

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Федотова Анна Алексеевна

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

Специальность 1.5.24 – Нейробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, отдел молекулярной нейробиологии, лаборатория внесинаптической передачи и в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», биологический факультет, кафедра высшей нервной деятельности.

Научный руководитель *Семьянов Алексей Васильевич – доктор биологических наук, член-корреспондент РАН*

Официальные оппоненты *Салмина Алла Борисовна – доктор медицинских наук, профессор, Институт мозга Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр неврологии», отдел молекулярных и клеточных механизмов нейропластичности, лаборатория нейробиологии и тканевой инженерии, главный научный сотрудник и заведующий лабораторией*

Сурин Александр Михайлович – доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», отдел общей патофизиологии, лаборатория фундаментальных и прикладных проблем боли, главный научный сотрудник

Туровский Егор Александрович – доктор биологических наук, Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», группа молекулярных и клеточных механизмов канцерогенеза, ведущий научный сотрудник и руководитель группы

Защита диссертации состоится «27» ноября 2023 г. в 15:30 на заседании диссертационного совета МГУ.015.7 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 12, биологический факультет МГУ, аудитория М-1.

Email: bellaum@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский проспект, д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/599301297/> и на сайте Диссовет 2.0: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/015.7/2701>

Автореферат разослан 25 октября 2023 года.

Ученый секретарь диссертационного совета
МГУ.015.7, доктор биологических наук

 Б.А. Умарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 (Semyanov and Verkhratsky, 2021). В течение длительного времени большая 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 (Fedotova et al., 2021; Popov et al., 2020; Popov et al., 2022). 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 (Semyanov et al., 2020). В свою очередь, астроцитарная Ca^{2+} активность – изменение концентрации ионов Ca^{2+} в различных компартментах астроцита – необходима для оптимального функционирования нервной системы (Bazargani and Attwell, 2016) и может вовлекаться в модуляцию синаптической пластичности (Henneberger et al., 2010), регуляцию тонуса кровеносных сосудов (Lind et al., 2013) и модуляцию астроцитарного метаболизма (Horvat et al., 2021). 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 (Guerra-Gomes et al., 2017; Kofuji and Araque, 2021; Lyon and Allen, 2022).

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 (Denton and McCormack, 1985) и модулировать активность ЭТЦ (Görlach et al., 2015). Процессы окислительного фосфорилирования находятся в динамическом равновесии с гликолизом и обеспечивают клетку необходимым количеством АТФ. В нейронах основная часть АТФ образуется в результате окислительного фосфорилирования, в астроцитах же важное значение играет гликолиз, на который клетки этого типа могут переключаться при определенных условиях

(Almeida et al., 2023). В частности, гликолиз может активироваться при повышении концентрации цитоплазматического Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) в астроцитах. При этом неизвестно, как изменяются окислительное фосфорилирование 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 (Oliveira et al., 2015; Kofuji and Araque, 2021; Lim et al., 2021). В частности, продемонстрирована связь астроцитарной Ca^{2+} активности с локомоцией (Nimmerjahn et al., 2009; Paukert et al., 2014; Tran et al., 2018; Wojarskaite et al., 2020). 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 (Oliveira et al., 2015). 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 (Dombeck et al., 2007; Kislin et al., 2014; Villette et al., 2015). 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 (Helmchen et al., 2001), или оптоволокна, имплантируемые в мозг и позволяющие при помощи фотометрии регистрировать интегральный флуоресцентный сигнал с определенной области (Aravanis et al., 2007). 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 (Qin et al., 2020; Lin et al., 2022).

Ионы Ca^{2+} являются важнейшим вторичным мессенджером и вовлечены в регуляцию многих внутриклеточных процессов, среди которых ключевое значение имеет клеточный метаболизм (Rossi et al., 2019).

Процессы гликолиза как в нейронах, так и в астроцитах лучше исследованы по сравнению с окислительным фосфорилированием, 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 (Lopez-Fabuel et al., 2016). 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» мышях 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 sO_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 венах 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 нейрохимического 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, из них 4 статьи и 3 тезисов докладов на конференциях в журналах, индексируемых аналитическими базами Scopus или Web of Science, 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 191 источник. Работа проиллюстрирована 1 таблицей и 60 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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).

Экспериментальные животные. В исследовании использованы самцы и самки мышей линии C57Bl/6 в возрасте 2-9 месяцев, содержащиеся 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.

Конструирование вирусных векторов. Для визуализации сигналов Ca^{2+} использовали генетически кодируемый индикатор Ca^{2+} GCaMP6f, для мечения клеток – флуоресцентные белки GFP и NirFP. Чтобы экспрессировать белки интереса в клетках мозга, использовали генетические векторы на основе AAV, содержащие промоторы, специфичные для

астроцитов (gfaABC1D) и нейронов (hSyn, CamKII). В работе использовали плазмиды: AAV.gfaABC1D-cyto-GCaMP6f-SV40 (экспрессия GCaMP6f в цитоплазме астроцитов), AAV.CamKII-GCaMP6f-WPRE-SV40 (экспрессия GCaMP6f в цитоплазме нейронов), AAV.gfaABC1D-PI-lck-GFP.SV40 (экспрессия GFP в астроцитах), AAV.hSyn-NirFP-WPRE-hGH (экспрессия NirFP в нейронах). Плазмиды были запакованы в AAV в центре наработки вирусных векторов ИБХ РАН (исполнитель: А.А. Мощенко). Работали с несколькими серотипами вируса: AAV5, AAV9, синтетическим серотипом AAV-phr.B.

Инъекция AAV в мозг.

Стереотаксическое введение AAV в мозг осуществляли под общим наркозом (изофлуран, 0.8-1.2%) в стереотаксическом аппарате с использованием бинокуляра. Манипуляции с тканями на черепе осуществляли под местной анестезией (новокаин 0.5%, 10 мл/кг, подкожно). После удаления кожи и соединительных тканей проводили краниотомию диаметром 0.5 мм над структурой интереса (определенной по координатам) с помощью стоматологического бора. Посредством стеклянного микрокапилляра, подсоединенного к шприцу, медленно вводили AAV в объеме 1 мкл на структуру интереса на нужную глубину. Отверстия в черепе закрывали биосовместимым силиконом (Kwik-Sil, США), кожу заклеивали биосовместимым клеем (3M Vetbond, США). По окончании операции производили анальгезию (кетопрофен, 5 мг/кг, внутривенно) и минимизировали риск воспаления (мелоксикам, 2 мг/кг, подкожно).

Подбор стереотаксических координат для инъекции AAV осуществляли согласно атласу мышиноного мозга. Через 3 и 4 недели после введения AAV осуществляли интракардиальную перфузию мышей и изготавливали срезы мозга. Далее проводили иммуногистохимическую окраску с последующей визуализацией с помощью флуоресцентного микроскопа. Были подобраны следующие оптимальные координаты для инъекции AAV в первичную соматосенсорную кору (rS1, проекция левой передней лапы): AP = +0.5, ML = 2.3, DV = -1.0...-0.1 мм; в гиппокамп (*str. oriens*, поле CA1): AP = -1.94, ML = ±1.5, DV = -1.3...-1.19 мм.

Подбор серотипа и титра AAV проводили с помощью инъекции AAV по подобранным координатам в объеме 1 мкл/полушарие в титрах 10^{12} и 10^{11} вир.ген./мл (разведение в 0.1M растворе натрий-фосфатного буфера, PBS). По результатам оценки экспрессии белков интереса были определены следующие оптимальные серотипы и титры AAV: AAV9 (титр 10^{11} вир.ген./мл) или AAV5 (качество экспрессии хуже, титр 10^{11} вир.ген./мл) – для экспрессии GCaMP6f в цитоплазме астроцитов; AAV5 или AAV-phr.B (титры 10^{12} и 10^{11} вир.ген./мл) – для экспрессии GFP в астроцитах. Для экспрессии белков в нейронах подходят серотипы вирусов AAV5, AAV9, AAV-phr.B (титры 10^{12} и 10^{11} вир.ген./мл). Оптимальное окно экспрессии – от 4-х недель с момента инъекции AAV.

Проведение морфологического контроля.

Интракардиальную перфузию животных производили по стандартному протоколу. После введения мышей вводили в глубокий наркоз (золетил-рометар, 40 мг/кг-5 мг/кг, внутривенно) осуществляли перфузию раствором PBS (20-30 мл, до момента замещения крови PBS), с последующей фиксацией тканей 4%-ным раствором параформальдегида (PFA, 15-20 мл). После проведения перфузии животное декапитировали, мозг извлекали, помещали в 4%-ный раствор PFA на сутки, затем хранили в 0.1M растворе PBS с добавлением азида натрия (0.001%).

Приготовление срезов мозга. Серийные срезы мозга толщиной 40 мкм изготавливали на вибраторе (Leica 1200s, Германия). Срезы монтировали на стекла или хранили в культуральных планшетах, заполненных 0.1M раствором PBS с добавлением азида натрия (0.001%), до окрашивания.

Проведение иммуногистохимической окраски срезов мозга. Оценку вирусной экспрессии GCaMP6f после проведения эксперимента проводили с помощью морфологического контроля с использованием первичных антител против GFP (Evrogen) и вторичных антител Alexa Fluor® 488 AffiniPure (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd) по разработанному протоколу. Окрашенные срезы мозга монтировали на предметные стекла и производили их визуализацию с помощью флуоресцентного микроскопа.

Визуализация срезов мозга с помощью флуоресцентного микроскопа. 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). Использовали конфокальный (Olympus FV-300, Япония) или мультифотонный (FemtoSmart, Femtonics, Венгрия) флуоресцентные микроскопы.

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

Имплантация хронического краниального окна совмещалась со стереотаксической инъекцией AVV. Краниотомию диаметром 3 мм 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 металлическую платформу массой около 1 г, позволяющую в дальнейшем фиксировать голову мыши в экспериментальной установке под объективом микроскопа. Животным обеспечивали анестезию и постоперационный уход.

Подготовка животных к эксперименту, хендлинг. Через 6-7 недель после проведения операции животных готовили к проведению сессий Ca^{2+} имиджинга. Процедуру хендлинга, заключающуюся в приучении мышей к манипуляциям с ними, проводили в течение 5 дней. Затем животных приучали к экспериментальным установкам типа «граммофон» (Gramophone, Femtonics, Венгрия) или «левитирующая платформа» (Mobile HomeCage, Neurotar, Финляндия), позволяющих мышам передвигаться.

Регистрация Ca^{2+} активности в астроцитах и нейронах соматосенсорной коры бодрствующих мышей осуществлялась при помощи мультифотонного микроскопа (FemtoSmart, Femtonics, Венгрия) с водным объективом x20, NA 1.0 (N20X-PFH 20X Olympus XLUMPLFLN Objective). Частота регистрации – 30 Гц, размер кадра 512×512 пикселей, интенсивность лазера – 7-20%, $\lambda_{ex} = 920$ нм. Ca^{2+} имиджинг синхронизировали с получением данных о скорости мыши. Визуализацию проводили в верхнем слое (L1) соматосенсорной коры (0-100 мкм от поверхности мозга), длительность записи – 5 или 10 мин, длительность сессии не превышала 2-х ч. Каждая запись включала в себя набор изображений о флуоресцентном сигнале от астроцитов или нейронов соматосенсорной коры во время локомоции мыши и в периоды покоя.

Обработка данных Ca^{2+} активности, полученных методом оптического имиджинга с двухфотонным возбуждением. Использовали программные модули на языке программирования Python, разработанные А.Р. Браже. После биннинга (суммирования значений интенсивности в нескольких последовательных кадрах), коррекции артефактов движения и процедуры подавления шума Ca^{2+} сигналы в каждом пикселе представляли в виде относительного изменения сигнала флуоресценции $\Delta F/F$ (%), где F – фоновая флуоресценция, ΔF – значимые отклонения сигнала. Для интерпретации Ca^{2+} активности производили 3D-реконструкцию флуктуаций $\Delta F/F$ (x-у-время). Непрерывные пространственно-временные области, в которых $\Delta F/F$ превышало заданный порог (15%), мы назвали Ca^{2+} событиями. В каждом кадре наблюдаются сегменты Ca^{2+} событий, исследуемые в данной работе. Для описания Ca^{2+} активности в пространстве и времени использовали следующие параметры: 1) $\Delta F/F$ (%), 2) средняя площадь Ca^{2+} сегмента ($мкм^2$) – общая площадь сегментов, разделенная на их количество, 3) активная область (%) – общая площадь Ca^{2+} сегментов, разделенная на площадь окрашенной области, 4) плотность Ca^{2+} сегментов (сегментов/ $мм^2$) – количество сегментов, разделенное на площадь окрашенной области. Данные имиджинга 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 с.

Исследование Ca^{2+} активности в астроцитах гиппокампа методом фотометрии.

Имплантация оптоволокон, совмещенная с инъекцией AAV, осуществлялась билатерально в область CA1 гиппокампа по подобранным ранее координатам. В краниотомии диаметром 0.5 мм инъецировали AAV, кодирующий GCaMP6f (GFP в контроле) под астроцитарным промотором. Затем имплантировали оптоволокна диаметром 125 мкм, фиксируя их на черепе с помощью смеси стоматологического цемента и клея. Животным обеспечивали анальгезию и постоперационный уход. За две недели до эксперимента производили реверсию цикла день-ночь (12ч/12ч). Через 6-7 недель после операции осуществляли хендлинг и подготовку к проведению поведенческих тестов.

Поведенческие тесты включали «открытое поле» (10 мин, арена 40*40*40 см³ по стандартному протоколу) и тесты на социальное поведение (3 сессии, камера с тремя отсеками). Сессия 1 – привыкание (5 мин, исследуемая мышь в центральном отсеке, входы в боковые отсеки перекрыты). Сессия 2 – тест на социальность (sociability), в боковых отсеках расположены пустой стакан и стакан с мышью, входы открыты. Сессия 3 – тест на социальную новизну (social novelty), в боковых отсеках расположены стаканы со знакомой и новой мышами, входы открыты.

Регистрация Ca²⁺ активности в астроцитах гиппокампа мышей in vivo проводилась билатерально в режиме фотометрии. Использовали некогерентный источник возбуждения флуоресценции ($\lambda_{ex} = 473$ нм). Запись флуоресцентного сигнала представляла собой визуализацию торцов оптоволокна с помощью спектрометра (частота регистрации 100 Гц). Одновременно с регистрацией Ca²⁺ сигнала от астроцитов проводили видеорегистрацию поведения животных при красном свете (камера ImagingSource DMK 33GV024, 33 кадра/с). Синхронизацию работы схемы достигали при помощи платы Arduino Uno.

Обработка фотометрического сигнала осуществлялась на языке программирования Python с использованием библиотек scipy и scikit-image. Флуоресцентный сигнал усредняли в пределах области интереса (торцы оптоволокон) и рассчитывали $\Delta F/F$ (%).

Обработка видеозаписей поведения производилась с помощью протокола, созданного на языке визуального программирования Bonsai (Open-source software, bonsai-rx.org). Определяли положение животного по его центру масс (центроиду) и время, проведенное в области интереса. Результаты сопоставляли с данными астроцитарной Ca²⁺ активности.

Мониторинг sO₂ в кровеносных сосудах и изучение редокс-состояния цитохромов ЭТЦ митохондрий астроцитов и нейронов соматосенсорной коры бодрствующих мышей.

Регистрацию спектров КР осуществляли с помощью метода рамановской микроспектроскопии (спектроскопии КР). Эксперименты проводили на мышах с хроническими краниальными окнами, астроциты первичной соматосенсорной коры которых экспрессировали GFP, нейроны – NirFP. Флуоресцентные метки использовали для идентификации клеток, сосуды визуализировали в отраженном свете. Мыши перемещались по беговой дорожке, установленной в столик прямого микроскопа FSM (Leica), интегрированного с рамановским микроспектрометром InVia Qontor (Renishaw, Великобритания). Регистрация спектров КР: лазер – $\lambda_{ex} = 532$ нм, мощность <1мВт на область регистрации с диаметром 800 нм; объектив – x20, NA 0.4. Спектры КР регистрировали из одной и той же точки в покое, во время локомоции и после нее. Время накопления спектра: 1 с (кровеносные сосуды), 3-10 с (астроциты) или 10-15 с (нейроны). Во время экспериментальной записи производилась видеорегистрация поведения мыши. Для оценки диаметра кровеносных сосудов спектры КР снимали вдоль линии, проходящей через кровеносный сосуд, с шагом 1 мкм.

Обработка спектров КР проводилась с помощью разработанных на языке программирования Python скриптов. Анализ включал коррекцию базовой линии и определение интенсивности пиков, связанных с колебаниями связей в молекулах окси- (оГб) и дезоксигемоглобина (дГб), на основании чего рассчитывали sO_2 . Диаметр кровеносного сосуда оценивали по среднеквадратичному значению интенсивности сигнала КР в спектральной области $1500-1660\text{ см}^{-1}$, содержащей пики от оГб и дГб. Областью сосуда считали участки с интенсивностью сигнала КР, превышающей интенсивность сигнала на краях профиля без сосудов минимум в 2 раза. Изменение относительного содержания восстановленных цитохромов В- и С-типа оценивали по соотношению интенсивностей пиков с положениями максимумов 750 см^{-1} и 1440 см^{-1} (I_{750}/I_{1440}), связанных с колебаниями связей гема в указанных цитохромах и связей С-С в липидах соответственно.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием программных модулей и электронных рабочих тетрадей на языке программирования Python. Применяли модель со смешанными эффектами, критерий Манна-Уитни, двухвыборочный критерий Вилкоксона. Уровень статистической значимости: $p < 0.05$. Данные представлены в тексте в виде: медиана [квартиль 25%-квартиль 75%]), на рисунках: ящики с усами 5-95%, медианой и квартилями 25% и 75%, если не указано иное.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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

Локомоция вызывает отсроченный Ca^{2+} ответ в популяции астроцитов первичной соматосенсорной коры. Основные параметры Ca^{2+} активности возрастали при локомоции по сравнению с покоем ($N = 9$ мышей, Рис. 1). Такая генерализованная активация астроцитов во время локомоции согласуется с литературными данными (Nimmerjahn et al., 2009; Tran et al., 2018; Wojarskaite et al., 2020).

Мы обнаружили, что различные параметры Ca^{2+} активности имеют разную временную и пространственную динамику (Рис. 2). Совпадение первого пика плотности Ca^{2+} сегментов и пика плотности начальных Ca^{2+} сегментов указывает на то, что в начале локомоции появляются новые Ca^{2+} сегменты (Рис. 2В). Затем они расширяются и сливаются, что отражается в увеличении средней площади Ca^{2+} сегмента (Рис. 2А, Б). В конце эпизода локомоции Ca^{2+} сегменты распадаются на фрагменты и заканчиваются (второй пик плотности Ca^{2+} сегментов и пик плотности конечных Ca^{2+} сегментов, Рис. 2В). Наблюдаемая задержка Ca^{2+} ответа относительно локомоции (Рис. 2В) может быть связана с механизмами генерации вызванной астроцитарной Ca^{2+} активности.

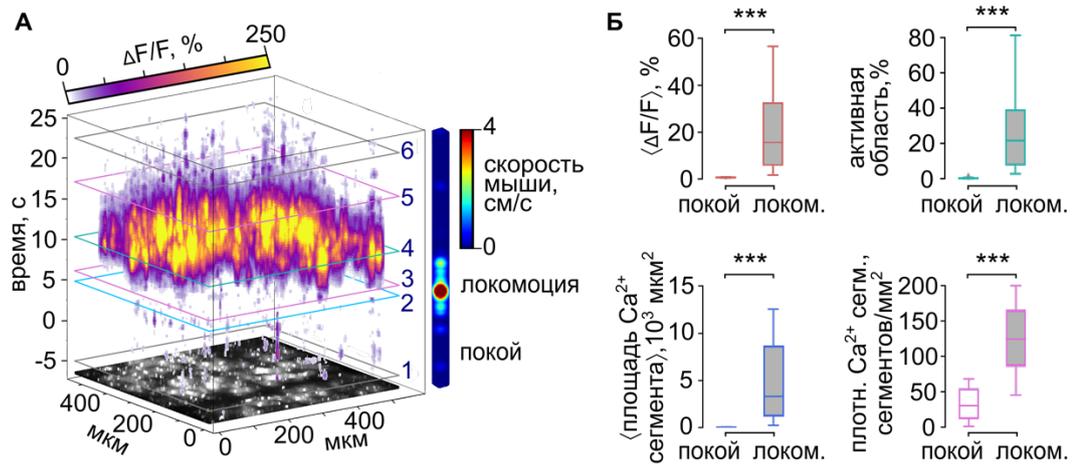


Рисунок 1. Ca^{2+} активность в астроцитах первичной соматосенсорной коры мыши в покое и при локомоции. (А) 3D-реконструкция относительного изменения флуоресцентного сигнала $\Delta F/F$, отражающего Ca^{2+} активность в астроцитах. Цифрами обозначены моменты времени, для которых на Рис. 2Б представлены кадры с пространственным распределением Ca^{2+} активности. (Б) Сводные данные о параметрах Ca^{2+} активности (***) – $p < 0.001$, модель со смешанными эффектами, $n = 24$ записи).

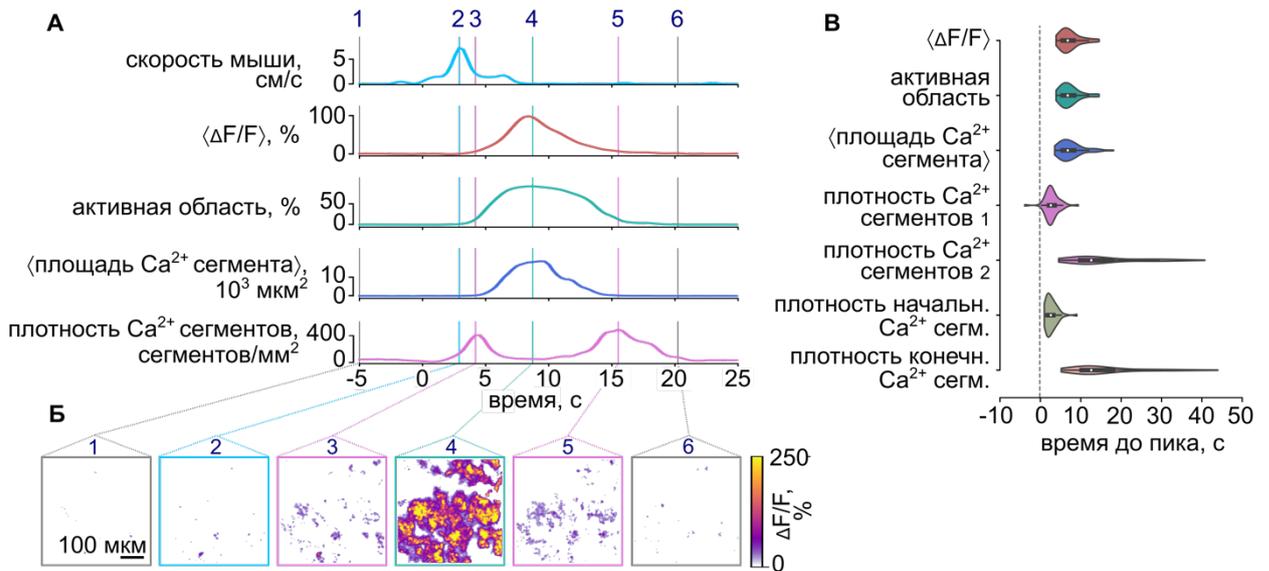


Рисунок 2. Пространственно-временная динамика основных параметров Ca^{2+} активности в астроцитах первичной соматосенсорной коры мышей при локомоции. (А) Пример изменений параметров Ca^{2+} активности во время одиночного локомоторного эпизода. (Б) Пространственное распределение Ca^{2+} активности ($\Delta F/F$) для выделенных моментов времени (обозначены цифрами на Рис. 1А). (В) Сводные данные о времени от начала движения мыши до пиковых значений основных параметров Ca^{2+} активности. Начало эпизода локомоции обозначено пунктирной линией ($n = 55$ эпизодов локомоции).

Завершение двигательного эпизода сопровождалось затуханием Ca^{2+} ответа, значительно превосходившего локомоторные эпизоды по длительности (Рис. 1А, 2А). Возможно, причина в том, что Ca^{2+} активность в

астроцитах *in vivo* определяется входами от многих элементов активной среды мозга, модулирующих продолжительность астроцитарных Ca^{2+} событий: локальной нейронной сети, нейромодуляторных проекций, кровеносных сосудов (Semyanov et al., 2020).

Астроцитарный Ca^{2+} ответ воспроизводится от одного эпизода локомоции к другому. Чтобы проверить, возникает ли Ca^{2+} ответ в одних и тех же областях соматосенсорной коры, для каждого локомоторного эпизода были построены карты, отражающие задержку Ca^{2+} ответа астроцитов относительно медианы ответа по времени (Рис. 3).

Первыми всегда активировались одни и те же области соматосенсорной коры (Рис. 3Б). Тем не менее пространственное разрешение не позволяет сказать, в какой части астроцитов начинается сигнал – в соме или на периферии.

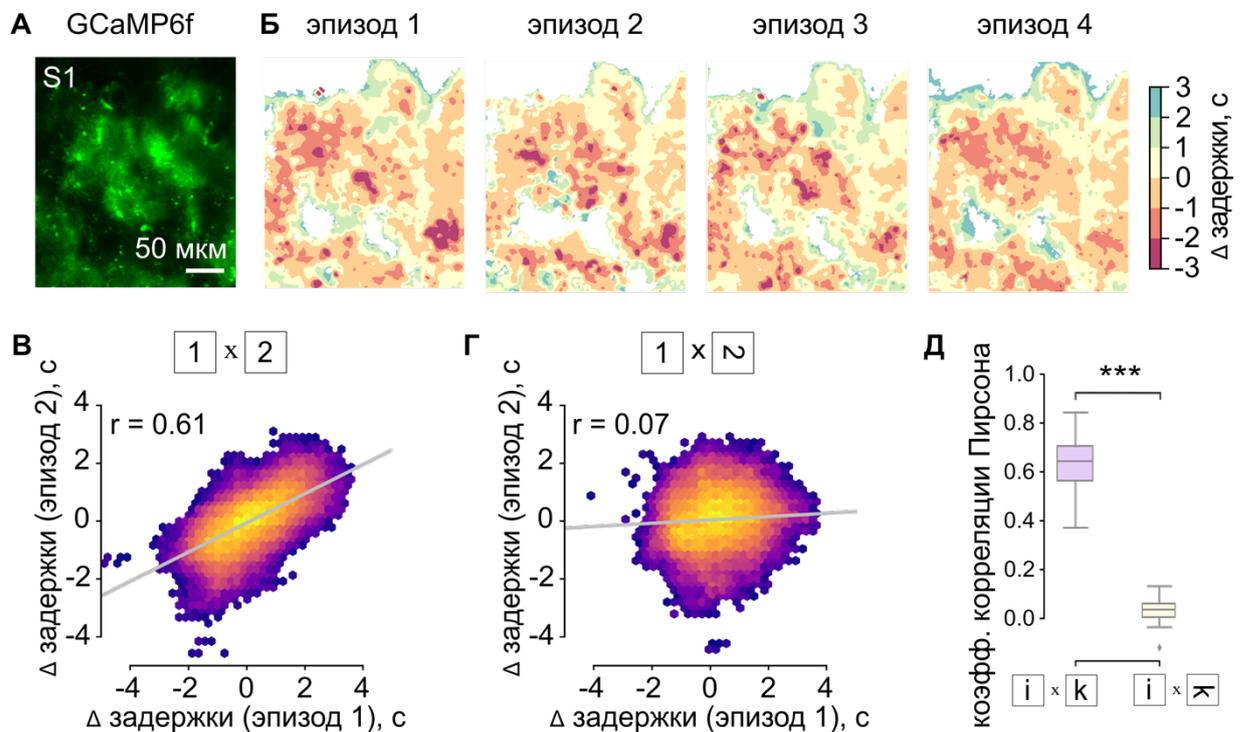


Рисунок 3. Пространственное распределение задержек Ca^{2+} ответа астроцитов на последовательные эпизоды локомоции относительно медианы ответа. (А) Пример участка соматосенсорной коры, из которого проводилась регистрация Ca^{2+} активности. (Б) Карты задержек Ca^{2+} ответа астроцитов на локомоцию. (В) Диаграмма рассеяния, полученная в результате корреляционного анализа между картами задержек для двух эпизодов локомоции. (Г) То же, что и (В), но вторая карта была повернута на 90 градусов. Серым показаны линии регрессии. (Д) Сводные данные о коэффициенте корреляции Пирсона для проведенных сравнений, j, k – индексы, обозначающие номера эпизодов локомоции (***) – $p < 0.001$, $n = 25$ парных сравнений).

Наиболее поздний ответ (темно-зеленые участки карт) был ассоциирован с областями мозга на периферии сосудов и, вероятно, указывает на активацию астроцитарных ножек, обхватывающих сосуды (Mills et al., 2022).

Корреляционный анализ подтвердил сходный пространственный паттерн активации астроцитов соматосенсорной коры при разных эпизодах локомоции (Рис. 3В-Д).

Интегративная функция одиночных кортикальных астроцитов

Ca^{2+} ответ астроцитов на локомоцию начинается в дистальных астроцитарных отростках и интегрируется в соме. Чтобы установить закономерности инициации и распространения Ca^{2+} ответа в пространстве по мере его развития, мы зарегистрировали сигнал от одиночных кортикальных астроцитов с высоким пространственным разрешением.

Повышение $[Ca^{2+}]_i$ в ответ на локомоцию начиналось в дистальных отделах астроцитарного домена и затем распространялось в сому (Рис. 4). Результат согласуется с более высокой вероятностью генерации Ca^{2+} активности в дистальных астроцитарных отростках (Rungta et al., 2016; Stobart et al., 2018).

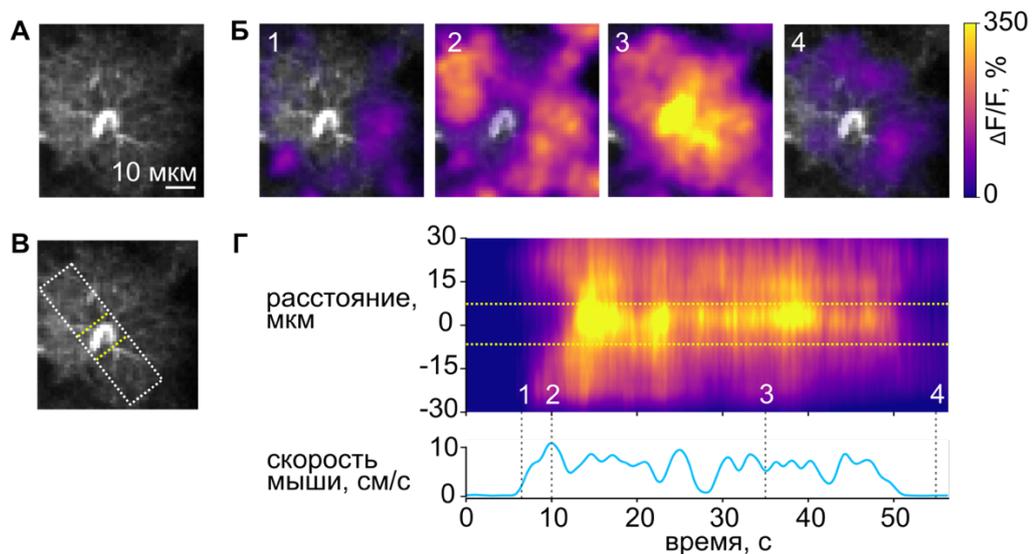


Рисунок 4. Ca^{2+} ответ одиночного астроцита соматосенсорной коры на локомоцию. (А) Пример астроцита, из которого проводилась регистрация Ca^{2+} активности. (Б) Пространственное распределение Ca^{2+} активности ($\Delta F/F$) по мере развития ответа на локомоцию. (В) Изображение астроцита с наложенным белым прямоугольником, обозначающим область построения скан-линии, желтым обозначена сома. (Г) Изображение флуоресцентного линейного сканирования (x-время), показывающее Ca^{2+} ответ на локомоцию в астроцитарных отростках и соме (0 мкм – центр сомы).

В соме астроцита происходит усиление Ca^{2+} ответа и генерация Ca^{2+} осцилляций. Поделив астроциты на сому и отростки, мы проанализировали изменения $[Ca^{2+}]_i$ в этих областях (Рис. 5). Временная динамика сигналов $\Delta F/F$ подтвердила наличие задержки Ca^{2+} ответа в соме

астроцита (голубая кривая) по отношению к ответу в астроцитарных отростках (розовая кривая) (Рис. 5Б, В).

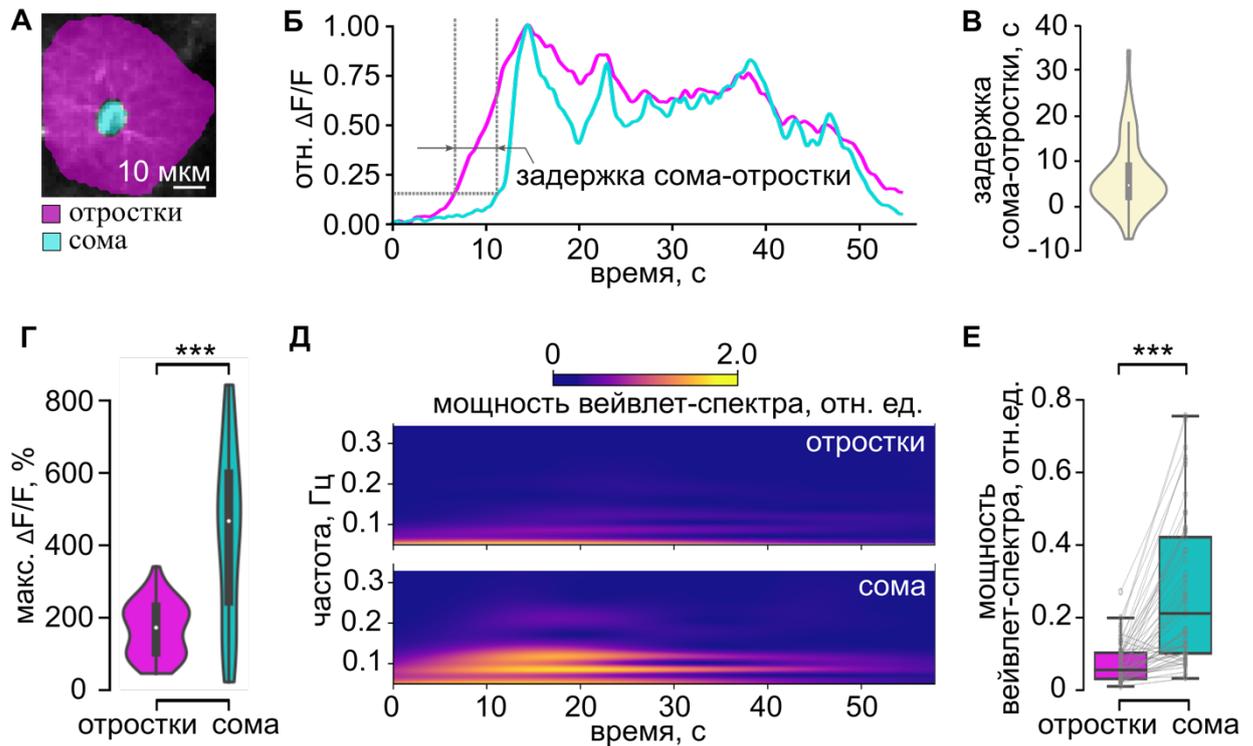


Рисунок 5. Различия Ca^{2+} ответа на локомоцию в отростках и соме астроцита. (А) Астроцит, сегментированный на сому и отростки, и Ca^{2+} динамика в этих областях (Б) во время эпизода локомоции, показанного на Рис. 4Г. Сигнал представлен в виде значений $\Delta F/F$, нормированных на максимальное значение $\Delta F/F$. (В) Сводные данные о задержке Ca^{2+} ответа в соме относительно отростков. (Г) Сводные данные о максимальных $\Delta F/F$ в отростках и сомах астроцитов, точка – медиана, границы прямоугольника – квантили 25-75%. (Д) Вейвлет-спектрограммы флуоресцентных сигналов, зарегистрированных в ответ на локомоцию. (Е) Средняя мощность вейвлет-спектра (отн. ед.), рассчитанная для диапазона частот 0.1-0.3 Гц (***) – $p < 0.001$, модель со смешанными эффектами, $n = 53$ клетки).

Зарегистрированный в соме Ca^{2+} ответ был в несколько раз выше, чем в отростках (Рис. 5Г). Вероятно, функциональное значение интеграции Ca^{2+} активности в астроцитах может заключаться в усилении Ca^{2+} сигналов. Амплификация сигнала происходит за счет выхода Ca^{2+} из внутриклеточных депо Ca^{2+} (Khakh and McCarthy, 2015; Rungta et al., 2016). Усиление Ca^{2+} сигнала может быть направлено на определенные клеточные функции, поскольку различные уровни $[\text{Ca}^{2+}]_i$ регулируют различные молекулярные пути (Clapham, 2007).

Кроме того, в зарегистрированном флуоресцентном сигнале наблюдались периодические колебания (Рис. 5Б). Вейвлет-анализ подтвердил наличие колебаний в частотном диапазоне 0.1-0.3 Гц, причем в соме они были выражены сильнее, чем в астроцитарных отростках (Рис. 5Д, Е). Осцилляции $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в астроцитах регулярно регистрировались в первичных

культурах и переживающих срезах мозга в ответ на фармакологическую стимуляцию (Cornell-Bell et al., 1990; Pasti et al., 1995, 1997; Verisokin et al., 2021). Хотя астроциты должны обладать механизмами для генерации колебаний $[Ca^{2+}]_i$ (Ullah et al., 2006), осцилляторное поведение астроцитов еще не было продемонстрировано *in vivo*.

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

Чтобы проверить гипотезу, отражаются ли в астроцитарной Ca^{2+} динамике когнитивные процессы, в частности, память, мы проанализировали Ca^{2+} сигнал из астроцитов гиппокампа, зарегистрированный в режиме фотометрии ($N = 8$ мышей). Ранее в мировой практике фотометрия использовалась, в основном, для мониторинга Ca^{2+} сигналов в нейронах.

Мыши участвовали в тесте на социальность, вовлекающем процессы памяти и распознавания объектов (Рис. 6А). На поведенческом уровне мыши предпочитали пустому стакану отсек с представителем своего вида, проводя в нем больше времени и больше перемещаясь (Рис. 6Б, В).

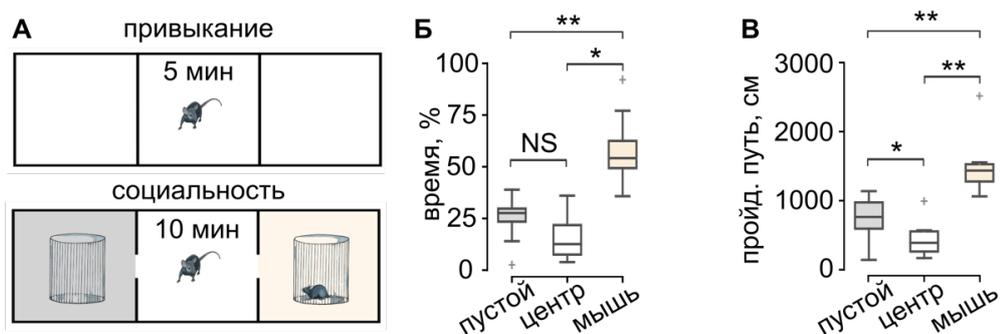


Рисунок 6. Поведенческие результаты теста на социальность. (А) Схема теста на социальность. (Б) Процент проведенного времени и (В) пройденный путь в каждом из отсеков арены (* – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, критерий Вилкоксона, $N = 8$ мышей).

Динамика $\langle \Delta F/F \rangle$ была сходной для двух гиппокампов (Рис. 7А). Отсутствие задержки на графике кросс-корреляции между Ca^{2+} сигналами из правого и левого гиппокампов подтверждает синхронизацию Ca^{2+} активности между полушариями (Рис. 7Б).

Сравнение значений $\langle \Delta F/F \rangle$ для различных отсеков арены выявило значимые отличия Ca^{2+} активности в отсеке с мышью по сравнению с центральным отсеком без стакана (Рис. 7В).

Как и в астроцитах соматосенсорной коры, Ca^{2+} активность в гиппокампе увеличивалась во время эпизодов локомоции, однако не всегда была связана с ней. Кросс-корреляционный анализ между Ca^{2+} сигналами и скоростью мыши показал, что в первой сессии (привыкание) Ca^{2+} сигнал сильнее коррелировал с локомоцией, отражая больший вклад локомоции в Ca^{2+} активность астроцитов в этой сессии (Рис. 7Г). Можно предположить, что появление нового для мыши стимула (объект или другая мышь) приводит к тому, что локомоция перестает объяснять все повышение $[Ca^{2+}]_i$.

Таким образом, Ca^{2+} активность в популяции астроцитов гиппокампа имела как зависящий, так и не зависящий от локомоции компоненты.

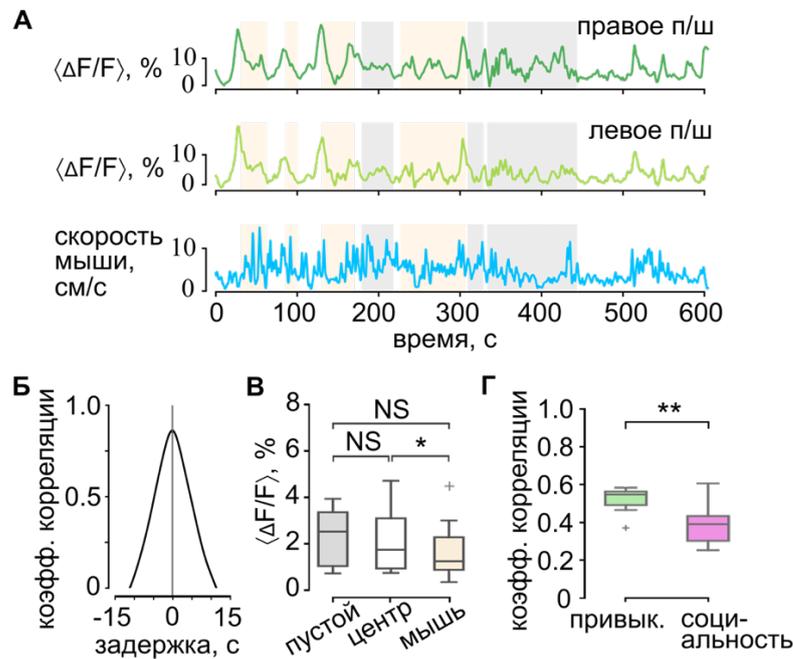


Рисунок 7. Ca^{2+} активность в астроцитах гиппокампа мышей в тесте на социальность. (А) Временная динамика $\langle \Delta F/F \rangle$, серым – нахождение мыши в отсеке с пустым стаканом, бежевым – в отсеке с мышью, белым – в центральном отсеке. (Б) Результаты кросс-корреляционного анализа для Ca^{2+} сигнала из правого и левого гиппокампов. (В) $\langle \Delta F/F \rangle$, рассчитанное как площадь под кривой для участков с нахождением экспериментальных животных в трех отсеках арены. (Г) Результаты кросс-корреляционного анализа для Ca^{2+} сигналов и скорости мыши в обеих сессиях теста (* – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, критерий Вилкоксона, $N = 8$ мышей).

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

В отличие от нейронов, астроциты отвечают на локомоцию с задержкой. Локомоция, как и другие типы поведения, вызывает согласованную работу элементов активной среды мозга, одним из которых являются нейроны (Semyanov and Verkhatsky, 2021). Известно, что нейронная Ca^{2+} сигнализация в основном опирается на вход Ca^{2+} в клетку, в то время как Ca^{2+} активность в астроцитах основана на мобилизации внутриклеточных запасов Ca^{2+} (Ghosh and Greenberg, 1995; Brini et al., 2014). Отличающиеся механизмы активации этих клеток создают предпосылки для различий Ca^{2+} ответов нейронов и астроцитов на локомоцию, поэтому мы провели их сравнение ($N = 4$ мыши, Рис. 8, 9).

В нейронах наблюдалась более высокая Ca^{2+} активность в покое по сравнению с астроцитами, локомоция сопровождалась повышением $\langle \Delta F/F \rangle$ (Рис. 9А). При этом увеличение Ca^{2+} активности при локомоции

относительно уровня активности в покое было значительно больше в астроцитах, чем в нейронах (Рис. 8А).

Кросс-корреляционный анализ между скоростью мыши и динамикой $[Ca^{2+}]_i$ ($\Delta F/F$) в нейронах и астроцитах выявил совпадение локомоции и увеличения $[Ca^{2+}]_i$ в нейронах (Рис. 8Б). Повышение $[Ca^{2+}]_i$ в астроцитах задерживалось на несколько секунд после начала локомоции и повышения $[Ca^{2+}]_i$ в нейронах (Рис. 8Б).

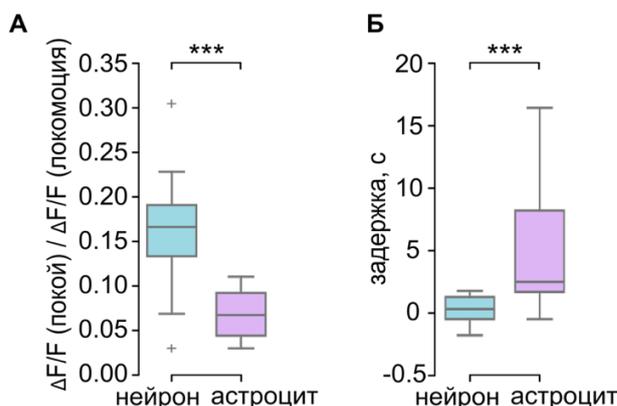


Рисунок 8. Вызванные локомоцией Ca^{2+} ответы в нейронах и астроцитах соматосенсорной коры. (А) Значения $\Delta F/F$ в покое относительно локомоции ($n = 32/ n = 7$ записей для нейронов/ астроцитов, критерий Манна-Уитни). (Б) Отставание пика кросс-корреляции между $\Delta F/F$ и скоростью мыши ($n = 25/ n = 7$ записей для нейронов/ астроцитов, модель со смешанными эффектами) (***) – $p < 0.001$).

Ca^{2+} ответ астроцитов снижается при последующей локомоции.

Поскольку в пределах одной записи могло наблюдаться несколько последовательных эпизодов локомоции, мы сравнили ответы нейронов и астроцитов на пары таких эпизодов, возникающих с небольшими интервалами времени между ними (< 30 с). Для этого рассчитывали коэффициент парной локомоции (КПЛ) – отношение величин второго и первого Ca^{2+} ответов (Рис. 9А).

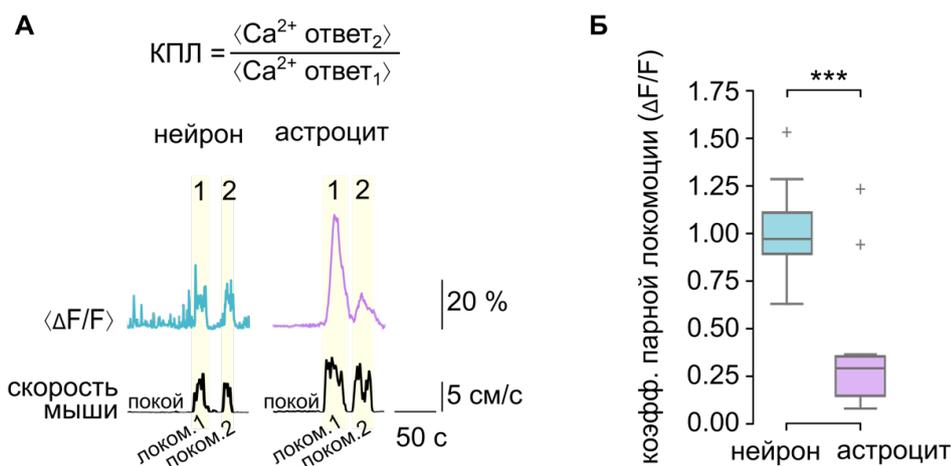


Рисунок 9. Различия коэффициента парной локомоции (КПЛ) для Ca^{2+} активности в астроцитах и нейронах первичной соматосенсорной коры мыши. (А) Соотношение КПЛ показывает величину ответа $\langle \Delta F/F \rangle$ на вторую локомоцию по отношению к величине ответа на первую локомоцию. (Б) Сводная статистика для значений КПЛ ($\Delta F/F$) (***) – $p < 0.01$, модель со смешанными эффектами, $n = 28/ n = 10$ парных локомоторных эпизодов для нейронов/ астроцитов).

КПЛ для $\Delta F/F$ в нейронах был близок к 1, то есть нейроны реагировали повышением $[Ca^{2+}]_i$ на каждый эпизод локомоции (Рис. 9Б). В астроцитах показатель был значительно ниже (Рис. 9Б), что указывает на снижение астроцитарного ответа на последующую локомоцию и наличие рефрактерности. Скорее всего, это связано с механизмами генерации Ca^{2+} сигнала в этих двух типах клеток. В нейронах вход Ca^{2+} обеспечивается, в основном, через лиганд- или потенциал-зависимые каналы плазматической мембраны (Ghosh and Greenberg, 1995; Brini et al., 2014). 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+} через рецепторы инозитол 1,4,5-трифосфата из эндоплазматического ретикулума. При сильной стимуляции запас Ca^{2+} в нем истощается, а рецепторы инактивируются (Verkhratsky et al., 2020; Lim et al., 2021a; Sherwood et al., 2021). Таким образом, для восстановления способности генерировать Ca^{2+} сигналы астроцитам требуется значительно больше времени, чем нейронам.

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

При локомоции обратимо повышается sO_2 в артериолах и венулах соматосенсорной коры. Астроциты и нейроны находятся в тесной морфологической и функциональной взаимосвязи с кровеносными сосудами мозга. Мы зарегистрировали спектры КР из соматосенсорной коры мышей ($N = 6$) и на основании пиков, связанных с колебаниями связей в молекулах оГб и дГб, оценили sO_2 (Рис. 10А).

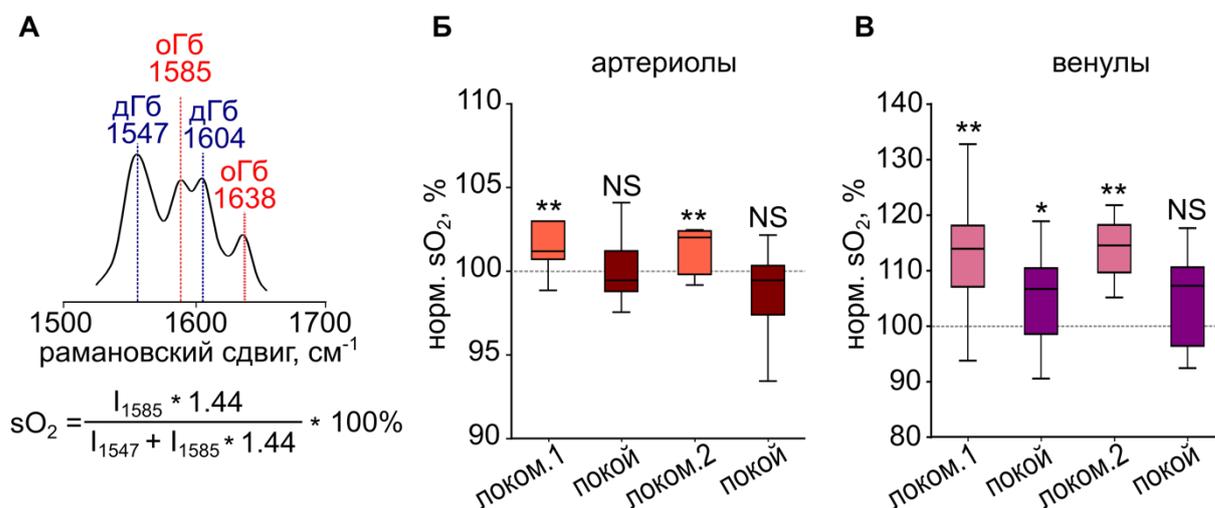


Рисунок 10. Изменение sO_2 в кровеносных сосудах соматосенсорной коры мыши при локомоции. (А) Пример участка спектра КР, зарегистрированного от артериолы в покое, и формула для расчета sO_2 . (Б) и (В) Сводные данные о процентном изменении sO_2 в артериолах и венулах соответственно. Пунктирной линией обозначено значение sO_2 в покое, принятое за 100% (* – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, критерий Манна-Уитни, $n = 12 / n = 21$ артериол/венул).

При локомоции показатель sO_2 возрастал по сравнению с состоянием покоя для крови как в артериолах (Рис. 10Б), так и в венах (Рис. 10В).

Повышение sO_2 наблюдалось при каждой локомоции в обоих типах кровеносных сосудов (Рис. 10Б, В). В то же время мы показали, что на второй эпизод локомоции астроциты отвечают сниженным по амплитуде Ca^{2+} ответом. Известно, что локальный мозговой кровоток может регулироваться вазоактивными агентами, выделяемыми астроцитами по Ca^{2+} -зависимому механизму (Jakovcovic and Harder, 2007). Следовательно, наши данные могут свидетельствовать о том, что Ca^{2+} активность в астроцитах может не являться основным фактором, регулирующим доставку кислорода в мозг. Вероятно, повышение sO_2 связано с системным ответом организма на локомоцию, сопровождающимся увеличением частоты сердечных сокращений (Zaretsky et al., 2016) и учащением дыхания (Bramble and Carrier, 1983).

Локомоция сопровождается расширением артериол соматосенсорной коры. Для артериол соматосенсорной коры мы оценили изменение диаметра при локомоции по сравнению с состоянием покоя до локомоции (Рис. 11). Движение мыши сопровождалось расширением артериол, с возвращением диаметра к величине в покое после окончания движения (Рис. 11).

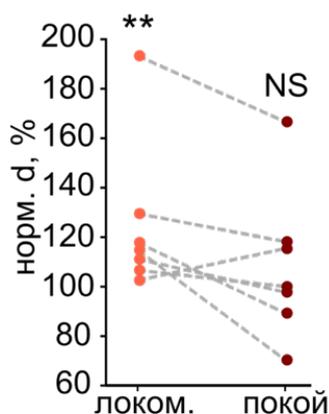


Рисунок 11. Относительное изменение диаметра артериол соматосенсорной коры при локомоции. Произведено нормирование на исходный диаметр артериол в покое, принятый за 100% (** – $p < 0.01$, критерий Манна-Уитни, $n = 7$ артериол).

Таким образом, увеличение sO_2 и расширение артериол может указывать на то, что при локомоции в мозг приходит избыточное количество кислорода и он не испытывает гипоксии в этих условиях.

Различия между метаболическими ответами астроцитов и нейронов соматосенсорной коры на локомоцию

Кислород, поступающий в ткань мозга из крови, выступает конечным акцептором электронов в дыхательной цепи митохондрий клеток, являющейся местом осуществления окислительного фосфорилирования. Окислительное фосфорилирование может активироваться под воздействием Ca^{2+} , поступающего в митохондрии при повышении $[Ca^{2+}]_i$ (Görlach et al., 2015). Различия Ca^{2+} ответов астроцитов и нейронов на локомоцию позволили нам предположить, что их метаболические ответы также могут отличаться. Для проверки этой гипотезы мы оценили метаболические ответы астроцитов и нейронов мышечной ткани ($N = 11$) на локомоцию, исследовав редокс-состояние ЭТЦ их митохондрий (Рис. 12).

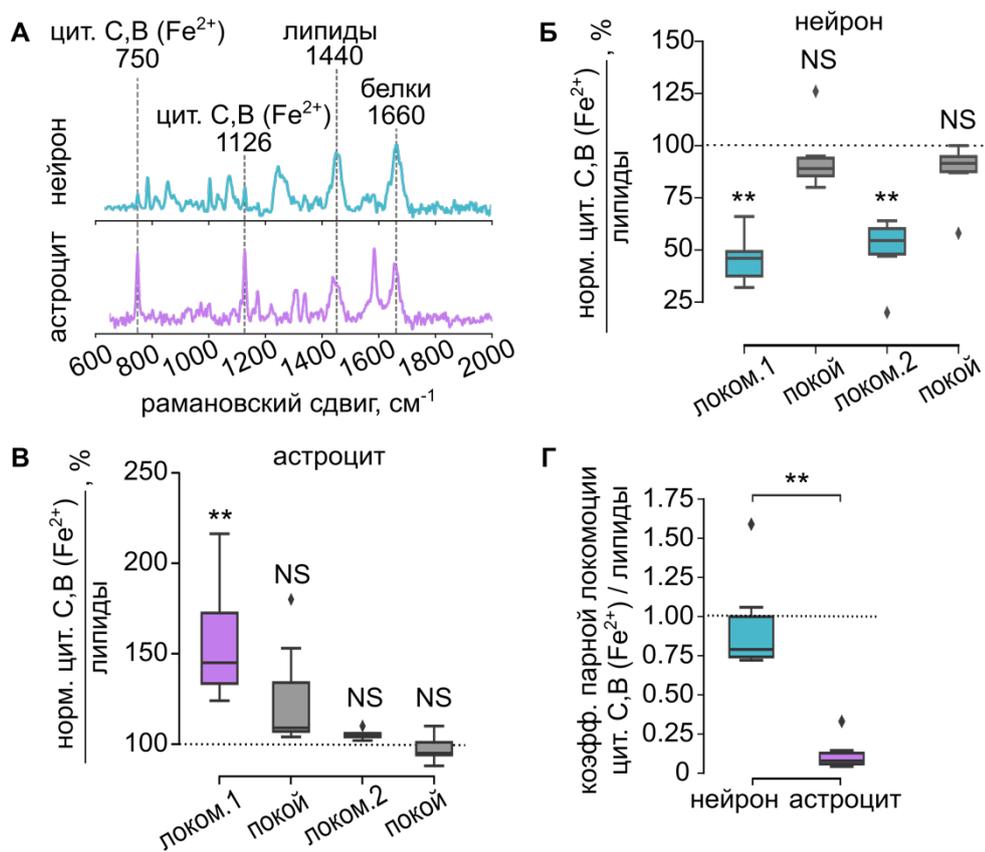


Рисунок 12. Изменение относительного содержания восстановленных цитохромов С- и В-типа в ЭТЦ митохондрий нейронов и астроцитов соматосенсорной коры мыши при локомоции. (А) Примеры спектров КР, зарегистрированных от идентифицированных астроцита (GFP-экспрессирующего) и нейрона (NirFP-экспрессирующего). (Б) и (В) Сводные данные об относительном содержании восстановленных цитохромов С- и В-типа в нейронах ($n = 6$ записей) и астроцитах ($n = 8$ записей). Значение в покое принято за 100% (пунктирная линия). (Г) Коэффициент парной локомоции (КПЛ) для относительного содержания восстановленных цитохромов С- и В-типа в ЭТЦ (** – $p < 0.01$, критерий Манна-Уитни, $n = 6 / n = 6$ парных эпизодов локомоции для нейронов/ астроцитов).

Наблюдалось достоверное снижение относительного содержания восстановленных цитохромов С- и В-типа в дыхательной цепи митохондрий нейронов при локомоции (Рис. 12Б) и увеличение этого показателя в астроцитах (Рис. 12В). 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. По-видимому, повышение относительного содержания восстановленных цитохромов С- и В-типа в ЭТЦ астроцитов связано с различиями в устройстве дыхательной цепи митохондрий астроцитов и нейронов (Lopez-Fabuel et al., 2016), а также различным эффектом Ca^{2+} на метаболические процессы в данных клетках (возможная активация гликолиза в астроцитах) (Horvat et al., 2021).

Кроме того, в отличие от астроцитов, в нейронах характерный ответ наблюдался при каждом эпизоде локомоции. Это указывает на наличие адаптации астроцитов. Такая адаптация, вероятно, связана с запуском процессов, направленных на снижение заполненности ЭТЦ электронами. Это может быть необходимо для того, чтобы предотвратить развитие окислительного стресса, возникающего при повышенной генерации активных форм кислорода вследствие накопления электронов в ЭТЦ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе впервые проведено комплексное исследование изменения активности соматосенсорной коры мышцы при локомоции, включающее анализ ответов на локомоцию астроцитов, нейронов и кровеносных сосудов, формирующих единую морфофункциональную систему (Рис. 13).

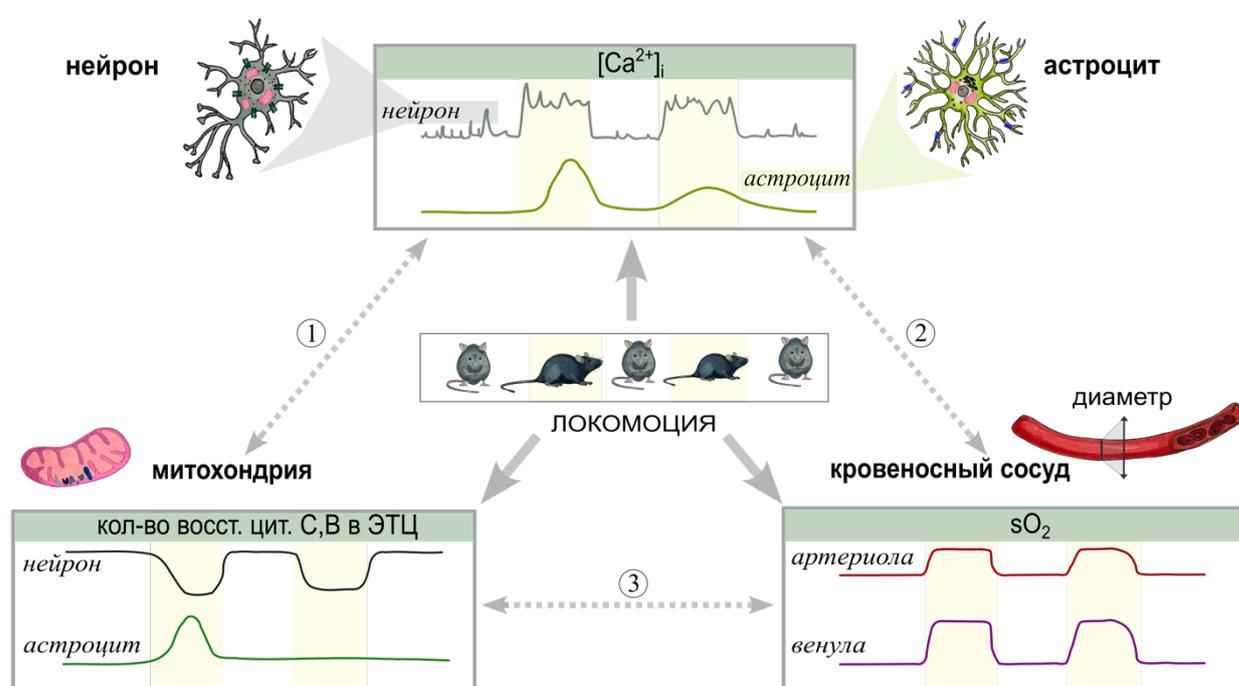


Рисунок 13. Схема, отражающая согласованный ответ взаимосвязанных элементов активной среды мозга мышцы на последовательные эпизоды локомоции.

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 (Denton and McCormack, 1985). С другой стороны, вход Ca^{2+} в митохондрии может активировать цикл Кребса в астроцитах и нейронах (Rossi et al., 2019) и модулировать активность ЭТЦ митохондрий этих клеток (Görlach et al., 2015) (Рис. 13, стрелка 1). В ответ на повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ астроциты высвобождают вазоактивные молекулы через концевые ножки, что может приводить к расширению сосудов и увеличению местного кровотока (Jakovcovic, Harder, 2007). В свою очередь, повышение астроцитарной Ca^{2+} активности может возникать вследствие механической

стимуляции при изменении диаметра кровеносных сосудов (Turovsky et al., 2020), в ответ на функциональную гиперемия или при резком снижении перфузии мозга (Tran et al., 2018) (Рис. 13, стрелка 2). Кислород, поступающий из крови в ЭТЦ митохондрий, является неотъемлемой частью метаболического процесса окислительного фосфорилирования, 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 (Christie et al.) (Рис. 13, 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 (Fedotova et al., 2023). 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* (Fedotova et al., 2023).

Разработанный нами подход на основе рамановской микроспектроскопии (Kotova et al., 2023) позволил получить сведения об изменениях локальной оксигенации крови в артериолах и венах соматосенсорной коры при локомоции. Выявленное повышение $s\text{O}_2$ в венах 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 окислительного фосфорилирования 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 венах первичной соматосенсорной коры, что сопровождается увеличением диаметра артериол.
6. Локомоция приводит к повышению заполненности электронами ЭТЦ в астроцитах и снижению в нейронах.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах Scopus, Web of Science, RSCI и в изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.015.7 по специальности 1.5.24 – «Нейробиология»:

1. Fedotova A., Brazhe A., Doronin M., Toptunov D., Pryazhnikov E., Khiroug L., Verkhatsky A., Semyanov A. Dissociation Between Neuronal and Astrocytic Calcium Activity in Response to Locomotion in Mice // *Function*. – 2023. – Vol. 4, no. 4. – zqad019. (Scopus, WoS, IF = 6.2) (1.39/1.18)*
2. Kotova D.A., Ivanova A.D., Pochechuev M.S., Kelmanson I.V., Khramova Y.V., Tiaglik A.B., Sudoplatov M.A., Trifonova A.P., Fedotova A.A., Morozova K.I., ... Bilan D.S. Hyperglycemia exacerbates ischemic stroke not through increased generation of hydrogen peroxide // *Free radical biology & medicine*. – 2023. – V. 208. – P. 153–164. (Scopus, WoS, IF = 7.4) (1.39/0.5)*
3. Popov A., Brazhe N., Fedotova A., Tiaglik A., Bychkov M., Morozova K., Brazhe A., Aronov D., Lyukmanova E., Lazareva N., Li L., Ponimaskin E., Verkhatsky A., Semyanov A. A high-fat diet changes astrocytic metabolism to promote synaptic plasticity and behavior // *Acta physiologica*. – 2022. – Vol. 236, no. 1. – e13847. (Scopus, WoS, IF = 6.3) (1.62/0.82)*
4. Fedotova A.A., Tiaglik A.B., Semyanov A.V. Effect of Diet as a Factor of Exposome on Brain Function // *J Evol Biochem Phys*. – 2021. – Vol. 57. – P. 577–604. (WoS, IF = 0.6) (3.23/1.6)*

* – Объем в усл. печ. л./вклад автора в усл. печ. л.

Тезисы докладов в рецензируемых журналах

1. Fedotova A., Brazhe A., Semyanov A. Population calcium activity in cortical astrocytes during mouse locomotion // *Glia*. – 2023. – Vol. 71, no S1. – P. e583-e583. (Scopus, WoS, IF = 6.2)
2. Tiaglik A., Morozova K., Fedotova A., Shestopalova M., Zalygin A., Oleinikov V., Bilan D., Brazhe N., Semyanov A. Locomotion differently changes the mitochondria redox state and H₂O₂ production in astrocytes and neurons // *Glia*. – 2023. – Vol. 71, no S1. – P. e596-e596. (Scopus, WoS, IF = 6.2)
3. Fedotova A., Kocsányi T., Tibeykina M., Pryazhnikov E., Brazhe A., Khirug L., Semyanov A. Different parameters of spatiotemporal calcium activity in cortical astrocytes are linked to different phases of mouse running // *Glia*. – 2021. – Vol. 69, no S1. – P. e287-e287. (Scopus, WoS, IF = 6.2)

Тезисы докладов в сборниках конференций

1. Федотова А.А., Тяглик А.Б., Солотенков М.А., Федотов И.В., Браже А.Р., Федотов А.Б., Желтиков А.М., Семьянов А.В. Связь кальциевой активности в астроцитах гиппокампа с поведением мышей // Третья всероссийская научная конференция с международным участием

- «Оптогенетика+ 2023», 6–8 апреля 2023 г.: Сборник научных трудов / Под общ. ред. член-корр. РАН, д.б.н.М. Л. Фирсова. — СПб.: ВВМ, 2023. — С.118-119.
2. Браже Н.А., Морозова К.И., Тяглик А.Б., **Федотова А.А.**, Шестопалова М.С., Залыгин А.В., Олейников В.А., Билан Д.С., Семьянов А.В. Исследование редокс-состояния митохондрий клеток *in vivo* с использованием рамановской микроспектроскопии и генетических инструментов // Третья всероссийская научная конференция с международным участием «Оптогенетика+ 2023», 6–8 апреля 2023 г.: Сборник научных трудов / Под общ. ред. член-корр. РАН, д.б.н. М.Л. Фирсова. — СПб.: ВВМ, 2023. — С.20-21.
 3. Браже А.Р., **Федотова А.А.**, Семьянов А.В. Изменения астроцитарной кальциевой активности при локомоции // Третья всероссийская научная конференция с международным участием «Оптогенетика+ 2023», 6–8 апреля 2023 г.: Сборник научных трудов / Под общ. ред. член-корр. РАН, д.б.н. М.Л. Фирсова. — СПб.: ВВМ, 2023. — С.22-23.
 4. **Fedotova A.**, Brazhe A., Tiaglik A., Denisov P., Toptunov D., Pryazhnikov E., Khiroug L., Fedotov I., Solotenkov M., Zheltikov A., Semyanov A. Astrocytic calcium correlates of animal behavior // RUSNEUROCHEM 2022: Всероссийская с международным участием конференция Российского нейрорхимического общества, г. Санкт-Петербург (22-24 мая 2022 г.). – Тезисы докладов. – СПб.: Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.Сеченова РАН, 2022. – С. 48.
 5. **Fedotova A.**, Brazhe A., Tiaglik A., Denisov P., Muravlev V., Toptunov D., Pryazhnikov E., Khiroug L., Fedotov I., Solotenkov M., Fedotov A., Zheltikov A., Semyanov A. The correlation between calcium activity in astrocytes and mouse behavior // FENS 2022. – Abstract E-book. – P. 3299-3299.
 6. Tiaglik A., **Fedotova A.**, Morozova K., Shestopalova M., Zalygin A., Brazhe N., Oleinikov V., Semyanov A. Imaging of mitochondria redox state in astrocytes and neurons in awake mouse // FENS 2022. – Abstract E-book. – P. 6758-6758.
 7. **Fedotova A.**, Kopcsányi T., Tybeykina M., Pryazhnikov E., Brazhe A., Khiroug L., Semyanov A. In vivo two-photon imaging of calcium dynamics in astrocytic network in mouse cortex // Первый Национальный конгресс по когнитивным исследованиям, искусственному интеллекту и нейроинформатике. Девятая международная конференция по когнитивной науке: Сборник научных трудов. В двух частях. Ч. 2. 10–16 октября 2020 г., Москва, Россия / Отв. ред. В.Л. Ушаков, И.И. Русак, В.В. Климов, П.М. Балабан. М.: НИЯУ МИФИ, 2021. – С.594.

ГЛОССАРИЙ И СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Ca^{2+} событие – непрерывная ограниченная во времени и пространстве область повышения уровня Ca^{2+} .

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

GCaMP6f – генетически кодируемый биосенсор, используемый для обнаружения и измерения концентрации Ca^{2+} в живых клетках.

Активная область (%) – общая площадь Ca^{2+} сегментов, разделенная на площадь окрашенной области.

Интегративная функция астроцита – распространение Ca^{2+} активности в астроците от дистальных отростков к коме, где происходит ее усиление и генерация Ca^{2+} осцилляций.

Конечный Ca^{2+} сегмент – последний сегмент Ca^{2+} события.

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

Медиана Ca^{2+} ответа – момент времени, в котором значение $\Delta F/F$ превышает пороговое в 50-ти процентах пикселей в кадре.

Начальный Ca^{2+} сегмент – первый сегмент Ca^{2+} события.

Плотность Ca^{2+} сегментов (сегментов/мм²) – количество Ca^{2+} 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 Ca^{2+} события, или Ca^{2+} сегмент – двухмерное сечение Ca^{2+} события в пределах кадра.

Средняя площадь Ca^{2+} сегмента (мкм²) – общая площадь Ca^{2+} сегментов, разделенная на их количество.

Степень оксигенации крови (sO_2 , %) – 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.

λ_{em} – длина волны испускания

λ_{ex} – длина волны возбуждения

AAV – аденоассоциированный вирус

PBS – натрий-фосфатный буфер

PFA – параформальдегид

АТФ – аденозинтрифосфат

КПЛ – коэффициент парной локомоции

КР – комбинационное рассеяние

ЭТЦ – электрон-транспортная (дыхательная) цепь митохондрий