

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Национальный исследовательский Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского»

На правах рукописи

Лебедева Альбина Владимировна

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗРАСТНЫХ И ПАТОЛОГИЧЕСКИХ
ИЗМЕНЕНИЙ НЕЙРОН-ГЛИАЛЬНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В
СРЕЗАХ ГИППОКАМПА**

03.03.01 – физиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
член-корреспондент Российской Академии Наук
Алексей Васильевич Семьянов

Нижегород

2017

Оглавление

ВЕДЕНИЕ.....	4
Глава 1. Обзор литературы	10
1.1. Структурная и функциональная организация астроцитов	10
1.2. Основные функции астроцитов.....	12
1.2.1. Метаболическая функция	12
1.2.2. Гомеостатическая функция	13
1.2.3. Сигнальная функция	17
1.3. Энергетический метаболизм в мозге, опосредованный астроцитами.....	20
1.3.1. Катаболизм глюкозы и образование АТФ	21
1.3.2. Специфические энергетические субстраты в мозге молодых животных	22
1.3.2.1. Роль лактата в энергетическом метаболизме и функционировании мозга.....	24
1.3.2.2. Роль пировиноградной кислоты (пирувата) в энергетическом метаболизме и функционировании мозга	24
1.3.2.3. Роль кетоновых тел в энергетическом метаболизме и функционировании мозга.....	25
1.4. Астроциты при эпилепсии.....	27
Глава 2. Материалы и методы	31
2.1. Подготовка переживающих срезов гиппокампа крыс	31
2.2. Флуоресцентный Ca^{2+} имиджинг астроцитов.....	32
2.3. Электрофизиология	36
2.3.1. Патч-кламп нейронов. Регистрация возбуждающих постсинаптических потенциалов (ВПСП)	36
2.3.2. Патч-кламп астроцитов. Измерение транспортерных и калиевых токов	37
2.4. Гистологическое окрашивание по Нисслю.....	40
2.5. Индукция эпилептического статуса у животных на основе литий-пилокарпиновой модели.....	41
2.6. Статистический анализ данных	42
Глава 3. Результаты и их обсуждение	44
3.1. Изменения астроцитарной Ca^{2+} активности в процессе постнатального развития	44
3.1.1. Спонтанная Ca^{2+} активность в астроцитах увеличивается с возрастом.....	44
3.1.2. Возраст-зависимая спонтанная Ca^{2+} активность астроцитов при использовании специфических энергетических субстратов	45
3.1.3. Блокада везикулярного высвобождения предотвращает эффект специфических энергетических субстратов на Ca^{2+} динамику в <P10.....	49
3.2. Исследование функциональной организации астроцитов при хронической эпилептиформной активности.....	54
3.2.1. Классификация судорожной активности в представленной модели эпилептиформной активности.....	54
3.2.2. Дегенерация нейронов и увеличение количества астроцитов в предложенной модели эпилептиформной активности.....	56
3.2.3. Захват глутамата транспортерами астроцитов при хронической эпилептиформной активности.....	58
3.2.5. Пространственно-временные характеристики астроцитарной Ca^{2+} активности после SE	62

3.3. Поиск вероятных механизмов изменений астроцитарной Ca^{2+} активности при эпилептическом статусе.....	67
3.3.1. Ca^{2+} активность в астроцитах при повышенной концентрации внеклеточного K^+	67
3.3.2. Астроцитарная Ca^{2+} активность при активации метаботропных глутаматных рецепторов (mGluR) агонистом trans-ACPD.....	70
Заключение.....	76
Выводы	79
Список цитируемой литературы	80

ВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Исследование процессов взаимодействия между нейронами и астроцитами в головном мозге является актуальной задачей современной нейробиологии. Нейроны передают сигналы друг другу посредством синаптической передачи. Астроциты способны модулировать передачу этих сигналов, хотя несколько лет назад считалось, что астроциты являются лишь вспомогательными клетками для нейронов [1]. На данный момент известно, что астроциты выполняют целый ряд важных функций в головном мозге [2], исследование которых позволит раскрыть новые стороны нейрон-астроцитарного взаимодействия.

Астроциты являются электрически невозбудимыми клетками, которые не способны передавать сигналы посредством генерации потенциалов действия, но они обладают кальциевой сигнализацией со сложными пространственно-временными характеристиками [3]. Астроциты выполняют в мозге следующие функции: трофическую (высвобождают трофические факторы, влияющие на рост нейронов, дифференциацию, формирование новых синапсов, рост аксонов и ветвление дендритов); метаболическую (поставляют к нейронам энергетические субстраты, глутамин, синтезируют гликоген, выполняют барьерную функцию, являясь структурным компонентом гематоэнцефалического барьера); гомеостатическую (участвуют в пространственной буферизации ионов калия, осуществляют обратный захват нейротрансмиттеров); регулируют локальный кровоток при повышенной нейрональной активности, высвобождая ряд веществ, изменяющих просвет сосудов [3]. Кальциевая активность в астроцитах приводит к высвобождению глиотрансмиттеров, регулирующих и модулирующих передачу сигналов в синапсе [4].

Однако функциональная роль астроцитов и их взаимодействие с нейронами при возрастных и патологических процессах в головном мозге

исследована не в полном объеме. Так, например, остаются слабо изученными вопросы функциональной активности астроцитов в процессе постнатального развития, а в частности в раннем онтогенезе. Кроме того, на сегодняшний день остаются неисследованными механизмы формирования кальциевой активности в сети астроцитов (астроцитарном синцитии). Вовлеченность астроцитов в механизмы развития большинства нейродегенеративных заболеваний, также исследована не достаточно [3].

Данная работа посвящена исследованию описанных выше процессов, способных оказывать влияние на активность астроцитов и их взаимодействие с нейронами.

Цели и задачи исследования

Целью данной работы являлось изучение возрастных и патологических изменений нейрон-глиального взаимодействия.

В соответствии с целью были поставлены следующие **задачи**:

1. Исследовать астроцитарную Ca^{2+} активность *str. radiatum* в области CA1 гиппокампа в процессе постнатального развития.
2. Оценить влияние специфических энергетических субстратов на астроцитарную Ca^{2+} активность в раннем онтогенезе.
3. Изучить процессы обратного захвата глутамата и захват K^+ астроцитами при хронической эпилептиформной активности.
4. Исследовать пространственно-временные характеристики астроцитарной Ca^{2+} активности при хронической эпилептиформной активности.
5. Оценить пространственно-временные характеристики Ca^{2+} активности в астроцитах при различных стимулах.

Методы исследования

Работа проводилась на переживающих срезах гиппокампа крыс, применялась методика функционального кальциевого имиджинга, пэтч-кламп, гистологический метод окрашивания нервных клеток по Нисслю.

Эпилептический статус у животных создавался на основе литий-пилокарпиновой модели.

Для анализа процессов обратного захвата глутамата транспортерами астроцитов, а также процессов захвата K^+ из внеклеточного пространства астроцитами была разработана специальная программа с использованием среды программирования Matlab. Для исследования пространственно-временных характеристик Ca^{2+} активности астроцитов в нейрон-глиальной сети была использована модифицированная программа в среде программирования Matlab, впервые описанная в статье Wu et. al., 2014.

Все данные были проанализированы с применением статистических методов.

Научная новизна работы

Впервые выявлены изменения в Ca^{2+} сигнализации астроцитов *str. radiatum* области CA1 гиппокампа в процессе постнатального развития.

Впервые показано влияние специфических энергетических субстратов на нейрон-глиальное взаимодействие в гиппокампе в раннем онтогенезе.

Впервые проведена оценка процессов обратного захвата глутамата астроцитарными транспортерами, а также процессы захвата K^+ из внеклеточного пространства при хронической эпилептиформной активности с использованием уникального метода анализа.

Впервые показаны изменения пространственно-временных характеристик Ca^{2+} событий в астроцитах гиппокампа при хронической эпилептиформной активности.

Впервые исследованы пространственно-временные характеристики Ca^{2+} событий в астроцитах при разных видах стимуляции.

Научно-практическая значимость

Данная работа показала важность использования специфических энергетических субстратов, поступающих с молоком матери в раннем онтогенезе для нормального функционирования нейрон-астроцитарных сетей

в головном мозге. Это свидетельствует о необходимости использования энергетических субстратов в питательных средах, применяемых в научных исследованиях при изучении активности клеток мозга на ранних этапах развития. Наиболее важно контролировать наличие специфических энергетических субстратов в детском питании, отсутствие которых или ограниченное использование может оказывать влияние на развитие головного мозга. Таким образом, результаты данной части работы могут быть рекомендованы для использования в доклинических исследованиях при разработке питательных сред и искусственного питания.

Кроме того, в представленной работе были раскрыты новые принципы Ca^{2+} сигнализации астроцитов гиппокампа на основе оценки пространственно-временных характеристик, как при физиологических и возраст-зависимых процессах, так и при патологических процессах в мозге, таких как хроническая эпилептиформная активность. Эти результаты могут быть использованы в качестве теоретической базы при разработке интеллектуальных систем и мозг-компьютерных интерфейсов. Новые данные о Ca^{2+} активности в астроцитах при хронической эпилептиформной активности могут быть использованы при разработке новых лекарственных препаратов и корректных методов лечения эпилепсии.

Кроме того, результаты работы могут быть использованы в образовательном процессе для студентов и аспирантов биологических и медицинских специальностей в качестве специальных курсов лекций и лабораторных практикумов.

Собственный вклад автора в исследования

Автор лично принимал участие в проведении работы на всех этапах её выполнения, включая постановку задач, планирование и проведение экспериментов, анализ и интерпретацию полученных результатов, а также в подготовке научных статей и докладов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Частота Ca^{2+} событий гиппокампальных астроцитов, опосредованная взаимодействием с нейронами, увеличивается при поступлении специфических энергетических субстратов (лактата, пирувата, кетоновых тел) в раннем онтогенезе.

2. При развитии хронической эпилептиформной активности наблюдается снижение размеров Ca^{2+} событий в астроцитах, но не происходит нарушений в процессах обратного захвата глутамата и K^+ .

3. Накопление внеклеточного K^+ и активация метаботропных глутаматных рецепторов изменяют пространственно-временные характеристики популяционной активности астроцитов: повышается вероятность событий большого размера.

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы были представлены на Международной конференции «На пути к нейроморфному интеллекту: эксперименты, модели и технологии» (Нижний Новгород, 2011); на 4 Съезде биофизиков России (Нижний Новгород, 2012); Международной конференции по биофизике (Пушино, 2012); Международном конгрессе по нейронаукам (Красноярск, 2014); 68 Областной научной конференции «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Нижний Новгород, 2015); Международной конференции «Frontiers in biomedicine» (Нижний Новгород, 2015); Двенадцатом международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2016); Международной конференции FEPS (Париж, 2016); Международной конференции по нейронаукам «Volga Neuroscience Meeting» (Санкт-Петербург-Нижний Новгород, 2016); Тринадцатом международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, Крым, Россия, 2017); Двадцать третьем международном съезде физиологического общества им. И. П. Павлова (Воронеж, Россия, 2017).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 25 научных работ, из них 3 статьи в рецензируемых научных изданиях (Web of Science, Scopus), входящих в перечень ВАК; 1 патент, 1 свидетельство на программу для ЭВМ, 15 тезисов конференций, 5 учебно-методических пособий.

Конкурсная поддержка работы

Проведенные исследования были выполнены при поддержке Министерства образования и науки РФ (Задание № 6.2619.2014/К) и Федеральной целевой программы (Соглашение 14.581.21.0016).

Структура и объём диссертации

Диссертация изложена на 90 страницах печатного текста и содержит 31 рисунок, 4 таблицы. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Список литературы включает 110 источников, из них 109 иностранных.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Структурная и функциональная организация астроцитов

Астроциты впервые были охарактеризованы Рудольфом Вирховым в 1850-х годах, как «клей», придающий форму различным областям мозга и удерживающее их вместе [1]. Впоследствии роль астроцитов в головном мозге была обширно исследована.

Астроциты представляют собой глиальные клетки звездчатой формы с многочисленными сильноразветвленными отростками и средним размером сомы 10 мкм [6]. Астроцитарные отростки располагаются в непосредственной близости от синаптических контактов (перисинаптические отростки) [5] и могут модулировать синаптическую передачу. Отростки астроцитов, отходящие непосредственно от сомы клетки, довольно толстые и включают в себя пучки промежуточных микрофиламентов, основой которых является GFAP (GFAP, Glial fibrillary acidic protein). Диаметр таких отростков может достигать 8-9 нм. Данные отростки разветвляются, образуя тонкие терминальные отростки, которые проникают между нейронами и окружают синапсы. При этом их расположение около синапса может быть настолько плотным, что синапс приобретает инкапсулированный вид. Интересно отметить, что степень охвата перисинаптических отростков обратно пропорциональна размеру синапса, (чем больше синапс, тем больше является открытым аксон – шипиковое взаимодействие) [6]. Перисинаптические отростки являются достаточно пластичными и динамичными структурами, способными модулировать синаптическую передачу [6].

Астроциты приматов, включая человека, делятся на четыре типа: протоплазматические, фиброзные, интраламнарные и варикозные (проекторные) [7]. У грызунов есть только первые два типа астроцитов.

Одним из специфических маркеров астроцитов является глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP, glial fibrillary acidic protein, глиальный фибриллярный кислый белок). GFAP является основой промежуточных

филаментов, [3] и широко используется для идентификации астроцитов. В отличие от нейронов, астроциты не обладают электрической возбудимостью, хотя экспрессируют большинство свойственных нейронам трансмембранных белков рецепторов [10-18] и каналов [19-23], способствующих формированию разности потенциалов на мембране [22]–[24]. Астроциты обладают способностью генерировать регенеративные изменения концентрации Ca^{2+} в цитоплазме: небольшие концентрации Ca^{2+} способны активировать инозитол-3-фосфатные рецепторы (IP3, inositol-3-phosphate) [27-28] эндоплазматического ретикулума (ЭПР), что приводит к выходу Ca^{2+} из внутриклеточных депо и Ca^{2+} -зависимому высвобождению Ca^{2+} [4], [27]. Повышения Ca^{2+} в астроцитах приводит к высвобождению глиотрансмиттеров, которые осуществляют модуляцию синаптической передачи [30-32]. Данные последних лет также демонстрируют наличие взаимодействия между нейрональной и астроцитарной активностью посредством не только Ca^{2+} , но и Na^+ сигнализации в астроцитах [16], [31]. Пространство между астроцитарными отростками и синапсами заполнено внеклеточным матриксом мозга (молекулами коллагенов, гликопротеинов и протеогликанов). Весь комплекс: пресинапс, постсинапс, астроцитарный отросток и внеклеточный матрикс формируют единый комплекс, называемый четырёхчастным синапсом [32]. Более того, астроциты формируют собственные сети, в которых клетки передают сигналы друг другу посредством щелевых контактов (гэп-контактов) и глиотрансмиттеров [6], [35-36]. Помимо классической синаптической передачи нейронная и глиальная сети могут взаимодействовать друг с другом посредством внесинаптических сигналов, таких как диффузные нейротрансмиттеры [36].

1.2. Основные функции астроцитов

1.2.1. Метаболическая функция

Астроциты, являясь структурным компонентом гематоэнцефалического барьера, способны поставлять ряд соединений из кровеносной системы к нейронам, в том числе энергетические субстраты [37]. Одним из важнейших энергетических субстратов, необходимых для нормальной работы мозга является гликоген, который представляет собой энергетически-выгодную форму хранения глюкозы. Было обнаружено, что запасы гликогена при нормальных физиологических условиях находятся исключительно в астроцитах [38]. А в патологических условиях запускаются механизмы отложения гликогена в нейронах, приводящие к апоптозу и их гибели. Поэтому, для энергетического обеспечения нейронов глюкоза и гликоген в астроцитах окисляются до лактата, который поставляется нейронам в качестве энергетического субстрата. Было показано, при патологических состояниях мозга (например, при гликопогликемии), а также при голодании в астроцитах наблюдается увеличение запасов гликогена, который служит энергетическим источником как для нейронов, так и для самих астроцитов [40].

Астроциты участвуют в синтезе глутамина, являющегося первичным субстратом для синтеза гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) – основного тормозного нейромедиатора в нервной системе [39]. Эта функция астроцитов является необходимой для поддержания тормозной ГАМК-зависимой синаптической передачи. Также глутамин является субстратом для образования основного возбуждающего нейромедиатора – глутамата [40].

В астроцитах глутамат преобразуется в неактивную форму – глутамин, и затем транспортируется к нейрону, где снова преобразуется в глутамат под действием фермента глутаминазы. Такая сложная цепь превращений глутамата необходима для предотвращения неконтролируемой активации нейронов глутаматом и эксайтотоксичности [41] (рис. 1).

Астроциты обладают способностью к высвобождению нескольких глиотрансмиттеров, например, глутамата, ГАМК, глицина, таурина и АТФ. При этом их высвобождение может быть осуществлено несколькими способами: экзоцитозом – с помощью везикул, диффузией через ионные каналы, посредством реверсии обратного захвата нейротрансмиттеров [42].

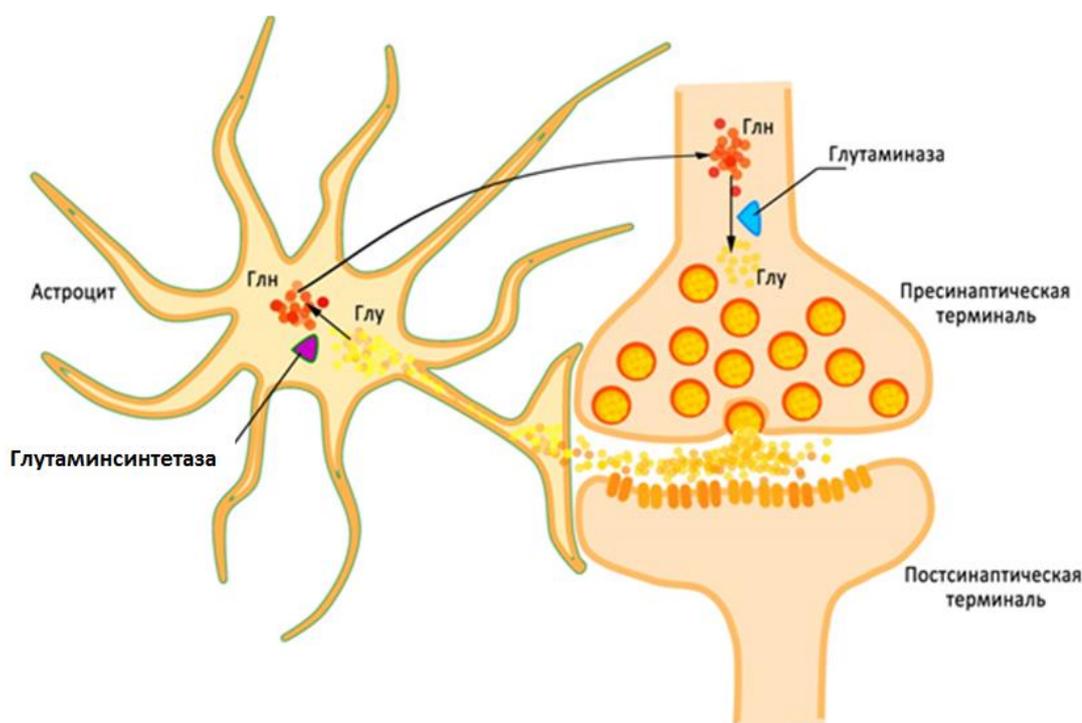


Рисунок 1. Цикл синтеза глутамата в астроцитах. В астроците глутамат преобразуется в глутамин с помощью глутаминсинтетазы, и затем транспортируется к нейрону, где снова преобразуется в глутамат с помощью глутаминазы. Глу – глутамат; Глн - глутамин

Кроме того, астроциты участвуют в утилизации аммония и других продуктов метаболизма, а также осуществляют защиту нейронов от свободных радикалов, поглощая и нейтрализуя их [43], [44].

1.2.2. Гомеостатическая функция

Астроциты активно участвуют в поддержании гомеостаза в межклеточном пространстве головного мозга. Они осуществляют захват глутамата из синаптической щели посредством транспортеров (до 80% всего высвобождаемого глутамата). Это необходимо для предотвращения

десенситизации рецепторов на постсинаптической мембране, эксайтотоксичности и чрезмерной активации NMDA-рецепторов, которая приводит к резкому повышению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} и, как следствие, гибели клетки [40].

Транспортеры способны осуществлять транспорт ионов через мембрану. Для этого не требуется гидролиза АТФ. Существует три типа транспортеров по направлению переноса веществ: симпортеры, антипортеры и унипортеры. Симпортеры осуществляют транспорт веществ в одном направлении, антипортеры – в противоположных, унипортеры – транспорт одного вещества независимо от других молекул.

Выделяют пять подтипов натрий-зависимых транспортеров, отвечающих за удаление внеклеточного глутамата в ЦНС и контролирующих синаптическую передачу. Из них в астроцитах экспрессируются EAAT1 и EAAT2 (excitatory amino acid transporter), аналогом которых у грызунов являются GLAST (glutamate–aspartate transporter) и GLT-1 (glutamate transporter-1) соответственно. Транспортеры глутамата, экспрессируемые астроцитами, регулируют возбуждающую нейротрансмиттерную передачу, предотвращая процесс эксайтотоксичности [45].

Транспортеры возбуждающих аминокислот в астроцитах захватывают 1 молекулу глутамата (которая при нормальном pH является одновалентным анионом), а также 3 Na^+ и при этом высвобождается 1 K^+ . Кроме того, вместе с глутаматом в клетку транспортируется один H^+ (рис. 2). Такой транспорт ионов обуславливает электрогенные свойства глутаматных транспортеров [46].

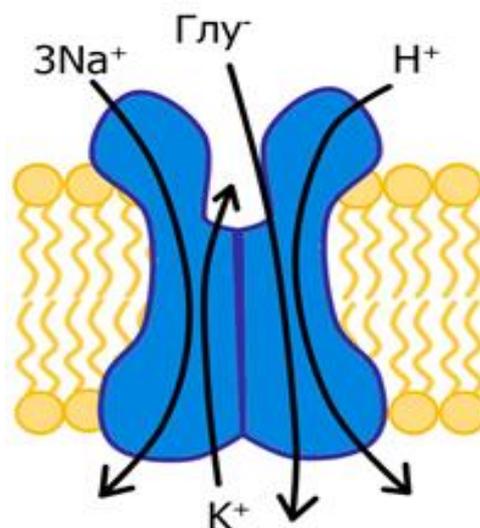


Рисунок 2. Функционирование глутаматных транспортеров (EAAT1,2) в астроцитах при прямом режиме работы. Глу⁻ – молекула глутамата, 3Na⁺ - 3 иона натрия, K⁺ - ион калия, H⁺ - ион водорода

Астроциты участвуют в пространственной и локальной буферизации K⁺, который высвобождается в фазу реполяризации во время потенциалов действия, а также при активации постсинаптических рецепторов, в частности, наибольший вклад вносят NMDA-рецепторы [3]. Внутри астроцита K⁺ может попадать пассивно по K⁺-каналам и за счет энергии вторично-активного транспорта: антипорт 2K⁺/3Na⁺, и симпорт Na⁺/K⁺ и 2Cl⁻. Основным типом калиевых каналов, участвующих в буферизации K⁺ в астроцитах являются Kir_{4.1} [47] (рис. 3).

Нарушение механизмов удаления K⁺ приводит к его аккумуляции и ряду серьезных заболеваний. К примеру, во время эпилептиформной активности концентрация ионов калия в межклеточном пространстве достигает 10-12 мМ, а при ишемии головного мозга может увеличиваться до 50-60 мМ [42].

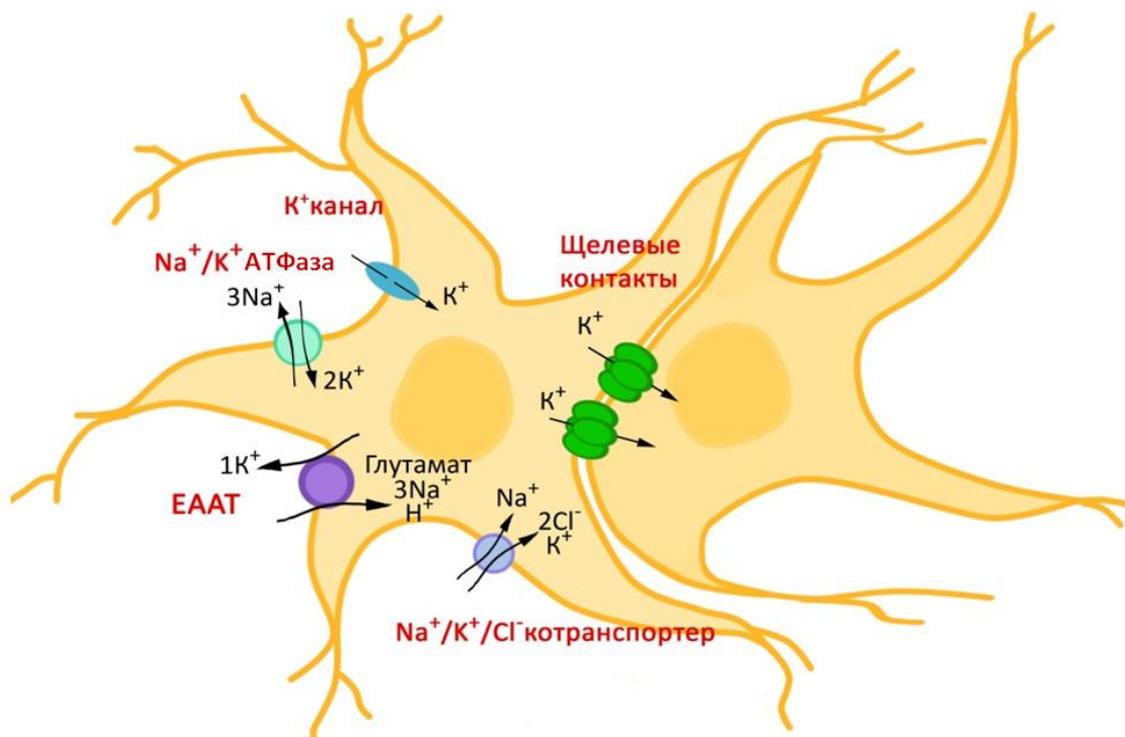


Рисунок 3. Система транспорта ионов в астроцитах. NKCC1 котранспортеры переносят Na^+ , K^+ и Cl^- внутрь клетки под действием электрохимического градиента ионов Na^+ ; транспортеры астроцитов за один цикл переносят внутрь клетки одну молекулу глутамата, три Na^+ , один H^+ и удаляют из клетки один K^+ ; по калиевым K^+ каналам K^+ перемещаются благодаря электрохимическому градиенту внутрь клетки; Na^+/K^+ -АТФаза астроцитов осуществляет антипорт 3Na^+ с 2K^+ , создавая тем самым высокую концентрация Na^+ во внеклеточной среде и высокую концентрацию K^+ внутри клетки. Благодаря щелевым контактам внутриклеточный K^+ способен диффундировать по глиальному синцитию

Благодаря наличию ионных каналов, мембрана астроцитов обладает высокой проницаемостью для K^+ . Поэтому потенциал покоя астроцитов ($V_m \sim -80$ мВ) очень близок к потенциалу реверсии для K^+ ($E_k \sim -90$ мВ). Согласно закону Ома, ток через мембрану равен:

$$I = g(V_m - E_k), \quad (1)$$

где g - проводимость ионного канала, V_m - потенциал покоя мембраны, E_k - потенциал реверсии для K^+ .

Потенциал реверсии для одного K^+ можно вычислить с помощью уравнения Нернста:

$$E_k = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[\text{K}^+]_i}{[\text{K}^+]_o}, \quad (2)$$

где R - газовая постоянная, T – абсолютная температура, z валентность, F - постоянная Фарадея, $[K^+]_o$ - концентрация K^+ во внеклеточном пространстве, $[K^+]_i$ - концентрация K^+ во внутриклеточном пространстве.

Увеличение внеклеточной концентрации K^+ вызовет сдвиг E_k в сторону деполяризации, которая вызовет приток K^+ (т.к. $V_m < E_k$). Однако данный вход ионов деполяризует мембрану, и V_m станет равным E_k , и ток ионов прекратится [48]. Таким образом, K^+ каналы вносят вклад в удаление K^+ из внеклеточного пространства.

Более значимый вклад осуществляют Na^+/K^+ -АТФазы и NKCC1-котранспортеры. Na^+/K^+ -АТФазы удаляют Na^+ из клетки и доставляют K^+ внутрь. Уровень насыщения астроцитарных Na^+/K^+ -АТФаз (10-15 мМ) намного выше нейрональных АТФаз (3мМ), что обуславливает их значительную роль в удалении ионов K^+ из внеклеточного пространства. NKCC1-котранспортеры так же осуществляют перенос Na^+ , K^+ и Cl^- внутрь клетки. Перенос ионов осуществляется благодаря электрохимическому градиенту ионов натрия, стехиометрия канала 1Na:1K:2Cl.

Однако на мембране астроцитов существуют и не ионные каналы, например, аквапорины, которые проницаемы для воды. С их помощью астроциты контролируют изменение концентрации воды в межклеточном пространстве [49].

1.2.3. Сигнальная функция

Астроциты электрически-невозбудимые клетки, но они обладают Ca^{2+} сигнальной системой. В астроцитах изменение концентрации Ca^{2+} может происходить либо спонтанно, либо в ответ на действие нейротрансмиттеров. Ca^{2+} сигналы в астроцитах проявляются как временное повышение содержания свободного Ca^{2+} в клетке в течение нескольких секунд. В некоторых случаях может наблюдаться быстрое локальное увеличение концентрации Ca^{2+} , за которым может последовать более длительная фаза. В

других случаях уровень Ca^{2+} в астроцитах колеблется в зависимости от активности синапса. Ca^{2+} сигналы могут распространяться к различным частям клетки или между клетками через щелевые контакты (ГЭП-контакты) [27,55].

Ca^{2+} сигналы в астроцитах формируются за счет основных двух путей: во-первых, за счет поступления ионов Ca^{2+} через цитоплазматическую мембрану из внеклеточного пространства, во-вторых, за счет высвобождения Ca^{2+} из внутриклеточных депо (ЭПР и митохондрии).

Транспортируется Ca^{2+} в ЭПР с помощью Ca^{2+} -АТФазы, а мобилизация его происходит в основном за счет активации ИТФ-рецепторов (инозитол-1,4,5-трифосфатных рецепторов). ИТФ-рецепторы в свою очередь активируются непосредственно инозитол-1,4,5-трифосфатом, который образуется в качестве вторичного посредника при активации метаботропных рецепторов глутамата или метаботропных пуринаргических рецепторов P2Y с последующей работой фосфолипазы С [28]. Также уровень Ca^{2+} в астроцитах может контролироваться митохондриями. Они захватывают Ca^{2+} внутрь митохондрий при помощи Ca^{2+} -унипортеров и могут высвобождать обратно в цитоплазму клетки через митохондриальные $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменники.

Преобладание внутриклеточного Ca^{2+} , в качестве основного источника сигналов в астроцитах, однако, не исключает вход Ca^{2+} из внеклеточного пространства через мембрану клетки. Определенный вклад при этом будут вносить следующие структуры клетки:

1. Потенциал-зависимые Ca^{2+} каналы VGCC (voltage-gated Ca^{2+} -channels) L-, N-, R-, T-типов (их наличие в астроцитах считается спорным);
2. Лиганд-зависимые ионные каналы, проницаемые для Ca^{2+} (NMDARs – N-метил-D-аспартатные рецепторы; AMPARs - аминоксалолепропионовые рецепторы, содержащие GluR2 субъединицу; ионотропные пуринаргические рецепторы P2X подтипа);

3. TRPC-каналы (transient receptor potential channels), каналы, регулирующие проницаемость катионов (в основном ионов Ca^{2+}). Вход кальция через эти каналы регулируется уровнем этого иона во внутриклеточных депо;

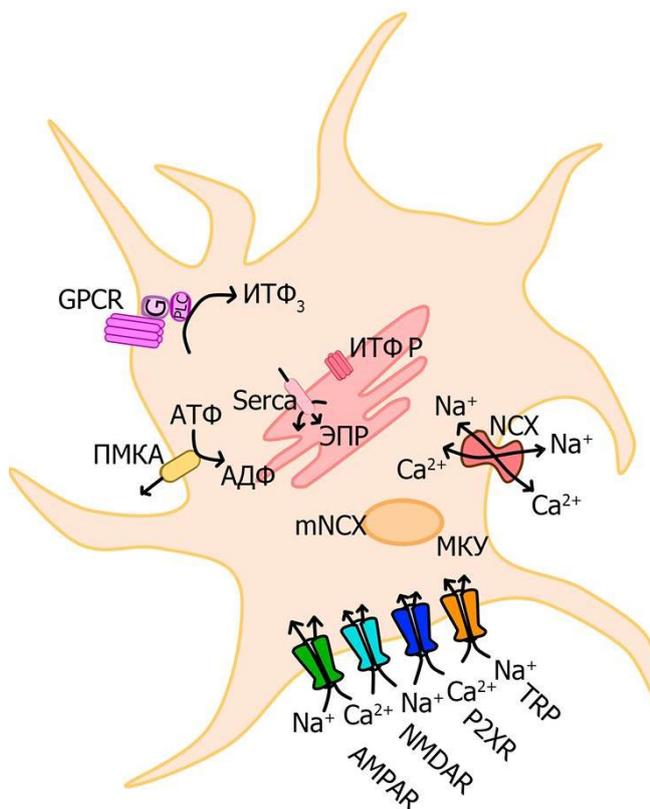


Рисунок 4. Структуры клетки, участвующие в генерации Ca^{2+} сигналов в астроцитах. GPCR (G-protein coupled receptor) – рецепторы, сопряженные с G-белком (например, метаботропный рецептор глутамата, mGluR); ИТФ-инозитол-3-фосфат; ИТФ – инозитол-1,4,5-трифосфатные рецепторы; SERCA – сарко-эндоплазматическая Ca^{2+} -АТФаза; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; PMCA – плазматическая мембранная Ca^{2+} -АТФаза; АТФ – аденозинтрифосфат; АДФ – аденозидифосфат; AMPAR – ионотропный глутаматный рецептор α -амино-3-гидрокси-5-метил-4 изоксазолпропиононовой кислоты; NMDAR – ионотропный глутаматный рецептор, селективно связывающий N-метил-D-аспартат; P2XR – ионотропный пуринергический рецептор; TRPC – (transient receptor potential channels) каналы, регулирующие проницаемость для катионов, в основном ионов Ca^{2+} ; NCX – $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменник; mNCX – митохондриальный $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменник; MCU – митохондриальный кальциевый унипортер

4. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменники, в астроцитах представленные всеми тремя типами, свойственными млекопитающим: NCX1, NCX2 и NCX3. Эти обменники могут работать в прямом режиме, когда один Ca^{2+} из клетки обменивается на три Na^+ , и в реверсивном режиме, при котором направление транспорта ионов меняется. Переход между этими режимами контролируется

значением потенциала на мембране (переход в реверсивный режим наблюдается при деполяризации мембраны клетки).

Таким образом, взаимодействия между различными источниками Ca^{2+} определяют его динамику в астроците [40] (рис. 4).

1.3. Энергетический метаболизм в мозге, опосредованный астроцитами

Для правильного развития и соответственно функционирования головного мозга критическими являются процессы поставки питательных веществ от астроцитов к нейронам, поскольку головной мозг имеет высокие энергетические потребности по отношению к общей массе тела и нарушение этих процессов может привести к нарушению в развитии мозга или привести к формированию нейродегенеративных заболеваний. Головной мозг потребляет около 20% кислорода и 25% глюкозы, в то время как он составляет лишь 2% от общей массы тела [40].

Поддержание и восстановление ионных градиентов на мембране, поглощение и утилизация нейротрансмиттеров, сигнальные каскады – всё это требует больших энергетических затрат как у нейронов, так и у астроцитов, а в особенности в ранний период постнатального развития. В процессе формирования нервных клеток мозг может использовать другие источники энергии по отношению к глюкозе (специфические энергетические субстраты), например кетоновые тела, лактат и пируват, которые поступают в организм и непосредственно к клеткам мозга с молоком матери и активно метаболизируются в астроцитах [51].

Кроме того, кетоновые тела могут быть использованы в качестве энергетического субстрата также при голодании и физических нагрузках [51], [52].

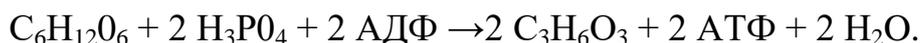
1.3.1. Катаболизм глюкозы и образование АТФ

Основным энергетическим субстратом во взрослом мозге служит глюкоза, так как в результате распада глюкозы образуется АТФ [55]. Существует два основных пути катаболизма глюкозы – аэробный и анаэробный распад. Аэробный распад глюкозы можно выразить суммарным уравнением:

$C_6H_{12}O_6 + 6 O_2 \rightarrow 6 CO_2 + H_2O + 38 \text{ АТФ}$. Этот процесс включает несколько стадий:

- Аэробный гликолиз - процесс окисления глюкозы до пировиноградной кислоты, протекающий в присутствии кислорода. Все ферменты, катализирующие реакции этого процесса, локализованы в цитозоле клетки.
- Общий путь катаболизма, включающий превращение пирувата в ацетил-КоА и его дальнейшее окисление в ЦТК (цикле трикарбоновых кислот).
- Перенос атомов водорода и электронов в митохондриальную дыхательную цепь при помощи специальных челноков. В результате окислительного фосфорилирования образуется энергия, заключённая в макроэргических связях молекул АТФ. Таким образом, в результате аэробного распада молекулы глюкозы синтезируется 38 молекул АТФ.

Анаэробным распадом (гликолизом) называют процесс расщепления глюкозы с образованием в качестве конечного продукта лактата. Этот процесс протекает без использования кислорода и поэтому не зависит от работы митохондриальной дыхательной цепи. АТФ образуется за счёт реакций субстратного фосфорилирования. Суммарное уравнение процесса:



В результате анаэробного гликолиза пируват восстанавливается цитозольным НАДН при участии фермента лактатдегидрогеназы. Анаэробный гликолиз по сравнению с аэробным менее эффективен. В этом

процессе катаболизм 1 молекулы глюкозы без участия митохондриальной дыхательной цепи сопровождается синтезом 2 молекул АТФ.

Основное физиологическое назначение катаболизма глюкозы заключается в использовании энергии, освобождающейся в этом процессе для синтеза АТФ.

Энергия, выделяющаяся в процессе полного распада глюкозы до CO_2 и H_2O , составляет 2880 кДж/моль. Если эту величину сравнить с энергией гидролиза высокоэнергетических связей - 38 моль АТФ (50 кДж на моль АТФ), то получим: $50 \times 38 = 1900$ кДж, что составляет 65% от всей энергии, выделяющейся при полном распаде глюкозы. Такова эффективность использования энергии распада глюкозы для синтеза АТФ. Необходимо учитывать, что реальная эффективность процесса может быть ниже. Точно оценить выход АТФ можно только при субстратном фосфорилировании, а соотношение между поступлением водорода в дыхательную цепь и синтезом АТФ является приблизительным.

Кроме энергетической функции, процесс катаболизма глюкозы может выполнять и анаболические функции. Метаболиты гликолиза используются для синтеза новых соединений. Так, фруктозо-6-фосфат и глицеральдегид-3-фосфат участвуют в образовании рибозо-5-фосфата – структурного компонента нуклеотидов; 3-фосфоглицерат может включаться в синтез аминокислот, таких как серин, глицин, цистеин. В печени и жировой ткани ацетил-КоА, образующийся из пирувата, используется как субстрат при биосинтезе жирных кислот, холестерина, а дигидроксиацетонфосфат как субстрат для синтеза глицерол-3-фосфата.

1.3.2. Специфические энергетические субстраты в мозге молодых животных

Как описано выше, на ранних этапах развития животного энергетический метаболизм мозга зависит от дополнительных

энергетических субстратов, поступление которых опосредовано астроцитами [70,73-75]. К специфическим энергетическим субстратам относят пировиноградная кислота (пируват), молочная кислота (лактат) и кетоновые тела (рис. 5).

Именно на ранних стадиях развития животного эти соединения циркулируют в крови и поступают в мозг в больших количествах. Причиной этому служит тот факт, что животные в этот период получают питательные вещества с молоком матери, которое богато лактозой, жирными кислотами и белковыми соединениями. А пищу, которая будет поставлять именно глюкозу, животное начинает потреблять только к 18-20 дню постнатального развития.

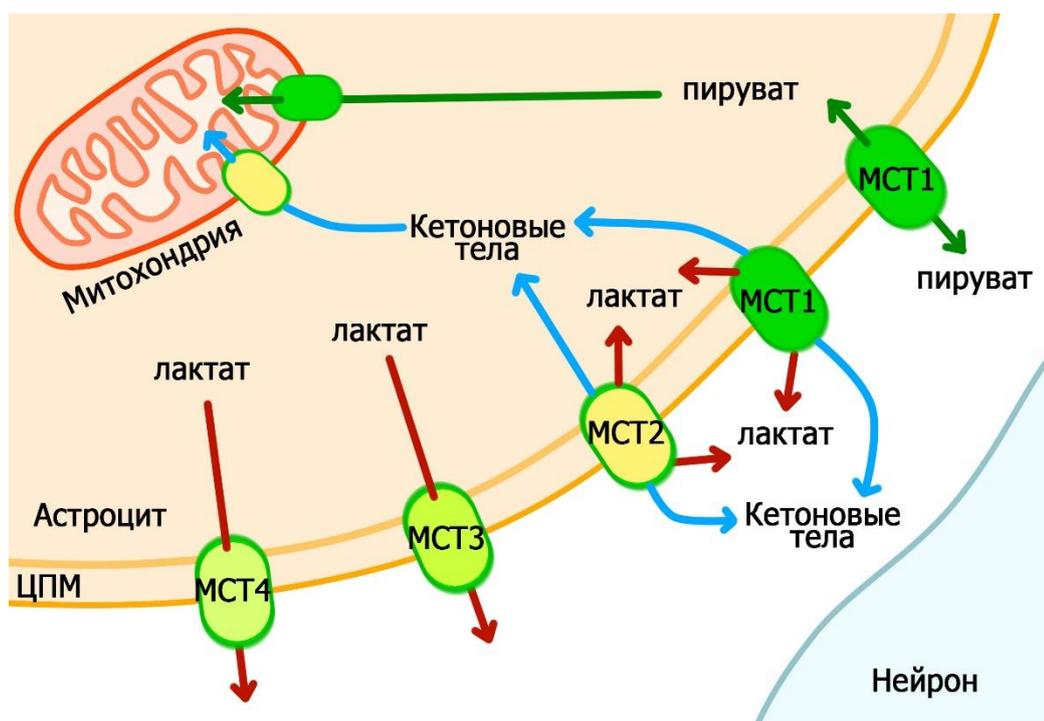


Рисунок 5. Поступление лактата, пирувата и кетоновых тел к нейронам посредством монокарбоксилатных транспортеров. МСТ 1-4 – монокарбоксилатные транспортеры 1-4 типов. ЦПМ – цитоплазматическая мембрана

В результате последовательного расщепления пирувата образуется 30 молекул АТФ, распад лактата имеет меньшую энергетическую ценность, лактат в данном случае является основным источником образования пирувата. Лактат и пируват также могут служить источниками образования

глюкозы в ходе процесса глюконеогенеза, но этот процесс является энергозависимым [56].

1.3.2.1. Роль лактата в энергетическом метаболизме и функционировании мозга

Лактат образуется в процессе расщепления глюкозы и присутствует во внеклеточном пространстве взрослого мозга в концентрации 0,5 -1,5 мМ [51], [57]. В ранний период постнатального развития мозга уровень лактата выше и он поступает из астроцитов к нейронам с помощью специальных переносчиков монокарбоксилатных транспортеров 1 и 2 типов [52].

Кроме того показано, что лактат может участвовать в процессах формирования памяти [58]. Это происходит за счет увеличения синтеза лактата, уровень которого коррелирует с активностью мозга. Нарушение работы монокарбоксилатного транспортера, с помощью которого астроциты поставляют лактат к нейронам может привести к нарушениям процессов формирования памяти [59].

1.3.2.2. Роль пировиноградной кислоты (пирувата) в энергетическом метаболизме и функционировании мозга

Пировиноградная кислота является промежуточным продуктом метаболизма глюкозы и активно используется мозгом как нейропротектор. После синтеза пирувата в процессе гликолиза, он поступает в нейроны через монокарбоксилатный транспортер 1 типа [60] и там происходит его декарбоксилирование, за счёт чего поддерживается цикл трикарбоновых кислот (ЦТК), компенсируется потеря α -кетоглутаровой кислоты при высвобождении глутамата в процессе синаптической передачи и идёт синтез глутамин [61].

В мозге на ранних этапах развития уровень глутамата снижен, поскольку на данном этапе развития из-за высокой активности нейронов увеличивается риск эксайтотоксичности. Карбоксилирование пирувата может

существенно скомпенсировать недостаток глутаминовой кислоты и, следовательно, способствовать нормальному синтезу молекул глутаминна [62].

В целом, реализация пентозофосфатного пути, в ходе которого образуется пируват, и его карбоксилирование в неонатальном периоде развития мозга, преобладают, по сравнению с мозгом взрослого животного [61].

1.3.2.3. Роль кетоновых тел в энергетическом метаболизме и функционировании мозга

Также известно, что в качестве энергетического субстрата в мозге молодых животных могут служить кетоновые тела [63]. Они представляют собой группу органических соединений, являющихся промежуточными продуктами жирового, углеводного и белкового обменов. К кетоновым телам относят ацетоуксусную кислоту (ацетоацетат) $\text{CH}_3\text{COCH}_2\text{COOH}$, β -оксимасляную кислоту (β -оксибутират, или D-3-гидроксибутират) $\text{CH}_3\text{CH(OH)CH}_2\text{COOH}$ и ацетон CH_3COCH_3 . В молоке грызунов (в частности крыс) содержится большое количество жирных кислот, при расщеплении которых и будут образовываться кетоновые тела. В нашей работе в качестве энергетического субстрата был использован β - гидроксibuтират. При его окислении до ацетоацетата образуется ацетил-КоА, который впоследствии, встраивается в цикл трикарбоновых кислот, в результате чего образуется АТФ. Именно на ранних этапах развития животного ферменты, участвующие в синтезе и расщеплении кетоновых тел (3- β - оксibuтиратдегидрогеназа, КоА-трансферазы β - кислот, ацетоацетил - КоА-тиолазы) присутствуют в больших количествах, а к 20 дню постнатального развития их содержание резко уменьшается [64]. Во взрослом организме кетоновые тела являются энергетическими источниками во время голода, когда организм начинает расщеплять запасы из жировых депо, а также при патологиях.

Кетоновые тела поступают в клетку с помощью монокарбоксилатных транспортеров МСТ1 и МСТ2 (рис. 8), чья экспрессия и активность гораздо выше в мозге новорожденного животного, нежели у взрослой особи [52]. β -гидроксибутират эффективно используется мозгом для синтеза аминокислот и мембранных липидов, которые важны в этот период активного роста мозга [63].

Кроме того, нарушение метаболизма кетоновых тел астроцитов в раннем постнатальном периоде развития может привести к развитию нейродегенеративных заболеваний. Астроциты уязвимы для глутаровой кислоты – дикарбоновой кислоты, которая накапливается в миллимолярных концентрациях, вызывая глутаровую ацидемию первого типа. Глутаровая кислота вызывает дисфункцию митохондрий астроцитов, окислительный стресс и последующее усиление пролиферации астроцитарных клеток [65]. Для предотвращения астроцитарной дисфункции нужны антиоксиданты – кетоны и, в частности, β -гидроксибутират, который снижает образование активных форм кислорода путём регуляции окислительно-восстановительного обмена. Таким образом, кетоновые тела активно используются в раннем постнатальном периоде развития, частично заменяя глюкозу и играя важную роль в защите астроцитов.

Таким образом, астроциты вовлечены в ряд механизмов, участвующих в поддержании нормального физиологического состояния нервной системы, в особенности в процессе постнатального развития. Однако не менее важную роль астроциты играют и при патологических состояниях мозга [3]. Дисфункции астроцитов лежат в основе большинства нейродегенеративных заболеваний. Так, например, при эпилепсии вовлеченность астроцитов во многом показана, но конкретные механизмы нарушений, происходящих в астроцитах при данном заболевании остаются не до конца изученными. В связи с этим в данной работе мы исследовали функционирование астроцитов как при физиологических процессах мозга и развитии, а также при

патологическом состоянии мозга (при хронической эпилептиформной активности мозга у крыс).

1.4. Астроциты при эпилепсии

Эпилепсия является одним из типов нейродегенеративных заболеваний, характеризующееся дисбалансом между возбуждающей и тормозной системами в головном мозге [66]. Височная эпилепсия (temporal lobe epilepsy, TLE) является наиболее распространенным типом эпилепсии, при котором происходит генерация судорожной активности и в результате склероз гиппокампальной формации [67]. При височной эпилепсии в гиппокампе происходят следующие нарушения: гибель пирамидных нейронов в регионах CA1 и CA3, миграция гранулярных клеток зубчатой фации, превращение астроцитов в реактивную форму (астроглиоз), чрезмерная активация микроглии, разрастание мшистых волокон. Нарушения могут также затрагивать и другие отделы мозга - энторинальную кору, миндалину, таламус [68]. Большинство исследований, посвященных эпилепсии, сконцентрированы вокруг работы нейронов и мало исследований посвященных выяснению роли астроцитов в генерации судорожной активности и развитии эпилепсии, хотя вовлеченность этих клеток в развитие астроцитов во многом показана [69], [70].

При эпилепсии астроциты, как и нейроны, подвергаются морфологической и функциональной перестройке, что способствует дисбалансу возбуждающих и тормозных систем в мозге. В физиологических условиях астроциты принимают активное участие в удалении глутамата из синаптической щели и захвате внеклеточного K^+ , повышающегося во время нейронной активности, и именно эти механизмы во многом подвергаются нарушениям при эпилепсии [70-73] (рис.6).

Во время эпилептических припадков в моделях животных *in vivo* внеклеточная концентрация K^+ может возрасти с 2,5 мМ до 10-12 мМ из-за чрезмерной активности нейронов [74]. Для поддержания баланса

внеклеточной концентрации K^+ при повышенной нейронной активности существует два механизма: 1) захват K^+ астроцитами посредством Na^+/K^+ -АТФазы и NKCC1-котранспортера; 2) пространственная буферизация K^+ с последующим распределением этих ионов по всему астроцитарному синцитию через межастроцитарные глп-контакты [75-78].

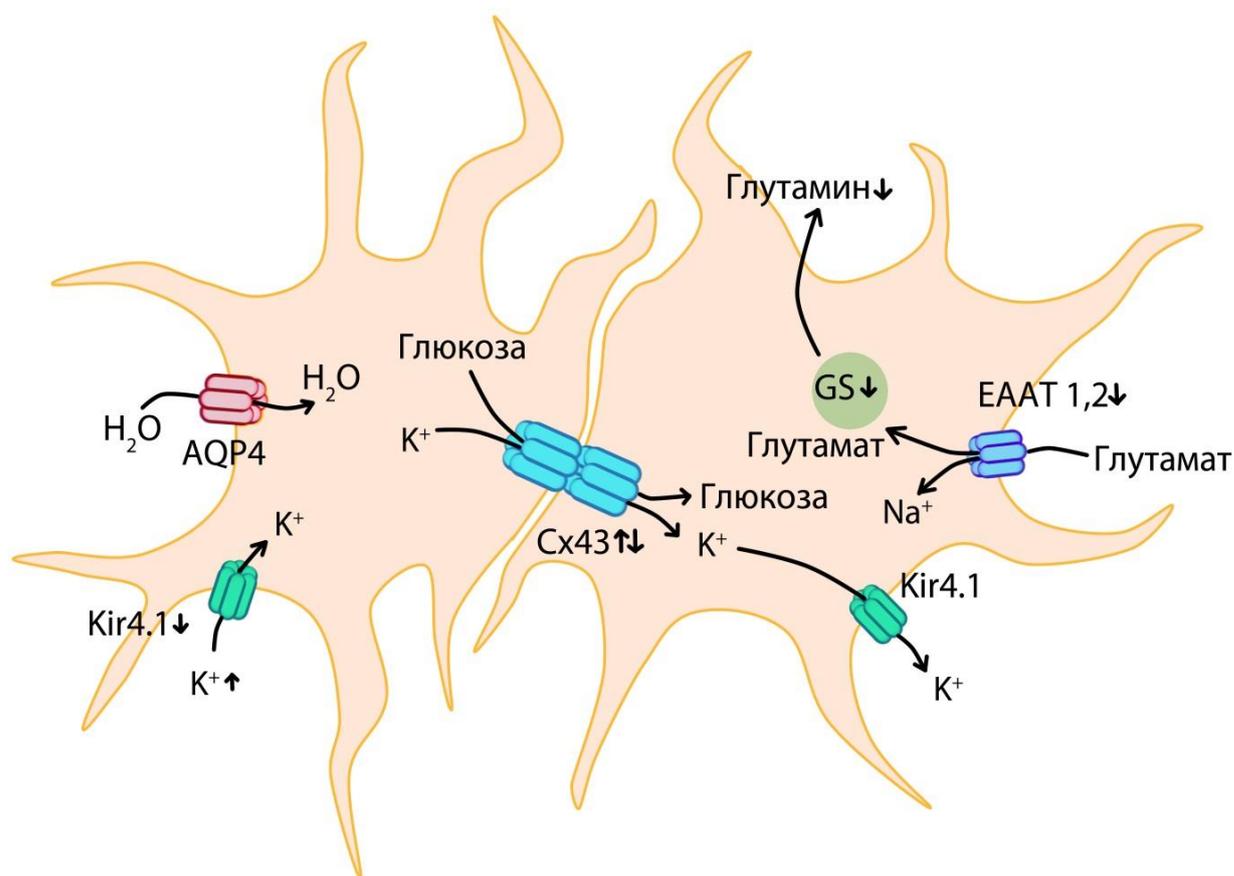


Рисунок 6. Нарушения в астроцитах при эпилепсии. Происходит увеличение экспрессии калиевых каналов подтипа $Kir_{4.1}$ и дерегуляция пространственной буферизации ионов калия. Наблюдаются изменения в экспрессии белков щелевых контактов коннексинов Sx43 (данные об экспрессии этих белков на данный момент являются противоречивыми). Наблюдается нарушение водного обмена из-за сниженной экспрессии аквапоринов (AQP4). При эпилепсии происходит снижение экспрессии глутаминсинтетазы (GS) и нарушения в экспрессии глутаматных транспортеров EAAT1,2 (данные являются спорными)

Результаты исследований K^+ буферизации при эпилепсии на моделях животных *in vivo* и *in vitro*, а также исследования на эпилептической ткани человека показали нарушение экспрессии основного типа калиевых каналов в астроцитах $Kir_{4.1}$ [79-82]. Является ли это причиной или следствием

эпилепсии на данный момент не выяснено. Следует также отметить, что при эпилепсии происходит также нарушение ГЭБ (гемато-энцефалического барьера), функциональной частью которого являются астроциты. Происходит частичное открытие ГЭБ для некоторых молекул и трансудация сывороточного альбумина, что в свою очередь приводит к активации трансформирующего фактора роста β -рецепторов (TGF, transforming growth factor) и снижению экспрессии калиевых каналов Kir_{4.1} и Kir_{2.3} [73], [83-84]. Однако, исследование Nagaо с соавторами, 2013, показало повышенную экспрессию Kir_{4.1} в пилокарпиновой модели эпилепсии у крыс [81]. Функциональные последствия этих изменений до конца не выяснены. Аквапорины также подвергаются изменениям при эпилепсии. Они в большинстве своём распределены в сосудистых областях мозга и при эпилепсии наблюдается снижение экспрессии этих каналов в астроцитах. Эти изменения предшествуют хронической фазе эпилепсии, и указывает на роль аквапоринов в патофизиологии данного заболевания [85-88]. Интересно отметить, что при эпилепсии в астроцитах изменениям подвергаются и щелевые контакты (гэп-контакты). Но результаты многих исследований в данном вопросе являются противоречивыми. Некоторые исследования показали увеличение экспрессии коннексинов Cx43 и/или Cx30, из которых состоят гэп-контакты астроцитов при эпилепсии, другие работы показали обратный эффект [33], [89-93]. Поэтому роль гэп-контактов в прогрессировании эпилепсии пока остаётся не известной. Одним из основных признаков эпилепсии являются повышенные концентрации внеклеточного глутамата, что может быть связано не только с повышенной нейронной активностью, но и нарушениями захвата глутамата транспортерами астроцитов [71]. Изменение в функционировании астроцитарных транспортеров и их экспрессия при эпилепсии является спорным вопросом на данный момент. Некоторые работы с использованием человеческой ткани не показали различий в функционировании данных

типов транспортеров [94-95]. Однако, другие авторы показали сниженную экспрессию EAAT2 в области CA1 гиппокампа [96-98]. При эпилепсии было найдено снижение экспрессии глутаминсинтетазы, которая переводит глутамат в глутамин [69]. Глутамин поступает в нейроны и из него синтезируется как глутамат, так и ГАМК (гамма-аминомасляная кислота тормозного нейротрансмиттера). Таким образом, дисфункция глутаминсинтетазы также может приводить к нарушению баланса между возбуждающей и тормозной системами в головном мозге. Представленные данные говорят о функциональной перестройке астроцитов при эпилепсии. Дальнейшие исследования функционирования астроцитов могут лечь в основу разработок лекарственных препаратов для лечения данного нейродегенеративного расстройства.

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Приготовление переживающих срезов гиппокампа крыс

Все эксперименты были выполнены с использованием лабораторных крыс линии Wistar и Sprague Dawley раннего (P5, P10, P20) и позднего (P30, P35) постнатального развития в зависимости от экспериментов.

Основные правила содержания и ухода соответствовали нормативам, данным в руководстве «Guide for care and use of laboratory animals (ILAR publication, 1996, National Academy Press)», Национальном стандарте РФ ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики» и согласованы с Этическим комитетом Минздрава России.

Работа проводилась на переживающих срезах гиппокампа (350 μm толщиной). Животные анестезировались с помощью изофлурана после чего осуществлялась декапитация. После извлекался головной мозг и помещался в ледяной раствор модифицированного раствора Рингера, содержащего в (мМ): 75 сахараза; 87 NaCl; 2.5 KCl; 8.48 MgSO₄; 1.24 NaH₂PO₄; 26.2 NaHCO₃; 0.5 CaCl₂; 22 D-глюкоза при постоянном насыщении карбогеном (95% O₂ и 5% CO₂), pH 7.4. Оба гиппокампа изолировались и помещались в агаровый блок для дальнейшего приготовления переживающих срезов с помощью вибратора (MICROTOM 650V, Германия) (рис. 7). Срезы инкубировались при температуре 34°C в растворе, ослабляющем последствия резки и содержащем в (мМ): 119 NaCl; 2.5 KCl; 1.3 MgSO₄; 1 NaH₂PO₄; 26.2 NaHCO₃; 1 CaCl₂; 1.6 MgCl₂; 22 D-глюкоза при постоянном насыщении карбогеном (95% O₂ и 5% CO₂), pH 7.4. После одного часа инкубации срезы перемещались в камеру микроскопа для регистрации активности клеток.

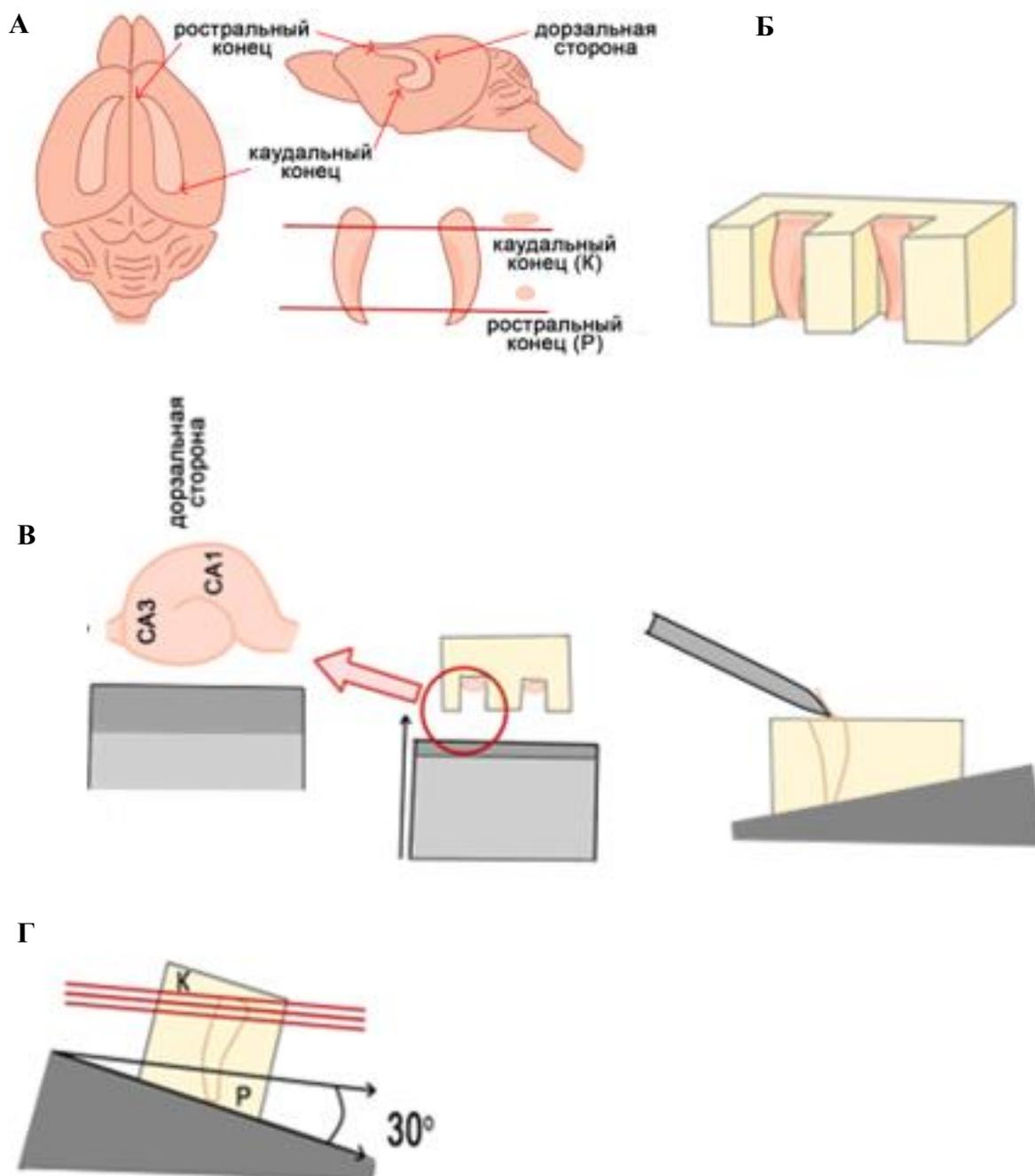


Рисунок 7. Схема приготовления переживающих срезов гиппокампа. А) Выделение гиппокампа из мозга. Б) Помещение гиппокампов в агаровый блок. В) Ориентация гиппокампов в агаровом блоке относительно лезвия вибратома. Г) Приклеивание агарового блока к наклонной платформе под углом 30° с помощью цианокрилатного клея

2.2. Флуоресцентный Ca^{2+} имиджинг астроцитов

Ca^{2+} имиджинг был проведён с использованием двух типов флуоресцентных красителей: Ca^{2+} индикатора Oregon Green 488 BAPTA-1

АМ в концентрации 795 мкМ (финальная концентрация) и астроцитарного маркера - sulforhodamine 101 в концентрации 100 нМ (финальная концентрация).

В камеру для окрашивания помещалось 5 мл раствора Рингера, имеющего состав в (ммМ119 NaCl; 2.5 KCl; 1.3 MgSO₄; 1 NaH₂PO₄; 26.2 NaHCO₃; 2 CaCl₂; 10 D-глюкоза (рН раствора 7,45; осмолярность 298 мОсм). Концентрация D-глюкозы менялась в зависимости от эксперимента. Далее к 5 ml раствора Рингера добавлялось 5 µl sulforhodamine 101, после чего в камеру помещался срез гиппокампа. Непосредственно после этого на поверхность среза добавлялось 2,5 µl Oregon Green 488 ВАРТА–1 АМ. Окрашивание происходило в течение 30 минут при постоянном насыщении карбогеном, при температуре 34 °С. После окрашивания срез отмывался в растворе Рингера в течение 10 минут. Oregon Green 488 ВАРТА–1 АМ является неактивной мембранно-проникающей формой индикатора Ca²⁺, как в живых нейронах, так и в живых астроцитах. В клетке фермент эстераза отщепляет от молекулы Oregon Green 488 ВАРТА-1 АМ ацетоксиметилловый эфир, после чего индикатор становится полярным и флуоресцирует. Астроциты, окрашенные обоими типами красителей, были использованы в дальнейшем для анализа (рис.8).

Для детекции Ca²⁺ событий в астроцитах был использован конфокальный микроскоп Carl Zeiss LSM 510.

Для возбуждения флуоресценции Sulforhodamine 101 использовался лазер, с длиной волны 543 нм, флуоресценция этого красителя регистрировалась в диапазоне 650 - 710 нм. Для возбуждения флуоресценции Oregon Green 488 ВАРТА-1 АМ использовался лазер с длиной волны 488 нм, флуоресценция регистрировалась в диапазоне 500-530 нм. Регистрация спонтанной кальциевой активности длилась в течение 20 минут, частота съемки 1 кадр в секунду. Полученные экспериментальные данные анализировались с помощью программного обеспечения на базе Matlab.

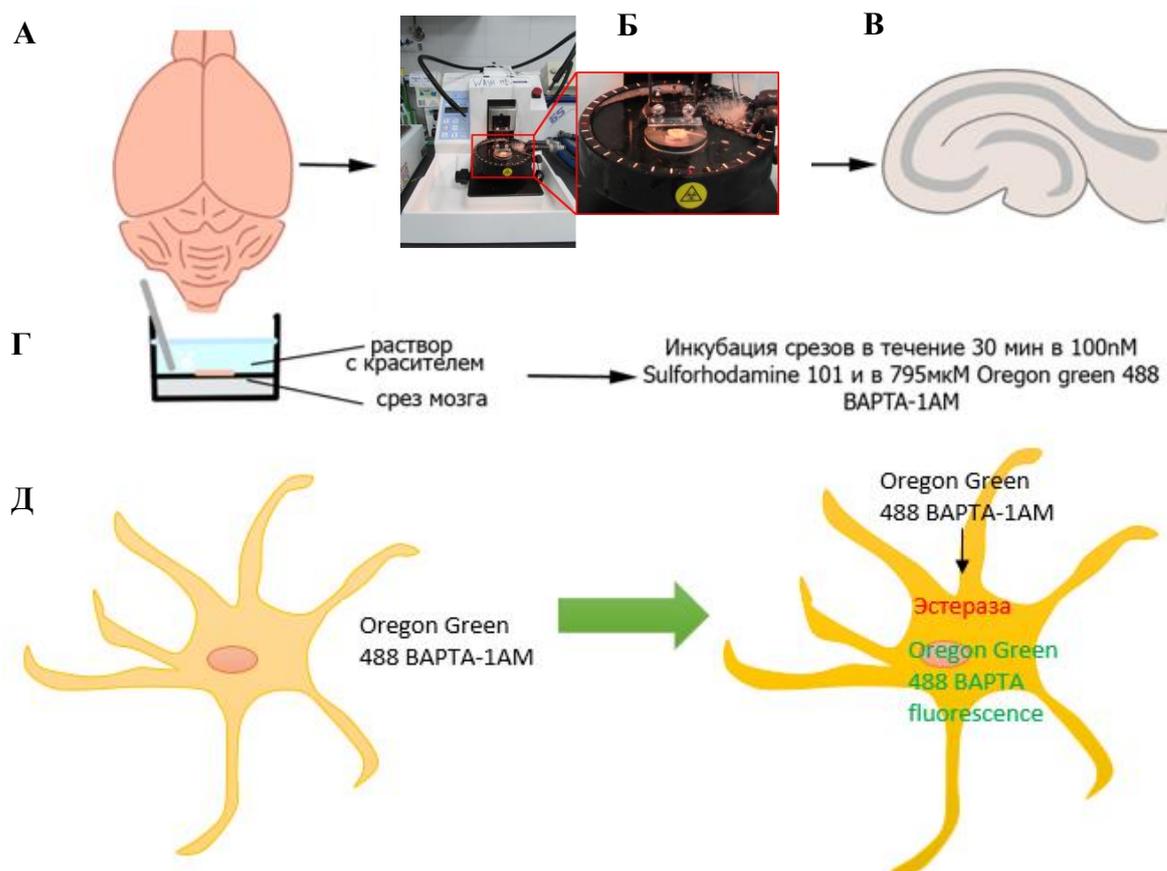


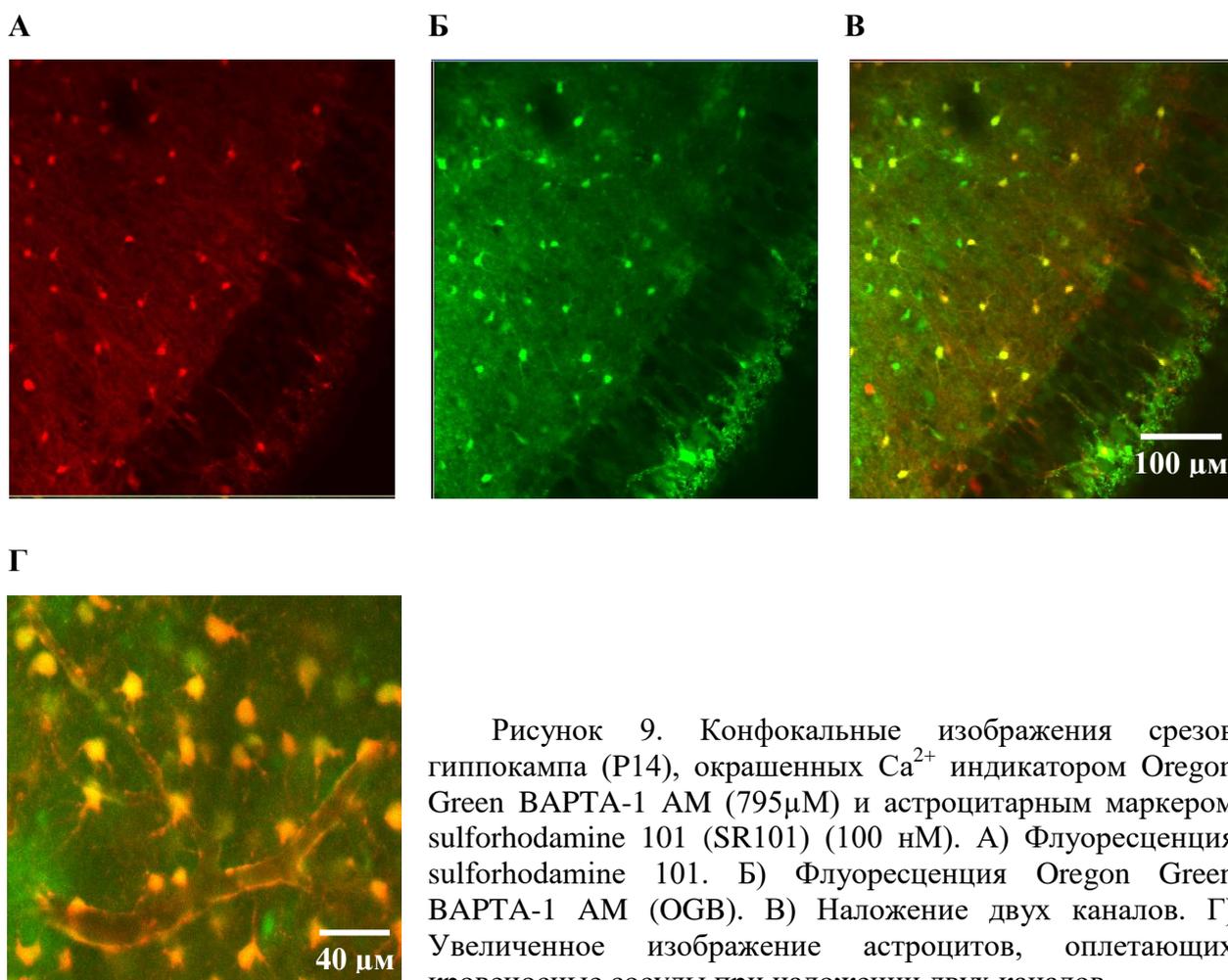
Рисунок 8. Этапы окрашивания флуоресцентными красителями переживающих срезов гиппокампа. А) Выделенный мозг крысы. Б) Вибратом Microm 650V и нарезка переживающих срезов гиппокампа. В) Схематичный срез гиппокампа. Г) Инкубация приготовленного среза в растворе с флуоресцентными красителями. Д) Схематичное отщепление ацетоксиметилового эфира от Ca^{2+} красителя Oregon Green BAPTA, в результате чего он становится полярным и флуоресцирует

В качестве параметров активности были использованы частота событий в минуту и длительность событий в коме. Амплитуда событий не использовалась для анализа, т.к. изменения амплитуды во многом зависели от разного количества загружаемого красителя и от неодинаковой работы ферментов в клетках. В части работы, где исследовались возрастные изменения в Ca^{2+} активности были использованы крысы линии Wistar 3-х возрастных групп (<P10; P10-P20; >P20), (P–возраст животного). Деление на возрастные группы было обусловлено анализом литературных данных по экспрессии рецепторов, каналов и транспортеров, участвующих в формировании Ca^{2+} событий в астроцитах [99-100].

Идентификация клеток осуществлялась следующим образом:

- жёлтые клетки – астроциты (окрашены обоими типами флуоресцентных красителей; Ca^{2+} индикатором Oregon Green ВАРТА-1 АМ и астроцитарным маркёром sulforhodamine 101);
- зелёные клетки – живые нейроны, окрашенные только Ca^{2+} индикатором Oregon Green ВАРТА-1 АМ;
- красные клетки - мёртвые нейроны, окрашенные sulforhodamine 101 (рис.9).

Ca^{2+} активность в астроцитах в периоды постнатального развития оценивалась по частоте событий в минуту и по длительности событий.



Для оценки пространственно-временных характеристик Ca^{2+} события детектировались целиком на кадрах после чего измерялись максимальная проекция (размеры событий) и длительность данных событий. Данные параметры вычислялись из массива изображений, которые конвертировались в один файл формата .mat после чего осуществлялось вычитание темнового шума, фильтрование сигнала с помощью фильтра BM3D (готовый алгоритм в открытом доступе <http://www.cs.tut.fi/~foi/GCF-BM3D>) и выравнивание массива временной покадровой серии. После этого Ca^{2+} события детектировались как активные пискели, которые объединялись в события по уровню пороговых значений, указанных в использованном алгоритме: >2 секунд для длительности событий и >10 мкм для определения максимальной проекции (размера) событий. После детекции событий из алгоритма извлекались строились функции плотности вероятности данных параметров (PDF, probability density function) в двойных логарифмических координатах и рассчитывался показатель степенной функции α , также строились кумулятивные функции распределения (CDF, cumulative density function) на основе которых оценивались параметры событий.

2. 3. Электрофизиология

2.3.1. Патч-кламп нейронов. Регистрация возбуждающих постсинаптических потенциалов (ВПСП)

Для регистрации ВПСП осуществлялась электрическая стимуляция коллатералей Шаффера (КШ) (рис. 10). Стимулирующий электрод представлял собой биполярный электрод из нержавеющей стали (FHC, Bowdoinham, США), который устанавливался в *str. radiatum* поля CA1 для стимуляции КШ на расстоянии не менее 200 мкм от места регистрации ВПСП. Регистрирующий микроэлектрод сопротивлением 4-7 МОм вытягивался из стеклянных капилляров при помощи пуллера P-97 (Sutter Instruments, Novato, США). Для регистрации ВПСП данный электрод

заполнялся внутриклеточным раствором составом в (мМ): 130 КМeSO₃; 8 NaCl; 10 Na-phospho-creatin; 10 HEPES; 2 EGTA; 3 L-ascorbic acid; 2 MgATP; 5 QX₃₁₄Br. Осмолярность составляла 280±5 мОсм, а значение рН 7.2 доводилось КОН.

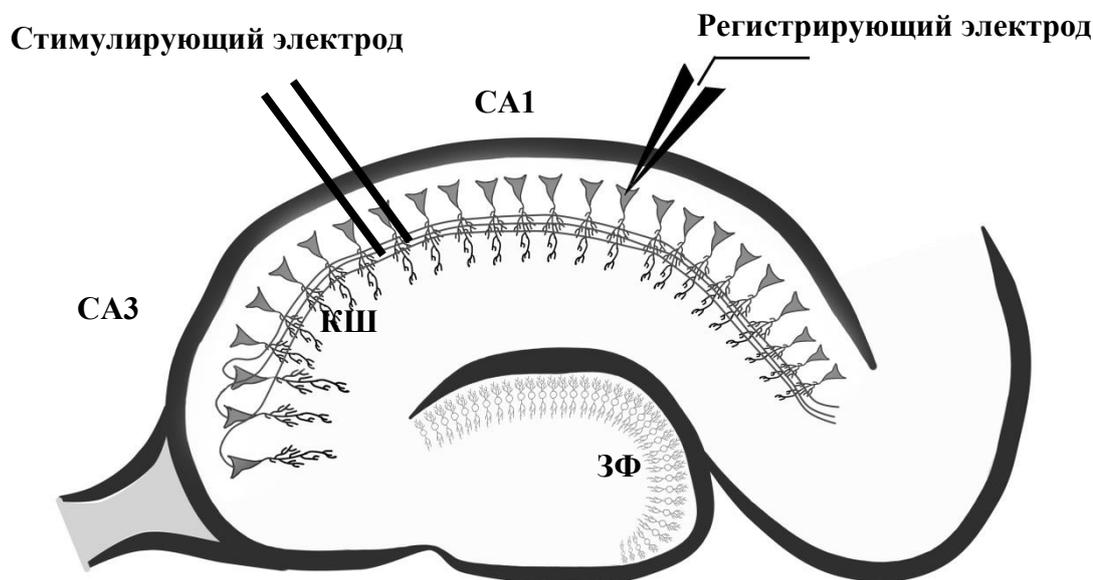


Рисунок 10. Схема местоположения электродов при регистрации ВПСП. СА1 – поле СА1 гиппокампа, состоящий из тел пирамидных нейронов, с одного из которых осуществляется регистрация ВПСП с помощью метода патч-кламп. СА3 – поле СА3 гиппокампа, состоящее также из тел пирамидных нейронов, но немного БОЛЬШИХ по размеру и более рыхло расположенных, чем тела пирамидных клеток поля СА1. КШ – коллатерали Шаффера. ЗФ – зубчатая фасция

ВПСП регистрировались с пирамидных клеток поля СА1 гиппокампа методом патч-кламп в режиме «целая клетка» при фиксации тока на мембране (current clamp).

В начале и в конце электрофизиологических экспериментов проводилось измерение входного и последовательного сопротивления для оценки качества эксперимента.

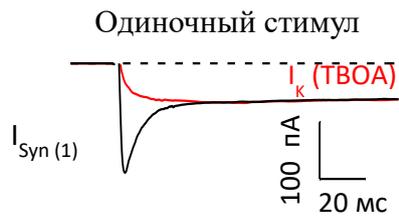
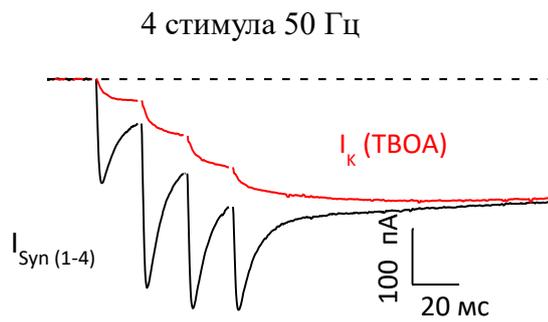
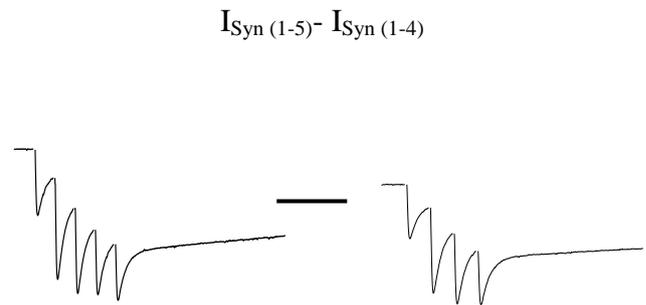
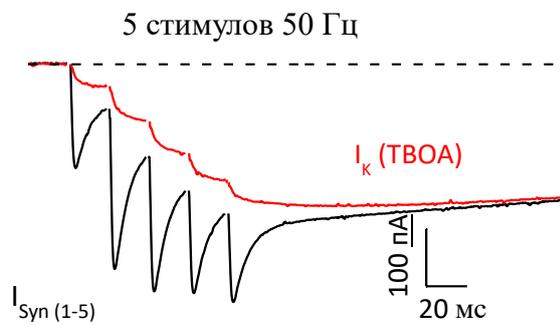
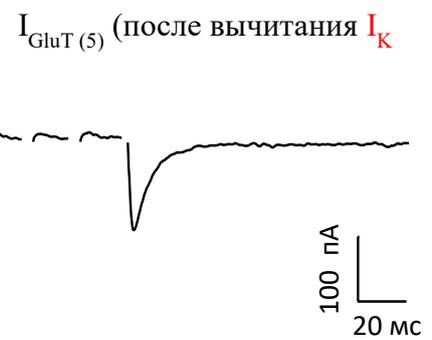
2.3.2. Патч-кламп астроцитов.

Измерение транспортерных и калиевых токов

Для регистрации калиевых и транспортерных токов астроцитов также была индуцирована синаптическая передача посредством электрической

стимуляции КШ. Запись токов производилась в конфигурации «целая клетка» в режиме фиксации потенциала (voltage clamp) с астроцитов в поле *str. radiatum* гиппокампа. Астроциты идентифицировались благодаря небольшому размеру сомы (10-20 мкм), потенциалу покоя близкому к -80 мВ и низкому входному сопротивлению 10-20 МОм. Внутриклеточный раствор для регистрации токов имел следующий состав в (мМ): 130 КМeSO₃; 8 NaCl; 10 Na-phospho-creatin; 10 HEPES; 3 L-ascorbic acid; 2 MgATP; (pH 7.2, осмолярность 290±2 мОсм). При добавлении в перфузию блокатора глутаматных транспортеров DL-TBOA (50 мкМ) после регистрации необходимого количества контрольных записей, были записаны калиевые токи. Таким образом, регистрация транспортерных и калиевых токов осуществлялась в несколько этапов (рис.11):

1. Запись индуцированного электрическим стимулом (комбинированного) тока (synaptic induced current, I_{syn}), состоящего из компонентов транспортерного и калиевого токов ($I_{syn} = I_{GluT} + I_K$) в ответ на 1, 4 и 5 стимулов;
2. Блокада транспортерного тока с помощью DL-TBOA (50 мкМ) и запись изолированного калиевого тока (I_K);
3. Нормирование и вычитание «идеализированного» калиевого тока (усреднённый калиевый ток от нескольких клеток) от 1 стимула из комбинированного с целью получения выделенного транспортерного тока ($I_{GluT(1)}$);
4. Выделение ответа на 5-ый стимул для сравнения его с ответом на 1-ый стимул (для оценки «слабой» и «сильной» активации синапсов) по формуле: $I_{Syn(5)} = I_{Syn(1-5)} - I_{Syn(1-4)}$. После этого осуществлялось нормирование и вычитание $I_{Syn(5)}$ с «идеализированным» калиевым током от 1 стимула и получен выделенный $I_{GluT(5)}$;
5. Параметры калиевого тока были рассчитаны в токе I_{syn} в точке 200 мс после последнего стимула.

А**Г****Б****Д****В****Е**

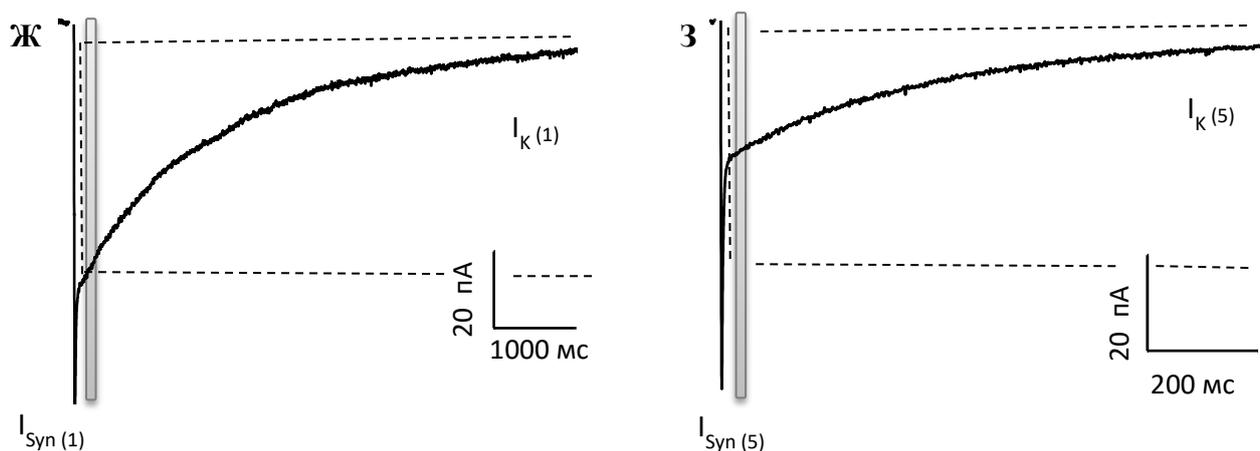


Рисунок 11. Этапы записи и процедура выделения транспортерных и калиевых токов в астроцитах. А) Ответ на одиночный стимул: комбинированный ток ($I_{Syn(1)}$) и калиевый ток (I_K) после добавления блокатора транспортерных токов ТВОА (50 мкМ). Б) Ответ на 4 стимула: комбинированный ток ($I_{Syn(1-4)}$) и калиевый ток после добавления (50 мкМ) ТВОА. В) Ответ на 5 стимулов: комбинированный ток ($I_{Syn(1-5)}$) и калиевый ток (I_K) после добавления (50 мкМ) ТВОА. Г) Изолированный $I_{GluT(1)}$ после нормализации и вычитания калиевого тока (I_K) ($I_{Syn(1)}$). Д) Процедура вычитания ответов от 4 стимулов $I_{Syn(1-4)}$ из ответов от 5 стимулов $I_{Syn(1-5)}$. Е) Изолированный $I_{GluT(5)}$ после процедуры нормализации и вычитания калиевого тока (I_K) из комбинированного ($I_{Syn(5)}$). Ж) Комбинированный ток $I_{Syn(1)}$ и расчет в нём параметров калиевого тока $I_K(1)$ в точке, начиная от 200 миллисекунд после последнего стимула. Серым прямоугольником на графике указана точка 200 миллисекунд после последнего стимула. Штриховыми линиями очерчены границы, в которых исследовались параметры калиевого тока. З) Комбинированный ток $I_{Syn(5)}$ и расчет в нём параметров калиевого тока $I_K(5)$ в точке, начиная от 200 миллисекунд после последнего стимула. Серым прямоугольником на графике указана точка 200 миллисекунд после последнего стимула. Штриховыми линиями очерчены границы, в которых исследовались параметры калиевого тока

2.4. Гистологическое окрашивание по Ниссляу

На основе метода окрашивания по Ниссляу проводилась количественная оценка нейрональных клеток в срезах гиппокампа после 2-4 недель индукции хронической эпилептиформной активности. Каждый мозг от контрольного животного или от животного с хронической эпилептиформной активностью был зафиксирован в 96-% спирте сроком на 1 сутки. После этого объекты подвергались дегидратации спиртами (80%, 70%), а после из исследуемых объектов удалялись остатки спиртов с помощью коммерческого раствора Clearen. Далее объекты заключались в парафин для уплотнения ткани в специализированные блоки. После затвердевания парафина блоки с

исследуемыми объектами нарезались на микротоме (Microm HM 325) на срезы толщиной 5 мкм, а полученные срезы наклеивались на предметные стекла, после чего происходило их окрашивание. Перед непосредственным окрашиванием осуществлялось депарафинирование срезов – удаление парафина, обеспечивающее проникновение красителя в ткани. Окрашивание осуществлялось с помощью красителя метиленовый синий, окрашивающего сому и ядра нейрональных и глиальных клеток. Количественная оценка нейрональных клеток в окрашенных препаратах осуществлялась вручную на микрофотографиях в программе ImageJ (открытый доступ imagej.nih.gov). Был осуществлен подсчет нейрональных клеток в областях гиппокампа (CA1 поле, CA3 поле, hilus и зубчатая фасция) в расчете на 100 мкм.

2.5. Индукция эпилептического статуса у животных на основе литий-пилокарпиновой модели

Для индукции хронической эпилептиформной активности (*status epilepticus*) у крыс линии Sprague-Dawley (возраст 18-25 дней) была использована литий-пилокарпиновая модель. Эта модель вызывает развитие как острых приступов эпилепсии, так и хронические изменения, характеризующиеся спонтанными судорогами.

За 20-24 часа до пилокарпина животным вводился хлорид лития 10 мг/кг. Непосредственно перед введением пилокарпина производилась инъекция (за 10 минут) метилскополамина для предотвращения воздействия пилокарпина на периферическую нервную систему. Пилокарпин инъецировался малыми дозами по 10 мг/кг каждые 30 минут (не более 60 мг/кг на одного животного) до развития у животных эпилептического статуса.

Согласно литературе, эпилептический статус был идентифицирован как генерализованные приступы без полного восстановления нормального поведения [101]. Судороги классифицировались на основе шкалы Рацина

(1972) [102]. При продолжительных судорогах (более 1 часа после установления эпилептического статуса) для предотвращения смертности таких животных вводился феназепам 1 мг/кг через каждые 10 минут в течение 30-40 минут. Эпилептический статус сохранялся в течение 4-6 часов с последующим ступором и глубоким сном, что в литературе описано как кома, в течение 12-20 часов. Для экспериментов животные использовались не менее, чем через две недели после установления эпилептического статуса.

2.6. Статистический анализ данных

Полученные данные Ca^{2+} активности в астроцитах были проанализированы с помощью подразделения программы, написанной в Matlab.

Электрофизиологические данные по регистрации ВПСП анализировались с помощью программы Clampfit (Axon Instruments Inc.; Union City, CA, США). Остальные электрофизиологические данные анализировались с помощью разработанной программы в Matlab 2012b (The MathWorks, Inc) и программы Origin 8 (OriginLab Corp.).

Часть данных представлена в виде арифметического среднего \pm стандартная ошибка среднего. Часть данных представлена в виде усреднённых функций плотностей вероятности (PDF, probability density function). Для оценки подчинения распределений Ca^{2+} событий степенному закону (3) данные были представлены как PDF в двойных логарифмических координатах и аппроксимированы степенной функцией.

Степенной закон имеет следующий вид:

$$P(x) = Cx^{-\alpha} \quad (3),$$

где $P(x)$ – плотность вероятности, показатель степени α характеризует «спадание» функции $P(x)$, C – константа.

Различия между средними значениями рассчитывались с помощью теста Манна-Уитни для несвязанных измерений.

Используемые в работе доверительные интервалы для обозначения статистической значимости следующие:

$p > 0.05$ – данные достоверно не различаются (N.S.)

$p < 0.05$ – данные различаются достоверно (*)

$p < 0.001$ – данные различаются достоверно (**)

Глава 3. Результаты и их обсуждение

3.1. Изменения астроцитарной Ca^{2+} активности в процессе постнатального развития

3.1.1. Спонтанная Ca^{2+} активность в астроцитах увеличивается с возрастом

В ходе данного исследования было показано, что частота и длительность спонтанных Ca^{2+} событий в соме астроцитов изменяется в зависимости от возраста животного (рис. 12).

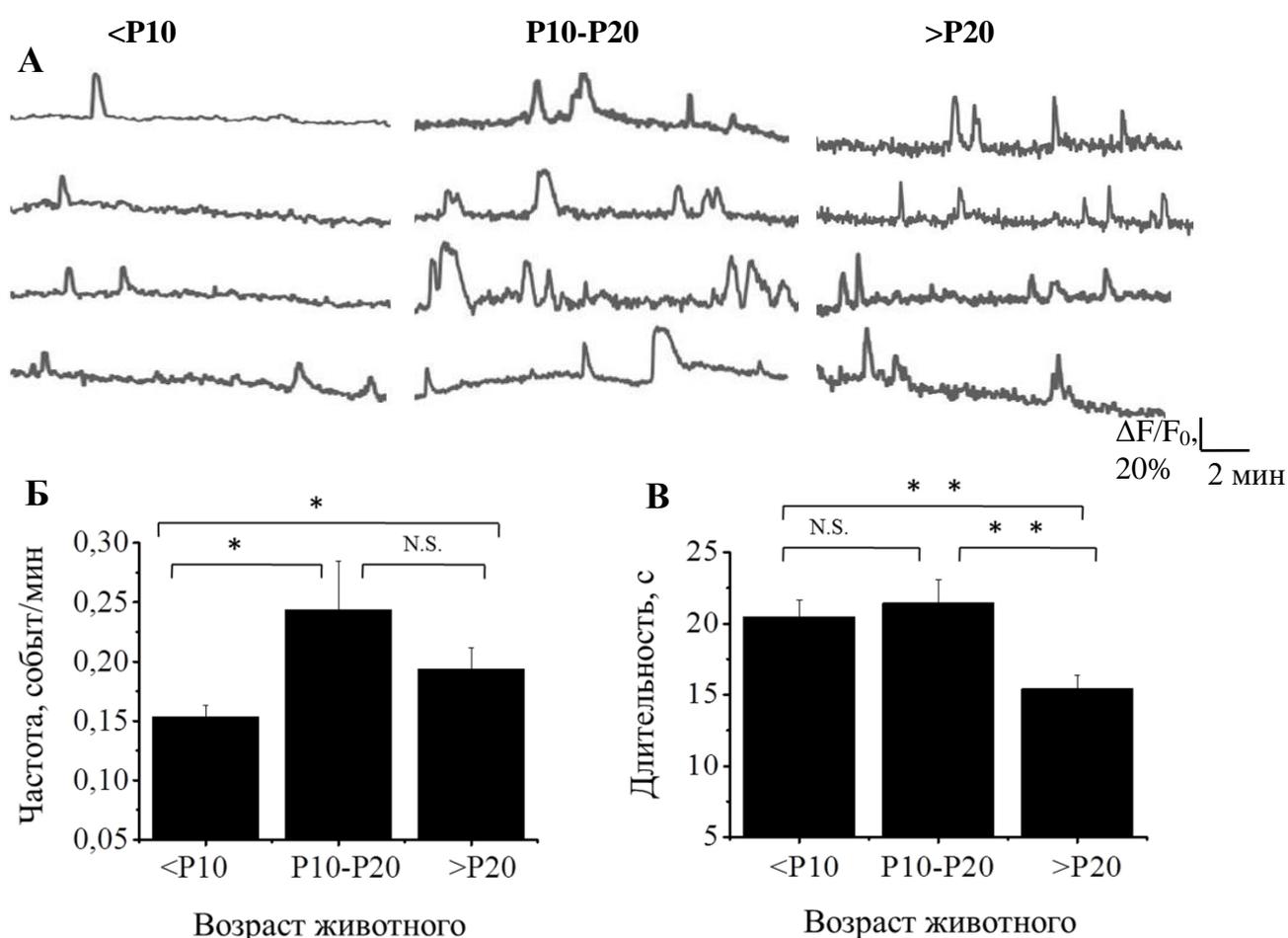


Рисунок 12. Изменение частоты и длительности спонтанных Ca^{2+} событий в астроцитах в процессе раннего постнатального развития животного. А) Оригинальные записи спонтанной Ca^{2+} активности в астроцитах в процессе постнатального развития. Каждая запись отражает спонтанную Ca^{2+} активность 4-х разных астроцитов в разных срезах гиппокампа. P – день постнатального развития. Б) Частота Ca^{2+} событий в астроцитах в различные периоды раннего постнатального развития. В) Длительность Ca^{2+} событий в астроцитах в различные периоды раннего постнатального развития. Данные представлены в виде среднее \pm стандартная ошибка среднего. Статистический тест Манна-Уитни. ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; N.S. $p > 0.05$

Наименьшая частота Ca^{2+} событий наблюдалась у тестовой группы животных до P10 (0.153 ± 0.009 событий/мин для нескольких астроцитов в регистрируемом поле съёмки, $n=15$; рис. 12 Б). У животных более позднего постнатального развития частота событий увеличилась (P10-P20: 0.244 ± 0.04 событий/мин, $n=16$, $p = 0.04$ для различия с <P10, тест Манна-Уитни) и далее достоверно не изменялась (>P20: $0.194 \pm 0,017$ событий/мин, $n=15$, $p = 0.01$ для различия с <P10; $p = 0.07$ для различия с P10-P20, тест Манна-Уитни).

Длительность событий достоверно снизилась к возрасту более P20 (15.42 ± 0.95 секунд, $n= 15$, $p=0.03$) для различия с <P10 и $p=0.001$ с P10-P20.

Увеличение частоты Ca^{2+} событий после P10 может быть связано с экспрессией основных рецепторов и транспортеров, которые играют важную роль в генерации Ca^{2+} событий. Уменьшение длительности Ca^{2+} событий к P20 может также отражать формирование основных систем утилизации Ca^{2+} к этому периоду постнатального развития [103]. У животных в возрасте до P10 дней небольшая частота Ca^{2+} событий может быть связана также с отсутствием в перфузионном растворе специфических энергетических субстратов, поступающих в мозг в этом возрасте [53].

3.1.2. Возраст-зависимая спонтанная Ca^{2+} активность астроцитов при использовании специфических энергетических субстратов

В качестве контроля использовался раствор с глюкозой, 10 мМ, которая не является основным субстратом в развивающемся мозге [104]. В качестве тестовых растворов использовались следующие растворы: глюкоза (5мМ) + лактат (5мМ); глюкоза (5мМ) + пируват (5мМ); глюкоза (5мМ) + β -гидроксибутират (10мМ).

Все использованные специфические энергетические субстраты достоверно увеличивали частоту Ca^{2+} событий в астроцитах у животных в возрастной группе до P10, но достоверно не изменяли исследуемые параметры Ca^{2+}

динамики астроцитов в последующих двух тестовых группах животных (рис.13, рис.14А, табл.1, 2).

Таблица 1.

Изменения в частоте Ca^{2+} событий при добавлении специфических энергетических субстратов относительно контрольных значений в процентном соотношении

	<P10	P10-P20	>P20
Лактат	106 ± 306 %; p = 0.04 n (число срезов) = 15 (контроль) n (число срезов) = 5 (лактат)	19 ± 63 %; p = 0.69 n (число срезов) = 16 (контроль) n (число срезов) = 5 (лактат)	37 ± 73 %; p = 0.11 n(число срезов)= 15 (контроль) n(число срезов)= 5 (лактат)
Пируват	140 ± 336 %; p = 0.01 n(число срезов) = 15 (контроль) n(число срезов) = 9 (пируват)	10 ± 54 %; p = 0.15 n(число срезов) = 16 (контроль) n(число срезов)= 5 (пируват)	9 ± 60 %; p = 0.64 n(число срезов)= 15 (контроль) n(число срезов)= 5 (пируват)
β-гидроксibuтират (βНВ)	91 ± 424 %; p = 0.004 n(число срезов) = 15 (контроль) n(число срезов)= 7 (βНВ)	29 ± 24 %; p = 0.98 n(число срезов)= 16 (контроль) n(число срезов)= 7 (βНВ)	13 ± 20 %; p = 0.15 n(число срезов)= 15 (контроль) n(число срезов)= 7 (βНВ)

Таблица 2.

Изменения в длительности Ca^{2+} событий при добавлении специфических энергетических субстратов относительно контрольных значений в процентном соотношении

	<P10	P10-P20	>P20
Лактат	1 ± 15 %; p = 1 n(число срезов) = 15 (контроль) n(число срезов) = 5 (лактат)	13 ± 23 %; p = 0.59 n(число срезов) = 16 (контроль) n(число срезов) = 5 (лактат)	10 ± 49 %; p = 0.72 n(число срезов) = 15 (контроль) n(число срезов)= 5 (лактат)
Пируват	13 ± 144 %; p = 1 n(число срезов) = 15 (контроль) n(число срезов)= 9 (пируват)	5 ± 128 %; p = 0.59 n(число срезов)= 16 (контроль) n(число срезов)= 5 (пируват)	16 ± 36 %; p = 0.81 n(число срезов)= 15 (контроль) n(число срезов)= 5 (пируват)
β-гидроксibuтират (βНВ)	6 ± 4 %; p = 0.77 n(число срезов)= 15 (контроль) n(число срезов)= 7 (βНВ)	8 ± 70 %; p = 0.56 n(число срезов) = 16 (контроль) n(число срезов) = 7 (βНВ)	45 ± 90 %; p = 0.08 n(число срезов) = 15 (контроль) n(число срезов)= 7 (βНВ)

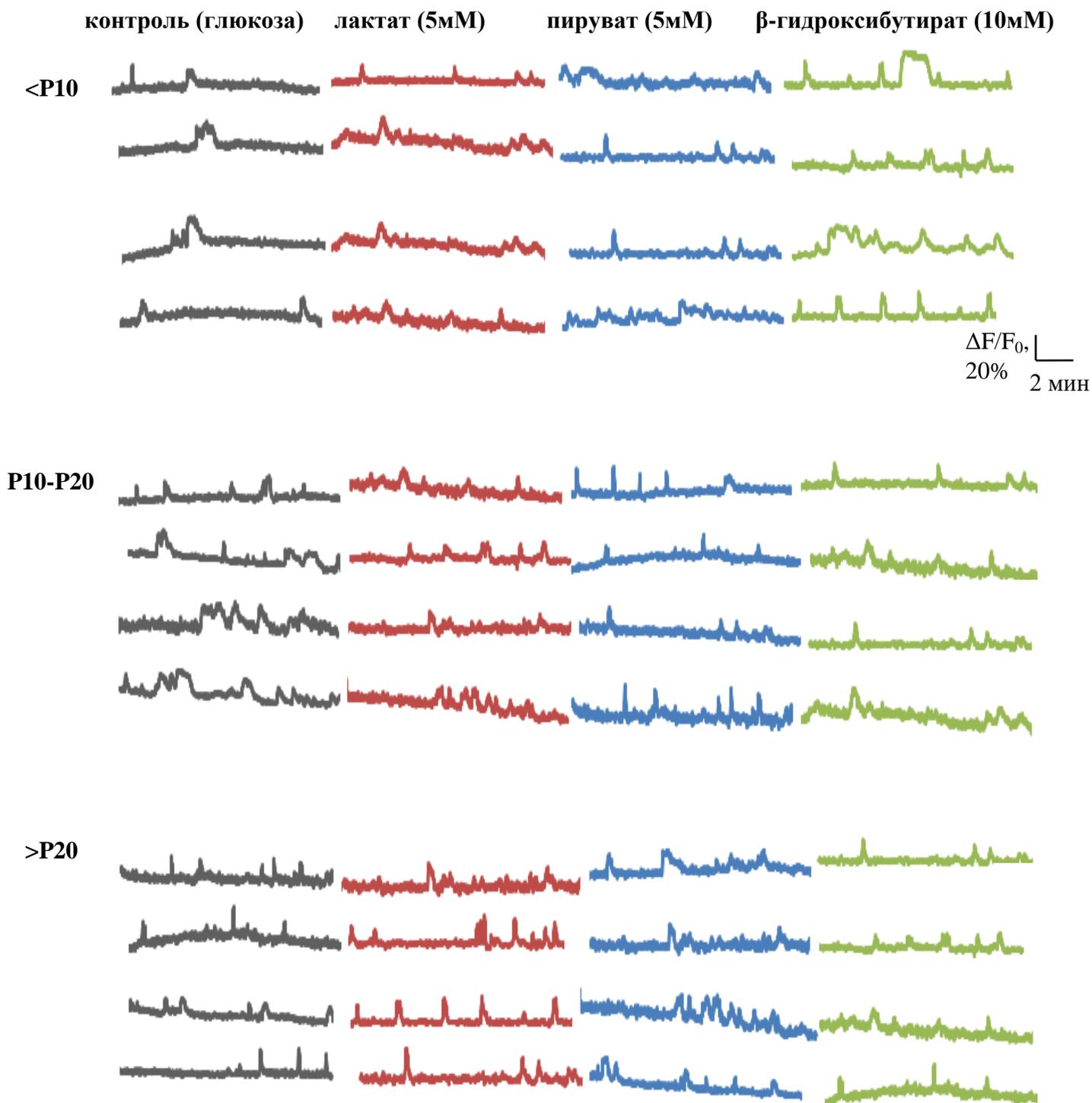


Рисунок 13. Динамика Ca^{2+} событий в астроцитах при добавлении специфических энергетических субстратов в разные периоды раннего постнатального развития. Оригинальные записи Ca^{2+} активности в трёх возрастных группах животных при добавлении специфических энергетических субстратов (лактата, пирувата, β -гидроксibuтирата). Каждая запись отражает спонтанную Ca^{2+} активность 4-х разных астроцитов в разных срезах гиппокампа. P – день постнатального развития

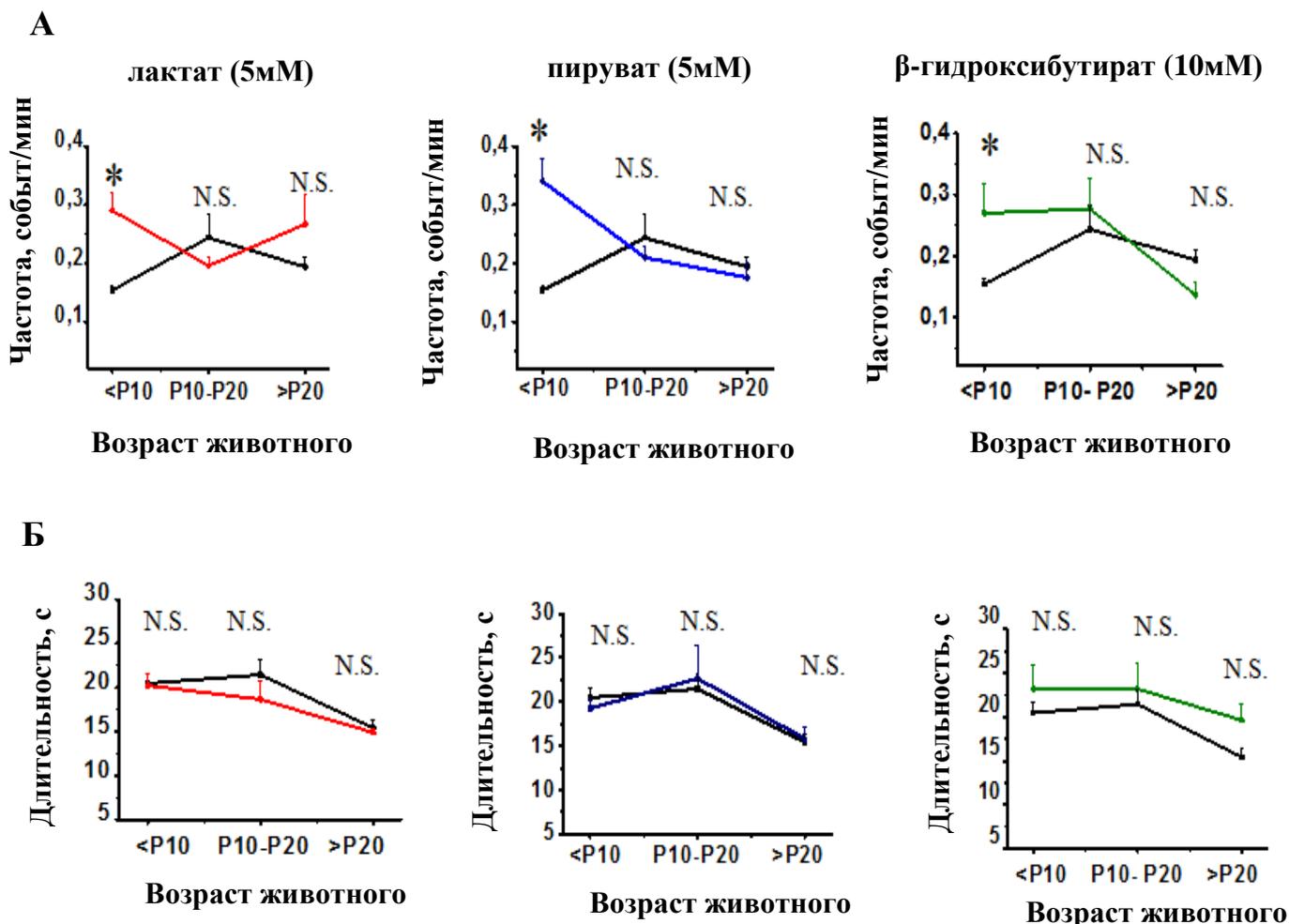


Рисунок 14. Параметры Ca^{2+} событий в астроцитах при добавлении специфических энергетических субстратов в разные периоды раннего постнатального развития. А) Частота Ca^{2+} событий в астроцитах при добавлении специфических энергетических субстратов. У животных в тестовой группе до P10 происходит статистически достоверное увеличение частоты Ca^{2+} событий в астроцитах. Б) Длительность Ca^{2+} событий в астроцитах при добавлении специфических энергетических субстратов статистически не изменяется, но сохраняется возраст-зависимое снижение длительности ответов к P20. Данные представлены в виде среднее \pm стандартная ошибка среднего. Статистический тест Манна-Уитни ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; N.S. $p > 0.05$

Наши данные указывают на то, что у животных до P10 частота Ca^{2+} событий определяется поступлением в мозг специфических энергетических субстратов из материнского молока (пирувата, лактата, β -гидроксибутирата). Если срезы от таких животных перфузировать раствором на основе глюкозы (энергетический субстрат, не характерный для этого возраста), то частота Ca^{2+} событий в астроцитах ниже, чем в последующие периоды. Добавление

специфических энергетических субстратов увеличивает частоту Ca^{2+} событий до уровня, характерного для более взрослых животных. Однако, полученный эффект может быть объяснен не только воздействием дополнительных энергетических субстратов непосредственно на астроциты, но также эффектом, опосредованным через нейроны. На следующем этапе мы протестировали данную гипотезу.

Таким образом, для нормального функционирования мозга, а в частности астроцитов, на ранних стадиях постнатального развития, необходимо наличие энергетических субстратов, поступающих с материнским молоком. Это очень важно, потому что именно астроциты поставляют питательные вещества к нейронам, а вследствие этого, регулируют их активность. Таким образом, питание материнским молоком необходимо в этот период жизни для поддержания необходимого уровня астроцитарной активности, и вследствие этого, доставки питания к нейронам. Эти данные могут объяснить причину, почему необходимо материнское молоко для нормального развития головного мозга.

3.1.3. Блокада везикулярного высвобождения предотвращает эффект специфических энергетических субстратов на Ca^{2+} динамику в <P10

Нейроны могут воздействовать на Ca^{2+} динамику в астроцитах посредством синаптического (везикулярного) высвобождения нейротрансмиттеров, которые воздействуют на астроцитарные рецепторы. Для блокирования данного эффекта срезы гиппокампа, непосредственно перед регистрацией активности инкубировались в течение 2 часов в растворе, содержащем блокатор везикулярной протонной АТФазы (VH^+ -АТФаза) – бафиломицин А1 (4 μM). Бафиломицин А1 по своей структуре является макролидным антибиотиком, который подавляет работу VH^+ -АТФазы, изменяя конформацию фермента, что предотвращает загрузку нейротрансмиттеров в синаптические везикулы.

Для оценки подавления синаптической передачи регистрировались возбуждающие постсинаптические потенциалы (ВПСП) в пирамидных нейронах поля СА1 гиппокампа с помощью метода патч-кламп в ответ на электрическую стимуляцию коллатералей Шаффера (рис. 15). Бафиломицин А1 (4μМ) подавлял синаптическую передачу и везикулярный транспорт.

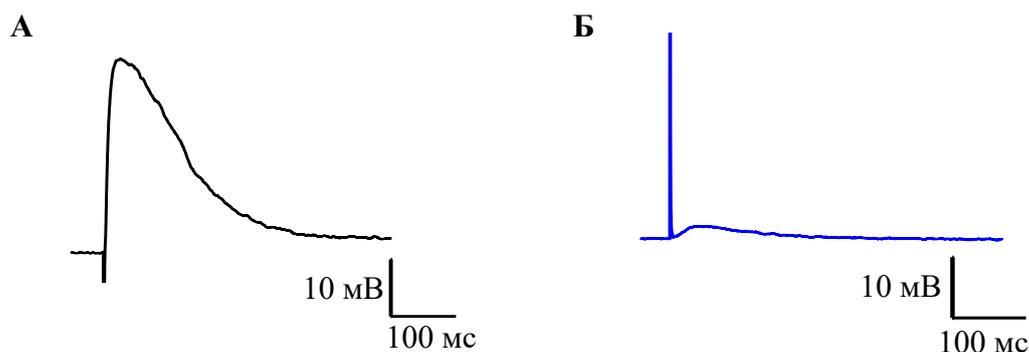
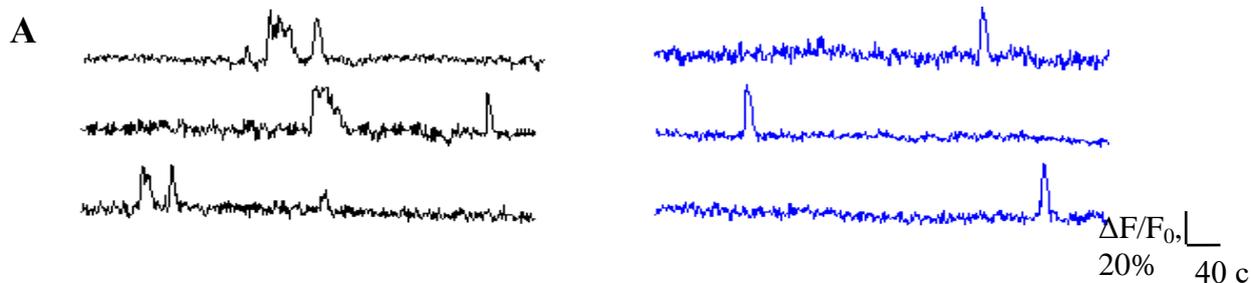


Рисунок 15. Оригинальные записи ВПСП с одиночной клетки в контроле (А) и при подавлении синаптической передачи (везикулярного транспорта) (Б). Амплитуда максимального подаваемого стимула 1,5 мА

Далее были исследованы частота и длительность Ca^{2+} событий в астроцитах при добавлении специфических энергетических субстратов (лактата, пирувата, β-гидроксибутирата) на фоне блокады везикулярного транспорта. В присутствии бафиломицина А1 Ca^{2+} активность астроцитов была значительно снижена как в контроле, так и в присутствии специфических энергетических субстратов (рис. 16, табл.3).



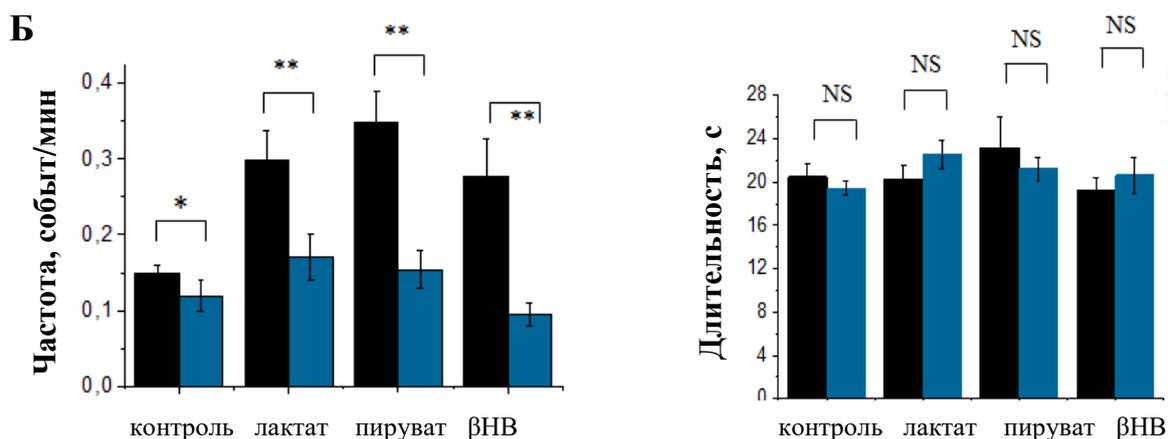


Рисунок 16. Изменение Ca²⁺ динамики астроцитов при добавлении специфических энергетических субстратов в присутствии бафиломицина A1. А) Оригинальные записи кальциевой активности астроцитов. Б) Частота и длительность Ca²⁺ событий при добавлении специфических энергетических субстратов. Данные представлены в виде среднее ± стандартная ошибка среднего. Статистический тест Манна-Уитни. **p < 0.01; *p < 0.05; N.S. p > 0.05

Таблица 3.
Частота и длительность Ca²⁺ событий при блокаде синаптического (везикулярного) высвобождения и при добавлении специфических энергетических субстратов относительно контрольных значений в процентном соотношении

<P10	контроль (глюкоза)	лактат	пируват	β-гидроксibuтират (βHB)
Частота	29 ± 73 %; p = 0.02 n(число срезов)=15 (контроль) n(число срезов)= 5 (контроль baf. A1)	58 ± 31 %; p = 0.01 n(число срезов)= 5 (лактат) n(число срезов)= 5 (лактат baf. A1)	58 ± 31 %; p = 0.01 n(число срезов)= 5 (лактат) n(число срезов)=5 (лактат baf. A1)	51 ± 79 %; p = 0.01 n(число срезов)= 7 (βHB) n(число срезов)= 7 (βHB baf. A1)
Длительность	9 ± 6 %; p = 0.48 n(число срезов)= 15 (контроль) n(число срезов)= 5 (контроль baf. A1)	0 ± 15 %; p = 1 n(число срезов)= 5 (лактат) n(число срезов)= 5 (лактат baf. A1)	20 ± 154 %; p = 0.4 n(число срезов)= 5 (лактат) n(число срезов)= 5 (лактат baf. A1)	21 ± 69 %; p = 0.31 n(число срезов)= 7 (βHB) n(число срезов)= 7 (βHB baf. A1)

Снижение Ca²⁺ динамики астроцитов в присутствии энергетических субстратов, но при подавлении синаптической передачи и везикулярного

транспорта может свидетельствовать о том, что в раннем онтогенезе поддержание активности астроцитов за счёт поступления энергетических субстратов в мозг опосредовано через нейрон-астроцитарные взаимодействия, и в первую очередь через метаболизм нейрональных клеток (рис. 17).

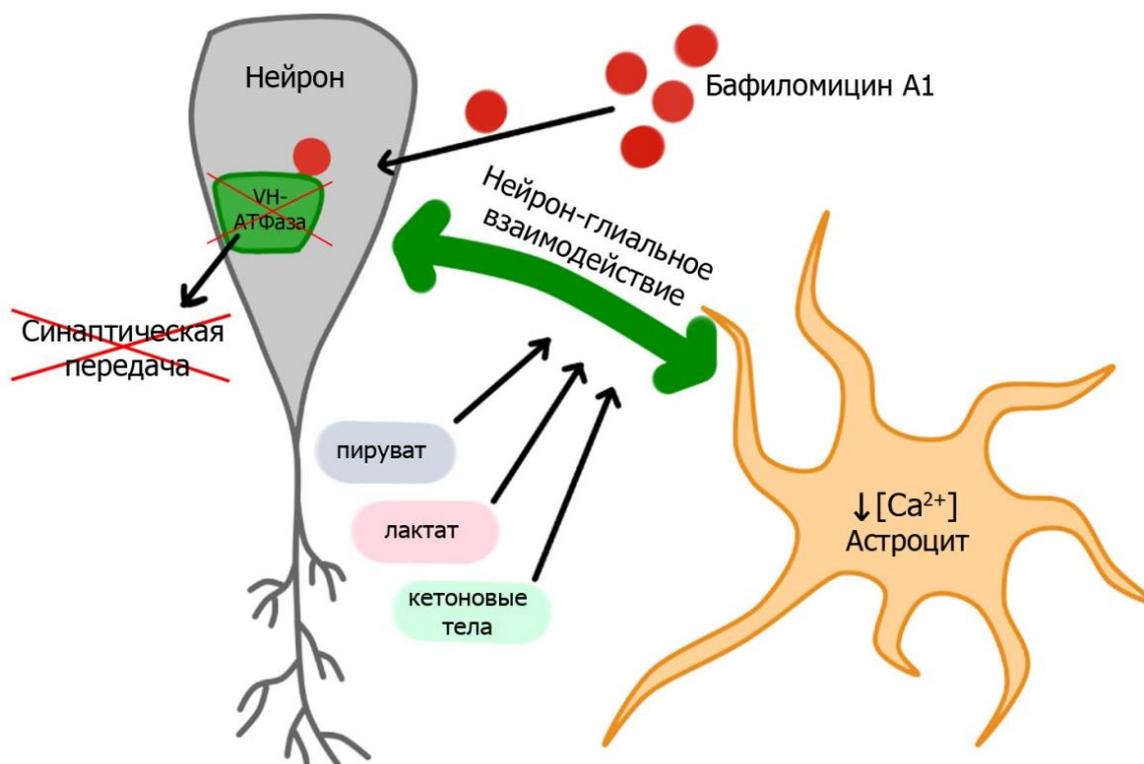


Рисунок 17. Схематичное отображение снижения Ca^{2+} активности астроцитов при подавлении везикулярного транспорта через взаимодействие с нейронами

Таким образом, в ранний постнатальный период развития астроциты зависят не только от постоянного притока энергетических субстратов, но и от сложных механизмов взаимодействия с нейронами, нарушение которых может привести к серьезным нарушениям в функционировании головного мозга.

Выводы к Главе 3.1.

Изучение Ca^{2+} активности астроцитов в процессе постнатального развития является актуальной задачей современной нейробиологии в свете

наличия большого количества нейродегенеративных заболеваний, связанных с нарушениями головного мозга при развитии организма. Особенно важным, но слабо изученным вопросом, является исследование процессов поступления питательных веществ в нервных клетках при развитии мозга, энергия которых необходима для большинства синтетических процессов в клетках мозга.

В данной части работы мы показали важность использования специфических энергетических субстратов, поступающих с молоком матери в раннем онтогенезе для нормального функционирования нейрон-астроцитарных сетей в головном мозге. Это свидетельствует о необходимости использования энергетических субстратов в питательных средах, применяемых в научных исследованиях при изучении активности клеток мозга на ранних этапах развития. Кроме того, важно контролировать наличие специфических энергетических субстратов в детском питании, отсутствие которых или ограниченное использование может замедлить развитие работы головного мозга или привести к развитию нейродегенеративных заболеваний.

3.2. Исследование функциональной организации астроцитов при хронической эпилептиформной активности

После изучения Ca^{2+} активности астроцитов в периоды постнатального онтогенеза, важно исследовать активность астроцитов при патологических процессах в мозге, поскольку астроциты вовлечены практически во все нейродегенеративные заболевания головного мозга и их функциональная роль в этих процессах во многом не исследована.

Было показано, что астроциты способны регулировать возбудимость нейрональных сетей при нормальном функционировании мозга [107]. Но при нарушениях такой возбудимости, которая может привести к судорожной активности и хроническим эпилептическим припадкам функциональная активность астроцитов исследована слабо.

3.2.1. Классификация судорожной активности в представленной модели эпилептиформной активности

Эпилептический статус (*status epilepticus, SE*) у животных после введения пилокарпина был определен как генерализованные приступы без полного восстановления нормального поведения. Большинство крыс уже через 10 минут проявляли слабый эпилептический статус, который характеризовался шевелением челюстей и носа, быстрым миганием глаз, подергиванием вибрисс, киванием головой, клонусом одной верхней конечности. После этого приступы увеличивались и представляли собой генерализованные приступы в течение 1-6 часов. К генерализованным судорогам относятся: тонико-миоклонические судороги верхних конечностей, так называемая «эрекция» хвоста, вращения и падения животного. Генерализованные судороги захватывают работу лимбической системы, одной из основных структур которой является гиппокамп, который и подвергается значительным нарушениям при височной эпилепсии. Судороги классифицировались на основе шкалы Радина (1972) [102] и в

таблице 4 представлены в виде среднего числа встречаемости каждого типа судорог.

Таблица 4.
Типы эпилептиформной активности в предложенной модели

Тип судорог	Судороги морды и движение ртом	Движение головой (кивание и качание)	Клонус одной передней конечности (рис.22А)	Стойка на задних лапах+ клонус передних конечностей (рис.22 Б-В)	Общие генерализованные судороги (рис. 22 Г)	Подпрыгивания
Среднее число встречаемости	3,5	3,6	7,6	5,6	15	3
Количество экспериментальных животных	16	16	16	16	16	16

Большое число типов судорог, относящихся к генерализованному типу и охватывающих лимбическую систему мозга свидетельствует об эффективности используемой модели (рис. 18).

Все последующие экспериментальные работы проводились на срезах гиппокампа (350 мкм) от контрольных и эпилептических групп крыс.

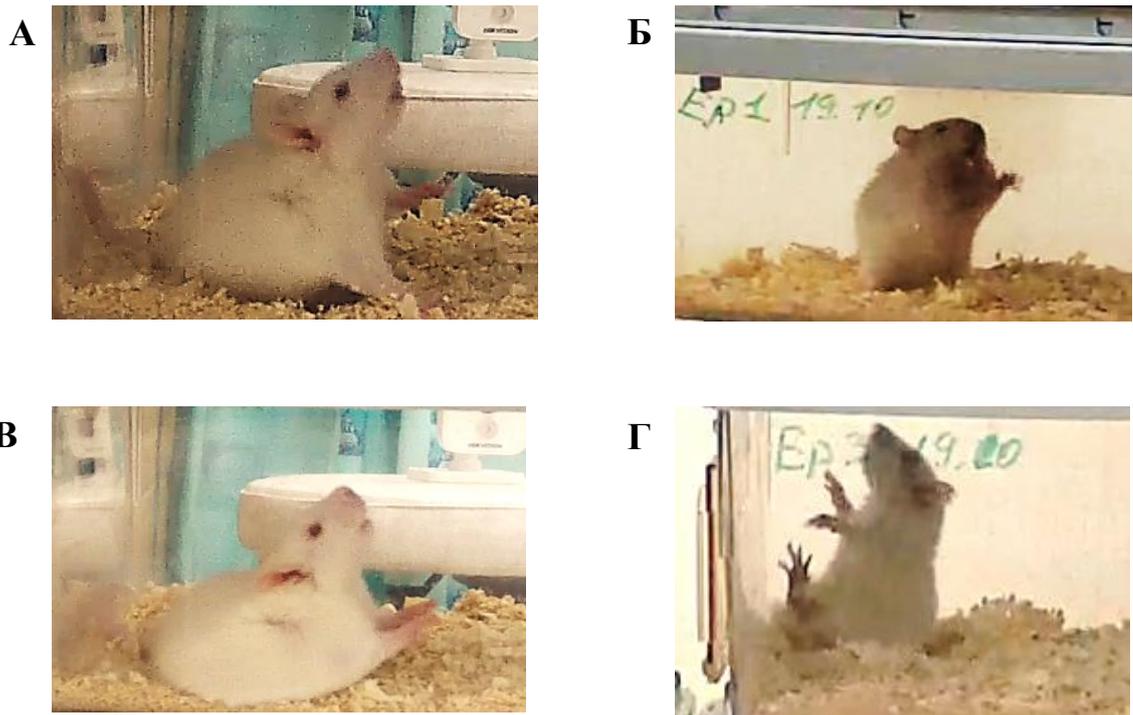


Рисунок 18. Типы судорожной активности у исследуемых животных. А) Клонус одной передней конечности. Б) Стойка на задних лапах. В) Клонус обеих передних конечностей. Г) Общие генерализованные судороги (падение животного)

3.2.2. Дегенерация нейронов и увеличение количества астроцитов в предложенной модели эпилептиформной активности

Дегенерация нейронов в гиппокампе, характерная для данной модели эпилептиформной активности через 2-4 недели после *SE* наблюдалась в областях гиппокампа: CA1, CA3, Nilus и зубчатая фасция на основе гистологического окрашивания метиленовым синим и подсчета количества нейронов в указанных областях в программе ImageJ в расчете на 100 мкм.

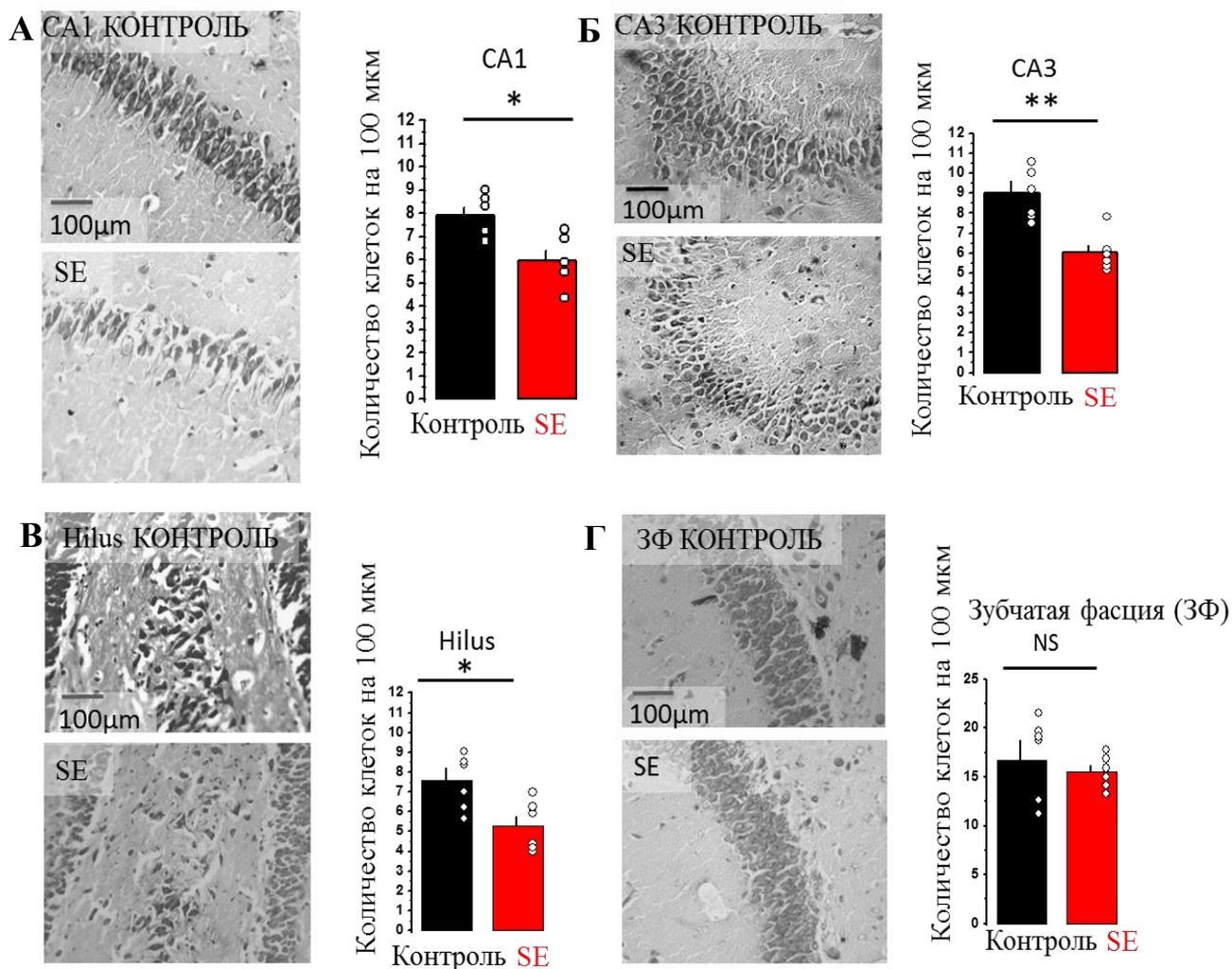


Рисунок 19. Дегенерация нейронов в областях гиппокампа через 2-4 недели после SE. А) Уменьшение количества пирамидных нейронов в области CA1. Б) Уменьшение количества пирамидных нейронов в области CA3. В) Уменьшение количества нейронов в области Hilus. Г) Отсутствие изменений в зубчатой фации (ЗФ). Данные представлены в виде среднее \pm стандартная ошибка среднего. Статистический тест Манна-Уитни. ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; N.S. $p > 0.05$

Статистически достоверно снизилось количество нейронов в областях CA1 (7.89 ± 0.36 в контроле, $n=6$ и 5.97 ± 0.43 в SE, $n=6$, $p=0.01$ для различий между группами); CA3 (8.86 ± 0.51 в контроле и 6.01 ± 0.39 в SE, $p=0.004$ для различий между группами) и в Hilus (7.46 ± 0.55 в контроле и 5.27 ± 0.51 в SE, $p=0.04$ для различий между группами), но не в зубчатой фации (17.16 ± 1.71 в контроле и 15.5 ± 0.69 в SE, $p=0.39$ для различий между группами) (рис. 19).

Кроме того, в предложенной модели эпилептиформной активности наблюдалось статистически достоверное увеличение количества астроцитов, также указывающее на изменения в астроцитах (1.17 ± 0.1 в контроле, $n=15$ и

1.54±0.14 в SE, n=20. p=0.03 для различий между группами). На основе изображений, полученных с помощью конфокальной микроскопии и астроцитарного маркера sulfhorodamine 101 (100 нМ) было рассчитано количество астроцитов в объеме 100x100 мкм в программе ImageJ (рис. 20).

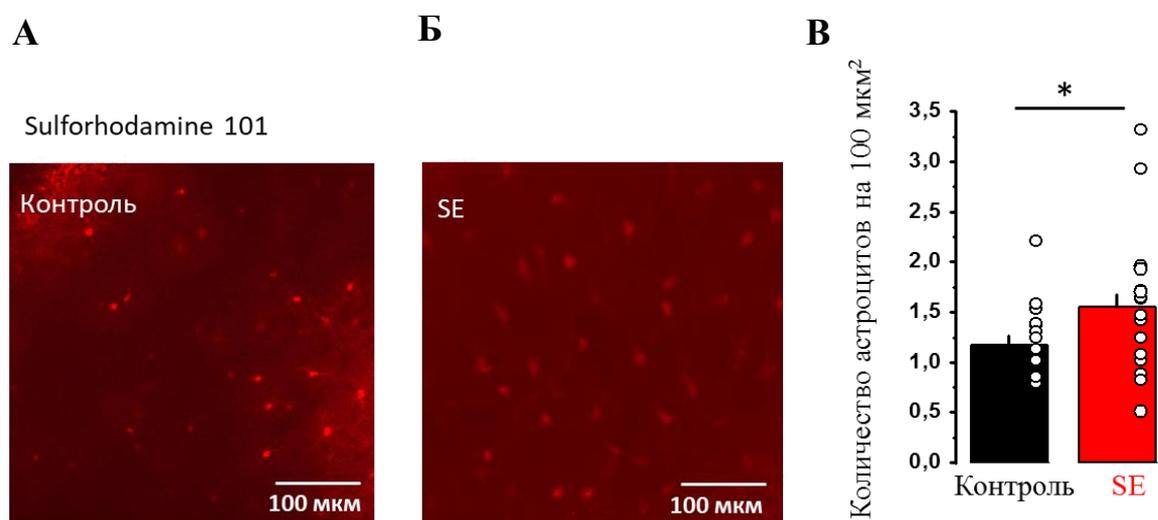


Рисунок 20. А) Конфокальное изображение астроцитов в *str. radiatum* области CA1 в контроле. Б) Конфокальное изображение астроцитов в *str. radiatum* области CA1 в SE. В) Увеличение количества астроцитов через 2-4 недели после SE в расчете на 100 мкм². Данные представлены в виде среднее ± стандартная ошибка среднего. Статистический тест Манна-Уитни. **p < 0.01; *p < 0.05; N.S. p > 0.05

Данная часть работы показала наличие изменений в нейрон-глиальной сети гиппокампа при литий-пилокарпиновой модели эпилептиформной активности у крыс. Было показано статистическое снижение количества нейронов в областях гиппокампа (CA1, CA3, Hilus) и увеличение количества астроцитов в *str. radiatum* области CA1. Данные изменения могут быть причиной функциональных нарушений в астроцитах, исследованию которых посвящены следующие разделы.

3.2.3. Захват глутамата транспортерами астроцитов при хронической эпилептиформной активности

Концентрация глутамата в синаптической щели регулируется транспортерами астроцитов и нейронов. Эффективность работы глутаматных

транспортёров в астроцитах при эпилепсии до настоящего момента исследована слабо. Имеются противоречивые данные об экспрессии этих транспортёров при эпилепсии [70, 73, 109].

В данной части работы мы исследовали процессы обратного захвата глутамата транспортёрами астроцитами при хронической эпилептиформной активности. Этапы регистрации токов подробно описаны в главе 2 Материалы и методы.

Для оценки эффективности работы астроцитарных транспортёров нами исследовано время затухания тока (τ decay) при одиночной (1 стимул) (рис. 21 А, Б, В). Для оценки синаптической фасилитации или депрессии были исследованы отношения амплитуд и отношения времени затухания транспортёрных токов в ответ на пятый и первый стимулы (рис. 21 Г, Д).

Время затухания транспортёрного тока в контроле составило 8.58 ± 1.28 ($n=3$) и статистически достоверно не отличалось от времени затухания тока при SE 7.64 ± 0.54 ($n=4$) ($p=0.68$, тест Манна-Уитни). Отношение амплитуд 1.84 ± 0.51 ($n=3$) и времени затухания транспортёрного тока 1.15 ± 0.05 ($n=3$) в ответ на пятый и первый стимулы составило в контроле и, и также статистически достоверно не отличалось от отношения амплитуд 1.57 ± 0.19 ($n=4$) ($p=0.85$, тест Манна-Уитни) и времени затухания транспортёрного тока 1.18 ± 0.11 ($n=4$) ($p=0.57$, тест Манна-Уитни) в ответ на пятый и первый стимулы при SE (рис. 21).

Отсутствие изменений в параметрах транспортёрных токов свидетельствует об отсутствии изменений в эффективности работы астроцитарных транспортёров при эпилептиформной активности через 2-4 недели после её индукции. Вероятно, что такой период развития эпилептиформной активности не оказывает прямого воздействия на работу астроцитарных транспортёров, что, вероятно, характеризует эффект гомеостатической регуляции астроцитами при видимой дегенерации

нейронов, происходящей во время исследуемой модели хронической эпилептиформной активности [70], [110].

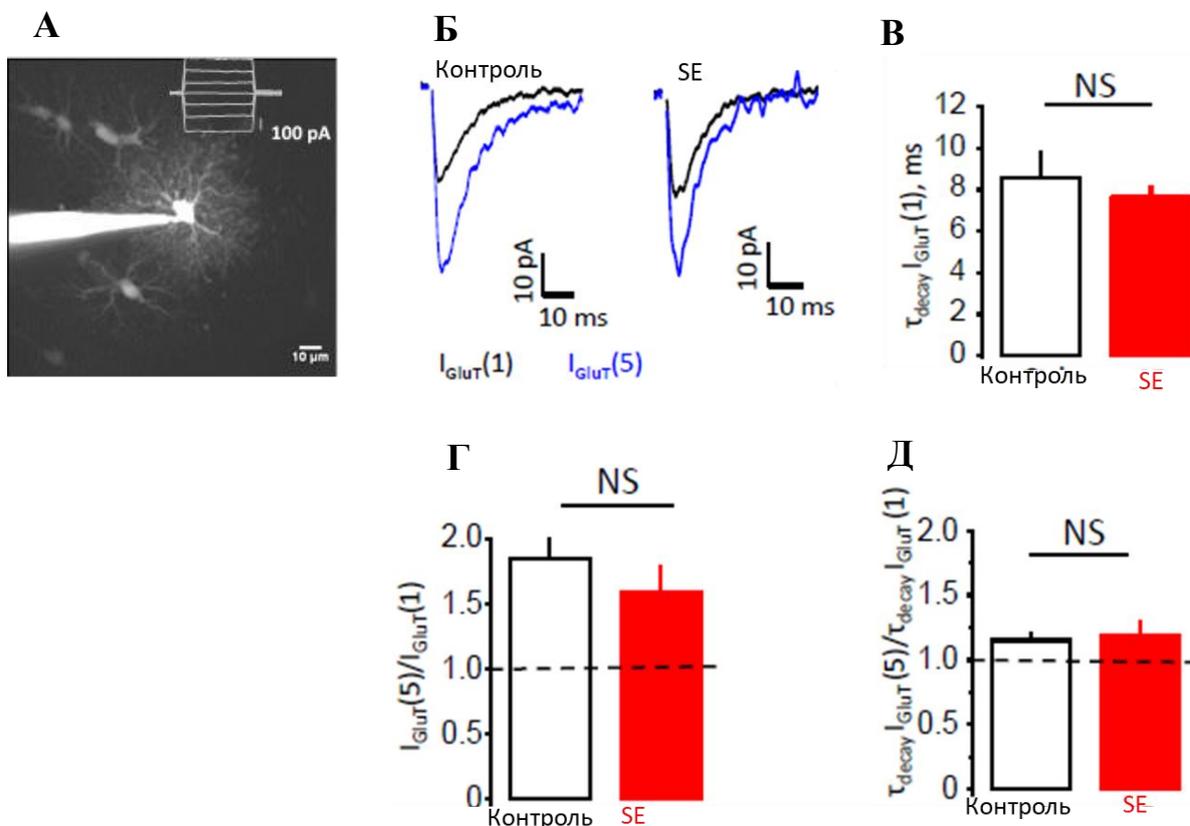


Рисунок 21. Параметры транспортных токов в контроле и в *SE* в ответ на пятый стимул. А) Изображение одиночного астроцита с патч-электродом, заполненным флуоресцентным красителем. Показан тест на мембранную возбудимость астроцита, характеризующий отсутствие элетрогенных свойств астроцита. Б) Оригинальные записи транспортных токов в контроле и при *SE* в ответ на одиночный (черный цвет) и на пятый стимул (синий цвет). В) Отсутствие статистически достоверных различий во времени затухания транспортных токов в контроле и при *SE* в ответ на одиночную стимуляцию. Г) Отсутствие статистически достоверных различий в отношении амплитуд тока в ответ на пятый и одиночный стимулы в контроле и в *SE*. Д) Отсутствие статистически достоверных различий в отношении времени затухания тока в ответ на пятый и одиночный стимулы в контроле и в *SE*. Статистический тест Манна-Уитни. N.S. $p > 0.05$

3.2.4. Динамика K^+ тока в астроцитах при хронической эпилептиформной активности

Для оценки захвата K^+ астроцитами были исследованы те же параметры как при исследовании параметров транспортного тока: время затухания K^+ тока в точке 200 мс после последнего стимула в токе I_{syn} (комбинированный

ток); отношения этих параметров в ответ на пятый и одиночный стимулы и соответствующие отношения амплитуд K^+ токов (фасилитация/депрессия токов) (рис. 22).

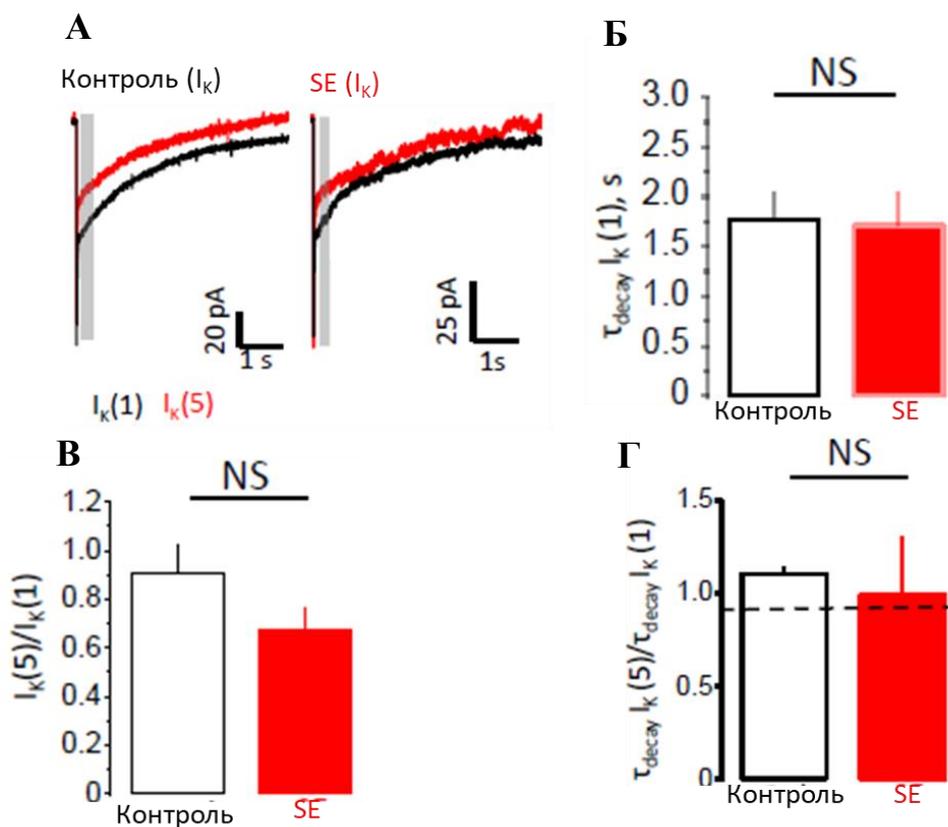


Рисунок 22. Параметры K^+ тока в контроле и при *SE*. А) Оригинальные записи K^+ тока в контроле и при *SE*: ответ на пятый стимул (красный цвет) в сравнении с ответом на одиночный стимул (черный цвет). Б) Отсутствие статистически достоверных различий во времени затухания K^+ токов в контроле и при *SE* в ответ на одиночную стимуляцию. В) Отсутствие различий в отношении амплитуд K^+ тока в контроле и при *SE*. Г) Отсутствие статистически достоверных различий в отношении амплитуд тока в ответ на пятый и одиночный стимулы в контроле и при *SE*. Д) Отсутствие статистически достоверных различий в отношении времени затухания тока в ответ на пятый и одиночный стимулы в контроле и в *SE*. Статистический тест Манна-Уитни. N.S. $p > 0.05$. Серым прямоугольником показана точка в 200 мс от которой считались параметры K^+ тока в I_{syn}

Статистически достоверных различий в захвате K^+ астроцитами при эпилептиформной активности не было обнаружено. Увеличение внеклеточной концентрации K^+ может наблюдаться при эпилептиформной активности [81], но, вероятно, гомеостатические механизмы астроцитов активируются и регуляция K^+ динамики осуществляется в нормальном

режиме. Кроме того, вероятно, что предложенная модель эпилептиформной активности может приводить к более значительным изменениям в захвате K^+ на более длительных этапах индукции эпилептической активности.

3.2.5. Пространственно-временные характеристики астроцитарной Ca^{2+} активности после *SE*

Для оценки пространственно-временных характеристик астроцитарной Ca^{2+} активности после индукции *SE* нами был применен метод конфокального Ca^{2+} имиджинга. Исследованы частота длительность и размеры Ca^{2+} событий в астроцитах. Частота Ca^{2+} событий в астроцитах была ррсчитана как события/минуту на единицу площади для временных серий от контрольных животных и животных после *SE* (рис. 23).

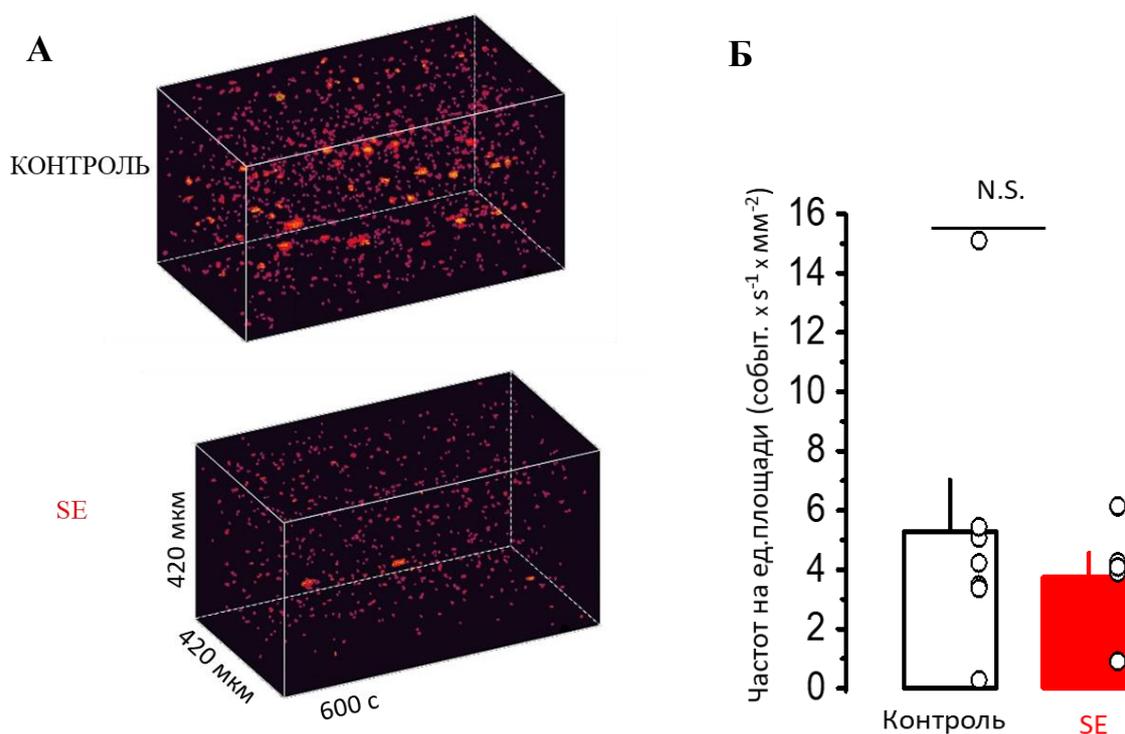


Рисунок 23. А) 3D-реконструкция Ca^{2+} сигналов в астроцитах в контроле и при *SE*. Размер 3D-реконструкции 420:420 μm в течение 10 минут (600 кадров). Б) Частота Ca^{2+} сигналов в контроле и при *SE*. Данные представлены в виде среднее \pm стандартная ошибка среднего. Статистический тест Манна-Уитни. $**p < 0.01$; $*p < 0.05$; N.S. $p > 0.05$

Длительность Ca^{2+} событий в астроцитах в контроле и при *SE* была рассчитана как усреднённый показатель степенной функции α от функции плотности вероятности для длительности всех событий (рис. 24 А, Б). Показатель степенной функции α для длительности событий в контроле составил -2.74 ± 0.23 и -3.02 ± 0.24 после *SE* ($p=0.3$, тест Манна-Уитни).

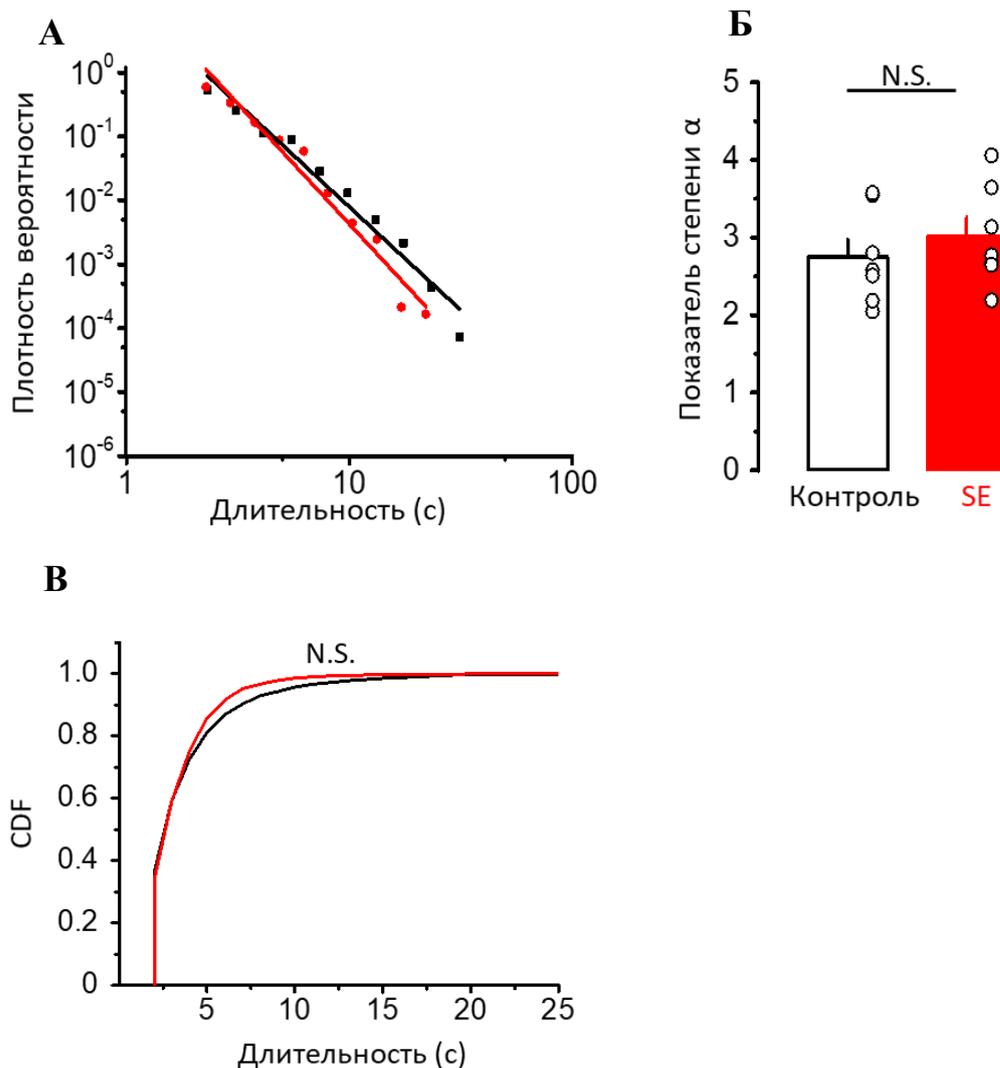


Рисунок 24. А) Функция плотности вероятности длительности Ca^{2+} событий в астроцитах в контроле и при *SE*. Б) Усреднённые показатели степенной функции α длительности Ca^{2+} событий в контроле и при *SE*. В) Кумулятивные функции распределения длительности Ca^{2+} событий в контроле и при *SE*. Данные представлены в виде $\text{среднее} \pm \text{стандартная ошибка среднего}$. Статистический тест Манна-Уитни. $**p < 0.01$; $*p < 0.05$; N.S. $p > 0.05$ для А,Б и критерий Колмагорова-Смирнова для В

Но показатель степени α не всегда может точно показать статистическую разницу в исследуемых группах, поэтому было принято

решение оценить также кумулятивную функцию распределения CDF (рис. 24 В). Но достоверных статистических различий в длительности Ca^{2+} событий в астроцитах в контроле и при *SE* не были найдены ($p=0.5$, критерий Колмагорова-Смирнова).

Оценка изменений максимальной проекции (размеров) Ca^{2+} событий в астроцитах в контроле и при *SE* была осуществлена подобным же образом как и при исследовании длительности Ca^{2+} событий в астроцитах, описанная выше (рис. 25).

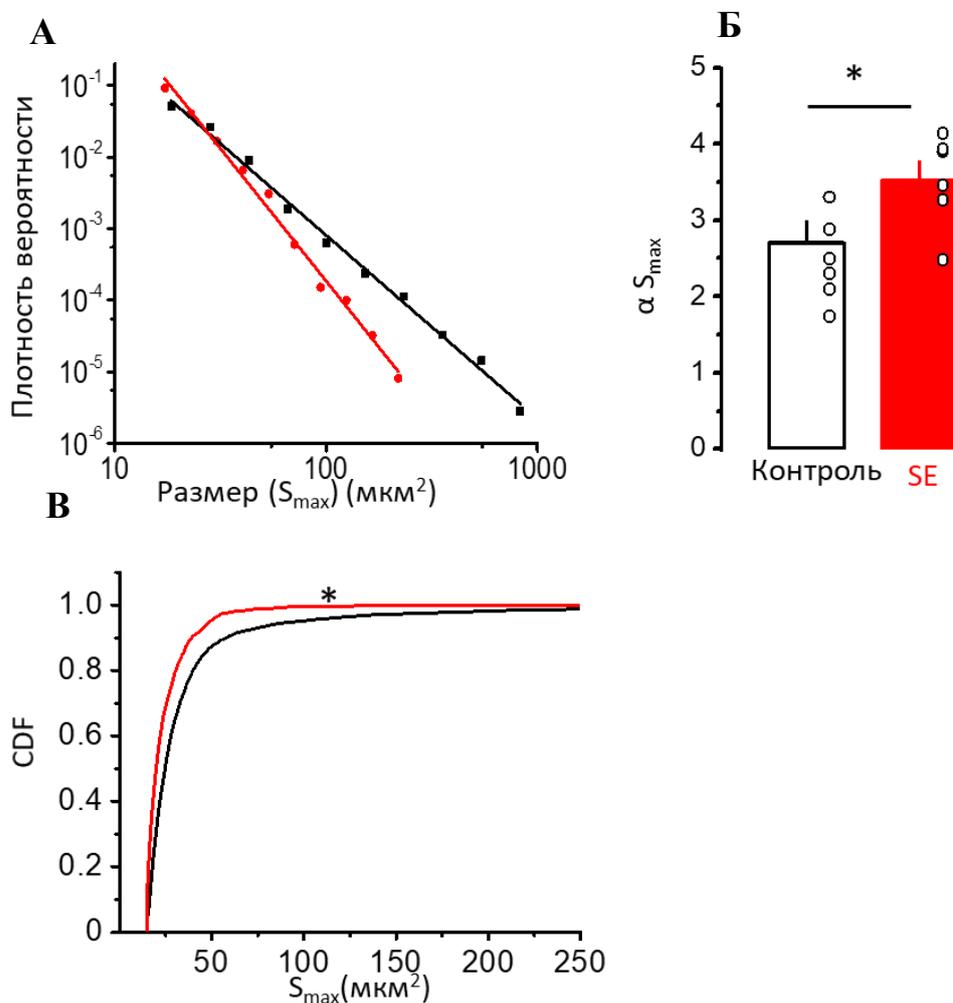


Рисунок 25. А) Функция плотности вероятности размеров Ca^{2+} событий в астроцитах в контроле и при *SE*. Б) Усреднённые показатели степенной функции α размеров Ca^{2+} событий в контроле и при *SE*. В) Кумулятивные функции распределения размеров Ca^{2+} событий в контроле и при *SE*. Данные представлены в виде $\text{среднее} \pm \text{стандартная ошибка среднего}$. Статистический тест Манна-Уитни. ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; N.S. $p > 0.05$ для А,Б и критерий Колмагорова-Смирнова для В

Показатель степенной функции α для размеров событий в контроле составил -2.69 ± 0.29 и -3.52 ± 0.25 после *SE* ($p=0.03$, тест Манна-Уитни), что характеризует пропорциональное уменьшение размеров «крупных» Ca^{2+} событий в астроцитах после *SE* по сравнению с контролем. Статистически достоверные различия в кумулятивном распределении размеров Ca^{2+} событий в астроцитах также подтверждают уменьшение размеров Ca^{2+} событий в астроцитах после *SE* по сравнению с контролем ($p=0.001$, критерий Колмогорова-Смирнова) (рис. 25).

После индукции пилокарпином эпилептиформная активность переходит в хроническую стадию через 2 и более недель согласно литературным данным [108]. За это время происходит ряд ключевых морфофункциональных изменений в астроцитах. Такие изменения затрагивают в первую очередь основную сигнальную систему в астроцитах – Ca^{2+} сигнализацию. Как было описано выше, Ca^{2+} сигнализация в астроцитах имеет пространственно-временные характеристики, которые могут быть описаны степенным законом [103,106]. После индукции эпилептического статуса происходит снижение «крупных» Ca^{2+} событий в астроцитах, которые участвуют в запуске Ca^{2+} активности и высвобождению Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Это свидетельствует о наличии функциональных перестроек в астроцитах при хронической эпилептиформной активности. Такие перестройки в астроцитах могут быть опосредованы увеличенным количеством самих астроцитов и нейрональной дегенерацией. Кроме того, при хронической эпилептиформной активности происходит сокращение числа астроцитарных отростков (неопубликованные данные), что регулирует Ca^{2+} активность в астроцитах. В связи с этим предполагается, что при уменьшенном количестве астроцитарных отростков может сократиться число синапсов и, соответственно, снижается Ca^{2+} активность в астроцитах. Но открытым остается вопрос являются ли изменения в Ca^{2+} активности астроцитов при хронической эпилептиформной активности эффектом,

вызывающим судорожную активность и гибель нейронов или это гомеостатический механизм при котором сокращается число нервных клеток, синапсов и астроцитарных отростков.

Выводы к Главе 3.2.

Эпилепсия является хроническим нейродегенеративным заболеванием, а эпилептические судороги влияют на качество жизни пациентов, поэтому исследование механизмов развития данного заболевания является важной социально-значимой задачей для современного общества. Синхронная активация нейронов головного мозга приводит к формированию судорожной (эпилептиформной) активности, в то время как функциональная активность астроглиальных клеток остается мало исследованной. Для установления роли астроглиальных клеток при развитии эпилепсии необходимо комплексно исследовать функциональную активность этих клеток. В связи с этим в данной части исследования были изучены функциональные особенности астроцитов при индукции эпилептиформной активности у крыс. Было показано, что при выбранной модели эпилептиформной активности наблюдается дегенерация нейронов в областях гиппокампа CA1, CA3, Nilus и происходит увеличение количества астроцитов, которые могут заполнять пространство вместо «погибших» нейронов. Такие функциональные перестройки в гиппокампе могут быть причиной изменений размеров Ca^{2+} событий (уменьшение «крупных» Ca^{2+} событий). Вероятным механизмом таких нарушений может являться увеличение экспрессии метаботропных глутаматных рецепторов, что может, в свою очередь, приводить к накоплению внеклеточного глутамата и соответственно модулировать Ca^{2+} активность в астроцитах. Кроме того, в исследуемой модели эпилептиформной активности не наблюдалось изменений в процессах обратного захвата глутамата во время синаптической передачи и захвата ионов калия. Вероятно, что таким образом астроциты

выполняют гомеостатические свойства при патологической эпилептиформной активности в мозге.

3.3. Поиск вероятных механизмов изменений астроцитарной Ca^{2+} активности при эпилептическом статусе

3.3.1. Ca^{2+} активность в астроцитах при повышенной концентрации внеклеточного K^+

В данной части работы мы исследовали Ca^{2+} активность в астроцитах при экспериментальном моделировании высокой нейрональной активности, которая в свою очередь приводит к накоплению K^+ во внеклеточной среде (в данном случае во внеклеточном растворе). Такое накопление внеклеточного K^+ может наблюдаться при эпилепсии и соответственно модулировать Ca^{2+} активность в астроцитах, которая претерпевает изменения при хронической эпилептиформной активности. Чтобы предотвратить прямой эффект K^+ на нейроны, эксперименты были проведены при блокаде везикулярного высвобождения бафиломицином A1 ($4\mu\text{M}$).

Был применен анализ пространственно-временных характеристик Ca^{2+} активности, описанный выше.

Статистически достоверных различий в частоте Ca^{2+} событий в астроцитах не были найдены. В контроле частота событий на единицу площади составила 7.35 ± 2.1 ($n=6$); частота событий на единицу площади при повышенной внеклеточной концентрации K^+ – 7.26 ± 1.36 ($n=10$) ($p=0.8$, тест Манна-Уитни) (рис. 26).

Длительность Ca^{2+} событий в астроцитах также достоверно не изменилась и составила 2.92 ± 0.14 с в контроле ($n=6$) и 2.95 ± 0.16 с ($n=10$) при повышенной внеклеточной концентрации K^+ ($p=0.87$, тест Манна-Уитни) (рис. 27). Однако кумулятивное распределение длительностей Ca^{2+} событий показали статистически достоверные различия между контролем и при

повышенной внеклеточной концентрации K^+ ($p < 0.001$, критерий Колмогорова-Смирнова) (рис. 27).

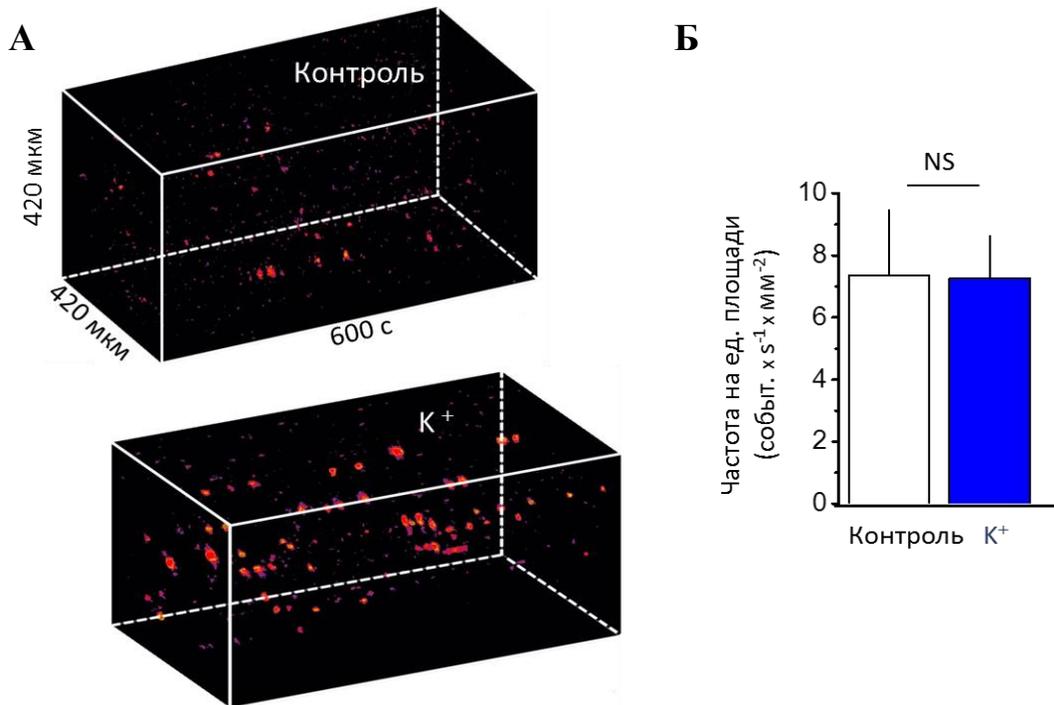


Рисунок 26. А) 3D-реконструкция Ca^{2+} сигналов в астроцитах в контроле и при K^+ ↑. Б) Отсутствие в частоте Ca^{2+} событий на единицу площади в контроле и при K^+ ↑. Данные представлены в виде среднее ± стандартная ошибка среднего. Статистический тест Манна-Уитни. N.S. $p > 0.05$, нет статистически достоверных различий

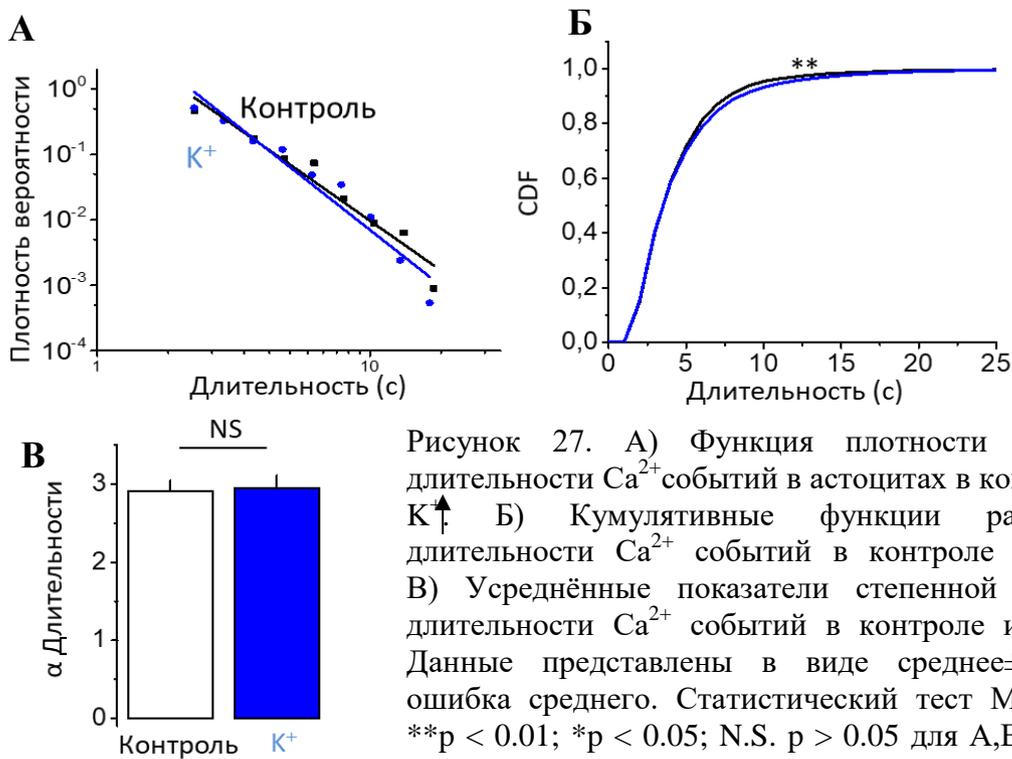


Рисунок 27. А) Функция плотности вероятности длительности Ca^{2+} событий в астроцитах в контроле и при K^+ ↑. Б) Кумулятивные функции распределения длительности Ca^{2+} событий в контроле и при K^+ ↑. В) Усреднённые показатели степенной функции α длительности Ca^{2+} событий в контроле и при K^+ ↑. Данные представлены в виде среднее ± стандартная ошибка среднего. Статистический тест Манна-Уитни. ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; N.S. $p > 0.05$ для А,В и критерий Колмагорова-Смирнова для Б

Показатель степенной функции α для размеров событий в контроле составил -3.24 ± 0.23 ($n=6$) и достоверно различался от показателя степенной функции α для размеров событий при повышенной внеклеточной концентрации K^+ и составил -2.81 ± 0.25 ($n=10$) ($p=0.02$, тест Манна-Уитни) (рис. 28 А, В). Кумулятивное распределение размеров Ca^{2+} событий при повышенной внеклеточной концентрации K^+ показало статистически достоверные различия от контроля ($p < 0.001$, критерий Колмогорова-Смирнова) (рис. 28 Б).

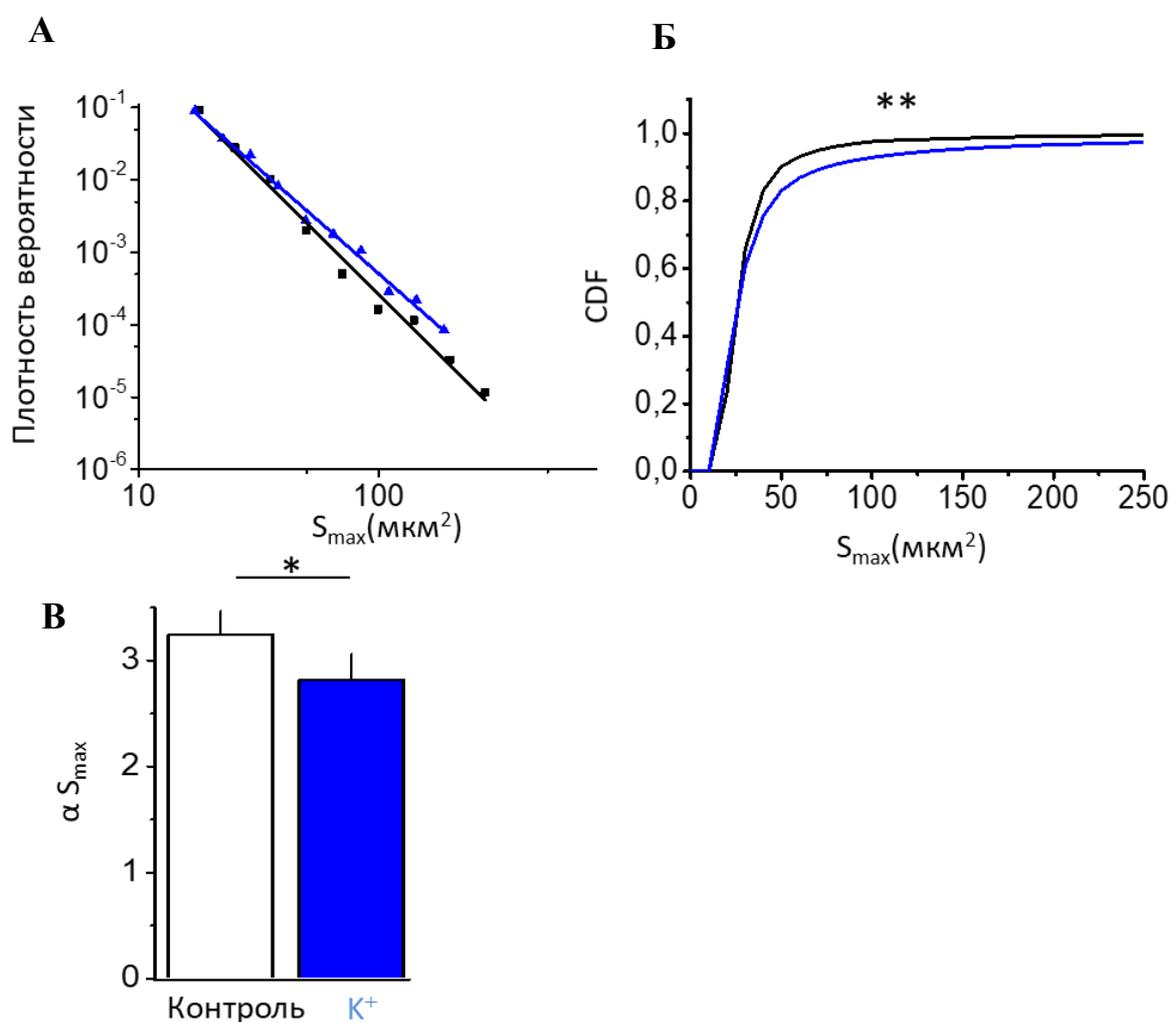


Рисунок 28. А) Функция плотности вероятности размеров Ca^{2+} событий в астоцитах в контроле и при K^+ . Б) Кумулятивные функции распределения размеров Ca^{2+} событий в контроле и при K^+ . В) Усреднённые показатели степенной функции α размеров Ca^{2+} событий в контроле и при K^+ . Данные представлены в виде $среднее \pm$ стандартная ошибка среднего. Статистический тест Манна-Уитни. $**p < 0.01$; $*p < 0.05$; N.S. $p > 0.05$ для А,В и критерий Колмагорова-Смирнова для Б

Повышенная внеклеточная концентрация K^+ оказала воздействие на параметры пространственно-временных характеристик Ca^{2+} активности астроцитов. Наблюдалось увеличение длительности Ca^{2+} событий, хотя это и не было подтверждено при подсчете показателя степенной функции α . Кроме того было показано увеличение размеров Ca^{2+} событий в условиях повышенной внеклеточной концентрации K^+ .

Повышение внеклеточной концентрации K^+ может происходить как при нормальных физиологических процессах (в фазу реполяризации потенциала действия; и при выходе K^+ во время активации NMDA и AMPA рецепторов на постсинаптической мембране), так и при патологических состояниях мозга (например, чрезмерная активность нейрональной сети при эпилепсии). Повышенная внеклеточная концентрация K^+ может также деполяризовать мембрану астроцитов, вследствие большего его входа и изменения равновесного потенциала, и, вероятно, модулирует Ca^{2+} активность в астроцитах. Но влияние повышенной внеклеточной концентрации K^+ иначе, чем при хронической эпилептиформной активности модулирует Ca^{2+} активность в астроцитах. Это свидетельствует о том, что экзогенное повышение концентрации K^+ не является возможным механизмом уменьшения размеров «крупных» Ca^{2+} событий в астроцитах, наблюдаемое в нашей исследуемой модели эпилептиформной активности. Но полученные результаты могут дать новую информацию о принципах интеграции Ca^{2+} событий в астроцитах в условиях накопления K^+ в межклеточном пространстве.

3.3.2. Астроцитарная Ca^{2+} активность при активации метаботропных глутаматных рецепторов (mGluR) агонистом trans-ACPD

В данной части исследования были проведены подобные эксперименты, описанные в предыдущей подглаве 3.3.2. Были исследованы пространственно-временные характеристики Ca^{2+} активности астроцитов при

повышенной активности mGluR специфическим агонистом trans-ACPD/t-ACPD (транс-1-аминоциклопентан-1,3-дикарбоксилловая кислота) (10μM). Предполагается, что при высокой нейрональной активности, наблюдаемой при эпилептиформной активности, происходит накопление глутамата, который способен диффундировать за пределы синаптической щели [105]. Поскольку отростки астроцитов располагаются вблизи синапсов, они способны захватывать глутамат специфическими транспортерами, предотвращая тем самым процесс эксайтотоксичности и соответственно гибель нейронов. В связи с этим было высказано предположение, что этот процесс может являться вероятным механизмом, описывающим уменьшения размеров «крупных» Ca²⁺ событий в астроцитах, наблюдаемое при хронической эпилептиформной активности.

Наблюдалось статистически достоверные различия в частоте Ca²⁺ событий в астроцитах. В контроле частота событий на единицу площади составила 7.35±2.1 (n=6); при активации mGluR – 16.69±2.02 (n=6) (p=0.02, тест Манна-Уитни) (рис. 29).

Функции плотности вероятности для длительности Ca²⁺ событий при активации метаботропных глутаматных рецепторов агонистом trans-ACPD показали наличие двух функций и аппроксимировать которые степенной функцией не представлялось возможности. Функция плотности вероятности в двойных логарифмических координатах может быть аппроксимирована линейно лишь в том случае, когда она имеет линейный вид, а в нашем случае такого не произошло. В связи с этим показатель степенной функции α рассчитан не был, а был проведен критерий Колмагорова-Смирнова двух кумулятивных функций распределения для длительности событий. Было показано снижение длительности Ca²⁺ событий в астроцитах в условиях активации метаботропных глутаматных рецепторов по сравнению с контролем (p<0.001, критерий Колмагорова-Смирнова) (рис. 30).

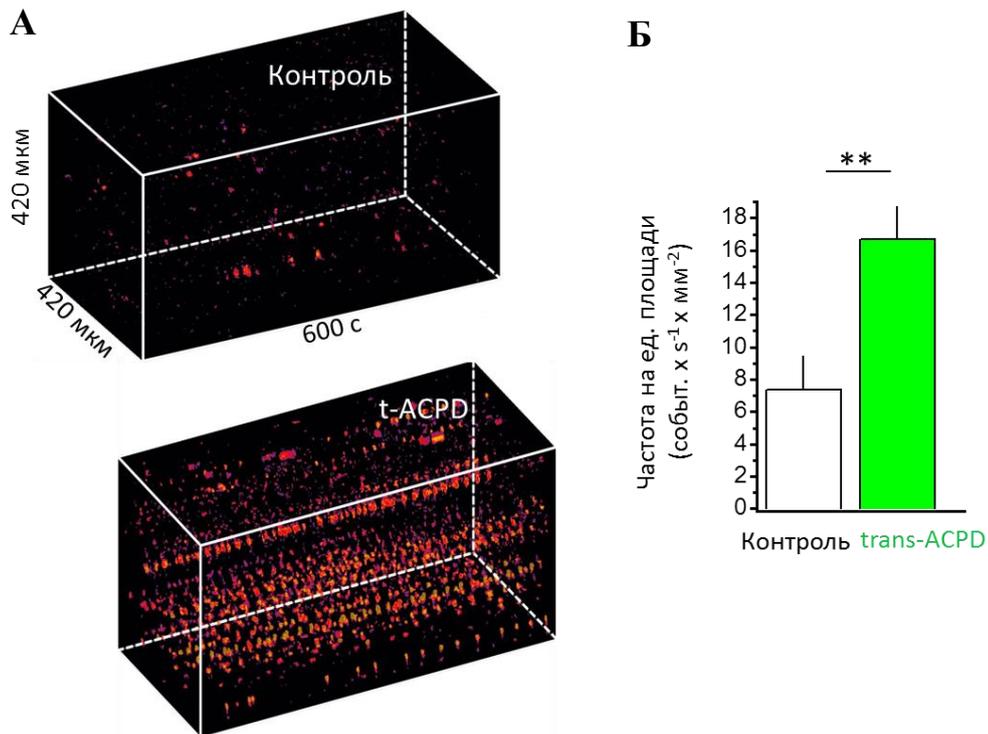


Рисунок 29. А) 3D-реконструкция Ca^{2+} сигналов в астроцитах в контроле и при активации mGluR агонистом t-ACPD. Б) Статистически достоверные различия в частоте Ca^{2+} событий на единицу площади в контроле и при активации mGluR. Данные представлены в виде $\text{среднее} \pm \text{стандартная ошибка среднего}$. Статистический тест Манна-Уитни. ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; N.S. $p > 0.05$ нет статистически достоверных различий

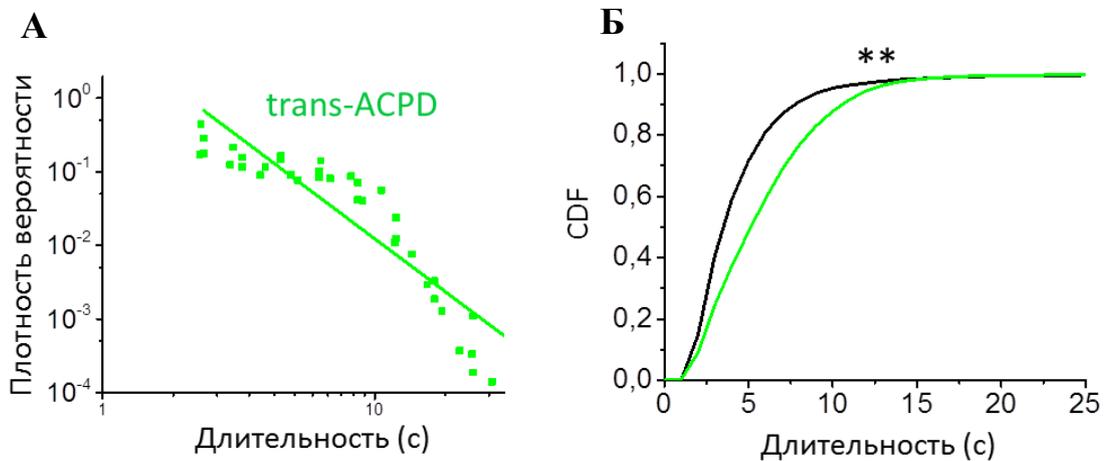


Рисунок 30. А) Функция плотности вероятности длительности Ca^{2+} событий в астроцитах в контроле и при активации mGluR агонистом t-ACPD. Б) Кумулятивные функции распределения длительности Ca^{2+} событий в контроле и при активации mGluR агонистом t-ACPD. Данные представлены в виде $\text{среднее} \pm \text{стандартная ошибка среднего}$. Статистический тест Манна-Уитни. ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; N.S. $p > 0.05$ для А и критерий Колмагорова-Смирнова для Б

Показатель степенной функции α для размеров событий в контроле составил -3.24 ± 0.23 ($n=6$) и достоверно различался от показателя степенной функции α для размеров событий при повышенной внеклеточной концентрации K^+ и составил -2.57 ± 0.16 ($n=6$) ($p=0.03$, тест Манна-Уитни) (рис. 31 А, В). Кумулятивное распределение размеров Ca^{2+} событий при повышенной внеклеточной концентрации K^+ показало статистически достоверные различия от контроля ($p < 0.001$, критерий Колмогорова-Смирнова) (рис. 31 Б).

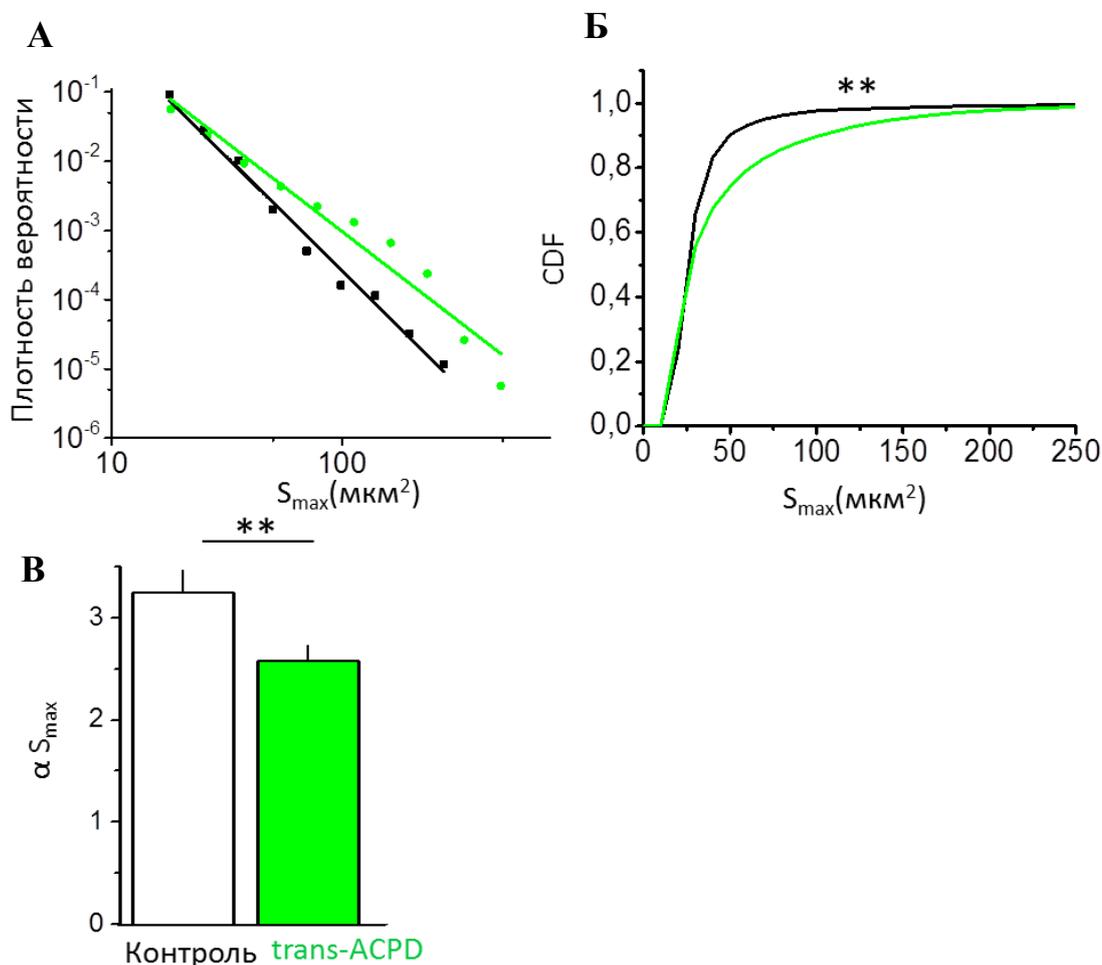


Рисунок 31. А) Функция плотности вероятности размеров Ca^{2+} событий в астоцитах в контроле и при активации mGluR агонистом t-ACPD. Б) Кумулятивные функции распределения размеров Ca^{2+} событий в контроле и при активации mGluR агонистом t-ACPD. В) Усреднённые показатели степенной функции α размеров Ca^{2+} событий в контроле и при активации mGluR агонистом t-ACPD. Данные представлены в виде $среднее \pm$ стандартная ошибка среднего. Статистический тест Манна-Уитни. ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; N.S. $p > 0.05$ для А,В и критерий Колмагорова-Смирнова для Б

Данная часть исследования показала, что пространственно-временные характеристики Ca^{2+} активности в астроцитах при высокой активации метаботропных глутаматных рецепторов посредством агониста trans-ACPD изменились. Произошло увеличение частоты Ca^{2+} событий в астроцитах, увеличение длительности этих событий и увеличение их размеров. Вероятно, что trans-ACPD оказывает влияние на кинетику ИТФ-рецепторов и тем самым модулирует параметры длительности Ca^{2+} событий [14], [105]. Но также как и повышенная экзогенная концентрация K^+ в межклеточном пространстве активация метаботропных глутаматных рецепторов не является тем вероятным механизмом снижения Ca^{2+} активности в астроцитах при хронической эпилептиформной активности у крыс.

Выводы к Главе 3.3.

Ca^{2+} активность астроцитов приводит к высвобождению глитоансмиттеров, способных оказывать воздействие на нейрональную активность и, соответственно, модулировать такие фундаментальные процессы в мозге, как память и обучение. В тоже время высокая нейрональная активность, которая зачастую характеризуется при эпилептиформной активности в мозге, может модулировать Ca^{2+} активность астроцитов.

Недавние исследования показали, что Ca^{2+} динамика астроцитов представляет собой сложную систему пространственно-временных характеристик, которые могут изменяться при модуляции нейрональной активности [106]. Данные исследования затрагивают активность одиночных астроцитов, как в культуре клеток, так и в срезе мозга [40]. Наши данные позволяют оценить пространственно-временные характеристики Ca^{2+} активности в сети астроцитов (в астроцитарном синцитии), чего ранее исследовано не было.

Показано, что пространственно-временные характеристики Ca^{2+} активности в астроцитах имеют сложный характер и модулируются накоплением экзогенного K^+ и при активации metabotropic glutamate receptors. Но данные экзогенные факторы модуляции Ca^{2+} активности в астроцитах, вероятно, не являются теми механизмами снижения Ca^{2+} активности в астроцитах, наблюдаемой при хронической epileptiform активности. Вероятно, что изменения, наблюдаемые в исследуемой модели epileptiform активности происходят в самих астроцитах.

Заключение

Настоящая диссертационная работа была посвящена исследованию функциональной активности астроцитов при физиологических и патологических процессах в головном мозге.

Несколько десятилетий назад астроциты считались вспомогательными клетками в мозге, в отличие от нейронов. В последние почти три десятилетия исследователи обратили внимание на астроциты и исследовали их роль во многих процессах в мозге. Астроциты вовлечены в механизмы передачи сигналов, пластичности, во многие метаболические процессы, как при физиологических, так и патофизиологических процессах мозга.

Изучение функциональной активности астроцитов в процессе постнатального развития показали, что Ca^{2+} сигнализация в астроцитах на ранних этапах постнатального развития мозга зависит от поступления специфических энергетических субстратов посредством взаимодействия с нейронами через сложные метаболические каскады реакций.

Недавние исследования показали, что Ca^{2+} активность в астроцитах имеет пространственно-временные характеристики на уровне одиночных астроцитов, которые могут изменяться при модуляции нейрональной активности [106]. Результаты наших исследований позволили оценить пространственно-временные характеристики Ca^{2+} активности в сети астроцитов (в астроцитарном синцитии) на основе новых методов анализа. Показано, что пространственно-временные характеристики Ca^{2+} активности астроцитов имеют сложный характер и могут регулироваться высокой нейрональной активностью. Изучение пространственно-временных характеристик Ca^{2+} активности в астроцитах раскрывает новые аспекты интеграции Ca^{2+} сигналов в сети астроцитов как при физиологических процессах, так и при патофизиологических процессах, что также позволяет оценить новые механизмы сложного взаимодействия астроцитов и нейронов

в головном мозге. Это также позволит раскрыть новые механизмы сложного взаимодействия астроцитов и нейронов в головном мозге.

Поскольку астроциты вовлечены практически во все нейродегенеративные заболевания головного мозга одним из актуальных вопросов является исследование их функциональной роли в этих процессах. Так, например, было показано, что астроциты способны регулировать возбудимость нейронных сетей при нормальном функционировании мозга [107]. Но при нарушениях такой возбудимости, которая может привести к судорожной активности и хроническим эпилептическим припадкам функциональная активность астроцитов исследована слабо. Нами были изучены морфологические и функциональные особенности астроцитов при индукции эпилептиформной активности у крыс. Было показано дегенерация нейронов в областях гиппокампа CA1, CA3, Nilus и увеличение количества астроцитов, которые могут заполнять пространство вместо «погибших» нейронов, выполняя или регулируя те или иные функции в мозге. Так, например, не было обнаружено нарушений в процессах захвата глутамата во время синаптической передачи и захвата ионов калия. Вероятно, что таким образом астроциты выполняют гомеостатические свойства при патологической эпилептиформной активности в мозге. Такие функциональные перестройки могут оказаться причиной уменьшения «крупных» Ca^{2+} событий в астроцитах. Также вероятным механизмом таких нарушений в Ca^{2+} активности в астроцитах может являться увеличение экспрессии метаботропных глутаматных рецепторов и соответственно их чрезмерная активация или накопление внеклеточной концентрации ионов калия, наблюдаемое при повышенной активности нейронов. Было показано, что данные экзогенные факторы увеличивают Ca^{2+} активность в астроцитах, но подобные эффекты не согласуются с результатами, которые были продемонстрированы при хронической эпилептиформной активности в астроцитах. То есть повышенное накопление внеклеточной концентрации

ионов калия и чрезмерная активация metabotropic glutamate receptors не могут быть причиной сниженной Ca^{2+} активности в астроцитах и, вероятно, такие механизмы заложены во внутриклеточных процессах астроцитов, участвующих в генерации Ca^{2+} активности.

Но являются ли функциональные перестройки в астроцитах при хронической эпилептиформной активности механизмом, запускающим патологическое состояние или механизмом, являющимся результатом патологического состояния в настоящее время определить трудно. Вовлеченность астроцитов в механизмы развития хронической эпилептиформной активности свидетельствует о том, что исследования в данной области могут быть крайне актуальны и использованы при лечении эпилепсии, поскольку астроциты могут быть рассмотрены в качестве терапевтических мишеней.

Выводы

1. В процессе постнатального развития частота Ca^{2+} событий в астроцитах увеличивается к возрасту P10-P20. Длительность Ca^{2+} событий к возрасту >P20 снижается.
2. В ранний постнатальный период развития <P10 частота Ca^{2+} событий в астроцитах увеличивается при добавлении специфических энергетических субстратов. Этот процесс опосредован через нейроны.
3. Эффективность обратного захвата глутамата и захвата K^+ астроцитами не изменяются при хронической эпилептиформной активности.
4. Размеры Ca^{2+} событий в астроцитах гиппокампа при хронической эпилептиформной активности уменьшаются.
5. Повышенная внеклеточная концентрация K^+ и активация метаботропных глутаматных рецепторов увеличивает Ca^{2+} активность в астроцитах. Но данные процессы не могут быть рассмотрены в качестве механизмов, описывающих снижение Ca^{2+} активности в астроцитах при хронической эпилептиформной активности.

Список цитируемой литературы

- [1] R. Virchow, “from the library of Helmut Kettenmann Max Delbrück Center for Molecular Medicine Berlin-Buch,” *Allg Zsch Psychiat*, pp. 3:242–250, 1846.
- [2] E. Benarroch, “Neuron-astrocyte interactions: partnership for normal function and disease in the central nervous system,” *Mayo Clin. Proc.*, vol. 55905, no. October, pp. 1326–1338, 2005.
- [3] M. V Sofroniew and H. V Vinters, “Astrocytes: biology and pathology.,” *Acta Neuropathol.*, vol. 119, no. 1, pp. 7–35, Jan. 2010.
- [4] T. Fiacco and K. McCarthy, “Astrocyte Calcium Elevations : Properties , Propagation , and Effects on Brain Signaling,” *Glia*, vol. 690, no. April, pp. 676–690, 2006.
- [5] I. Patrushev, N. Gavrilov, V. Turlapov, and A. Semyanov, “Subcellular location of astrocytic calcium stores favors extrasynaptic neuron-astrocyte communication,” *Cell Calcium*, vol. 54, pp. 343–349, 2013.
- [6] Y. Bernardinelli, I. Nikonenko, and D. Muller, “Structural plasticity: mechanisms and contribution to developmental psychiatric disorders.,” *Front. Neuroanat.*, vol. 8, no. November, p. 123, 2014.
- [7] V. Matyash and H. Kettenmann, “Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology,” *Brain Research Reviews*, vol. 63, no. 1–2. pp. 2–10, 2010.
- [8] D. D. Fraser, L. a Mudrick-Donnon, and B. a MacVicar, “Astrocytic GABA receptors.,” *Glia*, vol. 11, no. 2, pp. 83–93, 1994.
- [9] M. Navarrete, A. Díez, and A. Araque, “Astrocytes in endocannabinoid signalling.,” *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, vol. 369, no. 1654, p. 20130599, 2014.
- [10] Z. Cai, G. Schools, and H. Kimelberg, “Metabotropic Glutamate Receptors in Acutely Isolated Hippocampal Astrocytes: Developmental Changes of mGluR5 mRNA and Functional Expression,” *Glia*, vol. 80, no. August 1999, pp. 70–80, 2000.
- [11] A. Verkhratsky and F. Kirchhoff, “NMDA Receptors in glia.,” *Neuroscientist*, vol. 13, no. 1, pp. 28–37, 2007.

- [12] O. Palygin, U. Lalo, and Y. Pankratov, “Distinct pharmacological and functional properties of NMDA receptors in mouse cortical astrocytes,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 163, no. 8, pp. 1755–1766, 2011.
- [13] M. Zhou and H. K. Kimelberg, “Freshly Isolated Hippocampal CA1 Astrocytes Comprise Two Populations Differing in Glutamate Transporter and AMPA Receptor Expression,” *J. Neurosci.*, vol. 21, no. 20, pp. 7901–7908, 2001.
- [14] R. Balázs, S. Miller, C. Romano, a de Vries, Y. Chun, and C. W. Cotman, “Metabotropic glutamate receptor mGluR5 in astrocytes: pharmacological properties and agonist regulation,” *J. Neurochem.*, vol. 69, pp. 151–163, 1997.
- [15] B. F. King, J. T. Neary, Q. Zhu, S. Wang, M. D. Norenberg, and G. Burnstock, “P2 purinoceptors in rat cortical astrocytes: Expression, calcium-imaging and signalling studies,” *Neuroscience*, vol. 74, no. 4, pp. 1187–1196, 1996.
- [16] V. Parpura and A. Verkhratsky, “Homeostatic function of astrocytes: Ca(2+) and Na(+) signalling,” *Transl. Neurosci.*, vol. 3, no. 4, pp. 334–344, Dec. 2012.
- [17] M. L. Olsen, B. S. Khakh, S. N. Skatchkov, M. Zhou, C. J. Lee, and N. Rouach, “New Insights on Astrocyte Ion Channels: Critical for Homeostasis and Neuron-Glia Signaling,” *J. Neurosci.*, vol. 35, no. 41, pp. 13827–35, 2015.
- [18] S. Bevan, R. M. Lindsay, M. N. Perkins, and M. C. Raff, “Voltage gated ionic channels in rat cultured astrocytes, reactive astrocytes and an astrocyte-oligodendrocyte progenitor cell,” *J Physiol*, vol. 82, no. 4, pp. 327–335, 1987.
- [19] I. Latour, J. Hamid, A. M. Beedle, G. W. Zamponi, and B. A. Macvicar, “Expression of voltage-gated Ca²⁺ channel subtypes in cultured astrocytes,” *Glia*, vol. 41, no. 4, pp. 347–353, 2003.
- [20] K. N. Seidel, C. Derst, M. Salzmann, M. Höltje, J. Priller, R. Markgraf, S. H. Heinemann, H. Heilmann, S. N. Skatchkov, M. J. Eaton, R. W. Veh, and H. Prüss, “Expression of the voltage- and Ca²⁺-dependent BK potassium channel subunits BK β 1 and BK β 4 in rodent astrocytes,” *Glia*, vol. 59, no. 6, pp. 893–902, 2011.

- [21] G. Glassmeier, G. Jeserich, and T. Krüppel, “Voltage-dependent sodium and potassium currents in cultured trout astrocytes,” *Glia*, vol. 11, no. 3, pp. 245–254, 1994.
- [22] G. M. McKhann, R. D’Ambrosio, and D. Janigro, “Heterogeneity of astrocyte resting membrane potentials and intercellular coupling revealed by whole-cell and gramicidin-perforated patch recordings from cultured neocortical and hippocampal slice astrocytes.,” *J. Neurosci.*, vol. 17, no. 18, pp. 6850–6863, 1997.
- [23] S. Nag, “Morphology and properties of astrocytes.,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 686, pp. 69–100, 2011.
- [24] U. Lalo, Y. Pankratov, V. Parpura, and A. Verkhratsky, “Ionotropic receptors in neuronal-astroglial signalling: What is the role of ‘excitable’ molecules in non-excitable cells,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1813, no. 5, pp. 992–1002, 2011.
- [25] L. A. Holtzclaw, S. Pandhit, D. J. Bare, G. A. Mignery, and J. T. Russell, “Astrocytes in adult rat brain express type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors,” *Glia*, vol. 39, no. 1, pp. 69–84, 2002.
- [26] L. Leybaert, K. Paemeleire, A. Strahonja, and M. J. Sanderson, “Inositol-trisphosphate-dependent intercellular calcium signaling in and between astrocytes and endothelial cells,” *Glia*, vol. 24, no. 4, pp. 398–407, 1998.
- [27] N. Bazargani and D. Attwell, “Astrocyte calcium signaling: the third wave.,” *Nat. Neurosci.*, vol. 19, no. 2, pp. 182–9, 2016.
- [28] G. Perea and A. Araque, “Synaptic regulation of the astrocyte calcium signal,” in *Journal of Neural Transmission*, 2005, vol. 112, no. 1, pp. 127–135.
- [29] M. Santello and a Volterra, “Synaptic modulation by astrocytes via Ca²⁺-dependent glutamate release.,” *Neuroscience*, vol. 158, no. 1, pp. 253–9, Jan. 2009.
- [30] G. Dallérac, O. Chever, and N. Rouach, “How do astrocytes shape synaptic transmission? Insights from electrophysiology.,” *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 7, no. October, p. 159, Jan. 2013.
- [31] Alexey Semyanov and Alexei Verkhratsky, “Ionic Signalling in Neuronal-Astroglial Interactions,” *Opera Medica Physiol.*, vol. 1, no. 2, pp. 153–163, 2016.

- [32] E. Syková, “Extrasynaptic volume transmission and diffusion parameters of the extracellular space,” *Neuroscience*, vol. 129, no. 4, pp. 861–876, 2004.
- [33] B. N. G. Giepmans, “Gap junctions and connexin-interacting proteins,” *Cardiovascular Research*, vol. 62, no. 2, pp. 233–245, 2004.
- [34] A. Wallraff, R. Köhling, U. Heinemann, M. Theis, K. Willecke, and C. Steinhäuser, “The impact of astrocytic gap junctional coupling on potassium buffering in the hippocampus,” *J. Neurosci.*, vol. 26, no. 20, pp. 5438–5447, 2006.
- [35] S. Anders, D. Minge, S. Griemsmann, M. K. Herde, and C. Henneberger, “Spatial properties of astrocyte gap junction coupling in the rat hippocampus,” 2014.
- [36] V. Samborska, S. Gordleeva, E. Ullner, A. Lebedeva, V. Kazantsev, and A. Zaikin, “Mammalian Brain As a Network of Networks,” *Opera Medica Physiol.*, vol. 2, no. 1, pp. 23–38, 2016.
- [37] N. J. Abbott, “Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability,” *J. Anat.*, vol. 200, no. 6, pp. 629–638, 2002.
- [38] A. M. Brown and B. R. Ransom, “Astrocyte Glycogen and Brain Energy Metabolism,” vol. 1271, no. July, pp. 1263–1271, 2007.
- [39] R. W. Olsen, S. P. Claus, S. L. Ellero, B. Berger, L. Krause, A. Bruttin, J. Molina, A. Paris, E. J. Want, I. De Waziers, O. Cloarec, S. E. Richards, Y. Wang, M. Dumas, A. Ross, S. Rezzi, S. Kochhar, P. Van Bladeren, J. C. Lindon, E. Holmes, J. K. Nicholson, N. M. Sagar, I. A. Cree, J. A. Covington, R. P. Arasaradnam, W.-J. Lee, K. Hase, J. K. Nicholson, E. Holmes, J. Kinross, R. Burcelin, G. Gibson, W. Jia, S. Pettersson, and P. Gérard, “GABA,” *Pathogens*, vol. 3, no. 6, p. 398585, 2013.
- [40] M. Bélanger, I. Allaman, and P. J. Magistretti, “Brain energy metabolism: Focus on Astrocyte-neuron metabolic cooperation,” *Cell Metab.*, vol. 14, no. 6, pp. 724–738, Dec. 2011.
- [41] V. Parpura and A. Verkhratsky, “Astrocytes revisited: concise historic outlook on glutamate homeostasis and signaling,” *Croat. Med. J.*, vol. 53, no. 6, pp. 518–528, Dec. 2012.
- [42] A. Verkhratsky and A. Butt, “Glial Neurobiology,” in *Glial Neurobiology*, 2007, pp. 29–38.

- [43] M. D. Norenberg, K. V. Rama Rao, and A. R. Jayakumar, "Mechanisms of ammonia-induced astrocyte swelling," *Metab. Brain Dis.*, vol. 20, no. 4, pp. 303–318, 2005.
- [44] A. R. Jayakumar, K. V. R. Rao, A. Schousboe, and M. D. Norenberg, "Glutamine-induced free radical production in cultured astrocytes," *Glia*, vol. 46, no. 3, pp. 296–301, 2004.
- [45] A. Scimemi and J. S. Diamond, "Deriving the time course of glutamate clearance with a deconvolution analysis of astrocytic transporter currents.," *J. Vis. Exp.*, no. 78, pp. 1–10, Jan. 2013.
- [46] S. Kirischuk, V. Parpura, and A. Verkhratsky, "Sodium dynamics: another key to astroglial excitability?," *Trends Neurosci.*, vol. 35, no. 8, pp. 497–506, Aug. 2012.
- [47] M. Olsen, "Examining potassium channel function in astrocytes.," *Methods Mol. Biol.*, vol. 814, pp. 265–81, Jan. 2012.
- [48] Bertil Hille, *Ion Channels of Excitable Membranes*, Third edit. 2001.
- [49] J. A. Hubbard, M. S. Hsu, M. M. Seldin, and D. K. Binder, "Expression of the Astrocyte Water Channel Aquaporin-4 in the Mouse Brain.," *ASN Neuro*, vol. 7, no. 5, 2015.
- [50] E. Scemes and C. Giaume, "Astrocyte calcium waves: What they are and what they do," *Glia*, vol. 54, no. 7, pp. 716–725, 2006.
- [51] K. Kasischke, "Lactate fuels the neonatal brain," *Front. Neuroenergetics*, vol. 3, no. JUN, pp. 3–5, 2011.
- [52] A. P. Halestrap, "The monocarboxylate transporter family--Structure and functional characterization.," *IUBMB Life*, vol. 64, no. 1, pp. 1–9, Jan. 2012.
- [53] A. Ivanov, M. Mukhtarov, P. Bregestovski, and Y. Zilberter, "Lactate Effectively Covers Energy Demands during Neuronal Network Activity in Neonatal Hippocampal Slices.," *Front. Neuroenergetics*, vol. 3, no. May, p. 2, Jan. 2011.
- [54] C. Vicario and J. M. Medina, "Metabolism of lactate in the rat brain during the early neonatal period.," *J. Neurochem.*, vol. 59, no. 1, pp. 32–40, 1992.
- [55] A. V. Lebedeva, Y. V. Dembitskaya, A. S. Pimashkin, Z. D. Zhuravleva, E. A. Shishkova, and A. V. Semyanov, "The role of energy substrates in

astrocyte calcium activity of rat hippocampus in early postnatal ontogenesis,” *Sovrem. Tehnol. v Med.*, vol. 7, no. 3, pp. 14–18, 2015.

- [56] *Биологическая химия*. 1998.
- [57] L. B. Gladden, “Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium,” *J. Physiol.*, vol. 558, no. Pt 1, pp. 5–30, Jul. 2004.
- [58] A. Suzuki, S. a Stern, O. Bozdagi, G. W. Huntley, H. Ruth, P. J. Magistretti, and C. M. Alberini, “Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term Memory Formation,” *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 810–823, 2012.
- [59] L. a Newman, D. L. Korol, and P. E. Gold, “Lactate produced by glycogenolysis in astrocytes regulates memory processing,” *PLoS One*, vol. 6, no. 12, p. e28427, Jan. 2011.
- [60] M. E. Hartnett, N. Tinkham, L. Paynter, P. Geisen, G. Koch, and K. L. Cohen, “A role for the mitochondrial pyruvate carrier as a repressor of the Warburg Effect and colon cancer cell growth,” vol. 148, no. 6, pp. 895–901, 2010.
- [61] E. M. F. Brekke, T. S. Morken, M. Wideroe, A. K. Haberg, A.-M. Brubakk, and U. Sonnewald, “The pentose phosphate pathway and pyruvate carboxylation after neonatal hypoxic-ischemic brain injury,” *J Cereb Blood Flow Metab*, vol. 34, no. 4, pp. 724–734, 2014.
- [62] E. Brekke, T. S. Morken, and U. Sonnewald, “Glucose metabolism and astrocyte-neuron interactions in the neonatal brain,” *Neurochem. Int.*, vol. 82, pp. 33–41, 2015.
- [63] R. Valdebenito, I. Ruminot, P. Garrido-Gerter, I. Fernandez-Moncada, L. Forero-Quintero, K. Alegria, H. M. Becker, J. W. Deitmer, and L. F. Barros, “Targeting of astrocytic glucose metabolism by beta-hydroxybutyrate,” *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2015.
- [64] R. M. Abrams and a a Hutchison, “Energy metabolism in the developing brain,” *Semin. Perinatol.*, vol. 3, no. 2, pp. 160–165, 1985.
- [65] S. Olivera-Bravo, A. Fernández, M. N. Sarlabós, J. C. Rosillo, G. Casanova, M. Jiménez, and L. Barbeito, “Neonatal astrocyte damage is sufficient to trigger progressive striatal degeneration in a rat model of glutaric Acidemia-I,” *PLoS One*, vol. 6, no. 6, pp. 1–10, 2011.
- [66] P. E. H. Reynolds, “Epilepsy : the disorder,” *WHO Rep.*, pp. 15–28, 2005.

- [67] B. Diehl and J. S. Duncan, “Temporal lobe epilepsy.,” *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, vol. 20, no. 5, p. 632, 2004.
- [68] R. Kalviainen, T. Salmenpera, K. Partanen, P. Vainio, P. Riekkinen, and A. Pitkanen, “Recurrent seizures may cause hippocampal damage in temporal lobe epilepsy,” *Neurology*, vol. 50, no. 5, pp. 1377–1382, 1998.
- [69] D. A. Coulter and C. Steinhäuser, “Role of Astrocytes in Epilepsy,” *Cold Spring Harb Perspect Med*, vol. 37, no. 11, pp. 1–16, 2016.
- [70] G. Seifert, G. Carmignoto, and C. Steinhäuser, “Astrocyte dysfunction in epilepsy,” *Brain Research Reviews*, vol. 63, no. 1–2, pp. 212–221, 2010.
- [71] G. Seifert, K. Schilling, and C. Steinhäuser, “Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective.,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 7, no. 3, pp. 194–206, 2006.
- [72] G. Seifert and C. Steinhäuser, “Neuron-astrocyte signaling and epilepsy,” *Experimental Neurology*, vol. 244, pp. 4–10, 2013.
- [73] J. Wetherington, G. Serrano, and R. Dingledine, “Astrocytes in the Epileptic Brain,” *Neuron*, vol. 58, no. 2, pp. 168–178, 2008.
- [74] U. Heinemann and H. Dieter Lux, “Ceiling of stimulus induced rises in extracellular potassium concentration in the cerebral cortex of cat,” *Brain Res.*, vol. 120, no. 2, pp. 231–249, 1977.
- [75] P. Kofuji and E. A. Newman, “Potassium buffering in the central nervous system,” *Neuroscience*, vol. 129, pp. 1045–1056, 2004.
- [76] D. Janigro, S. Gasparini, R. D’Ambrosio, G. McKhann, and D. DiFrancesco, “Reduction of K⁺ uptake in glia prevents long-term depression maintenance and causes epileptiform activity.,” *J. Neurosci.*, vol. 17, no. 8, pp. 2813–24, Apr. 1997.
- [77] M. Bikson, J. Lian, P. J. Hahn, W. C. Stacey, C. Sciortino, and D. M. Durand, “Suppression of epileptiform activity by high frequency sinusoidal fields in rat hippocampal slices.,” *J. Physiol.*, vol. 531, no. Pt 1, pp. 181–191, 2001.
- [78] R. D. D’Ambrosio, D. S. Gordon, H. R. Winn, C. Doganli, K. Kjaersorensen, C. Knoeckel, H. C. Beck, R. Nyengaard, B. Honoré, P. Nissen, A. Ribera, and C. Oxvig, “Differential Role of KIR Channel and Na⁺ / K⁺ - Pump in the Regulation of Extracellular K⁺ in Rat Hippocampus
Differential Role of KIR Channel and Na²⁺ / K²⁺ -Pump in the Regulation of

- Extracellular K² in Rat Hippocampus,” *J. Neurophysiol.*, vol. 98104, pp. 87–102, 2002.
- [79] G. Seifert, K. Hüttmann, D. K. Binder, C. Hartmann, A. Wyczynski, C. Neusch, and C. Steinhäuser, “Analysis of astroglial K⁺ channel expression in the developing hippocampus reveals a predominant role of the Kir4.1 subunit,” *J. Neurosci.*, vol. 29, no. 23, pp. 7474–88, 2009.
- [80] H. Higashimori and H. Sontheimer, “Role of Kir4.1 channels in growth control of glia,” *Glia*, vol. 55, no. 16, pp. 1668–1679, 2007.
- [81] Y. Nagao, Y. Harada, T. Mukai, S. Shimizu, A. Okuda, M. Fujimoto, A. Ono, Y. Sakagami, and Y. Ohno, “Expressional analysis of the astrocytic Kir4.1 channel in a pilocarpine-induced temporal lobe epilepsy model,” *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 7, no. July, pp. 1–10, 2013.
- [82] X. Tong, Y. Ao, G. C. Faas, S. E. Nwaobi, J. Xu, M. D. Haustein, M. a Anderson, I. Mody, M. L. Olsen, M. V Sofroniew, and B. S. Khakh, “Astrocyte Kir4.1 ion channel deficits contribute to neuronal dysfunction in Huntington’s disease model mice,” *Nat. Neurosci.*, vol. 17, no. 5, pp. 694–703, 2014.
- [83] A. Friedman, D. Kaufer, and U. Heinemann, “Blood-brain barrier breakdown-inducing astrocytic transformation: Novel targets for the prevention of epilepsy,” *Epilepsy Research*, vol. 85, no. 2–3. pp. 142–149, 2009.
- [84] P. R. Perillán, X. Li, E. a Potts, M. Chen, D. S. Bredt, and J. M. Simard, “Inward rectifier K(+) channel Kir2.3 (IRK3) in reactive astrocytes from adult rat brain,” *Glia*, vol. 31, no. 2, pp. 181–92, 2000.
- [85] V. Benfenati, M. Caprini, M. Dovizio, M. N. Mylonakou, S. Ferroni, O. P. Ottersen, and M. Amiry-Moghaddam, “An aquaporin-4/transient receptor potential vanilloid 4 (AQP4/TRPV4) complex is essential for cell-volume control in astrocytes,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 6, pp. 2563–8, 2011.
- [86] S. Strohschein, K. Hüttmann, S. Gabriel, D. K. Binder, U. Heinemann, and C. Steinhäuser, “Impact of aquaporin-4 channels on K⁺ buffering and gap junction coupling in the hippocampus,” *Glia*, vol. 59, no. 6, pp. 973–980, 2011.
- [87] H. Zhang and A. S. Verkman, “Aquaporin-4 independent Kir4.1 K⁺ channel function in brain glial cells,” *Mol. Cell. Neurosci.*, vol. 37, no. 1, pp. 1–10, 2008.

- [88] A. S. Verkman, “Aquaporins: translating bench research to human disease,” *J Exp Biol*, vol. 212, no. Pt 11, pp. 1707–1715, 2009.
- [89] S. Mylvaganam, M. Ramani, M. Krawczyk, and P. L. Carlen, “Roles of gap junctions, connexins, and pannexins in epilepsy,” *Frontiers in Physiology*, vol. 5 MAY. 2014.
- [90] M. M. Jin and Z. Chen, “Role of gap junctions in epilepsy,” *Neuroscience Bulletin*, vol. 27, no. 6, pp. 389–406, 2011.
- [91] J. E. Rash, T. Yasumura, F. E. Dudek, and J. I. Nagy, “Cell-specific expression of connexins and evidence of restricted gap junctional coupling between glial cells and between neurons,” *J. Neurosci.*, vol. 21, no. 6, pp. 1983–2000, 2001.
- [92] L. Venance, A. Rozov, M. Blatow, N. Burnashev, D. Feldmeyer, and H. Monyer, “Connexin expression in electrically coupled postnatal rat brain neurons,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 97, no. 18, pp. 10260–10265, 2000.
- [93] D. Fushiki, Y. Hamada, R. Yoshimura, and Y. Endo, “Phylogenetic and bioinformatic analysis of gap junction-related proteins, innexins, pannexins and connexins,” *Biomed. Res.*, vol. 31, no. 2, pp. 133–142, 2010.
- [94] T. Eid, A. Ghosh, Y. Wang, H. Beckström, H. P. Zaveri, T. S. W. Lee, J. C. K. Lai, G. H. Malthankar-Phatak, and N. C. De Lanerolle, “Recurrent seizures and brain pathology after inhibition of glutamine synthetase in the hippocampus in rats,” *Brain*, vol. 131, no. 8, pp. 2061–2070, 2008.
- [95] L. P. Bjørnsen, T. Eid, S. Holmseth, N. C. Danbolt, D. D. Spencer, and N. C. de Lanerolle, “Changes in glial glutamate transporters in human epileptogenic hippocampus: Inadequate explanation for high extracellular glutamate during seizures,” *Neurobiol. Dis.*, vol. 25, no. 2, pp. 319–330, 2007.
- [96] E. M. Ingram, J. W. Wiseman, S. Tessler, and P. C. Emson, “Reduction of glial glutamate transporters in the parietal cortex and hippocampus of the EL mouse,” *J. Neurochem.*, vol. 79, no. 3, pp. 564–575, 2001.
- [97] G. W. Mathern, D. Mendoza, A. Lozada, J. K. Pretorius, Y. Dehnes, N. C. Danbolt, N. Nelson, J. P. Leite, L. Chimelli, D. E. Born, A. C. Sakamoto, J. A. Assirati, I. Fried, W. J. Peacock, G. A. Ojemann, and P. D. Adelson, “Hippocampal GABA and glutamate transporter immunoreactivity in patients with temporal lobe epilepsy,” *Neurology*, vol. 52, no. 3, pp. 453–472, 1999.

- [98] E. a Proper, G. Hoogland, S. M. Kappen, G. H. Jansen, M. G. a Rensen, L. H. Schrama, C. W. M. van Veelen, P. C. van Rijen, O. van Nieuwenhuizen, W. H. Gispen, and P. N. E. de Graan, "Distribution of glutamate transporters in the hippocampus of patients with pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy.," *Brain*, vol. 125, no. Pt 1, pp. 32–43, 2002.
- [99] T. M. Desilva, N. S. Borenstein, J. J. Volpe, H. C. Kinney, and P. A. Rosenberg, "Expression of EAAT2 in neurons and protoplasmic astrocytes during human cortical development," *J. Comp. Neurol.*, vol. 520, no. 17, pp. 3912–3932, 2012.
- [100] N. A. Oberheim, S. A. Goldman, and M. Nedergaard, "Heterogeneity of Astrocytic Form and Function," vol. 814, pp. 23–45, 2012.
- [101] C. J. Müller, M. Bankstahl, I. Gröticke, and W. Löscher, "Pilocarpine vs. lithium-pilocarpine for induction of status epilepticus in mice: Development of spontaneous seizures, behavioral alterations and neuronal damage," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 619, no. 1–3, pp. 15–24, 2009.
- [102] K. D. Phelan, U. T. Shwe, D. K. Williams, L. J. Greenfield, and F. Zheng, "Pilocarpine-induced status epilepticus in mice: A comparison of spectral analysis of electroencephalogram and behavioral grading using the Racine scale," *Epilepsy Res.*, vol. 117, no. October, pp. 90–96, 2015.
- [103] R. Nakayama, T. Sasaki, K. F. Tanaka, and Y. Ikegaya, "Subcellular calcium dynamics during juvenile development in mouse hippocampal astrocytes," vol. 43, pp. 923–932, 2016.
- [104] A. J. Barker and E. M. Ullian, "New roles for astrocytes in developing synaptic circuits.," *Commun. Integr. Biol.*, vol. 1, no. 2, pp. 207–11, Jan. 2008.
- [105] J. L. Hauser, E. B. Edson, B. M. Hooks, and C. Chen, "Metabotropic glutamate receptors and glutamate transporters shape transmission at the developing retinogeniculate synapse.," *J. Neurophysiol.*, vol. 109, no. 1, pp. 113–23, Jan. 2013.
- [106] Y.-W. Wu, X. Tang, M. Arizono, H. Bannai, P.-Y. Shih, Y. Dembitskaya, V. Kazantsev, M. Tanaka, S. Itoharu, K. Mikoshiba, and A. Semyanov, "Spatiotemporal Calcium Dynamics in Single Astrocytes and Its Modulation by Neuronal Activity," *Cell Calcium*, Jan. 2014.
- [107] S. Vijayaraghavan, "Glial-neuronal interactions--implications for plasticity and drug addiction.," *AAPS J.*, vol. 11, no. 1, pp. 123–32, Mar. 2009.

- [108] G. Curia, D. Longo, G. Biagini, R. S. G. Jones, and M. Avoli, “The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy,” *J. Neurosci. Methods*, vol. 172, no. 2, pp. 143–157, 2008.
- [109] C. Y. Chiang, B. J. Sessle, and J. O. Dostrovsky, “Role of astrocytes in epilepsy,” *Neurochem. Res.*, vol. 37, no. 11, pp. 2419–2431, 2012.
- [110] O. Devinsky, A. Vezzani, S. Najjar, N. C. De Lanerolle, and M. A. Rogawski, “Glia and epilepsy : excitability and inflammation,” *Trends Neurosci.*, vol. 36, no. 3, pp. 174–184, 2013.