УДК 577.352.4

# ИЗМЕНЕНИЯ рН В МАТРИКСЕ МИТОХОНДРИЙ И ЦИТОЗОЛЕ ПРИ ИНДУЦИРОВАННОЙ ГЛУТАМАТОМ ДИСРЕГУЛЯЦИИ Ca<sup>2+</sup>-ГОМЕОСТАЗА В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ НЕЙРОНАХ ГИППОКАМПА КРЫСЫ

© 2022 г. А. М. Сурин<sup>*a*, *b*, \*, Л. Р. Горбачева<sup>*c*, *d*</sup>, И. Г. Савинкова<sup>*c*</sup>, Р. Р. Шарипов<sup>*a*</sup>, В. Г. Пинелис<sup>*b*</sup></sup>

<sup>а</sup>НИИ общей патологии и патофизиологии, Москва, 125315 Россия <sup>b</sup>"НМИЦ здоровья детей" Минздрава России, Москва, 119991 Россия <sup>c</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, 117513 Россия <sup>d</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119234 Россия \*e-mail: surin\_am@mail.ru

Поступила в редакцию 02.03.2022 г. После доработки 21.03.2022 г. Принята к публикации 27.03.2022 г.

Воздействие высоких концентраций глутамата (Glu) на первичные культуры нейронов из мозга крысы приводит к сильной деполяризации митохондрий, развивающейся синхронно со вторичным подъемом внутриклеточной концентрации свободного Ca<sup>2+</sup> (отсроченной кальциевой дисрегуляцией, ОКД). В данной работе одновременно с измерениями внутриклеточной концентрации свободного Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) были измерены pH в матриксе митохондрий (pH<sub>m</sub>) и цитозоле (pH<sub>c</sub>) нейронов, при действии токсической дозы Glu (100 мкМ). Для этого в первичных культурах из гиппокампа новорожденных крыс была достигнута экспрессия pH-чувствительного зеленого белка mtYFP в митохондриях и pH-чувствительного красного белка mKate в цитозоле. Полученную нейрональную культуру нагружали  $Ca^{2+}$ -индикатором Fura-FF и в тех нейронах, которые экспрессировали совместно mtYFP и mKate, одновременно измеряли [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, pH<sub>m</sub> и pH<sub>c</sub>. Обнаружено, что во время первой фазы Ca<sup>2+</sup>-ответа на Glu, когда наблюдается частичная деполяризация митохондрий, происходит увеличение градиента рН между матриксом митохондрий и цитозолем (ДрН), которое компенсирует снижение электрического компонента митохондриального потенциала ( $\Delta \Psi_m$ ), поддерживая тем самым постоянство электрохимического потенциала митохондрий. Развитие ОКД приводит к резкому снижению  $\Delta \Psi_m$  и  $\Delta pH$  в соме нейронов, однако полного коллапса  $\Delta pH$  не наблюдается. Это может означать, что ОКД не обусловлена неспецифической мегапорой во внутренней мембране митохондрий (мРТР), как это принято считать. Либо часть митохондрий в соме нейронов сохраняет барьерные свойства внутренней мембраны и не формирует мРТР даже при развитии ОКД и достижении высокого Ca<sup>2+</sup>-плато.

**Ключевые слова:** глутамат, флуоресцентные белки, измерения pH, отсроченная кальциевая дисрегуляция, митохондрии, нейрональные культуры **DOI:** 10.31857/S0233475522040089

### введение

Глутамат (Glu) — основной возбуждающий нейротрансмиттер в центральной нервной системе, контролирует различные клеточные и синаптические функции [1]. Glu принимает участие в развитии таких заболеваний, как эпилепсия и нейродегенеративные расстройства [2–5]. В области, окружающей зону поражения при черепно-мозговой травме и инсульте, Glu превращается в сильнейший нейротоксин [6–8].

Детальное изучение изменений внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) при действии Glu привело к открытию явления, названного отсроченной кальциевой дисрегуляцией (ОКД) [9, 10]. Динамика изменений [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> имеет сложный трехфазный характер и тесно связана с изменениями электрического компонента трансмембранного потенциала внутренней мембраны митохондрий ( $\Delta \Psi_m$ ) [11, 12]. В настоящее время считается, что митохондрии, как основной производитель АТР и самое емкое внутриклеточное Ca<sup>2+</sup>-депо, играют ведущую роль в развитии ОКД [11–15].

Применение флуоресцентного белкового АТРсенсора позволило обнаружить ряд ранее неизвестных особенностей воздействия Glu на нейроны в культуре [16]. Сопоставление кинетики изменений концентрации АТР в цитозоле ([ATP]<sub>c</sub>) и [Ca<sup>2+</sup>]<sub>і</sub> показало, что падение [ATP]<sub>с</sub> в каждом нейроне, экспрессировавшем АТР-сенсор, всегда опережало развитие ОКД, которое начиналось при достижении [АТР], ~16% от уровня в покоящихся нейронах. В фазе высокого [Ca<sup>2+</sup>],-плато [АТР]<sub>с</sub> опускалась до ~10% от уровня покоя. Эти величины в 4-6 раза ниже значений [АТР], полученных с помощью физико-химических или биохимических методов анализа в среднем по клеточной популяции [17-20]. Причина расхождения, по крайней мере отчасти, связана с АТР, поступающим из глиальных клеток, 15-35% которых всегда присутствуют в нейрональных культурах [21]. Полностью подавить рост глиальных клеток не удается, даже применяя цитостатик Ara-С при концентрациях, не убивающих нейроны (см., например, рис. 2А в [21] и Материалы и методы, первый абзац).

Стимуляция ионотропных глутаматных рецепторов при патологических процессах вызывает не только мощный вход Ca<sup>2+</sup>, но и сильное закисление цитоплазмы и митохондрий, обусловленное работой Ca<sup>2+</sup>-ATP-аз и  $Na^+/H^+$ обменников плазмалеммы [22] и митохондриальным Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>-обменом [23, 24]. В этой связи pHзависимость сигналов флуоресцентных белковых сенсоров является не только недостатком, осложняющим интерпретацию сигналов [16], но может быть и достоинством, позволяющим использовать их в качестве рН-индикаторов в интересующем компартменте клетки, например, только в матриксе митохондрий или только в цитозоле [24-26].

Главные функциональные характеристики митохондрий, а именно, способность синтезировать ATP, захватывать из цитоплазмы Ca<sup>2+</sup> и другие катионы, транспортировать белки в матрикс, удерживать факторы апоптоза, обусловлены трансмембранным электрохимическим потенциалом их внутренней мембраны ( $\Delta \mu_{\rm H}$ ) [27, 28]. Этот важнейший интегральный показатель функционального состояния митохондрий определяется

суммой электрического трансмембранного потенциала (ΔΨ<sub>m</sub>) и трансмембранного градиента рН между матриксом митохондрий и цитозолем ( $\Delta pH$ ). Изменения  $\Delta \Psi_m$  в нейронах во время первой фазы Ca<sup>2+</sup>-ответа на нейротоксическое действие Glu и при развитии ОКД почти "зеркально" отражают изменения [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> [10, 11], тогда как относительно изменений ДрН в индивидуальных нейронах, насколько нам известно, нет экспериментальных данных. Поэтому в данной работе одновременно с измерениями [Ca<sup>2+</sup>], были измерены pH в матриксе митохондрий (pH<sub>m</sub>) и цитозоле (pH<sub>c</sub>) нейронов, подвергнутых токсическому воздействию Glu. Для этого в первичных культурах из гиппокампа новорожденных крыс экспрессировали рН-чувствительный зеленый белок mtYFP в митохондриях и pH-чувствительный красный белок mKate в цитозоле. Обнаружено, что во время первой фазы Са<sup>2+</sup>-ответов нейронов на глутамат происходит увеличение ДрН, которое компенсирует, по крайней мере отчасти, снижение  $\Delta \Psi_m$ . При развитии ОКД и установлении высокого [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-плато ДрН резко падает, однако полного коллапса ДрН не происходит. Вероятно, развитие ОКД не обусловлено образованием неспецифической поры высокой проводимости, либо такая пора возникает не во всех митохондриях в соме нейронов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Первичные нейрональные культуры из гиппокампа новорожденных крыс получали, как описано в [29]. Кратко, животных анестезировали, декапитировали, извлекали мозг и затем гиппокампы. Суспензию клеток (10<sup>6</sup> клеток/мл) получали, обрабатывая гиппокампы папаином (10 ед/мл), диссоциируя 15-кратным пипетированием, и отмывали от разрушенных клеток двукратным осаждением в центрифуге (1000 об/мин). Суспензию (200 мкл) переносили на покровные стекла, прикрепленные к лункам 35 мм пластиковых чашек Петри (MatTek, США). Стекла предварительно покрывали полиэтиленимином (10 мг/мл). Через час добавляли 1.5 мл нейробазальной среды, содержащей 2% Supplement B-27 и 0.5 мМ L-глутамина. Клетки содержали при 37°С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>/95% воздуха при 100% влажности. На 3-4 день добавляли арабинозид С (Ara-C, 2 мкМ) для подавления роста глиальных клеток. Культуры использовали на 8-10 день после посева (3-4 день после трансфекции).

Эксперименты на животных выполняли в соответствии с этическими принципами и нормативными документами, рекомендованными Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых в экспериментах (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition, 2010), а также в соответствии с "Правилами надлежащей лабораторной практики", утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016 г.

**Микрофлуориметрические измерения** выполнены при температуре 27–29°С в буфере, содержащем (мМ): 135 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 20 HEPES, 5 *D*-глюкозы; pH 7.4 устанавливали, добавляя 20 мМ HEPES и дотитровывая 1 М HCl. Номинально бескальциевые растворы вместо CaCl<sub>2</sub> содержали 0.1мМ EGTA и 2 мМ MgCl<sub>2</sub>. Смену растворов осуществляли 2 × 2 мл заменой содержимого чашки с клетками за время не более 30 с.

Для измерения  $[Ca^{2+}]_i$  клетки нагружали Fura-FF в форме ацетоксиметилового (AM) эфира (концентрация маточного раствора 2 мМ в ДМСО). Fura-FF/AM предварительно смешивали с неионным детергентом Pluronic F-127 (Molecular Probes, США) для предотвращения образования в буфере суспензий AM-эфиров индикаторов. Нагрузку проводили при температуре 25–26°C в указанном выше буфере в течение 40–50 мин. Концентрации Fura-FF/AM и Pluronic F-127 составляли соответственно 3–5 мкМ и 0.02%.

Для измерения рН митохондрий и цитозоля плазмиды, несущие гены соответствующих белков, доставляли в клетки, используя Lipofectamine-2000 (LF-2000). Плазмиду (2-3 мкг ДНК/100 мкл OptiMem) смешивали с LF-2000 (4-6 мкл/100 мкл OptiMem) и через 20 мин, когда завершалось образование комплекса ДНК с LF-2000, вносили смесь в клеточную культуру. Перед этим кондиционированную клеточную среду временно заменяли на Transfect Medium (200 мкл в лунке с клетками) и в каждую лунку вносили 50 мкл комплекса ДНК с LF-2000, после чего помещали клетки в СО<sub>2</sub>-инкубатор. Через 2 ч удаляли Transfect Medium, ополаскивали клетки нейробазальной средой и возвращали клеткам ту кондиционную среду, в которой они находились перед трансфекцией. Калибровку рН-зависимости сигналов флуоресцентных белковых сенсоров в нейронах проводили как описано в [24] с небольшими изменениями в способе расчета, используя растворы с ионофорами, обеспечивающими выравнивание рН между буфером и внутриклеточной средой. Калибровочные растворы имели состав (мМ): 0.005 нигерицина, 0.001 FCCP, 134 глюконата калия, 1 MgCl<sub>2</sub>, 20 HEPES. Для доведения pH использовали 1 М растворы HCl или KOH. Для предотвращения работы митохондриальной ATP-азы в прямом или реверсивном режиме, что могло потенциально повлиять на воспроизводимость калибровочных кривых, в калибровочные растворы добавляли олигомицин (2.5 мкг/мл).

В тех нейронах, которые экспрессировали одновременно mtYFP и mKate, выполняли измерения [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, pH<sub>m</sub> и pH<sub>c</sub>. Флуоресцентно-микроскопические измерения проводили на установках, включающих инвертированный микроскоп Olympus IX-71, систему освещения Sutter Labmda 10-2 с ксеноновой лампой 175 Вт (Sutter Instruments) и CCD-камеру CoolSNAP HQ2 (Photometrics), управляемых через компьютерную программу MetaFluor (Molecular Devices, США). Возбуждающий свет от лампы проходил поочередно через светофильтры  $340 \pm 8$  и  $380 \pm 8$  нм для Fura-FF и через  $485 \pm 10$  и  $565 \pm 15$  нм соответственно для mtYFP и mKate и отражался на образец трехполосным зеркалом (максимумы отражения 300-400 нм,  $485 \pm 15$  и 560  $\pm$  20 нм; полосы пропускания  $460 \pm 20$ ,  $525 \pm 20$  и выше 580 нм). Для регистрации сигналов Fura-FF и mtYFP использовали один и тот же эмиссионный светофильтр  $525 \pm 15$  нм. Для регистрации эмиссии mKate использовали пороговый светофильтр, имеющий пропускание 590-700 нм. Светофильтры и дихроичные зеркала производства Omega (США).

Все реагенты фирмы Sigma (США). Флуоресцентный Ca<sup>2+</sup>-индикатор Fura-FF приобретен у Invitrogen (США). Плазмиды, кодирующие флуоресцентные белковые сенсоры, были любезно предоставлены Dr. R. Rizzuto (University of Ferrara, Италия) и проф. Д. Чудаковым (ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН).

Для обсчета флуоресцентных сигналов и построения графиков, а также для статистической обработки данных использовали программы MetaFluor Analyst, Excel, GraphPad Prizm 6.1 и Origin 7.0.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ

Применение смеси двух плазмид, содержащих гены флуоресцентных белковых pH-сенсоров (имеющих разные спектры возбуждения и эмиссии), приводит к трансфекции как нейронов, так и астроцитов. Следует отметить, что трансфекция терминально дифференцированных клеток с применением Lipofectamine-2000 не очень высокая. В наших экспериментах доля трансфицированных нейронов в культурах гиппокампа новорожденных крыс обычно не превышала 0.1%. Эффективность трансфекции астроцитов была в



**Рис. 1.** Экспрессия одновременно двух флуоресцентных белков не изменяет характер Ca<sup>2+</sup>-ответов на глутамат. Флуоресцентные изображения первичной культуры клеток гиппокампа крысы, экспрессирующих в одном из нейронов зеленый pH-чувствительный белок mtYFP в митохондриях (*a*) и красный pH-чувствительный белок mKate в цитозоле (*б*). На панели *в* приведено изображение всех клеток в поле наблюдения, нагруженных низкоаффинным флуоресцентным Ca<sup>2+</sup>-индикатором Fura-FF. Графики изменений [Ca<sup>2+</sup>]<sub>1</sub>, индуцированные глутаматом (Glu, 100мкМ в безмагниевом буфере в присутствии 10 мкМ глицина), представлены на панели *e*; пунктиром выделен график изменений [Ca<sup>2+</sup>]<sub>1</sub> в нейроне, экспрессировавшем одновременно mtYFP и mKate. Цифрами *1, 2 и 3* отмечены клетки, в которых за время действия Glu развилась OKД. Изображение *в* соответствует 1770 с на панели *e* или 1170 с с момента добавления Glu. Длины волн возбуждения и испускания флуоресценции см. Материалы и методы; объектив (40×/NA = 1.35 oil). Масштабный отрезок на панелях *a*, *б*, *в* соответствует 20 мкм.

3-5 раз выше. Соотношение флуоресцентных сигналов может значительно различаться как между индивидуальными клетками, так и в каждой трансфицированной клетке, если она экспрессирует более одного флуоресцентного белка. На рис. 1 и 2 представлены изображения нейронов, в митохондриях которых экспрессируется зеленый флуоресцентный белок mtYFP [24] (рис. 1a и 2a), а в цитозоле красный флуоресцентный белок mKate [30] (рис. 16 и 26). При использовании объектива с относительно высоким увеличением и разрешением хорошо видно, что mtYFP заполняет часть перинуклеарного пространства в соме и в виде пунктиров расположен в дендритах и аксоне (рис. 1а). Аналогичный характер флуоресценции наблюдается при окрашивании нейронов митотрекерами [31] или митохондриальными потенциал-чувствительными зондами [21, 32].

В отличие от mtYFP, красный флуоресцентный белок mKate, не имеющий адресной пептидной последовательности, заполняет цитозоль и ядро (рис. 16). В ядерной оболочке имеются поры, размер которых позволяет диффундировать из цитозоля в ядро и обратно молекулам размером до 20–40 кДа [33, 34], что согласуется с размером мономерных флуоресцентных белков, в частности mKate [30].

На рис. 1*г*, 3*a*, 3*б* показаны графики изменений  $[Ca^{2+}]_i$  для группы нейронов, окрашенных Fura-FF (рис. 1*в*). Видно, что процедура трансфекции (см. Материалы и методы) не отменила



**Puc. 2.** Экспрессия одновременно двух флуоресцентных белков и окрашивание нейронов Ca<sup>2+</sup>-индикатором позволяет сопоставить изменения pH в митохондриях и цитозоле (pH<sub>m</sub> и pH<sub>c</sub>) с изменениями [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Изображения гиппокампальных нейронов, (*a*) экспрессирующих зеленый pH-чувствительный белок mtYFP в митохондриях, (*b*) красный pH-чувствительный белок mtYFP в митохондриях, (*b*) красный pH-чувствительный белок mtYFP в митохондриях и цитозоле (*b*) нагруженных низкоаффинным Ca<sup>2+</sup>-индикатором Fura-FF (возб. 340, 380, испуск. 525 нм). *e* – Графики изменений pH<sub>m</sub> и pH<sub>c</sub> одного из нейронов, показанных на изображениях (ROI 9; обведен кружком) при действии токсических доз глутамата (Glu), а также ингибитора дыхания цианида (CN, 3 мM), ингибитора митохондриальной ATP-азы олигомицина (Oligo, 2.5 мкг/мл) и протонофора FCCP (1 мкM). *d* – Графики изменения [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> и градиента pH между матриксом митохондрий и цитозолем (ΔpH) того же нейрона (ROI 9). Объектив 20×/NA = 0.70. Концентрация Glu и условия регистрации флуоресцентных сигналов как на рис. 1. Масштабный отрезок на панелях *a*, *b*, *e* сответствует 40 мкм.

индивидуальности ответов нейронов на Glu. Часть нейронов смогла противостоять токсическому действию Glu и в них не возникла ОКД (11 из 14 на рис. 1 $\epsilon$ ). В трех нейронах развилась ОКД (обозначены цифрами 1, 2 и 3 на рис. 1 $\epsilon$ ; их графики отмечены 1, 2 и 3 на рис. 1 $\epsilon$ ), в том числе и в том, который экспрессировал mtYFP и mKate (рис. 1). Индивидуальность развития ОКД в нейронах в ответ на Glu хорошо документирована [11]. Если процедура трансфекции подобрана корректно, то индивидуальность  $Ca^{2+}$ -ответов сохраняется даже в тех случаях, когда используют субъединичные флуоресцентные белковые сенсоры, молекулярная масса которых в 3 раза превышает массу mtYFP и mKate [16, 35].

Чтобы выяснить, как соотносятся изменения  $pH_m$  и  $pH_c$  с изменениями  $[Ca^{2+}]_i$  в индивидуальных нейронах, клеточную культуру нагружали Fura-FF и выбирали участок, в котором находи-



## ИЗМЕНЕНИЯ РН В МАТРИКСЕ МИТОХОНДРИЙ И ЦИТОЗОЛЕ

**Рис. 3.** Изменения  $[Ca^{2+}]_i$  и pH в цитозоле (pH<sub>c</sub>) и в матриксе митохондрий (pH<sub>m</sub>) клеток гиппокампа крысы, изображения которых представлены на рис. 2. *a* – Изменения  $[Ca^{2+}]_i$  в клетках, экспрессировавших одновременно флуоресцентные белковые pH-сенсоры в цитозоле (mKate) и митохондриях (mtYFP). *б* – Изменения  $[Ca^{2+}]_i$  в клетках, не экспрессировавших mtYFP и mKate. *e* – Изменения сигналов mtYFP, (*c*) mKate и (*d*)  $\Delta$ pH. *e* – Максимальные значения  $\Delta$ pH во время действия Glu и через ~200 с после отмывки. Для сравнения сигналы одного из нейронов, приведенных на рис. 2 (ROI 9), выделены цветными линиями; сигналы остальных нейронов представлены серыми линиями. На панели *e* точки, соответствующие нейрону (ROI 9), отмечены цветными точками; столбики " $\Delta$ pH макс с OKД" и " $\Delta$ pH макс без OKД" соответствуют максимальныя значениям  $\Delta$ pH в каждом индивидуальном нейроне, не имевшем OKД или во время первой фазы подъема [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, предшествующей OKД в тех нейронах, где OKД развилась; столбики " $\Delta$ pH после OKД (1510 с)" соответствуют значениям  $\Delta$ pH при максимальном подъеме [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> в результате развития OKД (примерно 1510 с на панелях *a*–*d*); " $\Delta$ pH без OKД (1510c)" – значения  $\Delta$ pH в тех нейронах, в которых OKД не произошла.

лось как можно больше нейронов, экспрессировавших одновременно mtYFP и mKate. Пример участка нейрональной культуры, в котором содержится группа таких нейронов, представлена на рис. 2a, 2b, 2e. Изменения pH<sub>m</sub>, pH<sub>c</sub>, их разности ( $\Delta$ pH) и [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> в этих нейронах, а также в части клеток, не экспрессировавших белковые сенсоры, показаны на рис. 3.

Сразу после добавления Glu одновременно со скачком  $[Ca^{2+}]_i$  (рис. 2 $\partial$ , 3a, 3 $\delta$ ) происходило снижение pH<sub>m</sub> и pH<sub>c</sub> (рис. 2 $\epsilon$ , 3 $\epsilon$ , 3 $\epsilon$ ). Динамика изменений pH<sub>m</sub> и pH<sub>c</sub> заметно различалась, что приводило к росту  $\Delta$ pH. По мере стабилизации изменений  $[Ca^{2+}]_i$  во время лаг-периода, предшествующего началу ОКД, стабилизировались также изменения  $\Delta$ pH (рис. 2 $\partial$ , 3 $\partial$ ).

Выполненные ранее нами [11, 36] и другими [37] исследования показали, что изменения  $[Ca^{2+}]_i$  в ответ на токсическую концентрацию Glu имеют "зеркальный" характер относительно изменений  $\Delta \Psi_m$ . В момент добавления Glu происходит сравнительно небольшой скачок  $[Ca^{2+}]_i$  от базального ~100 нМ [38] до нескольких микромолей/литр (первая фаза подъема  $[Ca^{2+}]_i$ ) [11, 38, 39]. Этот небольшой подъем  $[Ca^{2+}]_i$  стабилизируется на период от единиц до десятков минут и сопровождается снижение  $\Delta \Psi_m$  на ~60 мВ [10, 32]. Это умеренное снижение  $\Delta \Psi_m$  во время первой фазы  $Ca^{2+}$ -ответа на Glu компенсируется ростом  $\Delta$ рН (рис. 2*д*, 3*д*, 3*е*).

При продолжительном действии Glu наступает вторая фаза изменений  $[Ca^{2+}]_i$ , названная OKД, при которой  $[Ca^{2+}]_i$  поднимается до десятков микромолей/литр [39]. Этот подъем осуществляется с лаг-периодом, индивидуальным для каждого нейрона (например, рис. 1*е* и 3*a*, 3*б*) и происходит всегда синхронно с сильным падением  $\Delta \Psi_m$  [11, 29]. До конца не ясно, от чего в большей степени зависит вторичный подъем  $[Ca^{2+}]_i$  – происходит ли выброс  $Ca^{2+}$  из митохондрий одновременно с деполяризацией или же больше сказывается поступление  $Ca^{2+}$  извне. В развитие ОКД и стабилизацию  $[Ca^{2+}]_i$  на уровне высокого плато вовлечены, по-видимому, различающиеся процессы, поскольку удаление  $Ca^{2+}$  из буфера в самом начале ОКД быстро снижает  $[Ca^{2+}]_i$ , тогда как смена буфера на бескальциевый в фазе высокого  $[Ca^{2+}]_i$ -плато влияет на  $[Ca^{2+}]_i$  гораздо слабее [11, 36].

При возникновении ОКД происходило дополнительное снижение  $pH_m$ , тогда как падение  $pH_c$  замедлялось или даже сменялось его ростом (рис. 2*г*, 3*в*, 3*г*), в результате чего  $\Delta pH$  быстро падала (рис. 2*д*). Обращает внимание то, что  $\Delta pH$  уменьшался до ~0.5 единиц pH (рис. 2*д* и 3*д*, 3*е*), т.е. до уровня, наблюдаемого в покоящихся нейронах.

Отмывание Glu бескальциевым буфером приводило к снижению  $[Ca^{2+}]_i$  в тех клетках, в которых не наступила ОКД (рис. 3*a*, 3*б*). Если в клетках развилась ОКД, то восстановление низкой  $[Ca^{2+}]_i$  происходило с задержкой, а в некоторых не восстанавливалась за время измерений. Во время  $Ca^{2+}$ -плато происходило постепенное защелачивание матрикса, которое ускорялось в постглутаматный период при восстановлении низкой  $[Ca^{2+}]_i$  (рис. 2*г* и 3*в*).

В цитозоле падение pH сменялось ростом при наступлении OKД, а также при прекращении действия Glu (рис. 2e и 3e). Другими словами, в постглутаматный период происходило постепенное выравнивание градиента pH между матриксом митохондрий и цитозолем, однако ни в одной из клеток за время действия Glu не наступило коллапса  $\Delta$ pH (рис. 3d, 3e).

Добавление в постглутаматный период ингибитора комплекса IV дыхательной цепи цианида (NaCN, 3 мМ) в сочетании с ингибированием  $F_1F_0ATP$ -азы олигомицином (Oligo, 2.5 мкг/мл), вызывающее коллапс  $\Delta \Psi_m$ , быстро увеличивал  $[Ca^{2+}]_i$  в результате мобилизации  $Ca^{2+}$  из митохондрий в цитозоль (рис.  $2\partial$  и 3a,  $3\delta$ ). К подобному подъему  $[Ca^{2+}]_i$  приводила замена цианида на ингибиторы комплексов I или III дыхательной цепи (соответственно, ротенон или антимицин A; данные не показаны). Причиной роста [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> являлась, очевидно, ликвидация электрофоретической силы, удерживавшей Ca<sup>2+</sup> в матриксе митохондрий [11, 13].

Цианид резко закислял матрикс и ускорял защелачивание цитозоля, сближая величины  $pH_m$  и  $pH_c$  (рис. 2*г* и 3*в*, 3*г*). Это указывает на то, что при остановке дыхательной цепи утечка протонов сквозь внутреннюю мембрану митохондрий способна ликвидировать  $\Delta pH$  за несколько минут (рис. 2*д* и 3*д*).

Отмывание NaCN быстро понижало  $[Ca^{2+}]_i$  в большинстве клеток (в 16 из 26), в которых Glu индуцировал подъем  $[Ca^{2+}]_i$  (рис. 3*a*, 3*б*). Очевидно, в результате разблокирования комплекса IV дыхательной цепи происходило восстановление  $\Delta \Psi_m$  и возобновление электрофоретического захвата  $Ca^{2+}$  митохондриями.

Отмывание цианида также быстро восстанавливало  $pH_m$  до уровня, предшествовавшего действию митохондриального яда (рис. 3*в*). Это наблюдение согласуется с тем, что дыхательная цепь возобновила выкачивание протонов из матрикса в цитозоль, повышая тем самым  $pH_m$ .

Протонофор FCCP (1мкМ), добавленный через 5 мин после отмывания цианида, резко увеличивал [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> и уменьшал разницу между рH<sub>m</sub> и рH<sub>c</sub> (рис. 3). Напомним, что добавление FCCP часто используют как методический прием, чтобы вызвать коллапс  $\Delta \Psi_m$  и проверить наличие Ca<sup>2+</sup> в митохондриях [11, 13]. Скачок [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, индуцированный FCCP, согласуется с тем, что понижение [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> после удаления NaCN обусловлено именно поглощением Ca<sup>2+</sup> митохондриями, а не откачиванием наружу.

Примечательно, что при отмывании FCCP часть клеток смогла начать понижение  $[Ca^{2+}]_i$  (рис. 3*a*, 3*б*). В этих же нейронах происходило повышение  $\Delta pH$  (рис. 3*d*). Это показывает, что даже после таких разнообразных воздействий, как токсические дозы глутамата и митохондриальные яды, клетки сохранили способность поддерживать функциональную активность митохондрий. Другими словами, процедура трансфекции и экспрессия чужеродных белков в цитозоле и в митохондриях не нарушила работоспособность нейронов, по крайней мере в течение ~2 ч в минимальном солевом буфере при температуре, близкой к комнатной.

Необходимо отметить, что часть клеток не реагировала ростом  $[Ca^{2+}]_i$  на Glu и, соответственно, на митохондриальные яды в постглутаматный период (рис. 36). Эти клетки реагировали только на добавление Ca<sup>2+</sup>-ионофора иономицина (Iono) на завершающей стадии эксперимента. Вероятно, эти нейроны не содержали ионотропных глутаматных рецепторов, либо были клетками глии. Отметим, что добавление иономицина в конце эксперимента для определения максимального сигнала Ca<sup>2+</sup>-индикатора (Fura-FF), неизменно вызывало защелачивание митохондрий и цитозоля (рис. 3). Этот ионофор является Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>-обменником, поэтому перенос Ca<sup>2+</sup> в цитозоль и затем в митохондрии сопровождается удалением протонов в буфер, т.е. повышением как pH<sub>m</sub>, так и pH<sub>c</sub>.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Одновременные измерения [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, pH<sub>m</sub> и pH<sub>c</sub> в одном и том же нейроне позволили обнаружить рост  $\Delta pH$ , компенсирующий снижение  $\Delta \Psi_m$  во время первой фазы Ca<sup>2+</sup>-ответа на глутамат. За счет процессов дыхания и Са<sup>2+</sup>/Н<sup>+</sup>-обмена между матриксом митохондрий и цитозолем умеренное снижение  $\Delta \Psi_{\rm m}$  на ~60 мВ во время первой фазы  $Ca^{2+}$ -ответа на Glu [10, 32] компенсируется ростом  $\Delta pH$  на ~1 (рис. 2 $\partial$ , 3 $\beta$ , 3 $\epsilon$ ). Согласно уравнению Нернста [13, 27, 28] такой рост ∆рН соответствует росту электрохимического потенциала митохондрий на ~60 мВ и происходит за счет Са<sup>2+</sup>/Н<sup>+</sup>-обмена, осуществляемого совокупным действием Ca<sup>2+</sup>-унипортера, протонных насосов дыхательной цепи (комплексов I, III и IV) и системой Ca<sup>2+</sup>/3Na<sup>+</sup>- и Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-обменников [13, 27, 28].

Недавно появились данные о том, что полость внутри крист внутренней мембраны митохондрий не является резервуаром для протонов, поступающих из межмембранного пространства и служащих "субстратом" для F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-азы ([40] и ссылки там). Предполагается, что плотная упаковка ферментов окислительного фосфорилирования в мембранах крист обеспечивает локальную кинетическую связь экструзии протонов дыхательной цепью с F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-азой, потребляющей эти протоны. В этом случае значения ДрН, полученные в настоящей работе, завышены. На наш взгляд, истина где-то посередине и обмен протонами между цитозолем, межмембранным пространством митохондрий и внутренним пространством крист, соединенным с межмембранным пространством, существует, по крайней мере, при действии глутамата на нейроны. Иначе поступление Ca<sup>2+</sup> в митохондрии не влияло бы на рН цитозоля ([16, 23, 24] и данное исследование).

Такая компенсация сохраняет (а возможно, даже увеличивает) способность митохондрий поддерживать необходимую скорость синтеза АТР в условиях его повышенного потребления ионными насосами плазматической мембраны. При развитии ОКД этот компенсаторный эффект, если не исчезает, то значительно ослабевает, однако полного коллапса  $\Delta pH$  не происходит, по крайней мере в начальный период ОКД. Это свидетельствует о том, что, если повышение протонной проводимости внутренней мембраны митохондрий вносит вклад в развитие ОКД и сильной митохондриальной деполяризации, то повышение этой проводимости едва ли является классической мегапорой (mitochondrial permeability transition pore, мРТР). В противном случае ∆рН стал бы равен нулю [14, 27, 28, 41]. Либо мРТР формируется не во всех митохондриях, локализованных в соме нейронов. В пользу отсутствия "классической" циклоспорин-А чувствительной поры. по крайней мере на начальном этапе ОКД, свидетельствует также то, что замена Ca<sup>2+</sup> на Sr<sup>2+</sup>, который препятствует мРТР [41, 42], не отменяла возникновения отсроченной "стронциевой дисрегуляции" [24, 43]. Более того, в присутствии Sr<sup>2+</sup> и циклоспорина-А наблюдалось кратковременное увеличение градиента рН между матриксом и цитозолем, совпадающее с началом ОКД [24], чего не должно быть, если бы развитие ОКД было полностью обусловлено мРТР. Более детальный анализ формирования поры и ее структуры дан, например, в обзорах [44, 45], в том числе при нейродегенеративных заболеваниях [46].

Стоит также отметить, что меньшее снижение  $pH_m$ , чем  $pH_c$  во время первой фазы  $Ca^{2+}$ -ответа на Glu, препятствует сильному увеличению растворимости  $Ca^{2+}$ -фосфатных комплексов в матриксе митохондрий, предотвращая более значительное падение их  $Ca^{2+}$ -буферной емкости в условиях снижения  $\Delta \Psi_m$  [46].

Деполяризация митохондрий в бескальциевом буфере в постглутаматный период, когда они накопили много  $Ca^{2+}$ , вызывает высвобождение  $Ca^{2+}$  в цитозоль, сопряженное с захватом митохондриями протонов. Возникающее закисление матрикса митохондрий вызывает, по-видимому, растворение  $Ca^{2+}$ -фосфатных комплексов [47] и дополнительное высвобождение  $Ca^{2+}$  из митохондрий, обеспечивая дополнительное поступление протонов в матрикс. Формально, подобный процесс работает по принципу положительной обратной связи, или "порочного круга" (*vicious cycle*). Эта гипотеза механизма развития ОКД, при которой одновременно происходит рост [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, деполяризация митохондрий и закисление их матрикса, была предложена Борисом Израилевичем Ходоровым за несколько лет до описанных в данной работе результатов [11].

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена по планам Государственных заданий Министерства здравоохранения Российской Федерации № АААА-А19-119012590191-3 и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № FGFU-2022-0012.

Соответствие принципам этики. Эксперименты с животными выполняли в соответствии с этическими принципами и нормативными документами, рекомендованными Европейским научным фондом (ESF) и декларацией о гуманном отношении к животным и в соответствии с Приказом Минздравсоцразвития России № 708н от 23.08.2010 г. "Об утверждении правил лабораторной практики".

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Wang Y., Qin Z. 2010. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis*. 15 (11), 1382–1402. https://doi.org/10.1007/s10495-010-0481-0
- Zhou Y., Danbolt N.C. 2014. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. J. Neural Transm. 121 (8), 799–817. https://doi.org/10.1007/s00702-014-1180-8

 Gudiño-Cabrera G., Ureña-Guerrero M.E., Rivera-Cervantes M.C., Feria-Velasco A.I., Beas-Zárate C. 2014. Excitotoxicity triggered by neonatal monosodium glutamate treatment and blood-brain barrier function. *Arch. Med. Res.* 45 (8), 653–659. https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2014.11.014

- 4. Jewett B.E., Thapa B. 2021. *Physiology, NMDA receptor*. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): Stat-Pearls Publishing.
- Zöllner J.P., Schmitt F.C., Rosenow F., Kohlhase K., Seiler A., Strzelczyk A., Stefan H. 2021. Seizures and epilepsy in patients with ischaemic stroke. *Neurol. Res. Pract.* 3 (1), 63. https://doi.org/10.1186/S42466-021-00161-W
- Verkhratsky A., Kirchhoff F. 2007. NMDA receptors in glia. *Neuroscientist.* 13 (1), 28–37. https://doi.org/10.1177/1073858406294270
- Gerkau N.J., Rakers C., Petzold G.C., Rose C.R. 2017. Differential effects of energy deprivation on intracellular sodium homeostasis in neurons and astrocytes. *J. Neurosci. Res.* 95 (11), 2275–2285. https://doi.org/10.1002/jnr.23995

- 8. Huo Y., Feng X., Niu M., Wang L., Xie Y., Wang L., Ha J., Cheng X., Gao Z., Sun Y. 2021. Therapeutic time windows of compounds against NMDA receptors signaling pathways for ischemic stroke. J. Neurosci. Res. 99 (12), 3204-3221. https://doi.org/10.1002/JNR.24937
- 9. Tymianski M., Charlton M.P., Carlen P.L., Tator C.H. 1993. Secondary Ca<sup>2+</sup> overload indicates early neuronal injury which precedes staining with viability indicators. Brain Res. 607 (1-2), 319-323. https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)91523-U
- 10. Nicholls D.G., Ward M.W. 2000. Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: Mortality and millivolts. Trends Neurosci. 23 (4), 166-174.

https://doi.org/10.1016/S0166-2236(99)01534-9

- 11. Khodorov B. 2004. Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurones. Progr. Biophys. Mol. Biol. 86 (2), 279-351. https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2003.10.002
- 12. Abramov A.Y., Duchen M.R. 2010. Impaired mitochondrial bioenergetics determines glutamate-induced delayed calcium deregulation in neurons. Biochim. Biophys. Acta. 1800 (3), 297-304. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.08.002
- 13. Nicholls D.G., Budd S.L. 2000. Mitochondria and neuronal survival. Physiol. Rev. 80 (1), 315-360.
- 14. Duchen M.R. 2012. Mitochondria, calcium-dependent neuronal death and neurodegenerative disease. Pflügers Arch. 464 (1), 111-121. https://doi.org/10.1007/s00424-012-1112-0
- 15. Plotegher N., Filadi R., Pizzo P., Duchen M.R. 2021. Excitotoxicity revisited: Mitochondria on the verge of a nervous breakdown. Trends Neurosci. 44 (5), 342-351. https://doi.org/10.1016/J.TINS.2021.01.001
- 16. Surin A.M., Gorbacheva L.R., Savinkova I.G., Sharipov R.R., Khodorov B.I., Pinelis V.G. 2014. Study on ATP concentration changes in cytosol of individual cultured neurons during glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis. Biochemistry (Moscow). 79 (2), 146-157.

https://doi.org/10.1134/S0006297914020084

- 17. Budd S.L., Nicholls D.G. 1996. A reevaluation of the role of mitochondria in neuronal Ca<sup>2+</sup> homeostasis. J. Neurochem. 66 (1), 403-411. https://doi.org/10.1046/J.1471-4159.1996.66010403.X
- 18. Pinelis V.G., Bykova L.P., Bogachev A.P., Isaev N.K., Viktorov I.V, Khodorov B.I. 1997. Toxic effect of glutamate on cultured cerebellar granular cells reduces the intracellular level of ATP. The role of Ca<sup>2+</sup> ions. Bull. Exp. Biol. Med. 123 (2), 162-164.
- 19. Ioudina M., Uemura E., Greenlee H.W. 2004. Glucose insufficiency alters neuronal viability and increases susceptibility to glutamate toxicity. Brain Res. 1004 (1-2), 188-192.

https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2003.12.046

20. Sorokina E.G., Reutov V.P., Senilova Y.E., Khodorov B.I., Pinelis V.G. 2007. Changes in ATP content in cerebellar granule cells during hyperstimulation of glutamate receptors: possible role of NO and nitrite ions. Bull. Exp. Biol. Med. 143 (4), 442-445. https://doi.org/10.1007/S10517-007-0151-6

- 21. Surin A.M., Khiroug S.S., Gorbacheva L.R., Khodorov B.I., Pinelis V.G., Khiroug L. 2013. Comparative analysis of cytosolic and mitochondrial ATP synthesis in embryonic and postnatal hippocampal neuronal cultures. Front. Mol. Neurosci. 5, 102. https://doi.org/10.3389/fnmol.2012.00102
- 22. Hwang S.-M., Koo N.-Y., Jin M., Davies A.J., Chun G.-S., Choi S.-Y., Kim J.-S., Park K. 2011. Intracellular acidification is associated with changes in free cytosolic calcium and inhibition of action potentials in rat trigeminal ganglion. J. Biol. Chem. 286 (3), 1719-1729.
- 23. Wang G.J., Randall R.D., Thayer S.A. 1994. Glutamate-induced intracellular acidification of cultured hippocampal neurons demonstrates altered energy metabolism resulting from Ca<sup>2+</sup> loads. J. Neurophysiol. 72 (6), 2563-2569. https://doi.org/10.1152/JN.1994.72.6.2563
- 24. Bolshakov A.P., Mikhailova M.M., Szabadkai G., Pinelis V.G., Brustovetsky N., Rizzuto R., Khodorov B.I. 2008. Measurements of mitochondrial pH in cultured cortical neurons clarify contribution of mitochondrial pore to the mechanism of glutamate-induced delayed Ca<sup>2+</sup> deregulation. *Cell Calcium*. **43** (6), 602–614. https://doi.org/10.1016/j.ceca.2007.10.005
- 25. Chudakov D.M., Matz M.V., Lukyanov S., Lukyanov K.A. 2010. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. Physiol. Rev. 90 (3), 1103-1163. https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00038.2009
- 26. Okumoto S. 2010. Imaging approach for monitoring cellular metabolites and ions using genetically encoded biosensors. Curr. Opin. Biotechnol. 21 (1), 45-54. https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2010.01.009
- 27. Nicholls D.G., Ferguson S.J. 2013. Bioenergetics. 4th ed. Middletown, USA: Acad. Press, 434 p. https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004
- 28. Скулачев В.П., Богачев А.В., Каспаринский Ф.О. 2011. Мембранная биоэнергетика. М.: Изд-во МГУ. 368 стр.
- 29. Сурин А.М., Красильникова И.А., Пинелис В.Г., Ходоров Б.И. 2014. Исследование взаимосвязи между индуцированной глутаматом отсроченной Ca<sup>2+</sup> дизрегуляцией, митохондриальной деполяризацией и последующей гибелью нейронов. Патогенез. 12 (4), 40-46.
- 30. Shcherbo D., Merzlyak E.M., Chepurnykh T.V., Fradkov A.F., Ermakova G.V., Solovieva E.A., Lukyanov K.A., Bogdanova E.A., Zaraisky A.G., Lukyanov S., Chudakov D.M. 2007. Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging. Nat. Methods. 4 (9), 741-746. https://doi.org/10.1038/NMETH1083
- 31. Buckman J.F., Hernandez H., Kress G.J., Votyakova T.V., Pal S., Reynolds I.J. 2001. MitoTracker labeling in primary neuronal and astrocytic cultures: Influence of mi-

tochondrial membrane potential and oxidants. *J. Neurosci. Methods.* **104** (2), 165–176. https://doi.org/10.1016/S0165-0270(00)00340-X

- Duchen M.R., Surin A., Jacobson J. 2003. Imaging mitochondrial function in intact cells. *Methods Enzymol.* 361, 353–389.
  - https://doi.org/10.1016/S0076-6879(03)61019-0
- Keminer O., Peters R. 1999. Permeability of single nuclear pores. *Biophys. J.* 77 (1), 217–228. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)76883-9
- Mattaj I.W., Englmeier L. 1998. Nucleocytoplasmic transport: The soluble phase. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 265–306. https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.67.1.265
- Brustovetsky N., Dubinsky J.M. 2000. Dual responses of CNS mitochondria to elevated calcium. *J. Neurosci.* 20 (1), 103–113.
- Шарипов Р.Р., Красильникова И.А., Пинелис В.Г., Горбачева Л.Р., Сурин А.М. 2018. Исследование механизма сенситизации нейронов к повторному действию глутамата. Биол. мембраны. 35 (5), 384– 397.
- 37. Ходоров Б.И., Сторожевых Т.П., Сурин А.М., Сорокина Е.Г., Юравичус А.И., Бородин А.В., Винская Н.П., Каспеков Л.Г., Пинелис В.Г. 2001. Митохондриальная деполяризация играет доминирующую роль в механизме нарушения нейронального кальциевого гомеостаза вызванного глутаматом. Биол. мембраны. 18 (6), 421–432.
- Abramov A.Y., Duchen M.R. 2008. Mechanisms underlying the loss of mitochondrial membrane potential in glutamate excitotoxicity. *Biochim. Biophys. Acta*. 1777 (7–8), 953–964.

https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2008.04.017

- Kiedrowski L. 1999. N-methyl-D-aspartate excitotoxicity: Relationships among plasma membrane potential, Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange, mitochondrial Ca<sup>2+</sup> overload, and cytoplasmic concentrations of Ca<sup>2+</sup>, H<sup>+</sup>, and K<sup>+</sup>. *Mol. Pharmacol.* 56 (3), 619–632.
- Toth A., Meyrat A., Stoldt S., Santiago R., Wenzel D., Jakobs S., von Ballmoos C., Ott M. 2020. Kinetic coupling of the respiratory chain with ATP synthase, but not proton gradients, drives ATP production in cristae

membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **117**(5), 2412–2421.

https://doi.org/10.1073/pnas.1917968117

- Bernardi P. 1999. Mitochondrial transport of cations: Channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol. Rev.* 79 (4), 1127–1155. https://doi.org/10.1038/370621a0
- Dubinin M.V., Adakeeva S.I., Samartsev V.N. 2013. Long-chain α,ω-dioic acids as inducers of cyclosporin A-insensitive nonspecific permeability of the inner membrane of liver mitochondria loaded with calcium or strontium ions. *Biochemistry (Moscow)*. 78 (4), 412– 417.

https://doi.org/10.1134/S000629791304010X

- 43. Вабниц А.В., Сторожевых Т., Пинелис В.Г., Ходоров Б.И. 2005. Открывание митохондриальной поры не является необходимым условием для деполяризации митохондрий нарушения кальциевой регуляции, вызываемых глутаматом в нейронах мозга. Биол. мембраны. 2 (4), 378–382.
- 44. Bauer T.M., Murphy E. 2020. Role of mitochondrial calcium and the permeability transition pore in regulating cell death. *Circ. Res.* **126** (2), 280–293. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.316306
- 45. Carinci M., Vezzani B., Patergnani S., Ludewig P., Lessmann K., Magnus T., Casetta I., Pugliatti M., Pinton P., Giorgi C. 2021. Different roles of mitochondria in cell death and inflammation: Focusing on mitochondrial quality control in ischemic stroke and reperfusion. *Biomedicines*. 9 (2), 1–28. https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES9020169
- Abramov A.Y., Berezhnov A. V., Fedotova E.I., Zinchenko V.P., Dolgacheva L.P. 2017. Interaction of misfolded proteins and mitochondria in neurodegenerative disorders. *Biochem. Soc. Trans.* 45 (4), 1025– 1033.

https://doi.org/10.1042/BST20170024

 Chalmers S., Nicholls D.G. 2003. The relationship between free and total calcium concentrations in the matrix of liver and brain mitochondria. *J. Biol. Chem.* 278 (21), 19062–19070. https://doi.org/10.1074/jbc.M212661200

## pH Changes in the Mitochondrial Matrix and Cytosol during Glutamate Deregulation of Ca<sup>2+</sup> Homeostasis in Cultured Rat Hippocampal Neurons

A. M. Surin<sup>1, 2, \*</sup>, L. R. Gorbacheva<sup>3, 4</sup>, I. G. Savinkova<sup>3</sup>, R. R. Sharipov<sup>1</sup>, V. G. Pinelis<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of General Pathology and Pathophysiology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 125315 Russia <sup>2</sup>Scientific Center for Children's Health, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 119991 Russia <sup>3</sup>Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117513 Russia

<sup>4</sup>Department of Human and Animal Physiology, School of Biology, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia \*e-mail: surin am@mail.ru

Application of glutamate (Glu) in high concentrations to the rat brain primary neuronal cultures leads to a secondary rise in the intracellular free  $Ca^{2+}$  concentration (delayed calcium deregulation, DCD), which de-

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ том 39 № 4 2022

### СУРИН и др.

velops synchronously with a strong mitochondrial depolarization. In this work, pH in the mitochondrial matrix (pHm) and cytosol (pHc) was measured simultaneously with the intracellular concentration of free Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) in the soma of cultured neurons exposed to a toxic concentration of Glu (100  $\mu$ M). To this end, we performed the expression of the pH-sensitive fluorescence proteins, green mtYFP in the mitochondria and red mKate in the cytosol, in primary cultures from the hippocampus of newborn rats. To measure [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> simultaneously with pHm, and pHc neuronal cultures were loaded with low affinity Ca<sup>2+</sup>-sensitive indicator Fura-FF. It was found that during the first phase of the Ca<sup>2+</sup>-response to Glu, when only partial depolarization of mitochondria occurs, there is an increase in the pH gradient between the mitochondrial matrix and cytosol ( $\Delta$ pH). The increase in  $\Delta$ pH compensates for the decrease in the electrical mitochondrial potential ( $\Delta$ Ψm), maintaining a relatively constant electrochemical mitochondrial potential and maintaining ATP synthesis at least until DCD begins. The development of DCD led to a sharp decrease both in  $\Delta$ Ψm and  $\Delta$ pH in the soma of neurons; however, a complete collapse of  $\Delta$ pH was not observed. This probably means that DCD (1) is not caused by a nonspecific pore in the mitochondrial inner membrane (mPTP), as it is commonly thought, or (2) some of the mitochondria in the soma of neurons retain the barrier properties of the inner membrane and do not form mPTP even at high [Ca<sup>2+</sup>], plateau.

Keywords: glutamate, fluorescent proteins, pH measurements, delayed calcium deregulation, mitochondria, neuronal cultures