based Ca²⁺ Biosensor Single Cell Imaging Interrogated by High-Frequency Ultrasound // *Sensors (Basel)*. 2020. Vol. 20, № 17. P. E4998.
201. Okumoto S. et al. Detection of glutamate release from neurons by genetically encoded surface-displayed FRET nanosensors // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005. Vol. 102, № 24. P. 8740–8745.
202. Kaper T. et al. Nanosensor detection of an immunoregulatory tryptophan influx/kynurenine efflux cycle // *PLoS Biol*. 2007. Vol. 5, № 10. P. e257.
203. Honda A. et al. Spatiotemporal dynamics of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate revealed by a genetically encoded, fluorescent indicator // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001. Vol. 98, № 5. P. 2437–2442.
204. Krogt G.N.M. van der et al. A comparison of donor-acceptor pairs for genetically encoded FRET sensors: application to the Epac cAMP sensor as an example // *PLoS One*. 2008. Vol. 3, № 4. P. e1916.

205. Violin J.D. et al. A genetically encoded fluorescent reporter reveals oscillatory phosphorylation by protein kinase C // *J Cell Biol.* 2003. Vol. 161, № 5. P. 899–909.
206. Zhang J. et al. Genetically encoded reporters of protein kinase A activity reveal impact of substrate tethering // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001. Vol. 98, № 26. P. 14997–15002.
207. Matz M.V. et al. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species // *Nat Biotechnol.* 1999. Vol. 17, № 10. P. 969–973.
208. Baird G.S., Zacharias D.A., Tsien R.Y. Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999. Vol. 96, № 20. P. 11241–11246.
209. Nakai J., Ohkura M., Imoto K. A high signal-to-noise Ca²⁺ probe composed of a single green fluorescent protein: 2 // *Nat Biotechnol.* Nature Publishing Group, 2001. Vol. 19, № 2. P. 137–141.
210. Nagai T. et al. Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca²⁺ // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001. Vol. 98, № 6. P. 3197–3202.
211. Hackley C.R., Mazzoni E.O., Blau J. cAMPr: A single-wavelength fluorescent sensor for cyclic AMP // *Science Signaling.* American Association for the Advancement of Science, 2018. Vol. 11, № 520. P. eaah3738.
212. Berg J., Hung Y.P., Yellen G. A genetically encoded fluorescent reporter of ATP:ADP ratio // *Nat Methods.* 2009. Vol. 6, № 2. P. 161–166.
213. Zhao Y. et al. SoNar, a Highly Responsive NAD⁺/NADH Sensor, Allows High-Throughput Metabolic Screening of Anti-tumor Agents // *Cell Metabolism.* 2015. Vol. 21, № 5. P. 777–789.
214. Bergamini C.M. et al. Oxygen, Reactive Oxygen Species and Tissue Damage // *Current Pharmaceutical Design.* 2004. Vol. 10, № 14. P. 1611–1626.
215. Belousov V.V. et al. Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide: 4 // *Nat Methods.* Nature Publishing Group, 2006. Vol. 3, № 4. P. 281–286.
216. Белоусов В.В., Ениколопов Г.Н., Мишина Н.М. Компарментализация Передачи Сигналов, Опосредованных Активными Формами Кислорода // *Биоорганическая Химия.* 2013. Vol. 39, № 4. P. 383–399.
217. Markvicheva K.N. et al. A genetically encoded sensor for H₂O₂ with expanded dynamic range // *Bioorg Med Chem.* 2011. Vol. 19, № 3. P. 1079–1084.
218. 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, № 3. P. 535–542.
219. Hanson G.T. et al. Green fluorescent protein variants as ratiometric dual emission pH sensors. 1. Structural characterization and preliminary application // *Biochemistry.* 2002. Vol. 41, № 52. P. 15477–15488.

220. Elsliger M.A. et al. Structural and spectral response of green fluorescent protein variants to changes in pH // *Biochemistry*. 1999. Vol. 38, № 17. P. 5296–5301.
221. Schwarzländer M. et al. The circularly permuted yellow fluorescent protein cpYFP that has been used as a superoxide probe is highly responsive to pH but not superoxide in mitochondria: implications for the existence of superoxide “flashes” // *Biochem J*. 2011. Vol. 437, № 3. P. 381–387.
222. Llopis J. et al. Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998. Vol. 95, № 12. P. 6803–6808.
223. Злотина М.М., Емельянов В.В., Чиркова Т.В. Флуоресцентные сенсоры, используемые для изучения роли вторичных посредников в клеточной сигнализации // *Вестник Санкт-Петербургского Университета. Серия 3. Биология*. 2011. № 2. P. 100–118.
224. Pak V.V. et al. Ultrasensitive Genetically Encoded Indicator for Hydrogen Peroxide Identifies Roles for the Oxidant in Cell Migration and Mitochondrial Function // *Cell Metabolism*. 2020. Vol. 31, № 3. P. 642-653.e6.
225. Ermakova Y.G. et al. Red fluorescent genetically encoded indicator for intracellular hydrogen peroxide // *Nat Commun*. 2014. Vol. 5. P. 5222.
226. Webb B.A. et al. Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression // *Nat Rev Cancer*. 2011. Vol. 11, № 9. P. 671–677.
227. Labi V., Erlacher M. How cell death shapes cancer // *Cell Death Dis*. 2015. Vol. 6. P. e1675.
228. Miesenböck G., De Angelis D.A., Rothman J.E. Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins // *Nature*. 1998. Vol. 394, № 6689. P. 192–195.
229. Bagar T. et al. Live-Cell Imaging and Measurement of Intracellular pH in Filamentous Fungi Using a Genetically Encoded Ratiometric Probe // *Eukaryotic Cell*. American Society for Microbiology, 2009. Vol. 8, № 5. P. 703–712.
230. Poburko D., Santo-Domingo J., Demaurex N. Dynamic regulation of the mitochondrial proton gradient during cytosolic calcium elevations // *J Biol Chem*. 2011. Vol. 286, № 13. P. 11672–11684.
231. Matlashov M.E. et al. Fluorescent ratiometric pH indicator SypHer2: Applications in neuroscience and regenerative biology // *Biochim Biophys Acta*. 2015. Vol. 1850, № 11. P. 2318–2328.
232. Ermakova 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.
233. Requardt R.P. et al. Ca²⁺ signals of astrocytes are modulated by the NAD⁺/NADH redox state // *Journal of Neurochemistry*. 2012. Vol. 120, № 6. P. 1014–1025.

234. Oka S., Hsu C.-P., Sadoshima J. Regulation of Cell Survival and Death by Pyridine Nucleotides // *Circulation Research*. American Heart Association, 2012. Vol. 111, № 5. P. 611–627.
235. Xia W. et al. Roles of NAD⁺ / NADH and NADP⁺ / NADPH in Cell Death // *Current Pharmaceutical Design*. 2009. Vol. 15, № 1. P. 12–19.
236. Bilan D.S., Belousov V.V. Genetically encoded probes for NAD⁺/NADH monitoring // *Free Radical Biology and Medicine*. 2016. Vol. 100. P. 32–42.
237. Hung Y.P. et al. Imaging cytosolic NADH-NAD(+) redox state with a genetically encoded fluorescent biosensor // *Cell Metab*. 2011. Vol. 14, № 4. P. 545–554.
238. Zhao Y. et al. Genetically Encoded Fluorescent Sensors for Intracellular NADH Detection // *Cell Metabolism*. 2011. Vol. 14, № 4. P. 555–566.
239. Bilan D.S. et al. Genetically encoded fluorescent indicator for imaging NAD⁺/NADH ratio changes in different cellular compartments // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2014. Vol. 1840, № 3. P. 951–957.
240. Zerez C.R., Lee S.J., Tanaka K.R. Spectrophotometric determination of oxidized and reduced pyridine nucleotides in erythrocytes using a single extraction procedure // *Anal Biochem*. 1987. Vol. 164, № 2. P. 367–373.
241. Билан Д.С., Белоусов В.В., Лукьянов С.А. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая флуоресцентный биосенсор, кассета экспрессии, клетка продуцирующая флуоресцентный биосенсор, выделенный флуоресцентный биосенсор: pat. RU2515903C2 USA. 2014.
242. Kostyuk A.I. et al. Hypocrates is a genetically encoded fluorescent biosensor for (pseudo)hypohalous acids and their derivatives: 1 // *Nat Commun*. Nature Publishing Group, 2022. Vol. 13, № 1. P. 171.
243. Kostyuk A.I. et al. In Vivo Imaging with Genetically Encoded Redox Biosensors // *Int J Mol Sci*. 2020. Vol. 21, № 21. P. E8164.
244. Seibenhener M.L., Wooten M.W. Isolation and culture of hippocampal neurons from prenatal mice // *J Vis Exp*. 2012. № 65. P. 3634.
245. TALON® Metal Affinity Resins User Manual. P. 15.
246. Костюк А.И. et al. Изменение ключевых параметров метаболизма липидов в тканях мозга крыс при перманентной ишемии // *Вестник Российского Государственного Медицинского Университета*. 2019. № 1.
247. Morgan B. et al. Real-time monitoring of basal H₂O₂ levels with peroxiredoxin-based probes: 6 // *Nat Chem Biol*. Nature Publishing Group, 2016. Vol. 12, № 6. P. 437–443.

248. Rousselet E., Kriz J., Seidah N.G. Mouse Model of Intraluminal MCAO: Cerebral Infarct Evaluation by Cresyl Violet Staining // *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2012. № 69. P. e4038.
249. Chebotarev A.S. et al. Enhanced-contrast two-photon optogenetic pH sensing and pH -resolved brain imaging // *J. Biophotonics*. 2021. Vol. 14, № 3.
250. Senda M. et al. Evaluation of the $^{11}\text{C}\text{CO}_2$ Positron Emission Tomographic Method for Measuring Brain pH. II. Quantitative pH Mapping in Patients with Ischemic Cerebrovascular Diseases // *J Cereb Blood Flow Metab. SAGE Publications Ltd STM*, 1989. Vol. 9, № 6. P. 859–873.
251. Yu L. et al. Amide Proton Transfer MRI Signal as a Surrogate Biomarker of Ischemic Stroke Recovery in Patients With Supportive Treatment // *Frontiers in Neurology*. 2019. Vol. 10.
252. Heiss W.-D., Sobesky J. Comparison of PET and DW/PW-MRI in acute ischemic stroke // *Keio J Med*. 2008. Vol. 57, № 3. P. 125–131.
253. Vilela P., Rowley H.A. Brain ischemia: CT and MRI techniques in acute ischemic stroke // *Eur J Radiol*. 2017. Vol. 96. P. 162–172.
254. Warden M.R., Cardin J.A., Deisseroth K. Optical Neural Interfaces // *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2014. Vol. 16, № 1. P. 103–129.
255. Doronina-Amitonova L.V. et al. Implantable fiber-optic interface for parallel multisite long-term optical dynamic brain interrogation in freely moving mice: 1 // *Sci Rep. Nature Publishing Group*, 2013. Vol. 3, № 1. P. 3265.
256. Kim C.K. et al. Simultaneous fast measurement of circuit dynamics at multiple sites across the mammalian brain: 4 // *Nat Methods. Nature Publishing Group*, 2016. Vol. 13, № 4. P. 325–328.
257. Sych Y. et al. High-density multi-fiber photometry for studying large-scale brain circuit dynamics: 6 // *Nat Methods. Nature Publishing Group*, 2019. Vol. 16, № 6. P. 553–560.
258. Kostyuk A.I. et al. Circularly Permuted Fluorescent Protein-Based Indicators: History, Principles, and Classification // *Int J Mol Sci*. 2019. Vol. 20, № 17. P. E4200.
259. Билан Д.С. et al. Регистрация динамики соотношения НАД⁺/НАДН в тканях эмбрионов рыб *Danio rerio* с помощью генетически кодируемого биосенсора // *Вестник Российского Государственного Медицинского Университета*. 2018. № 1. P. 74–79.
260. Hanson G.T. et al. Investigating Mitochondrial Redox Potential with Redox-sensitive Green Fluorescent Protein Indicators * // *Journal of Biological Chemistry. Elsevier*, 2004. Vol. 279, № 13. P. 13044–13053.
261. Gutscher M. et al. Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential: 6 // *Nat Methods. Nature Publishing Group*, 2008. Vol. 5, № 6. P. 553–559.

262. Sugiura K. et al. Redox sensor proteins for highly sensitive direct imaging of intracellular redox state // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2015. Vol. 457, № 3. P. 242–248.
263. Shokhina A.G. et al. Red fluorescent redox-sensitive biosensor Grx1-roCherry // *Redox Biology*. 2019. Vol. 21. P. 101071.
264. Subach O.M. et al. Slowly Reducible Genetically Encoded Green Fluorescent Indicator for In Vivo and Ex Vivo Visualization of Hydrogen Peroxide: 13 // *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2019. Vol. 20, № 13. P. 3138.
265. Lentz T.B., Gray S.J., Samulski R.J. Viral vectors for gene delivery to the central nervous system // *Neurobiol Dis*. 2012. Vol. 48, № 2. P. 179–188.
266. Atchison R.W., Casto B.C., Hammon W.McD. Adenovirus-Associated Defective Virus Particles // *Science*. American Association for the Advancement of Science, 1965. Vol. 149, № 3685. P. 754–756.
267. Dong B., Nakai H., Xiao W. Characterization of Genome Integrity for Oversized Recombinant AAV Vector // *Molecular Therapy*. 2010. Vol. 18, № 1. P. 87–92.
268. Abulimiti A., Lai M.S.-L., Chang R.C.-C. Applications of adeno-associated virus vector-mediated gene delivery for neurodegenerative diseases and psychiatric diseases: Progress, advances, and challenges // *Mechanisms of Ageing and Development*. 2021. Vol. 199. P. 111549.
269. Powell S.K., Rivera-Soto R., Gray S.J. Viral expression cassette elements to enhance transgene target specificity and expression in gene therapy // *Discov Med*. 2015. Vol. 19, № 102. P. 49–57.
270. Brenner M. et al. GFAP promoter directs astrocyte-specific expression in transgenic mice // *J. Neurosci*. Society for Neuroscience, 1994. Vol. 14, № 3. P. 1030–1037.
271. Kügler S., Kilic E., Bähr M. Human synapsin 1 gene promoter confers highly neuron-specific long-term transgene expression from an adenoviral vector in the adult rat brain depending on the transduced area: 4 // *Gene Ther*. Nature Publishing Group, 2003. Vol. 10, № 4. P. 337–347.
272. Lee Y. et al. GFAP promoter elements required for region-specific and astrocyte-specific expression // *Glia*. 2008. Vol. 56, № 5. P. 481–493.
273. Rizzuto R. et al. A Gene Specifying Subunit VIII of Human Cytochrome c Oxidase Is Localized to Chromosome 11 and Is Expressed in Both Muscle and Non-muscle Tissues // *Journal of Biological Chemistry*. 1989. Vol. 264, № 18. P. 10595–10600.
274. Liu D. et al. Crossing the blood-brain barrier with AAV vectors // *Metab Brain Dis*. 2021. Vol. 36, № 1. P. 45–52.
275. Gao G. et al. Clades of Adeno-Associated Viruses Are Widely Disseminated in Human Tissues // *Journal of Virology*. American Society for Microbiology, 2004. Vol. 78, № 12. P. 6381–6388.

276. Gao G.-P. et al. Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. Vol. 99, № 18. P. 11854–11859.
277. Wu Z., Asokan A., Samulski R.J. Adeno-associated Virus Serotypes: Vector Toolkit for Human Gene Therapy // *Molecular Therapy*. Elsevier, 2006. Vol. 14, № 3. P. 316–327.
278. Borodinova A.A. et al. Genetic Constructs for the Control of Astrocytes' Activity: 7 // *Cells*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2021. Vol. 10, № 7. P. 1600.
279. Petrosyan H.A. et al. Transduction efficiency of neurons and glial cells by AAV-1, -5, -9, -rh10 and -hu11 serotypes in rat spinal cord following contusion injury // *Gene Ther*. 2014. Vol. 21, № 12. P. 991–1000.
280. Gray S.J., Woodard K.T., Samulski R.J. Viral vectors and delivery strategies for CNS gene therapy // *Therapeutic Delivery*. Future Science, 2010. Vol. 1, № 4. P. 517–534.
281. Tsien R.Y. THE GREEN FLUORESCENT PROTEIN // *Annu. Rev. Biochem*. 1998. Vol. 67, № 1. P. 509–544.
282. Heim R., Prasher D.C., Tsien R.Y. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994. Vol. 91, № 26. P. 12501–12504.
283. Hess S.T., Heikal A.A., Webb W.W. Fluorescence Photoconversion Kinetics in Novel Green Fluorescent Protein pH Sensors (pHluorins) // *J. Phys. Chem. B*. American Chemical Society, 2004. Vol. 108, № 28. P. 10138–10148.
284. Pérez-Escuredo J. et al. Monocarboxylate transporters in the brain and in cancer // *Biochim Biophys Acta*. 2016. Vol. 1863, № 10. P. 2481–2497.
285. Cramer S.W. et al. Through the looking glass: A review of cranial window technology for optical access to the brain // *J Neurosci Methods*. 2021. Vol. 354. P. 109100.
286. Holtmaat A. et al. Imaging neocortical neurons through a chronic cranial window // *Cold Spring Harb Protoc*. 2012. Vol. 2012, № 6. P. 694–701.
287. Isshiki M., Okabe S. Evaluation of cranial window types for in vivo two-photon imaging of brain microstructures // *Microscopy (Oxf)*. 2014. Vol. 63, № 1. P. 53–63.
288. Mayevsky A. Brain NADH redox state monitored in vivo by fiber optic surface fluorometry // *Brain Research Reviews*. 1984. Vol. 7, № 1. P. 49–68.
289. Garofalo O., Cox D.W.G., Bachelard H.S. Brain Levels of NADH and NAD⁺ Under Hypoxic and Hypoglycaemic Conditions In Vitro // *Journal of Neurochemistry*. 1988. Vol. 51, № 1. P. 172–176.
290. Williamson D.H., Lund P., Krebs H.A. The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver // *Biochem J*. 1967. Vol. 103, № 2. P. 514–527.

291. Hochachka P.W., Mommsen T.P. Protons and Anaerobiosis // *Science*. American Association for the Advancement of Science, 1983. Vol. 219, № 4591. P. 1391–1397.
292. Paschen W. et al. Lactate and pH in the Brain: Association and Dissociation in Different Pathophysiological States // *Journal of Neurochemistry*. 1987. Vol. 48, № 1. P. 154–159.
293. Combs D.J. et al. Relationship between plasma glucose, brain lactate, and intracellular pH during cerebral ischemia in gerbils. // *Stroke*. American Heart Association, 1990. Vol. 21, № 6. P. 936–942.
294. Li C., Jackson R.M. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. American Physiological Society, 2002. Vol. 282, № 2. P. C227–C241.
295. Chen R. et al. Reactive Oxygen Species Formation in the Brain at Different Oxygen Levels: The Role of Hypoxia Inducible Factors // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2018. Vol. 6.
296. Granger D.N., Kvietyts P.R. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept // *Redox Biology*. 2015. Vol. 6. P. 524–551.
297. Kelmanson I.V., Kotova D.A., Shokhina A.G. In vivo dynamics of acidosis and oxidative stress in the acute phase of an ischemic stroke in a rodent model // *Redox Biology*. 2021. Vol. 48. P. 102178.
298. Rosafio K. et al. Cell-specific modulation of monocarboxylate transporter expression contributes to the metabolic reprogramming taking place following cerebral ischemia // *Neuroscience*. 2016. Vol. 317. P. 108–120.
299. Dringen R., Wiesinger H., Hamprecht B. Uptake of L-lactate by cultured rat brain neurons // *Neurosci Lett*. 1993. Vol. 163, № 1. P. 5–7.
300. Volk C, Kempfski B, Kempfski Os. Inhibition of lactate export by quercetin acidifies rat glial cells in vitro // *Neuroscience letters*. *Neurosci Lett*, 1997. Vol. 223, № 2.
301. Nanadikar M.S. et al. O₂ affects mitochondrial functionality ex vivo // *Redox Biology*. 2019. Vol. 22. P. 101152.
302. Rupadevi M., Parasuraman S., Raveendran R. Protocol for middle cerebral artery occlusion by an intraluminal suture method // *J Pharmacol Pharmacother*. 2011. Vol. 2, № 1. P. 36–39.
303. Bo B. et al. Optogenetic translocation of protons out of penumbral neurons is protective in a rodent model of focal cerebral ischemia // *Brain Stimulation: Basic, Translational, and Clinical Research in Neuromodulation*. Elsevier, 2020. Vol. 13, № 3. P. 881–890.
304. Harston G.W.J. et al. Identifying the ischaemic penumbra using pH-weighted magnetic resonance imaging // *Brain*. 2015. Vol. 138, № 1. P. 36–42.

305. Serteser M. et al. Lipid Peroxidation in Rat Brain During Focal Cerebral Ischemia: Prevention of Malondialdehyde and Lipid Conjugated Diene Production by a Novel Antiepileptic, Lamotrigine // *NeuroToxicology*. 2002. Vol. 23, № 1. P. 111–119.
306. Di Cesare Mannelli L. et al. PPAR- γ Impairment Alters Peroxisome Functionality in Primary Astrocyte Cell Cultures // *BioMed Research International*. Hindawi, 2014. Vol. 2014. P. e546453.
307. Liddelov S.A., Marsh S.E., Stevens B. Microglia and Astrocytes in Disease: Dynamic Duo or Partners in Crime? // *Trends in Immunology*. 2020. Vol. 41, № 9. P. 820–835.