

Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова Российской академии наук
Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова
Биологический факультет

На правах рукописи



Федотова Анна Алексеевна

**ОСОБЕННОСТИ КАЛЬЦИЕВОГО И МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ОТВЕТОВ
АСТРОЦИТОВ МЫШИ НА ЛОКОМОЦИЮ**

Специальность – 1.5.24 – Нейробиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, член-корреспондент РАН
А. В. Семьянов

Москва – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

<i>ГЛОССАРИЙ</i>	4
<i>ВВЕДЕНИЕ</i>	6
<i>ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</i>	12
1.1 Особенности Ca^{2+} активности в астроцитах	12
1.1.1 Связь Ca^{2+} активности в астроцитах с морфологией	12
1.1.2 Внутриклеточные механизмы Ca^{2+} активности в астроцитах	15
1.1.3 Спонтанная астроцитарная Ca^{2+} активность	16
1.1.4 Вызванная астроцитарная Ca^{2+} активность	17
1.2 Экспериментальные модели для исследования астроцитарной Ca^{2+} активности.....	18
1.3 Ca^{2+} активность в астроцитах при локомоции и других типах поведения	20
1.4 Нейрон-астроцитарные взаимодействия в мозге	24
1.4.1 Уровни нейрон-астроцитарных взаимодействий	24
1.4.2 Эффект нейромодуляторов на астроцитарную Ca^{2+} активность	26
1.4.3 Особенности Ca^{2+} активности в астроцитах и нейронах.....	27
1.5 Астроцит как компонент активной среды мозга.....	28
<u>1.6</u> Взаимодействия астроцитов, нейронов и кровеносных сосудов.....	30
1.7 Взаимосвязь Ca^{2+} и клеточного метаболизма	31
<i>МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</i>	35
2.1 Экспериментальные животные	35
2.2 Конструирование вирусных векторов.....	35
2.3 Инъекция AAV в мозг.....	37
2.3.1 Стереотаксическое введение AAV в мозг.....	37
2.3.2 Подбор серотипа и титра AAV	39
2.3.3 Подбор стереотаксических координат для инъекции AAV	40
2.4 Проведение морфологического контроля.....	41
2.4.1 Интракардиальная перфузия животных.....	41
2.4.2 Приготовление срезов мозга	41
2.4.3 Проведение иммуногистохимической окраски срезов мозга	42
2.4.4 Визуализация срезов мозга с помощью флуоресцентного микроскопа	43
2.5 Исследование Ca^{2+} активности в астроцитах и нейронах соматосенсорной коры мышей. 44	
2.5.1 Имплантация хронического краниального окна	44
2.5.2 Подготовка животных к эксперименту, хендлинг	45

2.5.3	Регистрация Ca^{2+} активности в астроцитах и нейронах соматосенсорной коры бодрствующих мышей	46
2.6	Исследование Ca^{2+} активности в астроцитах гиппокампа мышей	47
2.6.1	Билатеральная имплантация оптоволокон, совмещенная с инъекцией AAV	47
2.6.2	Поведенческие тесты	48
2.6.3	Регистрация Ca^{2+} активности в астроцитах гиппокампа методом фотометрии.....	49
2.7	Мониторинг степени оксигенации крови в сосудах и изучение редокс-состояния цитохромов дыхательной цепи митохондрий астроцитов и нейронов соматосенсорной коры бодрствующих мышей	51
2.8	Анализ полученных данных.....	52
2.8.1	Обработка данных Ca^{2+} активности в астроцитах и нейронах, полученных методом оптического имиджинга с двухфотонным возбуждением	52
2.8.2	Обработка фотометрического сигнала.....	55
2.8.3	Обработка видеозаписей поведения.....	55
2.8.4	Обработка спектров КР.....	57
2.8.5	Статистический анализ полученных данных	57
	<i>РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ</i>	58
3.1	Популяционный Ca^{2+} ответ астроцитов соматосенсорной коры мышей на локомоцию	58
3.1.1	Пространственно-временные характеристики популяционного Ca^{2+} ответа.....	59
3.1.2	Воспроизводимость пространственного паттерна популяционного Ca^{2+} ответа	72
3.2	Интегративная функция одиночных кортикальных астроцитов	79
3.3	Ca^{2+} динамика в астроцитах гиппокампа мышей при выполнении поведенческих тестов	84
3.4	Различия между Ca^{2+} ответами нейронов и астроцитов соматосенсорной коры на локомоцию	91
3.5	Изменение степени оксигенации крови и диаметра кровеносных сосудов соматосенсорной коры при локомоции	97
3.6	Различия между метаболическими ответами астроцитов и нейронов соматосенсорной коры на локомоцию	104
	<i>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</i>	110
	<i>ВЫВОДЫ</i>	113
	<i>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</i>	114
	<i>БЛАГОДАРНОСТИ</i>	114

ГЛОССАРИЙ

Ca²⁺ событие – непрерывная ограниченная во времени и пространстве область повышения уровня Ca²⁺.

ΔF/F (%) – относительное изменение интенсивности флуоресценции, полученное делением значимых отклонений сигнала (ΔF) на базовый уровень (F).

GCaMP6f – генетически кодируемый биосенсор, используемый для обнаружения и измерения концентрации Ca²⁺ в живых клетках.

Активная область (%) – общая площадь Ca²⁺ сегментов, разделенная на площадь окрашенной области.

Интегративная функция астроцита – распространение Ca²⁺ активности в астроците от дистальных отростков к соме, где происходит ее усиление и генерация Ca²⁺ осцилляций.

Конечный Ca²⁺ сегмент – последний сегмент Ca²⁺ события.

Коэффициент парной локомоции (КПЛ) – отношение величины второго ответа к величине первого при парных эпизодах локомоции.

Медиана Ca²⁺ ответа – момент времени, в котором значение ΔF/F в кадре превышает пороговое в 50-ти процентах пикселей, вовлеченных в ответ.

Начальный Ca²⁺ сегмент – первый сегмент Ca²⁺ события.

Плотность Ca²⁺ сегментов (сегментов/мм²) – количество Ca²⁺ сегментов, разделенное на площадь окрашенной области.

Рамановская спектроскопия, или спектроскопия комбинационного рассеяния – метод количественной оценки молекул и их состояния по характерным спектрам рамановского рассеяния.

Рефрактерность – обратимое снижение ответа на последующие стимулы.

Сегмент Ca²⁺ события, или Ca²⁺ сегмент – двумерное сечение Ca²⁺ события в пределах кадра.

Средняя площадь Ca²⁺ сегмента (мкм²) – общая площадь Ca²⁺ сегментов, разделенная на их количество.

Степень оксигенации крови (sO₂, %) – уровень насыщенности гемоглобина крови кислородом.

Экспозом – совокупность взаимодействующих между собой факторов (внешней среды, внутренней среды и образа жизни), оказывавших влияние на организм в течение всей жизни.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

λ_{em} – длина волны испускания

λ_{ex} – длина волны возбуждения

AAV – аденоассоциированный вирус

GFAP – глиальный кислый фибриллярный белок

GPCR – рецепторы, сопряженные с G-белком

IP₃ – инозитол-1,4,5-трифосфат

K_d – константа диссоциации

MCU – митохондриальный Ca²⁺ унипортер

mNCX – митохондриальный Na⁺/Ca²⁺-обменник

mPTP – переходная пора проницаемости митохондриальной мембраны

NCX – Na⁺/Ca²⁺-обменник

NKA – Na⁺/K⁺ АТФаза

NREM – медленноволновой сон

PBS – натрий-фосфатный буфер

PMCA – Ca²⁺-АТФаза плазматической мембраны

PFA – параформальдегид

REM – сон с быстрыми движениями глаз

SERCA – сарко/эндоплазматическая ретикулумная Ca²⁺-АТФаза

SVR – отношение площади объекта к объему

tDCS – транскраниальная стимуляция постоянным током

TRP-каналы – каналы переходного рецепторного потенциала

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

ацетил-КоА – ацетилкофермент А

ВКП – внеклеточное пространство

ГАМК – гамма-аминомасляная кислота

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

КПЛ – коэффициент парной локомоции

КР – комбинационное рассеяние

МПП – межмембранное пространство митохондрий

НА – норадреналин

НАД⁺ и НАДН – окисленная и восстановленная формы никотинамидадениндинуклеотида

ОФ – окислительное фосфорилирование

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

ЭТЦ – электрон-транспортная (дыхательная) цепь митохондрий

ЦНС – центральная нервная система

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Работа мозга обеспечивается динамическим взаимодействием между различными типами клеток (нейронами, глией, клетками кровеносных сосудов) и неклеточными элементами (внеклеточным пространством и матриксом), являющимися компонентами активной среды мозга [1]. В течение длительного времени бóльшая часть работ в области нейробиологии была посвящена только одному типу клеток мозга – нейронам. К настоящему моменту многие исследования показали роль других элементов активной среды, в частности, астроцитов, в обеспечении функций мозга в норме и при развитии патологий.

Астроциты – электрически невозбудимые клетки, функционально взаимодействующие с нейронами на различных уровнях: отдельных синапсов, клеток и нейронных сетей. Функционирование астроцитов изменяется под действием факторов экспозома [2–4]. Для астроцитов характерна сложная внутриклеточная Ca^{2+} сигнализация, определяемая входами от многих элементов активной среды мозга: локальной нейронной сети, нейромодуляторных проекций, соседних астроцитов, кровеносных сосудов [5]. В свою очередь, астроцитарная Ca^{2+} активность – изменение концентрации Ca^{2+} в различных компартментах астроцита – необходима для оптимального функционирования нервной системы [6] и может вовлекаться в модуляцию синаптической пластичности [7], регуляцию тонуса кровеносных сосудов [8] и модуляцию астроцитарного метаболизма [9]. Исследование распространения Ca^{2+} активности по астроцитарной сети возможно только в интактном мозге. На данный момент количество работ, посвященных изучению астроцитов *in vivo*, остается немногочисленным. Особенно мало знаний получено в отношении Ca^{2+} активности в астроцитах при разных типах поведения животных [10–12].

Астроциты и нейроны морфологически и функционально связаны с кровеносными сосудами головного мозга и формируют совместно нейро-глио-сосудистый комплекс. С одной стороны, кислород, поступающий в ткань мозга из крови, является конечным акцептором электронов в электрон-транспортной (ЭТЦ, дыхательной) цепи митохондрий клеток. С другой стороны, цитоплазматический Ca^{2+} , поступая в митохондрии, может активировать ферменты цикла Кребса [13] и модулировать активность ЭТЦ [14]. Процессы окислительного фосфорилирования (ОФ) находятся в динамическом равновесии с гликолизом и обеспечивают клетку необходимым количеством АТФ. В нейронах основная часть АТФ образуется в результате ОФ, в астроцитах же важное значение играет гликолиз, на который клетки этого типа могут переключаться при определенных условиях [15]. В частности, гликолиз может активироваться при повышении концентрации цитоплазматического Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) в астроцитах. При этом неизвестно, как изменяются ОФ и редокс-состояние митохондрий в астроцитах и нейронах, а

также взаимосвязанная с ними локальная оксигенация крови (sO_2) в кровеносных сосудах мозга в условиях *in vivo*.

Степень разработанности темы. В литературе последних лет показано изменение астроцитарной Ca^{2+} активности во время сна, обучения, при формировании памяти и изменении эмоционального состояния [11,16,17]. В частности, продемонстрирована связь астроцитарной Ca^{2+} активности с локомоцией [18–21]. Однако детальный анализ развития астроцитарного Ca^{2+} ответа в пространстве и времени как на уровне популяции клеток, так и на субклеточном уровне отсутствует.

Исследование Ca^{2+} активности в астроцитах животных, вовлеченных в физиологически релевантное поведение, стало возможным благодаря разработке генетически кодируемых Ca^{2+} сенсоров, клеточно-специфического молекулярного таргетинга и визуализации мозга в естественных условиях [16]. Современные методы оптического имиджинга позволили наблюдать за динамикой астроцитарной Ca^{2+} активности в реальном времени *in vivo*. Основным подходом является оптический имиджинг с помощью мультифотонной флуоресцентной микроскопии с использованием различных модификаций экспериментальных установок, позволяющих создать животному условия для перемещения: шара, беговой дорожки или левитирующей платформы [22–24]. Однако в таких экспериментах животные ограничены в своей способности проявлять более сложное поведение, например, социальное. В связи с этим в последние годы были разработаны подходы, позволяющие работать на свободноподвижных мышах. Всё чаще используют миниатюрный флуоресцентный микроскоп, надеваемый животному на голову [25], или оптоволокна, имплантируемые в мозг и позволяющие при помощи фотометрии регистрировать интегральный флуоресцентный сигнал с определенной области [26]. Усовершенствование методов фотометрии позволило регистрировать клеточную активность в глубоких структурах мозга с минимальным повреждением ткани. Тем не менее фотометрия применяется, в основном, для мониторинга Ca^{2+} сигналов в нейронах. Исследования по регистрации астроцитарной Ca^{2+} активности из гиппокампа свободноподвижных мышей с помощью фотометрии начали появляться в мировой литературе лишь в последние годы в силу трудоемкости [27,28].

Ионы Ca^{2+} являются важнейшим вторичным мессенджером и вовлечены в регуляцию многих внутриклеточных процессов, среди которых ключевое значение имеет клеточный метаболизм [29]. Процессы гликолиза как в нейронах, так и в астроцитах лучше исследованы по сравнению с ОФ, которое в условиях *in vivo* совершенно не изучено. Имеющиеся в литературе данные сосредоточены, в основном, на строении ЭТЦ митохондрий и, в частности, описывают различные комплексы ЭТЦ [30]. При этом практически все существующие в данный момент

сведения о функционировании дыхательной цепи нейронов и астроцитов получены на культурах, что может отличаться от условий *in vivo*.

Цель и задачи исследования. Цель данной работы – проанализировать изменения активности мозга мыши при локомоции, оценив функциональные ответы астроцитов, нейронов и кровеносных сосудов.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Изучить пространственно-временные характеристики Ca^{2+} ответов популяции астроцитов первичной соматосенсорной коры мышей на локомоцию.
2. Проанализировать развитие астроцитарного Ca^{2+} ответа на локомоцию с субклеточным разрешением.
3. Исследовать Ca^{2+} динамику в астроцитах гиппокампа мышей при выполнении поведенческих тестов.
4. Сравнить Ca^{2+} ответы астроцитов и нейронов соматосенсорной коры мышей на локомоцию.
5. Провести мониторинг степени оксигенации крови в кровеносных сосудах соматосенсорной коры мыши при локомоции.
6. Оценить метаболические ответы астроцитов и нейронов мышей на локомоцию, исследовав редокс-состояние дыхательной цепи их митохондрий.

Научная новизна работы. Впервые проведено комплексное исследование изменения свойств нейронов, астроцитов и кровеносных сосудов соматосенсорной коры мыши при локомоции. Впервые детально изучена пространственно-временная динамика параметров астроцитарной Ca^{2+} активности в соматосенсорной коре мыши в ответ на локомоцию на уровне популяции клеток и на субклеточном уровне. Выявлено, что пространственный паттерн активации популяции астроцитов при локомоции воспроизводится от одного эпизода локомоции к другому. Впервые исследована интегративная функция астроцитов, характеризующая сому как интегратор Ca^{2+} активности, распространяющейся от дистальных отростков к соме, где увеличивается амплитуда изменений концентрации Ca^{2+} и происходит генерация Ca^{2+} осцилляций. Осцилляции $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в астроците продемонстрированы в условиях *in vivo* впервые. Исследование Ca^{2+} динамики в астроцитах гиппокампа мышей, выполняющих тесты на социальность и социальную новизну, является уникальным и проведено впервые в мире. Впервые исследован ответ различных компонентов активной среды мозга (астроцит, нейрон, кровеносный сосуд) на последовательные эпизоды локомоции. Показано, что Ca^{2+} ответ астроцитов, в отличие от ответа нейронов, развивается с задержкой и обладает рефрактерностью при последующей локомоции. С использованием метода рамановской микроспектроскопии (спектроскопии комбинационного рассеяния, КР) *in vivo* впервые получены сведения об

изменении локальной оксигенации крови в артериолах и венулах соматосенсорной коры и обнаружены функциональные различия в работе ЭТЦ митохондрий астроцитов и нейронов при локомоции.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты работы значительно расширяют современные представления об особенностях астроцитарной Ca^{2+} активности бодрствующих мышей и вносят вклад в понимание принципиально разных типов Ca^{2+} сигнализации в астроцитах и нейронах. В работе впервые разработан подход, основанный на рамановской микроспектроскопии, позволяющий в условиях *in vivo* осуществлять мониторинг редокс-состояния митохондрий идентифицированных клеток мозга в сочетании с мониторингом sO_2 в кровеносных сосудах. Предложенный подход позволил впервые получить данные о редокс-состоянии ЭТЦ астроцитов и нейронов *in vivo* и в дальнейшем поможет выявить механизмы внутри- и межклеточной сигнализации, основанной на активных формах кислорода.

Результаты работы способствуют поиску мишеней для лечения различных заболеваний, сопровождающихся функциональными изменениями астроцитов (например, эпилепсии и различных нейродегенеративных заболеваний, в частности, болезни Альцгеймера, болезни Хантингтона, болезни Паркинсона, латерального амиотрофического склероза).

Методология и методы исследования. Объектом исследования являлись самцы и самки мышей линии C57Bl/6 в возрасте 2-9 месяцев. Все эксперименты проведены в соответствии с Директивой 2010/63/EU об использовании животных для экспериментальных исследований.

Предмет исследования – компоненты активной среды мозга: астроциты, нейроны, артериолы и венулы первичной соматосенсорной коры мыши.

Для изучения пространственно-временной динамики Ca^{2+} активности в популяции астроцитов и нейронов использовали GCaMP6f, экспрессированный в этих клетках под специфичными промоторами. Вирусный вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), кодирующий GCaMP6f, доставляли в мозг путем стереотаксической инъекции. Предварительно проводили подбор серотипа и титра вируса и координат инъекции с применением методов интракардиальной перфузии мышей, приготовления срезов мозга, иммуногистохимической окраски.

Ca^{2+} имиджинг с помощью мультифотонного микроскопа проводили на перемещающихся по вращающемуся диску или «левитирующей платформе» мышах с хроническими краниальными окнами. Для характеристики Ca^{2+} активности оценивали изменения ее параметров (относительного изменения флуоресцентного сигнала $\Delta F/F$, активной области, средней площади Ca^{2+} сегмента, плотности Ca^{2+} сегментов).

Для исследования Ca^{2+} динамики в астроцитах гиппокампа во время выполнения мышами поведенческих тестов проводили билатеральную регистрацию флуоресцентного сигнала от астроцитов гиппокампа при помощи метода фотометрии.

Для мониторинга $s\text{O}_2$ в кровеносных сосудах соматосенсорной коры и изучения редокс-состояния цитохромов ЭТЦ митохондрий астроцитов и нейронов использовали метод рамановской микроспектроскопии *in vivo*.

Положения, выносимые на защиту

1. Астроциты соматосенсорной коры и гиппокампа универсально отвечают повышением $[\text{Ca}^{2+}]_i$ на локомоцию, но также обладают Ca^{2+} активностью, специфичной для конкретной структуры мозга.
2. Аналогично интеграции нейронами синаптических входов в последовательность потенциалов действия, астроциты обладают функцией интеграции Ca^{2+} активности, формирующейся в дистальных отростках и усиливающейся в соме. Интегративная функция астроцитов может быть связана с регуляцией метаболических процессов в мозге.
3. В отличие от нейронов, Ca^{2+} активность в астроцитах развивается с задержкой и обладает рефрактерностью при последовательных эпизодах локомоции. Метаболические ответы астроцитов и нейронов на локомоцию также отличаются.
4. Повышенная оксигенация крови в венулах и расширение артериол соматосенсорной коры при локомоции может свидетельствовать о том, что в мозг поступает избыточное количество кислорода с кровью.

Степень достоверности данных. Представленные в исследовании результаты являются воспроизводимыми и статистически достоверными и основываются на данных, полученных с использованием корректных методов. Литературный обзор, постановка цели и задач исследования, обсуждение полученных результатов базируются на анализе актуальной литературы по теме работы.

Апробация материалов работы. Основные результаты работы были представлены на 16-й международной конференции European Meeting on Glial Cells in Health and Disease (GLIA 2023, Германия, Берлин, 9-13 июля 2023), международном физиологическом симпозиуме сообщества ISBS (Армения, Ереван, 18-19 мая 2023), всероссийской конференции «Оптогенетика+ 2023» (Россия, Санкт-Петербург, 6-8 апреля 2023), международном форуме Федерации европейских нейронаучных сообществ FENS Forum 2022 (Франция, Париж, 9-13 июля 2022), международной конференции Российского нейробиологического общества RusNeuroChem2022 (Россия, Санкт-Петербург, 22-24 мая 2022), международном симпозиуме VI International Symposium on «Physics, Engineering and Technologies for Biomedicine» (Россия, Москва, 20-24 ноября 2021), 15-й

международной конференции European Meeting on Glial Cells in Health and Disease (GLIA 2021, Франция, онлайн-формат, 5-9 июля 2021), национальном конгрессе CAICS 2020 (National congress on cognitive research, artificial intelligence and neuroinformatics, Россия, Москва, 12-16 октября 2020), международном симпозиуме Symposium of Biology Students in Europe (SymBioSE, Нидерланды, онлайн-формат, 28-31 июля 2020 и Великобритания, Глазго, 29 июля - 6 августа 2019).

Диссертация апробирована на открытом семинаре отдела молекулярной нейробиологии ИБХ РАН 05.09.2023 г. и на заседании кафедры высшей нервной деятельности МГУ имени М.В. Ломоносова 12.09.2023 г.

Публикации. По теме работы опубликовано 14 печатных работ: 4 статьи и 3 тезисов докладов на конференциях в журналах, индексируемых аналитическими базами Scopus, Web of Science или RSCI и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.015.7 по специальности 1.5.24 – «Нейробиология», а также 7 тезисов в сборниках докладов научных конференций.

Личный вклад автора. Личный вклад соискателя А.А. Федотовой является весомым на всех этапах исследования и заключается в планировании экспериментов, изучении и анализе современной литературы по теме работы, проведении экспериментов с использованием всех описанных выше методических подходов, обобщении и обсуждении результатов, написании статей и тезисов докладов, а также в представлении полученных данных на конференциях. Анализ данных Ca^{2+} активности выполнен совместно с А.Р. Браже. Фотометрические измерения проведены совместно с А.Б. Тяглик, М.А. Солотенковым, И.В. Федотовым. Данные, полученные с помощью метода рамановской микроспектроскопии, собраны и проанализированы совместно с А.Б. Тяглик, К.И. Морозовой, Н.А. Браже.

Структура и объем работы. Работа изложена на 124 страницах, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения полученных данных, заключения и выводов. Список литературы включает 190 источников. Работа проиллюстрирована 1 таблицей и 60 рисунками.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы рассмотрены особенности астроцитарной Ca^{2+} активности, особое внимание уделено механизмам возникновения и развития Ca^{2+} сигнализации и влияющим на нее факторам. Описаны используемые в современной нейробиологии методы для исследования Ca^{2+} активности в астроцитах и собраны немногочисленные сведения об изменениях астроцитарной Ca^{2+} активности при разных функциональных состояниях мозга и типах поведения. В рамках концепции об активной среде мозга охарактеризованы функциональные взаимодействия астроцитов с нейронами и кровеносными сосудами мозга. Последняя глава посвящена взаимосвязи Ca^{2+} и клеточного метаболизма.

1.1 Особенности Ca^{2+} активности в астроцитах

Астроциты представляют собой клетки эктодермального происхождения и выполняют многочисленные функции в обеспечении работы центральной нервной системы (ЦНС). Астроциты контролируют гомеостаз головного и спинного мозга на всех уровнях организации, участвуют в осуществлении когнитивных функций и пластичности мозга, а также вносят вклад в патофизиологию неврологических расстройств [31]. В свою очередь, функционирование астроцитов изменяется под действием факторов экспозома (внешней среды, внутренней среды и образа жизни) [2,3].

Астроциты крайне неоднородны по морфологии и выполняемым функциям и широко представлены в нервной системе как в сером, так и в белом веществе.

В отличие от нейронов, астроциты являются электрически невозбудимыми клетками и не способны генерировать потенциалы действия. Однако они могут генерировать медленные (электротонические) потенциалы [32]. Так, астроциты отвечают на внешние стимулы специфическим типом возбудимости, связанным с внутриклеточными ионами и вторичными мессенджерами. Этот тип возбудимости определяется как внутриклеточная возбудимость, которая в значительной степени опосредуется колебаниями свободных ионов в цитозоле. Внутриклеточные сигналы в астроцитах опосредованы Ca^{2+} , Na^+ , цАМФ, K^+ , H^+ и Cl^- [33]. Сложный репертуар внутриклеточной Ca^{2+} активности, более изученный в сравнении с остальными типами ионной активности в астроцитах, необходим для оптимального функционирования ЦНС [6].

1.1.1 Связь Ca^{2+} активности в астроцитах с морфологией

Ca^{2+} активность в астроцитах находится в тесной взаимосвязи с их морфологией. Выделяют несколько типов астроцитов, в сером веществе мозга доминируют протоплазматические астроциты [32]. В частности, астроциты коры головного мозга и

гиппокампа характеризуются сложной морфологией и занимают отдельные территориальные домены [34]. Эти клетки имеют небольшие круглые сомы диаметром около 10 мкм и 5-10 первичных отростков, которые делятся, формируя отростки высших порядков, придающие протоплазматическим астроцитам характерную морфологию с развитой системой отростков [35]. Астроцитарные отростки классифицируются на основании их морфологических свойств [1,36] и представлены веточками (branchlets), листочками (leaflets) и концевыми ножками (end-feet) (Рис. 1).

К веточкам относятся отростки, которые можно визуализировать с помощью дифракционно-ограниченной оптической микроскопии – это отростки, отходящие непосредственно от сомы (веточки 1-го порядка) и отростки, возникающие в результате ветвления веточек 1-го порядка. Поскольку и астроциты, и нейроны являются производными нейроэпителиальных клеток, они имеют определенную степень гомологии в своей морфологической организации. Структурная организация астроцитарных веточек, несущих листочки, напоминает дендриты нейронов с шипиками.

Астроцитарный листочек расположен на главной веточке и простирается в пространство между клеточными компартментами мозга, включая синапсы. В отличие от веточек, листочки оптически не разрешимы с помощью классических методов оптической микроскопии. Отношение площади объекта к объему (SVR) в окрестности произвольной точки, используемое для исследования морфологии биологических объектов, также отличается для веточек и листочков [37]. Другое отличие заключается в том, что веточки содержат органеллы, такие как митохондрии и эндоплазматический ретикулум (ЭПР), в то время как малый объем листочков не обеспечивает для них достаточно места [38]. Специфическая локализация белков указывает на функциональное различие между астроцитарными веточками и листочками. Так, в листочках не экспрессируется астроцитарный маркер GFAP, наблюдаемый в соме и крупных отростках, но преобладают белки цитоскелета – линкеры актина (эзрин и радиксин). Кроме того, транспортеры глутамата, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменник (NCX) и Na^+/K^+ АТФаза (NKA), по-видимому, колокализуются в дистальных астроцитарных отростках [1]. Моделирование методом Монте-Карло точечного источника Ca^{2+} показало, что приплюснутая структура астроцитарных листочков обеспечивает оптимальные условия для химической компартиментализации и изменяется в ответ на близлежащую синаптическую активность в Ca^{2+} -зависимой манере [39].

Астроцитарные концевые ножки представляют собой обладающие высокой пластичностью структуры, контактирующие с кровеносными сосудами мозга [40]. В концевых ножках располагаются митохондрии, ЭПР и аппарат Гольджи, что может указывать на локальный биосинтез, способствующий созреванию мембран и секреции белков, а также на Ca^{2+} сигнализацию, опосредованную Ca^{2+} -зависимым высвобождением Ca^{2+} из ЭПР [1].

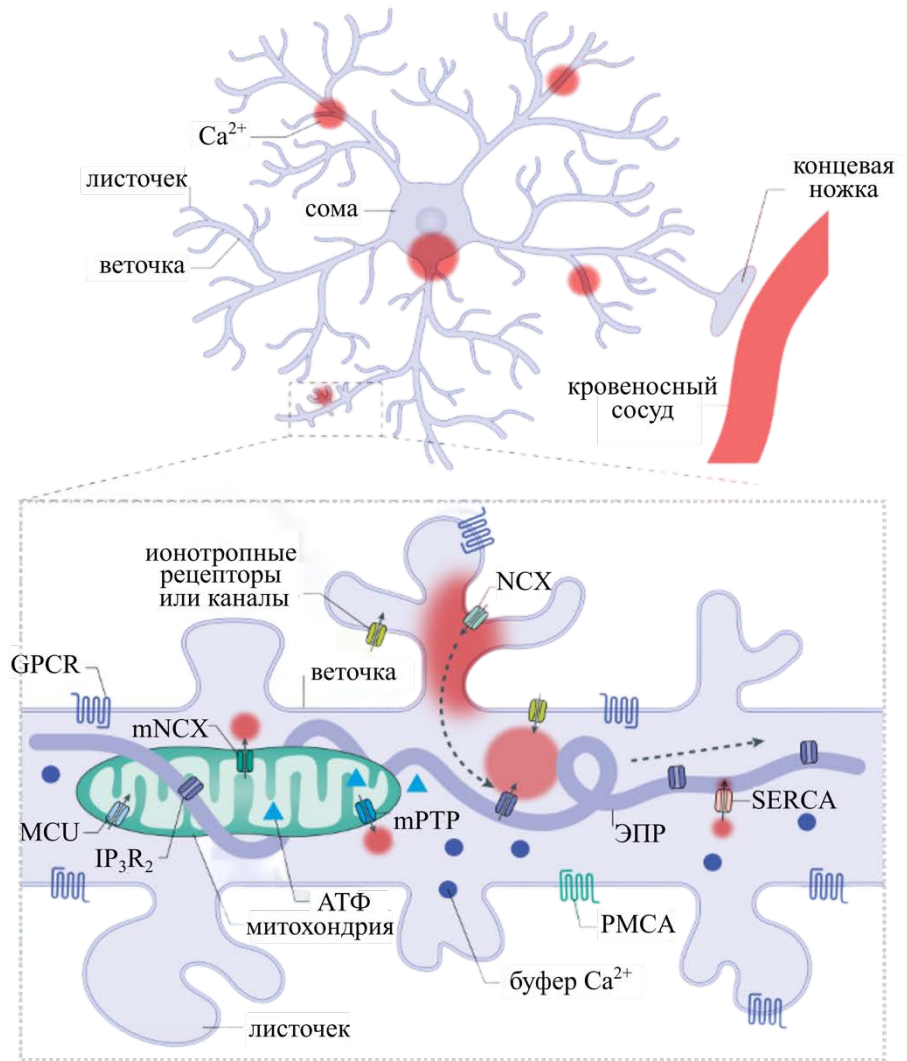


Рисунок 1. Обработка сигнала астроцитами. Вверху: строение астроцита. Показаны основные части: сома (soma), веточка (branchlet), листочек (leaflet) и астроцитарная концевая ножка (end-foot). Внизу: Ca^{2+} сигнализация в астроцитарном отростке. На мембране веточек и листочков расположены $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменники (NCX), ионотропные рецепторы, ионные каналы и рецепторы, сопряженные с G-белком (GPCR) и Ca^{2+} -АТФаза плазматической мембраны (PMCA), которая удаляет Ca^{2+} из клетки. В веточках располагаются митохондрии, в которых происходит синтез аденозинтрифосфата (АТФ), и эндоплазматический ретикулум (ЭПР), содержащий рецепторы инозитол-1,4,5-трифосфата (IP_3R). Митохондрии экспрессируют переходную пору проницаемости митохондриальной мембраны (mPTP), митохондриальный $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник (mNCX) и митохондриальный Ca^{2+} унипортер (MCU), а ЭПР – сарко/эндоплазматическую ретикулумную Ca^{2+} -АТФазу (SERCA), которые участвуют в транспорте Ca^{2+} . Рисунок адаптирован из [5].

Амплитуда стохастических колебаний уровня $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в астроцитарных веточках зависит от SVR, которое наиболее велико в дистальных веточках, где вход Ca^{2+} в цитозоль вызывает наибольшие подъемы $[\text{Ca}^{2+}]_i$; [41]. Следовательно, колебания $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в тонких дистальных

веточках с большей вероятностью, чем соматические колебания $[Ca^{2+}]_i$, достигают порога, при котором запускаются механизмы амплификации Ca^{2+} сигнала за счет Ca^{2+} -зависимого высвобождения Ca^{2+} из внутриклеточных депо [42].

Пространственная неоднородность Ca^{2+} активности в астроцитах наблюдается в работах *ex vivo* и *in vivo*. Ca^{2+} события, то есть непрерывные ограниченные во времени и пространстве области повышения уровня Ca^{2+} , преимущественно возникают в дистальных частях астроцитарных отростков [5]. Например, количественная визуализация времени жизни флуоресценции показала увеличение амплитуды Ca^{2+} -токов в дистальных астроцитарных отростках в ответ на аппликацию агонистов метаботропных глутаматных рецепторов [43]. Вопрос, почему вероятность возникновения Ca^{2+} событий выше в определенных астроцитарных компартментах, требует дальнейшего исследования с уточнением ультраструктурного состава и молекулярной структуры этих компартментов. На переживающих срезах гиппокампа крыс было обнаружено, что патологическое изменение астроцитарной морфологии (изменение количества веточек) может модулировать астроцитарную Ca^{2+} динамику [44].

В свою очередь, морфология астроцитов может изменяться в зависимости от Ca^{2+} активности. Повышение $[Ca^{2+}]_i$ вызывает рост периферических отростков за счет связывания актина с профилином 1 [45]. Кроме того, экспрессия рекомбинантного пептида, поглощающего IP_3 , вызывает уменьшение Ca^{2+} активности и ретракцию (уменьшение количества и сокращение ветвления) астроцитарных листочков [46].

1.1.2 Внутриклеточные механизмы Ca^{2+} активности в астроцитах

Внутриклеточные Ca^{2+} сигналы в астроцитах важны для оптимального функционирования ЦНС и представляют собой астроцитарный аналог изменений мембранного потенциала нейронов [6]. Ca^{2+} сигналы имеют сложную организацию и механизмы и обладают различными пространственно-временными параметрами [5]. Свойства Ca^{2+} динамики, лежащие в основе механизмы, физиологическое, патофизиологическое и предполагаемое информационное содержание изучены гораздо хуже, чем возбудимость нейронов. Таким образом, расшифровка астроцитарной Ca^{2+} сигнализации является неотложной и важной задачей современной нейробиологии.

В отличие от нейронов, область астроцитарной сомы не является центральным сигнальным узлом. Вместо этого локальные очаги Ca^{2+} активности могут возникать в астроцитарных отростках вследствие входа Ca^{2+} в клетку и в дальнейшем могут модулировать нейронную активность.

Выделяют несколько механизмов повышения уровня Ca^{2+} в астроците. Во-первых, Ca^{2+} может проникать в клетку через NCX, расположенный в плазматической мембране, или через

другие рецепторы и каналы. Например, транспортеры глутамата, расположенные на астроцитарных листочках, не только обеспечивают поглощение глутамата, но и переводят синаптическую активность в астроцитарный ответ через вход Na^+ и последующую реверсию NCX и генерацию астроцитарного Ca^{2+} сигнала. Повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ может распространяться в веточки, содержащие ЭПР. В них Ca^{2+} сигнал может усиливаться (амплификация) и распространяться путем Ca^{2+} -зависимого высвобождения Ca^{2+} из ЭПР через IP_3R .

Во-вторых, на мембране астроцитов располагаются GPCR, которые запускают астроцитарную Ca^{2+} сигнализацию путем активации фосфолипазы C, которая гидролизует фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат (PIP_2) на два вторичных медиатора – IP_3 и диацилглицерол. IP_3 вызывает выход Ca^{2+} из ЭПР.

Наконец, в астроцитарных веточках располагаются вытянутые митохондрии, которые могут принимать активное участие в локальной Ca^{2+} динамике [47]. Так, митохондрии высвобождают ионы Ca^{2+} через mPTP, mNCX и MCU. Митохондрии также служат источником АФК, которые регулируют астроцитарную Ca^{2+} активность [5].

В цитозоле Ca^{2+} буферизуется эндогенными буферами или (при их введении) индикаторами Ca^{2+} (например, GCaMP). Затем Ca^{2+} удаляется из клетки с помощью PMCA или закачивается в ЭПР с помощью SERCA.

Длительность Ca^{2+} событий в астроцитах может варьироваться от сотен миллисекунд до нескольких секунд. Медленная астроцитарная активность считается недостаточно быстрой для обработки информации в реальном времени. Тем не менее астроциты могут кодировать информацию не за счет скорости, а благодаря пространственным паттернам Ca^{2+} активности. Согласно современным данным, характеристики Ca^{2+} динамики в астроцитарной сети (общая площадь, количество и продолжительность Ca^{2+} событий) могут изменяться практически мгновенно в каждом кадре визуализации [48]. Поскольку астроциты образуют масштабные сети, в которых отдельные клетки связаны друг с другом посредством щелевых контактов (gap junctions), исследование паттернов Ca^{2+} активности представляется особенно актуальным.

1.1.3 Спонтанная астроцитарная Ca^{2+} активность

Астроцитарные Ca^{2+} события можно классифицировать на спонтанные и вызванные. Спонтанные Ca^{2+} события генерируются внутри астроцита без каких-либо внешних стимулов, тогда как вызванная Ca^{2+} активность возникает в ответ на значимые внутренние и внешние стимулы, рассмотренные в п. 1.1.4.

Точные механизмы генерации спонтанной Ca^{2+} активности в астроцитах до сих пор неизвестны. Астроциты способны генерировать спонтанную Ca^{2+} активность несмотря на подавление нейронной активности при помощи блокатора потенциал-зависимых Na^+ -каналов

тетродотоксина [49], при блокировке везикулярного высвобождения нейронов бафиломицином A1 [50], а также *in vivo* и в срезах мозга нокаутных мышей *Itr2*^{-/-}, лишенных IP₃R2 [51]. Скорее всего, эти спонтанные Ca²⁺ события запускаются стохастическими потоками Ca²⁺ по путям, описанным выше (Рис.1). Наложение небольших ограниченных в пространстве потоков Ca²⁺ приводит к локальным колебаниям [Ca²⁺]_i, которые могут достигать порога для Ca²⁺-зависимого высвобождения Ca²⁺ из внутриклеточных депо. В этом случае будет наблюдаться амплификация Ca²⁺ сигнала и его распространение [52].

Спонтанная Ca²⁺ активность в астроцитах может модулироваться под влиянием внешних стимулов, которые также могут вызывать новые Ca²⁺ ответы, и разделение этих двух процессов экспериментально представляется сложным. Нейроактивные вещества (например, глутамат, норадреналин (НА), АТФ) могут активировать α-субъединицы астроцитарных Gq-белков через соответствующие GPCR, что приводит к выработке диацилглицерола и IP₃. Уровни IP₃ и Ca²⁺ совместно определяют вероятность открытия IP₃R [53]. В частности, высокая концентрация IP₃ в цитозоле увеличивает вероятность усиления спонтанной Ca²⁺ активности через Ca²⁺-зависимое высвобождение Ca²⁺ из внутриклеточных депо. Долгое время считалось, что астроцитарная Ca²⁺ сигнализация обеспечивается почти исключительно IP₃R. Хотя IP₃R2 играют основную роль в астроцитарной Ca²⁺ активности, имеется вклад и других IP₃R [54]. Спонтанная Ca²⁺ активность может также модулироваться АФК, действие которых влияет на частоту возникновения, распространение и продолжительность астроцитарной Ca²⁺ активности. Продукция АФК увеличивается при возрастании метаболических потребностей ткани, например, при повышенной нейронной активности, или при патологиях. Повышенное производство АФК, в свою очередь, увеличивает вероятность открытия mPTP и IP₃R [5].

Таким образом, спонтанную Ca²⁺ активность в астроцитах следует рассматривать как маркер их физиологического состояния, а изменения параметров Ca²⁺ активности могут отражать сдвиги в метаболическом или окислительно-восстановительном статусе астроцитов.

1.1.4 Вызванная астроцитарная Ca²⁺ активность

Ca²⁺ активность в астроцитах может быть вызвана путем активации различных рецепторов, ионных каналов и обменников, расположенных на мембране клетки. Повышение Ca²⁺ активности в астроцитах наблюдается при активации различными возбуждающими нейромодуляторами (например, глутаматом, АТФ или ацетилхолином). Соответственно, Ca²⁺ может поступать в цитозоль астроцитов в ответ на нейронную активность через ионотропные глутаматные рецепторы, пуриnergические P2X рецепторы и никотиновые холиnergические рецепторы [31].

Повышение Ca^{2+} активности в астроцитах может быть вызвано и тормозным нейромедиатором гамма-аминомасляной кислотой (ГАМК) [55,56]. Поглощение ГАМК приводит к притоку Na^+ , который активирует NCX, что вызывает астроцитарные Ca^{2+} токи [57]. Это означает, что астроциты способны активироваться независимо от природы передатчика. Это позволяет предположить, что они интегрируются в некоторые схемы мозга в качестве агента, который одинаково считывает возбуждающие и тормозные воздействия.

Связывание молекул различных нейромодуляторов, например, НА, с расположенными на мембране астроцитов GPCR, также может приводить к повышению Ca^{2+} активности в результате выработки IP_3 , который вызывает выход Ca^{2+} из ЭПР через IP_3R .

Астроциты также экспрессируют несколько типов каналов переходного рецепторного потенциала (TRP) [58]. Спонтанное открытие TRPA1-каналов вносит вклад в базальный уровень Ca^{2+} и колебания $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [59], а их блокада способствует незначительному снижению уровня $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в состоянии покоя [47]. Кроме того, TRP-каналы модулируют Ca^{2+} -зависимый везикулярный выброс глутамата астроцитами коры головного мозга [60].

Наконец, астроциты воспринимают многие другие типы сигналов, включая объемную передачу нейромодуляторов (volume transmission), изменение парциального давления CO_2 и O_2 , pH, температуры и церебрального перфузионного давления, и отвечают на эти воздействия изменением Ca^{2+} активности [61].

1.2 Экспериментальные модели для исследования астроцитарной Ca^{2+} активности

Для изучения астроцитарной Ca^{2+} активности используются различные экспериментальные модели. Ca^{2+} активность в астроцитах была успешно изучена на многих видах животных (*Drosophila melanogaster*, *Danio rerio*, грызуны, приматы, человек), при этом большая часть экспериментов проводится на грызунах – наиболее часто используемом модельном организме в нейробиологии [5].

Пионерская работа по изучению физиологии астроцитов выполнена на клеточной культуре, когда впервые было замечено, что астроциты генерируют Ca^{2+} события в ответ на глутамат [62]. В частности, были зарегистрированы осцилляции $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [62]. Клеточные культуры являются мощным инструментом для изучения фундаментальных путей клеточной сигнализации. Тем не менее серьезным недостатком этой модели является то, что культивируемые астроциты не развивают сложную морфологию, наблюдающуюся у астроцитов *in vivo*. Различие в морфологии может отражаться в ином распределении органелл, участвующих во внутриклеточной Ca^{2+} сигнализации, и наборе экспрессируемых рецепторов и каналов [63]. В связи с этим Ca^{2+} активность в культивируемых астроцитах качественно отличается от наблюдаемой в интактном мозге.

Переживающие срезы мозга – еще один широко используемый препарат, преимущество которого заключается в том, что клетки и их связи изначально развивались в естественной среде. Таким образом, астроциты в срезах мозга сохраняют морфологические характеристики, наблюдаемые *in vivo*: им присуща сложная система отростков (веточки, листочки, концевые ножки). Срезы мозга применяются для изучения нейрон-астроцитарных взаимодействий с помощью электрофизиологических, оптических и комбинированных методов с высоким пространственным и временным разрешением. Срезы идеально подходят для локальных и целенаправленных манипуляций [5]. Ограничениями использования срезов являются повреждение проекций нервных окончаний во время приготовления препарата, возможность нарушения снабжения ткани кислородом и развитие воспаления, сопровождающегося реактивным астроглиозом, который может изменить физиологию астроцитов [64].

Исследование распространения Ca^{2+} активности по астроцитарной сети возможно только в интактном мозге. Современные методы оптического имиджинга позволили наблюдать за динамикой астроцитарных Ca^{2+} событий в реальном времени *in vivo*. Методологический прогресс *in vivo* позволил перейти от использования в экспериментах анестезированных животных к исследованию мозга бодрствующих животных. Исследования без применения наркоза являются особенно актуальными, поскольку наркоз может оказывать значительное влияние на физиологическое состояние астроцитов, в частности, подавляя Ca^{2+} активность [65]. В настоящее время для осуществления хронического Ca^{2+} имиджинга на бодрствующих животных применяются следующие подходы. Первый – оптический имиджинг с помощью мультифотонного флуоресцентного микроскопа с использованием различных модификаций экспериментальной установки, позволяющих создать животному условия для перемещения: шар, беговая дорожка, левитирующая платформа [22–24]. Такой подход позволяет контролировать сенсорную среду животных и применяется для исследования влияния зрительного, обонятельного, слухового или соматосенсорного входов. Широкое распространение получило также использование виртуальной реальности [66]. Тем не менее в таких экспериментах животные ограничены в своей способности проявлять более сложное поведение, например, социальное. В связи с этим в последние годы были разработаны подходы, позволяющие работать на свободноподвижных мышах. К таким подходам относятся использование миниатюрного флуоресцентного микроскопа, надеваемого животному на голову [25], и фотометрия с помощью оптоволокон [26]. Благодаря усовершенствованию методов фотометрии стало возможным регистрировать клеточную активность в глубоких структурах мозга с минимальным повреждением ткани. Ранее фотометрия использовалась, в основном, для мониторинга Ca^{2+} сигналов в нейронах. Этот метод был применен для регистрации Ca^{2+} активности в астроцитах фиксированных за голову мышей и позволил оценить сигнал в различных областях мозга [21,67].

Таким образом, исследование Ca^{2+} активности в астроцитах *in vivo* позволяет определить паттерны активности, которые являются физиологически значимыми и зависят от сенсорного входа, активности нейронных сетей, функционального состояния животного, поведения.

Отдельные подходы используются для исследования астроцитов приматов, включая человека, потому что их астроциты имеют другой профиль экспрессии генов и представлены бóльшим количеством анатомических классов [68]. Следовательно, результаты исследований астроцитов грызунов, в частности, в моделях болезней, не могут быть распространены на астроциты человека. Кроме того, доступ к тканям человеческого мозга ограничен хирургическими биопсийными образцами, полученными от пациентов во время операций. В связи с этим перспективным подходом к изучению базовой физиологии астроцитов человека является прямое генетическое репрограммирование эмбриональных стволовых клеток или индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в астроциты [69].

Таким образом, существует набор методов для изучения Ca^{2+} активности в астроцитах. Поскольку каждый тип препаратов имеет определенные ограничения, для расшифровки механизмов астроцитарной Ca^{2+} активности следует интегрировать результаты, полученные на различных препаратах разными методами.

1.3 Ca^{2+} активность в астроцитах при локомоции и других типах поведения

Астроцитарная Ca^{2+} активность, отражающая функции астроцитов в целом организме, впервые была зарегистрирована *in vivo* в 2004 году. Было обнаружено, что возрастание Ca^{2+} активности в астроцитах связано с усилением нейронной активности [70]. Большинство ранних экспериментов по визуализации Ca^{2+} сигналов в астроцитах *in vivo* проводились на наркотизированных животных. Вскоре выяснилось, что общие анестетики подавляют астроцитарную Ca^{2+} активность, что привело к переходу к работе на бодрствующих животных [65].

Основным методом для исследования Ca^{2+} сигнализации является двухфотонный имиджинг на животных с имплантированными хроническими краниальными окнами. Последние представляют собой краниотомию, герметично закрытую стеклом. Альтернативой краниальному окну являются препараты с истончением черепа. Было разработано несколько конфигураций установок, позволяющих проводить Ca^{2+} имиджинг на бодрствующих животных. В частности, для зафиксированных за голову (посредством специальной платформы на черепе) мышей, применяются следующие установки: шар из пенополистирола, вращающийся на потоках воздуха, «левитирующая платформа» (клетка, «плавающая» на подложке из воздуха), беговая дорожка, вращающийся диск («граммофон»), которые могут использоваться в сочетании с виртуальной реальностью. Ниже будут рассмотрены современные данные об астроцитарной Ca^{2+} активности

при обработке сенсорной информации и движении, во сне, при различных эмоциональных состояниях, обучении и памяти.

Движение и сенсорная стимуляция. Астроциты в различных областях мозга реагируют *in vivo* на сенсорные стимулы и двигательную активность повышением уровня $[Ca^{2+}]_i$. В астроцитах соматосенсорной коры мышей наблюдаются стимул-зависимые Ca^{2+} ответы на электрическую сенсорную стимуляцию задней лапы, связанные по времени с изменениями в активности нейронной сети, оцениваемой по спектральному содержанию электрокортикограммы [71]. В обонятельной луковице мышей было обнаружено, что астроциты реагируют повышением $[Ca^{2+}]_i$ на запаховые стимулы [72]. Стоит заметить, что последние два исследования проводились на животных под наркозом, что накладывает некоторые ограничения на интерпретацию результатов [65]. Ca^{2+} ответы астроцитов регистрируются в зрительной коре бодрствующих мышей при предъявлении зрительных стимулов [73] и в бочонковой коре (barrel cortex) при стимуляции вибрисс [74]. В бочонковой коре периартериальные и перикапиллярные астроциты отвечают на естественную гиперемия во время сенсорной стимуляции (whisking) путем AMPA- и NMDA-рецептор-зависимого повышения Ca^{2+} активности в астроцитарных концевых ножках [20]. Сенсорная стимуляция во время передвижения мыши приводит к возникновению множественных одновременных Ca^{2+} токов в астроцитах соматосенсорной коры [18]. У млекопитающих локомоция инициируется активацией ствола мозга, который интегрирует входные сигналы более высокого порядка от базальных ганглиев и коры головного мозга [75,76]. Увеличение Ca^{2+} активности в астроцитах при локомоции зарегистрировано и в других областях мозга. Например, стойкая активация Бергмановской глии (тип униполярных астроцитов) наблюдается в мозжечке во время локомоторного поведения мыши [19]. Использование генетически кодируемого индикатора Ca^{2+} GCaMP3 показало, что короткие локомоторные эпизоды сопровождаются повсеместным увеличением Ca^{2+} активности в клетках Бергмановской глии, которое сохраняется в течение нескольких секунд после прекращения движения. Тем не менее, величина Ca^{2+} ответов не коррелирует со скоростью локомоции, а локомоция не всегда вызывает активацию глии [21].

Недавно астроцитарная Ca^{2+} активность *in vivo* была зарегистрирована у свободноподвижных мышей. С помощью GCaMP6f и самостоятельно изготовленной фотометрической установки были зарегистрированы астроцитарные Ca^{2+} токи в слуховой коре и области CA1 гиппокампа, вызванные локомоцией и электрической стимуляцией лапы [28].

Сон. Астроцитарные Ca^{2+} сигналы динамически изменяются во сне, при его депривации и в состоянии бодрствования. При помощи двухфотонной микроскопии на фиксированных за голову мышах показано снижение астроцитарной Ca^{2+} активности в бочонковой коре мыши во время сна [18]. Аналогичное снижение Ca^{2+} активности было продемонстрировано и на

свободноподвижных мышцах с помощью миниатюрного флуоресцентного микроскопа, установленного над лобной корой головного мозга [77].

Генетическое манипулирование астроцитами позволило количественно оценить Ca^{2+} активность в них во время естественного сна. С использованием нокаутных *Itpr2*^{-/-} мышей (с генетической делецией $\text{IP}_3\text{R2}$) с сильно ослабленной, но не полностью нарушенной Ca^{2+} активностью, было обнаружено, что IP_3 -опосредованная Ca^{2+} сигнализация служит регуляторным путем для поддержания медленноволнового (NREM) сна [18]. Более детальный анализ Ca^{2+} динамики во время NREM сна мышей показал, что кортикальные астроциты контролируют его глубину и продолжительность. В частности, увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ путем хемогенетической активации Gi -GPCR сигнализации вызывало более глубокий сон, в то время как активация пути Gq -GPCR нарушала переход от сна к бодрствованию, продлевая сон [78]. Примечательно, что снижение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в астроцитах путем нокаута белка STIM1, являющегося сенсором Ca^{2+} в просвете ЭПР, вызывает уменьшение потребности во сне даже при его недостатке [77]. У *Drosophila melanogaster* термогенетически индуцированное повышение Ca^{2+} активности в астроцитах вызывает устойчивый сон [79].

Роль астроцитарной Ca^{2+} динамики в модуляции сна с быстрыми движениями глаз (REM) менее изучена. Ослабление IP_3 -опосредованной Ca^{2+} сигнализации в астроцитах мышей линии VIPP приводит к тому, что мыши проводят больше времени в REM сне и чаще впадают в это состояние во время неактивной фазы [80]. Фотометрия у трансгенных мышей, экспрессирующих в астроцитах генетически кодируемый ратиометрический сенсор Ca^{2+} *YCnano50*, позволила выявить различия в динамике астроцитарной Ca^{2+} активности во время сна в коре, гиппокампе, гипоталамусе, мозжечке и мосте. Было продемонстрировано значительное снижение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в астроцитах во время REM сна и повышение после пробуждения [81].

Таким образом, связь между конкретными параметрами астроцитарной Ca^{2+} активности и различными характеристиками сна остается неясной и требует дальнейших исследований.

Эмоциональные состояния. Увеличивается количество исследований, указывающих на участие астроцитов в опосредовании эмоциональных состояний путем изменения Ca^{2+} активности. Астроциты с большой вероятностью могут выступать в роли клеточной мишени при лечении депрессивно-подобных состояний. Так, транскраниальная стимуляция постоянным током (tDCS), используемая для лечения депрессии, вызывает увеличение Ca^{2+} активности в кортикальных астроцитах без явных изменений локальных полевых потенциалов. Астроцитарный Ca^{2+} сигнал необходим для ослабления симптомов депрессии, развивающейся в результате хронического ограничения движения, при помощи tDCS [82]. В модели хронического социального стресса у нокаутных *Itpr2*^{-/-} мышей наблюдается более высокая частота депрессивноподобного поведения по сравнению с контрольными мышами, что опосредовано

Ca²⁺-зависимым высвобождением АТФ [83]. Тем не менее в модели с условной делецией IP₃R2 депрессивный фенотип отсутствует [84].

Астроциты вовлечены в формирование реакции страха, причем Ca²⁺ активность определяется специфическими GPCR-опосредованными сигнальными путями и зависит от области мозга. В частности, в тесте на выработку контекстуального страха усиление Gq-GPCR сигнализации (повышение [Ca²⁺]_i) в астроцитах гиппокампа способствует реакции замирания [85]. Активация пути Gi-GPCR в астроцитах дорсального гиппокампа ухудшает обучение реакции страха, усиленной стрессом [86]. Оптогенетическая активация астроцитов крыс при помощи ChR2 (ChR2 вызывает повышение [Ca²⁺]_i в астроцитах) в области CA1 гиппокампа сопровождается снижением связанного с тревогой страха и опосредуется A1-рецепторами аденозина [87]. Хемогенетическая активация пути Gq-GPCR в астроцитах миндалины на поведенческом уровне приводит к противоречивым результатам: усиливает угасание реакции страха, если производилась активация астроцитов базолатеральной миндалины [88], и уменьшает выраженность страха в парадигме отсроченного обусловливания страха, если воздействовали на астроциты центральной миндалины [89]. Ослабление пути Gq-GPCR в астроцитах с помощью iβARK (ингибирующий пептид из β-адренергической рецепторной киназы 1) не влияет как на долговременную память в тестах на выработку контекстуального и стимул-зависимого страха, так и на реакцию замирания [90].

Имеются данные, указывающие на то, что астроциты стриатума участвуют в модуляции обсессивно-компульсивного поведения мышей. У мышей, экспрессирующих Ca²⁺-АТФазу плазматической мембраны, функция которой заключается в удалении цитозольного Ca²⁺, снижение Ca²⁺ активности в астроцитах приводит к чрезмерному грумингу, связанному со стрессом [91].

Таким образом, появляются сведения об участии астроцитарной Ca²⁺ сигнализации в модуляции различных эмоциональных состояний. Требуются дальнейшие исследования для уточнения степени такой модуляции и выяснения вовлеченных механизмов.

Обучение и память. На срезах мозга трансгенных мышей с делецией гена IP₃R2 было продемонстрировано, что астроцитарный IP₃R-опосредованный выброс Ca²⁺ контролирует долговременную потенциацию в гиппокампе, широко признанную одним из ключевых клеточных механизмов, лежащих в основе обучения и памяти [54]. Вопрос о том, может ли IP₃R влиять на функцию долговременной памяти, активно обсуждается. Было замечено, что отсутствие IP₃R2-опосредованной сигнализации у нокаутных мышей не вызывает нарушений обучения и памяти на недавние события (24-48 ч), однако приводит к дефициту памяти на отдаленные события (2-4 недели). У таких мышей снижаются показатели выполнения теста на распознавание новых объектов, ухудшается пространственная память в лабиринте Барнс и

обучение в тестах на выработку контекстуального и стимул-зависимого страха [92]. Селективное ослабление IP_3R2 -опосредованной Ca^{2+} сигнализации астроцитов выявило роль астроцитарной Ca^{2+} динамики в моторном обучении мышей в задаче дотягивая (reaching task) [93].

Гиппокамп анатомически хорошо приспособлен для обеспечения процессов памяти: являясь мультимодальной структурой мозга, он имеет реципрокные связи со многими другими областями коры головного мозга [94]. Области CA1 и *subiculum* проецируются на различные участки коры, включая энторинальную, ретроспленальную и периорбитальную кору, которые вовлечены в различные формы пространственного обучения и памяти [95–97]. Область CA1 гиппокампа содержит «клетки места» – пирамидные нейроны, активирующиеся при исследовании мышью определенного участка пространства [98]. Недавно было обнаружено, что астроциты CA1 проявляют постоянную Ca^{2+} активность при движении мышей в направлении места получения вознаграждения в знакомой среде, но не в новой. Это может указывать на участие астроцитов в кодировании местоположения в пространственных контекстах, зависящих от памяти [99]. С использованием одновременного двухфотонного Ca^{2+} имиджинга астроцитов и нейронов в гиппокампе мышей, ориентирующихся в виртуальной реальности, также было показано, что астроцитарные Ca^{2+} сигналы могут участвовать в кодировании пространственной информации [100].

Таким образом, в последние годы появляются сведения о вовлечении астроцитов в различные типы поведения. Тем не менее глубинные механизмы и физиологическое значение астроцитарной Ca^{2+} динамики требуют дальнейшего исследования.

1.4 Нейрон-астроцитарные взаимодействия в мозге

Важность взаимодействия между нейронами и астроцитами является широко признанной. Нейроны влияют на астроцитарную Ca^{2+} активность посредством локальных взаимодействий на уровне отдельных синапсов и через диффузное высвобождение нейромодуляторов. Оба пути изменяют пространственно-временные свойства спонтанной Ca^{2+} сигнализации в астроцитах и вызывают новые Ca^{2+} сигналы.

1.4.1 Уровни нейрон-астроцитарных взаимодействий

Выделяют несколько уровней взаимодействий между астроцитами и нейронами [5]. Низший уровень представлен одиночными синапсами (многочастный синапс). Действие различных химических агентов вызывает Ca^{2+} сигналы в астроцитарных листочках, расположенных в области синапсов. К таким воздействиям относятся синаптическое высвобождение нейротрансмиттеров, внесинаптическое выделение нейромодуляторов (например, дофамина и НА) и выделение ретроградных передатчиков (эндоканнабиноидов). Усиление под

их действием Ca^{2+} активности в астроцитах запускает высвобождение сигнальных молекул (глиопередатчиков), которые, связываясь с пре- и постсинаптическими рецепторами, влияют на возбудимость нейронов, регулируя синаптическую передачу и пластичность.

Взаимодействие между астроцитами и нейронами может происходить на уровне целой клетки. Астроцитарная Ca^{2+} активность может не ограничиваться листочком, распространяясь на целую веточку с листочками (астроцитарный микродомен). В таком случае в область повышения Ca^{2+} активности могут попадать территории нескольких синапсов. Таким образом, Ca^{2+} активность в астроцитах может модулировать работу целого кластера синапсов, влияя на их активность и/или пластичность путем высвобождения сигнальных молекул или изменения синаптического микроокружения. Такое воздействие приводит к совместной модуляции нескольких синапсов как на одном, так и на разных дендритах и/или нейронах.

Наконец, может наблюдаться взаимодействие между сетями нейронов и астроцитов. Отдельные астроциты соединены между собой через щелевые контакты, образованные белками-коннексинами, что позволяет им формировать крупномасштабные сети. Такие щелевые контакты проницаемы для малых молекул и ионов (IP_3 , АФК, Ca^{2+}). На смешанной культуре астроцитов и нейронов было показано, что блокировка щелевых контактов октанолом ослабляет нейронную активность, а межклеточные Ca^{2+} волны оказываются чувствительными к блокировке. Это указывает на межклеточную нейрон-глиальную сигнализацию [101]. Кроме того, существует механизм закрытия щелевых контактов под воздействием высоких уровней $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [5]. Надо заметить, что в срезах не были обнаружены Ca^{2+} волны, распространяющиеся по астроцитарному синцитию. Более того, последовательно возникающие Ca^{2+} события, наблюдающиеся в отдельных астроцитах в результате действия нейромодуляторов или нейронной активности, можно ошибочно принять за Ca^{2+} волны [5,21,82].

Астроциты взаимодействуют между собой посредством везикулярного и не везикулярного высвобождения глиопередатчиков. Глиопередатчики (например, АТФ, глутамат, D-серин) могут воздействовать на нейроны в масштабах от нескольких секунд до нескольких минут, модулируя синаптическую передачу и пластичность посредством широкого спектра механизмов [102].

Вклад пространственной коммуникации астроцитов в функционирование мозга все еще недостаточно изучен. Механизмы взаимодействия астроцитов с нейронами и астроцитов с астроцитами разнообразны и зависят от области мозга. В связи с этим актуальными являются исследования по моделированию астроцитарной сетевой активности. Размер групп корковых астроцитов, объединенных в локальную сеть, оценивается примерно в 60-80 клеток, но несколько сетей могут также соединяться между собой через другие астроциты [103]. Модельные исследования позволяют предположить, что после запуска волна возбуждения может

распространяться в коре головного мозга на большие расстояния и воздействовать на постсинаптические нейроны в удаленных синаптических терминалах. Тем не менее большинство Ca^{2+} событий ограничивается одним пространственным доменом астроцитов [104].

Таким образом, оптимальные нейрон-астроцитарные взаимодействия достигаются за счет равновесия между активностью нейронов и астроцитов и структурными изменениями последних: повышение активности нейронной сети может модулировать астроцитарную Ca^{2+} сигнализацию, а снижение – приводить к укорочению астроцитарных листочков.

1.4.2 Эффект нейромодуляторов на астроцитарную Ca^{2+} активность

Астроцитарная Ca^{2+} активность может модулироваться под действием нейронной активности вследствие объемной передачи (диффузное высвобождение нейромодуляторов). Нейромодулятор – это молекула, которая не классифицируется как быстрый синаптический нейромедиатор, но влияет на возбудимость и/или активность нейронной сети. К классическим нейромодуляторам относят НА, ацетилхолин, серотонин, дофамин. Они высвобождаются по всему головному и спинному мозгу из подкорковых проекций, берущих начало в стволе мозга и базальных отделах переднего мозга.

Нейромодуляторы оказывают свое действие не только на нейроны, но и на астроциты, модулируя Ca^{2+} активность в последних. Например, синхронизированный выброс НА из проекций *locus coeruleus* по всей коре головного мозга мышей опосредует Ca^{2+} сигнализацию путем активации астроцитарных α_1 -адренергических рецепторов, позволяя астроцитарной сети реагировать на локальные изменения активности нейронов [105]. Исследование, проведенное на *Drosophila melanogaster*, предоставило первое экспериментальное доказательство того, что нейромодуляторы могут передавать сигналы нейронам через астроциты. Так, НА-подобные нейромодуляторы, тирамин и октопамин, непосредственно активируют астроциты, что модулирует активность нижележащих дофаминергических нейронов и приводит к изменению сложных форм поведения (обонятельного хемотаксиса и стартл-реакции) [106]. У *Danio rerio* НА-опосредованные Ca^{2+} сигналы в астроцитах приводят к активации нижележащих нейронов, что также способствует изменению поведения – неуспешные (не приводящие к достижению цели) действия (*futile behaviour*) подавляются [107].

Ацетилхолин модулирует Ca^{2+} активность в астроцитах, обеспечивающих холинэргическую пластичность в соматосенсорной коре головного мозга, связанную с состоянием внимания и бдительности. Совместная стимуляция вибрисс и базального ядра Мейнерта, основного источника холинэргической иннервации коры, приводит к повышению Ca^{2+} активности в астроцитах, опосредованной мускариновыми ацетилхолиновыми рецепторами [108]. Астроциты гиппокампа отвечают на активность холинэргических проекций медиального

септума, характерную для состояния бодрствования, через α_7 -никотиновый ацетилхолиновый рецептор [109]. Показано, что холинергическая активность *in vivo*, вызванная сенсорной стимуляцией или электрической стимуляцией ядер септума, также увеличивает Ca^{2+} активность в астроцитах гиппокампа и вызывает долговременную потенциацию в синапсах полей гиппокампа (CA1, CA3). Эффекты опосредуются мускариновыми холинергическими и метаботропными глутаматными рецепторами [110].

Эффекты серотонина и дофамина на активность астроцитов *in vivo* изучены слабее. Известно, что серотониновый рецептор 5-HT₄ экспрессируется в астроцитах гиппокампа как *in vitro*, так и *in vivo*. Активация данного рецептора запускает молекулярные каскады, усиливающие сборку филаментного актина, что приводит к морфологическим перестройкам астроцитов гиппокампа и может влиять на Ca^{2+} сигнализацию в них [111]. Астроциты ядра одиночного пути (*nucleus tractus solitarii*) отвечают на входящие афферентные входы повышением $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Одним из механизмов, опосредующих астроцитарные Ca^{2+} ответы, является действие серотонина на 5-HT_{2A}-рецепторы [112].

Дофамин участвует в таких физиологических процессах, как обучение, память, двигательный контроль и вознаграждение. Около трети всей популяции дофаминовых D₂-рецепторов коры головного мозга обезьян сосредоточены на отростках астроцитов [113], что может указывать на наличие модуляции Ca^{2+} динамики в астроцитах дофамином *in vivo*. Таким образом, благодаря диффузии дофамин может оказывать воздействие астроцитарные сети, в частности, в переднем мозге.

Таким образом, астроциты способны интегрировать сигналы, опосредуемые нейромодуляторами.

1.4.3 Особенности Ca^{2+} активности в астроцитах и нейронах

Механизмы генерации и поддержания Ca^{2+} активности в астроцитах и нейронах отличаются. Нейроны имеют множество механизмов генерации внутриклеточных Ca^{2+} сигналов, специфика действия которых определяется их пространственной близостью к молекулярным мишеням Ca^{2+} . Нейронная Ca^{2+} сигнализация в основном опирается на потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы плазматической мембраны, которые активируются при потенциалах действия [114]. За пассивным входом Ca^{2+} в клетку через Ca^{2+} -проницаемые мембранные каналы следует диффузия Ca^{2+} в цитоплазму. Диффузия Ca^{2+} ограничивается гомеостатическими механизмами, такими как цитоплазматические буферы (цитозольные Ca^{2+} -связывающие белки), мембранные насосы и переносчики, влияющими на длительность и величину Ca^{2+} сигнала. Кроме того, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ контролируется поглощением и высвобождением митохондриями [115]. Ca^{2+} связывается с эффекторными белками, что в конечном итоге приводит к активации различных

физиологических процессов. Например, в синапсе локальные повышения $[Ca^{2+}]_i$ запускают многочисленные реакции как в пресинаптических, так и в постсинаптических элементах [116].

Ca^{2+} активность в астроцитах основана на мобилизации внутриклеточных запасов Ca^{2+} . Развитая система отростков с органеллами, участвующими в генерации Ca^{2+} активности, позволяет астроцитам дифференцированно отвечать на синаптическую активность и интегрировать многочисленные синаптические входы [5]. Астроцитарные отростки, содержащие запасы Ca^{2+} , переплетаются с нейронными структурами, активность которых может приводить к запуску Ca^{2+} ответа астроцитов и его усилению за счет высвобождения Ca^{2+} из ЭПР [36]. Усиление внутриклеточной Ca^{2+} активности может способствовать распространению Ca^{2+} волн по соме и отросткам астроцита [1]. Генерация Ca^{2+} событий в тонких отростках может быть дополнительно усилена ЭПР-независимыми механизмами высвобождения, включающими выход Ca^{2+} из митохондрий через mPTP [47].

Ca^{2+} активность в астроцитах имеет иные временные и пространственные характеристики, чем активность нейронов. Временные масштабы астроцитарной Ca^{2+} динамики, как правило, значительно медленнее. Так, длительность астроцитарных Ca^{2+} сигналов может составлять от нескольких сотен миллисекунд до нескольких секунд, в то время как одиночные потенциалы действия в нейронах длятся в пределах нескольких миллисекунд [117].

Таким образом, различия Ca^{2+} динамики в нейронах и астроцитах ставят вопрос о вкладе этих клеток в обеспечение функций мозга и, в частности, обработку информации в реальном времени [5].

1.5 Астроцит как компонент активной среды мозга

Недавно была предложена концепция активной среды мозга (brain active milieu), учитывающая динамическое взаимодействие между различными компонентами мозга, не ограничиваясь нейрон-глиальными взаимодействиями [1]. Концепция активной среды мозга объединяет предыдущие теории, объясняющие функции мозга с позиции локальных взаимодействий между разными типами клеток. Ключевыми являются представления о трехчастном синапсе [118], нейроваскулярной единице, синаптической и внесинаптической сигнализации, глиотрансмиссии, а также объемной передаче [119]. Согласно концепции активной среды мозга, функции мозга основаны на сложной сети взаимодействий между нейронами, различными типами глии (астроцитами, микроглией, олигодендроцитами), клетками кровеносных сосудов (эндотелиальными клетками, гладкомышечными клетками, перицитами) и неклеточными элементами (внеклеточным пространством и внеклеточным матриксом). Все клеточные и неклеточные компоненты мозга совместно создают активную среду мозга (Рис. 2А).

Активных сред много, их морфологическая организация и функциональные свойства специфичны для различных областей мозга [120].

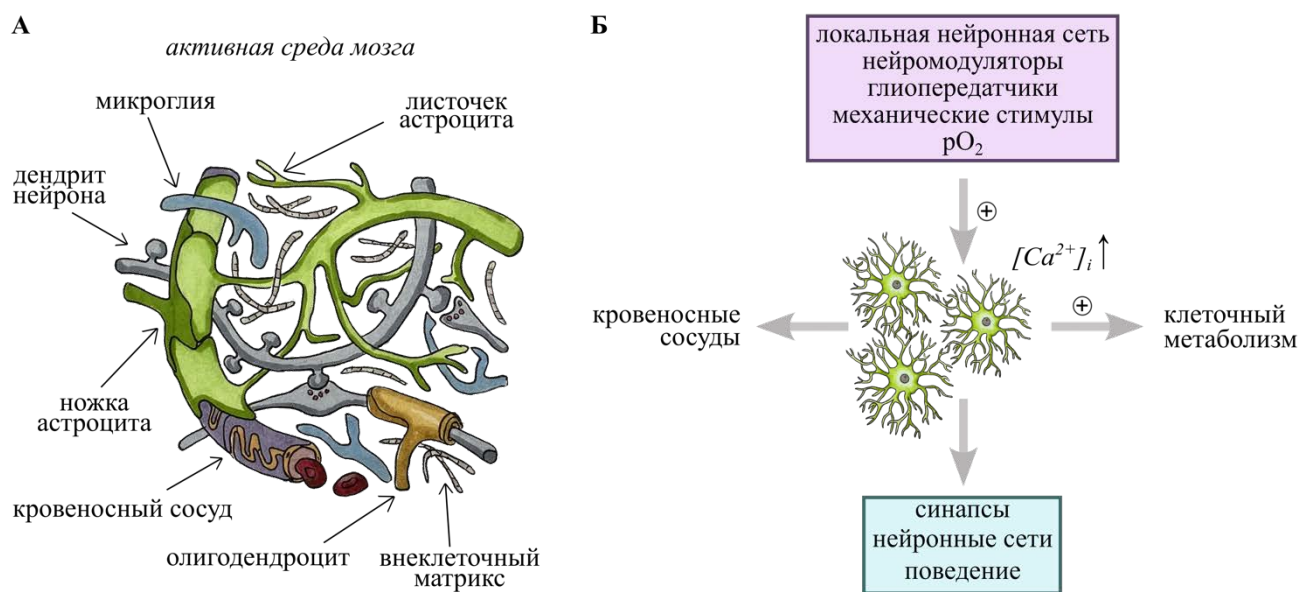


Рисунок 2. Астроцит как компонента активной среды мозга. А – Различные элементы мозга формируют активную среду мозга (brain active milieu). Рисунок по работе [120]. Б – Ca^{2+} активность в астроцитах *in vivo* изменяется под действием физиологически значимых внутренних и внешних стимулов и может участвовать в модуляции работы мозга на различных уровнях.

Работа активной среды мозга не является простым суммированием элементов, и каждое состояние мозга (бодрствование, сон, патология) или форма мозговой активности (обучение, исследование, принятие решения) требует взаимодействия всех элементов активной среды.

Нейроны взаимодействуют друг с другом преимущественно через химические синапсы и способны передавать сигналы на большие расстояния через распространение потенциалов действия по аксонам. Активность нейронов влияет на микроокружение через выделение нейротрансмиттеров и нейромодуляторов, локальные электрические потенциалы и флуктуации концентрации ионов. Отдельные синапсы могут контактировать с различными отростками астроцитов.

Астроциты реагируют на физиологически значимые внутренние и внешние стимулы изменением Ca^{2+} активности, определяющейся входами от многих элементов мозга (Рис. 2Б). В свою очередь, астроцитарная Ca^{2+} активность может быть вовлечена в модуляцию сосудистого тонуса, активацию клеточного метаболизма, а также модуляцию синаптической передачи и пластичности, работы нейронных сетей, поведения [1].

Микроглиальные отростки патрулируют активную среду и способствуют формированию синаптических связей.

Олигодендроциты формируют миелиновую оболочку и поддерживают аксоны.

Внеклеточное пространство (ВКП), заполненное тканевой жидкостью и внеклеточным матриксом, разделяет клетки мозга и занимает около 20% от общего объема мозга. Извилистость ВКП определяет путь диффузии внесинаптических сигнальных молекул (включая нейротрансмиттеры и нейромодуляторы).

Внеклеточный матрикс присутствует на всем протяжении ВКП, где он ограничивает перестройку клеточных компартментов (например, образование новых синапсов) и взаимодействует с рецепторами и каналами, регулируя их функции.

Сосуды головного мозга на уровне капилляров являются неотъемлемой частью нейроваскулярной единицы и покрыты астроцитарными концевыми ножками [1,40].

Таким образом, поведение формируется в результате совместной работы многих элементов мозга. В рамках концепции активной среды мозга роль астроцитов и астроцитарной Ca^{2+} сигнализации объединяет различные типы взаимодействий и требует разработки методов для экспериментов *in vivo*, которые одновременно исследуют различные типы клеток.

1.6 Взаимодействия астроцитов, нейронов и кровеносных сосудов

Астроциты и нейроны находятся в тесной морфологической и функциональной взаимосвязи с кровеносными сосудами головного мозга, формируя совместно нейро-глио-сосудистый комплекс. Существуют различные механизмы нейрососудистого контроля, обеспечивающие адекватное энергетическим потребностям кровоснабжение мозга. Точно сбалансированная микросреда в головном мозге поддерживается за счет целостности гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), обеспечивающего защиту ЦНС от вредных веществ и патогенов и облегчающего прохождение жизненно важных молекул, таких как энергетические субстраты [121].

Считается, что астроциты, являясь частью нейро-глио-сосудистого комплекса, выполняют роль связующего звена между поставщиками метаболитов (сосудами) и потребителями (нейронами), регулируя кровоток, доступность метаболитов и активность нейронов.

С одной стороны, концевые ножки астроцитов, расположенных в сером веществе ЦНС, образуют контакты с базальной мембраной стенки кровеносного сосуда. Известно, что почти все сосуды мозга (до 99%) покрыты астроцитарными отростками, участвующими в поддержании функций ГЭБ [40]. В условиях *in vivo* показано, что все корковые астроциты связаны как минимум с одним кровеносным сосудом. Только в гиппокампе, имеющем меньшую плотность сосудов по сравнению с корой головного мозга, встречаются единичные астроциты, не имеющие явных сосудистых связей [122]. Ca^{2+} ответ астроцитов, связанный, в частности, с нейронной активностью, запускает широкий спектр сигнальных путей, один из которых – секреция астроцитарными концевыми ножками вазоактивных веществ, влияющих на диаметр

кровеносных сосудов. Примерами вазодилататоров могут служить эпоксиэйкозатриеновая кислота, аденозин, NO и метаболиты фермента циклооксигеназы-2, действие которых приводит к увеличению местного кровотока [123]. Это указывает на ключевую роль астроцитов в функциональной гиперемии (увеличении кровоснабжения органов и тканей) [124]. Астроциты соматосенсорной коры отвечают на функциональную гиперемия во время сенсорной стимуляции или локомоции путем AMPA- и NMDA-рецептор-зависимого повышения уровня $[Ca^{2+}]_i$ в астроцитарных концевых ножках [20]. Астроциты также реагируют повышением $[Ca^{2+}]_i$ на резкое снижение перфузии мозга [125].

С другой стороны, астроциты захватывают своими отростками синапсы, что позволяет им не только отвечать на активность нейронов [126], но и модулировать синаптическую активность за счет описанных ранее механизмов. Поскольку астроциты формируют функциональный синцитий, они могут обеспечивать межклеточную коммуникацию и распределение ионов, метаболитов и нейротрансмиттеров в мозге [127]. Считается, что астроциты интегрируют информацию об активности нейронов для увеличения локального мозгового кровотока посредством K^+ сигнализации [128].

Таким образом, астроциты идеально приспособлены для регуляции локального кровотока в зависимости от уровня нейронной активности [72,129,130]. Астроциты могут служить связующим звеном между нейронами и кровеносными сосудами, передавая информацию об уровне нейронной активности в кровеносные сосуды для координации доставки кислорода и глюкозы в клетки ткани в соответствии с их энергетическими потребностями. Тем не менее вклад астроцитов в регуляцию сосудистого тонуса и точные механизмы этого процесса остаются областью активных исследований.

1.7 Взаимосвязь Ca^{2+} и клеточного метаболизма

Ионы Ca^{2+} являются важнейшим вторичным мессенджером и вовлечены в регуляцию многих внутриклеточных процессов, ключевое значение среди которых принадлежит клеточному метаболизму. В частности, под действием ионов Ca^{2+} активируются процессы гликолиза и ОФ [29]. Считается, что энергообеспечение нейронов зависит, в основном, от ОФ, в то время как астроциты для производства энергии в большей степени полагаются на гликолиз [15].

Процессы гликолиза как в нейронах, так и в астроцитах, лучше исследованы по сравнению с ОФ, которое в условиях *in vivo* совершенно не изучено. Гликолиз является первым этапом метаболизма глюкозы и происходит в цитоплазме, при этом из 1 молекулы глюкозы образуются 2 молекулы пирувата, 2 молекулы АТФ и 2 молекулы восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (НАДН) [131]. Пируват поступает в матрикс митохондрий, где

преобразуется в ацетилкофермент А (ацетил-КоА). Дальнейшее окисление ацетил-КоА происходит в цикле Кребса (цикле трикарбоновых кислот), а НАДН – в дыхательной цепи митохондрий в процессе ОФ.

Дыхательная цепь митохондрий осуществляет синтез АТФ. Дыхательную цепь образуют пять комплексов, расположенных во внутренней мембране митохондрий, а именно: I – НАДН-дегидрогеназа (НАДН-убихинон-оксидоредуктаза), II – сукцинатдегидрогеназа (сукцинат-убихинон-оксидоредуктаза), III – цитохром С-редуктаза (убихинол-цитохром С-оксидоредуктаза, цитохром BC1-комплекс), IV – цитохром С-оксидаза (цитохромоксидаза, цитохром С-кислород-оксидоредуктаза, цитохром АА₃), V – АТФ-синтаза (Рис. 3).

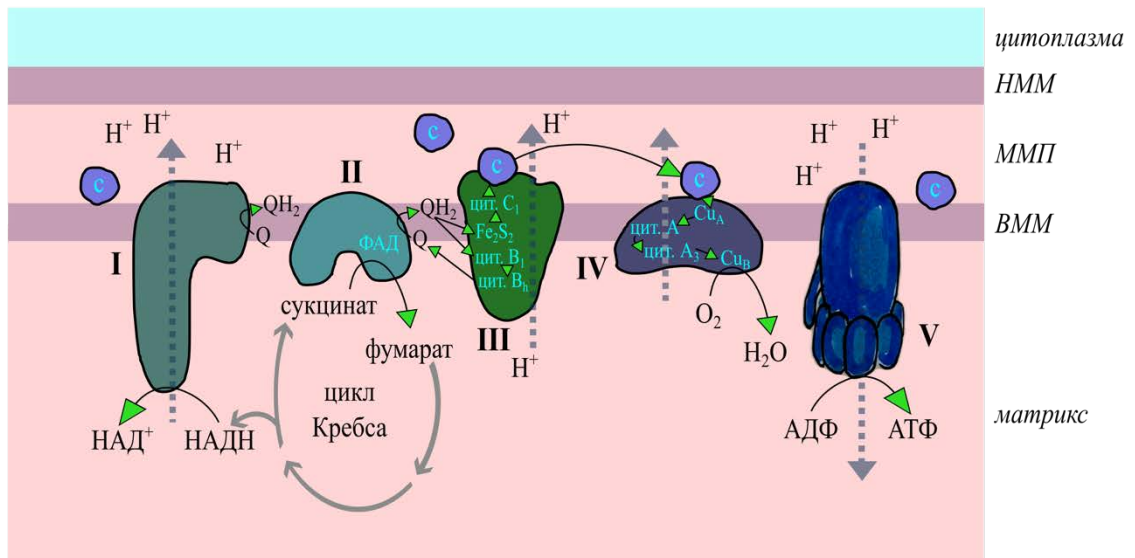


Рисунок 3. Строение дыхательной цепи митохондрий. Римскими цифрами обозначены комплексы ЭТЦ, пунктирные стрелки обозначают движение H^+ , зеленые – перемещение электронов. с – цитохром С, Q и QH₂ – убихинон и его восстановленная форма, ВММ – внутренняя мембрана митохондрии, ММП – межмембранное пространство, НАД⁺ и НАДН – окисленная и восстановленная формы никотинамидадениндинуклеотида, НММ – наружная мембрана митохондрии, ФАД и ФАДН₂ – флавинадениндинуклеотид и его восстановленная форма, цит. – цитохром. Адаптировано из [4].

Важную роль в транспорте электронов по ЭТЦ играют цитохромы – гем-содержащие белки, связанные с внутренней мембраной митохондрий. Только цитохром С не связан с мембраной и диффундирует в межмембранном пространстве (ММП).

В ходе цикла Кребса в матриксе митохондрий на 1 пируват синтезируется 4 молекулы НАДН. Окисление НАДН происходит в I комплексе ЭТЦ. Одна из реакций цикла Кребса – превращение сукцината в фумарат – катализируется II комплексом ЭТЦ. В процессе ОФ электроны от восстановительных эквивалентов перемещаются по цепи переносчиков ЭТЦ, что сопровождается переносом H^+ в ММП через I, III и IV комплексы ЭТЦ. Это создает

электрохимический градиент, запускающий синтез АТФ за счет перемещения H^+ по каналам АТФ-синтазы. Таким образом, синтез АТФ в результате ОФ происходит за счет переноса электронов по цепи переносчиков ЭТЦ (Рис. 3) [131].

Производство АТФ через ОФ особенно важно в мозге, на долю которого приходится 20% метаболизма организма в состоянии покоя [132,133]. В качестве побочного продукта в процессе ОФ образуются АФК. В больших количествах они вызывают окислительный стресс и повреждение клеток, однако в умеренных количествах играют сигнальную роль и способствуют синаптической пластичности в мозге [134].

Помимо синтеза АТФ и генерации АТФ, митохондрии являются важным участником астроцитарной Ca^{2+} динамики [47] и занимают почти весь объем астроцита [135]. Митохондрии являются динамичными структурами, подвергающимися обширному делению и слиянию, направленному движению по цитоскелетным путям и деградации [136]. Митохондрии обычно действуют как буфер ионов Ca^{2+} и отвечают на повышение концентрации Ca^{2+} либо увеличивая продукцию АТФ, либо запуская апоптоз [137].

Цитоплазматический Ca^{2+} может попадать в митохондрии через несколько механизмов, основным из которых является MCU. Помимо MCU, митохондриальные потоки Ca^{2+} опосредуются mNCX, H^+/Ca^{2+} обменником и mPTP, расположенными на внутренней мембране митохондрий [137,138]. В митохондриях ионы Ca^{2+} могут влиять на активность ферментов, транспортеров и белков, участвующих в синтезе АТФ [29,139]. Ионы Ca^{2+} играют важнейшую роль в регуляции цикла Кребса, активируя пируватдегидрогеназу, NAD^+ -зависимую изоцитратдегидрогеназу и 2-оксоглутаратдегидрогеназу [13]. Активность дыхательной цепи также может модулироваться повышением концентрации Ca^{2+} в митохондриях [14]. Выработка АТФ зависит от концентрации Ca^{2+} в митохондриальном матриксе, причем субмикромольные концентрации стимулируют синтез АТФ, а концентрации выше 10 мкМ – подавляют [140]. Митохондрии медленно высвобождают накопленный Ca^{2+} обратно в цитозоль, что модулирует амплитуду и увеличивает продолжительность цитозольных Ca^{2+} событий. Таким образом, митохондрии обладают способностью контролировать и модулировать многие Ca^{2+} -зависимые функции астроцитов и нейронов [141].

Имеющиеся в литературе данные сосредоточены, в основном, на строении ЭТЦ цепи митохондрий и, в частности, описывают различные комплексы ЭТЦ. Имеются данные о том, что дыхательная цепь митохондрий нейронов и астроцитов организована по-разному: ЭТЦ нейронов устроена по типу респиросомы, в то время как для ЭТЦ астроцитов характерна разрозненная организация [30]. Тем не менее все полученные к настоящему моменту данные о функционировании ЭТЦ получены на культурах, что может отличаться от условий *in vivo*.

Таким образом, ионы Ca^{2+} тесно связаны с регуляцией клеточного метаболизма, одним из основных участников которого являются митохондрии. Митохондрии, в свою очередь, вносят существенный вклад в Ca^{2+} активность в клетках мозга, что находит отражение в модуляции различных Ca^{2+} -зависимых процессов.

Можно заключить, что астроцитарная Ca^{2+} активность – важный аспект при исследовании функций, обеспечиваемых астроцитами в нервной системе. На данный момент количество работ, посвященных изучению астроцитов *in vivo*, остается немногочисленным, особенно мало работ с участием свободноподвижных животных.

Ca^{2+} активность тесно связана с метаболическими процессами в клетках мозга. Взаимосвязь клеточного метаболизма и ионов Ca^{2+} создает потребность в детальном изучении пространственно-временных параметров Ca^{2+} активности в астроцитах и нейронах. Ca^{2+} активность в этих клетках и их энергетические потребности могут отличаться в зависимости от структуры мозга и типа поведения.

Сведения о функционировании ЭТЦ как астроцитов, так и нейронов в условиях *in vivo* отсутствуют. Получение данных о редокс-состоянии дыхательной цепи астроцитов и нейронов будет способствовать пониманию, какой вклад каждый тип клеток вносит в обеспечение работы мозга.

При проведении экспериментов *in vivo* необходимо учитывать, что поведение формируется в результате совместной работы многих элементов активной среды мозга. В связи с этим требуется комплексный подход, позволяющий изучить роль различных элементов активной среды.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Экспериментальные животные

Исследование выполнено на базе Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ РАН) и кафедры высшей нервной деятельности биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Все эксперименты проведены в соответствии с Директивой 2010/63/EU об использовании животных для экспериментальных исследований. Исследование одобрено Комиссией ИБХ РАН по содержанию и использованию животных (протоколы №283, 353, учитывающие этические и юридические нормы Rus-LASA и международные GLP-стандарты).

В исследовании использованы самцы и самки мышей линии C57Bl/6 в возрасте 2-9 месяцев. Животные содержались в группах в стандартных лабораторных условиях в конвенциональном отделении вивария ИБХ РАН с доступом к воде и комбинированному корму *ad libitum* при цикле день/ночь – 12 ч/12 ч. Через 4-8 недель после хирургической операции животным готовили к проведению экспериментов (визуализация Ca^{2+} активности в астроцитах и нейронах, регистрация рамановских спектров, фотометрия, комбинированная с проведением поведенческих тестов). Эксперименты проводились *in vivo* на соматосенсорной коре головного мозга и гиппокампе бодрствующих мышей.

2.2 Конструирование вирусных векторов

Для визуализации сигналов Ca^{2+} в цитозоле астроцитов и нейронов был использован генетически кодируемый индикатор Ca^{2+} GCaMP6f (Рис. 4).

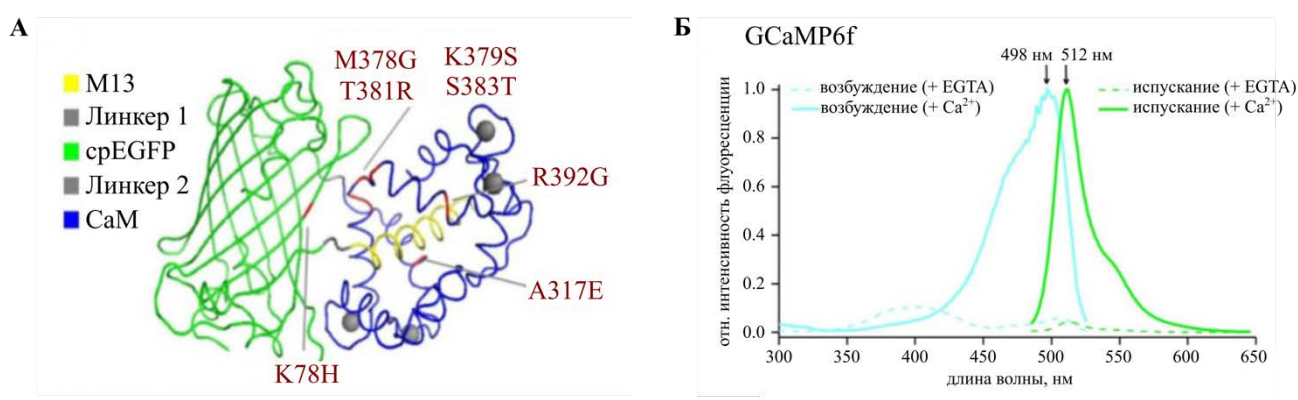


Рисунок 4. Характеристики генетически кодируемого индикатора Ca^{2+} GCaMP. А – Модельная структура индикатора GCaMP6, обозначены мутации индикаторов GCaMP6s (K78N), GCaMP6m (M378G, K379S), GCaMP6f (A317E) и общие мутации относительно индикатора Ca^{2+} GCaMP5G (T381R, S383T, R392G). Б – Спектры возбуждения и испускания GCaMP6f в растворе в отсутствие (+ EGTA) и в присутствии ионов Ca^{2+} . Рисунок адаптирован из [142].

GCaMP6f представляет собой молекулу, которая построена на основе флуоресцентного белка cрEGFP, к N- и C-концам которого присоединены белки M13 (пептидная последовательность киназы легких цепей миозина) и кальмодулин (CaM, Ca²⁺-связывающий белок). Молекула GCaMP6f реагирует на связывание ионов Ca²⁺ изменением своих флуоресцентных свойств, флуоресцентный сигнал в дальнейшем регистрируется с помощью флуоресцентного микроскопа. Флуорофор имеет пик возбуждения на длине волны $\lambda_{ex} = 497$ нм и пик испускания на $\lambda_{em} = 512$ нм. GCaMP6f обладает быстрой кинетикой (константа диссоциации $K_d = 375$ нМ) [143].

Одно из преимуществ генетически кодируемых сенсоров в том, что они могут быть таргетированы в определенный тип клеток. Чтобы доставить GCaMP6f специфически в клетки мозга, мы использовали генетические векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV, Рис. 5). Плазмиды были запакованы в AAV в центре наработки вирусных векторов ИБХ РАН (исполнитель – А.А. Мощенко).

Векторы, таргетируемые в астроциты, содержали специфичный для астроцитов промотор *gfaABC1D* (близок к GFAP, астроцит-специфичному маркеру глиального фибриллярного кислого белка), в нейроны – промоторы *hSyn* и *CamKII*. В ходе экспериментов AAV доставлялись в мозг (в соматосенсорную кору и гиппокамп) посредством стереотаксической инъекции, совмещенной с другими хирургическими манипуляциями.

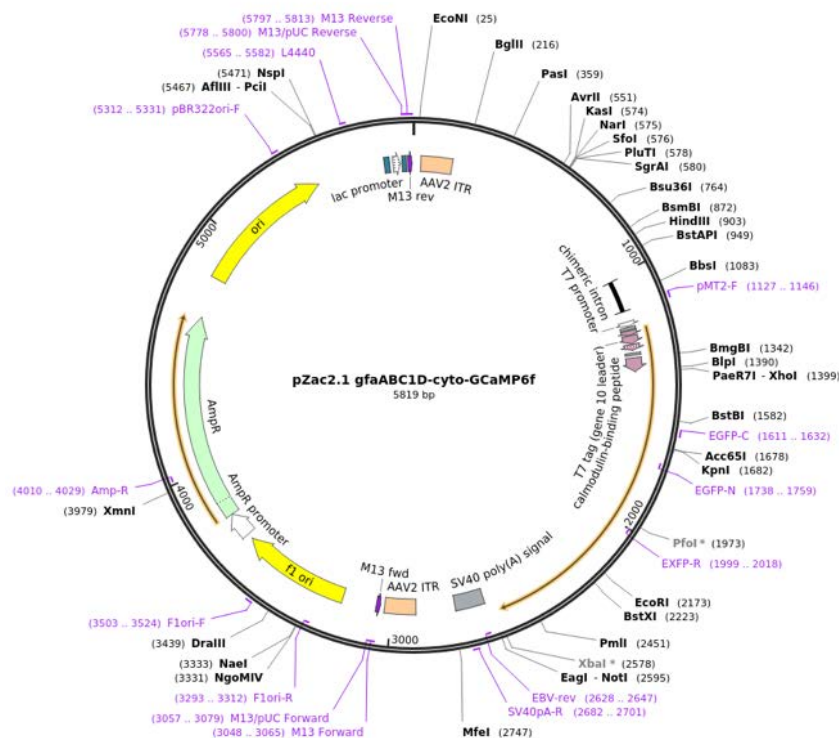


Рисунок 5. Пример плазмиды pZac2.1 *gfaABC1D*-cyto-GCaMP6f (#52925, www.addgene.org), содержащей последовательность генетически кодируемого индикатора Ca²⁺ GCaMP6f.

В работе использовали следующие плазмиды:

- 1) для экспрессии сенсора Ca^{2+} GCaMP6f в цитоплазме астроцитов: AAV.gfaABC1D-cyto-GCaMP6f-SV40 (плазмида, созданная Baljit Khakh, Addgene plasmid #52925; <http://n2t.net/addgene:52925>; RRID:Addgene_52925),
- 2) для экспрессии сенсора Ca^{2+} GCaMP6f в цитоплазме нейронов: AAV.CamKII-GCaMP6f-WPRE-SV40 (плазмида, созданная James M. Wilson (Addgene plasmid #100834; <http://n2t.net/addgene:100834>; RRID:Addgene_100834),
- 3) для экспрессии зеленого флуоресцентного белка GFP в астроцитах: AAV.gfaABC1D-PI-lck-GFP.SV40 (плазмида, созданная Baljit Khakh (Addgene plasmid #105598; <http://n2t.net/addgene:105598>; RRID:Addgene_105598),
- 4) для экспрессии дальне-красного флуоресцентного белка NirFP в нейронах: AAV.hSyn-NirFP-WPRE-hGH (плазмида собрана на основе вектора от evrogen.ru).

Работали с несколькими серотипами вируса: AAV5, AAV9 и синтетическим серотипом AAV-phr.B, поскольку в ходе тестирования вирусов было обнаружено, что они обладают разной эффективностью заражения клеток и приводят к различной картине экспрессии в астроцитах и нейронах соматосенсорной коры и гиппокампа в срезах мозга и *in vivo* (Рис. 7).

2.3 Инъекция AAV в мозг

2.3.1 Стереотаксическое введение AAV в мозг

Инъекция AAV (в объеме 1 мкл) под специфичными промоторами, обеспечивающим экспрессию конструкторов в астроцитах или нейронах, производилась с помощью тонкого стеклянного капилляра. Стеклянный капилляр (микропипетка) изготавливался на основе стеклянных заготовок (Drummond Scientific 3-000-105-G Glass Replacement Capillaries for Microdispensers, White, 1-5 μ L Capacity), вытягиваемых с уменьшением диаметра и жестким разрывом в самом тонком месте с помощью пуллера (Sutter Instrument, P-1000, США). Тонкий кончик пипетки минимизировал повреждение ткани мозга при инъекции и способствовал более медленному введению вещества в мозг.

Перед проведением операции для защиты глаз животного непосредственно на роговицу наносили глазной гель (Видисик) или физиологический раствор 0.9% NaCl. Стереотаксическая операция по краниотомии и инъекции AAV, кодирующих белки интереса, производилась под общим наркозом (изофлуран, 3% для погружения в наркоз и 0.8-1.2% во время проведения операции) с использованием бинокуляра. Животное закреплялось в стереотаксическом аппарате так, чтобы череп был строго зафиксирован. Шерсть на верхней поверхности головы сбрасывали, затем обрабатывали 70%-ным раствором этилового спирта. Перед рассечением кожи головы производили местную анестезию путем подкожного введения новокаина (0.5%, 10 мл/кг). Перед

проведением манипуляций убеждались в отсутствии у животного мышечных рефлексов (роговичного и отдергивания конечности в результате пощипывания лапок и хвоста пинцетом). После рассечения кожи головы в направлении от носа к затылку удаляли соединительную ткань и обрабатывали поверхность черепа 70%-ным раствором этилового спирта. Определяли положение *Bregma* и откладывали нужные координаты (Таблица 1). С помощью стоматологического бора проводили краниотомию диаметром 0.5 мм над областью интереса, периодически смачивая поверхность черепа 0.9%-ным раствором NaCl (Рис. 6). В случае кровотечения использовали гемостатическую губку. После изготовления отверстия в черепе с помощью стеклянного капилляра, заполненного раствором AAV и подсоединенного через резиновую трубку к шприцу, медленно вводили AAV в ткань мозга на нужную глубину, убеждаясь в отсутствии пузырьков воздуха и избегая излишнего давления в капилляре. После каждой точки введения ждали 2-5 минут для обеспечения лучшей диффузии раствора в ткань. Затем отверстия в черепе закрывали биосовместимым силиконом (Kwik-Sil, США), а кожу заклеивали биосовместимым клеем (3M Vetbond, США).

По окончании операции производили однократную внутривенную инъекцию раствора кетопрофена (5 мг/кг) с целью анальгезии и подкожную инъекцию мелоксикама (2 мг/кг), обладающего противовоспалительным действием, и наблюдали за состоянием животного. При необходимости введение анальгетика повторяли.

После хирургического вмешательства животных располагали в конвенциональном отделении вивария в стандартных условиях.

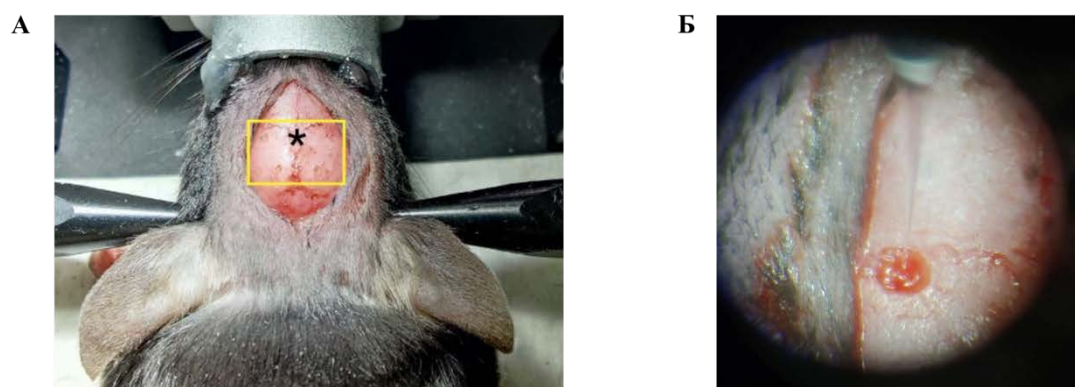


Рисунок 6. Проведение стереотаксической инъекции AAV в мозг. А – Пример краниотомии для последующего введения AAV (4 отверстия – 2 над областью соматосенсорной коры и 2 над гиппокампом – показаны желтым прямоугольником, *Bregma* отмечена звездой). Б – Заполненный AAV стеклянный микрокапилляр, погруженный в мозг.

2.3.2 Подбор серотипа и титра AAV

Для подбора серотипа, титра AAV и координат инъекции доставку AAV в клетки мозга производили с помощью стереотаксической инъекции в область поля CA1 гиппокампа или в область первичной соматосенсорной коры с последующим приготовлением срезов мозга. Производили тест следующих вирусов (Рис. 7): AAV5-gfaABC1D-cytoGCaMP6f-SV40, AAV9-gfaABC1D-cyto-GCaMP6f-SV40, AAV-php.B-gfaABC1D-cyto-GCaMP6f-SV40, AAV5-gfaABC1D-PI-lck-GFP-SV40.

AAV инъецировали в объеме 1 мкл/полушарие в титрах 10^{12} и 10^{11} вир.ген./мл (разведение в 0.1M растворе натрий-фосфатного буфера (PBS)) в гиппокамп или первичную соматосенсорную кору. Оценку экспрессии производили через 3 и 4 недели после инъекции.

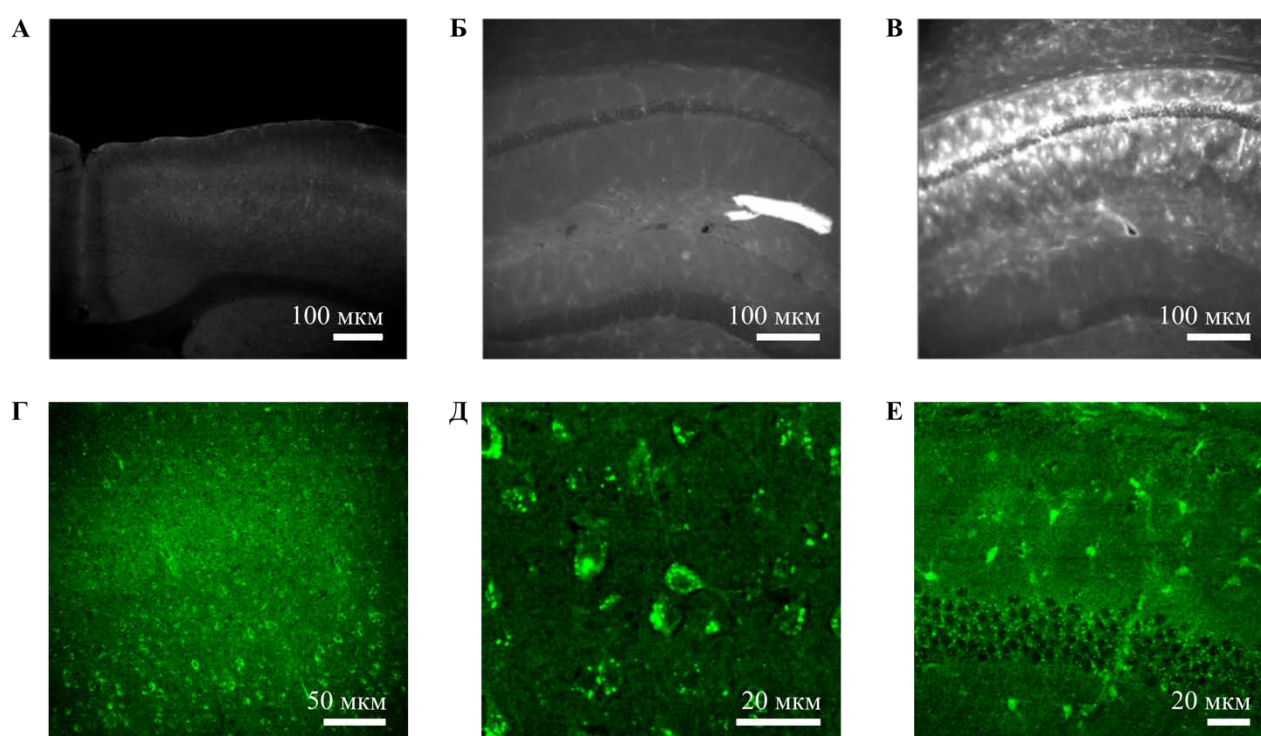


Рисунок 7. Примеры срезов мозга, полученных в ходе проведения морфологического контроля для подбора оптимальных серотипа и титра AAV и координат стереотаксической инъекции. А – AAV5-gfaABC1D-cytoGCaMP6f-SV40, соматосенсорная кора, 10^{12} вир.ген./мл, 4 недели экспрессии. Б – AAV5-gfaABC1D-cytoGCaMP6f-SV40, гиппокамп, 10^{11} вир.ген./мл, 3 недели экспрессии. В – AAV9-gfaABC1D-cytoGCaMP6f-SV40, гиппокамп, 10^{11} вир.ген./мл, 4 недели экспрессии. Г и Д – AAV-php.B-gfaABC1D-cytoGCaMP6f-SV40, соматосенсорная кора, 10^{11} вир.ген./мл, 4 недели экспрессии, наблюдаются агрегаты (в виде флуоресцирующих гранул) нефункционального сенсора в цитоплазме астроцитов). Е – AAV-php.B-gfaABC1D-cytoGCaMP6f-SV40, гиппокамп, 10^{11} вир.ген./мл, 3 недели экспрессии.

По результатам проведенных тестов были определены оптимальные серотипы и титры AAV. Для экспрессии сенсора Ca^{2+} GCaMP6f в цитоплазме астроцитов оптимальным является серотип AAV9. Качество экспрессии немного снижается при использовании серотипа AAV5, но он тоже работает стабильно, оптимальным титром является 10^{11} вир.ген./мл. Более высокая концентрация вируса, по-видимому, вызывает реактивный астроглиоз и апоптоз. Синтетический серотип вируса, вероятно, является токсичным для астроцитов, в клетках накапливаются агрегаты нефункционального сенсора, наблюдается апоптоз.

Для экспрессии зеленого флуоресцентного белка GFP в астроцитах подходит AAV5, титры 10^{12} и 10^{11} вир.ген./мл работают хорошо.

Тесты, проведенные в лаборатории ранее, показали, что для нейронов подходят все серотипы вирусов, причем AAV-*php.B* обладает наибольшей эффективностью заражения, титр не является критичным – и AAV может быть использован в концентрации как 10^{12} , так и 10^{11} вир.ген./мл.

2.3.3 Подбор стереотаксических координат для инъекции AAV

Стереотаксические координаты инъекции подбирались согласно атласу мышинового мозга с использованием нескольких мышей, поскольку наблюдались индивидуальные различия в размерах структур интереса у мышей одного возраста. Особенно тщательно производился подбор координаты для гиппокампа, поскольку кончик пипетки должен был попадать в середину-нижнюю треть слоя *str. oriens*, где впоследствии размещался торец оптоволокон для регистрации флуоресцентного сигнала. Вследствие небольшой толщины слоя *str. oriens* в поле CA1 гиппокампа требовалось точно подобрать координаты в дорзо-вентральном направлении. Чтобы область заражения была более широкой, в этом направлении производили несколько заколов (3-4), равномерно распределяя вводимый объем AAV между точками. Все координаты определялись относительно точки *Bregma* (место схождения лобных и теменных костей, Рис. 6А).

Для оценки уровня экспрессии белков через 3 и 4 недели после введения AAV проводили интракардиальную перфузию мышей, изготавливали срезы мозга и осуществляли иммуногистохимическую окраску с последующей визуализацией с помощью конфокального (Olympus FV-300, Япония) или мультифотонного (FemtoSmart, Femtonics, Венгрия) микроскопов (Рис. 7). В результате тестирования были подобраны оптимальные координаты для инъекции (Табл. 1).

В дальнейшем при проведении операций для экспериментов использовалась монолатеральная инъекция в область правой первичной соматосенсорной коры (проекция передней лапы) и билатеральная инъекция в правый и левый гиппокампы. Инъекция AAV была

совмещена с имплантацией хронического краниального окна (над первичной соматосенсорной корой) или имплантацией оптоволокон в поле CA1 гиппокампа.

Таблица 1. Стереотаксические координаты, используемые в ходе выполнения хирургических операций.

Структура мозга	AP, мм (ростро-каудальное направление)	ML, мм (медио-латеральное направление)	DV, мм (дорзо-вентральное направление)
Первичная соматосенсорная кора (S1)	+0.5	±2.3	-0.6...-0.1 (астроциты) -1.0...-0.4 (нейроны)
Гиппокамп (<i>str. oriens</i> , поле CA1)	-1.94	±1.5	-1.3...-1.19 (астроциты)

2.4 Проведение морфологического контроля

2.4.1 Интракардиальная перфузия животных

Оценку экспрессии GCaMP6f после проведения эксперимента осуществляли с помощью морфологического контроля. Мышей вводили в глубокий наркоз путем внутривенной инъекции раствора золетил-рометар (40 мг/кг-5 мг/кг). Интракардиальную перфузию производили через систему кровообращения. Наркотизированное животное клали на спину, делали надрез на брюшной области, продолжая его вправо и влево вдоль грудной клетки, вскрывали грудную полость, освобождая сердце для дальнейших манипуляций. Канюлю, прикрепленную к резиновой трубке, вводили в левый желудочек и подавали 0.1М раствор PBS. В правом желудочке для быстрого замещения крови делали небольшой надрез. После перфузии раствором PBS в объеме 20-30 мл (до момента замещения крови PBS) производили фиксацию тканей 4%-ным раствором параформальдегида (PFA), приготовленного на PBS, в объеме 15-20 мл. После проведения перфузии животное декапитировали, мозг аккуратно извлекали из черепной коробки помещали в 4%-ный раствор PFA на сутки для постфиксации, а затем хранили в 0.1М растворе PBS с добавлением раствора азида натрия (консерванта, 0.001%) до момента приготовления срезов мозга.

2.4.2 Приготовление срезов мозга

Перед приготовлением срезов одно полушарие извлеченного зафиксированного мозга помечали продольными разрезами сбоку. Мозг затем приклеивали к агаровому блоку, который фиксировали цианакрилатным клеем на ориентируемом диске для образца, помещенном в буферный лоток, заполненный 0.1М раствором PBS.

Серийные срезы мозга толщиной 40 мкм изготавливали на вибраторе (Leica 1200s, Германия) в полуавтоматическом режиме. Приготовленные срезы хранили в культуральных планшетах, заполненных 0.1М раствором PBS с добавлением раствора азиды натрия (0.001%), до проведения иммуногистохимической окраски или до момента монтирования срезов на стекла.

Монтирование срезов на предметные стекла осуществляли с помощью кисточки, смоченной в 0.1М растворе PBS. На предварительно увлажненное стекло осторожно и тщательно натягивали срезы, избыток жидкости удаляли с помощью салфетки. После подсыхания срезов их заливали 30%-ным раствором глицерина, приготовленном на основе PBS, накрывали срезы покровным стеклом и герметично заклеивали торцы стекол с помощью прозрачного лака для ногтей.

2.4.3 Проведение иммуногистохимической окраски срезов мозга

Был разработан протокол иммуногистохимического окрашивания срезов, позволяющий проводить идентификацию экспрессии после проведения экспериментов (Рис. 8).

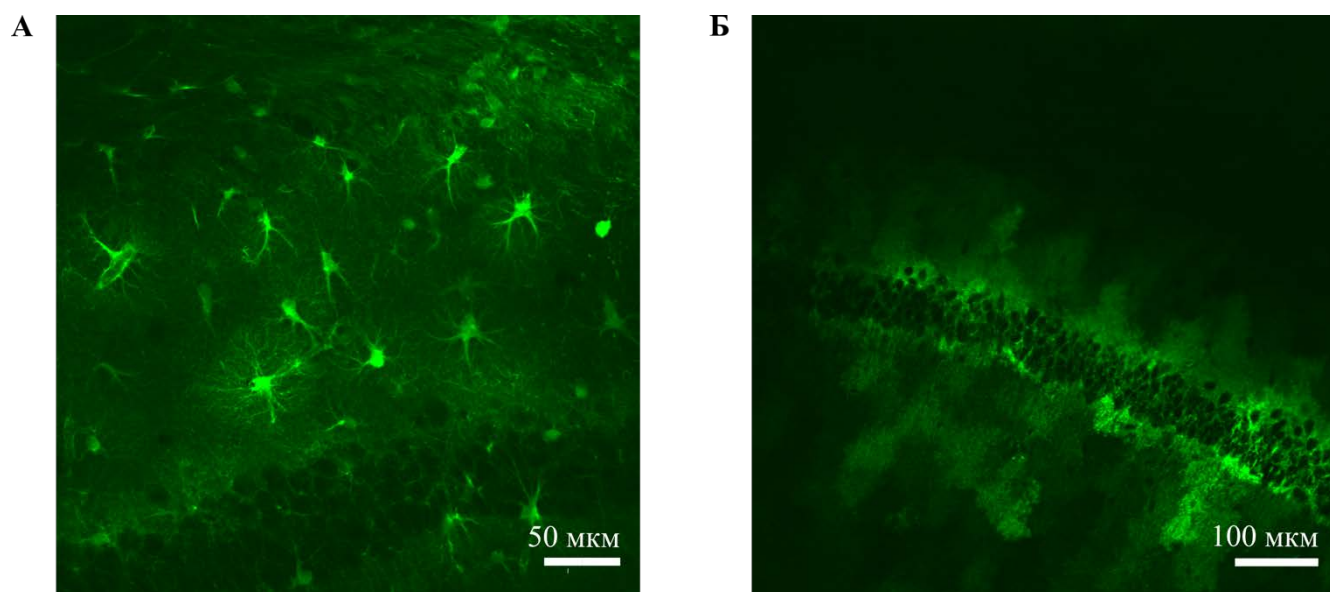


Рисунок 8. Пример иммуногистохимического окрашивания коронарных срезов головного мозга мышей. А – Срез гиппокампа, в цитоплазме астроцитов экспрессирован GCaMP6f. Б – Срез гиппокампа с экспрессией GFP в астроцитах (lck-форма). Используются первичные антитела против GFP (Evrogen) и вторичные антитела Alexa Fluor® 488 AffiniPure (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd). Белки были экспрессированы в мозге при помощи инъекции AAV (AAV9-gfaABC1D-cyto-GCaMP6f-SV40 и AAV5-gfaABC1D-PI-lck-GFP-SV40 для GCaMP6f и GFP соответственно). Визуализируются зеленые астроциты, для возбуждения флуоресценции использовался лазер с длиной волны $\lambda_{ex} = 820$ нм.

Согласно протоколу, окраску проводили в течение двух дней, последовательно перекладывая срезы в лунки планшета, заполненные необходимыми растворами. Планшет размещали на шейкере для постоянного перемешивания жидкости и обеспечения лучшей окраски.

В первый день срезы промывали в 0.1М растворе PBS (pH = 7.4, 5 минут, трижды) при комнатной температуре, затем в течение 1 часа проводили инкубацию в 0.1М растворе PBS, содержащем 1% детергента Triton X-100 и 1% бычьего сывороточного альбумина. Затем срезы отмывали в 0.1М растворе PBS, содержащем 0,2% Triton X-100 (pH = 7.4, 3 минуты, трижды). Далее проводили инкубацию срезов в течение 2 часов в 0.1М растворе PBS (pH = 7.4), содержащем 0.2% Triton X-100 и первичные антитела (из кролика, anti-GFP, Evrogen) в разведении 1:1000 при комнатной температуре. Затем продолжали инкубацию в течение ночи при температуре 4°C.

На второй день срезы промывали в 0.1М растворе PBS (pH = 7.4), содержащем 0.2% Triton X-100, в течение 5 мин при комнатной температуре трижды. Далее срезы инкубировали в течение 2 часов в 0.1М растворе PBS (pH = 7.4), содержащем 0.2% Triton X-100 и вторичные антитела (против кролика, Alexa Fluor® 488 AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L), Jackson ImmunoResearch Europe Ltd) в разведении 1:500. После производили отмывку срезов в 0.1М растворе PBS (pH = 7.4), содержащем 0.2% Triton X-100 (однократно, в течение 5 мин) и дважды по 5 минут в 0.1М растворе PBS (pH = 7.4). Окрашенные срезы мозга монтировали на предметные стекла, после чего производили их визуализацию с помощью флуоресцентного микроскопа.

2.4.4 Визуализация срезов мозга с помощью флуоресцентного микроскопа

Для визуализации окрашенных срезов использовали флуоресцентный микроскоп: конфокальный (Olympus FV-300, Япония) или мультифотонный (FemtoSmart, Femtonics, Венгрия). Условия возбуждения и регистрации флуоресценции подбирали в соответствии со спектрами возбуждения и испускания флуоресцентных белков (Alexa Fluor® 488: $\lambda_{ex} = 494$ нм, $\lambda_{em} = 517$ нм, GFP: $\lambda_{ex} = 488$ нм, $\lambda_{em} = 510$ нм, GCaMP6f: $\lambda_{ex} = 497$ нм, $\lambda_{em} = 512$ нм, NirFP $\lambda_{ex} = 605$ нм, $\lambda_{em} = 670$ нм). Конфокальный микроскоп: для возбуждения флуоресценции зеленых белков использовали источник белого света, фильтруя длины волн в диапазоне 470-495 нм, для регистрации сигнала использовали фильтр 525/39 нм (GFP Emission Filter, Thorlabs, США), объектив x10. Мультифотонный микроскоп: для двухфотонного возбуждения флуоресценции зеленых белков использовали длину волны $\lambda_{ex} = 820$ нм, красного белка – $\lambda_{ex} = 750$ нм, регистрацию проводили в зеленом (фильтр 520/60 нм) и красном (фильтр 605/70 нм) каналах соответственно, объектив x20.

2.5 Исследование Ca^{2+} активности в астроцитах и нейронах соматосенсорной коры мышей

2.5.1 Имплантация хронического краниального окна

Имплантация хронического краниального окна была совмещена со стереотаксической инъекцией AAV, кодирующих GCaMP6f, подробно описанной в п. 2.3.1. После обработки кости черепа, очищенной от соединительной ткани, спиртом, над областью правой первичной соматосенсорной коры (проекция левой передней лапы, AP = +0.5 мм, ML = 2.3 мм) производили краниотомию (отверстие в черепе) диаметром 3 мм для последующей имплантации краниального окна (Рис. 9А).

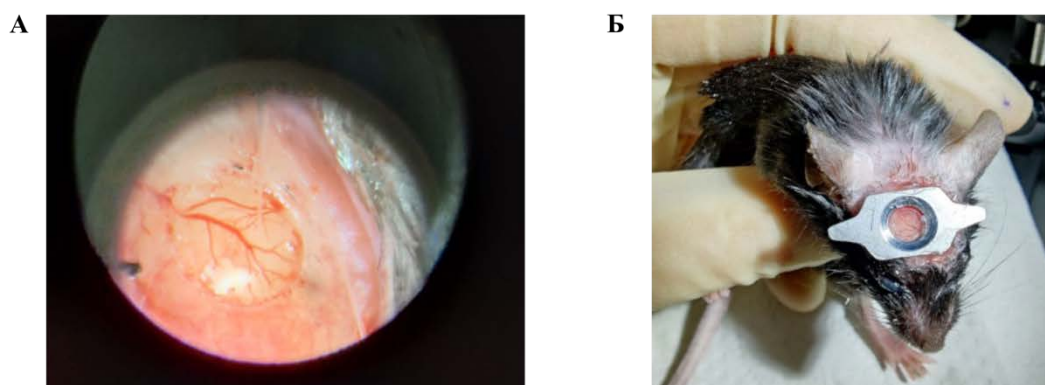


Рисунок 9. Проведение операции по имплантации хронического краниального окна над соматосенсорной корой. А – Проведение краниотомии диаметром 3 мм для последующего введения AAV, виден кончик стеклянного микрокапилляра, через который производится инъекция AAV в кору головного мозга. Б – Мышь после операции с установленной на черепе металлической платформой. Платформа используется для фиксации головы в экспериментальной установке под объективом микроскопа.

Краниотомию осуществляли под бинокуляром таким образом, чтобы избежать серьезных повреждений коры мозга, сохранив твердую мозговую оболочку (*dura mater*). После удаления кости черепа поверхность мозга обрабатывали стерильным 0.9%-ным раствором NaCl для защиты ткани мозга от пересыхания. Затем производили стереотаксическую инъекцию AAV, после чего краниотомию герметично закрывали круглым покровным стеклом диаметром 4-5 мм, приклеивая края стекла к кости. С помощью смеси стоматологического цемента и клея на черепе закрепляли специальную платформу массой около 1 грамма (Рис. 9Б), позволяющую в дальнейшем производить фиксацию головы животного в экспериментальной установке под объективом мультифотонного микроскопа (FemtoSmart, Femtonics, Венгрия) и осуществлять хроническую многократную регистрацию флуоресцентного сигнала от коры мозга. После завершения хирургических манипуляций животным обеспечивали постоперационный уход.

2.5.2 Подготовка животных к эксперименту, хендлинг

Через 6-7 недель после проведения операции животных готовили к проведению сессий Ca^{2+} имиджинга. Сначала в течение 5 дней проводили процедуру хендлинга, заключающуюся в приучении мышей к манипуляциям с ними. Проведение хендлинга способствовало уменьшению стресса, вызванного взаимодействием с экспериментатором, а также снижению вариабельности экспериментальных данных. Процедуру хендлинга проводили в несколько этапов:

- 1) приучение к рукам (руку помещают в домашнюю клетку, позволяя животному познакомиться с ней и исследовать в течение нескольких минут, через несколько дней животное позволяет приподнять себя на ладонях);
- 2) фиксация животного одной рукой за складку кожи на шее и холке, вторая рука фиксирует хвост.

После проведения хендлинга животных приучали к экспериментальной установке. В исследовании использовали установки типа «граммофон» (Gramophone, Femtonics, Венгрия, Рис. 10В) и «левитирующая платформа» (Mobile HomeCage, Neurotar, Финляндия).

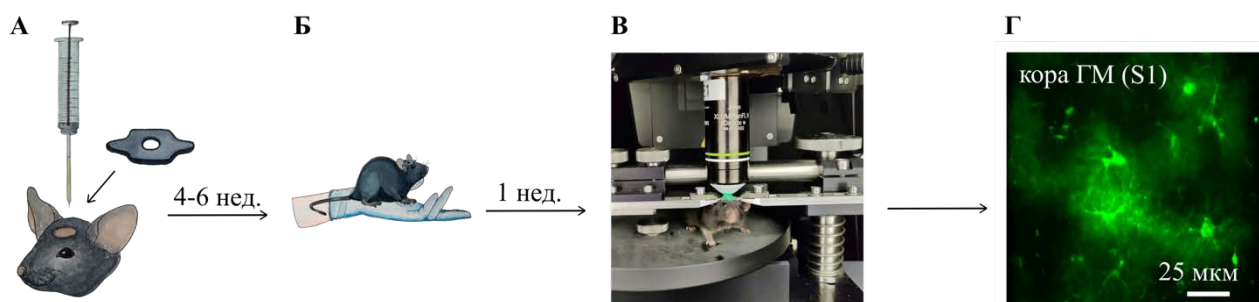


Рисунок 10. Схема эксперимента по регистрации Ca^{2+} активности в астроцитах и нейронах соматосенсорной коры бодрствующего животного. А – Операция по инъекции AAV (AAV9-gfaABC1D-cyto-GCaMP6f-SV40 или AAV5-CamKII-GCaMP6f-WPRE-SV40) и имплантации хронического краниального окна. Б – Процедура хендлинга и приучения к экспериментальной установке. В – Ca^{2+} имиджинг при помощи мультифотонного микроскопа в установке «граммофон», частота съемки 30 кадров в секунду. Г – Пример записи сигнала флуоресценции GCaMP6f, экспрессированного в цитоплазме астроцитов соматосенсорной коры мыши, в условиях *in vivo*.

«Граммфон» представлял собой вращающийся диск с небольшими бортиками, который животное могло приводить в движение при помощи лап, перемещаясь вперед или назад. «Левитирующая платформа» отличалась наличием платформы, позволяющей арене, в которой располагалась мышь, «плавать» на воздушной прослойке, то есть животное могло двигаться не только вперед-назад, но и в любом направлении в пределах плоскости. Экспериментальные установки содержали часть, в которой фиксировалось установленное на черепе металлическое

крепление. Таким образом, животное оказывалось зафиксированным за голову, но при этом могло перемещаться по подвижной платформе. Необходимо было приучить животных к процедуре фиксации и научить бегать по вращающемуся диску или арене. Это достигалось путем проведения сессий знакомства и закрепления в экспериментальной установке в течение нескольких дней перед проведением эксперимента. Перед размещением нового животного установка протиралась 70%-ным раствором спирта и дистиллированной водой, чтобы удалить запаховые метки, и насухо вытиралась.

2.5.3 Регистрация Ca^{2+} активности в астроцитах и нейронах соматосенсорной коры бодрствующих мышей

Регистрацию Ca^{2+} активности в соматосенсорной коре проводили при помощи мультифотонного микроскопа (FemtoSmart, Femtonics, Венгрия) с водным объективом с 20-кратным увеличением и числовой апертурой 1.0 (N20X-PFH 20X Olympus XLUMPLFLN Objective). Для возбуждения флуоресценции GCaMP6f использовали титан-сапфировый лазер (Coherent Chameleon, США) с длиной волны $\lambda_{\text{ex}} = 920$ нм. Флуоресцентный сигнал выделяли при помощи фильтра 525/39 нм и детектировали с помощью фотоэлектронного умножителя. Запись Ca^{2+} активности производили с частотой 30 кадров в секунду, размер кадра 512×512 пикселей.

Ca^{2+} имиджинг в установке «граммофон» был синхронизирован с получением данных о скорости перемещения животного. Параллельно проводили видеорегистрацию поведения мышей с помощью инфракрасной камеры (поскольку запись флуоресцентного сигнала осуществлялась в темноте). Ca^{2+} имиджинг в установке «левитирующая платформа» был синхронизирован с трекингом местоположения мыши в арене. Животные проводили в установке до 2-х часов. Следили за тем, чтобы у мышей не возникало жажды, периодически позволяя им пить, и не допускали утомления животных или состояния дистресса. Эксперимент включал несколько записей по 5 или 10 мин. Сигнал регистрировали от популяции астроцитов (Рис. 10) или нейронов либо с более высоким разрешением от одиночных астроцитов. Таким образом, каждая запись включала в себя набор изображений о флуоресцентном сигнале от астроцитов или нейронов первичной соматосенсорной коры во время локомоции и в периоды покоя. Часть экспериментов проводили на мышах под изофлурановым наркозом (0.7-1.2 % в газовой смеси).

Поскольку базовый уровень флуоресценции GCaMP6f очень низкий, астроциты было сложно обнаружить, если животное было неактивно. Следовательно, отдельная задача заключалась в поиске оптимального участка коры мозга для проведения имиджинга. Для этого с помощью объектива микроскопа сначала фокусировались на поверхности мозга, определяемой по сильно развитой сосудистой сети (Рис. 11). Затем по оси z обнулялись и опускались объективом вниз до тех пор, пока в поле зрения не окажутся астроциты. Имиджинг проводили в

верхнем слое (L1) коры головного мозга, в котором сосредоточены тела астроцитов и отростки нейронов (0-100 мкм от поверхности мозга). Следили за тем, чтобы сигнал от сенсора не выгорал, используя интенсивность лазера в диапазоне 7-20%, в зависимости от глубины плоскости регистрации сигнала.

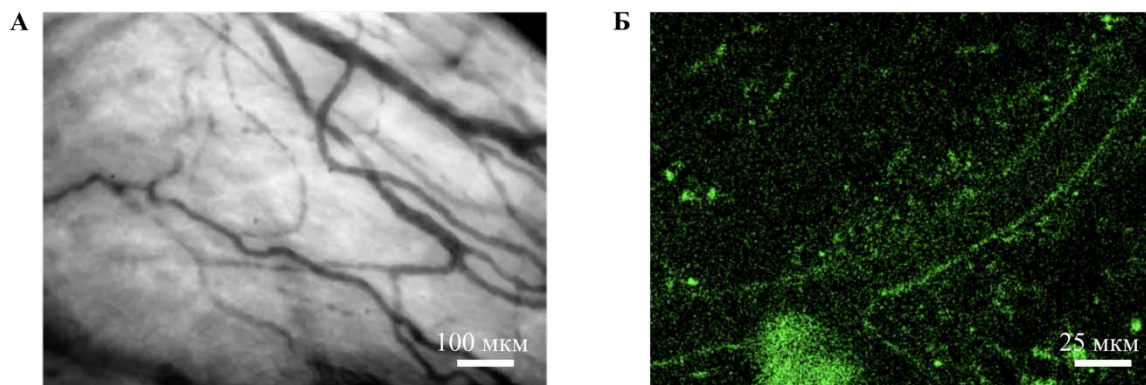


Рисунок 11. Сосудистая сеть в соматосенсорной коре мыши *in vivo*. А – Снимок поверхности коры головного мозга мыши. Б – Вид сосудов при визуализации флуоресценции, полученной в режиме двухфотонного возбуждения (флуоресцентный сигнал от астроцитарных ножек, оборачивающих сосуды).

2.6 Исследование Ca^{2+} активности в астроцитах гиппокампа мышей

2.6.1 Билатеральная имплантация оптоволокон, совмещенная с инъекцией AAV

Как и в случае с хроническим краниальным окном, билатеральную имплантацию оптоволокон диаметром 125 мкм совмещали со стереотаксической инъекцией AAV, кодирующих GCaMP6f или GFP (в контроле). После обработки костей черепа, очищенных от соединительной ткани, спиртом, с помощью стоматологического бора над областью гиппокампа билатерально производили краниотомии диаметром 0.5 мм. Были подобраны оптимальные координаты (AP = - 1.94 мм, ML = +/- 1.5 мм, DV = - 1.27 мм) для хронической имплантации оптоволокон так, чтобы торец волокна оказывался в середине-нижней трети *str. oriens* поля CA1 гиппокампа. Для оценки точности попадания проводили морфологический контроль (Рис. 12А). После проведения стереотаксической инъекции AAV производили имплантацию оптоволокон, фиксируя их на черепе с помощью смеси стоматологического цемента и клея (Рис. 12Б). На поверхность черепа скальпелем предварительно наносили неглубокие царапины для усиления адгезии. После завершения хирургических манипуляций животным обеспечивали послеоперационный уход.

Животные содержались в группах в стандартных лабораторных условиях с доступом к воде и комбинированному корму *ad libitum*. За две недели до эксперимента производили реверсию цикла день-ночь (12ч/12ч). Через 6-7 недель после операции осуществляли процедуру хендлинга (подробнее в п. 2.5.2) и подготовку к проведению поведенческих тестов (Рис. 12В).

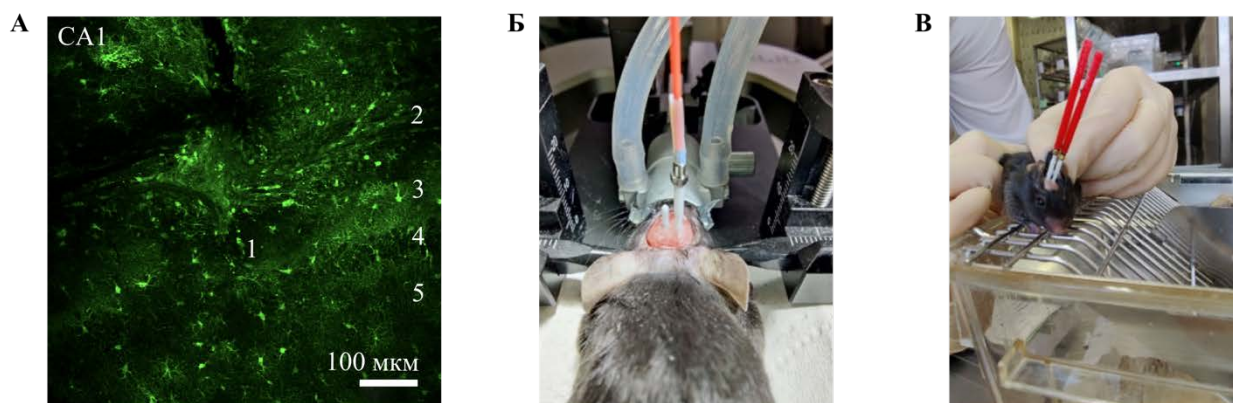


Рисунок 12. Подготовка мышей к эксперименту по регистрации фотометрического сигнала от астроцитов гиппокампа. А – Срез мозга, содержащий трек от волокна в *str. oriens* поля CA1 гиппокампа, 1 – трек от кончика оптоволокон, 2 – *Capsula externa*, 3 – *str. oriens*, 4 – *str. pyramidale*, 5 – *str. radiatum*. Б – Мышь в стереотаксисе, проведена операция по билатеральной имплантации оптоволокон. В – Мышь во время процедуры хендлинга.

2.6.2 Поведенческие тесты

Животные участвовали в батарее поведенческих тестов, состоящей из:

День 1. Тест «открытое поле». Животное помещали в центр арены (40*40*40 см³) и проводили регистрацию в течение 10 минут. Оценивали время нахождения на периферии и в центре (20 см*20 см) арены.

День 2. Тест на социальность и социальную новизну (Рис. 13). Экспериментальная камера состояла из трех отсеков с прозрачными стенками, центральный отсек содержал отверстия-входы в боковые отсеки. Тест состоял из трех сессий, между которыми производился перерыв 2-3 минуты. В начале каждой сессии тестируемая мышь помещалась в центральный отсек.

- 1) Привыкание (*habituation*, 5 минут, Рис. 13А). Животное помещали на 5 минут в центральный отсек для исследования арены, входы в боковые отсеки были закрыты.
- 2) Тест на социальность (*sociability test*, 10 минут, Рис. 13Б). Животное помещали в центральную часть арены, при этом соседние отсеки были открыты для доступа, в один боковой отсек помещали пустой перфорированный стакан (размер соответствовал среднему размеру одиночных цилиндрических домиков для мышей), в другом боковом отсеке под таким же стаканом размещали незнакомую мышь. Тест основан на том, что грызуны обычно предпочитают проводить больше времени с другим грызуном (социальность).
- 3) Тест на социальную новизну (*social novelty test*, 10 минут, Рис. 13В). Экспериментальное животное помещали в центральную часть арены, в пустой стакан в боковом отсеке помещали новую мышь, в другом стакане оставляли уже знакомую мышь. Грызуны обычно

предпочитают проводить больше времени с новым, незнакомым грызуном (социальное предпочтение, социальная новизна).

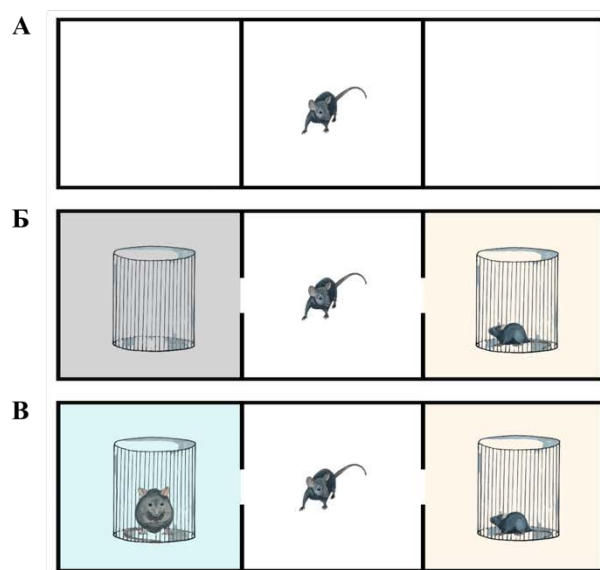


Рисунок 13. Поведенческий тест на социальность и социальную новизну. А – Привыкание к экспериментальной установке (5 минут), входы в боковые отсеки перекрыты. Б – Тест на социальность (10 минут), серый отсек содержит пустой стакан, бежевый отсек – стакан с мышью. В – Тест на социальную новизну (10 минут), бежевый отсек – со стаканом со знакомой мышью, голубой – с новой мышью. В начале каждой сессии животное высаживается в центральный отсек.

2.6.3 Регистрация Ca^{2+} активности в астроцитах гиппокампа методом фотометрии

Регистрацию Ca^{2+} активности в астроцитах гиппокампа *in vivo* проводили на самцах мышей в рамках сотрудничества с лабораторией нелинейной оптики МГУ им. М.В. Ломоносова (руководитель – А.М. Желтиков, в состав рабочей группы входили И.В. Федотов и М.А. Солотенков) совместно с м.н.с. лаборатории внесинаптической передачи ИБХ РАН А.Б. Тяглик. Связь между параметрами Ca^{2+} активности в астроцитах гиппокампа и поведением животных исследовали в режиме фотометрии (Рис. 14). Для билатеральной фотометрии использовали излучение непрерывного лазера с длиной волны 473 нм и мощностью 50 мВт, фокусируемое на торцы двух оптоволокон диаметром 125 мкм, мощность излучения составляла 1-3 мкВт. Параметры возбуждения были подобраны так, чтобы выгорание сигнала от Ca^{2+} сенсора отсутствовало. Тем не менее при возбуждении лазером соотношение сигнал-шум было низким (применение когерентного источника предполагает фокусирование лазера в узком пучке и в связи с особенностями морфологии астроцитов не является оптимальным), поэтому мы перешли к экспериментам с использованием некогерентного источника возбуждения флуоресценции (диод с длиной волны 473 нм). Одновременно с регистрацией флуоресцентного сигнала от астроцитов (частота регистрации 100 Гц) проводили видеорегистрацию поведения животных при

красном свете, невидимом для мышей (камера ImagingSource DMK 33GV024, 33 кадра/с). Световой режим содержания мышей инвертировали заблаговременно до начала эксперимента. Синхронизацию работы схемы достигали при помощи платы Arduino Uno.

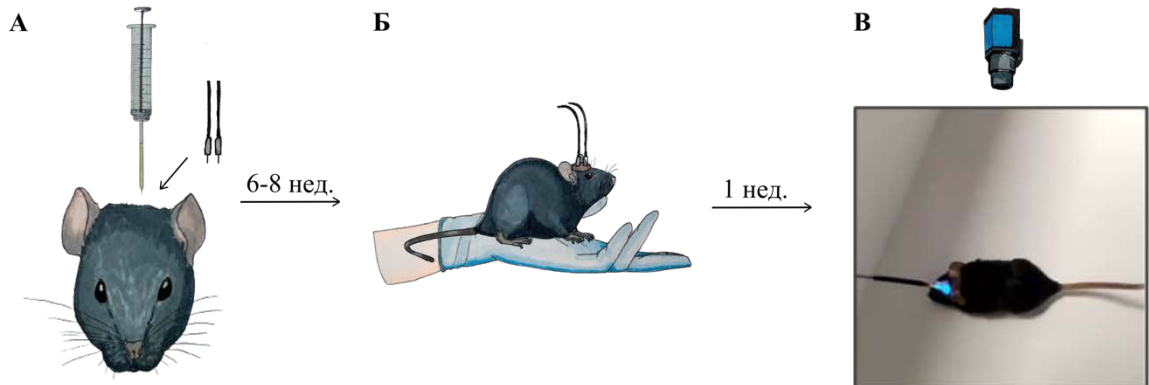


Рисунок 14. Схема эксперимента по регистрации Ca^{2+} активности в астроцитах гиппокампа свободноподвижной мыши с помощью метода фотометрии. А – Операция по инъекции AAV (AAV9-gfaABC1D-cyto-GCaMP6f-SV40 или AAV-php.B-gfaABC1D-PI-lck-GFP.SV40) для экспрессии GCaMP6f или GFP в астроцитах. Операция совмещалась с билатеральной имплантацией оптоволокон. Б – Процедура хендлинга и приучения к подключению оптоволокон. В – Запись сигнала от астроцитов поля CA1 гиппокампа в режиме фотометрии, совмещенная с видеорегистрацией поведения мыши.

Запись Ca^{2+} сигнала представляла собой визуализацию торцов оптоволоконка с помощью спектрометра (Рис. 15).

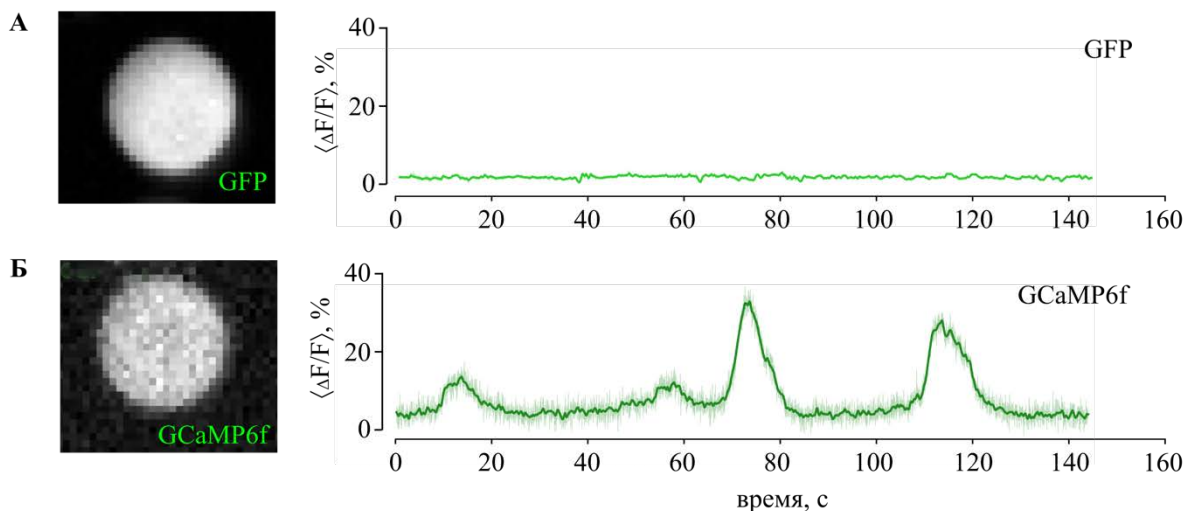


Рисунок 15. Сравнение сигналов флуоресценции от астроцитов гиппокампа контрольных и экспериментальных животных. А – Изображение, получаемое на торце волокна при записи флуоресценции от GFP-экспрессирующих астроцитов (контрольные мыши), и фотометрический сигнал от астроцитов гиппокампа. Б – То же для экспериментальных мышей, в астроцитах которых был экспрессирован GCaMP6f.

Фотометрический сигнал от астроцитов гиппокампа мышей контрольной (GFP) и экспериментальной (GCaMP6f) групп отличался. У экспериментальных животных наблюдались существенные флуктуации флуоресценции с течением времени (Рис. 15Б), в то время как у GFP-экспрессирующих животных значимые изменения сигнала отсутствовали (Рис. 15А).

2.7 Мониторинг степени оксигенации крови в сосудах и изучение редокс-состояния цитохромов дыхательной цепи митохондрий астроцитов и нейронов соматосенсорной коры бодрствующих мышей

Для исследования редокс-состояния цитохромов дыхательной цепи митохондрий астроцитов и нейронов и количественной оценки гемоглобина в кровеносных сосудах головного мозга использовали метод рамановской микроспектроскопии (спектроскопии комбинационного рассеяния, КР). Данный метод основан на неупругом (комбинационном) рассеянии света. Исследование проводили совместно с м.н.с. лаборатории внесинаптической передачи ИБХ РАН А.Б. Тяглик, сотрудниками кафедры биофизики МГУ им. М.В. Ломоносова в.н.с. Н.А. Браже и м.н.с. К.И. Морозовой.

Эксперименты проводили на мышах с хроническими краниальными окнами, астроциты которых экспрессировали зеленый флуоресцентный белок GFP, а нейроны – дальне-красный флуоресцентный белок NirFP. Флуоресцентные метки использовались для идентификации клеток. Для проведения экспериментов мы использовали беговую дорожку, приходящую в действие при движении мыши и поддерживающую ритм движения животного (модифицировали модель беговой дорожки <https://www.janelia.org/open-science/low-friction-rodent-driven-belt-treadmill>, Рис. 16).

Для регистрации спектров КР беговая дорожка с закрепленной мышью устанавливалась в столик прямого микроскопа FSM (Leica), интегрированного с рамановским микроспектрометром InVia Qontor (Renishaw, Великобритания). Астроциты идентифицировали по флуоресценции GFP, которую оценивали путем анализа интенсивности пика с максимумом при 510 нм на спектрах, полученных с длиной волны возбуждения 473 нм. Нейроны идентифицировали по флуоресценции NirFP, которую оценивали путем анализа интенсивности пика с максимумом при 670 нм на спектрах, полученных с длиной волны возбуждения 633 нм. Сосуды находили при визуальном наблюдении в отраженном свете.

Рамановские спектры (спектры КР) от кровеносных сосудов и клеток (астроцитов, нейронов) соматосенсорной коры были получены при использовании лазера с длиной волны возбуждения 532 нм и мощностью не более 1 мВт на область регистрации с диаметром 800 нм. Использовали объектив x20 с числовой апертурой 0.4. Время накопления одного спектра КР составляло 1 секунду для кровеносного сосуда, 3-10 секунд для астроцитов и 10-15 секунд для

нейронов. Спектры получали из одной и той же точки в покое, во время локомоции и после нее. Во время экспериментальной записи производилась видеорегистрация поведения мыши для последующей визуальной сегментации поведения на периоды покоя и локомоции.

Для оценки изменений диаметра кровеносных сосудов спектры снимали в покое, при локомоции и после нее вдоль линии, проходящей через кровеносный сосуд, с шагом 1 мкм.

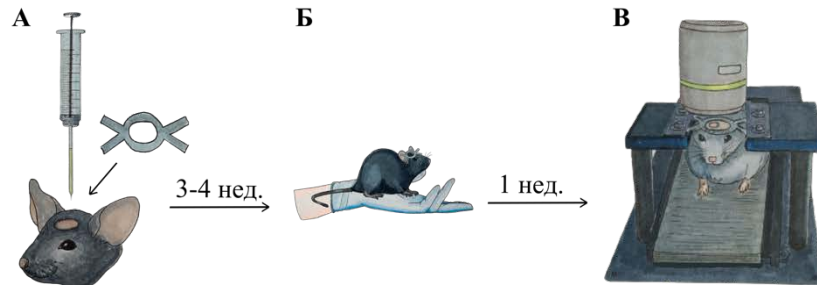


Рисунок 16. Схема эксперимента по регистрации спектров КР от кровеносных сосудов, астроцитов и нейронов соматосенсорной коры бодрствующих мышей. А – Операция по инъекции AAV (AAV-php.B-gfaABC1D-PI-lck-GFP.SV40 или AAV-php.B-hSyn-NirFP-WPRE-hGH) и установке хронического краниального окна. Б – Процедура хендлинга и приучения к беговой дорожке. В – Регистрация спектров КР от соматосенсорной коры мыши, перемещающейся по беговой дорожке.

2.8 Анализ полученных данных

Анализ данных Ca^{2+} активности в астроцитах и нейронах проводили совместно с с.н.с. кафедры биофизики МГУ им. М.В. Ломоносова А.Р. Браже. Анализ данных рамановской микроскопии выполнен совместно с сотрудниками кафедры биофизики МГУ им. М.В. Ломоносова в.н.с. Н.А. Браже и м.н.с. К.И. Морозовой.

2.8.1 Обработка данных Ca^{2+} активности в астроцитах и нейронах, полученных методом оптического имиджинга с двухфотонным возбуждением

Для обработки данных, получаемых с помощью мультифотонного микроскопа, использовали разработанные с.н.с. кафедры биофизики МГУ им. М.В. Ломоносова А.Р. Браже программные модули на языке программирования Python. Исходные данные, зарегистрированные с частотой ~ 30 кадров в секунду содержали низкий уровень сигнала, поэтому перед дальнейшей обработкой проводился биннинг (суммирование значений интенсивности) в неперекрывающихся временных интервалах (по 10 кадров для астроцитов и по 5 – для нейронов), так что результирующая частота регистрации была 3 и 6 кадров в секунду соответственно.

Далее проводилась коррекция возможных артефактов движения по сигналу автофлуоресценции, регистрируемому в красном канале. Серии кадров раскладывались на

опорные изображения и соответствующие им временные сигналы с использованием сингулярного разложения. Полученные временные сигналы подвергались фильтрации 3-точечным медианным фильтром, а пространственные компоненты (опорные изображения) сглаживались пространственным фильтром Гаусса с параметром $\sigma = 1\text{px}$. Обратное преобразование с использованием первых 50 сглаженных описанным выше способом компонент давало подготовленные для коррекции артефактов движения изображения. Далее производилась кластеризация полученных изображений, все кадры выравнивались по центру кластера, которому принадлежало наибольшее число кадров. Выравнивание проводилось глобально для сдвигов кадра как целого. Полученные для каждого кадра автофлуоресценции значения сдвигов относительно координат x и y затем применялись для кадров в зеленом канале, то есть содержащих сигнал флуоресценции GCaMP6f.

После биннинга и коррекции артефактов движения кадры, содержащие сигнал флуоресценции GCaMP6f, подвергались подавлению шума на основе локальных сингулярных разложений и обратного преобразования с использованием только первых нескольких компонент. Полученные при разложении пространственные и временные компоненты подвергались дополнительной фильтрации перед обратным преобразованием. Перед применением алгоритма подавления шума применяли стабилизирующее дисперсию преобразование Анскомба, после подавления шума — обратное преобразование Анскомба. В дальнейшем под сигналом флуоресценции $F(t)$ понимается преобразованный сигнал после биннинга, коррекции артефактов движения и подавления шума.

После подавления шума в каждом пикселе полученных серий кадров производилась оценка медленно меняющегося фонового уровня флуоресценции ($F_0(t)$) и относительных изменений флуоресценции ($\Delta F/F = 100\% * (F(t) - F_0(t))/F_0(t)$). $F_0(t)$ определялась как плавная огибающая локальных минимумов исходного сигнала флуоресценции, обработанного медианным фильтром с шириной окна 5 точек. Получаемая смещенная оценка уровня $F_0(t)$ корректировалась так, чтобы мода распределения отклонений флуоресценции от фонового значения была равна нулю. В областях, где средние значения $F_0(t)$ были слишком низкими, оценка относительных изменений флуоресценции не проводилась, они считались равными нулю. После разделения исходного сигнала на фоновую флуоресценцию (F) и значимые отклонения (ΔF) производили нормализацию и представляли Ca^{2+} сигналы в виде относительного изменения интенсивности флуоресценции $\Delta F/F$ (%).

Для интерпретации наблюдаемой активности производили 3D-реконструкцию флуктуаций нормализованного Ca^{2+} сигнала в пространстве и времени, представляя изменения флуоресценции в виде трёхмерных массивов (x - y -время, Рис. 17А). Непрерывные пространственно-временные области, в которых $\Delta F/F$ превышает заданный порог (15%), мы

назвали Ca^{2+} событиями. То есть Ca^{2+} событие – это непрерывная ограниченная во времени и пространстве область повышения уровня Ca^{2+} . Событие характеризуется набором пространственно-временных параметров и представлено в каждом кадре двухмерными сечениями – сегментами Ca^{2+} событий (Ca^{2+} сегментами, Рис. 17Б). Если в предыдущем кадре в данной области пространства не наблюдается Ca^{2+} активности, то такой сегмент считается начальным Ca^{2+} сегментом, если активность отсутствует в последующем кадре – конечным Ca^{2+} сегментом (Рис. 17В).

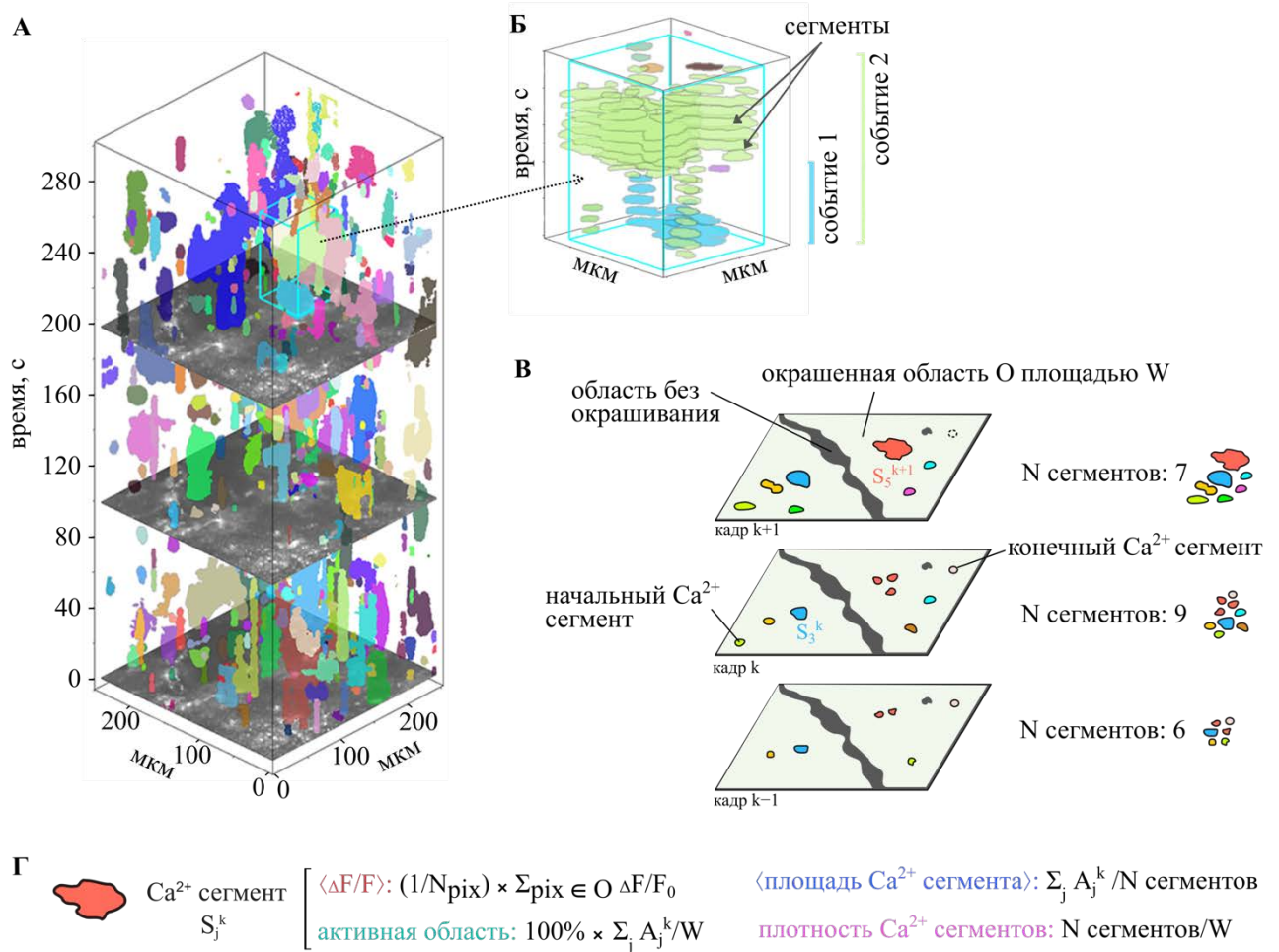


Рисунок 17. Основные параметры Ca^{2+} активности. А – Пример 3D-реконструкции (x-y-время) Ca^{2+} сигнала в популяции астроцитов коры головного мозга. Показан участок мозга (оси x-y, нижняя плоскость, GCaMP6f-экспрессирующие астроциты показаны белым) и реконструировано относительное изменение флуоресцентного сигнала $\Delta F/F$ (%) в этой области с течением времени (ось z). Отдельные области пространства, в которых $\Delta F/F$ превышает порог 15% (Ca^{2+} события) окрашены цветами. Б – Участок 3D-реконструкции: каждое Ca^{2+} событие состоит из отдельных Ca^{2+} сегментов, наблюдаемых в пределах кадра. В – Схема, объясняющая развитие Ca^{2+} события во времени. Г – Формулы для расчета основных параметров Ca^{2+} активности.

Относительное изменение флуоресцентного сигнала $\Delta F/F$ (%) представляет собой интегральную характеристику Ca^{2+} активности. Чтобы понять, чем определяются флуктуации этого показателя, мы провели более детальный анализ и охарактеризовали Ca^{2+} активность с помощью следующих пространственно-временных параметров (Рис. 17В, Г):

- 1) Активная область (%) – общая площадь Ca^{2+} сегментов, разделенная на площадь окрашенной области.
- 2) Средняя площадь Ca^{2+} сегмента (мкм^2) – общая площадь Ca^{2+} сегментов, разделенная на их количество.
- 3) Плотность Ca^{2+} сегментов (сегментов/ мм^2) – количество Ca^{2+} сегментов, разделенное на площадь окрашенной области.

На основании значений скорости перемещения животного во время имиджинговых сессий все данные были разделены на две группы: покой и локомоция. Локомоцией считали эпизоды, в которых скорость движения мыши превышала порог 0.5 см/с на протяжении не менее 3 секунд, остальные эпизоды относили к состоянию покоя.

2.8.2 Обработка фотометрического сигнала

Для обработки фотометрического сигнала использовали язык программирования Python с использованием библиотек `scipy` и `scikit-image`. Вначале проводилось выделение областей интереса, соответствующих пучкам света, собираемых оптоволоконками. Для этого изображение регистрирующей камеры обрабатывалось детектором границ Кенни (Canny filter), после чего к найденным границам применялась операция бинарного заполнения пустых областей в замкнутых контурах (`binary fill holes`), что давало финальную маску для области интереса. Затем флуоресцентный сигнал усредняли в пределах области интереса, что давало временную реализацию Ca^{2+} активности, и проводили нормирование сигнала на медленно меняющуюся компоненту фонового уровня флуоресценции F_0 . F_0 определялась как плавная огибающая локальных минимумов исходного сигнала флуоресценции, обработанного медианным фильтром с шириной окна 100 точек. Получаемая смещенная оценка уровня F_0 корректировалась так, чтобы мода распределения отклонений флуоресценции от фонового значения была равна нулю. Дальнейший анализ производился с использованием относительных изменений интенсивности флуоресценции $\Delta F/F$ (%) = $100\% * (F - F_0) / F_0$.

2.8.3 Обработка видеозаписей поведения

Все видеозаписи поведения были проанализированы с помощью протокола, созданного на языке визуального программирования Bonsai (Open-source software, bonsai-rx.org). Протокол состоял из двух частей (Рис. 18), одна из которых анализировала положение животного по его

центру масс (центроиду), другая – время, проведенное в области интереса (центр и периферия арены в тесте «открытое поле», разные отсеки арены в тесте на социальное поведение).

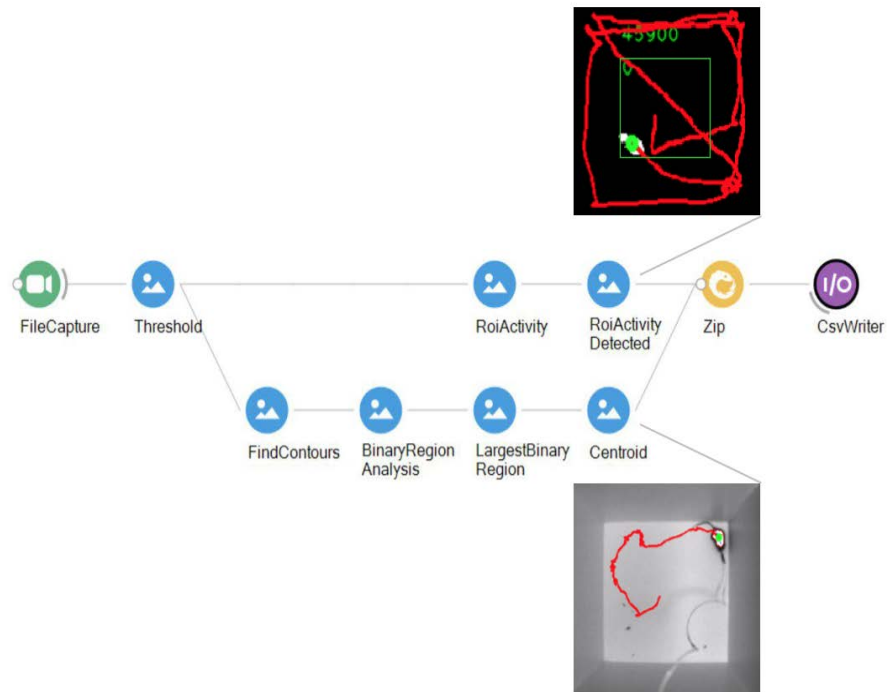


Рисунок 18. Пример схемы автоматической обработки поведения на языке визуального программирования Bonsai. Схема включает два направления: автоматическое определение нахождения животного в области интереса (сверху) и расчет траектории передвижения животного (снизу) на основе функций библиотеки компьютерного зрения OpenCV.

В программе Bonsai реализована стандартная библиотека Python – OpenCV (computer vision), функции которой позволяют обработать поток видеоданных с помощью алгоритмов компьютерного зрения. Условия видеорегистрации были подобраны таким образом, чтобы запись черной мыши происходила на контрастном белом фоне. Поток видеоданных был бинаризован, черные пиксели инвертированы в белые с помощью преобразования *inverted binary threshold*, затем устанавливался определенный порог, оптимальным образом подобранный по размеру и интенсивности белых пикселей, соответствующих детектируемому животному. Далее происходил поиск и анализ наибольшей бинарной области, который завершался функцией *centroid*, соответствующей положению животного в координатах x и y . С помощью уже установленного порога происходил анализ нахождения животного в выделенных областях арены за счет функций *ROI* (region of interest) и *ROI activity detected*, покадрово определялось время нахождения мыши в областях интереса. Результаты автоматического анализа поведения были записаны в отдельные файлы в формате *.csv* и далее были сопоставлены с данными астроцитарной Ca^{2+} активности.

2.8.4 Обработка спектров КР

Анализ спектров КР проводили с помощью специально разработанных скриптов на языке программирования Python. Для спектров КР, полученных для кровеносных сосудов, проводилась автоматическая коррекция базовой линии путём аппроксимации базовой линии прямой линией в областях интереса. Степень оксигенации крови (sO_2), отражающую насыщение гемоглобина кислородом, рассчитывали по формуле:

$$sO_2 = \frac{I_{1585} * 1.44}{I_{1547} + I_{1585} * 1.44} * 100 \%$$

где $I_{1585} \text{ см}^{-1}$ – колебания связей CaCm-метиновых мостиков в геме оксигемоглобина (оГб), $I_{1547} \text{ см}^{-1}$ – колебания связей CaCm-метиновых мостиков в геме дезоксигемоглобина (дГб), 1.44 – поправочный коэффициент, введенный при проведении калибровочных экспериментов, учитывающий более высокую рамановскую активность дезоксигемоглобина по сравнению с оксигемоглобином при лазерном возбуждении 532 нм.

Диаметр кровеносного сосуда оценивали путем расчета среднеквадратичного значения интенсивности рамановского сигнала в спектральной области 1500-1660 см^{-1} , содержащей рамановские пики, связанные с различными колебаниями метиновых мостиков в молекулах оГб и дГб. Областью сосуда считали те участки, в которых интенсивность рамановского сигнала в указанной области превышала не менее, чем в два раза, интенсивность сигнала на краях профиля, не содержащего сосуда.

Изменение относительного количества восстановленных цитохромов В- и С-типа оценивали путем анализа соотношения интенсивностей пиков I_{750}/I_{1440} , где пик с положением максимума 750 см^{-1} соответствует колебаниям связей гема в восстановленных цитохромах С и В-типа (большой вклад от цитохрома С), пик с положением максимумов 1440 см^{-1} – колебания связей С-С в липидах.

2.8.5 Статистический анализ полученных данных

Статистический анализ проводили с использованием программных модулей и электронных рабочих тетрадей на языке программирования Python. Соответствие распределения значений нормальному проверяли при помощи теста Колмогорова-Смирнова. Сравнение параметров при наличии двух независимых групп проводили с использованием критерия Манна-Уитни и модели со смешанными эффектами. При сравнении двух зависимых выборок использовали непараметрический критерий Вилкоксона. Различия считали статистически значимыми при уровне $p < 0.05$. NS – not significant: различия, не обладающие статистической значимостью. Данные представлены в тексте в виде: медиана [квартиль 25%-квартиль 75%]), соответствующие рисунки – ящики с усами 5-95%, с медианой и квартилями 25% и 75%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Популяционный Ca^{2+} ответ астроцитов соматосенсорной коры мышей на локомоцию

Для исследования Ca^{2+} активности в астроцитах мы выполнили Ca^{2+} имиджинг соматосенсорной коры неанестезированных животных, поскольку известно, что общие анестетики подавляют астроцитарную Ca^{2+} сигнализацию [65]. Для этого в область соматосенсорной коры, содержащую афферентные проекции левой передней конечности, вводили AAV9-gfaABC1D-cyto-GCaMP6f для экспрессии GCaMP6f под специфичным астроцитарным промотором и выполняли операцию по имплантации хронического краниального окна над местом инъекции. По истечении 4-6 недель после восстановления мышей ($N = 9$), хендлинга и приучения к экспериментальной установке («Граммфон») проводили эксперименты по визуализации Ca^{2+} в цитоплазме астроцитов. Каждая экспериментальная запись длительностью 10 минут состояла из мгновенных снимков коры головного мозга (частота регистрации 30 кадров в секунду) размером 550×550 мкм². При связывании с ионами Ca^{2+} интенсивность флуоресценции GCaMP6f возрастает. Примеры снимков соматосенсорной коры приведены на Рис. 19.

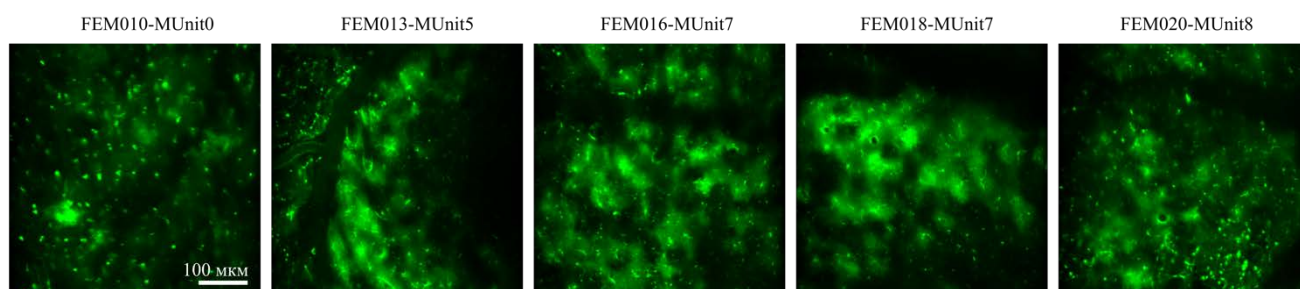


Рисунок 19. Примеры кадров, отражающих средний уровень сигнала флуоресценции. Показаны отдельные снимки соматосенсорной коры из нескольких экспериментальных записей, зеленые клетки – астроциты, экспрессирующие GCaMP6f в цитоплазме. Для возбуждения флуоресценции в двухфотонном режиме использовалась длина волны $\lambda_{\text{ex}} = 920$ нм. Шкала – 100 мкм.

В интактной коре головного мозга клетки организованы в слои с характерной citoархитектурой, причем в верхнем (L1) слое соматосенсорной коры преобладают сомы астроцитов [144]. В верхнем слое соматосенсорной коры, откуда производилась регистрация сигнала, мы наблюдали также развитую сосудистую сеть (Рис. 19, 20). Если сосуд расположен перпендикулярно плоскости, из которой происходит регистрация флуоресцентного сигнала, то край сосуда можно определить по тонким участкам флуоресценции, представляющим собой астроцитарные концевые ножки (end-feet, Рис. 20, показано треугольником), обхватывающие сосуды (темные трубковидные участки кадра) и составляющие вместе с ними глиоваскулярную

единицу. Известно, что почти все сосуды мозга (до 99%) покрыты астроцитарными отростками (ножками), участвующими в поддержании функций ГЭБ [40].

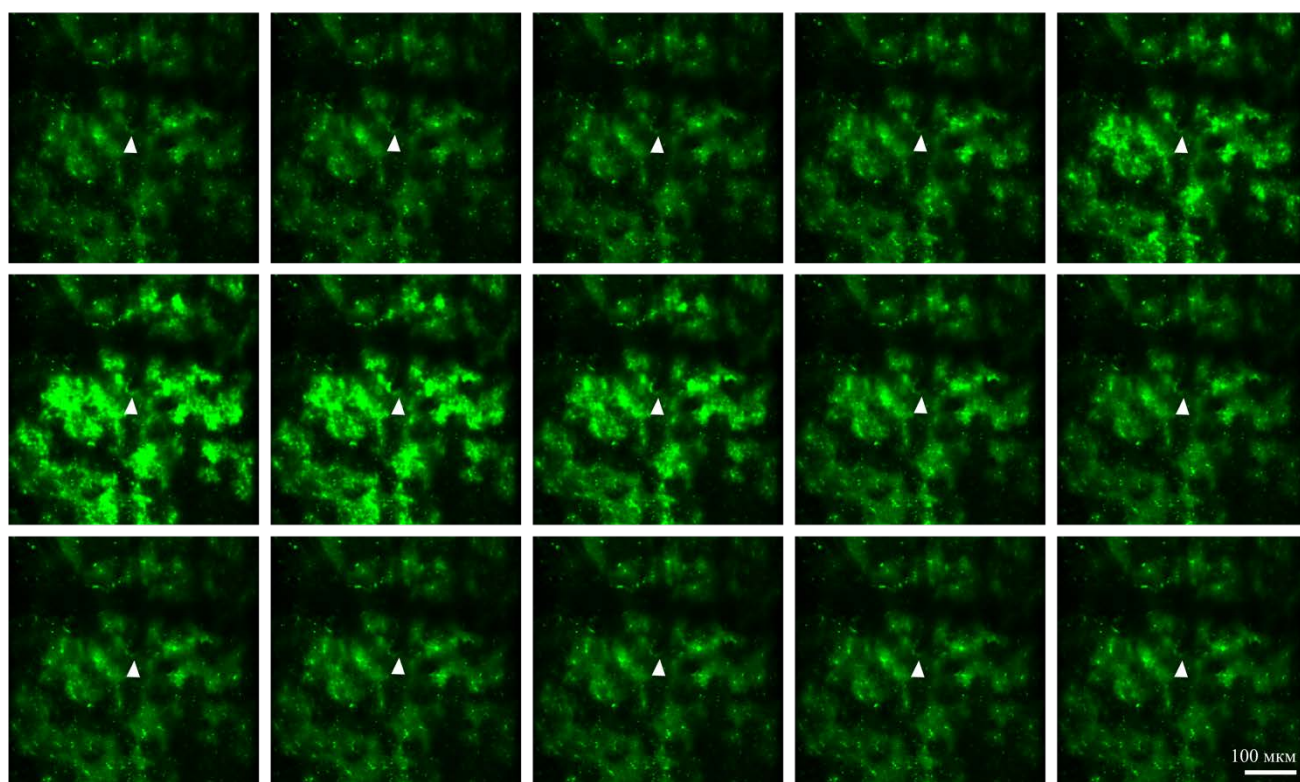


Рисунок 20. Участок записи Ca^{2+} сигнала в астроцитах первичной соматосенсорной коры головного мозга бодрствующих мышей. Показаны отдельные снимки мозга для 15 последовательных кадров, зеленые клетки – астроциты, экспрессирующие GCaMP6f в цитоплазме, треугольником отмечены отростки астроцитов (концевые ножки), оборачивающие сосуды (темные трубковидные участки). Для возбуждения флуоресценции в двухфотонном режиме использовалась длина волны $\lambda_{\text{ex}} = 920$ нм. Шкала – 100 мкм.

Каждая экспериментальная запись содержала периоды покоя, когда животное не выполняло активных действий и сидело на месте, и периоды произвольной локомоции, когда животное перемещалось, при помощи лап приводя в движение платформу, расположенную под ним. Ca^{2+} имиджинг сопровождался видеорегистрацией поведения мыши и отслеживанием скорости животного. Такой подход позволил нам оценить пространственно-временные паттерны Ca^{2+} активности в астроцитах соматосенсорной коры бодрствующих мышей и выявить закономерности изменения этих показателей до, во время и после локомоции.

3.1.1 Пространственно-временные характеристики популяционного Ca^{2+} ответа

Чтобы исследовать, как астроцитарная Ca^{2+} активность разворачивается во времени и пространстве и соотносится с двигательной активностью животного, мы произвели 3D-

реконструкцию (x-y-время) значений $\Delta F/F$ (%) (Рис. 21). Соотношение $\Delta F/F$ (%) отражает уровень Ca^{2+} активности в астроцитах, где F – это базовый уровень флуоресценции, ΔF – изменение сигнала флуоресценции.

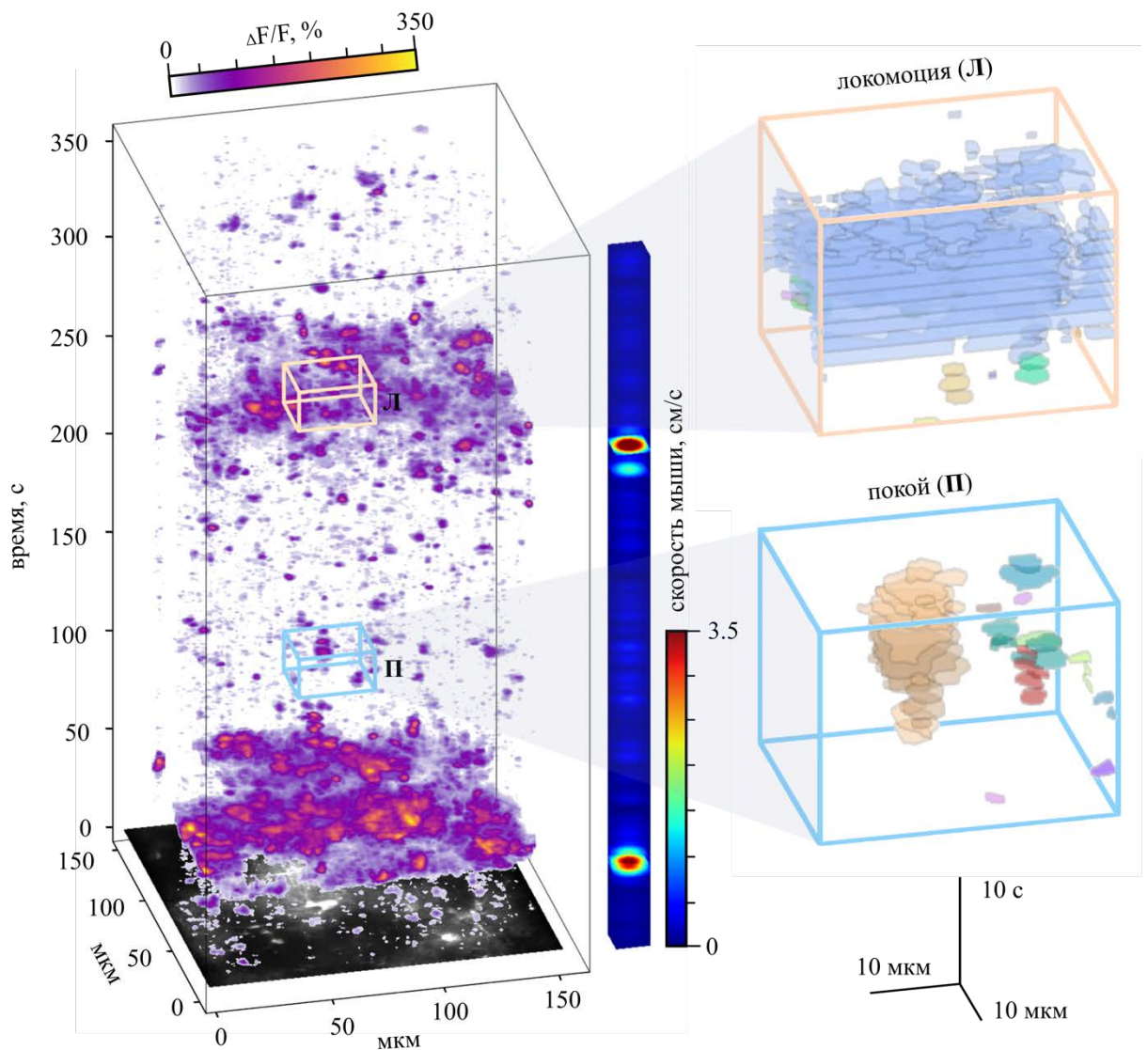


Рисунок 21. 3D-реконструкция (x-y-время) Ca^{2+} активности в астроцитах первичной соматосенсорной коры мыши. Показан участок соматосенсорной коры (оси x-y, нижняя плоскость, астроциты, экспрессирующие GCaMP6f в цитоплазме, показаны белым). Реконструировано относительное изменение интенсивности флуоресценции $\Delta F/F$ (%) в этой области с течением времени (ось z). Значения $\Delta F/F$ закодированы цветом, более яркие (оранжевые и желтые) области пространства соответствуют наибольшему уровню сигнала. Справа в виде цветовой шкалы показано изменение скорости животного, красные участки соответствуют эпизодам двигательной активности (локомоции), синие – периодам покоя.

Такая визуализация представляет собой историю развития Ca^{2+} сигнала, представленного широким репертуаром Ca^{2+} событий разной величины и длительности. Ca^{2+} событие

представляет собой непрерывную ограниченную во времени и пространстве область повышения уровня Ca^{2+} . В данной работе мы анализировали сегменты Ca^{2+} событий (Ca^{2+} сегменты), то есть связанные пиксели в пределах кадра, в которых значение $\Delta F/F$ превышало заданный порог 15%. Таким образом, Ca^{2+} сегменты являются двухмерным сечением Ca^{2+} события в пределах кадра. Для Ca^{2+} активности были проанализированы следующие основные параметры: изменение интенсивности флуоресцентного сигнала $\Delta F/F$ (%), активная область (%), средняя площадь Ca^{2+} сегмента (мкм^2) и плотность Ca^{2+} сегментов (сегментов/ мм^2), охарактеризованные в методическом разделе (п. 2.8.1).

Эпизоды локомоции животных чередовались с периодами покоя (Рис. 21). В периоды покоя (когда скорость мыши не превышала 0.5 см/с, синие участки столбика скорости) в соматосенсорной коре наблюдалась рассеянная локализованная астроцитарная Ca^{2+} активность, проявлявшаяся на субклеточном уровне в виде небольших, разрозненных событий (мелкие фиолетовые области пространства), что может быть определено как спонтанная Ca^{2+} сигнализация в астроцитах [5]. Эпизод двигательной активности животного сопровождался значительным увеличением интенсивности флуоресцентного сигнала $\Delta F/F$, отражающим массовую активацию всех астроцитов в поле зрения. В данном примере (Рис. 21) можно выделить два локомоторных эпизода, характеризующихся повышением скорости мыши (красные участки на столбике скорости) и сопровождающихся увеличением $\Delta F/F$ (ярко-розовые, оранжевые и желтые области пространства). Видно, что объем и длительность Ca^{2+} событий при локомоции увеличены по сравнению с покоем (Рис. 21). Вероятно, увеличение размеров Ca^{2+} сегментов во время локомоции связано с высвобождением Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} депо – ЭПР и митохондрий – основному механизму амплификации Ca^{2+} активности в астроците [33]. Примечательно, что сильная активация астроцитов, вызванная локомоцией, сохранялась в течение нескольких секунд после окончания бега.

Пример временной динамики основных параметров Ca^{2+} активности в астроцитах представлен на Рис. 22. Обычно в течение 10-минутной сессии мы наблюдали несколько эпизодов локомоторной активности животного, определенные как участки записи, в которых скорость мыши превышала порог 0.5 см/с в течение не менее 3 секунд (Рис. 22А). Если между соседними локомоторными эпизодами проходило менее 3 секунд, такие эпизоды объединяли в один.

В совокупности, в покое Ca^{2+} активность занимала лишь небольшую площадь кадра (средняя активная область: 0.23 [0.09-0.39] % кадра; $n = 24$ записи) и имела низкую интенсивность флуоресценции ($\langle \Delta F/F \rangle$: 0.70 [0.58-0.96] %; $n = 24$ записи, Рис. 23). Средняя площадь Ca^{2+} сегментов и их плотность также были низкими (средняя площадь Ca^{2+} сегмента: 60.3 [49.2-74.2] мкм^2 ; плотность Ca^{2+} сегментов: 31.22 [12.60-54.86], сегментов/ мм^2 ; $n = 24$ записи, Рис. 23).

Мы наблюдали увеличение всех параметров Ca^{2+} активности в астроцитах во время локомоции по сравнению с покоем (Рис. 22, Рис. 23). Для всех эпизодов локомоции параметры Ca^{2+} активности были достоверно выше ($\langle \Delta F/F \rangle$: 15.74 [6.22-32.46] %, активная область: 21.06 [7.57-38.28] %, средняя площадь Ca^{2+} сегмента: 2485.3 [963.6-6579.3] μm^2 , средняя плотность Ca^{2+} сегментов: 125.65 [86.10-165.60] сегментов/ mm^2 ; $n = 24$; $p < 0.001$, модель со смешанными эффектами, Рис. 23).

Хотя в покое флуктуации Ca^{2+} сигнала были небольшими, такой параметр, как плотность Ca^{2+} сегментов, менялся значительно сильнее и в покое, и при беге (Рис. 22), указывая на то, что мелкие Ca^{2+} сегменты наблюдаются в течение всей записи, причем с началом эпизода локомоции их количество возрастает.

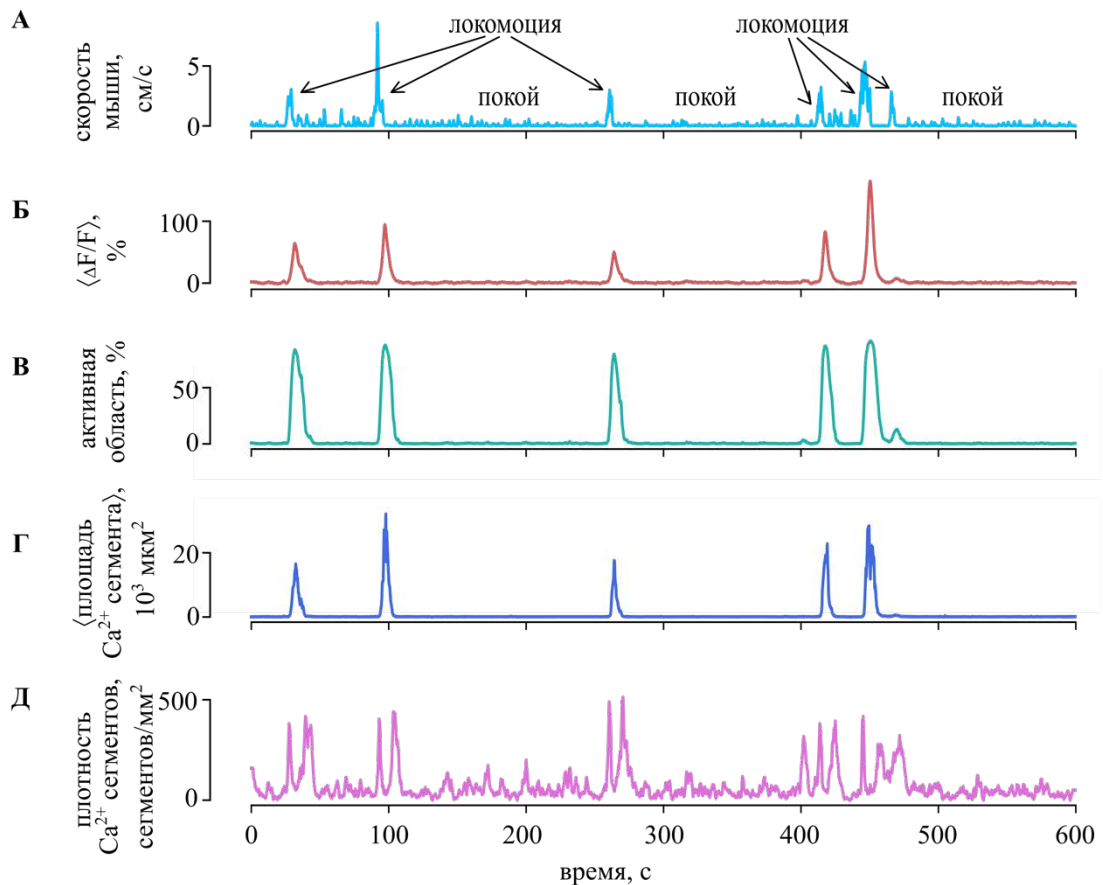


Рисунок 22. Временная динамика основных параметров Ca^{2+} активности в популяции астроцитов первичной соматосенсорной коры мышей в покое и при локомоции. Скорость мыши (см/с), на основании которой производилось деление на локомоцию и покой, представлена на А.

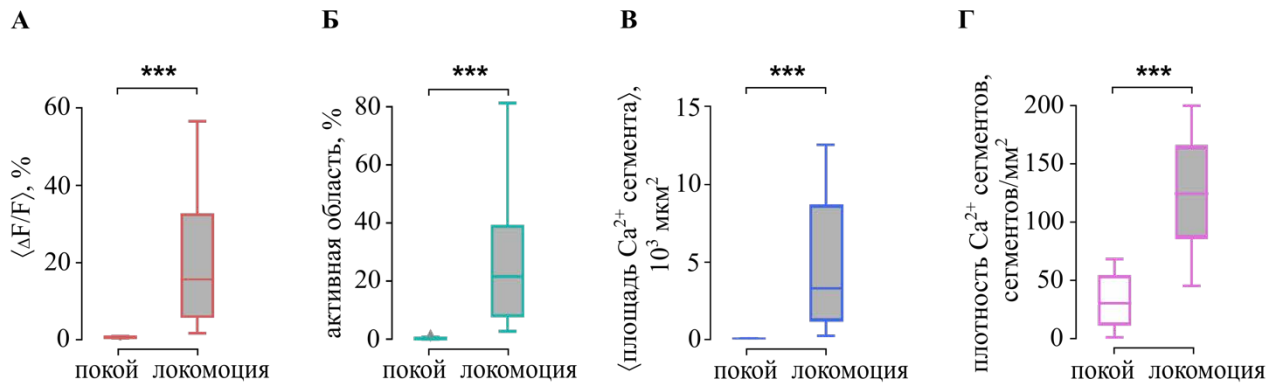


Рисунок 23. Сводные данные о параметрах популяционной астроцитарной Ca^{2+} активности в первичной соматосенсорной коре мыши в покое и при локомоции. Данные представлены в виде ящиков с усами 5-95%, с медианой и квартилями 25% и 75%, *** – $p < 0.001$, модель со смешанными эффектами, $n = 24$ записи.

Такая генерализованная активация астроцитов во время локомоции согласуется с литературными данными [18–20]. Механизм, лежащий в основе этого ассоциированного с двигательной активностью повышения уровня $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в астроцитах связывают с активацией, вызванной высвобождением нейромедиаторов. Накоплены экспериментальные доказательства того, что локомоция вызывает высвобождение нейромодуляторов ацетилхолина и НА [21,145,146]. НА-ергические нейроны голубого ядра (*locus coeruleus*), расположенного в стволе мозга, распространяют аксонные коллатерали диффузно по всему мозгу. Показано, что НА модулирует Ca^{2+} сигнал в астроцитах при движении в различных областях мозга, например, в зрительной коре и мозжечке, и модуляция опосредована $\alpha 1$ -адренорецепторами [21,105,147,148]. Сообщается также, что повышение астроцитарной Ca^{2+} активности может возникать вследствие механической стимуляции при изменении диаметра кровеносных сосудов [149] и в ответ на функциональную гиперемия при локомоции [20]. Таким образом, увеличение зарегистрированной нами астроцитарной Ca^{2+} активности при локомоции может быть обусловлено как влиянием активности локальной нейронной сети (нейроны, обрабатывающие сенсорную информацию от конечности), так и влиянием нейромодуляторных проекций, а также контактирующих с астроцитами сосудов.

В отдельной серии экспериментов мы проверили, меняются ли пространственно-временные характеристики астроцитарной Ca^{2+} активности в первичной соматосенсорной коре мышей ($N = 2$) в зависимости от местоположения животного в пространстве. Для этого применялась установка «левитирующая платформа», позволяющая животным перемещаться в любом направлении в пределах плоскости платформы, приводя ее в движение лапами. Визуализация динамики Ca^{2+} в астроцитах была совмещена с трэкингом перемещения мыши

(Рис. 24А). Во время эксперимента мыши перемещались по всей территории. Невысокая скорость перемещения у стенок платформы указывает на преобладание в этих участках арены периодов покоя, в то время как основные локомоторные эпизоды совершались в ее центре. Астроцитарная Ca^{2+} активность следовала за локомоцией, однако связи с местоположением животного в пространстве выявлено не было.

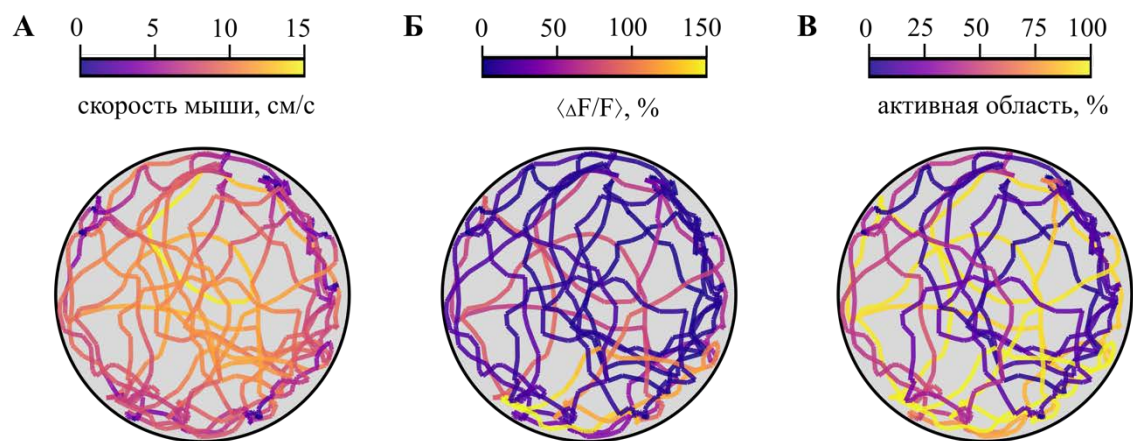


Рисунок 24. Пример трека перемещения мыши по «левитирующей платформе» с наложенными на него показателями Ca^{2+} активности в астроцитах. Трек записан в течение 600 с, цветом закодированы: А – Скорость мыши. Б – Среднее изменение интенсивности флуоресценции $\Delta F/F$. В – активная область.

Отсутствие кодирования пространства астроцитами в данном случае можно объяснить тем, что активация соматосенсорной коры, из которой регистрировали Ca^{2+} сигнал, связана с обработкой сенсорной информации от поверхности передней лапы нейронами. Можно предположить, что кодирование пространства может отражаться в Ca^{2+} активности астроцитов структур мозга, отвечающих за навигацию в пространстве, в частности, гиппокампа. Так, известно, что «клетки места» (place cells) гиппокампа проявляют специфическую для данного места пространства нейронную активность и кодируют пространственную информацию. Действительно, в недавнем исследовании с использованием виртуальной реальности было показано, что астроциты гиппокампа участвуют в кодировании дополнительной пространственной информации, что позволяет предположить существование глиальных клеток места [100]. В другой работе было обнаружено, что астроциты проявляют постоянную активность при движении мышей в направлении места получения вознаграждения в знакомой среде. Это может указывать на участие астроцитов в кодировании местоположения в пространственных контекстах, зависящих от памяти [99].

Таким образом, мы наблюдали значительные различия в популяционной астроцитарной Ca^{2+} активности в соматосенсорной коре при локомоции и в покое. Параметры Ca^{2+} активности

($\Delta F/F$, активная область, средняя площадь Ca^{2+} сегмента и плотность Ca^{2+} сегментов) в кортикальных астроцитах достоверно возрастали во время локомоции по сравнению с покоем без очевидной связи с местоположением животного в пространстве.

Для исследования динамики изменения определенных нами параметров астроцитарной Ca^{2+} активности во время движения, мы выделили эпизоды локомоции и проанализировали их отдельно. Из всех записей Ca^{2+} активности (26 записей) было выделено 146 эпизодов локомоции.

Основные характеристики эпизодов локомоции представлены на Рис. 25. В среднем на запись длительностью 10 минут приходилось 5.6 ± 1.3 локомоторных эпизода продолжительностью 6.79 [3.31-14.78] с. Средняя скорость мышей во время произвольной локомоции составила 1.76 [0.80-2.83] см/с, максимальная – 3.97 [1.45-6.90] см/с, что характеризует локомоцию как ходьбу и медленный бег. Максимальная скорость передвижения мышей в наших экспериментах достигала значения 17 см/с, в то время как в поведенческих тестах без фиксации головы, например, в открытом поле, мыши развивают значительно более высокую скорость [150]. Это указывает на некоторые ограничения методов имиджинга с использованием краниального окна, выражающиеся в невозможности исследования свободного поведения без фиксации головы. Тем не менее приучение животных к экспериментальной установке, хендлинг и тренировочные сессии позволяют свести к минимуму стресс, вызываемый экспериментом, и получить качественные данные.

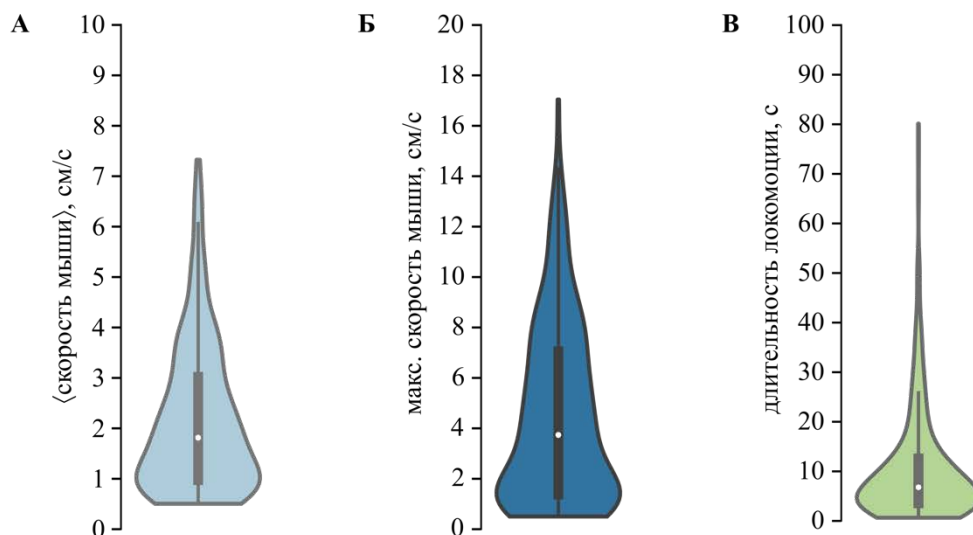


Рисунок 25. Основные параметры эпизодов локомоции. Точкой обозначена медиана, границы прямоугольника – квантили 25-75%, $n = 146$ эпизодов локомоции.

3D-реконструкция (x-y-время) значений $\Delta F/F$ (%) для одного эпизода локомоции приведена на Рис. 26, динамика изменения пространственно-временных параметров популяционной Ca^{2+} активности в пределах одного двигательного эпизода – на Рис. 27.

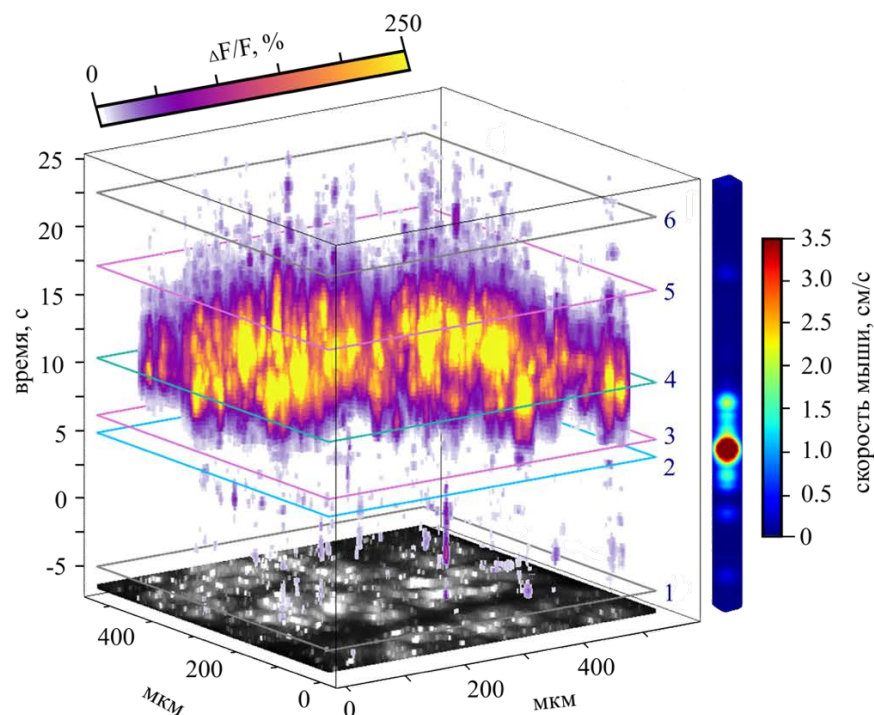


Рисунок 26. 3D-реконструкция (x-y-время) Ca^{2+} активности в астроцитах первичной соматосенсорной коры мыши во время одиночного эпизода локомоции. Показан участок соматосенсорной коры (оси x-y, нижняя плоскость, астроциты, экспрессирующие GCaMP6f в цитоплазме, показаны белым). Реконструировано относительное изменение флуоресцентного сигнала $\Delta F/F$ (%) в этой области с течением времени (ось z). Цифрами обозначены моменты времени, для которых представлены кадры с пространственным распределением астроцитарной Ca^{2+} активности на Рис. 27Е.

С небольшой задержкой после начала локомоции, когда скорость мыши достигала максимального значения (Рис. 27А), начинался рост таких параметров, как $\Delta F/F$ (Рис. 27Б), активная область (Рис. 27В) и средняя площадь Ca^{2+} сегмента (Рис. 27Г). Динамика изменения плотности Ca^{2+} сегментов отличалась: она начинала возрастать вместе с увеличением скорости мыши и имела двухфазный характер, не продемонстрированный ранее в литературе (Рис. 27Д). Чтобы выяснить, с чем связаны пики на кривой плотности Ca^{2+} сегментов, мы рассчитали два дополнительных параметра: плотность начальных Ca^{2+} сегментов и плотность конечных Ca^{2+} сегментов (Рис. 28Е). Начальными считали первые сегменты Ca^{2+} событий, то есть если в предыдущем кадре Ca^{2+} активность на месте этого сегмента отсутствовала, а конечными – последние сегменты событий, когда в последующем кадре в области, соответствующей данному сегменту, не было Ca^{2+} активности. Оказалось, что пики на кривых изменения плотности

начальных и конечных Ca^{2+} сегментов (Рис. 28Е) совпадали с первым и вторым пиками кривой плотности Ca^{2+} сегментов соответственно (Рис. 28Д).

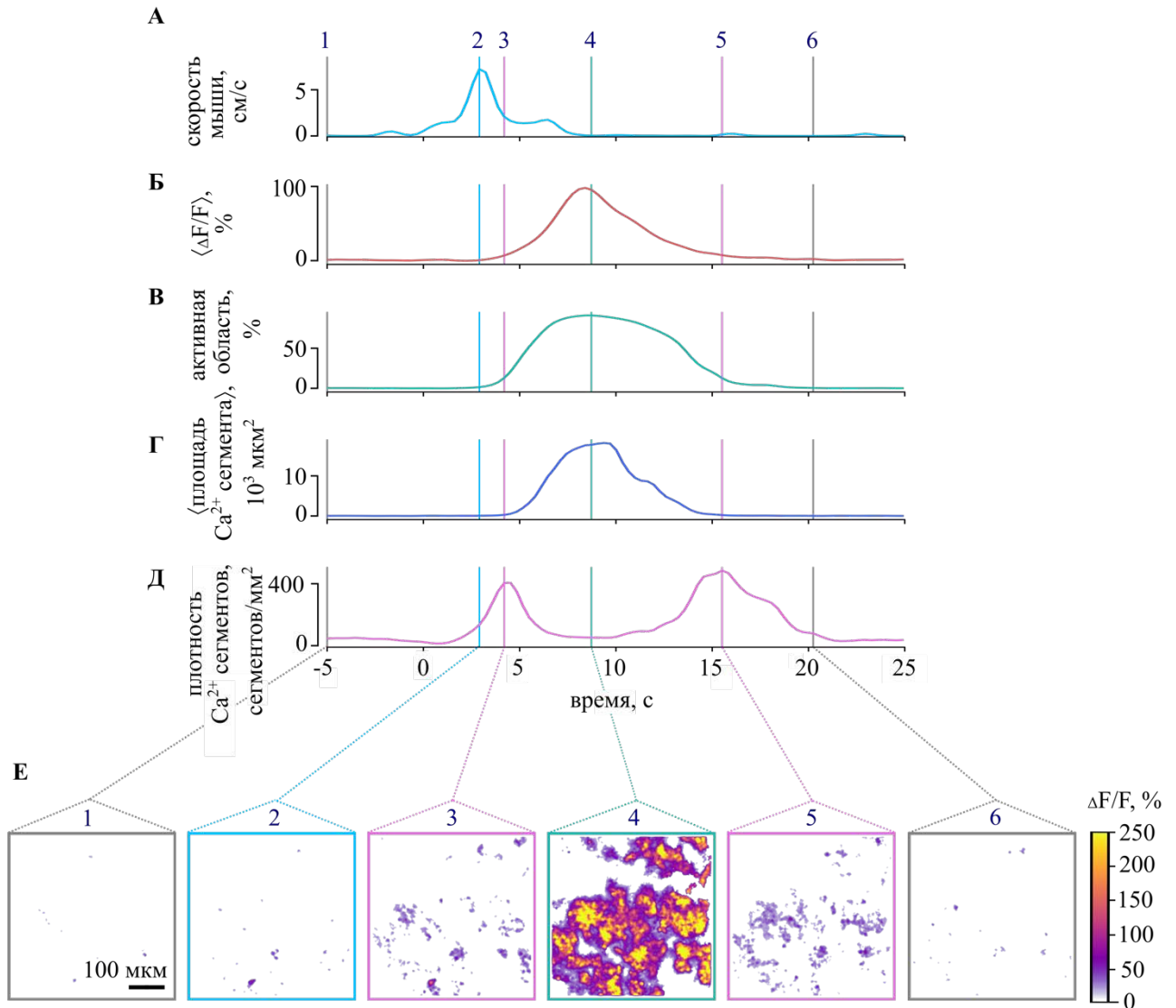


Рисунок 27. Временная динамика основных параметров Ca^{2+} активности в популяции астроцитов первичной соматосенсорной коры мыши при локомоции. Показан один локомоторный эпизод. На Е приведено пространственное распределение Ca^{2+} активности ($\Delta F/F$) для моментов времени, соответствующих следующим временным точкам: 1 – произвольный момент времени до начала локомоции, 2 – пик скорости мыши, 3 – первый пик плотности Ca^{2+} сегментов, 4 – пик активной области, 5 – второй пик плотности Ca^{2+} сегментов, 6 – произвольный момент времени после окончания локомоции (также обозначены цифрами на Рис. 26).

Таким образом, двухкомпонентность изменения кривой плотности сегментов во время локомоции (Рис. 27Д) можно объяснить следующим образом: сначала параметр возрастал из-за возникновения множества маленьких сегментов Ca^{2+} активности (Рис. 27Е-3), а затем уменьшался, поскольку происходило слияние этих сегментов в более крупные, занимающие область всего кадра (Рис. 27В, Е-4). После завершения локомоторного эпизода плотность Ca^{2+}

сегментов снова увеличивалась, поскольку Ca^{2+} активность распадалась на множество мелких сегментов (Рис. 27Е-5).

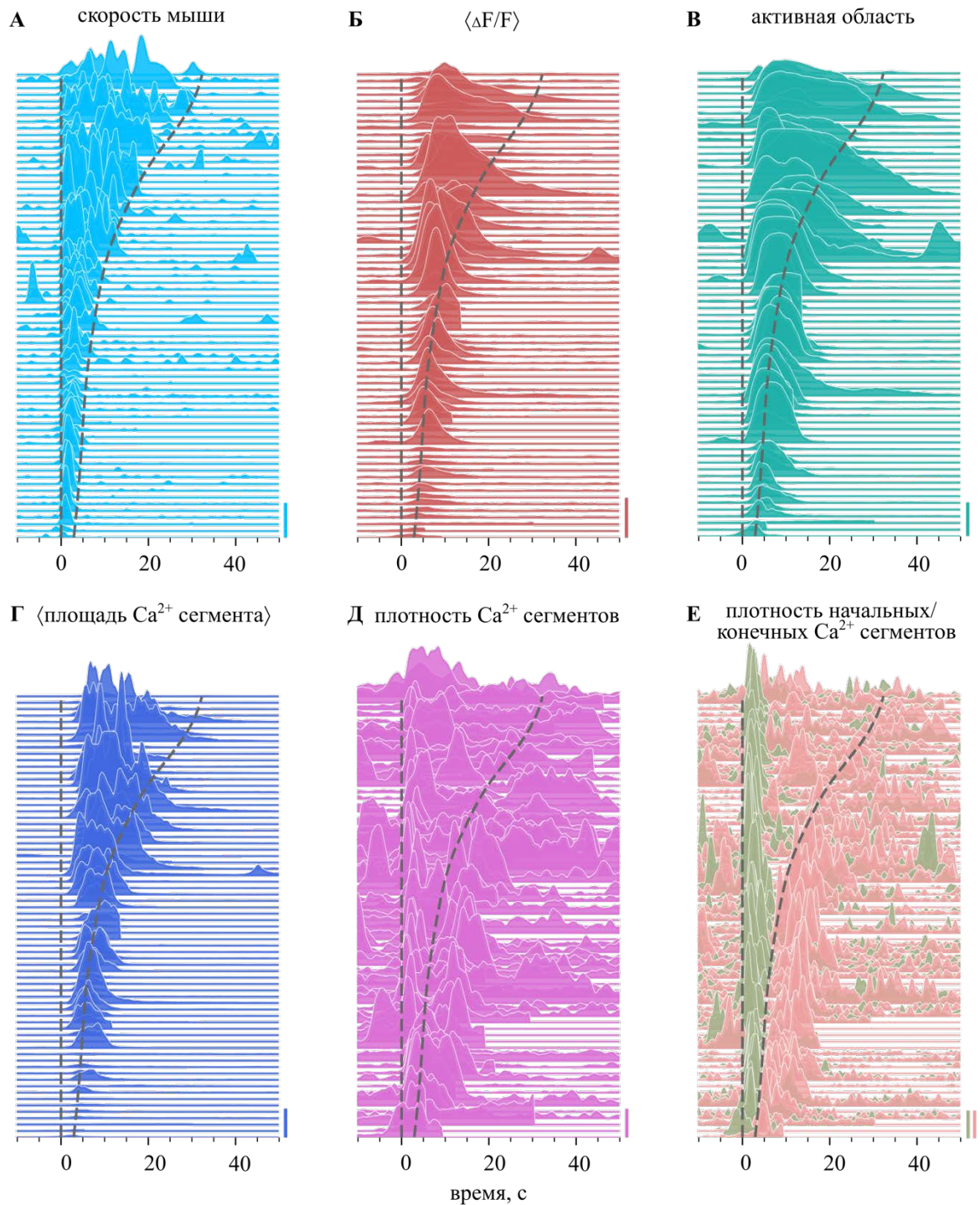


Рисунок 28. Сводные графики временной динамики основных параметров Ca^{2+} активности в популяции астроцитов соматосенсорной коры мышей при локомоции. Каждая кривая соответствует одному эпизоду локомоции. Пунктирные линии обозначают начало и окончание локомоторного эпизода. Шкала: А – 5 см/с, Б – 100 %, В – 50 %, Г – 15000 мкм², Д – 200 сегментов/мм², Е – 150 сегментов/мм².

Завершение двигательного эпизода сопровождалось затуханием Ca^{2+} ответа, причем ответы значительно превосходили локомоторные эпизоды по длительности (Рис. 28). Возможно, причина в том, что Ca^{2+} активность в астроцитах *in vivo* определяется входами от многих элементов активной среды мозга (локальная нейронная сеть, нейромодуляторные проекции, кровеносные сосуды и т.д.), которые модулируют продолжительность астроцитарных Ca^{2+} событий [5].

Хотя скорость и продолжительность локомоции варьировались, динамика параметров Ca^{2+} сигнала имела репрезентативный характер для разных локомоторных эпизодов (Рис. 28). Корреляционный анализ показал, что время до пика плотности начальных Ca^{2+} сегментов не коррелирует с продолжительностью локомоции ($r^2 = 0.01$; линейная регрессия, $p = 0.46$, $n = 55$ эпизодов локомоции, Рис. 29А). Считается, что триггером для инициации Ca^{2+} ответа служит выделение нейромодуляторов при локомоции, в частности, НА [21,145]. НА воздействует на GPCR, расположенные на мембране астроцита, что приводит к увеличению количества IP_3 . IP_3 , связываясь с IP_3R на мембране ЭПР, вызывает выход Ca^{2+} из ЭПР в цитоплазму, что приводит к увеличению $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Таким образом, параметр времени до пика плотности начальных Ca^{2+} сегментов может отражать мобилизацию IP_3R , расположенных на мембране ЭПР [151].

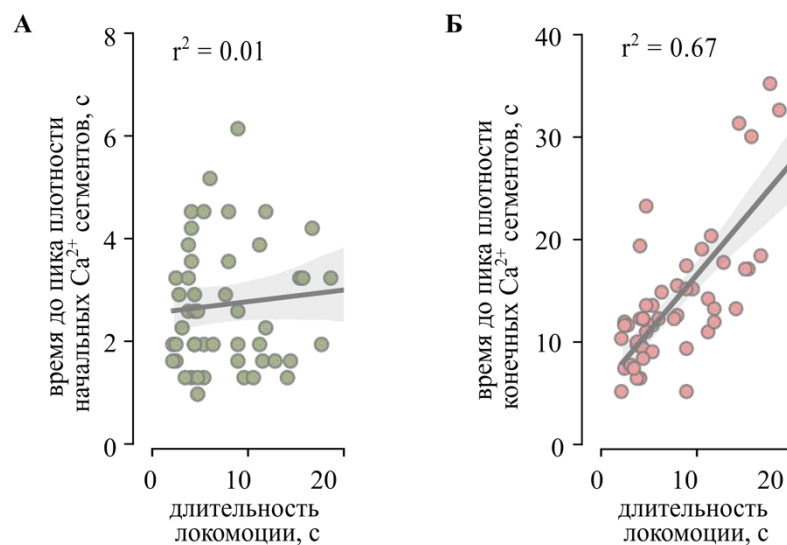


Рисунок 29. Взаимосвязь между временем до пика плотности начальных (А) и конечных (Б) Ca^{2+} сегментов и длительностью эпизода локомоции. Представлены результаты регрессионного анализа, $p = 0.46$ (А) и $p < 0.001$ (Б), линейная регрессия, $n = 55$ эпизодов локомоции (круги).

Анализ взаимосвязи между временем до пика плотности конечных Ca^{2+} сегментов и продолжительностью локомоции выявил сильную корреляцию ($r^2 = 0.67$, линейная регрессия, $p < 0.001$, $n = 55$ эпизодов локомоции, Рис. 29Б). Таким образом, чем длительнее был эпизод локомоции, тем больше времени проходило до достижения пика плотности конечных Ca^{2+}

сегментов, а окончание Ca^{2+} событий было связано с окончанием локомоции. На молекулярном уровне окончание Ca^{2+} событий связано с механизмами секвестрации (удаления) Ca^{2+} , включающими выведение Ca^{2+} из клетки через РМСА и мобилизацию Ca^{2+} в ЭПР под действием SERCA [117]. Можно предположить, что при длительных эпизодах локомоции Ca^{2+} не успевает эффективно удаляться из цитоплазмы астроцита.

Мы оценили время, прошедшее с момента начала локомоции до временной точки, в которой основные параметры Ca^{2+} активности достигали своего максимального значения, рассчитав показатель «время до пика». Получили следующие значения: $\langle \Delta F/F \rangle$: 6.77 [5.49-8.24] с, активная область: 7.12 [5.49-8.40] с, средняя площадь Ca^{2+} сегмента: 7.11 [5.49-8.73] с, плотность Ca^{2+} сегментов – первый пик: 2.58 [2.26-3.56] с, второй пик: 12.60 [10.10-17.94] с, плотность начальных Ca^{2+} сегментов 2.58 [1.94-3.39] с, плотность конечных Ca^{2+} сегментов: 12.60 [10.50-17.77] с ($n = 55$ эпизодов локомоции, Рис. 30). Таким образом, время до пиковых значений $\langle \Delta F/F \rangle$, активной области и средней площади Ca^{2+} сегмента в среднем составляло около 7 секунд, что соответствовало средней продолжительности локомоторного эпизода.

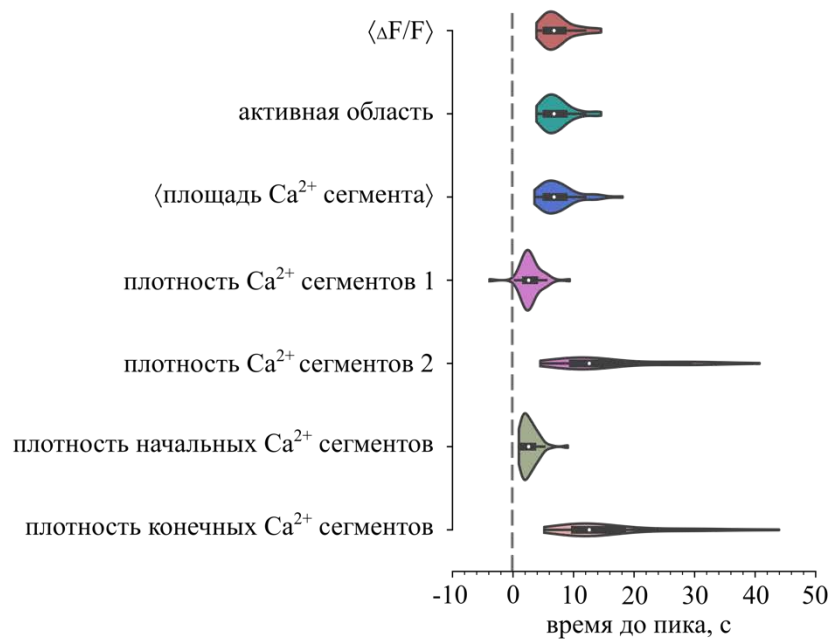


Рисунок 20. Сводные данные о времени от начала движения мыши до пиковых значений основных параметров Ca^{2+} активности в астроцитах соматосенсорной коры мыши. Начало эпизода локомоции обозначено пунктирной линией.

Задержка астроцитарного Ca^{2+} ответа ставит вопрос о его физиологической значимости. Наличие задержки позволяет предположить, что астроциты не отвечают на сенсорные сигналы в реальном времени. С другой стороны, астроцитарная Ca^{2+} активность может быть вовлечена в модуляцию синаптической пластичности [7], регуляцию сосудистого тонуса [8] и

метаболическую активацию астроцитов [9], которые происходят с задержкой. Например, синаптическая пластичность и консолидация памяти могут происходить после обработки сенсорной информации, ее фильтрации и сопоставления с предыдущими воспоминаниями в мозге. То же самое относится к вазодилатации и метаболической активации астроцитов, которые могут представлять собой системную реакцию на повышенную потребность мозга в энергии после интенсивной активности нейронов во время локомоции [132].

Таким образом, локомоция мышцы вызывает отсроченный Ca^{2+} ответ популяции астроцитов. Ca^{2+} ответ, как правило, превосходит локомоцию по длительности и может быть охарактеризован несколькими параметрами: $\Delta F/F$, активная площадь, площадь Ca^{2+} сегмента и плотность Ca^{2+} сегментов. Различные параметры Ca^{2+} активности имеют разную временную динамику. Новые Ca^{2+} сегменты появляются в начале локомоции и формируют первый пик плотности Ca^{2+} сегментов. Затем сегменты расширяются и сливаются, что отражается в увеличении средней площади Ca^{2+} сегмента. В конце эпизода локомоции Ca^{2+} события распадаются на фрагменты (второй пик плотности Ca^{2+} сегментов) и терминируются.

3.1.2 Воспроизводимость пространственного паттерна популяционного Ca^{2+} ответа

Далее мы проанализировали временную и пространственную неоднородность Ca^{2+} ответа популяции астроцитов.

Распределение задержек ответа пикселей (активации) относительно начала локомоции представлен на Рис. 31. Ответ был неоднороден по длительности и интенсивности и формировал колоколообразную кривую. Небольшая часть пикселей была активна до достижения скоростью максимального значения (в данном примере – в интервале 0-3 секунды от начала локомоторного эпизода), отражая фоновую астроцитарную активность. Такие локальные небольшие повышения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ могут наблюдаться в астроцитарных листочках и обуславливаются входом Ca^{2+} через плазматическую мембрану (через ионотропные рецепторы или NCX) [32,61].

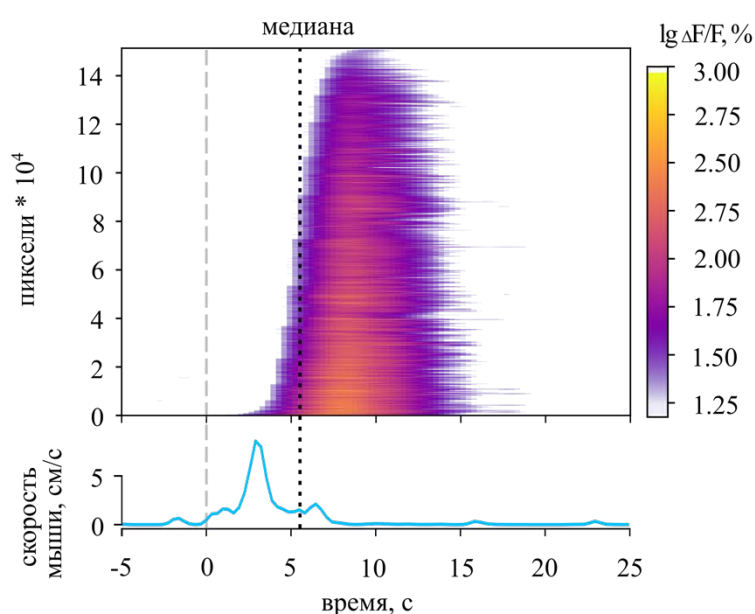


Рисунок 31. Распределение задержек активации пикселей относительно начала локомоции. Приведен пример для одного эпизода локомоции, внизу показана динамика скорости мыши. Пунктиром обозначена медиана Ca^{2+} ответа астроцитов по времени (момент времени, в котором значение $\Delta F/F$ в кадре превышает пороговое в 50-ти процентах пикселей, вовлеченных в ответ).

Глобальный Ca^{2+} ответ популяции астроцитов развивался после достижения пика скорости мыши. Медиана реакции по времени составила 3.88 [3.23-5.09] секунд. Более длительный и выраженный (с большей интенсивностью флуоресценции) ответ наблюдался у пикселей, отвечающих раньше (Рис. 31). И длительность, и амплитуда Ca^{2+} ответа коррелировали с задержкой относительно начала локомоции (коэффициент детерминации r^2 соответственно: 0.53 [0.29-0.64] и 0.38 [0.20-0.60]; $n = 70$ эпизодов локомоции, Рис. 32).

Ранний ответ может отражать Ca^{2+} активность, обусловленную внутренними свойствами популяции астроцитов.

Дальнейшая активация астроцитов может объясняться высвобождением Ca^{2+} из ЭПР через IP_3R после активации GPCR лигандами, например, НА. Так, в недавней работе было продемонстрировано, что выброс НА предшествует увеличению Ca^{2+} активности в астроцитах коры головного мозга на 5.7 секунд. Концентрация НА была оценена по динамике флуоресценции генетически кодируемого сенсора НА GRAB_{NE}, задержка также составила около 6 секунд [152]. Будучи агонистом $\alpha 1$ -адренергических рецепторов, НА приводит к отсроченной мобилизации астроцитарных внутриклеточных запасов Ca^{2+} , выступая инициатором повышения цитоплазматического Ca^{2+} в астроцитах при локомоции. Антагонисты $\alpha 1$ -рецепторов (например, празозин) блокируют не только вызванное локомоцией повышение уровня астроцитарного Ca^{2+} , но и более 90% спонтанных астроцитарных Ca^{2+} событий, что позволяет считать НА-ергическую передачу основным фактором увеличения астроцитарной Ca^{2+} активности в коре при локомоции [105]. Митохондрии также участвуют в увеличении астроцитарной Ca^{2+} активности посредством mPTP и mNCX [47,138].

Более поздний ответ пикселей может отражать активацию астроцитов вследствие диффузии сигнальных молекул (в частности, IP_3) через щелевые контакты от астроцита к астроциту [153].

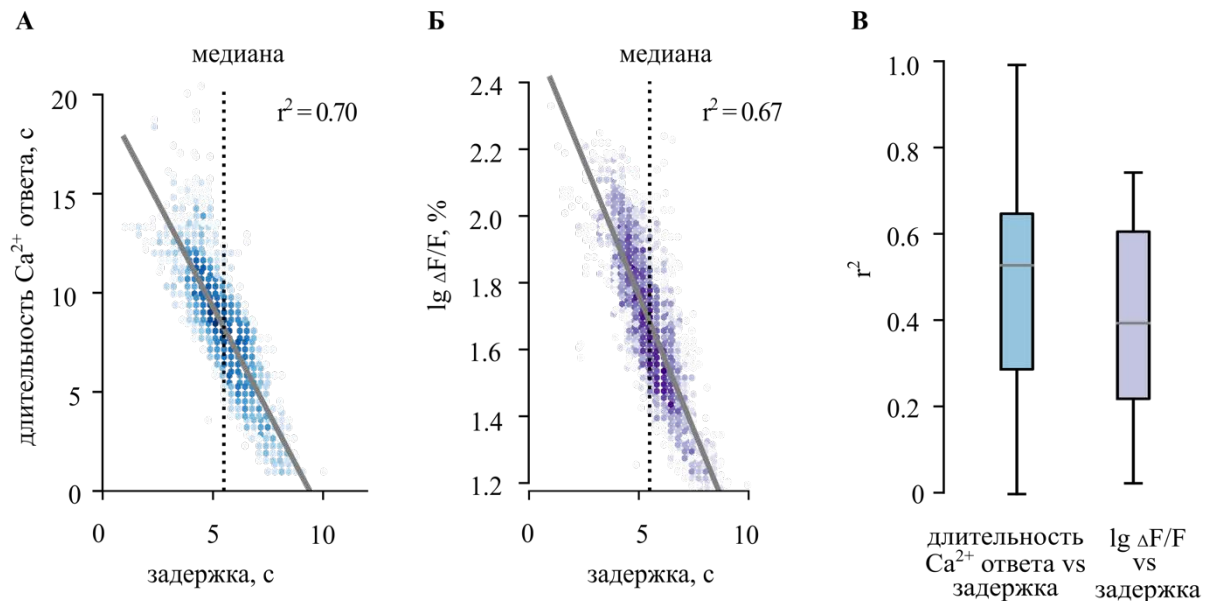


Рисунок 32. Связь между длительностью и интенсивностью Ca^{2+} ответов и задержкой активации пикселей. А, Б – Результаты регрессионного анализа между длительностью (А) и величиной ($\Delta F/F$) Ca^{2+} ответов (Б) и временем, проходящим от начала локомоции до начала ответа. Зависимости показаны для эпизода локомоции, представленного на Рис. 31 (регрессионный анализ, коэффициенты детерминации: $r^2 = 0.70$ и $r^2 = 0.67$ соответственно, $p < 0.001$). В – Сводные данные о коэффициентах детерминации для рассчитанных линейных регрессий, $n = 70$ эпизодов локомоции.

Мы задались вопросом: возникает ли Ca^{2+} ответ в одних и тех же областях соматосенсорной коры? Чтобы это проверить, для каждого локомоторного эпизода были построены карты, отражающие задержку активации пикселей по времени относительно медианы ответа (Рис. 33). Красные области отражают участки коры, в которых Ca^{2+} ответ на локомоцию развивался раньше всего. Можно заметить, что первыми всегда активировались одни и те же области соматосенсорной коры (Рис. 33Б). Тем не менее пространственное разрешение не позволяет сказать, в какой части астроцитов начинался ответ – в коме или на периферии, в отростках. Наиболее поздний ответ (темно-зеленые участки карт) был ассоциирован с областями мозга на периферии кровеносных сосудов, вероятно, указывая на активацию астроцитарных ножек, контактирующих с последними [40] (Рис. 33).

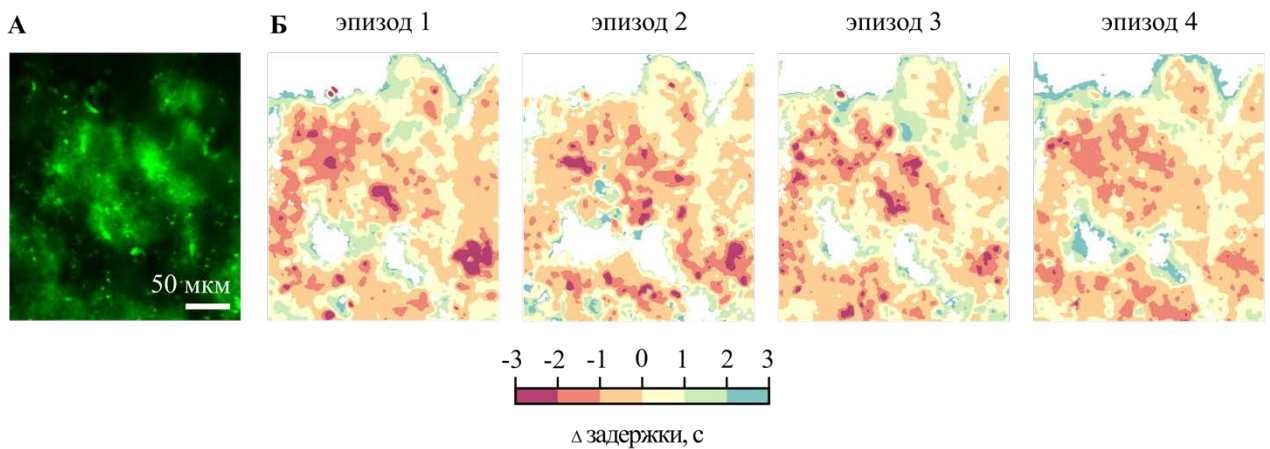


Рисунок 33. Задержка Ca^{2+} ответа астроцитов на локомоцию относительно медианы ответа. За медиану взят момент времени, когда значение $\Delta F/F$ в кадре превышало пороговое в 50-ти процентах пикселей, вовлеченных в ответ. А – Пример участка коры головного мозга, из которого была зарегистрирована Ca^{2+} динамика в астроцитах во время нескольких эпизодов локомоции. Зеленые участки кадра – флуоресценция GCaMP6f, экспрессированного в цитоплазме астроцитов. Б – Карты задержек активации пикселей относительно медианы ответа.

Чтобы определить, сходно ли пространственное распределение областей с ранним и поздним ответом при разных эпизодах локомоции, мы провели корреляционный анализ (Рис. 34). Для этого выбирали пары локомоторных эпизодов, для которых Ca^{2+} ответ астроцитов был записан из одного и того же участка соматосенсорной коры. (Рис. Б). В качестве контрольных сравнений использовали те же пары эпизодов локомоции, но одну из карт задержек поворачивали на 90 градусов. Поворот карты приводил к исчезновению корреляции (коэффициент корреляции Пирсона r : 0.65 [0.57-0.70] и 0.04 [0.01-0.06] соответственно, $n = 25$ парных сравнений, Рис. 34В). Таким образом, различные эпизоды локомоции приводили к повторяющемуся пространственному паттерну активации соматосенсорной коры, характеризующемуся более ранним ответом одних и тех же областей мозга.

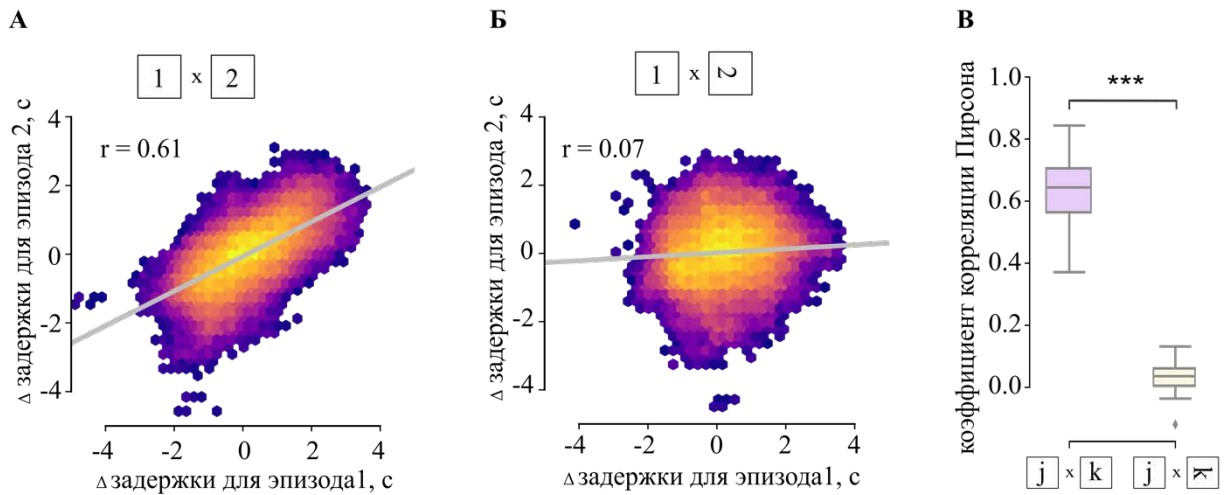


Рисунок 34. Результаты корреляционного анализа между задержками ответа в участке соматосенсорной коры для различных эпизодов локомоции. А – Диаграмма рассеяния, демонстрирующая наличие корреляции между двумя картами, отражающими пространственное распределение задержек активации пикселей для двух эпизодов локомоции (записи получены из одного и того же участка соматосенсорной коры). Б – Диаграмма рассеяния, показывающая отсутствие корреляции для тех же двух карт, если вторая была повернута на 90 градусов. Серым показаны линии регрессии. В – Сводные данные о коэффициенте корреляции Пирсона, j, k – индексы, обозначающие номера эпизодов локомоции. *** – $p < 0.001$, корреляционный анализ, $n = 25$ парных сравнений.

Воспроизводимость пространственного паттерна популяционного Ca^{2+} ответа астроцитов указывает на наличие физиологической основы. Мы выдвинули гипотезу, что области мозга, демонстрирующие более ранний ответ на локомоцию, могут отличаться повышенной спонтанной Ca^{2+} активностью. Чтобы это проверить, мы проанализировали астроцитарную Ca^{2+} активность в популяции астроцитов мышей, находящихся в состоянии покоя ($n = 115$ эпизодов покоя). В покое в соматосенсорной коре наблюдались небольшие по амплитуде и длительности Ca^{2+} события (Рис. 35).

Чтобы выяснить, за счет чего происходили колебания активной области в покое (Рис. 35А), мы провели кросс-корреляционный анализ (Рис. 36). Наиболее высокая корреляция наблюдалась между активной областью и плотностью начальных ($r: 0.73 [0.62-0.80]$) и конечных ($r: 0.71 [0.61-0.78]$) Ca^{2+} сегментов. Вследствие этого корреляция активной области с плотностью Ca^{2+} сегментов ($r: 0.81 [0.69-0.86]$, Рис.36Б) была значительно выше, чем корреляция с кривой изменений средней площади Ca^{2+} сегмента ($r: 0.56 [0.42-0.66]$, Рис. 36Б). Таким образом, флуктуации активной области в покое в большей степени объяснялись возникновением и окончанием Ca^{2+} событий, а не изменением их площади в пределах кадра.

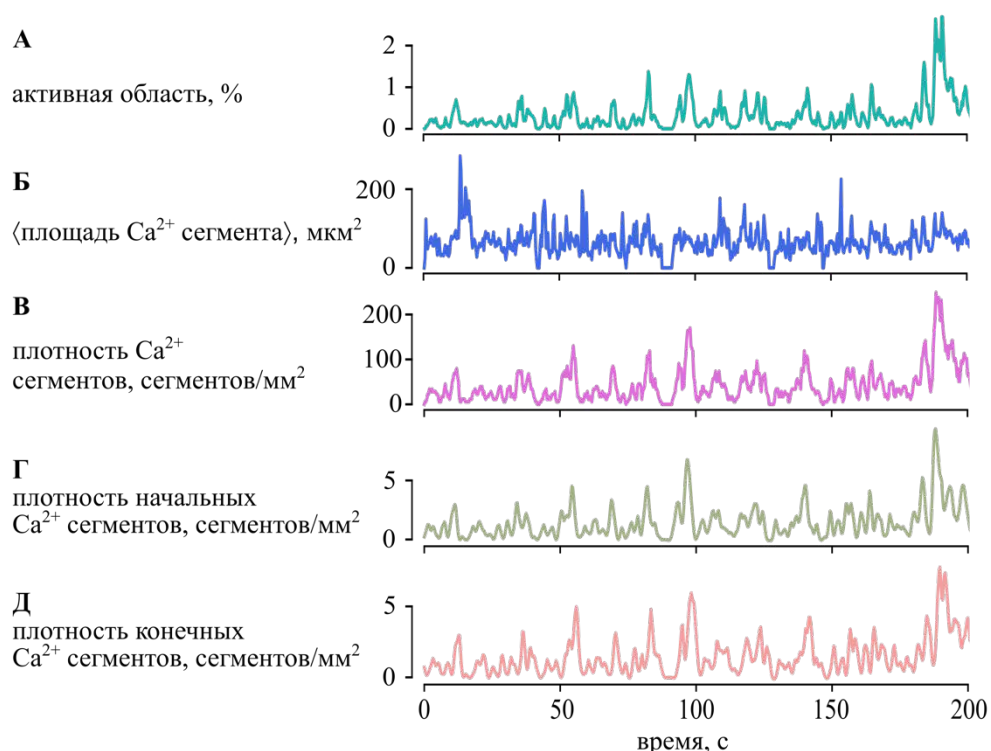


Рисунок 35. Временная динамика основных параметров Ca^{2+} активности в популяции астроцитов первичной соматосенсорной коры мыши в покое. Показан участок экспериментальной записи, в котором средняя скорость мыши не превышала 0.5 см/с.

Каков физиологический смысл флуктуаций $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в покое? Поскольку Ca^{2+} является важнейшим сигнальным ионом, вовлеченным во множество молекулярных каскадов, различные уровни $[\text{Ca}^{2+}]_i$ могут модулировать метаболическое состояние мозга [152].

Астроцитарная Ca^{2+} активность в соматосенсорной коре в покое занимала лишь небольшую часть кадра. Мы определили вероятность активации в каждом пикселе, рассчитав процент кадров на протяжении записи, в которых пиксели были активны, и закодировали пространственное распределение спонтанной Ca^{2+} активности в каждом пикселе цветом (Рис. 37Б). Затем для тех же участков соматосенсорной коры мы построили карту задержек активации пикселей в ответ на локомоцию относительно медианы ответа (Рис. 37В) и сравнили такие пары карт между собой (Рис. 38).

Анализ колокализации областей, отвечающих раньше других на локомоцию, и областей с наибольшей вероятностью активации в покое показал, что такое совпадение не является случайным (r : -0.36 [-0.41-(-0.28)], поворот карты приводил к исчезновению корреляции - r : -0.046 [-0.022-0.004], $n = 23$ парных сравнения, Рис. 38).

Таким образом, пространственный паттерн спонтанной Ca^{2+} активности в покое коррелирует с паттерном, вызванным локомоцией, то есть раньше на локомоцию отвечают те области соматосенсорной коры, в которых в покое наблюдалась спонтанная Ca^{2+} активность.

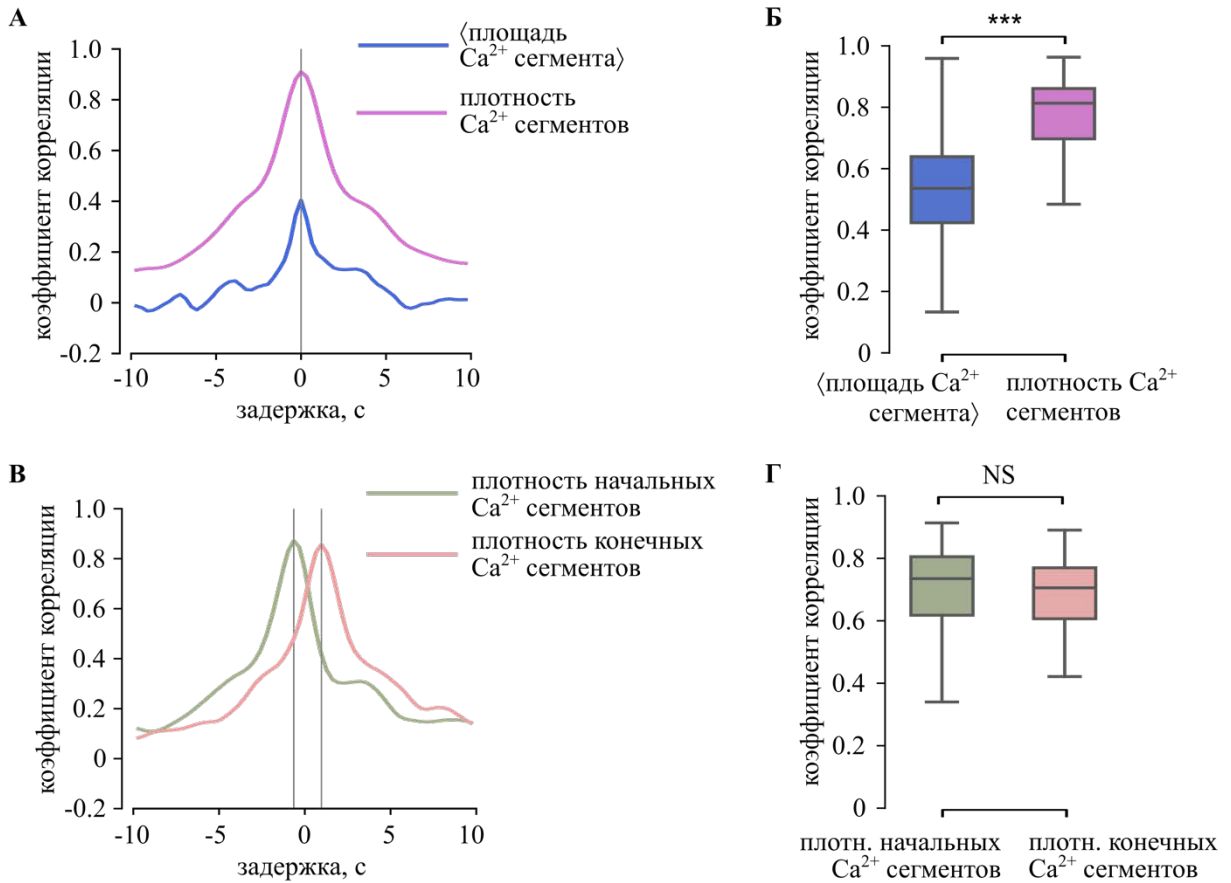


Рисунок 36. Результаты кросс-корреляционного анализа между параметрами Ca^{2+} активности в покое и значениями активной области. А, В – Графики кросс-корреляций для участка записи, приведенного на Рис. 35, вертикальные серые линии соответствуют пиковому значению коэффициента корреляции. Б, Г – Сводные данные о пиковых коэффициентах корреляции. *** – $p < 0.001$, кросс-корреляционный анализ, $n = 115$ эпизодов покоя.

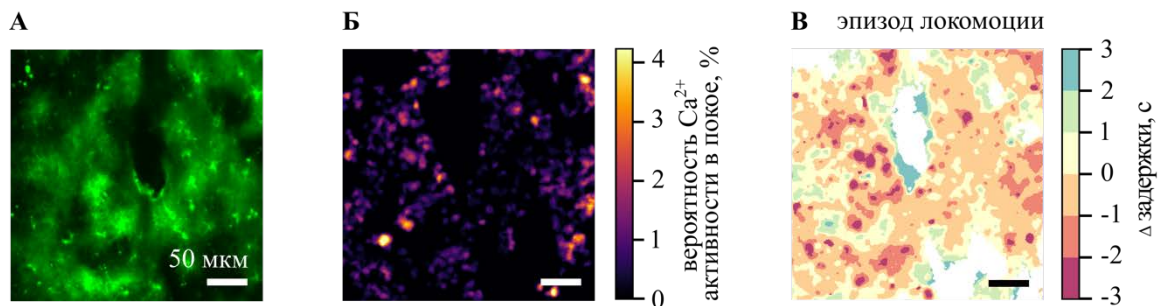


Рисунок 37. Колокализация областей активации соматосенсорной коры в покое и при локомоции. А – Пример участка соматосенсорной коры, из которого были зарегистрированы записи Ca^{2+} активности в астроцитах. Зеленые участки кадра – флуоресценция GCaMP6f, экспрессированного в цитоплазме астроцитов. Б и В – Пространственное распределение вероятности Ca^{2+} активности в покое (Б) и карта задержек активации пикселей относительно медианы ответа (В) для того же участка мозга.

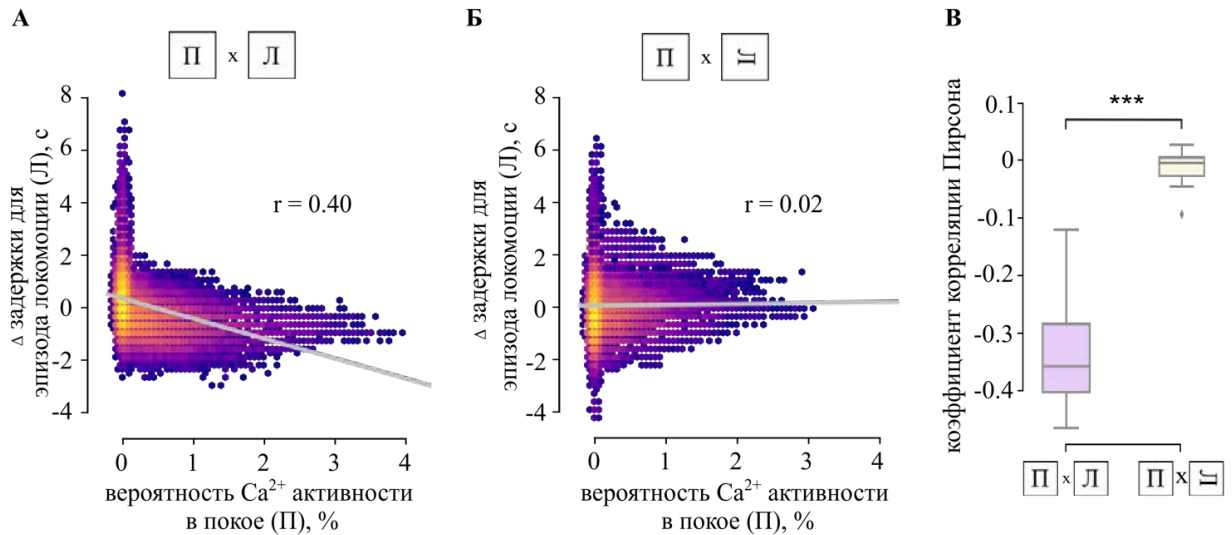


Рисунок 38. Результаты корреляционного анализа между задержками активации пикселей относительно медианы ответа при локомоции и уровнем спонтанной астроцитарной Ca^{2+} активности в соматосенсорной коре в покое. А – Корреляция между картами, приведенными на Рис. 37Б и В. Б – То же, что и А, но вторая карта повернута на 90 градусов. Серым показаны линии регрессии. В – Сводные данные о коэффициенте корреляции Пирсона. *** – $p < 0.001$, корреляционный анализ, $n = 23$ парных сравнения.

Могут ли области с повышенной вероятностью активации в покое колокализоваться с более высокой плотностью внутриклеточных депо Ca^{2+} – ЭПР и митохондрий? 3D-реконструкция синапсов на основе данных микроскопии сверхвысокого разрешения показала, что тонкие астроцитарные отростки содержат ЭПР [154]. Получены данные о вкладе митохондрий, локализованных в дистальных отростках астроцитов, в генерацию локальных Ca^{2+} токов. Открытие mPTP вызывает небольшие митохондриальные Ca^{2+} события, которые усиливаются под влиянием нейронной активности [47]. Кроме того, установлен локальный перенос Ca^{2+} между ЭПР и митохондриями [155].

Согласно литературе, спонтанные увеличения Ca^{2+} наблюдаются преимущественно в дистальных астроцитарных отростках [42,156]. Следовательно, области с повышенным уровнем спонтанной Ca^{2+} активности, демонстрирующие ранний Ca^{2+} ответ на локомоцию, могут колокализоваться с митохондриями и ЭПР, находящимися в астроцитарных отростках.

Таким образом, пространственный паттерн Ca^{2+} ответа популяции астроцитов на локомоцию воспроизводится при различных локомоторных эпизодах. Для участков соматосенсорной коры, в которых ответ на локомоцию наблюдается раньше всего, зарегистрирован более высокий уровень спонтанной Ca^{2+} активности в состоянии покоя мыши.

3.2 Интегративная функция одиночных кортикальных астроцитов

Мы наблюдали, что во время локомоции $[Ca^{2+}]_i$ повышается во всем астроцитарном домене, включая сому. В связи с этим возникает вопрос: либо Ca^{2+} активность, инициированная в соме астроцита, впоследствии распространяется по астроцитарным отросткам, либо, наоборот, повышение $[Ca^{2+}]_i$ начинается в дистальных отростках и распространяется к соме. Чтобы ответить на этот вопрос, мы зарегистрировали сигнал от одиночных кортикальных астроцитов бодрствующих мышей с высоким пространственным разрешением. Последовательные кадры, отражающие изменение сигнала флуоресценции с течением времени, представлены на Рис. 39.

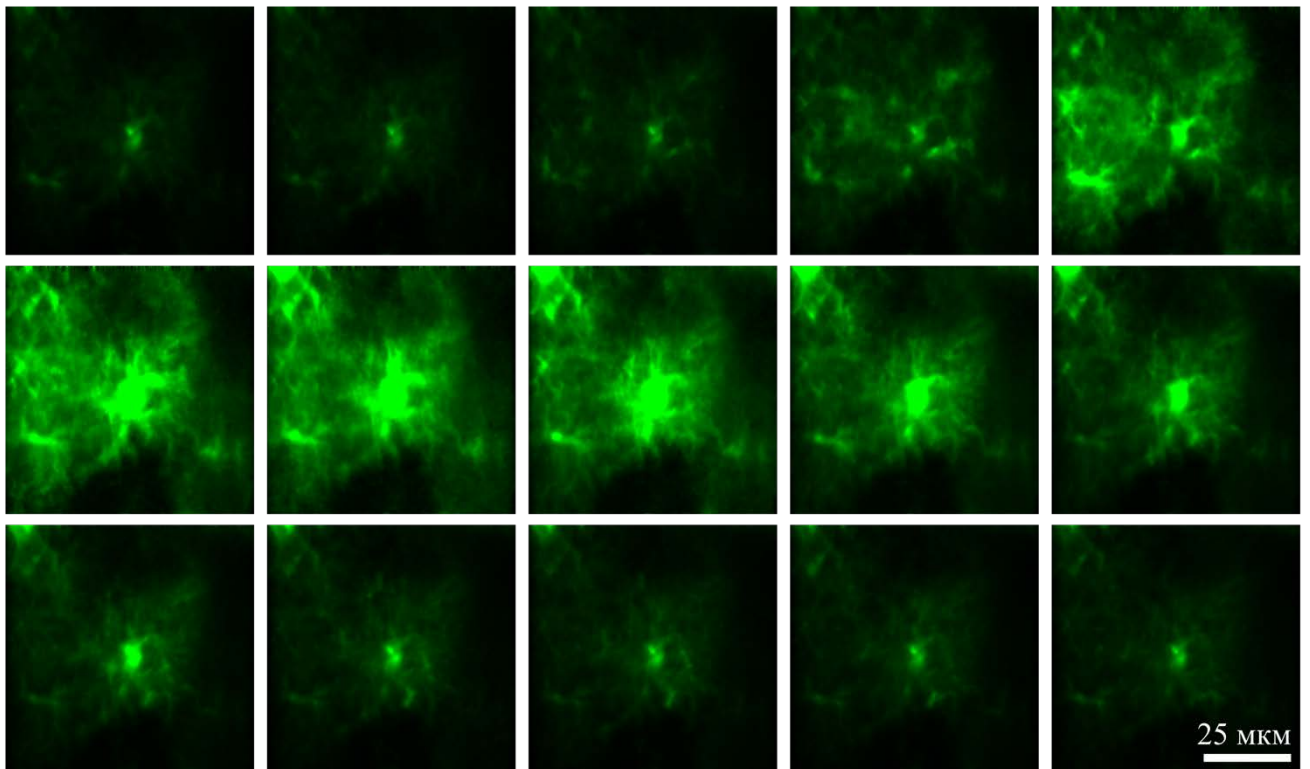


Рисунок 39. Участок записи Ca^{2+} активности в одиночном астроците первичной соматосенсорной коры бодрствующей мыши. Показано развитие сигнала во времени (слева-направо, сверху-вниз). Каждое изображение получено усреднением 10 последовательных кадров (биннинг). В цитоплазме астроцита экспрессирован GCaMP6f. При локомоции (средний ряд) наблюдается повышение Ca^{2+} активности. Для возбуждения флуоресценции в двухфотонном режиме использовалась длина волны $\lambda_{ex} = 920$ нм. Шкала – 25 мкм.

Мы провели широкое линейное сканирование всей астроцитарной области и проанализировали изменения $[Ca^{2+}]_i$ в соме и отростках астроцита (Рис. 40). С началом локомоции мыши повышение уровня $[Ca^{2+}]_i$ начиналось в дистальных отделах астроцитарного домена и затем распространялось в сому (Рис. 40Б, В). Этот результат согласуется с более высокой вероятностью генерации Ca^{2+} активности в дистальных астроцитарных отростках [156,157].

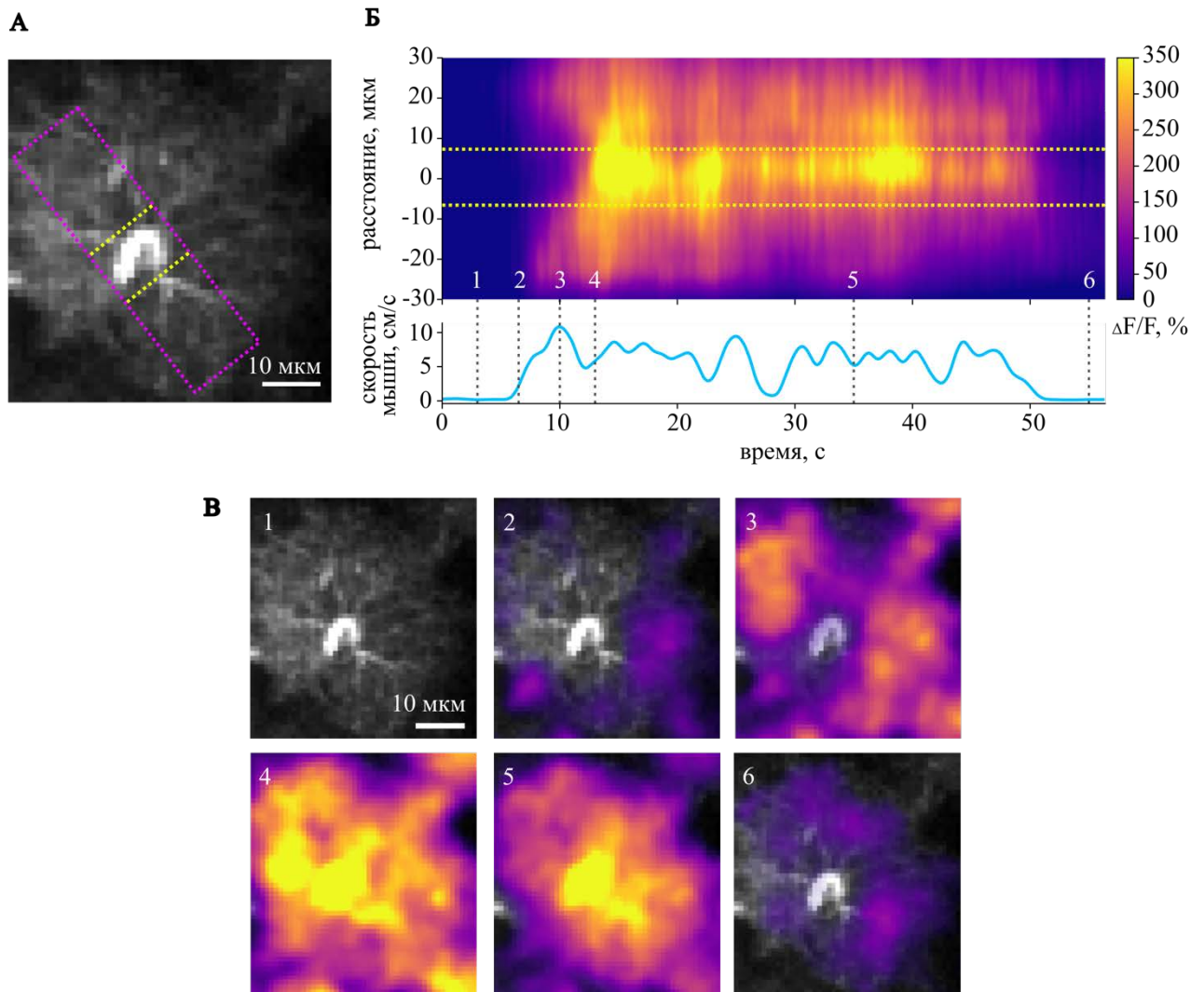


Рисунок 40. Ca^{2+} активность в одиночном астроците в ответ на локомоцию. А – Изображение астроцита с наложенным прямоугольником, обозначающим область, вдоль которой проводилось построение скан-линии (розовый прямоугольник). Желтыми пунктирными линиями обозначена сома. Б – (Вверху) Изображение флуоресцентного линейного сканирования (x-время), показывающее Ca^{2+} ответ на локомоцию в астроцитарных отростках и соме. Расстояние рассчитано от центра сомы (0 мкм). Желтыми пунктирными линиями отмечена ширина сомы. (Внизу) Динамика скорости мыши во время эпизода локомоции, соответствующего приведенному выше линейному сканированию. В – Пространственное распределение Ca^{2+} активности ($\Delta F/F$) для моментов времени, обозначенных на Б пунктирными линиями.

Мы разделили каждый астроцит ($n = 53$) на сому и отростки и проанализировали Ca^{2+} активность отдельно в этих частях астроцита (Рис. 41). Кривые временной динамики сигналов $\Delta F/F$ подтвердили наличие задержки Ca^{2+} ответа в соме астроцита (голубая кривая) по отношению к ответу в его отростках (розовая кривая, Рис. 41Б). Задержка составила 4.7 [2.3-8.9] с (Рис. 41В). Поскольку задержка варьировала в широком диапазоне, мы проверили, можно ли объяснить эту изменчивость изменчивостью размера астроцитарных доменов. Регрессионный анализ не

выявил значимой корреляции между задержкой и максимальным диаметром Фере астроцитов ($R^2 = 0.055$, $p = 0.09$, линейная регрессия, $n = 53$; Рис. 41Г).

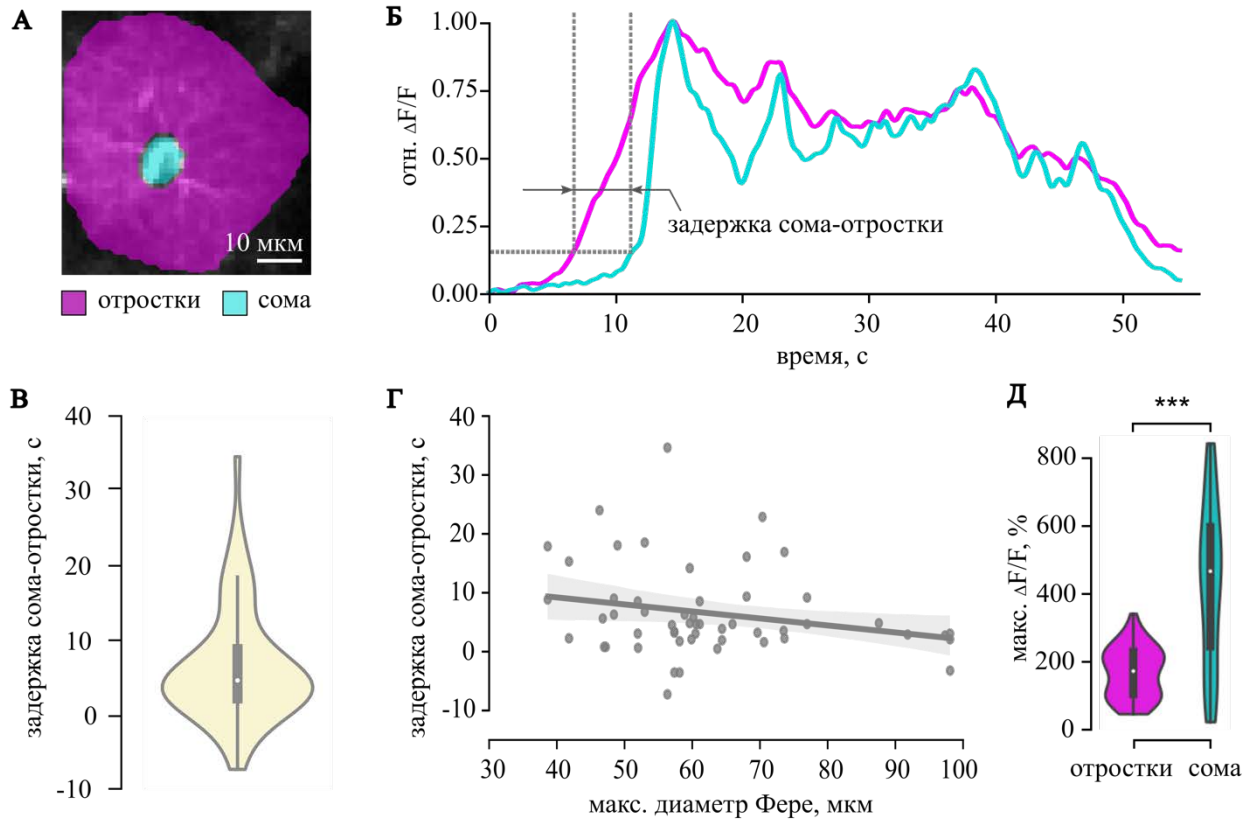


Рисунок 41. Различия Ca^{2+} ответа на локомоцию в отростках и соме астроцита. А – Астроцит, сегментированный на сому и отростки. Б – Динамика Ca^{2+} активности в соме и отростках астроцита во время эпизода локомоции, показанного на Рис. 40Б. Сигнал представлен в виде значений $\Delta F/F$, нормированных на максимальное значение $\Delta F/F$. Задержка сома-отростки рассчитывалась между точками, соответствующими 15-ти процентам от максимального значения $\Delta F/F$ (пунктирные линии и стрелки). В – Сводные данные о распределении задержек Ca^{2+} ответов между сомой и астроцитарными отростками. Г – Взаимосвязь между задержкой Ca^{2+} ответов в соме по отношению к отросткам и размером астроцитов, выраженным как максимальный диаметр Фере (регрессионный анализ: $R^2 = 0.055$, $p = 0.09$, линейная регрессия). Д – Сводные данные о максимальных значениях $\Delta F/F$ в отростках и сомах астроцитов, точка – медиана, границы прямоугольника – квантили 25-75%. *** – $p < 0.001$, модель со смешанными эффектами, $n = 53$ клетки.

Наши наблюдения позволяют предположить, что сома астроцита работает как интегратор Ca^{2+} активности, начинающейся в отростках. Каково функциональное значение интеграции Ca^{2+} активности в астроцитах? Одна из возможностей – усиление Ca^{2+} сигналов. Так, зарегистрированный в соме Ca^{2+} ответ был в несколько раз выше, чем в отростках (максимальное значение $\Delta F/F$ в отростках: $170.3 [102.8-229.7] \%$; в соме: $465.0 [245.1-595.3] \%$, $n = 53$ клетки; p

< 0.001 , модель со смешанными эффектами, Рис. 41Д). Амплификация сигнала в соме астроцита происходила, по-видимому, за счет выхода Ca^{2+} из внутриклеточных депо Ca^{2+} [52,156].

Известно, что различные уровни $[\text{Ca}^{2+}]_i$ регулируют различные молекулярные пути [158]. Таким образом, усиление Ca^{2+} активности в соме астроцита может быть направлено на определенные клеточные функции. Например, повышение уровня $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в соме может увеличивать продукцию АТФ, стимулируя активность ферментов цикла Кребса, белков ЭТЦ митохондрий и АТФ-синтазы [138,159]. Такой усиленный метаболический ответ астроцита может быть физиологическим результатом интеграции Ca^{2+} . Интеграция Ca^{2+} сигналов в астроцитарной соме напоминает интеграцию сомой нейрона изменений мембранного потенциала на дендритных входах с последующей генерацией потенциалов действия [160].

Кроме того, мы заметили колебания в зарегистрированном флуоресцентном сигнале (Рис. 41Б). Чтобы охарактеризовать эти осцилляции, мы провели вейвлет-анализ (Рис. 42). Действительно, наблюдались периодические колебания $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в частотном диапазоне 0.1-0.3 Гц, причем в соме они были выражены сильнее, чем в астроцитарных отростках (мощность вейвлет-спектра в отростках: 0.06 [0.03-0.10] отн. ед.; в соме: 0.21 [0.10-0.42] отн. ед., $n = 53$; $p < 0.001$, модель со смешанными эффектами, Рис. 42). Следовательно, интеграция сигнала в соме астроцита вызывает осцилляции $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

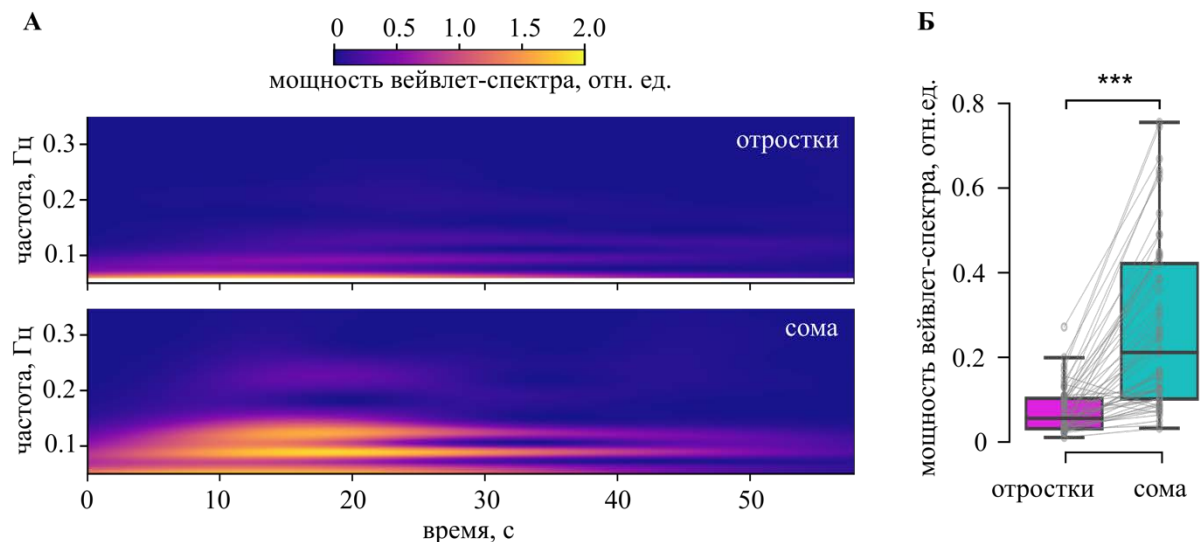


Рисунок 42. Вейвлет-анализ флуоресцентного сигнала в одиночных астроцитах. А – Вейвлет-спектрограммы флуоресцентных сигналов, зарегистрированных в ответ на локомоцию в отростках и соме астроцита и показанных на Рис. 41Б. Б – Средняя мощность вейвлет спектра (отн. ед.), рассчитанная для интервала, когда $\Delta F/F$ в астроцитарных отростках (вверху) и соме (внизу) было выше 15-ти процентов от максимального значения и находилось в диапазоне частот 0.1-0.3 Гц. *** – $p < 0.001$, модель со смешанными эффектами, $n = 53$ клетки.

Осцилляции $[Ca^{2+}]_i$ в астроцитах регулярно регистрировались в первичных культурах и в переживающих срезах мозга в ответ на фармакологическую стимуляцию [62,103,161,162]. Математические модели Ca^{2+} динамики в астроцитах также предсказывают осцилляторную активность, обусловленную положительной и отрицательной обратной связью [163,164]. Хотя астроциты, в принципе, должны обладать механизмами для колебаний $[Ca^{2+}]_i$, осцилляторное поведение астроцитов еще не было зарегистрировано *in vivo*. Возможная причина заключается в том, что Ca^{2+} активность в астроцитах *in vivo* определяется входами различных элементов активной среды мозга (локальная нейронная сеть, нейромодуляторные проекции, кровеносные сосуды и т.д.).

Осцилляторное поведение астроцитов может возникать при повышении уровня $[Ca^{2+}]_i$ в соме. Колебания зарождаются в соме и затухают при распространении к периферии астроцитов. Для возникновения осцилляций $[Ca^{2+}]_i$ необходимо, чтобы уровень $[Ca^{2+}]_i$ превышал определенный порог. Большие всплески уровня $[Ca^{2+}]_i$ и запас ионов Ca^{2+} в соме создают оптимальные условия для возникновения осцилляций $[Ca^{2+}]_i$ [163]. Возможно, информация закодирована в частоте осцилляций $[Ca^{2+}]_i$, зависящей от силы внешнего сигнала и внутренних свойств отдельного астроцита. Можно предположить, что колебательный Ca^{2+} сигнал может декодироваться ферментами, содержащими Ca^{2+} -связывающие домены с определенным сродством, что может регулировать их фосфорилирование и активировать специфические клеточные программы [165].

Таким образом, на субклеточном уровне $[Ca^{2+}]_i$ увеличивается во время локомоции одновременно в разных морфологических компартментах астроцита, начинаясь в астроцитарных отростках и распространяясь к соме. В соме астроцита происходит интеграция Ca^{2+} сигнала, его усиление и генерация осцилляций $[Ca^{2+}]_i$.

3.3 Ca^{2+} динамика в астроцитах гиппокампа мышей при выполнении поведенческих тестов

В наших экспериментах Ca^{2+} ответ астроцитов соматосенсорной коры был связан с локомоцией, поскольку данная область мозга вовлечена в обработку соматосенсорной информации, поступающей от передней лапы. Мы задались вопросом, могут ли в астроцитарной Ca^{2+} динамике быть отражены когнитивные процессы? Для проверки этой гипотезы мы проанализировали изменения Ca^{2+} сигнала, зарегистрированного из астроцитов гиппокампа мышей, выполняющих поведенческие тесты, поскольку гиппокамп является структурой мозга, вовлеченной в процессы памяти и кодирования пространства [98,166]. Для этого использовали методику фотометрии, проводя регистрацию популяционной Ca^{2+} активности в астроцитах поля CA1 гиппокампа, экспрессирующих GCaMP6f в цитоплазме.

Сначала мыши (N = 8) на 10 минут помещались в арену «открытого поля». Чтобы оценить, связана ли Ca^{2+} активность в астроцитах гиппокампа с положением животного в пространстве, экспериментальные записи были поделены на участки, когда мыши находились в центральной области арены (квадрат 20 см x 20 см) или на ее периферии. Животные проводили достоверно больше времени на периферии арены (центр: 25.2 [11.1-40.1] % времени, периферия: 74.8 [59.9-88.9] % времени, n = 8 мышей, p < 0.05, критерий Вилкоксона, Рис. 43А), а также проходили там больший путь (центр: 364.6 [215.9-781.7] см, периферия: 1416.4 [1228.6-1505.7] см, n = 8 мышей, p < 0.01, критерий Вилкоксона, Рис. 43Б).

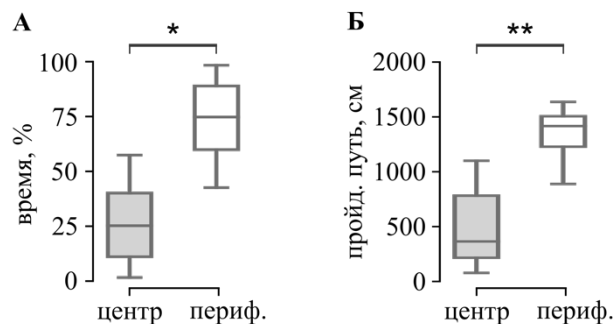


Рисунок 43. Поведенческие результаты теста «открытое поле». А – Процент времени, проведенного мышами в центре или на периферии арены, от общей продолжительности теста. Б – Путь, пройденный мышами в центральной и периферической частях арены. * – p < 0.05, ** – p < 0.01, критерий Вилкоксона, N = 8 мышей.

Для соотнесения поведения животных и Ca^{2+} активности в астроцитах гиппокампа был разработан подход к одновременной визуализации перемещения и поведения животного и измеряемого сигнала флуоресценции. На визуализациях (Рис. 44 А, Б) видно, что интенсивность астроцитарного Ca^{2+} сигнала варьировала в зависимости от положения мыши в арене и скорости перемещения животного.

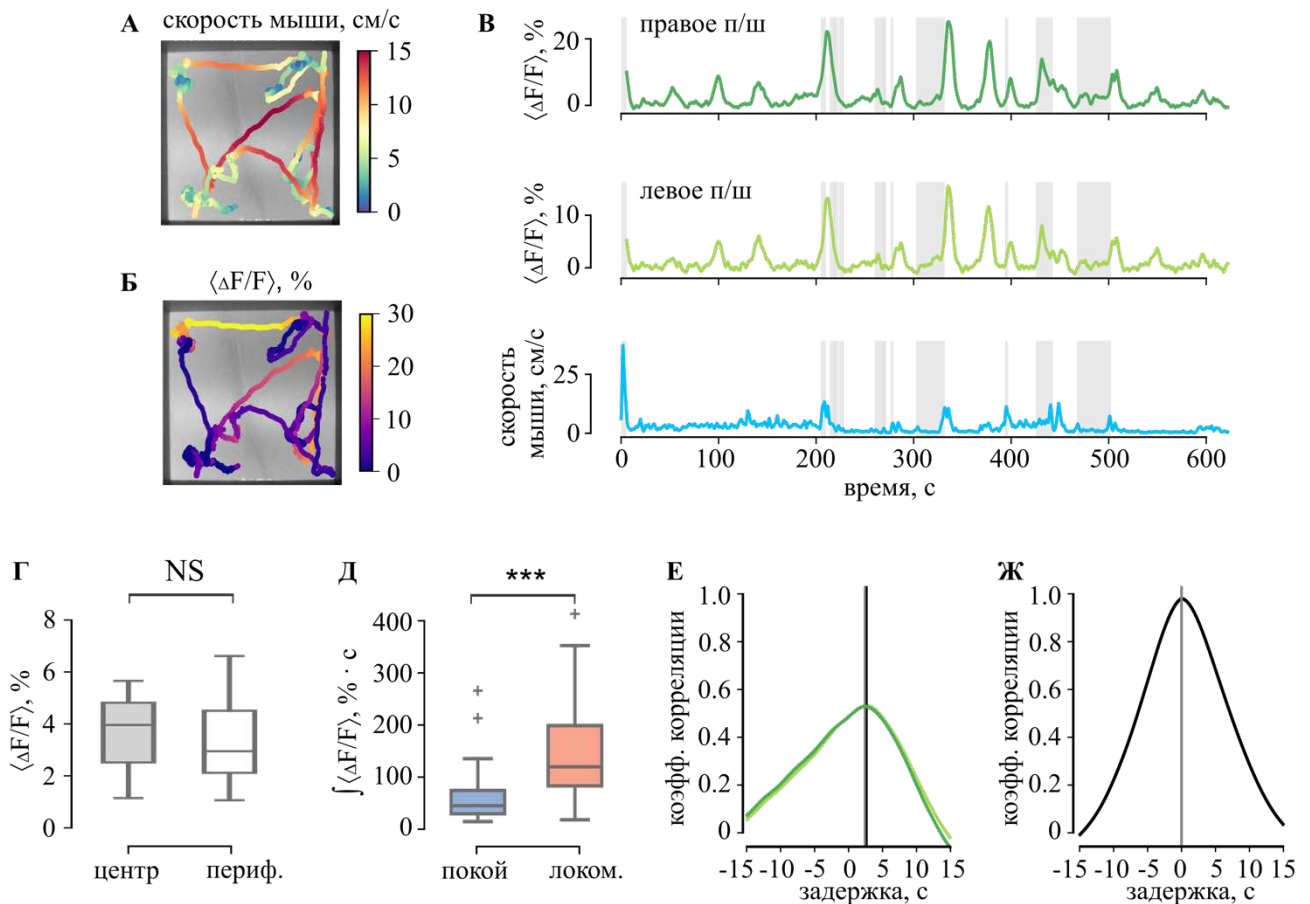


Рисунок 44. Ca^{2+} активность в астроцитах гиппокампа мышей в тесте «открытое поле». А – Траектория движения животного в арене, цветом закодирована скорость мыши (см/с). Б – Относительные изменения интенсивности флуоресценции $\langle \Delta F/F \rangle$ (%), наложенные на траекторию движения мыши и закодированные цветом. В – Временная динамика $\langle \Delta F/F \rangle$ в левом и правом гиппокампах, нижний график – скорость движения мыши; серым отмечены участки записи с нахождением мыши в центре арены, белым – на периферии. Г – $\langle \Delta F/F \rangle$, рассчитанное как площадь под кривой для участков с нахождением мыши в центре и на периферии арены (критерий Вилкоксона, $N = 8$ мышей). Д – Сравнение $\langle \Delta F/F \rangle$, рассчитанного как площадь под кривой для отдельных Ca^{2+} сигналов, наблюдавшихся в покое мыши или при локомоции (***) – $p < 0.001$, модель со смешанными эффектами, $N = 8$ мышей). Е – Результаты кросс-корреляционного анализа между Ca^{2+} сигналами из правого (темно-зеленым) и левого (светло-зеленым) гиппокампов и скоростью мыши, отражающие задержку Ca^{2+} сигнала относительно локомоции. Ж – Результаты кросс-корреляционного анализа между Ca^{2+} сигналами из правого и левого гиппокампов, отражающие синхронизацию Ca^{2+} активности между полушариями.

Мы сравнили величины $\langle \Delta F/F \rangle$ для различных частей арены, а именно центра и периферии, однако достоверные различия отсутствовали (центр: 3.96 [2.52-4.81] %, периферия: 2.12 [1.06-2.95] %, $p > 0.05$, критерий Вилкоксона, $N = 8$ мышей, Рис. 44Г).

Наличие участков на кривых $\langle \Delta F/F \rangle$, где повышения Ca^{2+} сигнала не сопровождались увеличением скорости мыши (Рис. 44Б), могут отражать связь Ca^{2+} активности с когнитивными процессами (например, принятия решения) или с более локальным положением животного в арене (например, в конкретной ограниченной области арены по типу «home base», которую, однако мыши с большей вероятностью выделяют в аренах с объектами [167]). Так, результаты недавнего исследования с одновременным двухфотонным Ca^{2+} имиджингом астроцитов и нейронов в гиппокампе мышей, ориентирующихся в виртуальной среде, указывают на возможное участие астроцитов в кодировании пространственной информации [100].

Тем не менее мы не наблюдали явной связи между Ca^{2+} активностью в астроцитах гиппокампа и местоположением мыши в арене. Это может указывать либо на отсутствие пространственного кодирования астроцитами в наших экспериментах, либо на то, что увеличение Ca^{2+} сигнала в большей степени определялось влиянием локомоции.

Чтобы это проверить, мы выделили повышения $[\text{Ca}^{2+}]_i$, ассоциированные с локомоцией, и повышения, наблюдавшиеся в период покоя мышей. Затем мы сравнили значения $\langle \Delta F/F \rangle$, рассчитанные как площадь под кривой для отдельных Ca^{2+} сигналов, для периодов покоя и локомоции. Действительно, Ca^{2+} активность при локомоции была достоверно выше, чем в покое (покой: 45.02 [29.61-74.37] %·с, локомоция: 119.82 [83.04-198.82] %·с, $p < 0.001$, модель со смешанными эффектами, Рис. 44Д).

Как и в соматосенсорной коре, мы наблюдали задержку астроцитарного Ca^{2+} сигнала относительно скорости мыши (задержка 2.56 [2.23-3.07] с, коэффициент корреляции 0.52 [0.32-0.54], кросс-корреляционный анализ, $N = 8$ мышей, Рис. 44Е).

Наконец, наблюдалась синхронизация астроцитарной Ca^{2+} активности между полушариями (отсутствие задержки между сигналами из правого и левого гиппокампа, кросс-корреляционный анализ, Рис. 44В, Ж). Вероятно, это отражает активацию астроцитов под воздействием нейромедиаторных проекций. Так, с помощью фотометрии на фиксированных за голову мышах было продемонстрировано, что активация астроцитарной сети в мозжечке и коре головного мозга при локомоции опосредована действием НА [21]. Таким образом, НА, доставляемый в различные области мозга (в том числе в оба гиппокампа) НА-ергическими проекциями из голубого пятна, может приводит к активации астроцитов [105].

На следующий день мыши участвовали в тестах, связанных с памятью, распознаванием объектов, социальным поведением (подробнее в п. 2.6.2 раздела «Материалы и методы»). Сначала мышь на 5 минут помещали в центральный отсек камеры (привыкание). Вторая сессия являлась тестом на социальность, третья – тестом на социальную новизну.

Мы сравнили поведенческие показатели и Ca^{2+} активность в различных отсеках арены. Иногда мыши забирались на стаканы и выходили на бортики арены. Такие участки записей не присваивали ни одному из отсеков. Поведенческие результаты тестов представлены на Рис. 45.

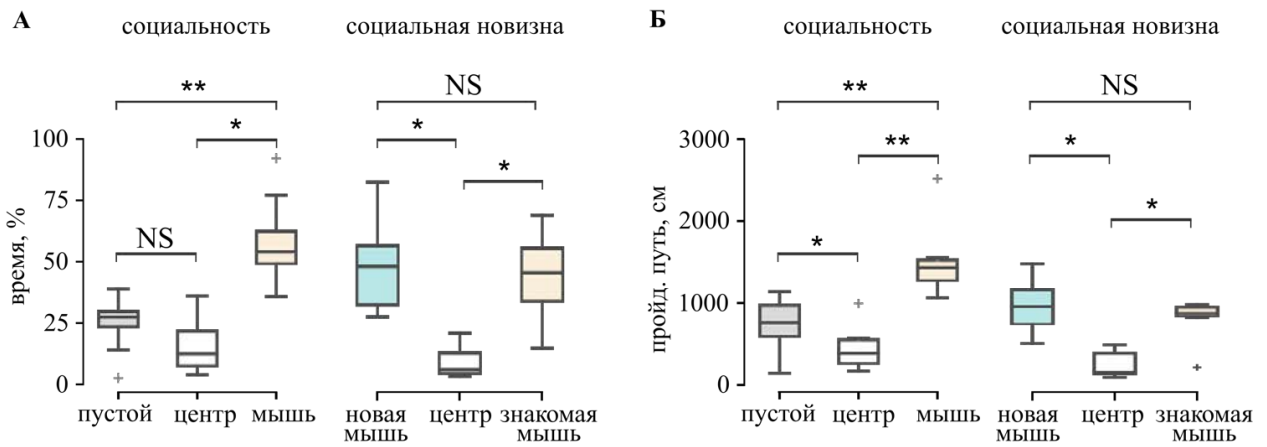


Рисунок 45. Поведенческие результаты тестов на социальность (N = 8 мышей) и социальную новизну (N = 7 мышей). А – Процент времени, проведенного мышами в одном из трех отсеков экспериментальной арены, от общей продолжительности теста (10 минут). Б – Путь, пройденный мышами в каждом из отсеков арены. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, критерий Вилкоксона.

И в тесте на социальность, и в тесте на социальную новизну мыши демонстрировали исследовательское поведение, сопровождающееся стойками и актами приноживания к стаканам, расположенным в арене (не показано на графиках, оценивалось по видеозаписям поведения).

В тесте на социальность животные (N = 8 мышей) проводили достоверно больше времени в отсеке со стаканом, содержащим другую мышь (28.1 [24.0-30.3] %, 13.1 [8.1-22.3] % и 54.7 [49.9-63.0] % времени в отсеке с пустым стаканом, в центральном отсеке и в отсеке с мышью соответственно, $p < 0.01$ при сравнении с отсеком с пустым стаканом, критерий Вилкоксона, Рис. 45А, слева), а также проходили там больший путь (764.0 [594.5-975.1] см, 389.4 [263.8-555.2] см и 1435.8 [1277.9-1527.6] см соответственно, $p < 0.01$ при сравнении с отсеком с пустым стаканом, критерий Вилкоксона, Рис. 45Б, слева).

Для теста на социальную новизну наблюдалась следующая закономерность: достоверных различий между временем и дистанцией в отсеках с новой и знакомой мышью обнаружено не было, однако экспериментальные мыши (N = 7 мышей) проводили значимо больше времени и больше перемещались в боковых отсеках, содержащих мышей, по сравнению с пустым центральным отсеком ($p < 0.05$, критерий Вилкоксона, Рис. 45А, Б, правая часть). Время, проведенное в отсеке с новой мышью, центральном отсеке и отсеке со знакомой мышью составило соответственно: 47.7 [32.0-56.0] %, 6.0 [4.3-12.6] % и 45.2 [33.6-55.0] % от времени теста; пройденный путь для этих отсеков соответственно: 951.9 [738.4-1156.9] см, 143.2 [118.5-402.8] см и 869.3 [832.3-940.9] см.

Характерные изменения Ca^{2+} активности в астроцитах гиппокампа в тестах на социальность и социальную новизну представлены на Рис. 46. Как и в тесте «открытое поле», наблюдалась синхронизация Ca^{2+} активности между полушариями (отсутствие задержки между сигналами из правого и левого гиппокампа, кросс-корреляционный анализ, Рис. 46А, Б).

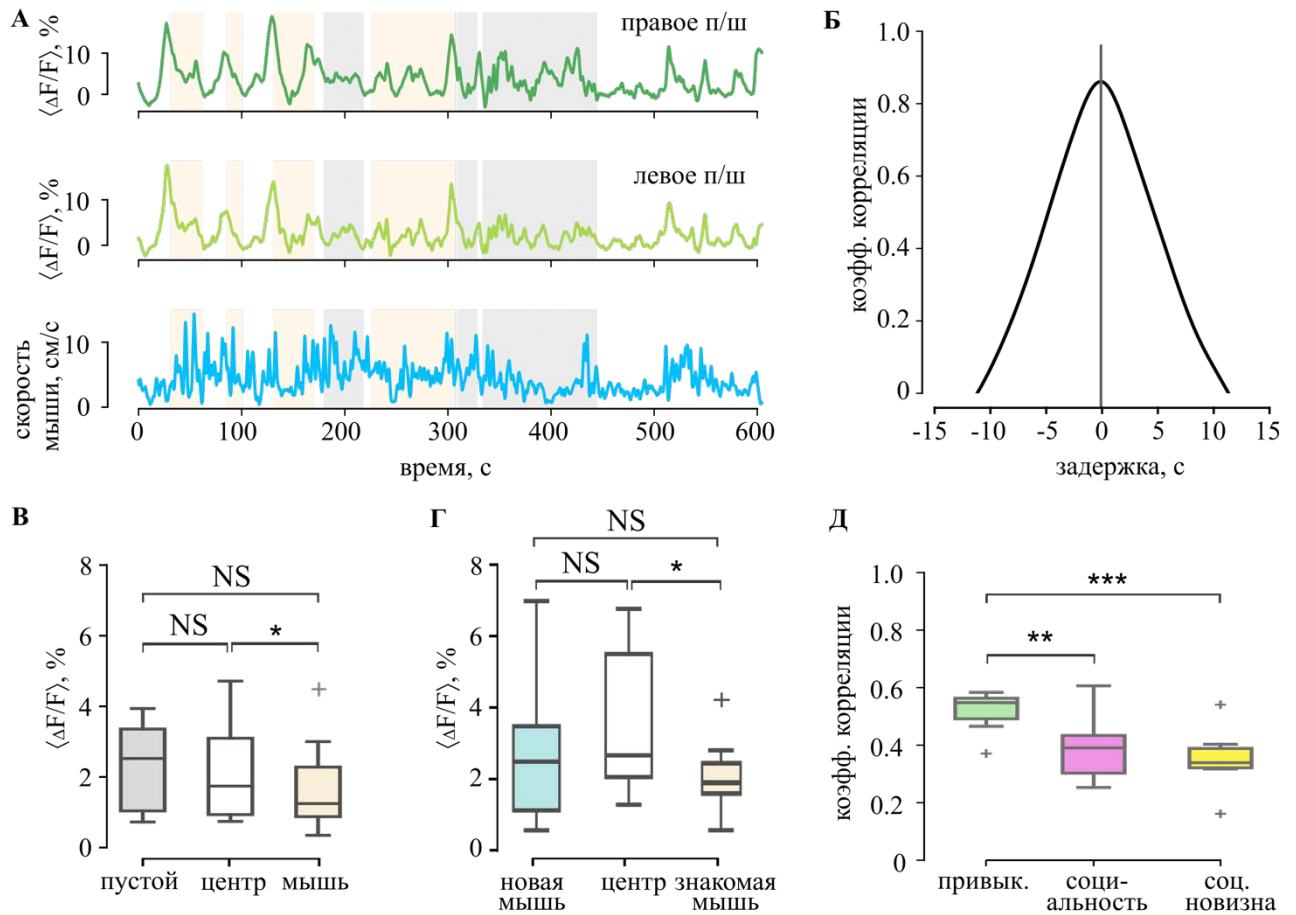


Рисунок 46. Ca^{2+} активность в астроцитах гиппокампа мышей в тестах на социальность и социальную новизну. А – Временная динамика $\langle \Delta F/F \rangle$ в правом и левом гиппокампах в тесте на социальность, нижний график – скорость движения мыши. Серым отмечено нахождение мыши в отсеке с пустым стаканом, бежевым – в отсеке с мышью, белым – в центральном отсеке. Б – Результаты кросс-корреляционного анализа для Ca^{2+} сигнала из правого и левого гиппокампов, отражающие синхронизацию Ca^{2+} активности между полушариями в тесте на социальность. В, Г – $\langle \Delta F/F \rangle$ в тесте на социальность ($N = 8$ мышей) и социальную новизну ($N = 7$ мышей) соответственно. $\langle \Delta F/F \rangle$ рассчитано как площадь под кривой для участков с нахождением экспериментальных животных в трех отсеках арены. Д – Результаты кросс-корреляционного анализа для Ca^{2+} сигналов и скорости мыши в трех сессиях теста, отражающие большой вклад локомоции в Ca^{2+} активность астроцитов в сессии с привыканием, * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$, критерий Вилкоксона.

Мы сравнили величины $\langle \Delta F/F \rangle$ для различных отсеков арены. Как в тесте на социальность, так и в тесте на социальную новизну наблюдались значимые отличия Ca^{2+} активности в отсеке с мышью по сравнению с центральным пустым отсеком ($p < 0.05$, критерий Вилкоксона, Рис. 46В, Г). Значения $\langle \Delta F/F \rangle$ в тесте на социальность для отсека с пустым стаканом, центрального отсека и отсека с мышью составили соответственно: 2.52 [1.04-3.36] %, 1.74 [0.94-3.10] % и 1.25 [0.88-2.88] %, Рис. 46В), в тесте на социальную новизну: 2.48 [1.12-3.47] %, 2.66 [2.05-5.50] % и 1.89 [1.59-2.44] % для отсека с новой мышью, центрального отсека и отсека со знакомой мышью соответственно (Рис. 46Г).

В данных тестах Ca^{2+} активность в астроцитах гиппокампа тоже увеличивалась при локомоции. Корреляционный анализ Ca^{2+} сигнала относительно скорости мыши выявил, что в первой сессии уровень Ca^{2+} сильнее коррелировал с локомоцией (коэффициент корреляции: 0.55 [0.49-0.58], 0.40 [0.31-0.49] и 0.33 [0.31-0.37] для сессий на привыкание, социальность и социальную новизну соответственно, $p < 0.01$, критерий Вилкоксона, Рис. 46Д). Можно предположить, что появление нового для мыши стимула (неживого объекта или другой мыши) приводит к тому, что локомоция перестает объяснять все повышение Ca^{2+} активности. Так, самый первый пик на кривой $\langle \Delta F/F \rangle$ был сопряжен с актом принюхивания к стакану, где располагалась мышь, и не был связан с движением (Рис. 46А).

В наших экспериментах наблюдался довольно низкий уровень флуоресцентного сигнала, что может быть объяснено несколькими причинами. Во-первых, в область сбора сигнала под торцом оптоволокон (участок гиппокампа толщиной примерно 100 мкм под оптоволоконном диаметром 125 мкм) попадало всего несколько астроцитов, экспрессирующих GCaMP6f, и не все из них могли вносить вклад в увеличение Ca^{2+} активности. Во-вторых, из-за большего рассеяния ткани в глубине мозга соотношение сигнал/шум в гиппокампе может быть ниже, чем в соматосенсорной коре.

Активность нейронов поля CA1 дорзального гиппокампа, откуда мы регистрировали сигнал, связывают с пространственной памятью и извлечением контекстуальной памяти [168]. С социальным аспектом памяти в литературе последних лет связывают вентральную часть поля CA1 или поле CA2 гиппокампа [169]. В связи с этим, продолжением данного исследования может быть анализ астроцитарной Ca^{2+} активности в поле CA2 гиппокампа.

Стоит отметить, что ранее в мировой практике фотометрия использовалась, в основном, для регистрации Ca^{2+} сигналов в нейронах. Работы по регистрации астроцитарной Ca^{2+} активности из гиппокампа свободноподвижных мышей с помощью фотометрии начали появляться в мировой литературе лишь в последние три года в связи с высокой сложностью метода. С помощью оптоволокон большего, чем в нашем эксперименте, диаметра, а

следовательно, с применением более инвазивного подхода, была зарегистрирована Ca^{2+} активность в астроцитах гиппокампа, вызванная локомоцией или ударом током [28]. Двойным мечением Ca^{2+} активности в нейронах и астроцитах было изучено вовлечение этих клеток в процессы рабочей памяти при выполнении поведенческого теста в Т-лабиринте [27]. Исследование связи астроцитарной Ca^{2+} динамики в гиппокампе с социальным поведением мышей в поведенческой парадигме на социальность и социальную новизну является уникальным и проведено нами впервые в мире.

Таким образом, мы обнаружили, что Ca^{2+} активность в популяции астроцитов гиппокампа мышей, выполняющих поведенческие тесты, имеет как зависящий, так и не зависящий от локомоции компоненты.

3.4 Различия между Ca^{2+} ответами нейронов и астроцитов соматосенсорной коры на локомоцию

Локомоция, как и другие типы поведения, вызывает согласованную работу элементов активной среды мозга, одним из которых являются нейроны [1]. У млекопитающих локомоция инициируется активацией ствола мозга, который интегрирует входные сигналы более высокого порядка от базальных ганглиев и коры [75,76]. Нейронная Ca^{2+} сигнализация в основном опирается на вход Ca^{2+} в клетку через потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы плазматической мембраны, которые активируются при потенциалах действия. В то же время Ca^{2+} активность в астроцитах основана на мобилизации внутриклеточных запасов Ca^{2+} . Отличающиеся механизмы активации этих клеток создают предпосылки для различий Ca^{2+} ответов астроцитов и нейронов на локомоцию. В данной серии экспериментов мы проверили эту гипотезу.

Мы проанализировали записи, полученные с помощью двухфотонного Ca^{2+} имиджинга через хроническое краниальное окно на мышах, перемещающихся по подвижной платформе. GCaMP6f был экспрессирован под специфичными промоторами в цитоплазме астроцитов (N = 2 мыши) или нейронов (N = 2 мыши) первичной соматосенсорной коры. Ca^{2+} активность регистрировали в верхнем (L1) слое, в котором астроциты являются доминирующим типом клеток. В этом слое мы редко видели сомы нейронов, но наблюдали их многочисленные отростки. Некоторые из них можно было визуально идентифицировать как дендриты с шипиками (Рис. 47А), другие было невозможно отнести к какому-либо определенному типу (дендриты или аксоны). Астроцитарная Ca^{2+} активность в соматосенсорной коре была подробно описана в главах 3.1 и 3.2, и в данных, полученных в текущей серии экспериментов, мы наблюдали те же закономерности, поэтому примеры изображений и индивидуальных записей приведены в данной главе только для нейронов.

В периоды покоя среднее относительное изменение интенсивности флуоресценции ($\Delta F/F$) в нейронах составило 1.1 [0.4-1.4] % (n = 112 эпизодов покоя), средняя активная площадь – 1.4 [0.5-2.1] % от кадра (n = 112 эпизодов покоя). Низкие значения связаны с тем, что активность наблюдалась преимущественно в отростках, которые занимали небольшую часть кадра.

Локомоция сопровождалась повышением уровня $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в нейронах (среднее $\langle \Delta F/F \rangle$: 7.7 [5.5-10.0] %, n = 105 эпизодов локомоции; $p < 0.001$, средняя активная площадь: 10.4 [5.5-14.5]%, n = 105 эпизодов локомоции; $p < 0.001$, модель смешанных эффектов). Повышение Ca^{2+} активности, по-видимому, связано с возбуждением нейронов соматосенсорной коры при получении сенсорной информации, следствием чего является вход Ca^{2+} в клетку через потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы [114].

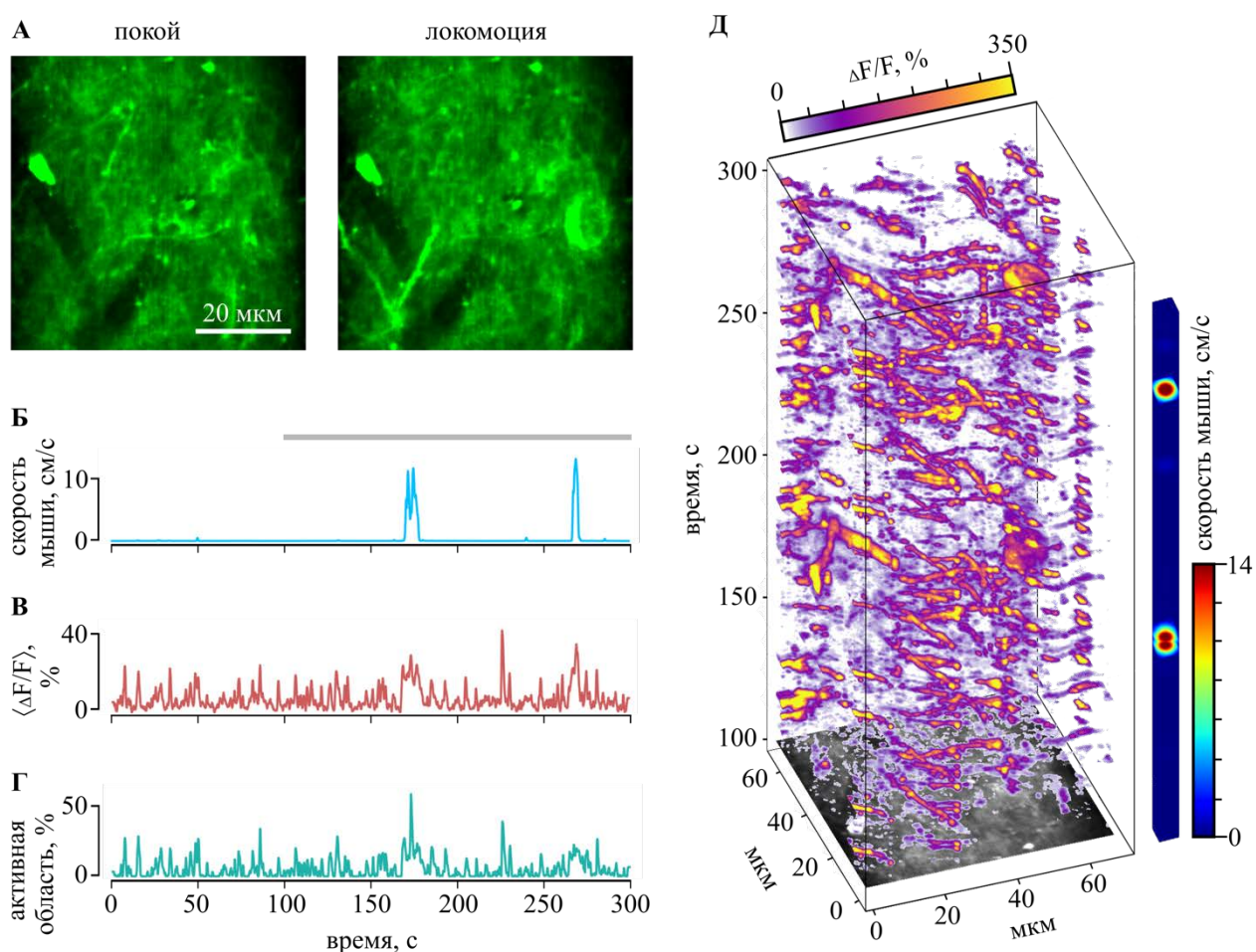


Рисунок 47. Свойства Ca^{2+} активности в нейронах соматосенсорной коры мыши при локомоции. А – Пример участка мозга, из которого были зарегистрированы записи Ca^{2+} активности в нейронах в покое (слева) и при локомоции (справа). Зеленые участки кадра – флуоресценция GCaMP6f, экспрессированного в цитоплазме нейронов. Б, В, Г – Временная динамика скорости движения мыши, изменений $\langle \Delta F/F \rangle$ и активной области соответственно. Серой линией отмечена часть записи, использованная для реконструкции, показанной на Д. Д – 3D-реконструкция (x-у-время) Ca^{2+} активности в нейронах бодрствующей мыши. Показан участок соматосенсорной коры (оси x-у, нейроны, экспрессирующие GCaMP6f, показаны белым) и реконструировано изменение $\Delta F/F$ (%) в этой области с течением времени (ось z). Интенсивность флуоресцентного сигнала закодирована цветом. Справа в виде цветовой шкалы показано изменение скорости животного, красные участки соответствуют эпизодам локомоции, синие – периодам покоя.

Мы провели сравнение параметров Ca^{2+} ответов на локомоцию между астроцитами и нейронами, оценив их выраженность (Рис. 48) и временную динамику (Рис. 49).

Измерив среднее значение $\langle \Delta F/F \rangle$ в периоды покоя и во время локомоции, мы рассчитали отношение «покой/локомоция» для этого параметра. В нейронах отношение было значительно

выше, чем в астроцитах (в нейронах: 0.17 [0.13-0.19], $n=32$ записи; в астроцитах: 0.07 [0.04-0.09], $n = 7$ записей; $p < 0.001$, критерий Манна-Уитни, Рис. 48Б).

Отношение «покой/локомоция», рассчитанное для активной области, также было значительно выше в нейронах (в нейронах: 0.15 [0.10-0.23], $n = 32$ записи; в астроцитах: 0.039 [0.036-0.061], $n = 7$ записей; $p < 0.001$, критерий Манна-Уитни, Рис. 48В). Эти результаты отражают более высокую Ca^{2+} активность в нейронах в периоды покоя мыши по сравнению с астроцитами.

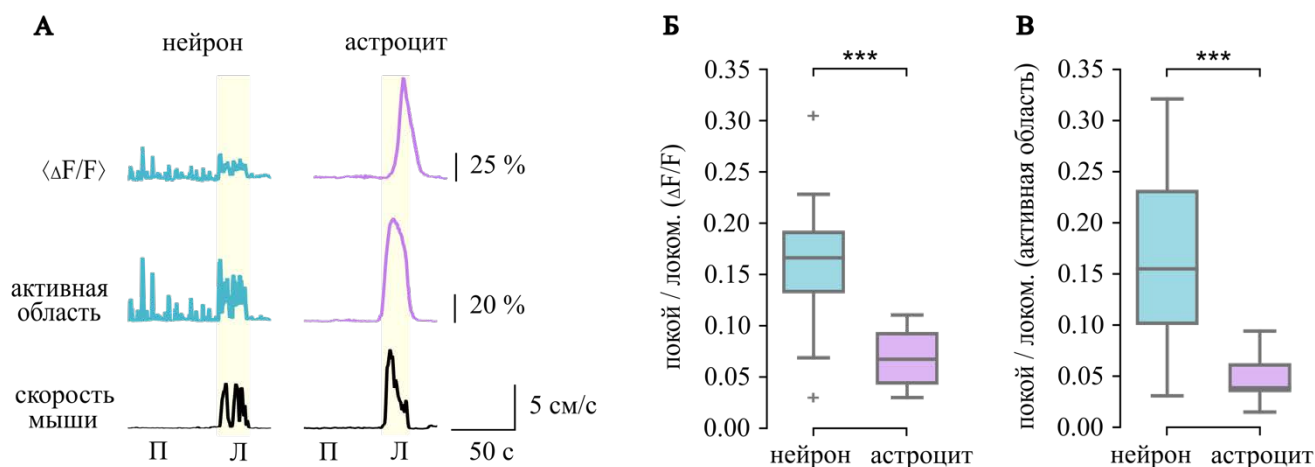


Рисунок 48. Сравнение вызванных локомоцией Ca^{2+} ответов в нейронах и астроцитах первичной соматосенсорной коры мыши. А – Кривые, демонстрирующие изменения $\langle \Delta F/F \rangle$ (вверху) и активной области (в середине) в нейронах (слева) и астроцитах (справа) в периоды покоя и локомоции, а также кривая изменения скорости движения мыши. Бежевым выделены эпизоды локомоции. Б и В – Отношение «покой/локомоция», рассчитанное для Ca^{2+} активности в нейронах ($n = 32$ записи) и астроцитах ($n = 7$ записей). *** – $p < 0.001$, критерий Манна-Уитни. П – покой, Л – локомоция.

Затем мы сравнили временную динамику развития Ca^{2+} ответов в нейронах и астроцитах по отношению к локомоции. Для этого провели кросс-корреляционный анализ между скоростью мыши и динамикой $[Ca^{2+}]_i$ ($\Delta F/F$). Кросс-корреляция дала достаточно высокие коэффициенты пиков для обоих типов клеток (в нейронах: 0.62 [0.42-0.80], $n = 25$ записей; в астроцитах: 0.83 [0.77-0.93], $n = 8$ записей; $p < 0.001$, модель смешанных эффектов, Рис. 49 А,Б). В нейронах время пика кросс-корреляции было около 0, что свидетельствует о совпадении локомоции и увеличения $[Ca^{2+}]_i$ (0.32 [-0.49-1.29] с, $n = 25$ записей, Рис. 49В). В астроцитах пик запаздывал на несколько секунд (2.50 [1.69-8.22], $n = 8$ записей; $p < 0.001$, модель смешанных эффектов, Рис. 49В).

Таким образом, повышение $[Ca^{2+}]_i$ в астроцитах задерживалось на несколько секунд относительно начала эпизода локомоции и повышения $[Ca^{2+}]_i$ в нейронах. Полученные результаты свидетельствуют о том, что активность локальной нейронной сети может не вызывать

астроцитарный Ca^{2+} сигнал. Вероятно, астроцитарный Ca^{2+} ответ возникает в результате действия нейромодуляторных подкорковых проекций, таких как НА-ергический вход из *locus coeruleus*, направленный на адренергические рецепторы, в избылии экспрессируемые в зрелых астроцитах [105,170,171]. Отсроченное повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в астроцитах может способствовать усилению локального кровотока [8], активации метаболизма [9], буферизации K^+ [172] или модулировать нейронную активность [7].

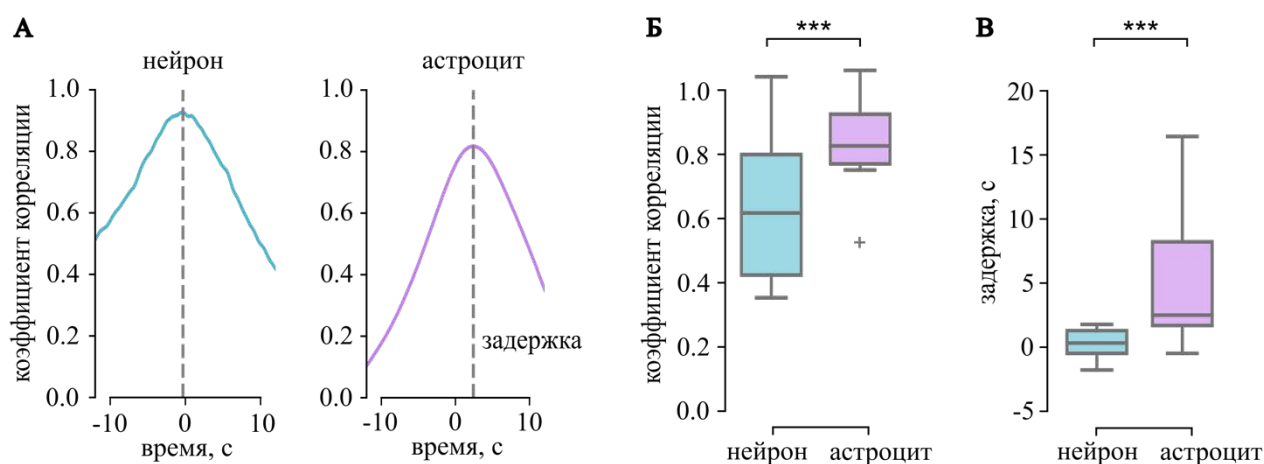


Рисунок 49. Различия временной динамики развития Ca^{2+} ответов на локомоцию в нейронах и астроцитах первичной соматосенсорной коры мыши. А – Примеры графиков кросс-корреляции между $\Delta\text{F}/\text{F}$ и скоростью животного для нейронов (слева) и астроцитов (справа) во время эпизода локомоции. Б – Пиковые значения коэффициента корреляции для нейронов ($n = 25$ записей) и астроцитов ($n = 7$ записей) для анализа, представленного на А. В – Отставание пика кросс-корреляции в нейронах ($n = 25$ записей) и астроцитах ($n = 7$ записей). *** – $p < 0.001$, модель смешанных эффектов.

Поскольку в пределах одной записи могло наблюдаться несколько последовательных эпизодов локомоции, мы сравнили Ca^{2+} ответы нейронов и астроцитов на 2 последовательных локомоторных эпизода. Для этого подбирали пары близко расположенных по времени эпизодов с интервалом менее 30 с, сопоставимых по скорости и длительности. Затем рассчитывали коэффициент парной локомоции (КПЛ) как отношение величины второго ответа к величине первого, соответствующих двум эпизодам локомоции (Рис. 50А). КПЛ для $\Delta\text{F}/\text{F}$ в нейронах был близок к 1 (0.97 [0.80-1.11], $n = 28$ парных эпизодов локомоции, Рис. 50Б), что свидетельствует о том, что нейроны реагировали повышением $[\text{Ca}^{2+}]_i$ на каждый эпизод локомоции. Напротив, КПЛ для $\Delta\text{F}/\text{F}$ в астроцитах был значительно ниже, чем в нейронах (0.29 [0.15-0.36], $n = 10$ парных эпизодов локомоции; $p < 0.001$, модель со смешанными эффектами, Рис. 50Б), что указывает на снижение астроцитарного ответа на последующую локомоцию.

Аналогичные результаты были получены для КПЛ, рассчитанного для активной области (в нейронах: 0.97 [0.80-1.30], $n = 28$ парных эпизодов локомоции; в астроцитах: 0.21 [0.14-0.64], $n = 10$ парных эпизодов локомоции, $p < 0.001$, модель со смешанными эффектами, Рис. 50В).

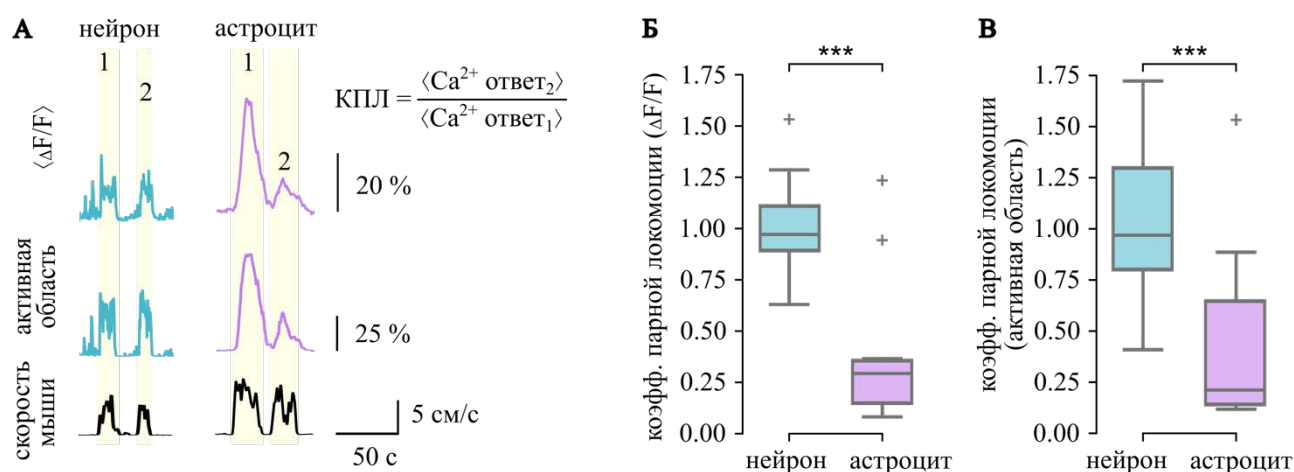


Рисунок 50. Различия коэффициента парной локомоции (КПЛ) для Ca^{2+} активности в астроцитах и нейронах первичной соматосенсорной коры мыши. Соотношение КПЛ определяется для парных эпизодов локомоции и показывает величину ответа на вторую локомоцию по отношению к величине ответа на первую локомоцию. *** – $p < 0.001$, модель смешанных эффектов, $n = 28$ парных локомоторных эпизодов для нейронов и $n = 10$ для астроцитов.

Таким образом, мы наблюдали значительные различия показателя КПЛ для астроцитов и нейронов, рассчитанного для $\Delta F/F$ и активной области. Астроциты отвечали выраженным увеличением $[Ca^{2+}]_i$ только на первую пробежку, а их ответ на последующий локомоторный эпизод был значительно снижен. В то же время ответ нейронов на второй эпизод локомоции не уменьшался. Скорее всего, это связано с механизмами генерации Ca^{2+} сигнала в этих клетках. Как было указано ранее, в нейронах вход Ca^{2+} обеспечивается, в основном, через лиганд- или потенциал-зависимые каналы плазматической мембраны [114,115]. Поскольку трансмембранный градиент Ca^{2+} быстро восстанавливается, нейроны готовы к ответу на второй эпизод локомоции. Глобальные астроцитарные Ca^{2+} -токи зависят от высвобождения Ca^{2+} из ЭПР через IP_3R и рианодиновые рецепторы. При сильной стимуляции запас Ca^{2+} в ЭПР истощается, а IP_3R инактивируются [32,33,173]. Для восстановления способности генерировать Ca^{2+} ответы астроцитам требуется значительно больше времени, чем нейронам.

Известно также, что активация GPCR сопровождается рефрактерным периодом, который определяется механизмом десенситизации/ресенситизации с участием гетеротримерного G-белкового комплекса [174,175]. Длительные периоды рефрактерности астроцитарной Ca^{2+} сигнализации могут являться признаком активации GPCR, в частности, под действием НА (например, при повторной активации оптогенетического GPCR Opto $\alpha 1AR$ наблюдается

одинаково ослабленный ответ между первой и второй активациями с интервалом в 60 секунд [176]).

Физиологическое значение рефрактерного периода астроцитарной Ca^{2+} активности может заключаться в следующем. Одним из эффектов астроцитарного Ca^{2+} является стимуляция ОФ [177]. Однако из-за особенностей организации ЭТЦ митохондрий астроцитов (неплотное распределение цитохромов) высока вероятность генерации АФК в ответ на повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [30,178]. В умеренных количествах АФК играют сигнальную роль и способствуют синаптической пластичности в мозге [134], однако в больших количествах они вызывают окислительный стресс и повреждение клеток. Поэтому рефрактерный период Ca^{2+} активности в астроцитах может быть необходим для обеспечения сигнальных эффектов АФК или предотвращения повреждения клеток.

Таким образом, Ca^{2+} ответы нейронов и астроцитов соматосенсорной коры на локомоцию принципиально отличаются. В отличие от нейронов, астроциты отвечают с задержкой, а их ответ при последующей локомоции снижается. Такая рефрактерность может быть обусловлена различными механизмами, лежащими в основе генерации астроцитарной Ca^{2+} активности.

3.5 Изменение степени оксигенации крови и диаметра кровеносных сосудов соматосенсорной коры при локомоции

Астроциты и нейроны находятся в тесной морфологической и функциональной взаимосвязи с кровеносными сосудами головного мозга, формируя совместно нейро-глио-васкулярный комплекс. Известно, что Ca^{2+} ответ астроцитов, связанный, в частности, с нейронной активностью, запускает широкий спектр сигнальных путей, один из которых – секреция астроцитарными концевыми ножками вазоактивных веществ, влияющих на диаметр кровеносных сосудов [123]. Это указывает на роль астроцитов в функциональной гиперемии (увеличении кровоснабжения органов и тканей) [124]. При этом в астроцитах повышается $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в ответ на функциональную гиперемии при сенсорной стимуляции или локомоции [20], а также в ответ на резкое снижение перфузии мозга [125]. Таким образом, астроциты являются связующим звеном между нейронами и кровеносными сосудами, передавая информацию об уровне нейронной активности в сосуды для координации доставки кислорода и глюкозы к клеткам мозга в соответствии с их энергетическими потребностями. Чтобы исследовать функциональный ответ кровеносных сосудов соматосенсорной коры мышей на локомоцию, мы оценили локальную оксигенацию крови и диаметр кровеносных сосудов в покое и при локомоции. Для этого нами был разработан уникальный методический подход, основанный на микроспектроскопии КР *in vivo*.

Мы выполнили регистрацию спектров КР от артериол и венул соматосенсорной коры мышей ($N = 6$), перемещающихся по беговой дорожке (Рис. 51А, 52А). Каждая экспериментальная запись включала периоды покоя, чередующиеся с двумя последовательными эпизодами локомоции. Локальную оксигенацию крови ($s\text{O}_2$, подробнее в п. 2.8.4) в артериолах ($n = 12$) и венулах ($n = 21$) оценивали по формуле, учитывающей изменение интенсивности пиков спектра КР, соответствующих колебаниям связей в геме оксигемоглобина (1585 см^{-1} , 1638 см^{-1}) и дезоксигемоглобина (1547 см^{-1} , 1604 см^{-1}) (Рис. 51А, 52А).

Пример спектров КР, зарегистрированных от артериолы, приведен на Рис. 51А. В покое показатель $s\text{O}_2$ в артериолах составил $95.79 [94.47-97.21] \%$. То, что кровь в артериолах не является полностью оксигенированной (не весь гемоглобин несет кислород), объясняется тем, что газообмен в тканях мозга начинается уже на уровне артериол за счет диффузии O_2 из сосудов в окружающие ткани [179]. Для статистического анализа для каждой артериолы или венулы оксигенация крови в состоянии покоя до начала движения считалась базовым уровнем, относительно которого рассчитывали %-ное изменение $s\text{O}_2$ крови при актах локомоции и покое между ними (Рис. 51В, 52В). Каждый эпизод локомоции сопровождался достоверным увеличением $s\text{O}_2$ в артериолах по отношению к состоянию покоя (локомоция 1: $101.19 [100.72-102.99] \%$, локомоция 2: $102.02 [99.81-102.41] \%$, $p < 0.01$, статистический критерий Манна-

Уитни, $n = 12$ артериол). Окончание локомоции сопровождалось возвращением sO_2 в артериолах к исходному базовому уровню (покой 1: 99,47 [98,81-101,22] %, покой 2: 99,46 [97,40-100,34] %, Рис. 51Б, В).

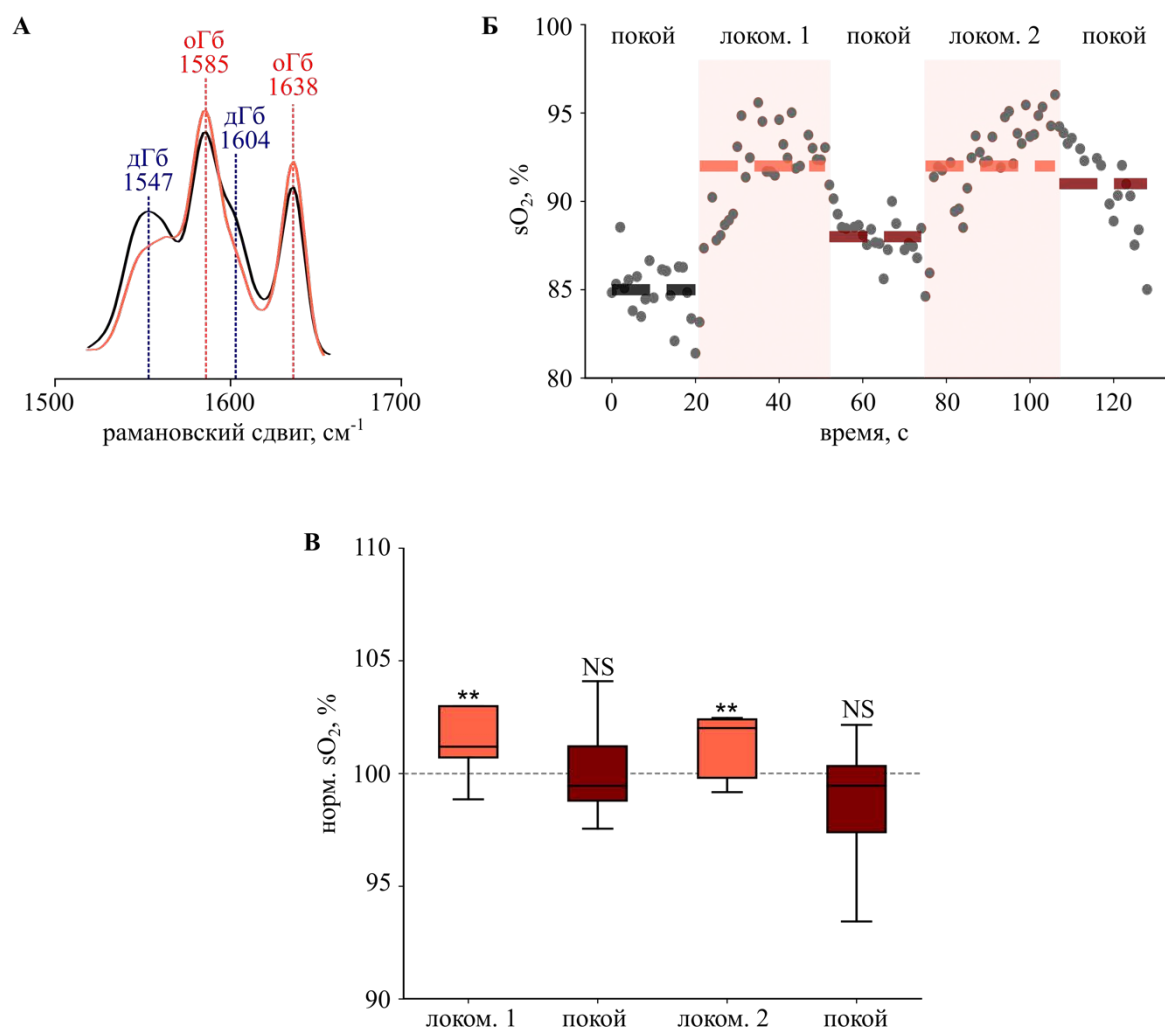


Рисунок 51. Изменение локальной оксигенации крови в артериолах первичной соматосенсорной коры мыши при локомоции. А – Спектры КР, зарегистрированные от артериолы при локомоции (красным) и в покое (черным), показан участок спектра в диапазоне $1500-1700\text{ см}^{-1}$. Над пиками спектра обозначено, каким формам гемоглобина (оксигемоглобин – оГб и дезоксигемоглобин – дГб) соответствуют основные пики. Б – Пример характерных изменений sO_2 при локомоции в артериоле. Каждое значение sO_2 рассчитано из спектра КР, зарегистрированного в указанный момент времени. Пунктиром обозначено среднее значение sO_2 . В – Сводные данные о процентном изменении sO_2 в артериолах. Пунктирной линией обозначено значение sO_2 в покое, принятое за 100%. ** – $p < 0.01$, статистический критерий Манна-Уитни, $n = 12$ артериол.

Аналогичный анализ изменений sO_2 был проведен для крови в венах соматосенсорной коры (Рис. 52). Значение в покое было ниже, чем в артериолах, и составило 68,79 [60,54-72,55] %. Как и в случае с артериолами, все эпизоды локомоции сопровождалось достоверным

повышением sO_2 в венулах (локомоция 1: 113.96 [107.10-118.14] %, локомоция 2: 114.55 [109.68-118.25] %, $p < 0.01$ и $p < 0.05$ соответственно, статистический критерий Манна-Уитни, $n = 21$ венула). После завершения первого эпизода локомоции не наблюдалось возвращения показателя к базовому уровню как минимум в течение одной минуты (106.71 [98.59-110.46] %, $p < 0.05$, статистический критерий Манна-Уитни, $n = 21$ венула, Рис. В). После окончания второго эпизода локомоции происходило снижение sO_2 до уровня в покое (107.29 [96.46-110.62] %).

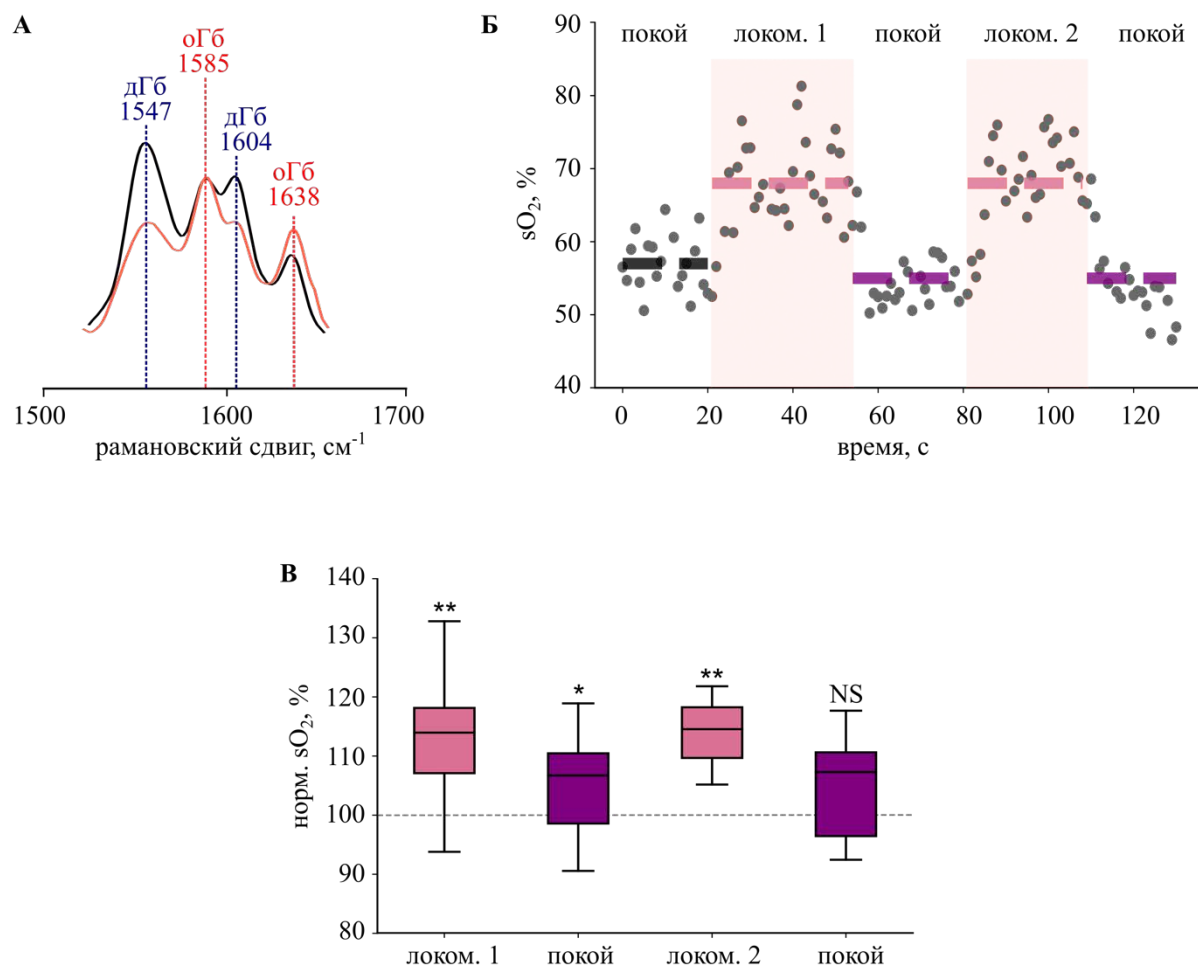


Рисунок 52. Изменение локальной оксигенации крови в венулах первичной соматосенсорной коры мыши при локомоции. А – Спектры КР, зарегистрированные от венулы при локомоции (красным) и в покое (черным), показан участок спектра в диапазоне $1500-1700\text{ см}^{-1}$. Над пиками спектра обозначено, каким формам гемоглобина (оксигемоглобин – оГб и дезоксигемоглобин – дГб) соответствуют основные пики. Б – Пример характерных изменений sO_2 при локомоции в венуле, каждое значение sO_2 рассчитано из спектра КР, зарегистрированного в указанный момент времени. Пунктиром обозначено среднее значение sO_2 . В – Сводные данные о процентном изменении sO_2 в венулах. Пунктирной линией обозначено значение sO_2 в покое, принятое за 100%. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, статистический критерий Манна-Уитни, $n = 21$ венула.

Проведя корреляционный анализ, мы обнаружили, что чем больше дезоксигемоглобина кровь содержала в состоянии покоя, то есть чем меньше показатель sO_2 был в покое, тем сильнее он изменялся при локомоции (Рис. 53).

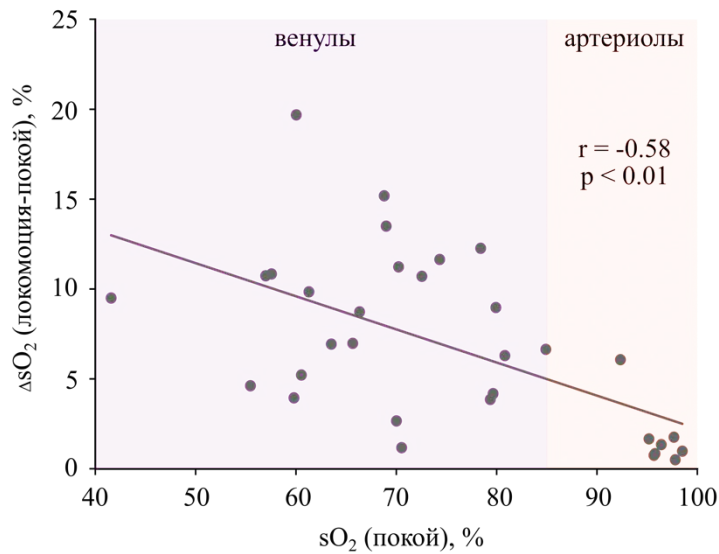


Рисунок 53. Корреляционный анализ между изменением sO_2 в кровеносных сосудах первичной соматосенсорной коры мышцы при локомоции по сравнению с состоянием покоя после локомоции и исходным значением sO_2 в покое.

Для артериол соматосенсорной коры мозга мышцы со 100%-ным значением sO_2 ($n = 7$) мы оценили изменение диаметра при локомоции и после нее по сравнению с состоянием покоя до локомоции (Рис. 54).

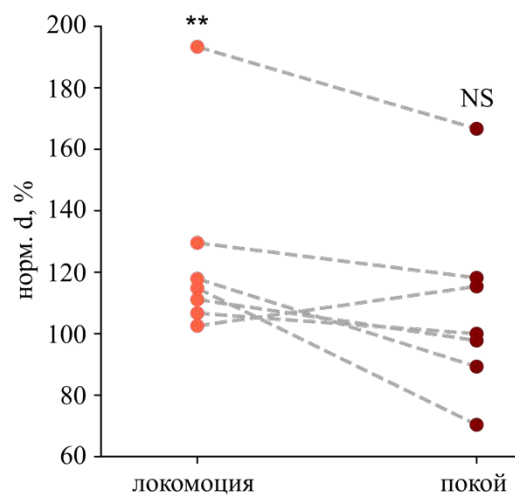


Рисунок 54. Увеличение диаметра артериол с полной оксигенацией крови в первичной соматосенсорной коре мышцы при локомоции. Исходный диаметр артериол (до локомоции) принят за 100%. По оси ординат показаны диаметры артериол при локомоции и в состоянии покоя после завершения локомоции, нормированные на исходный диаметр и выраженные в процентах. ** – $p < 0.01$, статистический критерий Манна-Уитни, $n = 7$ артериол.

При движении наблюдалось статистически достоверное увеличение относительного изменения диаметра артериол ($125 \pm 12\%$, $p < 0.01$, критерий Манна-Уитни, $n = 7$ артериол). После окончания локомоции диаметр артериол возвращался к исходному значению, не отличаясь от диаметра в покое ($108 \pm 11\%$, $p = 0.47$, критерий Манна-Уитни, данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего).

Расширение артериол со 100%-ной оксигенацией крови при локомоции, то есть кровеносных сосудов, которые доставляют кислород в мозг и в которых еще не начался процесс газообмена с тканью, позволяет заключить, что в данных условиях кислорода с кровью в мозг приходит больше, чем в условиях в покое.

Наши результаты указывают на увеличение количества оксигенированного гемоглобина и на входе в ткань мозга (артериолы), и на выходе из нее (венулы). Увеличение sO_2 в артериолах и венолах при движении может быть объяснено системным ответом организма на локомоцию. Так, физическая нагрузка сопровождается увеличением частоты сердечных сокращений [180] и учащением дыхания [181]. Исследования с использованием электрофизиологии, двухфотонной микроскопии и визуализации внутреннего оптического сигнала (используется для картирования функционального состояния мозга) показали, что локомоция сопровождается значительным увеличением нейронной активности [182], диаметра кровеносных сосудов [183], скорости и объема мозгового кровотока в соматосенсорной коре мышей [184]. Можно предположить, что поскольку скорость кровотока возрастает, эритроциты успевают отдать в ткань меньшее количество кислорода в единицу времени по сравнению с состоянием покоя, следствием чего является повышение sO_2 в венолах. В то же время расширение артериол может способствовать тому, что при локомоции в единицу времени через сечение артериолы может проходить большее количество эритроцитов с оксигемоглобином, несущим кислород, чем проходило в покое. Зарегистрированное нами повышение sO_2 в артериолах соматосенсорной коры при локомоции может являться следствием этих процессов.

Кроме того, поскольку показатель sO_2 при локомоции повышался как в артериолах, так и в венолах, а артериолы со 100%-ной оксигенацией расширялись, наши данные могут указывать на то, что при локомоции кислород поступает в мозг в количестве, большем, чем необходимо для поддержания его метаболического состояния. Вероятно, физиологическое значение поступления избыточного количества кислорода с кровью в мозг при локомоции может заключаться в предотвращении развития гипоксии в мозге и, следовательно, поддержании его нормального функционирования.

Мы оценили функциональный ответ кровеносных сосудов соматосенсорной коры на последовательные эпизоды локомоции. Для этого сравнили значения sO_2 при первом и втором эпизодах локомоции, рассчитав показатель КПЛ (Рис. 55). КПЛ рассчитывался по формуле: $\text{КПЛ} = \langle sO_2 \rangle_2 / \langle sO_2 \rangle_1$, где $\langle sO_2 \rangle_1$ – среднее значение sO_2 при первой локомоции; $\langle sO_2 \rangle_2$ – среднее значение sO_2 при второй локомоции в той же записи.

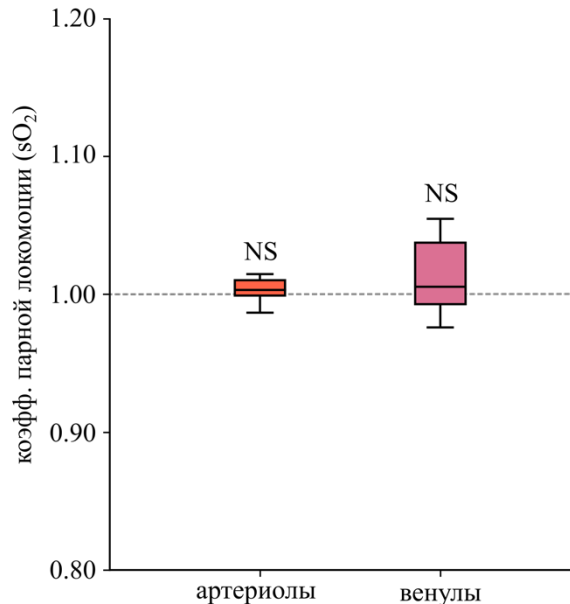


Рисунок 55. Коэффициент парной локомоции (КПЛ) для локальной оксигенации крови в артериолах и венулах первичной соматосенсорной коры мыши. Соотношение КПЛ определено для парных эпизодов локомоции и показывает величину ответа на вторую локомоцию по отношению к величине ответа на первую локомоцию. Критерий Манна-Уитни, $n = 10$ и $n = 15$ парных эпизодов локомоции для артериол и венул соответственно.

Значение КПЛ было приближено к единице как для артериол (1.003 [1.000-1.011], $n = 10$ парных эпизодов локомоции), так и для венул (1.006 [0.993-1.038], $n = 15$ парных эпизодов локомоции), то есть показатель sO_2 повышался при каждой локомоции в обоих типах кровеносных сосудов.

В то же время, согласно нашим данным, КПЛ для Ca^{2+} активности в астроцитах был значительно меньше единицы, и на второй эпизод локомоции астроциты отвечали сниженным по амплитуде Ca^{2+} ответом. При этом известно, что локальный мозговой кровоток может регулироваться вазоактивными агентами, выделяемыми астроцитами [123]. Следовательно, наши данные могут свидетельствовать о том, что Ca^{2+} активность в астроцитах может не являться основным компонентом, регулирующим доставку кислорода в мозг. Вероятно, доминирующий вклад в увеличение sO_2 вносит системный ответ организма на локомоцию, сопровождающийся учащением сердцебиения и дыхания.

Можно предположить, что такая адаптивная реакция организма несет защитную функцию. Так, если бы вазодилатация постоянно зависела от Ca^{2+} активности в астроцитах, имеющей рефрактерный период, то тогда в течение рефрактерности мозг мог бы испытывать гипоксию.

Следует отметить, что в большинстве исследований гемодинамики применяются агенты, позволяющие контрастировать сосуды мозга (например, декстран). Разработанный нами подход на основе рамановской микроспектроскопии не требует окрашивания сосудов и, что очень важно, позволяет идентифицировать тип сосуда (артериола или венула) и получить количественное значение локальной оксигенации крови, что дает преимущество перед остальными методиками.

Таким образом, локальная оксигенация крови увеличивается при каждом акте локомоции как в артериолах, так и в венах соматосенсорной коры мышей, причем изменение более выражено в венах. Полученные данные об увеличении $s\text{O}_2$ в венах и расширении артериол при локомоции могут свидетельствовать о том, что в мозг поступает избыточное количество кислорода с кровью и он не испытывает гипоксии в этих условиях.

3.6 Различия между метаболическими ответами астроцитов и нейронов соматосенсорной коры на локомоцию

Зарегистрированное нами увеличение sO_2 в кровеносных сосудах мозга и расширение артериол при локомоции может указывать на то, что количество кислорода, поступающего в ткань мозга, тоже меняется. Кислород выступает конечным акцептором электронов в дыхательной цепи митохондрий клеток, являющейся местом осуществления ОФ. ОФ может активироваться под воздействием Ca^{2+} , поступающего в митохондрии при повышении $[Ca^{2+}]_i$ [14]. Различия Ca^{2+} ответов астроцитов и нейронов на локомоцию позволили нам предположить, что их метаболические ответы, оцененные по редокс-состоянию дыхательной цепи их митохондрий, также могут отличаться. Чтобы проверить данную гипотезу, мы исследовали редокс-состояние ЭТЦ митохондрий астроцитов и нейронов *in vivo* при помощи метода рамановской микроспектроскопии.

Мы провели регистрацию спектров КР от астроцитов и нейронов бодрствующих мышей, находящихся на беговой дорожке ($N = 11$). Пример спектров КР, зарегистрированных от клеток первичной соматосенсорной коры животных, находившихся в покое, представлен на Рис. 56А.

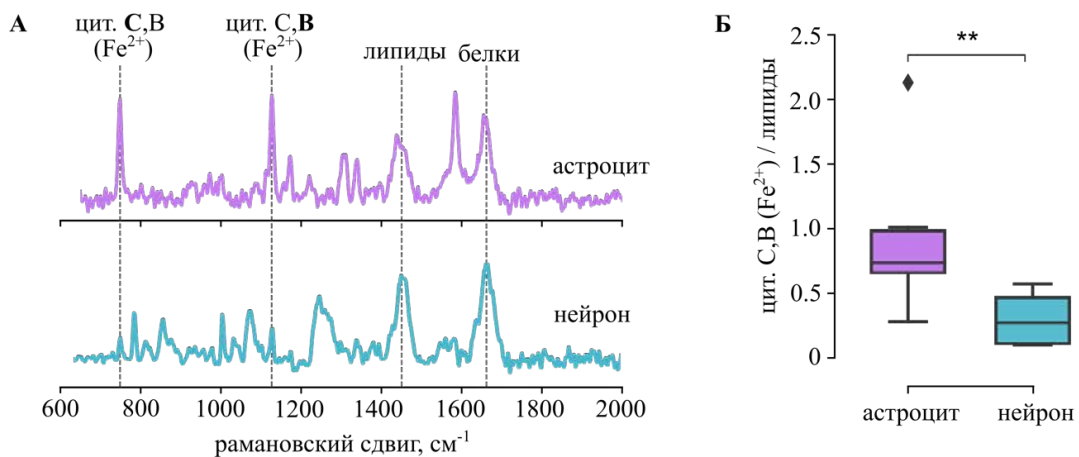


Рисунок 56. Состояние дыхательной цепи митохондрий астроцитов и нейронов первичной соматосенсорной коры мышей в покое. А – Примеры спектров КР, зарегистрированных от идентифицированных астроцита (GFP-экспрессирующего) и нейрона (NirFP-экспрессирующего). Пунктирными линиями обозначены пики, соответствующие цитохромам С- и В-типа, белкам и липидам. Б – Сводные данные об относительном содержании восстановленных цитохромов в дыхательной цепи митохондрий астроцитов и нейронов, рассчитанным по формуле $I_{750}/I_{1440} = \text{цит. С,В (Fe}^{2+})/\text{липиды}$, где I_{750} и I_{1440} – интенсивности пиков, связанных с колебаниями связей гема в указанных цитохромах и связей С-С в липидах соответственно. Отложены медианы и квартили 25% и 75%. ** – $p < 0.01$, статистический критерий Манна-Уитни, $n = 6$ астроцитов и $n = 6$ нейронов.

Чтобы оценить состояние дыхательной цепи, производили нормирование интенсивности цитохромного пика (с положением максимума на 750 см^{-1}) на интенсивность пика, соответствующего колебанию С-С связей в молекулах липидов (пик с положением максимума на 1440 см^{-1}). Относительное содержание восстановленных цитохромов С- и В-типа в покое достоверно отличалось для астроцитов ($0.71 [0.27-1.03]$, $n = 6$ астроцитов) и нейронов (медиана $0.23 [0.15-0.61]$, $n = 6$ нейронов, $p < 0.01$, критерий Манна-Уитни, Рис. 56Б).

Поведенческая парадигма включала два последовательных эпизода локомоции, чередующихся с периодами покоя. При локомоции происходило изменение редокс-состояния дыхательной цепи митохондрий как астроцитов, так и нейронов (Рис. 57, 58).

В нейронах мы наблюдали достоверное снижение относительного содержания восстановленных цитохромов С- и В-типа относительно показателя в покое, принятого за 100% (Рис. 57). Ответ был выражен при каждом эпизоде локомоции (локомоция 1: $46.0 [37.5-49.25]\%$, локомоция 2: $54.5 [48.0-60.3]\%$, $n = 6$ записей, $p < 0.01$, критерий Манна-Уитни, Рис. 57Б). Завершение каждого эпизода сопровождалось возвращением исследуемого параметра к исходному значению до начала движения. Следовательно, при локомоции в дыхательной цепи нейронов происходило снижение количества электронов, что может указывать на отсутствие гипоксии в ткани мозга при функциональной нагрузке этого типа.

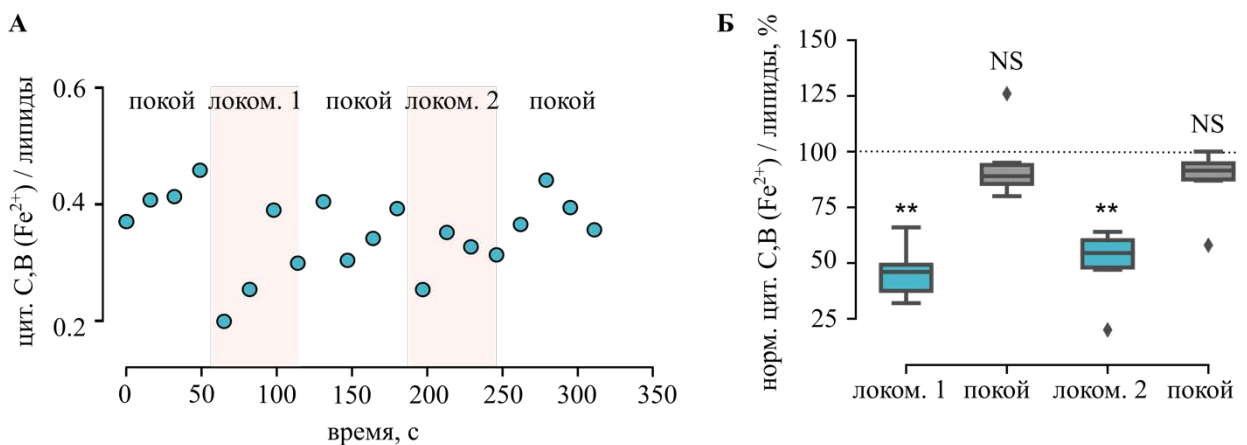


Рисунок 57. Уменьшение относительного содержания восстановленных цитохромов С- и В-типа в дыхательной цепи митохондрий нейронов первичной соматосенсорной коры при локомоции. А – Динамика изменения относительного содержания восстановленных цитохромов С и В-типа в нейронах в одной экспериментальной записи. Кружками обозначены значения относительного содержания восстановленных цитохромов С- и В-типа, рассчитанные для каждого спектра КР, зарегистрированного в указанный момент времени от выбранного нейрона. Б – Сводные данные об относительном содержании восстановленных цитохромов, значение в покое принято за 100% (пунктирная линия). Отложены медианы и квартили 25% и 75%. ** – $p < 0.01$, статистический критерий Манна-Уитни, $N = 5$ мышей, $n = 6$ записей.

Метаболический ответ астроцитов соматосенсорной коры на локомоцию отличался от ответа нейронов (Рис. 58). Относительное содержание восстановленных цитохромов в ЭТЦ митохондрий астроцитов при локомоции достоверно увеличивалось, составляя 157.5 [145-182] % ($n = 8$ записей, $p < 0.01$, критерий Манна-Уитни, Рис. 58Б). При этом завершение локомоции сопровождалось возвращением показателя к исходному уровню (108.0 [106.3-147.3] %, $n = 8$ записей, критерий Манна-Уитни, Рис. Б) и не изменялось при последующем эпизоде локомоции. Увеличение относительного содержания восстановленных цитохромов С и В-типа в ЭТЦ митохондрий астроцита при локомоции свидетельствует о возрастании загрузки ЭТЦ электронами. Наблюдаемое увеличение заполнения электронами ЭТЦ астроцитов при локомоции, вероятно, не является следствием нехватки кислорода, поскольку данные об изменении sO_2 в кровеносных сосудах мозга и редокс-состоянии ЭТЦ нейронов указывают на отсутствие гипоксии в мозге. Следовательно, наблюдаемый метаболический ответ астроцитов развивался в результате других внутриклеточных процессов.

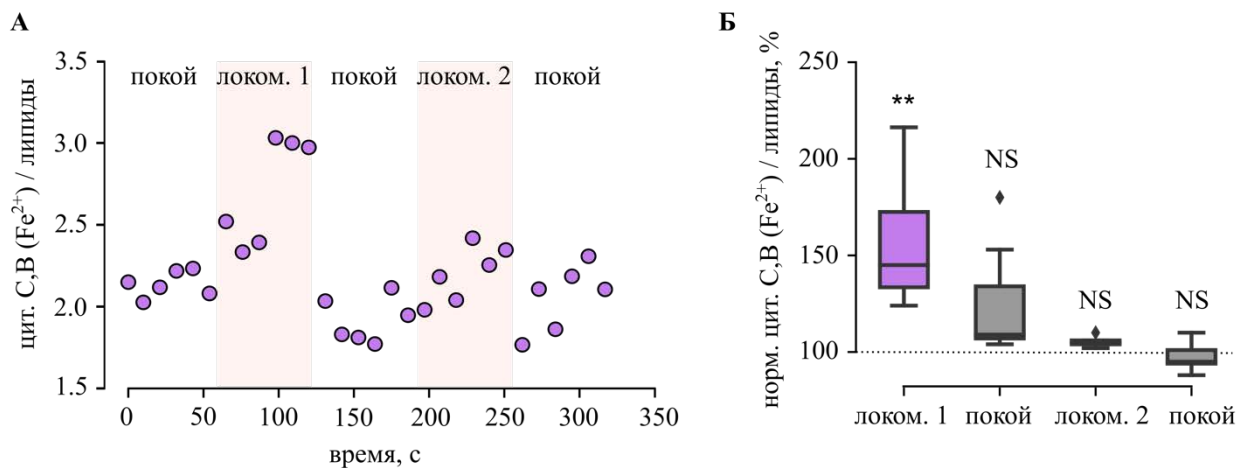


Рисунок 58. Увеличение относительного содержания восстановленных цитохромов С- и В-типа в дыхательной цепи митохондрий астроцитов первичной соматосенсорной коры при локомоции. А – Динамика изменения относительного содержания восстановленных цитохромов С и В-типа в астроцитах в одной экспериментальной записи. Кружками обозначены значения относительного содержания восстановленных цитохромов С- и В-типа, рассчитанные для каждого спектра КР, зарегистрированного в указанный момент времени от выбранного астроцита. Б – Сводные данные об относительном содержании восстановленных цитохромов С- и В-типа, значение в покое принято за 100% (пунктирная линия). Отложены медианы и квартили 25% и 75%. ** – $p < 0.01$, статистический критерий Манна-Уитни, $N = 6$ мышей, $n = 8$ записей.

Ранее мы показали, что Ca^{2+} активность в нейронах возрастает в ответ на каждый эпизод локомоции, в то время как в астроцитах увеличение $[Ca^{2+}]_i$ выражено лишь на первый эпизод и снижено по амплитуде при последующем локомоторном эпизоде. Поскольку концентрация Ca^{2+}

может влиять активность дыхательной цепи, мы провели аналогичный анализ для относительного содержания восстановленных цитохромов типа С- и В- в дыхательной цепи астроцитов и нейронов, рассчитав показатель КПЛ (Рис. 59). КПЛ рассчитывался по формуле: $\text{КПЛ} = \langle \Delta \text{цит. С,В (Fe}^{2+}) / \text{липиды}_{\text{локом.2 - покой}} \rangle / \langle \Delta \text{цит. С,В (Fe}^{2+}) / \text{липиды}_{\text{локом.1 - покой}} \rangle$, где $\langle \Delta \text{цит. С,В (Fe}^{2+}) / \text{липиды}_{\text{локом.1 - покой}} \rangle$ – разность между средними значениями относительного содержания восстановленных цитохромов при первой локомоции и в покое; $\langle \Delta \text{цит. С,В (Fe}^{2+}) / \text{липиды}_{\text{локом.2 - покой}} \rangle$ – то же самое для второй локомоции в этой записи.

Значение КПЛ было приближено к единице для нейронов (0.7 [0.74-0.98], n = 6 парных эпизодов локомоции), что указывает на отсутствие значимых изменений в скорости и эффективности транспорта электронов в их дыхательной цепи при последующем эпизоде локомоции. Вероятно, это отражает подстройку работы ЭТЦ под изменение энергетических потребностей нейронов при локомоции, поскольку большая часть энергии мозга расходуется на поддержание потенциалов действия и постсинаптических токов [185].

У астроцитов, напротив, показатель КПЛ был близок к нулю (0.08 [0.06-0.13], n = 6 парных эпизодов локомоции) и достоверно отличался от КПЛ для нейронов ($p < 0.01$, критерий Манна-Уитни), что соотносится со сниженным Ca^{2+} ответом на второй эпизод локомоции.

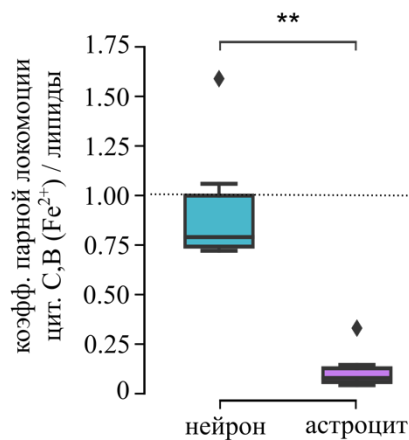


Рисунок 59. Различия коэффициента парной локомоции (КПЛ) для относительного содержания восстановленных цитохромов С- и В-типа в ЭТЦ митохондрий астроцитов и нейронов первичной соматосенсорной коры мыши. Соотношение КПЛ определено для парных эпизодов локомоции и показывает величину ответа на вторую локомоцию по отношению к величине ответа на первую локомоцию (с нормированием на значение в покое). ** – $p < 0.01$, критерий Манна-Уитни, n = 6 парных эпизодов локомоции для нейронов и n = 6 для астроцитов.

Таким образом, редокс-состояние дыхательной цепи митохондрий астроцитов и нейронов отличалось как в покое, так и при локомоции. Относительное содержание восстановленных цитохромов С- и В-типа во время активного движения возрастало в астроцитах и уменьшалось в

нейронах, указывая на различные механизмы, вовлекаемые в метаболический ответ этих клеток. Это может быть связано с несколькими факторами.

Имеются данные о том, что дыхательная цепь митохондрий нейронов и астроцитов организована по-разному [30]. Организация ЭТЦ в нейронах в виде суперкомплекса (респирасомы) создает условия для эффективной работы ЭТЦ, выраженной в ускорении транспорта электронов. Скорость транспорта электронов по дыхательной цепи может модулироваться под влиянием нескольких факторов: разности потенциалов на внутренней митохондриальной мембране, зависящей от транспорта протонов через внутреннюю мембрану митохондрий, количества поступающих в ЭТЦ доноров электронов (НАДН, ФАДН₂ из цикла Кребса) и количества акцепторов электронов (кислород). Следовательно, возможное увеличение количества кислорода, служащего акцептором электронов, может выступать дополнительным фактором, способствующим ускорению ОФ в нейронах. Более эффективная работа ЭТЦ может быть необходима для приведения количества синтезируемых молекул АТФ в соответствие с энергетическими потребностями нейронов. Энергия АТФ может быть использована для восстановления нарушенных при локомоции мембранных градиентов Na⁺ и K⁺ за счет работы Na⁺/K⁺-АТФ-азы.

В астроцитах, напротив, митохондрии характеризуются ЭТЦ с разрозненным расположением комплексов, следствием чего может являться замедление электронного транспорта [30]. С одной стороны, можно предположить, что наблюдающееся при локомоции повышение [Ca²⁺]_i приводит к активации гликолиза в астроцитах, следствием чего является увеличенное производство «гликолизного» АТФ [9]. Поскольку в клетке существует баланс между гликолизом и ОФ, следствием повышения количества АТФ, образованного в результате гликолиза, может являться субстратное ингибирование АТФ-синтазы дыхательной цепи митохондрий [186]. С другой стороны, ионы Ca²⁺, поступившие в митохондрии из цитоплазмы, могут активировать ферменты цикла Кребса. Это также может вызывать увеличенную продукцию НАДН и поступление большего числа электронов в ЭТЦ и ее повышенную загрузку электронами [186]. Следствием замедления активности АТФ-синтазы и избыточного количества первичных доноров электронов (НАДН) может являться накопление протонов в межмембранном пространстве митохондрий и дополнительное замедление электронного транспорта. Это, в свою очередь, может стать причиной повышения генерации супероксида-анион радикала O₂⁻ с последующим образованием других АФК [178], которые могут выполнять сигнальную роль, участвуя в регуляции метаболизма мозга и нейронной активности [187].

Вероятно, в нейронах активация цикла Кребса под действием Ca²⁺ не приводит к замедлению электронного транспорта вследствие того, что ЭТЦ нейронов устроена как респирасома, обеспечивающая быстрый транспорт электронов. Кроме того, ОФ в нейронах –

основной способ получения АТФ, поэтому при локомоции или других способах активации нейронов резко увеличивается потребление АТФ. Это ускоряет работу АТФ-синтазы, увеличивая использование протонов, накапливающихся в межмембранном пространстве митохондрий, и, таким образом, обеспечивая более эффективный транспорт электронов в ЭТЦ.

Можно предположить, что изменение редокс-состояния митохондрий астроцитов при локомоции модулируется нейронной активностью. Так, существует гипотеза лактатного шаттла между астроцитами и нейронами, которая предполагает, что активность нейронов приводит к Ca^{2+} -индуцированному усилению гликолиза в астроцитах. Вследствие этого пируват в астроцитах превращается в лактат, который затем транспортируется в нейроны и используется ими для превращения в пируват. Пируват впоследствии используется в цикле Кребса для обеспечения ЭТЦ электронами [188].

Исходя из этих рассуждений можно заключить, что астроциты способны подстраивать свой метаболизм под энергетические потребности нейронов.

Таким образом, мы показали, что астроциты и нейроны могут отвечать на изменение энергетических потребностей мозга при локомоции, перестраивая работу ЭТЦ. Локомоция приводит к повышению заполненности электронами ЭТЦ астроцитов и снижению этого показателя в нейронах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе впервые проведено комплексное исследование изменения активности соматосенсорной коры мыши при локомоции, включающее анализ ответов на локомоцию астроцитов, нейронов и кровеносных сосудов, формирующих единую морфофункциональную систему (Рис. 60).

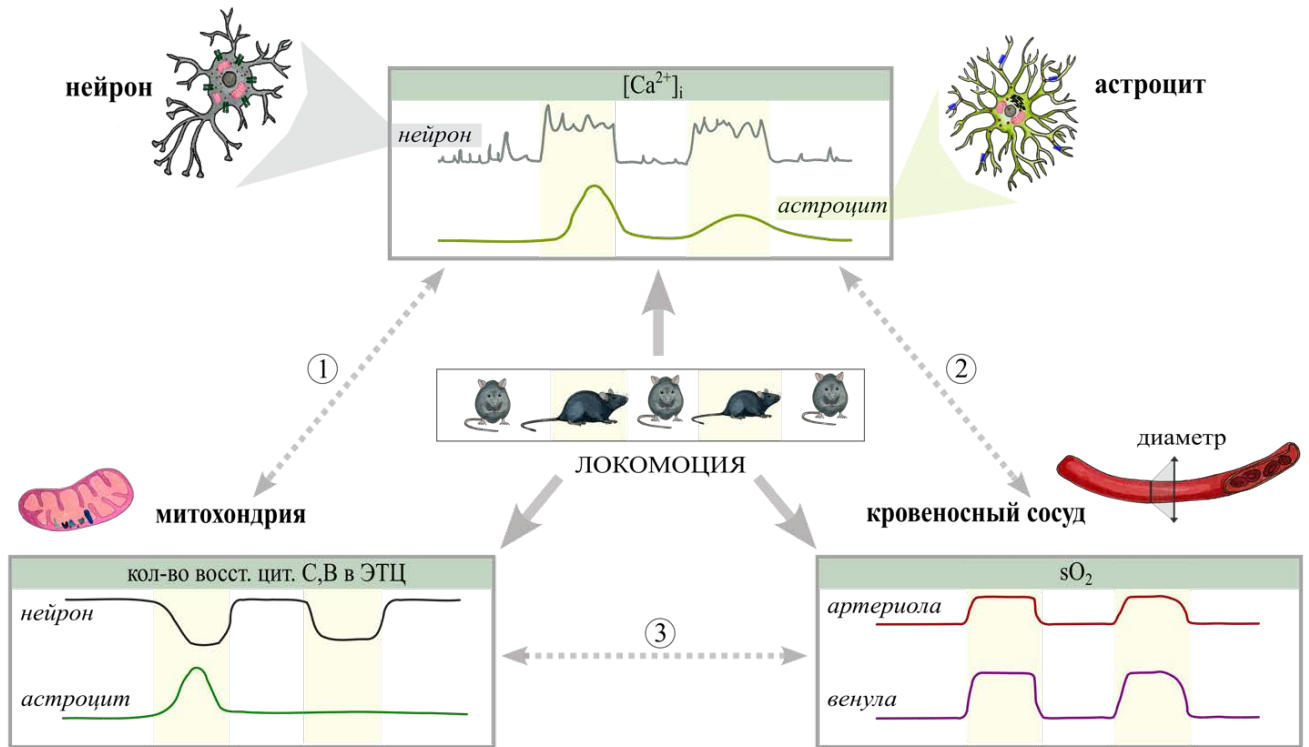


Рисунок 60. Схема, отражающая согласованный ответ взаимосвязанных элементов активной среды мозга мыши на локомоцию. Продемонстрированы отличия Ca^{2+} и метаболических ответов астроцитов и нейронов на последовательные эпизоды локомоции (обозначены бежевым), а также изменение степени оксигенации крови в артериолах и венах и расширение артериол в этих условиях. Пунктирными стрелками указана взаимосвязь между Ca^{2+} активностью в астроцитах и нейронах, функционированием митохондрий и кровеносных сосудов.

В мозге все клеточные элементы, меж- и внутриклеточные сигнальные процессы взаимосвязаны. Митохондрии являются внутриклеточными депо Ca^{2+} и могут вовлекаться в Ca^{2+} динамику, высвобождая Ca^{2+} в цитоплазму клеток [13]. С другой стороны, вход Ca^{2+} в митохондрии может активировать цикл Кребса в астроцитах и нейронах [29] и модулировать активность ЭТЦ митохондрий этих клеток [14] (Рис. 60, стрелка 1). В ответ на повышение $[Ca^{2+}]_i$ астроциты высвобождают вазоактивные молекулы через концевые ножки, что может приводить к расширению сосудов и увеличению местного кровотока [123]. В свою очередь, повышение астроцитарной Ca^{2+} активности может возникать вследствие механической стимуляции при

изменении диаметра кровеносных сосудов [149], в ответ на функциональную гиперемию или при резком снижении перфузии мозга [20] (Рис. 60, стрелка 2). Кислород, поступающий из крови в ЭТЦ митохондрий, является неотъемлемой частью метаболического процесса ОФ, выступая в роли конечного акцептора электронов в дыхательной цепи. Наконец, при повышении загрузки ЭТЦ электронами возможен синтез NO, который, выходя в кровеносное русло, способен вызывать вазодилатацию [189] (Рис. 60, стрелка 3).

Впервые в данной работе в условиях *in vivo* нам удалось выявить принципиальные отличия Ca^{2+} и метаболических ответов астроцитов и нейронов на локомоцию [190]. Для детального анализа Ca^{2+} активности мы предложили использовать дополнительные к интегральной характеристике $\Delta F/F$ параметры: активную площадь, среднюю площадь Ca^{2+} сегмента и плотность Ca^{2+} сегментов. Мы обнаружили, что данные параметры обладают различной временной динамикой при ответе астроцитов на локомоцию. Пространственный паттерн Ca^{2+} ответа популяции астроцитов был сходным для различных локомоторных эпизодов.

В дополнительной серии экспериментов по регистрации Ca^{2+} динамики в астроцитах гиппокампа мы показали, что Ca^{2+} активность может иметь не связанный с локомоцией компонент.

Мы проследили развитие Ca^{2+} ответа на уровне отдельного астроцита и выявили, что аналогично интеграции нейронами синаптических входов в последовательность потенциалов действия астроциты также обладают интегративной функцией, проявляющейся в распространении Ca^{2+} активности от дистальных отростков в сому, где происходит усиление Ca^{2+} сигнала и генерация осцилляций $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Мы впервые продемонстрировали наличие осцилляций в соме астроцитов *in vivo* [190].

Разработанный нами подход на основе рамановской микроспектроскопии [191] позволил получить сведения об изменениях локальной оксигенации крови в артериолах и венулах соматосенсорной коры при локомоции. Выявленное повышение $s\text{O}_2$ в венулах и расширение артериол соматосенсорной коры при локомоции могут свидетельствовать о том, что в мозг поступает большее количество кислорода с кровью, чем ему требуется.

Мы впервые получили данные о противоположно направленных изменениях редокс-состояния ЭТЦ митохондрий астроцитов и нейронов *in vivo*.

В целом можно заключить, что обнаруженные в результате данного исследования закономерности вносят вклад в понимание принципиально разных типов Ca^{2+} сигнализации в астроцитах и нейронах коры головного мозга. В совокупности с полученными о состоянии дыхательной цепи данными это способствует пониманию вклада каждого типа клеток в обеспечение работы мозга.

Будущие исследования должны быть направлены на применение генетически кодируемых флуоресцентных биосенсоров и опто-/хемогенетических инструментов для управления Ca^{2+} активностью в астроцитах и оценке функциональных эффектов астроцитарной Ca^{2+} активности в различных пространственно-временных масштабах. Предметом дальнейших исследований в отношении метаболизма астроцитов и нейронов может служить детальное рассмотрение молекулярных механизмов, в частности, проведение ингибиторного анализа для оценки вклада ОФ в метаболические процессы в этих клетках при различных функциональных состояниях мозга.

ВЫВОДЫ

1. Локомоция вызывает отсроченный Ca^{2+} ответ в популяции астроцитов первичной соматосенсорной коры мыши, воспроизводящийся от одного эпизода локомоции к другому. Параметры Ca^{2+} активности ($\Delta F/F$, активная площадь, средняя площадь Ca^{2+} сегмента, плотность Ca^{2+} сегментов) имеют различную временную динамику.
2. Ca^{2+} ответ на локомоцию начинается в дистальных астроцитарных отростках и интегрируется в соме, где происходит его усиление и генерация осцилляций $[\text{Ca}^{2+}]_i$.
3. Ca^{2+} активность в популяции астроцитов гиппокампа мышей, выполняющих поведенческие тесты, имеет как зависящий, так и не зависящий от локомоции компоненты.
4. Ca^{2+} ответы нейронов и астроцитов на локомоцию принципиально отличаются. В отличие от нейронов, астроциты отвечают с задержкой и их ответ снижается при последующей локомоции.
5. Локомоция обратимо повышает степень оксигенации крови в артериолах и венулах первичной соматосенсорной коры, что сопровождается увеличением диаметра артериол.
6. Локомоция приводит к повышению заполненности электронами ЭТЦ в астроцитах и снижению в нейронах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Semyanov A., Verkhratsky A. Astrocytic processes: from tripartite synapses to the active milieu // *Trends Neurosci*, 2021. Vol. 44, № 10. P. 781–792.
2. Fedotova A.A., Tiaglik A.B., Semyanov A. V. Effect of Diet as a Factor of Exposome on Brain Function // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 202. Vol. 57, № 3. P. 577–604.
3. Popov A. et al. Caloric restriction triggers morphofunctional remodeling of astrocytes and enhances synaptic plasticity in the mouse hippocampus // *Cell Death Dis*, 2020. Vol. 11, № 3.
4. Popov A. et al. A high-fat diet changes astrocytic metabolism to promote synaptic plasticity and behavior // *Acta Physiol*, 2022. Vol. 236, № 1. P. e13847.
5. Semyanov A., Henneberger C., Agarwal A. Making sense of astrocytic calcium signals - from acquisition to interpretation // *Nat Rev Neurosci*, 2020. Vol. 21, № 10. P. 551–564.
6. Bazargani N., Attwell D. Astrocyte calcium signaling: the third wave // *Nat Neurosci*, 2016. Vol. 19, № 2. P. 182–189.
7. Henneberger C. et al. Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes // *Nature*, 2010. Vol. 463, № 7278. P. 232-236.
8. Lind B.L. et al. Rapid stimulus-evoked astrocyte Ca²⁺ elevations and hemodynamic responses in mouse somatosensory cortex in vivo // *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. Vol. 110, № 48. P. e4678.
9. Horvat A. et al. Ca²⁺ as the prime trigger of aerobic glycolysis in astrocytes // *Cell Calcium*, 2021. Vol. 95. P. 102368.
10. Guerra-Gomes S. et al. Functional Roles of Astrocyte Calcium Elevations: From Synapses to Behavior // *Front Cell Neurosci*, 2017. Vol. 11. P. 427.
11. Kofuji P., Araque A. Astrocytes and Behavior // *Annu Rev Neurosci*, 2021. Vol. 44. P. 49–67.
12. Lyon K.A., Allen N.J. From Synapses to Circuits, Astrocytes Regulate Behavior // *Front Neural Circuits*, 2022. Vol. 15. P. 136.
13. Denton R.M., McCormack J.G. Ca²⁺ transport by mammalian mitochondria and its role in hormone action // *Am J Physiol*, 1985. Vol. 249, № 6 Pt 1.
14. Görlach A. et al. Calcium and ROS: A mutual interplay // *Redox Biol*, 2015. Vol. 6. P. 260–271.
15. Almeida A., Jimenez-Blasco D., Bolaños J.P. Cross-talk between energy and redox metabolism in astrocyte-neuron functional cooperation // *Essays Biochem*, 2023. Vol. 67, № 1. P. 17–26.
16. Oliveira J.F. et al. Do stars govern our actions? Astrocyte involvement in rodent behavior // *Trends Neurosci*, 2015. Vol. 38, № 9. P. 535–549.
17. Lim E.Y., Ye L., Paukert M. Potential and Realized Impact of Astroglia Ca²⁺ Dynamics on Circuit Function and Behavior // *Front Cell Neurosci*, 2021. Vol. 15. P. 194.
18. Bojarskaite L. et al. Astrocytic Ca²⁺ signaling is reduced during sleep and is involved in the regulation of slow wave sleep // *Nat Commun*, 2020. Vol. 11, № 1.
19. Nimmerjahn A., Mukamel E.A., Schnitzer M.J. Motor behavior activates Bergmann glial networks // *Neuron*, 2009. Vol. 62, № 3. P. 400–412.
20. Tran C.H.T., Peringod G., Gordon G.R. Astrocytes Integrate Behavioral State and Vascular Signals during Functional Hyperemia // *Neuron*, 2018. Vol. 100, № 5. P. 1133-1148.e3.

21. Paukert M. et al. Norepinephrine controls astroglial responsiveness to local circuit activity // *Neuron*, 2014. Vol. 82, № 6. P. 1263.
22. Dombeck D.A. et al. Imaging large-scale neural activity with cellular resolution in awake, mobile mice // *Neuron*, 2007. Vol. 56, № 1. P. 43–57.
23. Kislin M. et al. Flat-floored air-lifted platform: a new method for combining behavior with microscopy or electrophysiology on awake freely moving rodents // *J Vis Exp*, 2014. № 88.
24. Villette V. et al. Internally Recurring Hippocampal Sequences as a Population Template of Spatiotemporal Information // *Neuron*, 2015. Vol. 88, № 2. P. 357–366.
25. Helmchen F. et al. A miniature head-mounted two-photon microscope. high-resolution brain imaging in freely moving animals // *Neuron*, 2001. Vol. 31, № 6. P. 903–912.
26. Aravanis A.M. et al. An optical neural interface: in vivo control of rodent motor cortex with integrated fiberoptic and optogenetic technology // *J Neural Eng*, 2007. Vol. 4, № 3. P. 143-156.
27. Lin Z. et al. Entrainment of Astrocytic and Neuronal Ca²⁺ Population Dynamics During Information Processing of Working Memory in Mice // *Neurosci Bull*, 2022. Vol. 38, № 5. P. 474–488.
28. Qin H. et al. Monitoring Astrocytic Ca²⁺ Activity in Freely Behaving Mice // *Front Cell Neurosci*, 2020. Vol. 14. P. 410.
29. Rossi A., Pizzo P., Filadi R. Calcium, mitochondria and cell metabolism: A functional triangle in bioenergetics // *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2019. Vol. 1866, № 7. P. 1068–1078.
30. Lopez-Fabuel I. et al. Complex I assembly into supercomplexes determines differential mitochondrial ROS production in neurons and astrocytes // *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016. Vol. 113, № 46. P. 13063–13068.
31. Verkhratsky A., Nedergaard M. Physiology of Astroglia // *Physiol Rev*, 2018. Vol. 98, № 1. P. 239.
32. Lim D. et al. Calcium signaling in neuroglia // *Int Rev Cell Mol Biol*, 2021. Vol. 362. P. 1–53.
33. Verkhratsky A., Semyanov A., Zorec R. Physiology of Astroglial Excitability // *Function*, 2020. Vol. 1, № 2.
34. Bushong E.A. et al. Protoplasmic Astrocytes in CA1 Stratum Radiatum Occupy Separate Anatomical Domains // *Journal of Neuroscience*, 2002. Vol. 22, № 1. P. 183–192.
35. Popov A. et al. Astrocyte dystrophy in ageing brain parallels impaired synaptic plasticity // *Aging Cell*, 2021. Vol. 20, № 3.
36. Khakh B.S., Sofroniew M. V. Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits // *Nature Neuroscience*, 2015. Vol. 18, № 7. P. 942–952.
37. Gavrillov N. et al. Astrocytic coverage of dendritic spines, dendritic shafts, and axonal boutons in hippocampal neuropil // *Front Cell Neurosci*, 2018. Vol. 12. P. 248.
38. Aboufares El Alaoui A. et al. Characterization of Subcellular Organelles in Cortical Perisynaptic Astrocytes // *Front Cell Neurosci*, 2021. Vol. 14. P. 492.
39. Rusakov D.A., Zheng K., Henneberger C. Astrocytes as regulators of synaptic function: A quest for the Ca²⁺ master Key // *Neuroscientist*, 2011. Vol. 17, № 5. P. 513–523.
40. Mills W.A. et al. Astrocyte plasticity in mice ensures continued endfoot coverage of cerebral blood vessels following injury and declines with age // *Nat Commun*, 2022. Vol. 13, № 1.

41. Patrushev I. et al. Subcellular location of astrocytic calcium stores favors extrasynaptic neuron–astrocyte communication // *Cell Calcium*, 2013. Vol. 54, № 5. P. 343–349.
42. Wu Y.W. et al. Morphological profile determines the frequency of spontaneous calcium events in astrocytic processes // *Glia*, 2019. Vol. 67, № 2. P. 246–262.
43. King C.M. et al. Local Resting Ca²⁺ Controls the Scale of Astroglial Ca²⁺ Signals // *Cell Rep*, 2020. Vol. 30, № 10. P. 3466–3477.e4.
44. Plata A. et al. Astrocytic Atrophy Following Status Epilepticus Parallels Reduced Ca²⁺ Activity and Impaired Synaptic Plasticity in the Rat Hippocampus // *Front Mol Neurosci*, 2018. Vol. 11. № 215.
45. Molotkov D. et al. Calcium-induced outgrowth of astrocytic peripheral processes requires actin binding by Profilin-1 // *Cell Calcium*, 2013. Vol. 53, № 5–6. P. 338–348.
46. Tanaka M. et al. Astrocytic Ca²⁺ signals are required for the functional integrity of tripartite synapses // *Mol Brain*, 2013. Vol. 6, № 1.
47. Agarwal A. et al. Transient Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore Induces Microdomain Calcium Transients in Astrocyte Processes // *Neuron*, 2017. Vol. 93, № 3. P. 587–605.e7.
48. Nakayama R. et al. Subcellular calcium dynamics during juvenile development in mouse hippocampal astrocytes // *Eur J Neurosci*, 2016. Vol. 43, № 7. P. 923–932.
49. Wang T.F. et al. Cellular mechanism for spontaneous calcium oscillations in astrocytes // *Pharmacol Sin*, 2006. Vol. 27, № 7. P. 861–868.
50. Sun M.Y. et al. Astrocyte calcium microdomains are inhibited by bafilomycin A1 and cannot be replicated by low-level Schaffer collateral stimulation in situ // *Cell Calcium*, 2014. Vol. 55, № 1. P. 1–16.
51. Srinivasan R. et al. Ca²⁺ signaling in astrocytes from *Ip3r2(-/-)* mice in brain slices and during startle responses in vivo // *Nat Neurosci*, 2015. Vol. 18, № 5. P. 708–717.
52. Khakh B.S., McCarthy K.D. Astrocyte calcium signaling: from observations to functions and the challenges therein // *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2015. Vol. 7, № 4.
53. Foskett J.K. et al. Inositol trisphosphate receptor Ca²⁺ release channels // *Physiol Rev*, 2007. Vol. 87, № 2. P. 593–658.
54. Sherwood M.W. et al. Astrocytic IP₃ Rs: Contribution to Ca²⁺ signalling and hippocampal LTP // *Glia*, 2017. Vol. 65, № 3. P. 502–513.
55. Serrano A. et al. GABAergic network activation of glial cells underlies hippocampal heterosynaptic depression // *J Neurosci*, 2006. Vol. 26, № 20. P. 5370–5382.
56. Mariotti L. et al. The inhibitory neurotransmitter GABA evokes long-lasting Ca²⁺ oscillations in cortical astrocytes // *Glia*, 2016. Vol. 64, № 3. P. 363–373.
57. Rose C.R., Ziemens D., Verkhratsky A. On the special role of NCX in astrocytes: Translating Na⁺-transients into intracellular Ca²⁺ signals // *Cell Calcium*, 2020. Vol. 86.
58. Verkhratsky A., Reyes R.C., Parpura V. TRP channels coordinate ion signalling in astroglia // *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 2014. Vol. 166.
59. Shigetomi E. et al. TRPA1 channels are regulators of astrocyte basal calcium levels and long-term potentiation via constitutive D-serine release // *J Neurosci*, 2013. Vol. 33, № 24. P. 10143–10153.

60. Reyes R.C., Verkhratsky A., Parpura V. TRPC1-mediated Ca²⁺ and Na⁺ signalling in astroglia: differential filtering of extracellular cations // *Cell Calcium*, 2013. Vol. 54, № 2. P. 120–125.
61. Semyanov A. Spatiotemporal pattern of calcium activity in astrocytic network // *Cell Calcium*, 2019. Vol. 78. P. 15–25.
62. Cornell-Bell A.H. et al. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling // *Science*, 1990. Vol. 247, № 4941. P. 470–473.
63. Lange S.C. et al. Primary cultures of astrocytes: their value in understanding astrocytes in health and disease // *Neurochem Res*, 2012. Vol. 37, № 11. P. 2569–2588.
64. Takano T. et al. Rapid manifestation of reactive astrogliosis in acute hippocampal brain slices // *Glia*, 2014. Vol. 62, № 1. P. 78.
65. Thrane A.S. et al. General anesthesia selectively disrupts astrocyte calcium signaling in the awake mouse cortex // *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. Vol. 109, № 46. P. 18974–18979.
66. Thurley K., Ayaz A. Virtual reality systems for rodents // *Curr Zool*, 2017. Vol. 63, № 1. P. 109–119.
67. Schulz K. et al. Simultaneous BOLD fMRI and fiber-optic calcium recording in rat neocortex // *Nat Methods*, 2012. Vol. 9, № 6. P. 597–602.
68. Bedner P., Jabs R., Steinhäuser C. Properties of human astrocytes and NG2 glia // *Glia*, 2020. Vol. 68, № 4. P. 756–767.
69. Pasca A.M. et al. Functional cortical neurons and astrocytes from human pluripotent stem cells in 3D culture // *Nat Methods*, 2015. Vol. 12, № 7. P. 671–678.
70. Hirase H. et al. Calcium dynamics of cortical astrocytic networks in vivo // *PLoS Biol*, 2004. Vol. 2, № 4. P. e96.
71. Lines J. et al. Astrocytes modulate sensory-evoked neuronal network activity // *Nat Commun*, 2020. Vol. 11, № 1. P. 3689.
72. Otsu Y. et al. Calcium dynamics in astrocyte processes during neurovascular coupling // *Neurosci*, 2015. Vol. 18, № 2. P. 210–218.
73. Sonoda K. et al. Astrocytes in the mouse visual cortex reliably respond to visual stimulation // *Biochem Biophys Res Commun*, 2018. Vol. 505, № 4. P. 1216–1222.
74. Stobart J.L. et al. Cortical Circuit Activity Evokes Rapid Astrocyte Calcium Signals on a Similar Timescale to Neurons // *Neuron*, 2018. Vol. 98, № 4. P. 726-735.e4.
75. Grillner S., El Manira A. Current Principles of Motor Control, with Special Reference to Vertebrate Locomotion // *Physiol Rev*, 2020. Vol. 100, № 1. P. 271–320.
76. Jordan L.M. Initiation of locomotion in mammals // *Ann N Y Acad Sci*, 1998. Vol. 860. P. 83–93.
77. Ingiosi A.M. et al. A Role for Astroglial Calcium in Mammalian Sleep and Sleep Regulation // *Current Biology*, 2020. Vol. 30, № 22. P. 4373-4383.e7.
78. Vaidyanathan T. V. et al. Cortical astrocytes independently regulate sleep depth and duration via separate GPCR pathways // *Elife*, 2021. Vol. 10. P. e63329.
79. Blum I.D. et al. Astroglial Calcium Signaling Encodes Sleep Need in *Drosophila* // *Current Biology*, 2021. Vol. 31, № 1. P. 150-162.e7.
80. Foley J. et al. Astrocytic IP₃/Ca²⁺ Signaling Modulates Theta Rhythm and REM Sleep // *Front Neural Circuits*, 2017. Vol. 11.

81. Tsunematsu T. et al. Region-Specific and State-Dependent Astrocyte Ca²⁺ Dynamics during the Sleep-Wake Cycle in Mice // *Journal of Neuroscience*, 2021. Vol. 41, № 25. P. 5440–5452.
82. Monai H. et al. Calcium imaging reveals glial involvement in transcranial direct current stimulation-induced plasticity in mouse brain // *Nat Commun*, 2016. Vol. 7. P. 11100.
83. Cao X. et al. Astrocyte-derived ATP modulates depressive-like behaviors // *Nat Med*, 2013. Vol. 19, № 6. P. 773–777.
84. Petravicz J., Boyt K.M., McCarthy K.D. Astrocyte IP₃R2-dependent Ca(2+) signaling is not a major modulator of neuronal pathways governing behavior // *Front Behav Neurosci*, 2014. Vol. 8. P. 1–13.
85. Adamsky A. et al. Astrocytic Activation Generates De Novo Neuronal Potentiation and Memory Enhancement // *Cell*, 2018. Vol. 174, № 1. P. 59-71.e14.
86. Jones M.E. et al. Chemogenetic Manipulation of Dorsal Hippocampal Astrocytes Protects Against the Development of Stress-enhanced Fear Learning // *Neuroscience*, 2018. Vol. 388. P. 45–56.
87. Li Y. et al. Activation of astrocytes in hippocampus decreases fear memory through adenosine A₁ receptors // *Elife*, 2020. Vol. 9. P. 1–25.
88. Shelkar G.P., Liu J., Dravid S.M. Astrocytic NMDA Receptors in the Basolateral Amygdala Contribute to Facilitation of Fear Extinction // *Int J Neuropsychopharmacol*, 2021. Vol. 24, № 11. P. 907–919.
89. Martin-Fernandez M. et al. Synapse-specific astrocyte gating of amygdala-related behavior // *Nature Neuroscience*, 2017. Vol. 20, № 11. P. 1540–1548.
90. Nagai J. et al. Specific and behaviorally consequential astrocyte G_q GPCR signaling attenuation in vivo with iβARK // *Neuron*, 2021. Vol. 109, № 14. P. 2256-2274.e9.
91. Yu X. et al. Reducing Astrocyte Calcium Signaling In Vivo Alters Striatal Microcircuits and Causes Repetitive Behavior // *Neuron*, 2018. Vol. 99, № 6. P. 1170-1187.e9.
92. Pinto-Duarte A. et al. Impairments in remote memory caused by the lack of Type 2 IP₃ receptors // *Glia*, 2019. Vol. 67, № 10. P. 1976–1989.
93. Padmashri R. et al. Motor-Skill Learning Is Dependent on Astrocytic Activity // *Neural Plast*, 2015. P. 938023.
94. Amaral D.G., Witter M.P. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data // *Neuroscience*, 1995. Vol. 31, № 3. P. 571–591.
95. Cembrowski M.S. et al. Dissociable Structural and Functional Hippocampal Outputs via Distinct Subiculum Cell Classes // *Cell*, 2018. Vol. 173, № 5. P. 1280-1292.e18.
96. Naber P.A., Witter M.P., Lopes Da Silva F.H. Networks of the hippocampal memory system of the rat. The pivotal role of the subiculum // *Ann N Y Acad Sci*, 2000. Vol. 911. P. 392–403.
97. Xu X. et al. Noncanonical connections between the subiculum and hippocampal CA1 // *J Comp Neurol*, 2016. Vol. 524, № 17. P. 3666–3673.
98. Ziv Y. et al. Long-term dynamics of CA1 hippocampal place codes // *Nat Neurosci*, 2013. Vol. 16, № 3. P. 264–266.
99. Doron A. et al. Hippocampal astrocytes encode reward location // *Nature*, 2022. Vol. 609, № 7928. P. 772–778.

100. Curreli S. et al. Complementary encoding of spatial information in hippocampal astrocytes // *PLoS Biol*, 2022. Vol. 20, № 3. P. e3001530.
101. Nedergaard M. Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells // *Science*, 1994. Vol. 263, № 5154. P. 1768–1771.
102. Araque A. et al. Gliotransmitters travel in time and space // *Neuron*, 2014. Vol. 81, № 4. P. 728–739.
103. Verisokin A.Y. et al. Modeling of Astrocyte Networks: Toward Realistic Topology and Dynamics // *Front Cell Neurosci*, 2021. Vol. 15. P. 50.
104. Lallouette J. et al. Sparse short-distance connections enhance calcium wave propagation in a 3D model of astrocyte networks // *Front Comput Neurosci*, 2014. Vol. 8, № 1 APR.
105. Ding F. et al. α 1-Adrenergic receptors mediate coordinated Ca^{2+} signaling of cortical astrocytes in awake, behaving mice // *Cell Calcium*, 2013. Vol. 54, № 6. P. 387–394.
106. Ma Z. et al. Neuromodulators signal through astrocytes to alter neural circuit activity and behaviour // *Nature*, 2016. Vol. 539, № 7629. P. 428–432.
107. Mu Y. et al. Glia Accumulate Evidence that Actions Are Futile and Suppress Unsuccessful Behavior // *Cell*, 2019. Vol. 178, № 1. P. 27-43.e19.
108. Takata N. et al. Astrocyte Calcium Signaling Transforms Cholinergic Modulation to Cortical Plasticity In Vivo // *The Journal of Neuroscience*, 2011. Vol. 31, № 49. P. 18155.
109. Papouin T. et al. Septal Cholinergic Neuromodulation Tunes the Astrocyte-Dependent Gating of Hippocampal NMDA Receptors to Wakefulness // *Neuron*, 2017. Vol. 94, № 4. P. 840-854.e7.
110. Navarrete M. et al. Astrocytes mediate in vivo cholinergic-induced synaptic plasticity // *PLoS Biol*, 2012. Vol. 10, № 2.
111. Müller F.E. et al. Serotonin receptor 4 regulates hippocampal astrocyte morphology and function // *Glia*, 2021. Vol. 69, № 4. P. 872–889.
112. Mastitskaya S. et al. Astrocytes Modulate Baroreflex Sensitivity at the Level of the Nucleus of the Solitary Tract // *The Journal of Neuroscience*, 2020. Vol. 40, № 15. P. 3052.
113. Khan Z.U. et al. An astroglia-linked dopamine D2-receptor action in prefrontal cortex // *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. Vol. 98, № 4. P. 1964-1969.
114. Ghosh A., Greenberg M.E. Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences // *Science*, 1995. Vol. 268, № 5208. P. 239–247.
115. Brini M. et al. Neuronal calcium signaling: function and dysfunction // *Cell Mol Life Sci*, 2014. Vol. 71, № 15. P. 2787–2814.
116. Augustine G.J., Santamaria F., Tanaka K. Local calcium signaling in neurons // *Neuron*, 2003. Vol. 40, № 2. P. 331–346.
117. Goenaga J. et al. Calcium signaling in astrocytes and gliotransmitter release // *Front Synaptic Neurosci*, 2023. Vol. 15.
118. Araque A. et al. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner // *Trends Neurosci*, 1999. Vol. 22, № 5. P. 208–215.
119. Agnati L.F. et al. A correlation analysis of the regional distribution of central enkephalin and β -endorphin immunoreactive terminals and of opiate receptors in adult and old male rats. Evidence for the existence of two main types of communication in the central nervous system: the volume

- transmission and the wiring transmission // *Acta Physiol Scand, Ltd*, 1986. Vol. 128, № 2. P. 201–207.
120. Semyanov A., Verkhatsky A. Inclusive Brain: From Neuronal Doctrine to the Active Milieu // *Function*, 2022. Vol. 3, № 2.
 121. Obermeier B., Daneman R., Ransohoff R.M. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier // *Nat Med*, 2013. Vol. 19, № 12. P. 1584–1596.
 122. Hösl L. et al. Direct vascular contact is a hallmark of cerebral astrocytes // *Cell Rep*, 2022. Vol. 39, № 1.
 123. Jakovcevic D., Harder D.R. Role of astrocytes in matching blood flow to neuronal activity // *Curr Top Dev Biol*, 2007. Vol. 79. P. 75–97.
 124. Haydon P.G., Carmignoto G. Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling // *Physiol Rev*, 2006. Vol. 86, № 3. P. 1009–1031.
 125. Marina N. et al. Astrocytes monitor cerebral perfusion and control systemic circulation to maintain brain blood flow // *Nat Commun*, 2020. Vol. 11, № 1.
 126. Santello M., Cali C., Bezzi P. Gliotransmission and the tripartite synapse // *Adv Exp Med Biol*, 2012. Vol. 970. P. 307–331.
 127. Giaume C. et al. Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions // *Nat Rev Neurosci*, 2010. Vol. 11, № 2. P. 87–99.
 128. Filosa J.A. et al. Local potassium signaling couples neuronal activity to vasodilation in the brain // *Nat Neurosci*, 2006. Vol. 9, № 11. P. 1397–1403.
 129. Attwell D. et al. Glial and neuronal control of brain blood flow // *Nature*, 2010. Vol. 468, № 7321. P. 232–243.
 130. Gordon G.R.J. et al. Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles // *Nature*, 2008. Vol. 456, № 7223. P. 745–750.
 131. Nelson D.L., Cox M.M. Nelson D.L., Cox M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 5th ed. / ed. Ahr K. New York, NY: W.H. Freeman and Company, 2008. 1158 p.
 132. Attwell D., Laughlin S.B. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain // *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 2001. Vol. 21, № 10. P. 1133–1145.
 133. Howarth C., Gleeson P., Attwell D. Updated energy budgets for neural computation in the neocortex and cerebellum // *J Cereb Blood Flow Metab*, 2012. Vol. 32, № 7. P. 1222–1232.
 134. Knapp L.T., Klann E. Potentiation of hippocampal synaptic transmission by superoxide requires the oxidative activation of protein kinase C // *J Neurosci*, 2002. Vol. 22, № 3. P. 674–683.
 135. Zehnder T. et al. Mitochondrial biogenesis in developing astrocytes regulates astrocyte maturation and synapse formation // *Cell Press*, 2021. Vol. 35, № 2. P. 108952.
 136. Jackson J.G., Robinson M.B. Regulation of mitochondrial dynamics in astrocytes: Mechanisms, consequences, and unknowns // *Glia*, 2018. Vol. 66, № 6. P. 1213–1234.
 137. Santo-Domingo J., Demarex N. Calcium uptake mechanisms of mitochondria // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 2010. Vol. 1797, № 6–7. P. 907–912.
 138. Rizzuto R. et al. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2012. Vol. 13, № 9. P. 566–578.

139. Contreras L. et al. Mitochondria: the calcium connection // *Biochim Biophys Acta*, 2010. Vol. 1797, № 6–7. P. 607–618.
140. Fink B.D. et al. Regulation of ATP production: dependence on calcium concentration and respiratory state // *Am J Physiol Cell Physiol*, 2017. Vol. 313, № 2. P. C146–C153.
141. Walters G.C., Usachev Y.M. Mitochondrial calcium cycling in neuronal function and neurodegeneration // *Front Cell Dev Biol*, 2023. Vol. 11.
142. Shigetomi E., Patel S., Khakh B.S. Probing the complexities of astrocyte calcium signaling // *Trends Cell Biol*, 2016. Vol. 26, № 4. P. 300.
143. Chen T.W. et al. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity // *Nature*, 2013. Vol. 499, № 7458. P. 295–300.
144. Takata N., Hirase H. Cortical Layer 1 and Layer 2/3 Astrocytes Exhibit Distinct Calcium Dynamics In Vivo // *PLoS One*, 2008. Vol. 3, № 6. P. e2525.
145. Pepeu G., Giovannini M.G. Changes in acetylcholine extracellular levels during cognitive processes // *Learn Mem*, 2004. Vol. 11, № 1. P. 21–27.
146. Reimer J. et al. Pupil fluctuations track rapid changes in adrenergic and cholinergic activity in cortex // *Nature Communications*, 2016. Vol. 7, № 1. P. 1–7.
147. Gray S.R. et al. Noradrenergic terminal short-term potentiation enables modality-selective integration of sensory input and vigilance state // *Sci Adv*, 2021. Vol. 7, № 51. P. 1378.
148. Ye L. et al. Ethanol abolishes vigilance-dependent astroglia network activation in mice by inhibiting norepinephrine release // *Nature Communications*, 2020. Vol. 11, № 1. P. 1–20.
149. Turovsky E.A. et al. Mechanosensory Signaling in Astrocytes. 2020.
150. Sheppard K. et al. Stride-level analysis of mouse open field behavior using deep-learning-based pose estimation // *Cell Rep*, 2022. Vol. 38, № 2.
151. Lu L. Mobilizing ER IP3 receptors as a mechanism to enhance calcium signaling // *Cell Mol Immunol*, 2021. Vol. 18, № 9. P. 2284–2285.
152. Reitman M.E. et al. Norepinephrine links astrocytic activity to regulation of cortical state // *Nat Neurosci*, 2023. Vol. 26, № 4. P. 579–593.
153. Goenaga J. et al. Calcium signaling in astrocytes and gliotransmitter release // *Front Synaptic Neurosci*, 2023. Vol. 15.
154. Denizot A. et al. The endoplasmic reticulum in perisynaptic astrocytic processes: shape, distribution and effect on calcium activity // *bioRxiv*, 2022.
155. Csordás G., Weaver D., Hajnóczky G. Endoplasmic Reticulum-Mitochondrial Contactology: Structure and Signaling Functions // *Trends Cell Biol*, 2018. Vol. 28, № 7. P. 523–540.
156. Rungta R.L. et al. Ca²⁺ transients in astrocyte fine processes occur via Ca²⁺ influx in the adult mouse hippocampus // *Glia*, 2016. Vol. 64, № 12. P. 2093–2103.
157. Stobart J.L. et al. Long-term In Vivo Calcium Imaging of Astrocytes Reveals Distinct Cellular Compartment Responses to Sensory Stimulation // *Cereb Cortex*, 2018. Vol. 28, № 1. P. 184–198.
158. Clapham D.E. Calcium signaling // *Cell*, 2007. Vol. 131, № 6. P. 1047–1058.
159. Glancy B. et al. Effect of calcium on the oxidative phosphorylation cascade in skeletal muscle mitochondria // *Biochemistry*, 2013. Vol. 52, № 16. P. 2793–2809.

160. Stuart G.J., Spruston N. Dendritic integration: 60 years of progress // *Nat Neurosci*, 2015. Vol. 18, № 12. P. 1713–1721.
161. Pasti L. et al. Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ // *J Neurosci*, 1997. Vol. 17, № 20. P. 7817–7830.
162. Pasti L., Pozzan T., Carmignoto G. Long-lasting changes of calcium oscillations in astrocytes. A new form of glutamate-mediated plasticity // *J Biol Chem*, 1995. Vol. 270, № 25. P. 15203–15210.
163. Ullah G., Jung P., Cornell-Bell A.H. Anti-phase calcium oscillations in astrocytes via inositol (1, 4, 5)-trisphosphate regeneration // *Cell Calcium*, 2006. Vol. 39, № 3. P. 197–208.
164. Dupont G. et al. Calcium oscillations // *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011. Vol. 3, № 3. P. 1–18.
165. Smedler E., Uhlén P. Frequency decoding of calcium oscillations // *Biochim Biophys Acta*, 2014. Vol. 1840, № 3. P. 964–969.
166. O’Keefe J., Nadel L. *The Hippocampus as a Cognitive Map* / Oxford: Clarendon Press, 1978. 570 p.
167. Clark B.J., Hamilton D.A., Whishaw I.Q. Motor activity (exploration) and formation of home bases in mice (C57BL/6) influenced by visual and tactile cues: modification of movement distribution, distance, location, and speed // *Physiol Behav*, 2006. Vol. 87, № 4. P. 805–816.
168. Lee H.S., Han J.H. Activity Patterns of Individual Neurons and Ensembles Correlated with Retrieval of a Contextual Memory in the Dorsal CA1 of Mouse Hippocampus // *J Neurosci*, 2023. Vol. 43, № 1. P. 113–124.
169. Hitti F.L., Siegelbaum S.A. The hippocampal CA2 region is essential for social memory // *Nature*, 2014. Vol. 508, № 7494. P. 88.
170. Oe Y. et al. Distinct temporal integration of noradrenaline signaling by astrocytic second messengers during vigilance // *Nat Commun*, 2020. Vol. 11, № 1. P. 471.
171. Hertz L. et al. Adrenoceptors in brain: cellular gene expression and effects on astrocytic metabolism and $[Ca^{2+}]_i$ // *Neurochem Int*, 2010. Vol. 57, № 4. P. 411–420.
172. Wang F. et al. Astrocytes modulate neural network activity by Ca^{2+} -dependent uptake of extracellular K^+ // *Sci Signal*, 2012. Vol. 5, № 218.
173. Sherwood M.W. et al. Astrocytic IP3Rs: Beyond IP3R2 // *Front Cell Neurosci*, 2021. Vol. 15. P. 695817.
174. Mohan M.L. et al. G-Protein Coupled Receptor Resensitization – Appreciating the Balancing Act of Receptor Function // *Curr Mol Pharmacol*, 2013. Vol. 5, № 3. P. 350–361.
175. Rajagopal S., Shenoy S.K. GPCR desensitization: Acute and prolonged phases // *Cell Signal*, 2018. Vol. 41. P. 9–16.
176. Iwai Y. et al. Transient Astrocytic Gq Signaling Underlies Remote Memory Enhancement // *Front Neural Circuits*, 2021. Vol. 15.
177. Rose J. et al. Mitochondrial Metabolism in Astrocytes Regulates Brain Bioenergetics, Neurotransmission and Redox Balance // *Front Neurosci*, 2020. Vol. 14.
178. Zhao R.Z. et al. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review) // *Int J Mol Med*, 2019. Vol. 44, № 1. P. 3–15.

179. Hu S. et al. Functional transcranial brain imaging by optical-resolution photoacoustic microscopy // *J Biomed Opt*, 2009. Vol. 14, № 4. P. 040503.
180. Zaretsky D. V., Zaretskaia M. V., DiMicco J.A. Characterization of the relationship between spontaneous locomotor activity and cardiovascular parameters in conscious freely moving rats // *Physiol Behav*, 2016. Vol. 154. P. 60–67.
181. Bramble D.M., Carrier D.R. Running and breathing in mammals // *Science*, 1983. Vol. 219, № 4582. P. 251–256.
182. Huo B.X., Smith J.B., Drew P.J. Neurovascular Coupling and Decoupling in the Cortex during Voluntary Locomotion // *Journal of Neuroscience*, 2014. Vol. 34, № 33. P. 10975–10981.
183. Huo B.X., Gao Y.R., Drew P.J. Quantitative separation of arterial and venous cerebral blood volume increases during voluntary locomotion // *Neuroimage*, 2015. Vol. 105. P. 369.
184. Huo B.X., Greene S.E., Drew P.J. Venous cerebral blood volume increase during voluntary locomotion reflects cardiovascular changes // *Neuroimage*, 2015. Vol. 118. P. 301–312.
185. Attwell D., Iadecola C. The neural basis of functional brain imaging signals // *Trends Neurosci*, 2002. Vol. 25, № 12. P. 621–625.
186. Walker J.E. The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown // *Biochem Soc Trans*, 2013. Vol. 41, № 1. P. 1–16.
187. Vicente-Gutierrez C. et al. Astrocytic mitochondrial ROS modulate brain metabolism and mouse behaviour // *Nat Metab*, 2019. Vol. 1, № 2. P. 201–211.
188. Pellerin L., Magistretti P.J. Sweet sixteen for ANLS // *J Cereb Blood Flow Metab*, 2012. Vol. 32, № 7. P. 1152–1166.
189. Christie I.N. et al. Astrocyte mitochondria produce nitric oxide from nitrite to modulate cerebral blood flow during brain hypoxia // *bioRxiv*, 2022.
190. Fedotova A. et al. Dissociation Between Neuronal and Astrocytic Calcium Activity in Response to Locomotion in Mice // *Function*, 2023. Vol. 4, № 4. P. zqad019.
191. Kotova D.A. et al. Hyperglycemia exacerbates ischemic stroke not through increased generation of hydrogen peroxide // *Free Radic Biol Med*, 2023. Vol. 208. P. 153–164.

БЛАГОДАРНОСТИ

Хочу выразить глубокую благодарность своему научному руководителю, Семьянову Алексею Васильевичу, за чёткую постановку задач, мудрые советы, продуктивные научные семинары, возможность представлять результаты работы на конференциях и проходить научные стажировки в международных лабораториях. Благодарна своему научному руководителю за предложение заняться этим проектом и создание всех условий для его реализации.

Благодарю своих коллег за теплое отношение, поддержку, помощь в любых вопросах и прекрасное чувство юмора, благодаря которым годы аспирантуры наполнились знаниями и ценными воспоминаниями. Особенная благодарность Браже Алексею Рудольфовичу за неоценимую помощь в анализе данных Ca^{2+} активности, а также терпение к многочасовым обсуждениям данных. Признательна Браже Надежде Александровне, открывшей для меня мир рамановской спектроскопии и готовой прийти на помощь в любую минуту. Хочу поблагодарить Тяглик Алису Борисовну и Морозову Ксению Игоревну за энтузиазм в проведении экспериментов, научные и ненаучные дискуссии, позитивный настрой и усердный труд. Выражаю благодарность коллегам из лаборатории фотоники и нелинейной спектроскопии под руководством профессора Желтикова Алексея Михайловича: Федотову Илье Валерьевичу, Солотёнкову Максиму Андреевичу, Федотову Андрею Борисовичу и Мартынову Григорию Николаевичу за высокий профессионализм и открытость к проведению нетривиальных экспериментов. Отдельно благодарю Tamás Korcsányi за обучение хирургическим операциям по имплантации хронического краниального окна и Ca^{2+} имиджингу – навыкам, без которых данное исследование было бы невозможно. Благодарю Олейникова Владимира Александровича и Билана Дмитрия Сергеевича за чуткое руководство проектами и плодотворное сотрудничество. Спасибо сотруднику вивария Камаевой Альфие Габдуляхатовне за бережное и профессиональное обращение с животными и Мощенко Александру Александровичу за изготовление вирусных векторов, использованных в исследовании.

Искренне благодарю всех сотрудников кафедры высшей нервной деятельности биологического факультета МГУ за приобретенные глубокие фундаментальные знания и интерес к науке.

Особенно признательна своей семье за то, что всегда поддерживают меня и воспитали амбициозным и целеустремленным человеком. Без этих качеств мне было бы сложнее следовать выбранному научному пути. Сердечно благодарю своего мужа за всестороннюю поддержку во всех моих начинаниях, терпение, постоянную мотивацию и стимулирование получить научную степень.