

УДК 576.38:57.085.23:57.085.25

Флуоресцентно-микроскопический анализ вклада эндоплазматического ретикулула в кальциевый сигналинг нейронов и глии в первичной нейрональной культуре из кортекса мозга крысы

Жердев А.А.¹, Бакаева З.В.^{2,3}, Сурин А.М.¹

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

²Федеральное государственное автономное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации

119991, Москва, Ломоносовский пр., д. 2, стр. 1

³Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Калмыцкий государственный университет имени Б.Б.Городовикова»

358000, Элиста, ул. Пушкина, д. 11

Гиперактивация ионотропных глутаматных рецепторов (iGluRs) вызывает нарушение ионного гомеостаза и биоэнергетики нейронов и является одним из ключевых механизмов, лежащих в основе патогенеза многих острых патологических состояний мозга (инсульта, последствий травмы, эпилептиформной активности) и хронических заболеваний (болезни Альцгеймера, Паркинсонизма и ряда других). Недавние исследования выявили, что активация глутаматом (Glu) метаболитных рецепторов (mGluRs) может влиять на активность iGluRs.

Цель. Определить вклад mGluRs и iGluRs в изменения внутриклеточного гомеостаза Ca^{2+} в нейронах и глии, индуцированные Glu в первичной культуре клеток из коры мозга крысы. Идентифицировать кальциевые сигналы, вызванные высвобождением Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулула (ЭПР) при активации mGluRs

Методы. Нейроглиальные культуры получали из коры головного мозга новорожденных крысят Вистар и использовали для флуоресцентно-микроскопических измерений на 10–13-е сутки. Изменения внутриклеточной концентрации свободного Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) регистрировали на микроскопе Nikon Ti-2, используя флуоресцентный индикатор Fura-2. Для оценки вклада Ca^{2+} , запасенного в ЭПР, в общее повышение $[Ca^{2+}]_i$, вызванное Glu, использовали бескальциевый буфер (Ca^{2+} замещен на 0,1 мМ EGTA) и ингибитор эндоплазматической Ca^{2+} -АТФазы тапсигаргин (5 мкМ). Для ингибирования mGluRs применяли AIDA (100 мкМ), для ингибирования iGluRs — МК-801 + CNQX (10 мкМ каждый).

Результаты. При действии Glu (100 мкМ) в 90% (7 экспериментов, 537 клеток) клеток реагировали быстрым увеличением $[Ca^{2+}]_i$. В 15% клеток Glu вызывал осцилляции $[Ca^{2+}]_i$, которые в бескальциевом буфере имели вид однократного скачка, ингибируемого тапсигаргином, что типично для астроцитов и указывает на экспрессию в них mGluRs первого типа, mGluR5.

Заключение. Анализ морфологических признаков клеток в культуре в сочетании с измерениями Ca^{2+} сигнализации с применением ингибиторов ионотропных и метаболитных рецепторов глутамата, удалением Ca^{2+} из внеклеточной среды и ингибированием Ca^{2+} -насоса ЭПР позволили оценить временной профиль сигналов и соотношение нейронов и глиальных клеток в нейрональной культуре. Обнаружена тенденция снижения вклада mGluRs в Glu-индуцированный рост $[Ca^{2+}]_i$ в тех клетках, вероятно, нейронах, в которых происходит массивный вход Ca^{2+} из окружающего буфера. Полученные параметры динамики изменений $[Ca^{2+}]_i$ могут быть полезными для испытания нейротоксичности веществ, влияющих на Glu-индуцированную Ca^{2+} сигнализацию.

Ключевые слова: глутаматные рецепторы; кальциевая сигнализация; внутриклеточный кальций; флуоресцентная микроскопия

Для цитирования: Жердев А.А., Бакаева З.В., Сурин А.М. Флуоресцентно-микроскопический анализ вклада эндоплазматического ретикулула в кальциевый сигналинг нейронов и глии в первичной нейрональной культуре из кортекса мозга крысы. Патогенез. 2026; 24(2): 80–92

DOI: 10.48612/path/2310-0435.2026.02.80-92

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

Финансирование. Работа выполнена согласно теме государственного задания № FG-FU-2025-0004, а также при финансовой поддержке Минздрава России, проект № ААААА19-119012590191-3. Оборудование для исследования приобретено в рамках гранта в форме субсидии Министерства науки и высшего образования Российской Федерации по программе обновления приборной базы НИОКР (внутренний номер 08-07-S6/2021/82930).

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 06.02.2026.

Fluorescence microscopic analysis of the contribution of endoplasmic reticulum to calcium signaling of neurons and glia in primary neuronal culture from rat brain cortex

Zherdev A.A.¹, Bakaeva Z.V.^{2,3}, Surin A.M.¹

¹Institute of General Pathology and Pathophysiology
Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

²National Medical Research Center of Children's Health
Lomonosovskii Prospekt 2, Bld. 1, Moscow 119991, Russian Federation

³B.B.Gorodovikov Kalmyk State University
Pushkin Str. 11, Elista 358000, Russian Federation

Hyperactivation of ionotropic glutamate receptors (iGluRs) disrupts ion homeostasis and neuronal bioenergetics and is one of the key mechanisms underlying the pathogenesis of many acute pathological conditions of the brain (stroke, trauma, epileptiform activity) and chronic diseases (Alzheimer's, Parkinson's, and others). Recent studies have shown that activation of metabotropic receptors (mGluRs) by glutamate (Glu) can influence iGluR activity.

The aim. To determine the contribution of mGluRs and iGluRs to changes in intracellular Ca^{2+} homeostasis in neurons and glia induced by Glu in primary cultures from rat cerebral cortex. To identify calcium signals induced by Ca^{2+} release from the endoplasmic reticulum (ER) upon activation of mGluRs.

Methods. Neuroglial cultures were obtained from the cerebral cortex of neonatal Wistar rats and used for fluorescence microscopy measurements at 10–13 days in vitro. Changes in the intracellular free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) were recorded on a Nikon Ti-2 microscope using the fluorescent indicator Fura-2. To assess the contribution of Ca^{2+} stored in the ER to the overall Glu-induced increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, a calcium-free buffer (Ca^{2+} replaced with 0.1 mM EGTA) and the endoplasmic Ca^{2+} -ATPase inhibitor thapsigargin (5 μM) were used. AIDA (100 μM) was employed to inhibit mGluRs, and MK-801 + CNQX (10 μM each) to inhibit iGluRs.

Results. When exposed to Glu (100 μM), 90% (7 experiments, 537 cells) of cells responded with a rapid increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. In 15% of cells, Glu induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations, which in Ca^{2+} -free buffer revealed a single $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rise inhibited by thapsigargin, which is typical for astrocytes and indicates the expression of type 1 mGluRs, mGluR5.

Conclusion. Analysis of the morphological features of cells in culture in combination with measurements of Ca^{2+} signaling using inhibitors of ionotropic and metabotropic glutamate receptors, removal of Ca^{2+} from the extracellular medium, and inhibition of the ER Ca^{2+} pump allowed us to evaluate the temporal profile of signals and the ratio of neurons and glial cells in the neuronal culture. A tendency toward a decreased contribution of mGluRs to the Glu-induced increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was found in those cells, likely neurons, which revealed a massive Ca^{2+} influx from the surrounding buffer. The parameters of the dynamics of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ changes may be useful for testing the neurotoxicity of substances that affect Glu-induced Ca^{2+} signaling.

Keywords: glutamate receptors; calcium signaling; intracellular calcium; fluorescence microscopy

For citation: Zherdev A.A., Bakaeva Z.V., Surin A.M. [Fluorescence microscopic analysis of the contribution of the endoplasmic reticulum to calcium signaling of neurons and glia in primary neuronal culture from rat brain cortex]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2026; 24(2): 80–92 (in Russian)

DOI: 10.48612/path/2310-0435.2026.02.80-92

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

Funding. This work was carried out in accordance with State Assignment #FGFU-2025-0004 and with the financial support of the Russian Ministry of Health, Project #AAAAA19-119012590191-3. The equipment for the study was acquired through a grant from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation under the R&D Instrumentation Upgrade Program (internal number #08-07-S6/2021/82930).

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

Received: 06.02.2026.

Введение

Глутамат (Glu), основной возбуждающий нейромедиатор центральной нервной системы (ЦНС), активирует два типа рецепторов: ионотропные (iGluRs) и метаботропные (mGluRs) [1]. В нейронах и глиальных клетках как в мозге, так и в первичных нейрональных культурах присутствуют оба типа рецепторов в различном соотношении [1, 2]. Ионотропные рецепторы присутствуют преимущественно в нейронах и формируют в плазматической мембране тетрамеры из различных либо одинаковых субъединиц. В центре этих тетрамеров образуются каналы, проницаемые для ионов Na^+ , K^+ , а также, в большинстве вариантов тетрамеров, для Ca^{2+} [1, 2]. Индуцированное Glu открытие каналов iGluRs служит основным путем поступления Na^+

и Ca^{2+} в клетки. Длительный рост внутриклеточных концентраций Na^+ ($[\text{Na}^+]_i$) и, особенно, Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) в цитоплазме нейронов влечёт резкое изменение функционирования клеток, вплоть до их гибели [3].

Метаботропные рецепторы первой группы (mGluR1 и mGluR5) сопряжены с G-белками, активирующими фосфолипазу C, которая гидролизует фосфатидилинозитолдифосфат (PIP_2) с образованием инозитолтрифосфата (IP_3), активирующим ионотропные IP_3 -рецепторы эндоплазматического ретикулума (IP_3Rs) [1]. Активация IP_3Rs высвобождает Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума (ЭПР) в цитозоль и скачкообразно увеличивает $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [4]. Нарушения работы mGluRs вовлечены в патогенез ишемии [5], шизофрении, депрессии, стресс-индуцированных состояний и других заболеваний [3, 4, 6].

ЭПР является быстро регулируемым внутриклеточным депо ионов кальция, концентрация которого в люмене ЭПР непосредственно влияет на транспорт и созревание трансмембранных и секретируемых белков всех типов клеток [7, 8]. Кроме того, мобилизация Ca^{2+} в цитозоль регулирует множество Ca^{2+} -зависимых процессов в цитозоле, в других органеллах и ядре [5]. В частности, показано, что активация mGluRs может модулировать ион-проводящие свойства iGluRs [9, 10].

Целью данной работы было проверить можно ли, опираясь на динамику изменений $[\text{Ca}^{2+}]_i$, выделить Ca^{2+} -сигналы, обусловленные поступлением Ca^{2+} в цитозоль из внеклеточной среды через iGluRs и высвобождением Ca^{2+} из ЭПР через ионные каналы IP_3 -рецепторов при активации mGluRs. В качестве объекта исследований были выбраны первичные нейрональные культуры из коры головного мозга крыс.

Материалы и методы исследования

Соблюдение этических норм. Эксперименты проведены в соответствии с требованиями Директивы Европейского парламента и Совета ЕС 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, использующихся для научных целей. Проведение экспериментов осуществляли в соответствии с требованиями этических комитетов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», протокол № 05-06/12 от 14 декабря 2017 г., и ФГАУ «Национального медицинского исследовательского центра здоровья детей», протокол № 05 от 15 мая 2025 г.

Приготовление первичных культур кортикальных нейронов. Исследования на животных выполнялись в соответствии с этическими нормами и регламентами, предусмотренными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных целях (Руководство по работе с животными, 8-е издание, 2010 г.), а также согласно «Правилам надлежащей лабораторной практики», утверждённым приказом Минздрава РФ № 199н от 01.04.2016 г. Первичные культуры нейронов коры головного мозга крыс получали из коры новорождённых (1–2 сутки) крыс Вистар по ранее описанной методике [11]. Кратко: животных анестезировали, декапитировали, извлекали кору и освобождали от мозговых оболочек. Ткань промывали в растворе Хенкса без Ca^{2+} и Mg^{2+} , содержащем 10 mM HEPES и 1 mM пирувата натрия, измельчали и инкубировали в буфере, содержащем папаин (12 мин, 37 °C), и промывали раствором Хенкса центрифугированием (230g, 5 мин). Осадок ресуспендировали в нейробазальной среде (NBM), дополненной 2% B-27, 1% GlutaMAX и 1% пенициллин/стрептомицином, доводили до концентрации 10^6 кл/мл. Суспензию клеток (200 мкл) наносили на покровные стёкла, закреплённые в 35-мм чашках Петри (MatTek, США) предварительно покрытых полиэтиленгликолем (1 мг/1 мл, 30 мин). Через час в чашки добавляли 1,5 мл NBM, содержащей 2% B-27, 1% антибиотика-антимикотика

и 1% GlutaMAX. Клетки хранили в инкубаторе при 37 °C, в атмосфере 95% воздуха и 5% CO_2 при 100% влажности. Излишнюю пролиферацию глиальных клеток подавляли внесением на следующий после посадки день цитозинарабинозида (AraC, 1 мкМ) на 18–20 часов. Каждые три дня среду частично обновляли, заменяя треть объёма на свежую. Культуры использовали в экспериментах на 10–13-е сутки после посева.

Флуоресцентно-микроскопические измерения. Флуоресцентные измерения выполняли, используя систему визуализации на основе инвертированного микроскопа Nikon Ti2 (Japan) с объективом Nikon SFluor 20x/NA = 0.75 и sCMOS камерой (Teledyne Photometrics, США). Для возбуждения флуоресценции в УФ-области спектра применяли светодиодные источники pE-340Fura (CoolLED, UK), для возбуждения в видимом диапазоне спектра использовали pE-300Ultra. Работа системы управлялась программой Nikon NIS-Elements (Japan).

Для регистрации изменений внутриклеточной концентрации свободного Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) клетки нагружали флуоресцентным кальциевым индикатором Fura-2 в форме ацетоксиметилового эфира (AM) (Fura-2/AM, 2 мкМ). Маточный раствор Fura-2/AM (1 mM) готовили в диметилсульфоксиде и хранили в виде аликвот при –20 °C. Маточный раствор Pluronic F-127 (18%) готовили еженедельно и хранили комнатной температуре.

Для измерений ионного гомеостаза клеток среду инкубации заменяли водно-солевым буфером (mM): 135 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 20 HEPES, 5 D-глюкоза; pH 7,4; измерения выполняли при 25–27 °C. В бескальциевых буферах CaCl_2 заменяли на хелатор кальция EGTA (0,1 mM).

Флуоресценцию Fura-2 возбуждали попеременно на 340 ± 13 и 380 ± 6 нм (F340 и F380, соответственно), и регистрировали при 544 ± 12 нм. Во всех экспериментах использовали 3-полосный делитель луча («дихроичное зеркало») FF468/526/596.

Значения $[\text{Ca}^{2+}]_i$, полученные при измерениях с использованием двухволнового Ca^{2+} индикатора Fura-2, рассчитаны по формуле:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R_{\min}},$$

где R – текущее значение отношения $\frac{F340}{F380}$, $R_{\min}$ и $R_{\max}$ –

минимальная и максимальная величина R , наблюдаемые при регистрации сигналов Fura-2. Значения $R_{\max}$ получали в конце эксперимента, добавляя Ca^{2+} ионофор иономицин (Iono, 2 мкМ) и повышая концентрацию Ca^{2+} в буфере до 5 mM.

Материалы. Все индикаторы и Pluronic F-127 производства Molecular Probes (США). Глутамат, Ca^{2+} -ионофор иономицин, EGTA и все соли приобретены у Sigma (США), NBM и его компоненты марки Gibco (Thermo Fisher Scientific, США), ингибитор Ca^{2+} -АТФазы эндоплазматического ретикулаума, тапсигаргин, куплен у Sigma-Aldrich (Merck, США).

Расчёт сигналов Ca^{2+} -индикатора, построение графиков и статистическая обработка данных осуществляли, используя программы Microsoft Excel и Graph Pad Prism 8.

Результаты исследования

По морфологическим признакам, а именно, по форме и размеру тела клеток, диаметру и длине проксимальных частей отростков (дендритов и аксонов), популяция клеток в первичной культуре из коры головного мозга крысы на изображениях в проходящем свете выглядит очень неоднородно (**рис. 1А**). Тем не менее удастся выделить общие, наиболее характерные признаки. Нейроны в проходящем свете более контрастны, чем глиальные клетки, имеют веретенообразную и сравнительно небольшую (10–20 мкм) сому.

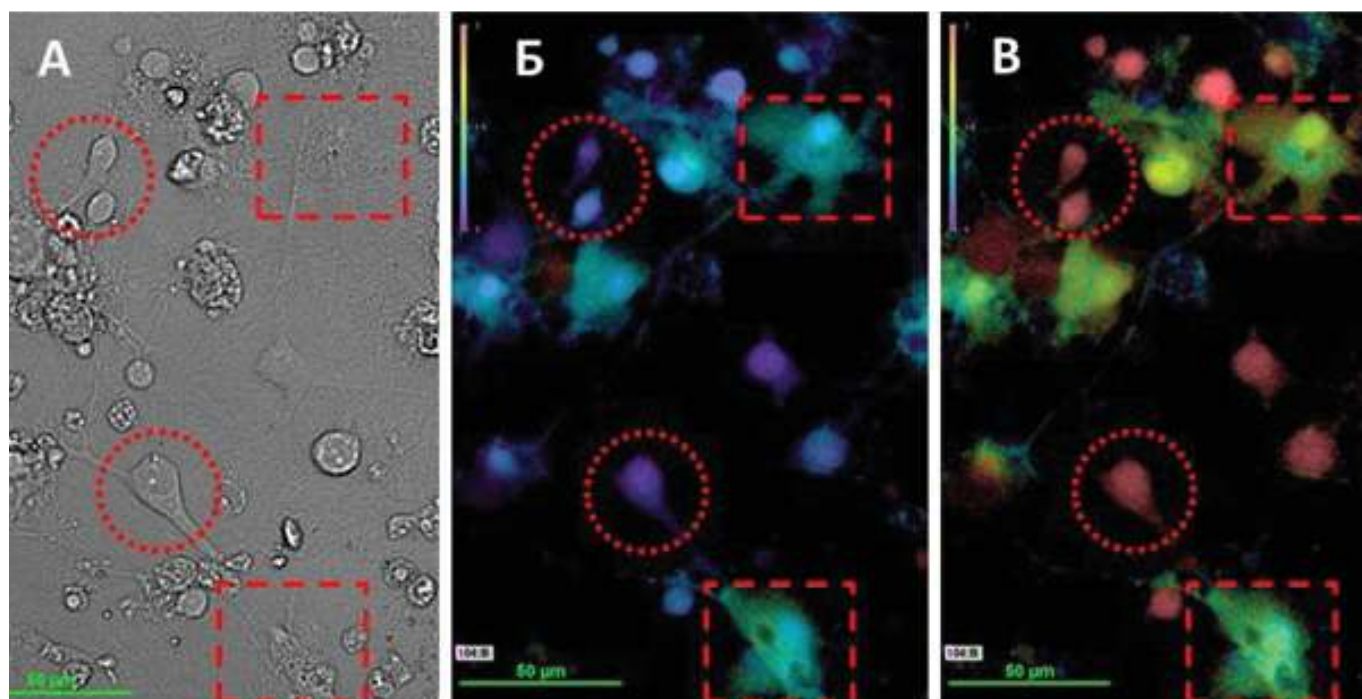


Рис. 1. Изображения нейроглиальной культуры в проходящем свете и флуоресцентные изображения культуры, нагруженной Ca^{2+} индикатором Fura-2. А: изображение фрагмента нейроглиальной культуры в проходящем свете. Б: флуоресцентные изображения культуры, нагруженной Ca^{2+} -индикатором Fura-2 за 1 мин до воздействия глутамата. В: то же через 1 мин после добавки глутамата (100 мкМ). Пунктирными кругами обведены клетки, которые по морфологическим признакам соответствуют нейронам, пунктирными прямоугольниками очерчены клетки, имеющие размер и контур астроцитов. Более теплый цвет на изображениях Б и В соответствует более высокой концентрации Ca^{2+} в клетках.

Глиальные клетки в коре головного мозга крысы представлены преимущественно астроцитами [12]. Эти клетки более плоские, чем нейроны, и поэтому хуже видны в проходящем свете (**рис. 1А**). Для идентификации глиальных клеток мы сопоставляли изображения в проходящем свете с флуоресцентными изображениями, полученными после окраски клеток Ca^{2+} -индикатором Fura-2 (**рис. 1Б, 1В**). Глиальные клетки, которые согласно иммуноцитофлуоресцентному окрашиванию имеют форму и размер, характерные для астроцитов [12–14], обведены пунктирными прямоугольниками.

До добавления глутамата (Glu, 100 мкМ) флуоресцентные изображения всех клеток имеют одинаковый синий (холодный) цвет, что отражает низкую $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в невозбужденных клетках. После добавления Glu клетки с морфологическими признаками нейронов резко увеличили $[\text{Ca}^{2+}]_i$, что условно показано переходом синего цвета в ярко-красный. Клетки, которые были обозначены как астроциты на основании изображений в проходящем свете (**рис. 1А**), на флуоресцентных изображениях Fura-2, тоже приобрели более теплую окраску (синие стали зелеными) (**рис. 1Б, 1В**), что в палитре «концентрация – цвет» указывает на увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, но меньшее, чем у нейронов.

Эта интерпретация разделения клеток в первичной культуре на нейроны и глию по морфологическим признакам была проверена и количественно охарактеризована в экспериментах с измерениями динамики кальциевых

ответов на Glu в отсутствии Ca^{2+} в буфере, а также в присутствии ингибиторов глутаматных рецепторов и ингибитора Ca^{2+} насоса ЭПР.

Изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$, вызванные Glu, были индивидуальны для каждой клетки как по амплитуде, так и по форме (**рис. 2А**, см. также **рис. 4Б** и **5В**). Поэтому для количественного сопоставления Ca^{2+} ответов на Glu была выбрана интегральная характеристика, отражающая общее количество Ca^{2+} в клетке за время действия нейромедиатора, а именно, площадь под кривой изменений $[\text{Ca}^{2+}]_i$ за время действия Glu (*area under curve*, AUC). AUC также индиви-

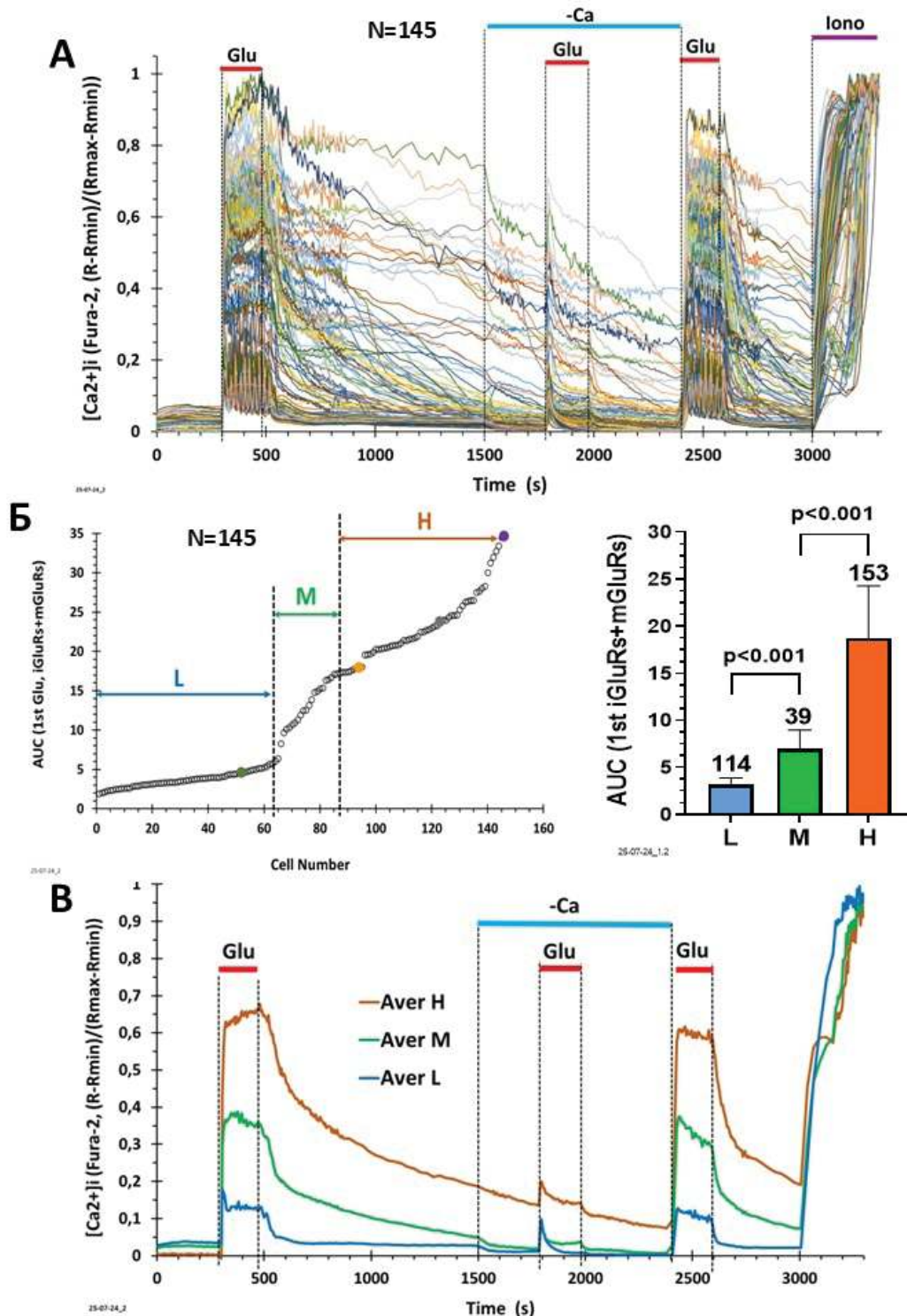


Рис. 2. Изменения внутриклеточной концентрации свободного кальция ($[Ca^{2+}]_i$) при действии глутамата на клетки первичной культуры из коры мозга крысы. А: Изменения $[Ca^{2+}]_i$ в индивидуальных клетках в ответ на повторные добавки глутамата (Glu) в Ca^{2+} -содержащем и в бескальциевом буферах. Время действия Glu и замена буфера на бескальциевый ($-Ca^{2+}$) обозначены горизонтальными отрезками. Б: распределение площади под графиком изменений $[Ca^{2+}]_i$ (area under curve, AUC) в течение первой аппликации Glu, когда Ca^{2+} сигнал отражает совокупное действие ионотропных и метаботропных рецепторов (1st Glu, iGluRs+mGluRs); величина AUC каждой точки на кривой (Б) соответствует графику одной индивидуальной клетки на панели (А), порядковый номер которой обозначен числом на оси абсцисс панели (Б). В: усредненные значения AUC, вычисленные по измерениям в двух сестринских культурах ($N = 306$ клеток), обозначенных отрезками L, M и H на панели (Б); числа над столбиками соответствуют количеству клеток в каждой из трех категорий. Г: усредненные изменения $[Ca^{2+}]_i$ в клетках, у которых AUC попадают в диапазоны низких (L), средних (M) и высоких (H) значений. Добавка Ca^{2+} -ионофора иономицина (Iono, 2 мкМ, 5 мМ $CaCl_2$) выполнена на этом и всех последующих рисунках для калибровки максимального сигнала Fura-2. На этом и последующих рисунках концентрация глутамата 100 мкМ; порядок и длительность действия реагентов отмечены на графиках горизонтальными полосками.

дуальна для каждой клетки, но в меньшей степени зависит от формы кривой изменений $[Ca^{2+}]_i$.

Значения AUC при первой аппликации Glu (1st Glu), ранжированные по величине AUC, представляют собой возрастающую кривую, на которой можно выделить три участка (**рис. 2Б**). Начальный участок «L» сформирован клетками, чьи значения AUC не превышают 6–7 условных единиц. В этот диапазон AUC попало $44,7 \pm 9,2\%$ клеток (Mean $\pm$ SD; 4 эксперимента; $N = 525$). Усредненные Ca^{2+} сигналы клеток диапазона «L» представлены на **рис. 2В**. У $15 \pm 10\%$ (7 экспериментов, $N = 537$) клеток в этом диапазоне AUC изменения $[Ca^{2+}]_i$ выглядели, как регулярные осцилляции (см. пример на **рис. 4Б**). Такие изменения $[Ca^{2+}]_i$ характерны для астроцитов, экспрессирующих mGluR5 [12]. Рецептор mGluR5 относится к mGluRs первого типа, активация которых мобилизует Ca^{2+} из ЭПР. Отмывание Glu после его 3-минутного действия вызывало в таких клетках быстрое снижение $[Ca^{2+}]_i$ до почти базального уровня (**рис. 2 В**).

В клетках с высоким подъёмом $[Ca^{2+}]_i$, принадлежащих диапазону AUC, который обозначен отрезком «Н» (**рис. 2Б**), колебаний $[Ca^{2+}]_i$ не наблюдалось. Доля таких клеток составляла $19 \pm 14\%$ клеток (Mean $\pm$ SD; 4 эксперимента; $N = 525$).

Большой рост $[Ca^{2+}]_i$ в ответ на Glu характерен для нейронов, содержащих iGluRs, Ca^{2+} - и Na^{+} -проницаемые каналы которых способны пропускать из буфера в клетку тысячи ионов в секунду [15]. В нейрональных культурах из различных разделов мозга грызунов Glu-индуцированные Ca^{2+} -сигналы с высокой амплитудой $[Ca^{2+}]_i$ надежно документированы как принадлежащие нейронам [16]. В клетках, принадлежащих диапазону «Н», удаление Glu вызывало не быстрое, как в «L»-клетках, а постепенное возвращение к низкой $[Ca^{2+}]_i$ (**рис. 2 В**). Медленное снижение $[Ca^{2+}]_i$ характерно для нейронов, подвергнутых действию высокой концентрации Glu и обусловлено высвобождением Ca^{2+} из митохондрий, которые в нейронах при массивном поступлении Ca^{2+} по iGluRs (преимущественно по NMDA-каналам) служат основным буферным депо Ca^{2+} [16].

В клетках со средним подъёмом $[Ca^{2+}]_i$, принадлежащих «М» диапазону AUC (**рис. 2Б**), восстановление нормального $[Ca^{2+}]_i$ после удаления Glu происходило с задержкой, но быстрее, чем в «Н»-клетках (**рис. 2В**). В некоторых из клеток этого типа изменения $[Ca^{2+}]_i$ во время действия Glu выглядели как суперпозиция относительно высокого $[Ca^{2+}]_i$ плато и осцилляций $[Ca^{2+}]_i$ небольшой амплитуды (см., например ROI 16 на **рис. 4Б** и ROI 9 на **рис. 5Б**). В этих клетках, вероятно, нейронах, доля Ca^{2+} , поступающего в цитоплазму по iGluRs, сопоставима с долей Ca^{2+} , высвобождаемого из ЭПР. Последний способ мобилизации Ca^{2+} в цитоплазму определяется, очевидно, активацией mGluRs. Доля клеток, отнесенных к «М»-диапазону AUC, составляла $36 \pm 14\%$ (Mean $\pm$ SD; $N = 525$) клеток.

Для дополнительной проверки вклада mGluRs в суммарные (iGluRs+mGluRs) изменения $[Ca^{2+}]_i$ повторная аппликация Glu была выполнена в бескальциевом буфере,

в котором Ca^{2+} был замещен хелатором Ca^{2+} , EGTA. В таком буфере подъём $[Ca^{2+}]_i$ возможен только благодаря Glu-индуцированному высвобождению из внутриклеточных Ca^{2+} депо [4]. Все три категории клеток (L, М и Н) в ответ на Glu в бескальциевом буфере показали быстрый кратковременный скачок $[Ca^{2+}]_i$ (**рис. 2Б, 2В**). Амплитуда изменений $[Ca^{2+}]_i$ и, соответственно, AUC были небольшим. Небольшая амплитуда подъёма $[Ca^{2+}]_i$ при второй аппликации Glu отражает не нарушения функционирования клеток в бескальциевом буфере, а малую Ca^{2+} емкость ЭПР по сравнению с количеством Ca^{2+} во внеклеточном буфере. Подтверждением этому служит то, что последующая (третья) добавка Glu в обычном Ca^{2+} -содержащем буфере вызвала во всех трех типах ответов (Н, М, L) почти такой же по амплитуде обратимый подъём $[Ca^{2+}]_i$, как и самая первая аппликация Glu (**рис. 2В**).

Анализ соотношения между ростом $[Ca^{2+}]_i$, вызванным поступлением Ca^{2+} в цитоплазму через активированные iGluRs (через NMDA- и AMPA-каналы) и через IP_3 -рецепторы ЭПР, иллюстрирован **рис. 3**. Наклон графика, показывающего соотношение между AUC в Ca^{2+} -содержащем буфере и в бескальциевом буфере (**рис. 3А**, оси абсцисс и ординат, соответственно), имеет в версии линейной аппроксимации отрицательную величину (тангенс угла наклона составляет $-0,026$). Такая низкая, близкая к нулю, величина наклона указывает на отсутствие достоверной корреляции между величинами AUC после первой добавки Glu и повторной аппликации Glu в бескальциевом буфере (**рис. 3А**). Однако есть тенденция снижения запаса Ca^{2+} , способного высвободиться из ЭПР в цитозоль в тех клетках, в которых Glu вызывал больший рост $[Ca^{2+}]_i$ за счет активации iGluRs.

Для наглядности показаны изменения $[Ca^{2+}]_i$ некоторых представительных клеток (**рис. 3 Б**), чьи AUC расположены в разных частях графика AUC (**рис. 3А**). Изменения $[Ca^{2+}]_i$ в этих клетках (**рис. 3Б**) выделены разным цветом и обозначены порядковыми номерами (ROI, region of interest, 8, 16, 40, 75), которые были присвоены клеткам случайным образом в начале эксперимента. Эти же номера расположены возле значений AUC для тех же клеток (**рис. 3А**). Видно, что клетки, имевшие при первой добавке Glu небольшой подъём $[Ca^{2+}]_i$ (**рис. 3Б**, ROIs 40 и 75) и, соответственно, небольшую AUC (ось абсцисс на **рис. 3А**), при повторной добавке Glu в бескальциевом буфере имели AUC (ось ординат на **рис. 3А**), сопоставимую с этим параметром при первой аппликации Glu. Это свидетельствует о том, что в таких клетках (например, ROIs 40 и 75) активация mGluRs и вызванный ею выход Ca^{2+} из ЭПР играет основную роль в подъеме $[Ca^{2+}]_i$. В некоторых подобных клетках, изменения $[Ca^{2+}]_i$ выглядят как регулярные осцилляции (например, ROI 75, **рис. 3Б**). Такой ответа на Glu характерен, как упоминалось выше, для астроцитов, экспрессирующих mGluR5 [12]. В других клетках, тоже имеющих слабый подъём $[Ca^{2+}]_i$ при первой добавке Glu, осцилляций не отмечено (например, ROI 40, **рис. 3Б**). Вероятно, в этих клетках экспрессируются mGluR1, которые тоже относятся

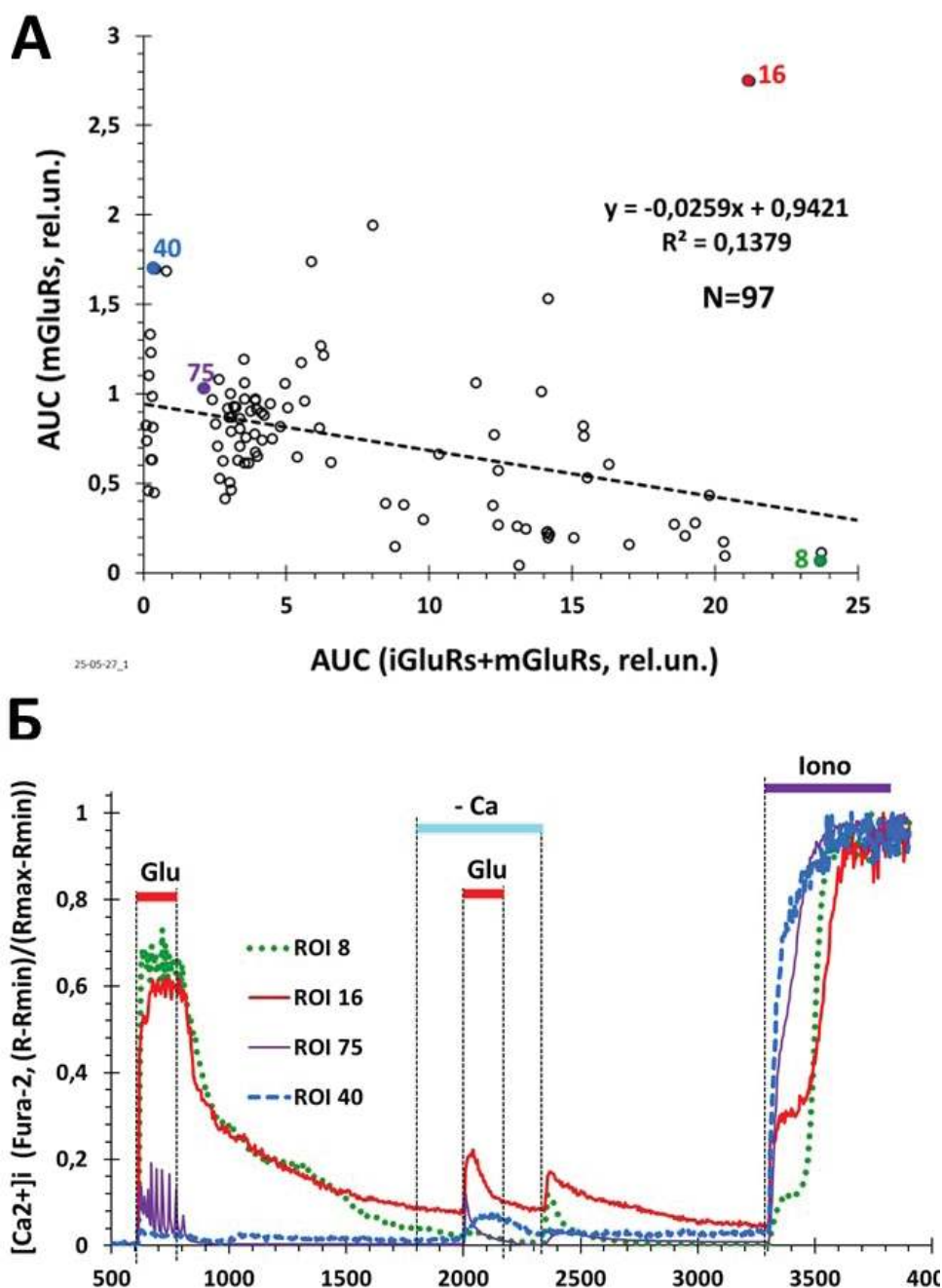


Рис. 3. Влияние удаления Ca^{2+} из буфера на изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ при действии глутамата (Glu) на клетки первичной культуры из коры мозга крысы. А: соотношения между площадями под кривыми изменений $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (AUC, отн. ед.); первая добавка Glu сделана в Ca^{2+} содержащем буфере, когда Ca^{2+} поступает в цитозоль в результате активации как ионотропных, так и метаботропных рецепторов (ось абсцисс AUC, iGluRs+mGluRs); повторная добавка Glu выполнена в бескальциевом буфере, в котором Ca^{2+} поступает в цитозоль в результате активации только метаботропных рецепторов (ось ординат AUC, mGluRs). Б: графики изменений $[\text{Ca}^{2+}]_i$ нескольких представительных клеток, чьи AUC расположены в различных зонах на панели (А). Номера и цвет кривых на панели (Б) соответствуют точкам на панели (А).

к первой группе mGluRs и сопряжены с активацией IP_3 -рецепторов в ЭПР и высвобождением Ca^{2+} из этого внутриклеточного Ca^{2+} депо, но без осцилляций [1, 12, 17].

В большинстве клеток, в которых первая добавка Glu вызвала высокоамплитудный Ca^{2+} ответ и, соответственно, большую AUC, подъем $[\text{Ca}^{2+}]_i$ при действии Glu в бескальциевом буфере был слабым (например, ROI 8, **рис. 3Б**). По-видимому, высокая экспрессия Glu-ак-

тивируемых Ca^{2+} -каналов в плазматической мембране каким-то образом снижает экспрессию mGluRs первого типа или/и их сопряжение с высвобождением Ca^{2+} из ЭПР. Однако наблюдались и исключения, когда подъем $[\text{Ca}^{2+}]_i$ при действии Glu в Ca^{2+} -содержащем буфере был большим, причём в бескальциевом буфере такие клетки демонстрировали рост $[\text{Ca}^{2+}]_i$, сопоставимый с астроцитами (например, ROI 16, **рис. 3Б**).

Проверка результатов о соотношении Ca^{2+} сигналов, обусловленных входом Ca^{2+} в клетки снаружи и мобилизацией Ca^{2+} из ЭПР, была дополнена протоколом с применением тапсигаргина (Thaps) (**рис. 4**). Это соединение является селективным и высокоаффинным ингибитором Ca^{2+} -АТФазы (Ca^{2+} насоса, SERCA) ЭПР [18]. Добавление Thaps (5 мкМ) к клеткам и ингибирование Ca^{2+} насоса ЭПР вызывает рост $[\text{Ca}^{2+}]_i$, который является следствием вытекания Ca^{2+} из ЭПР, обусловленного высокой Ca^{2+} -проницаемостью мембраны ЭПР, благодаря наличию в ней разнообразных трансмембранных белков, включая упомянутые Ca^{2+} -АТФазы и IP_3 -рецепторы [4, 7, 8].

Чтобы оценить вклад Ca^{2+} , запасенного в ЭПР, в подъеме $[\text{Ca}^{2+}]_i$ вызванный Thaps, этот ингибитор добавляли в бескальциевом буфере, предотвращающем поступление Ca^{2+} в клетку из буфера по кальциевым каналам, активируемым опустошением ЭПР (CRAC-каналам). Как только Thaps, диффундируя через плазмалемму, достигал Ca^{2+} насоса ЭПР и блокировал его, некомпенсированная Ca^{2+} -насосом утечка Ca^{2+} из ретикулума в цитозоль вызывала рост $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (**рис. 4А**). На фоне Thaps последующая добавка Glu перестала повышать $[\text{Ca}^{2+}]_i$, что указывает на то, что ингибирование Ca^{2+} -АТФазы опустошает ЭПР и последующая активация mGluRs не способна вызвать дополнительного выброса Ca^{2+} в цитозоль.

График соотношения между величинами AUC, наблюдаемыми при первой добавке Glu (AUC (1st Glu, iGluRs+mGluRs)) и при аппликации Thaps (AUC (Thaps)) в бескальциевом буфере имел небольшой отрицательный наклон – 0,059 (**рис. 4Б**). Похожая тенденция снижения запаса внутриклеточного Ca^{2+} в клетках, способных пропускать большие потоки Ca^{2+} сквозь каналы плазматической мембраны, отмечена при Glu-индуцированной мобилизации Ca^{2+} в бескальциевом буфере (**рис. 3А**). Такое подобие Ca^{2+} -сигналов вполне естественно, поскольку в протоколах, как с применением Glu, так и Thaps, регистрируется преимущественно одна и та же характеристика, а именно, Ca^{2+} -ёмкость ЭПР.

Изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в отдельных представительных клетках в ответ на поочередные добавки Glu в Ca^{2+} -содержащем буфере и Thaps в бескальциевом буфере (**рис. 4В**) показывают индивидуальные различия, напоминающие те, которые характерны двух последовательных добавок Glu сначала в нормальном, а затем в бескальциевом буферах (**рис. 3Б**). Представительные клетки для наглядности выбрали в широком диапазоне значений AUC среди всех клеток в пределах поля наблюдения в микроскопе (**рис. 4А**).

Помимо сопоставления сигналов клеток в Ca^{2+} -содержащем и в бескальциевом буферах, мы сравнили сигналы, вызванные двумя последовательными добавками Glu в растворах идентичного состава за исключением того, что вторую добавку Glu делали с одновременным введением ингибиторов iGluRs или mGluRs. Усредненные графики изменений $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в ответ на последовательные добавки одинаковых доз Glu (100 мкМ) в растворах без ингибиторов (**рис. 5А**) или содержащих ингибиторы iGluRs

(**рис. 5Б**) или ингибитор mGluRs (**рис. 5В**) показали различия в амплитуде и форме Ca^{2+} ответов.

Сопоставление AUC при первой аппликации Glu (1st Glu, iGluRs+mGluRs) и повторной добавке этого нейромедиатора показало, что в контрольной культуре, в которой две последовательные аппликации Glu делали с 15-минутным интервалом в идентичных буферах, AUC в ответ на первую аппликацию Glu был выше, чем AUC в ответ на вторую добавку Glu (**рис. 5А**). Феномен снижения Ca^{2+} -ответа на повторную добавку Glu в идентичных условиях хорошо виден по наклону графика соотношений AUC после первой и второй добавок Glu (**рис. 5Г**). Если принять, что величины AUC для каждой клетки при повторных воздействиях Glu связаны линейно, то величина тангенса угла наклона составляет 0,69 ($R^2 = 0,84$, $N = 211$ клеток). Это значительно меньше теоретического значения, равного 1, который наблюдали бы при одинаковых увеличениях $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в ответ на одинаковые добавки Glu. Клетки, очевидно, не успевали полностью восстановить пути поступления Ca^{2+} в цитозоль, несмотря на достаточно длительный 15-минутный период между двумя последовательными добавками Glu (**рис. 5А**).

Подъем $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в ответ на повторную добавку Glu, выполненный в присутствии смеси МК-801 и CNQX, ингибиторов iGluRs, соответственно, NMDA- и AMPA-типов, был значительно ниже, чем на первую аппликацию Glu (**рис. 5Б**). В отличие от контрольного эксперимента (**рис. 5А, 5Г**), наблюдалась не корреляция между величинами AUC при первой и второй добавках Glu, а тенденция к снижению AUC в тех клетках, которые имели большую AUC при первом введении Glu. Более того, наклон графика (**рис. 5Д**), исходя из линейной аппроксимации совокупности AUC индивидуальных клеток, имел отрицательное значение (наклон – 0,024, $R^2 = 0,124$, $N = 175$ клеток), напоминая то, что наблюдалось при блокаде поступления Ca^{2+} по NMDA- и AMPA-каналам, когда удаляли Ca^{2+} из внеклеточного буфера (**рис. 2 и 3**).

Ингибирование mGluRs с помощью неселективного ингибитора AIDA, вызывало не снижение AUC в ответ на повторную добавку Glu в присутствии AIDA (100 мкМ) [19], как можно было ожидать, а увеличение по сравнению с контролем (наклон 1,0 по сравнению с 0,69) (**рис. 5Е**). По-видимому, ингибирование mGluRs способствует восстановлению путей поступления Ca^{2+} по NMDA- и AMPA-каналам.

Обсуждение

Glu служит основным возбуждающим нейромедиатором клеток мозга, поэтому структурно-функциональным взаимодействиям iGluRs и mGluRs посвящено множество работ. Интенсивность и характер этих взаимодействий зависит от использованных моделей и условий их применения. Первичные нейрональные культуры из коры головного мозга крысы можно отнести к самым распространённым моделям. Одно из главных преимуществ состоит в относи-

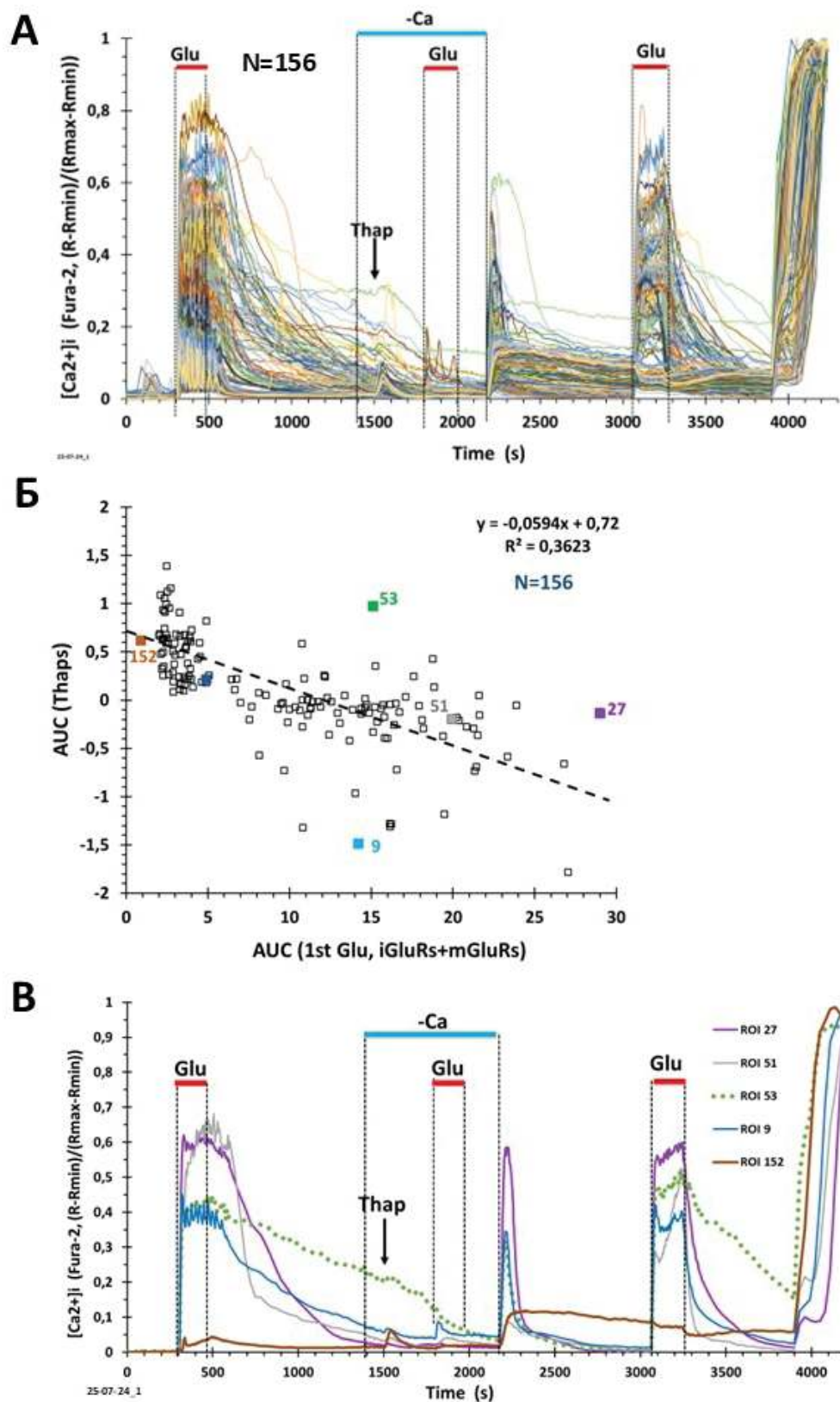


Рис. 4. Изменения $[Ca^{2+}]_i$ при действии Glu в условиях ингибирования Ca^{2+} -АТФазы эндоплазматического ретикула (ЭПР) в клетках первичной культуры из коры мозга крысы. А: изменения $[Ca^{2+}]_i$ в индивидуальных клетках в ответ на Glu и тапсигаргин (Thaps, 5 мкМ). Б: соотношения между площадями под кривыми изменений $[Ca^{2+}]_i$ (AUC, отн. ед.), вызванными добавками Glu и Thaps; добавки Glu сделаны в Ca^{2+} содержащем буфере, когда Ca^{2+} поступает в цитозоль в результате активации как ионотропных, так и метаботропных рецепторов (ось абсцисс AUC, iGluRs+mGluRs); добавка Thaps выполнена в бескальциевом буфере, в котором Ca^{2+} поступает только из ЭПР. В: графики изменений $[Ca^{2+}]_i$ нескольких представительных клеток, чьи AUC соответствуют цветным точкам на панели (Б). Номера и цвет кривых на панели (В) соответствует точкам AUC на панели (Б).

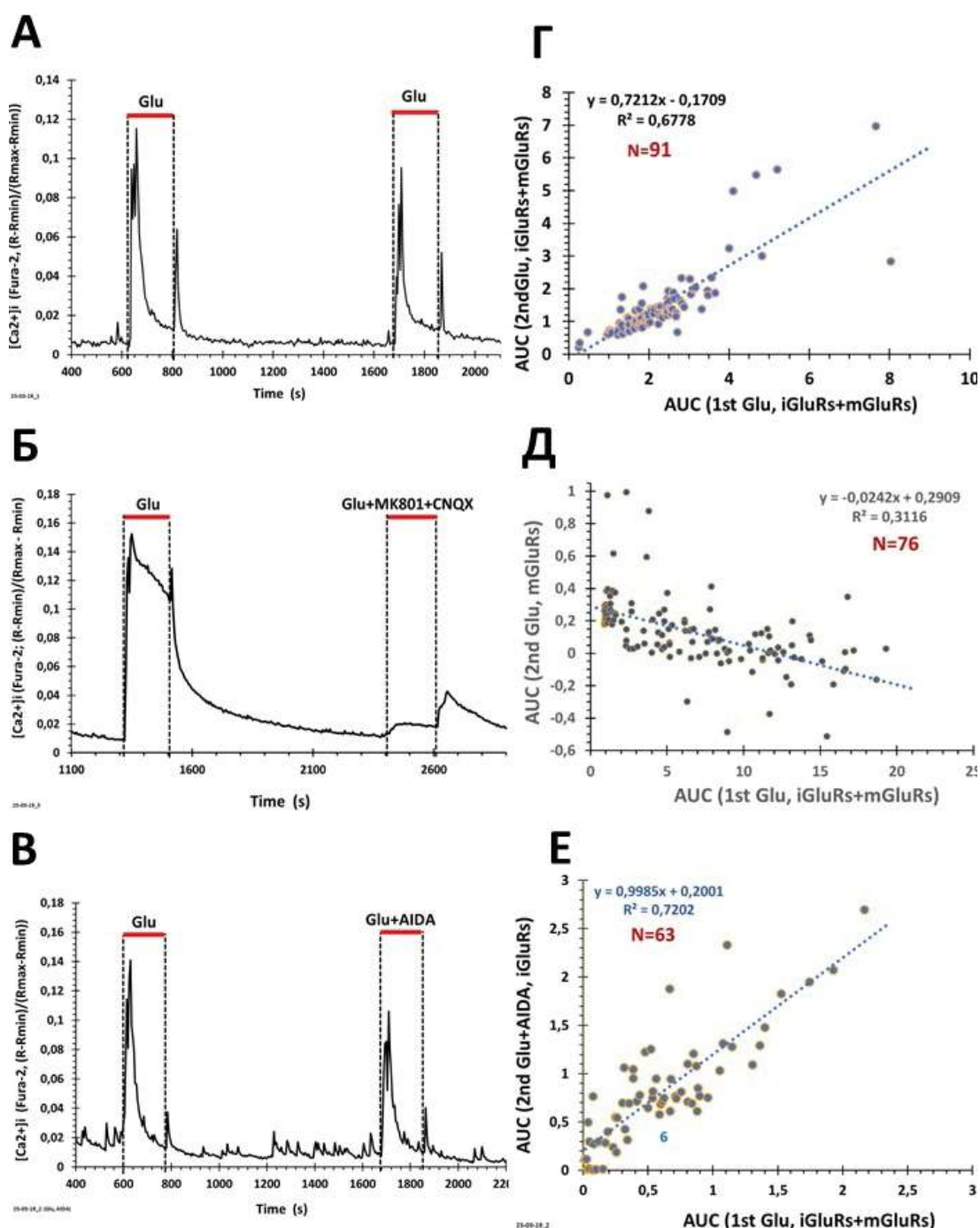


Рис. 5. Изменения внутриклеточной концентрации свободного кальция ($[Ca^{2+}]_i$) при действии глутамата на клетки первичной культуры из коры мозга крысы. А: изменения $[Ca^{2+}]_i$ при действии глутамата (Glu, 100 мкМ). Б: то же при действии Glu в присутствии ингибиторов ионотропных глутаматных рецепторов (iGluRs) МК-801 и CNQX (10мкМ каждый). В: то же в присутствии ингибитора метаботропных глутаматных рецепторов (mGluRs) AIDA (100мкМ). Г, Д, Е: соотношения между площадями под кривыми изменений $[Ca^{2+}]_i$, когда (Г) первая и повторная добавка Glu сделаны в буферах одинакового состава, (Д) повторная добавка выполнена в присутствии ингибиторов iGluRs и (Е) повторную добавку выполнили в присутствии ингибиторов mGluRs. Каждая точка на панелях Г, Д, Е соответствует одной клетке.

тельной лёгкости получения из коры большого количества клеток. Осложняющим обстоятельством является очень разнородный клеточный состав по сравнению с другими разделами мозга, затрудняющий интерпретацию результатов, в частности, соотнесения получаемых данных с типом клеток. В данной работе представлена попытка анали-

за амплитуды и формы Ca^{2+} -ответов, вызванных активацией клеток первичной нейрональной культуры глутаматом.

Индукцированное Glu увеличение $[Ca^{2+}]_i$ обусловлено поступлением Ca^{2+} в цитозоль из внеклеточной среды, прежде всего через iGluRs и высвобождением Ca^{2+} из ЭПР через ионные каналы IP_3 -рецепторов при активации

mGluRs первого типа (mGluR1 и 5) [4, 12, 16]. Анализ Ca^{2+} сигналов в ответ на добавку Glu показал, что в полученных нами первичных нейрональных культурах из коры мозга крысы, доля клеток, у которых в изменениях $[\text{Ca}^{2+}]_i$ доминирует вклад iGluRs, составляет около 20%. По морфологическим признакам (рис. 1) и амплитуде $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (рис. 2) эти клетки, соответствуют нейронам. Доля клеток, вероятно глиальных, у которых в Ca^{2+} сигналах преобладает вклад mGluRs, колеблется в пределах 35–55%. Отнесение остальных 25–45% клеток затруднительно без иммунофлуоресцентного окрашивания белков-маркеров, поскольку в динамике $[\text{Ca}^{2+}]_i$ этих клеток присутствуют сигналы, вызванные активацией как iGluRs, так и mGluRs.

Сопоставление вызванных глутаматом интегральных Ca^{2+} сигналов (AUC) в Ca^{2+} -содержащем буфере, с AUC в бескальциевом буфере, а также с AUC в присутствии тапсигаргина, ингибитора mGluRs первого типа (mGluR1 и 5), или ингибиторов iGluRs (MK-801+CNQX) не выявило четкой корреляции между AUC первого и повторного действия Glu (рис. 3, 4). Большой разброс значений AUC (рис. 3-5) является отражением разнообразия механизмов регуляции Ca^{2+} гомеостаза клеток в первичной культуре. Тем не менее, в этих протоколах наклоны зависимостей AUC при второй добавке Glu от величин AUC при первой добавке Glu имели в линейном приближении отрицательные значения (от $-0,024$ до $-0,059$). Другими словами, проявилась тенденция к снижению вклада mGluRs в Glu-индуцированный рост $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в тех клетках, в которых он был большим и определялся, очевидно, поступлением Ca^{2+} по ионным каналам плазмалеммы, прежде всего по NMDA- и AMPA-каналам [16]. Возможно, чем больше Ca^{2+} может войти в клетку по ионотропным каналам плазмалеммы, тем в меньшей степени такие клетки нуждаются в запасах Ca^{2+} в ЭПР для регулирования Ca^{2+} -зависимых внутриклеточных процессов.

По наклону графика соотношений AUC после первой и второй добавок Glu видно, что повторное воздействие Glu вызывает меньший рост $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (меньшую AUC; тангенс угла наклона 0,69), несмотря на идентичные условия обеих добавок (рис. 2Г). Это значительно меньше теоретического значения 1, которого можно ожидать при одинаковых увеличениях $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в ответ на одинаковые добавки Glu. В эксперименте с сестринской культурой, в котором повторную добавку Glu выполняли в присутствии AIDA, блокатора mGluRs первого типа (mGluR1 и 5), наклон графика соотношений AUC после первой и второй добавок Glu, про-

тив ожидания, не понизился ещё больше из-за отсутствия вклада mGluRs в рост $[\text{Ca}^{2+}]_i$, а стал практически равен теоретическому значению 1 (рис. 5Е). Такой контринтуитивный результат может указывать на то, что ингибирование mGluR1 и mGluR5 с помощью AIDA, которую осуществляли при второй аппликации Glu (рис. 5В, 5Е), отменяет снижение кальциевой проводимости iGluRs, наблюдаемой в контрольном эксперименте (рис. 5А, 5Г). На культуре кортикальных нейронов из мозга мыши было показано, что активация mGluR1, 5 увеличивает ионную проводимость NMDA-рецепторов и снижает выживаемость клеток [20]. Однако позже этим же авторским коллективом было обнаружено, что эффект зависит от длительности стимуляции mGluRs и может сменяться на противоположный, если действие Glu укладывается в период от 1 до 45 мин [21]. Таким образом, в полученных нами культурах и использованном протоколе, вероятно, реализуется вариант снижения инактивации (сохранения активности) iGluRs при ингибировании mGluRs (рис. 5).

Заключение

Анализ Ca^{2+} -ответов клеток первичной нейрональной культуры из коры головного мозга крысы на стимуляцию глутаматом выявил большое разнообразие изменений $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Эта разнородность обусловлена как наличием разных типов клеток, а именно, нейронов и глии, так, вероятно, и различиями Ca^{2+} гомеостаза среди нейронов. Возможно, один из способов регулирования гомеостаза заключается в обратном соотношении Ca^{2+} потоков через плазмалемму по ионотропным каналам, прежде всего iGluRs, и мобилизации Ca^{2+} из ЭПР по IP_3 -каналам, в результате активации mGluRs. Используемые в данной работе методические приёмы, позволившие охарактеризовать особенности участия iGluRs и mGluRs в регуляции Ca^{2+} гомеостаза клеток первичной нейрональной культуры, могут быть полезны для анализа биологической активности веществ, способных регулировать ионные каналы плазмалеммы и ЭПР.

Авторский вклад:

Жердев А.А. – проведение экспериментов, анализ данных, написание текста; Бакаева З.В. – планирование работы, обсуждение результатов, редактирование текста; Сурин А.М. – планирование работы, анализ данных, написание и редактирование текста, администрирование.

Список литературы

1. Reiner A., Levitz J. Glutamatergic Signaling in the Central Nervous System: Ionotropic and Metabotropic Receptors in Concert. *Neuron*. 2018; 98(6): 1080–1098. DOI: 10.1016/J.NEURON.2018.05.018
2. Hansen K.B., Wollmuth L.P., Bowie D., Furukawa H., Menniti F.S., Sobolevsky A.I., Swanson G.T., Swanger S.A., Greger I.H., Nakagawa T., McBain C.J., Jayaraman V., Low C.M., Dell'acqua M.L., Diamond J.S., Camp C.R., Perszyk R.E., Yuan H., Traynelis S.F. Structure, Function, and Pharmacology of Glutamate Receptor Ion Channels. *Pharmacol. Rev.* 2021; 73(4): 1469–1658. DOI: 10.1124/PHARMREV.120.000131/-/DCSUPPLEMENTAL
3. Wu W.L., Gong X.X., Qin Z.H., Wang Y. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to the pathogenesis of neurodegenerative diseases-an update. *Acta Pharmacol. Sin.* 2025; 46(12): 3129–3142. DOI: 10.1038/S41401-025-01576-W

4. Berridge M. J. The Inositol Trisphosphate/Calcium Signaling Pathway in Health and Disease. *Physiol. Rev.* 2016; 96(4): 1261–1296. DOI: 10.1152/physrev.00006.2016
5. Neves D., Salazar I.L., Almeida R.D., Silva R.M. Molecular mechanisms of ischemia and glutamate excitotoxicity. *Life Sci.* 2023; 328:121814. DOI: 10.1016/j.lfs.2023.121814
6. Nicoletti F., Di Menna L., Iacovelli L., Orlando R., Zuen A. R., Conn P. J., Dogra S., Joffe M. E. GPCR interactions involving metabotropic glutamate receptors and their relevance to the pathophysiology and treatment of CNS disorders. *Neuropharmacology.* 2023; 235: 109569. DOI: 10.1016/J.NEUROPHARM.2023.109569
7. Phillips M. J., Voeltz G. K. Structure and function of ER membrane contact sites with other organelles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2016; 17(2): 69–82. DOI: 10.1038/nrm.2015.8
8. Depaoli M. R., Hay J. C., Graier W. F., Malli R. The enigmatic ATP supply of the endoplasmic reticulum. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 2019; 94(2): 610–628. DOI: 10.1111/brv.12469
9. Heidinger V., Manzerra P., Wang X. Q., Strasser U., Yu S. P., Choi D. W., Behrens M. M. Metabotropic Glutamate Receptor 1-Induced Upregulation of NMDA Receptor Current: Mediation through the Pyk2/Src-Family Kinase Pathway in Cortical Neurons. *J. Neurosci.* 2002; 22(13): 5452. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.22-13-05452.2002
10. Sarantis K., Tsiamak E., Kouvaros S., Papatheodoropoulos C., Angelatou F. Adenosine A₂A receptors permit mGluR5-evoked tyrosine phosphorylation of NR2B (Tyr1472) in rat hippocampus: a possible key mechanism in NMDA receptor modulation. *J. Neurochem.* 2015; 135(4): 714–726. DOI: 10.1111/JNC.13291
11. Krasil'nikova I., Surin A., Sorokina E., Fisenko A., Boyarkin D., Balyasin M., Demchenko A., Pomytkin I., Pinelis V. Insulin Protects Cortical Neurons Against Glutamate Excitotoxicity. *Front. Neurosci.* 2019; 13: 488333. DOI: 10.3389/FNINS.2019.01027/BIBTEX
12. Verkhratsky A., Nedergaard M. Physiology of Astroglia. *Physiol. Rev.* 2018. 98(1): 239–389. DOI: 10.1152/physrev.00042.2016
13. Bakaeva Z., Goncharov M., Frolov F., Krasilnikova I., Sorokina E., Zgodova A., Smolyarchuk E., Zavadskiy S., Andreeva L., Myasoedov N., Fisenko A., Savostyanov K. Regulatory Peptide Pro-Gly-Pro Accelerates Neuroregeneration of Primary Neuroglial Culture after Mechanical Injury in Scratch Test. *Int. J. Mol. Sci.* 2024; 25(20). DOI: 10.3390/ijms252010886
14. Bakaeva Z., Goncharov M., Krasilnikova I., Zgodova A., Frolov D., Grebenik E., Timashev P., Pinelis V., Surin A. Acute and Delayed Effects of Mechanical Injury on Calcium Homeostasis and Mitochondrial Potential of Primary Neuroglial Cell Culture: Potential Causal Contributions to Post-Traumatic Syndrome. *Int. J. Mol. Sci.* 2022; 23(7): 3858. DOI: 10.3390/ijms23073858
15. Nicholls J.C., Martin A.R., Wallace B.C., Fuchs P.A. *From Neuron to Brain.* Sunderland, Sinauer Associates Inc., 2001. 672 p.
16. Khodorov B. Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurones. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2004; 86(2): 279–351. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2003.10.002
17. Surin A., Pshenichkin S., Grajkowska E., Surina E., Wroblewski J. T. Cyclothiazide selectively inhibits mGluR1 receptors interacting with a common allosteric site for non-competitive antagonists. *Neuropharmacology.* 2007; 52(3): 744–754. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2006.09.018
18. Thastrup O. Role of Ca²⁺(+)-ATPases in regulation of cellular Ca²⁺ signalling, as studied with the selective microsomal Ca²⁺(+)-ATPase inhibitor, thapsigargin. *Agents Actions.* 1990; 29(1–2): 8–15. DOI: 10.1007/BF01964706
19. Crawford J. H., Wainwright A., Heavens R., Pollock J., Martin D. J., Scott R. H., Seabrook G. R. Mobilisation of intracellular Ca²⁺ by mGluR5 metabotropic glutamate receptor activation in neonatal rat cultured dorsal root ganglia neurones. *Neuropharmacology.* 2000; 39(4): 621–630. DOI: 10.1016/S0028-3908(99)00167-7
20. Bruno V., Copani A., Knöpfel T., Kuhn R., Casabona G., Dell' Albani P., Condorelli D. F., Nicoletti F. Activation of metabotropic glutamate receptors coupled to inositol phospholipid hydrolysis amplifies NMDA-induced neuronal degeneration in cultured cortical cells. *Neuropharmacology.* 1995; 34(8): 1089–1098. DOI: 10.1016/0028-3908(95)00077-J
21. Bruno V., Battaglia G., Copani A., D'Onofrio M., Di Iorio P., De Blasi A., Melchiorri D., Flor P. J., Nicoletti F. Metabotropic glutamate receptor subtypes as targets for neuroprotective drugs. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2001; 21(9): 1013–1033. DOI: 10.1097/00004647-200109000-00001

References

1. Reiner A., Levitz J. Glutamatergic Signaling in the Central Nervous System: Ionotropic and Metabotropic Receptors in Concert. *Neuron.* 2018; 98(6): 1080–1098. DOI: 10.1016/J.NEURON.2018.05.018
2. Hansen K.B., Wollmuth L.P., Bowie D., Furukawa H., Menniti F.S., Sobolevsky A.I., Swanson G.T., Swanger S.A., Greger I.H., Nakagawa T., McBain C.J., Jayaraman V., Low C.M., Dell'acqua M.L., Diamond J.S., Camp C.R., Perszyk R.E., Yuan H., Traynelis S.F. Structure, Function, and Pharmacology of Glutamate Receptor Ion Channels. *Pharmacol. Rev.* 2021; 73(4): 1469–1658. DOI: 10.1124/PHARMREV.120.000131/-DCSUPPLEMENTAL
3. Wu W.L., Gong X.X., Qin Z.H., Wang Y. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to the pathogenesis of neurodegenerative diseases-an update. *Acta Pharmacol. Sin.* 2025; 46(12): 3129–3142. DOI: 10.1038/S41401-025-01576-W
4. Berridge M. J. The Inositol Trisphosphate/Calcium Signaling Pathway in Health and Disease. *Physiol. Rev.* 2016; 96(4): 1261–1296. DOI: 10.1152/physrev.00006.2016
5. Neves D., Salazar I.L., Almeida R.D., Silva R.M. Molecular mechanisms of ischemia and glutamate excitotoxicity. *Life Sci.* 2023; 328:121814. DOI: 10.1016/j.lfs.2023.121814
6. Nicoletti F., Di Menna L., Iacovelli L., Orlando R., Zuen A. R., Conn P. J., Dogra S., Joffe M. E. GPCR interactions involving metabotropic glutamate receptors and their relevance to the pathophysiology and treatment of CNS disorders. *Neuropharmacology.* 2023; 235: 109569. DOI: 10.1016/J.NEUROPHARM.2023.109569
7. Phillips M. J., Voeltz G. K. Structure and function of ER membrane contact sites with other organelles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2016; 17(2): 69–82. DOI: 10.1038/nrm.2015.8
8. Depaoli M. R., Hay J. C., Graier W. F., Malli R. The enigmatic ATP supply of the endoplasmic reticulum. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 2019; 94(2): 610–628. DOI: 10.1111/brv.12469
9. Heidinger V., Manzerra P., Wang X. Q., Strasser U., Yu S. P., Choi D. W., Behrens M. M. Metabotropic Glutamate Receptor 1-Induced Upregulation of NMDA Receptor Current: Mediation through the Pyk2/Src-Family Kinase Pathway in Cortical Neurons. *J. Neurosci.* 2002; 22(13): 5452. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.22-13-05452.2002
10. Sarantis K., Tsiamak E., Kouvaros S., Papatheodoropoulos C., Angelatou F. Adenosine A₂A receptors permit mGluR5-evoked tyrosine phosphorylation of NR2B (Tyr1472) in rat hippocampus: a possible key mechanism in NMDA receptor modulation. *J. Neurochem.* 2015; 135(4): 714–726. DOI: 10.1111/JNC.13291
11. Krasil'nikova I., Surin A., Sorokina E., Fisenko A., Boyarkin D., Balyasin M., Demchenko A., Pomytkin I., Pinelis V. Insulin

- Protects Cortical Neurons Against Glutamate Excitotoxicity. *Front. Neurosci.* 2019; 13: 488333. DOI: 10.3389/FNINS.2019.01027/BIBTEX
12. Verkhatsky A., Nedergaard M. Physiology of Astroglia. *Physiol. Rev.* 2018. 98(1): 239–389. DOI: 10.1152/physrev.00042.2016
 13. Bakaeva Z., Goncharov M., Frolov F., Krasilnikova I., Sorokina E., Zgodova A., Smolyarchuk E., Zavadskiy S., Andreeva L., Myasoedov N., Fisenko A., Savostyanov K. Regulatory Peptide Pro-Gly-Pro Accelerates Neuroregeneration of Primary Neuroglial Culture after Mechanical Injury in Scratch Test. *Int. J. Mol. Sci.* 2024; 25(20). DOI: 10.3390/ijms252010886
 14. Bakaeva Z., Goncharov M., Krasilnikova I., Zgodova A., Frolov D., Grebenik E., Timashev P., Pinelis V., Surin A. Acute and Delayed Effects of Mechanical Injury on Calcium Homeostasis and Mitochondrial Potential of Primary Neuroglial Cell Culture: Potential Causal Contributions to Post-Traumatic Syndrome. *Int. J. Mol. Sci.* 2022; 23(7): 3858. DOI: 10.3390/ijms23073858
 15. Nicholls J.C., Martin A.R., Wallace B.C., Fuchs P.A. *From Neuron to Brain*. Sunderland, Sinauer Associates Inc., 2001. 672 p.
 16. Khodorov B. Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurones. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2004; 86(2): 279–351. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2003.10.002
 17. Surin A., Pshenichkin S., Grajkowska E., Surina E., Wroblewski J. T. Cyclothiazide selectively inhibits mGluR1 receptors interacting with a common allosteric site for non-competitive antagonists. *Neuropharmacology.* 2007; 52(3): 744–754. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2006.09.018
 18. Thastrup O. Role of Ca²⁺(+)-ATPases in regulation of cellular Ca²⁺ signalling, as studied with the selective microsomal Ca²⁺(+)-ATPase inhibitor, thapsigargin. *Agents Actions.* 1990; 29(1–2): 8–15. DOI: 10.1007/BF01964706
 19. Crawford J. H., Wainwright A., Heavens R., Pollock J., Martin D. J., Scott R. H., Seabrook G. R. Mobilisation of intracellular Ca²⁺ by mGluR5 metabotropic glutamate receptor activation in neonatal rat cultured dorsal root ganglia neurones. *Neuropharmacology.* 2000; 39(4): 621–630. DOI: 10.1016/S0028-3908(99)00167-7
 20. Bruno V., Copani A., Knöpfel T., Kuhn R., Casabona G., Dell’Albani P., Condorelli D. F., Nicoletti F. Activation of metabotropic glutamate receptors coupled to inositol phospholipid hydrolysis amplifies NMDA-induced neuronal degeneration in cultured cortical cells. *Neuropharmacology.* 1995; 34(8): 1089–1098. DOI: 10.1016/0028-3908(95)00077-J
 21. Bruno V., Battaglia G., Copani A., D’Onofrio M., Di Iorio P., De Blasi A., Melchiorri D., Flor P. J., Nicoletti F. Metabotropic glutamate receptor subtypes as targets for neuroprotective drugs. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2001; 21(9): 1013–1033. DOI: 10.1097/00004647-200109000-00001

Сведения об авторах:

Жердев Алексей Алексеевич — аспирант лаборатории фундаментальных и прикладных проблем боли Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; <https://orcid.org/0009-0005-6222-9040>

Бакаева Занда Валериевна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, руководитель лаборатории нейробиологии и основ развития мозга Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации; старший научный сотрудник Управления научной и инновационной политики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Калмыцкий государственный университет имени Б.Б.Городовикова»; <https://orcid.org/0000-0002-2797-3270>

Сурин Александр Михайлович — доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории фундаментальных и прикладных проблем боли Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; <https://orcid.org/0000-0003-1104-5442>