Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования

«Пермский государственный национальный исследовательский университет»

На правах рукописи

КУШНИРЁВА ЛИЛИЯ АЛЕКСАНДРОВНА

СИНАПТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА И МИТОХОНДРИЙ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА В НОРМЕ И ПРИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Специальность – 1.5.5 – физиология человека и животных

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

к.б.н., проф. Э.А. Коркотян

Нижний Новгород – 2023

оглавление

введени	4E4
ГЛАВА 1.	Обзор литературы12
1.1.	Синаптическая пластичность 12
1.2.	Эндоплазматический ретикулум и шипиковый аппарат 16
1.3.	Функции шипикового аппарата18
1.4.	Роль митохондрий в регуляции кальциевой сигнализации 22
1.5.	Роль митохондрий в поддержании синаптической пластичности 25
1.6.	Взаимодействия эндоплазматического ретикулума и митохондрий
1.7.	Нарушения функциональной связи ЭР и митохонлрий в контексте
болезни А	льцгеймера
ГЛАВА 2.	Материалы и методы исследования
2.1.	Получение первичных культур нейронов гиппокампа
2.2.	Трансфекция клеточной культуры 46
2.3.	Генотипирование
2.4.	Поведенческий эксперимент
2.5.	Иммуногистохимический анализ 49
2.6.	Анализ гибели клеток 50
2.7.	Визуализация
2.8.	Статистический анализ
ГЛАВА 3.	Результаты исследования и их обсуждение 54
3.1.	Исследование влияния белка пресенилина 1 и его мутантной формы
на выжива	аемость культивируемых нейронов гиппокампа

3.2. Исследование влияния белка пресенилина 1 и его мутантной формы на митохондриальную и клеточную морфологию, мембранный потенциал митохондрий и митохондриальные функции в культуре нейронов гиппокампа

5	7	
	1	

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Дендритные шипики представляют собой выросты на поверхности дендритов, которые функционируют как постсинаптический компонент нейронального синапса. Шипики способны изменять свои морфофункциональные характеристики в ответ на синаптическую активность, что лежит в основе феномена пластичности и имеет решающее значение для процессов обучения и памяти (Cummings et al., 1996; Segal et al., 2005; Yuste, 2010; Murakoshi, Yasuda, 2012). Эндоплазматический ретикулум (ЭР) является крупнейшей внутриклеточной органеллой нейронов, которая простирается от ядерной мембраны через аксон к пресинаптическим окончаниям и через дендриты - в зрелые дендритные шипики в виде гладких канальцев или изолированного шипикового аппарата (ША). Запасы Ca²⁺ в ЭР и ША играют важную роль в хранении и регуляции его высвобождения, что необходимо для синаптической реструктуризации. Заполненность ША Ca²⁺ влияет на временную динамику иона, его распределение в соседние участки дендрита и связывание с многочисленными Ca²⁺-регулируемыми сигнальными путями (Padamsey, Foster, Emptage, 2019). К истощению хранилищ ЭР (депо) чувствительны молекулы стромального взаимодействия (STIMs, stromal interaction molecules). Они кластеризуются возле истощенного участка хранилища, а затем вступают во взаимодействие с потенциал-независимым кальциевым каналом Orail, обеспечивая приток кальция (Bogeski, Kilch, 2012; Kraft, 2015). При наличии большого числа источников о функциях STIM/Orai в невозбудимых клетках, данные об их роли в центральных нейронах представлены скудно. Открытым также остаётся вопрос функциональной дифференциации двух изоформ кальциевых сенсоров: STIM1 и STIM2, экспрессирующихся в центральных нейронах. Ещё одним важным участником процесса заполнения/опустошения хранилищ является белок пресенилин.

Пресенилины 1 и 2 – две высокогомологичных изоформы пресенилина млекопитающих. Их мутации связанны примерно с 40% всех случаев семейной формы болезни Альцгеймера (БА) (Ти et al., 2006). Текущие исследования сфокусированы на их гамма-секретазной активности в мембранах, ассоциированных с митохондриями (МАМ), где они влияют на посттрансляционные модификации белка-предшественника амилоида (АРР) с образованием амилоида β . Согласно «гипотезе MAM» предполагается, что БА развивается в следствие нарушения ЭР-митохондриальных взаимодействий. В частности, исследования показывают повышенную экспрессию МАМзависимых белков в мозге людей и мышей с БА, вплоть до момента появления бляшек амилоида β , что фактически предшествует событиям в более распространенной «амилоидной гипотезе», которая до сих пор не привела к созданию эффективной терапии для лечения (Попугаева, Власова, Безпрозванный, 2014; Mitroshina, Kalinina, Vedunova, 2023). Пресенилины 1 и 2 играют ключевую роль во взаимодействиях между митохондриями и ЭР в синаптических контактах центральных нейронов, в том числе в нейронах синаптическая которого пластичность гиппокампа, лежит В основе определенных типов обучения и памяти (Zhuravin et al., 2019). Данные исследований показывают, что мутации в пресенилине 1 приводят к энергетическому дефициту, являющемуся ранним признаком нейродегенерации и болезни Альцгеймера (Du et al., 2010; Yu et al., 2018). Согласно имеющимся исследованиям, в области дендритного стержня, у основания содержатся продолговатые митохондриальные шипиков. скопления – митохондриальные кластеры, которые, возможно, обеспечивают локальный синтез белков и АТФ для снабжения постсинаптической области al., 2019). Кальциевые (Rangaraju et сигналы, генерируемые постсинаптическими мембранами, влияют как на его высвобождение из локальных хранилищ через рианодиновые канал-рецепторы (RyR), так и на захват, основанный на поступлении кальция внутрь. Комплекс перечисленных производства ATΦ нано-сигналов, вероятно, и определяет уровень

синаптическими митохондриями. Нарушения функциональной взаимосвязи между митохондриями и депо могут приводить к помехам в сигнальных путях, стимулирующих продукцию АТФ.

Выяснение молекулярных механизмов, лежащих в основе как нормального функционирования мозга, так и патогенеза нейродегенеративных заболеваний, в частности, БА, выявление новых молекулярных мишеней, отбор кандидатов в лекарственные препараты и их внедрение новых в повседневную практику в настоящее время является приоритетной задачей для физиологии и медицины (Vasilev et al., 2021; Salmina et al., 2022). Несмотря на то, что роль митохондрий нейронов в норме и при заболеваниях была тщательно исследована, принципы их регуляции посредством кальция остаются полностью неизученными. В настоящей работе с использованием культивируемых нейронов гиппокампа крысы исследуется влияние всплесков Ca²⁺ на кинетику митохондриальных процессов и их функциональное значение.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы являлось исследовать функциональное взаимодействие между ретикулярным кальциевым депо и митохондриями в норме, а также при индуцированной патологии альцгеймерного типа с помощью трансфекции геном мутантного пресенилина 1.

Исходя из поставленной цели решались следующие задачи:

- зарегистрировать изменения митохондриальных функций, следующих за кальциевыми событиями в контроле и при трансфекции геном мутантного пресенилина 1;
- выявить анатомическую и функциональную взаимосвязь между митохондриями и локальными кальциевыми депо;
- 3. охарактеризовать эффекты химических веществ, стимулирующих или подавляющих работу вышеописанных механизмов;
- исследовать причинно-следственную связь между флуктуациями Ca²⁺ в митохондриях и выработкой ими АТФ;

- экспериментально обосновать гипотезу о взаимосвязи между работоспособностью митохондрий и синаптической функцией в нейронах гиппокампа;
- продемонстрировать влияние поведенческой активности животных на Ca²⁺-регулируемые сигнальные пути.

Научная новизна

Впервые показаны локальные кальциевые сигналы в постсинаптических кластерах. митохондриальных Продемонстрирована связь между кальциевыми всплесками в локальных областях цитозоля и митохондриальной динамикой кальция. Указанное особенно важно, поскольку в литературных источниках присутствуют только математические модели подобных взаимодействий. Впервые исследована наноструктура ША И ИХ взаимодействие с механизмом восполнения запасов кальция в изолированных депо. Кроме того, продемонстрированы различия этого восполнения, опосредованного изоформами STIM1 и STIM2.

В работе демонстрируется влияние белка пресенилина 1 и его мутантной формы на динамику локальных кальциевых хранилищ. Показано, что мутантная форма пресенилина 1 выраженно снижает утечку кальция в МАМ, что отражается на снижении уровня кальциевых всплесков в митохондриях.

Продемонстрировано, что нарушение митохондриального кальциевого гомеостаза и мембранного потенциала оказывает влияние на выработку АТФ в дендритных постсинаптических микродоменах. Синаптический дефицит, вызванный митохондриальной дисфункцией, усугубляется в случае фармакологического воздействия повреждающими агентами различного механизма действия, связанными с образованием супероксидного радикала и митохондриальным разобщением.

Наконец, впервые продемонстрирован феномен взаимодействия ША и экспрессией ранних генов (*Arc*, *c-Fos*). Представленная работа связывает воедино функционирование элементов постсинаптической ультраструктуры и

генетическую экспрессию как в нормальных условиях, так и при патологии в нейронах гиппокампа.

Научно-практическая значимость исследования.

Полученные сведения расширяют и обновляют понимание механизмов синаптической пластичности, детализируя имеющиеся знания о молекулярной основе процессов обучения и памяти в отдельном синапсе в норме и патологии. В работе выдвигается принципиально новая гипотеза 0 первопричине нейродегенеративных процессов. Предполагается, ЧТО появление бляшек амилоида и тау-клубков отражает более продвинутые стадии нейродегенерации, тогда как их первопричиной являются локальные энергетические нарушения в зоне отдельных синапсов. Возникающий энергетический дефицит влечёт за собой дерегуляцию выработки АТФ, необходимого для обеспечивания потребностей каждого синапса. Такая динамическая рассогласованность проявляется в событиях миллисекундного диапазона и в объёмах менее одного кубического микрометра. Вследствие событий в этих временных и пространственных границах возникает энергетических дисбаланс, за которым следует элиминация отдельных синапсов, утрата пластичности шипиков и последующая нейродегенерация. В частности, на фоне сопутствующего дисбаланса Ca²⁺ происходит инициация апоптоза, морфологическая и функциональная дегенерации митохондрий, вероятно, приводящая, к выработке цитохрома С. Митохондрии прекращают выполнять свои функции, поскольку не получают достаточного объёма кальциевых сигналов, стимулирующих выработку АТФ, или напротив, Ca^{2+} переизбытком обременяются В результате взаимодействия с дисфункциональными хранилищами. Высказанная в работе гипотеза имеет несомненную клиническую значимость, а результаты исследования являются фундаментальной базой для разработки инновационных фармакологических симптомы нейродегенерации. агентов. призванных смягчить Ланные исследования используются в учебных курсах, читаемых магистрантам и

аспирантам -нейробиологам и нейрофармакологам Пермского государственного национального исследовательского университета.

Методология и методы исследования

Исследование выполнено применением стандартных с нейробиологических методик как на трансфицированных первичных культурах нейронов гиппокампа, так и на лабораторных животных *in vivo*. Визуализация спонтанной кальциевой активности нейронов гиппокампа и структурных компонентов производилась с помощью методов конфокальной флуоресцентной микроскопии. Некоторые данные экспериментов, проведённых *in vitro* верифицировались в поведенческих экспериментах, в частности, для контроля экспрессии генов. Для иммуногистохимического этапа исследований использовались культура нейронов крыс и коронарные срезы головного мозга мышей.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Белок пресенилин 1 регулирует уровень кальция в локальных депо, примыкающих к областям МАМ. Мутантная форма пресенилина 1 влияет на амплитуду и частоту кальциевых всплесков в постсинаптических митохондриях нейронов. Помехи в Ca²⁺-зависимых сигнальных путях оказывают влияние на локальную продукцию АТФ. Кроме того, сигнальный дефицит в митохондриях приводит к изменению их морфофункциональных характеристик.

2. Фармакологические агенты, воздействующие на секрецию кальция и функциональный статус митохондрий влияют на взаимодействие между ША и МАМ. Результатом являются изменения в амплитуде и частоте кальциевых событий в митохондриях. Утрата контроля над флуктуациями кальция в дендритах приводит не только к функциональным, но и к морфологическим сдвигам. В частности, наблюдается массивный рост незрелых отростков на поверхности дендритов. Вслед за этим развиваются признаки нейродегенерации, завершающиеся гибелью клеток.

3. В условиях генетической абляции ША в ответ на поведенческую стимуляцию наблюдается повышенная экспрессия раннего гена *Arc* в гиппокампе трансгенных животных, что обусловлено изменениями концентрации внутриклеточного Ca^{2+} . Снижение доступности Ca^{2+} в результате отсутствия ША функционально подобно состоянию нейронов гиппокампа, трансфицированных мутантной формой пресенилина 1, что верифицирует *in vivo* результаты, полученные в данной работе в условиях *in vitro*.

Личный вклад автора

Научные положения и выводы работы базируются на результатах собственных исследований автора. Эксперименты, обработка, интерпретация результатов и статистический анализ проведены автором собственноручно. Совместно с научным руководителем был произведён выбор темы исследования, постановка задач, обсуждение полученных результатов и подготовка результатов проведенного исследования к публикациям и их представление на научных конференциях.

Достоверность научных результатов

Достоверность научных результатов подтверждается воспроизводимостью экспериментальных данных и высокой статистической обусловлена надёжностью мощностью, a также современных экспериментальных исследования методов И согласованностью с результатами независимых исследований других авторов.

Апробация работы

Основные положения диссертации доложены на: мини-симпозиуме молодых ученых «Нейрофармакология и поведение» (Реховот – Санкт-Петербург – Пермь, 16 мая 2022 г.), 15-ой международной конференции AD/PDTM (Alzheimer's and Parkinson's Diseases and related neurological disorder) 2021 (9 – 14 марта 2021, онлайн), 16-ой международной конференции AD/PDTM 2022 (15 – 20 марта, 2022, онлайн), 30-м ежегодном собрании Израильского сообщества нейронаук (4-6 December 2022, Эйлат, Израиль).

Совместно с научным руководителем опубликована глава под названием «Взаимодействие митохондрий и эндоплазматической сети в центральных нейронах» в печатном издании «Updates on Endoplasmic Reticulum» (2022, IntechOpen, London), являющимся рекомендованным учебным пособием для магистрантов и аспирантов -нейробиологов Пермского государственного национального исследовательского университета (см. акты внедрения).

Публикации

По теме научно-квалификационной работы опубликовано 12 печатных работ, из них 8 статей в журналах, входящих в международные системы научного цитирования Scopus и Web of Science, 3-е тезисов в сборниках международных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы, посвящённой материалам и методам исследования, главы описания и обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, приложений. Работа изложена на 140 страницах, содержит 41 рисунок и 2 приложения. Список литературы содержит 152 источника.

Конкурсная поддержка

Грант для иностранных студентов Института им. Вейцмана, г. Реховот, Израиль.

Благодарности

Автор благодарит проф. Эдуарда Коркотяна за неоценимый вклад в развитие нейробиологии в стенах ПГНИУ, за идеи исследований, помощь в проведении экспериментов, конструктивную критику и замечания при подготовке диссертации.

Автор благодарит проф. Менахема Сегала за конструктивные комментарии при подготовке диссертации и помощь в изготовлении клеточных культур.

Автор благодарит проф. Семьянова Алексея Васильевича за помощь в освоение методов нейробиологических исследований.

ГЛАВА 1. Обзор литературы

1.1. Синаптическая пластичность

Дендритные шипики представляют собой выросты на поверхности дендритов, которые функционируют как постсинаптический компонент нейронального синапса. Морфологическими признаками функционирующего шипика является головка и шейка, при этом головка может вплотную подходить к пресинаптической аксонной терминали, а шейка соединяет головку с постсинаптическим дендритом. Размер и форма шипика, а также количество шипиков на дендрите широко варьируют. Шипики пластичны и способны изменять свои морфофункциональные особенности в ответ на повторяющуюся синаптическую активность, что лежит В основе синаптической пластичности и поэтому имеет решающее значение для таких процессов, как обучение и память (Cummings et al., 1996; Segal et al., 2005; Yuste, 2010; Murakoshi, Yasuda, 2012). Изменения в форме, размере, распределении, потере и увеличении количества дендритных шипиков связаны с целым рядом заболеваний человека, хотя механизмы, которые их обуславливают, остаются недостаточно изученными (Yuste, 2001; Penzes et al., 2011).

Функционально дендритные шипики являются местами интенсивной биохимической активности, при этом сигналы, поступающие от синапсов через ионотропные глутаматные рецепторы, такие, как рецепторы N-метил-D-аспартата (NMDAR), рецепторы α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты (AMPAR) и каинатные рецепторы, приводят к притоку основных вторичных мессенджеров - ионов кальция (Ca²⁺) (Popov et al., 2017). Хотя одиночное событие в синапсе, активирующее рецептор, вызывает временный приток кальция, повторная активация рецептора влечёт за собой быстрое увеличение его концентрации, что приводит к связыванию Ca²⁺ с кальциевыми буферами, такими как кальций-связывающий белок кальмодулин (CaM), затем следует биохимическая активации кальмодулин-зависимой протеинкиназы II (CaMKII) для последующей передачи сигналов

(Lisman et al., 2002). В целом, высокие концентрации кальция в шипиках связаны с долговременной потенциацией (ДВП), тогда как низкие концентрации кальция связаны с длительной депрессией (ДВД) (Huganir et al., 2013). Таким образом, динамика Са²⁺ в дендритных шипиках является ключевым механизмом индукции синаптической пластичности в нейронах. Концентрация кальция в шипиках дендритов строго регулируется (Yuste, Denk, 1995; Svoboda, Tank, Denk, 1996; Yuste, Majewska, Holthoff, 2000) по амплитуде и времени притока через рецепторы. Последующий учёт молекул кальция происходит благодаря связыванию или разъединению с белками, буферами и насосами, а также с помощью органелл, которые могут секвестрировать или высвобождать кальций, таких как эндоплазматический ретикулум и расширение гладкого ЭР (гЭР) в шипик, называемое шипиковым аппаратом, которое проникает в шею или даже в головку шипика (Yuste, 2010; Holbro et al., 2010; Higley, Sabatini, 2012; Kraft, 2015).

ДВП и ДВД связаны с увеличением и уменьшением объема шипика соответственно. Как функциональная, так и структурная пластичность требуют притока Ca²⁺ через постсинаптические NMDAR, активации CaMKII для встраивания субъединиц рецепторов глутамата (GluR), малых гуанозинтрифосфатаз (GTPase) и полимеризации актина (Nishiyama, Yasuda, 2015).

Локальное нацеливание синтеза мРНК и белков для увеличения размера активных шипиков осуществляется с помощью специфического механизма синаптического мечения и захвата (СМЗ): индукция ДВП создает в потенцированных синапсах «метку», способную захватывать белки, связанные с пластичностью (PRPs, *plasticity related proteins*), в том числе гомолог белка Homer (Homer 1a) и Arc. Известно, что мРНК и белок Arc накапливаются в дендритных областях, которые получают высокочастотные синаптические входы (Okuno et al., 2012). Накопление Arc в дендритах, вызванное обучением или стрессом, имеет решающее значение для пластичности и консолидации памяти (Kedrov, Durymanov, Anokhin, 2019).

Homer 1a, постсинаптический каркасный белок, привлекается из сомы в стимулированный шипик. Синаптической меткой может быть временное морфофункциональное состояние синапса, которое представлено комплексом белков во взаимодействии со структурами актинового цитоскелета. Например, ЛВП образование стабильного известно, что вызывает пула полимеризованного (фибриллярного) F-актина, который может являться синаптической меткой. Однако эта метка также обнаруживается и в нестимулированных шипиках. Например, после ДВП Arc накапливается в нестимулированных шипиках и исключается из потенцированных. Кроме количество синаптического Arc отрицательно того. коррелирует с количеством встроенных субъединиц GluA1 в синапсах и способствует эндоцитозу AMPAR. Вполне вероятно, что это обратное синаптическое мечение помогает поддерживать контраст синаптического веса между активными и неактивными шипиками в областях с высокой синаптической пластичностью, таких как гиппокамп (Okuno et al., 2012; Nishiyama, Yasuda, 2015). Этот механизм особенно привлекателен, когда шипики расположены близко друг к другу и являются частью одного и того же функционального синаптического кластера, поскольку известно, что морфофункциональные изменения коррелируют между соседними шипиками. Так, снижение порога индукции ДВП затухает на протяжении ~10 мкм дендритной ветви, а в молодых нейронах повторное выделение глутамата из пресинаптической терминали снижает порог индукции в прилегающей области до нескольких минут (Nishiyama, Yasuda, 2015). Предполагается, что внутрикластерная дифференцировка синапсов также необходима для структурной пластичности. Например, после индукции ДВП активность ГТФаз Ras И Rho на ~5–10 МКМ распространяется ВДОЛЬ дендрита с возможностью проникновения в соседние шипики. Кроме того, единичная пиковая активность может запускать молекулярную передачу сигналов с участием активируемой посредством Ca²⁺-кальмодулина серин-треониновой фосфатазы кальцинейрина (CaN), инозитол-1,4,5-трисфосфатного рецептора (IP3R) и

метаботропного глутаматного рецептора 1 (mGluR1), которые действуют на соседние шипики (Lu, Zuo, 2017). Возможно, что Arc-зависимая депотенциация нецелевых шипов помогает демаркировать соседние шипики для точного захвата PRPs.

Механизм, события связывающий локальные синаптические В отдельных шипиках и сигналы, поступающие в ядро, включает такие транскрипции, как белок, присоединяющийся к цАМФрегуляторы регулируемому участку (CREB, cAMP response element-binding protein) и синапто-ядерный белок-мессенджер Jacob, которые транслоцируются в ядро в ответ на синаптическую активность. После активации NMDAR Jacob фосфорилируется и диссоциирует от шипиков, перемещаясь в ядро импортинзависимым образом. Присутствие фосфорилированного Jacob в ядре увеличивает фосфорилирование CREB, индуцируя экспрессию генов цАМФзависимых элементов (CRE-зависимых генов, CRE, cAMP response elements), которые участвуют в генерации белковой метки только в потенцированных синапсах (Nishiyama, Yasuda, 2015). Однако такая метка, скорее всего, представляет собой не столько комплекс белковых молекул, сколько кратковременную реконфигурацию цитоскелета шипика за счет активности CaMKII, включая перестройку постсинаптической плотности (PSD, AMPAR. Bo postsynaptic *density*) ДВП, И количества время аутофосфорилированная форма CaMKII остается активной в PSD даже после того, как концентрация Ca²⁺ возвращается к исходному уровню, и такой меченый синапс способен захватывать PRP. Если меченый синапс стабилизирует свою новую структурную конформацию до того момента, когда состояние маркировки исчезнет, он, таким образом, сохранит изменение своей синаптической эффективности. Эта гипотеза подтверждается экспериментами, в которых ингибирование аутофосфорилирования CaMKII разрушает метку, влияя на структурную, но не на раннюю функциональную пластичность синапса (Redondo, Morris, 2011).

Мы также можем рассматривать сам ША, как потенциальную метку функционально улучшенных синапсов, как это сделали Ostroff и др., (2017) показав, что наличие ША в крупных шипиках коррелирует с наличием полирибосом в их головках после обучения. Это указывает на высокую степень пространственной специфичности трансляции в дендритах. Накопление полирибосом в головках крупных шипиков отражает механизм усиления трансляции при обучении, демонстрируя связь между структурной пластичностью и консолидацией памяти (Ostroff et al., 2017).

1.2. Эндоплазматический ретикулум и шипиковый аппарат

Эндоплазматический ретикулум является крупнейшей внутриклеточной органеллой нейронов. Он простирается от ядерной мембраны через аксон к пресинаптическим окончаниям и через все дендритные ветви, проникая в некоторые дендритные шипики в виде тонких гладких канальцев или их отростков шипикового аппарата (Verkhratsky, 2005). ЭP В виде дифференцируется на гладкий и шероховатый, или рибосомальный, рЭР. Оба типа ЭР выполняют множество клеточных функций, включая синтез и транспорт основных внутриклеточных молекул. Однако наиболее загадочной и наименее изученной функцией ЭР является хранение и передача сигналов Са²⁺ из ША, который расположен в основном в зрелых, грибовидных дендритных шипиках (Padamsey, Foster, Emptage, 2019). ША - небольшая многослойная пластинчатая структура, иногда соединенная с гЭР в дендритном стволе тонкой трубкой, проходящей через шейку шипика (Ророу et al., 2005). Локализация ША зависит от синаптической активности (Padamsey, Foster, Emptage, 2019). Около 80 % крупных дендритных шипиков имеют объёмный ША, в то время как мелкие тонкие (незрелые) шипики содержат его только в 20% случаев (Popov et al., 2005). Чаще сеть гЭР доходит только до шейки шипика или полностью отсутствует в нём (Popov et al., 2005; Wu et al., 2017). Было показано, что цитоплазма шипика состоит из актина и актин-регуляторных белков, продольно расположенных в шейке шипика и организованных в плотную решетку, окружающую гЭР или же ША в головке

шипика (Frotscher et al., 2014). Маркером ША является актин-модулирующий белок синаптоподин (SP) (Vlachos, 2012; Rosado et al., 2022). Имеются противоречия в исследованиях с использованием электронной микроскопии (ЭМ), которые не позволяют однозначно ответить на вопрос: является ли ША структурой, производной ОТ ЭP, свидетельствующей автономной 0 завершающей стадии «зрелости» шипика, и тогда все другие включения ЭР в шипик являются лишь промежуточными стадиями, либо формирование ША происходит независимо от включения в шипик непрерывного компартмента ЭР, и, в таком случае, они могут сосуществовать (Popov et a., 2005; Ostroff et a., 2010; Korkotian, Frotscher, Segal, 2014; Wu et al., 2017; Perez-Alvarez et. al., 2020; Sree et al., 2021; Ofer et al., 2021). Тем не менее, растет число исследований, в которых ША упоминается как один из главных участников регуляции синаптической пластичности и механизмов обучения и памяти (Deller et al., 2007; Vlachos, 2012; Vlachos et al., 2013; Korkotian, Frotscher, Segal, 2014; Maggio, Vlachos, 2014; Segal, Korkotian, 2016; Jedlicka, Deller, 2017). Известно, что SP-положительные (SP⁺) шипики демонстрируют более сильную реакцию на высвобождение глутамата из пресинаптической терминали, чем SP-отрицательные (SP⁻). Кроме того, SP опосредует накопление GluR1-субъединицы AMPA-рецептора в головках шипиков (Vlachos et al., 2009), а SP-ассоциированные запасы Ca²⁺ в форме ША играют важную роль в хранении и регуляции высвобождения Ca²⁺, необходимого для пластичности нейронов. Нейроны гиппокампа у молодых мышей с нокаутом по гену SYNPO (SPKO, SYNPO knockout) лишены ША и снижают ДВП, не решают когнитивные задачи и утрачивают пространственную память.

ЭР является основной внутриклеточной органеллой, ответственной за накопление запасов и управление цитозольной концентрацией кальция ([Ca²⁺]_c) как в нейронах, так и в ненейрональных клетках (Verkhratsky, 2005; Zalk, Lehnart, Marks, 2007; Гордлеева, Матросов, Казанцев, 2012). Высвобождение кальция из ЭР важно в тех случаях, когда приток ионов кальция из внеклеточного пространства недостаточен для повышения [Ca²⁺]_c

до уровня, необходимого для активации фосфорилирования кальцийзависимых белков, или в случаях, когда нет достаточного количества кальциевых каналов на плазматической мембране, что встречается, например, в ювенильных нейронах. К истощению кальция из хранилищ (депо) ЭР чувствительны молекулы стромального взаимодействия (STIMs, stromal interaction molecules). Они скапливаются возле истощенного внутриклеточного хранилища, а затем перемещаются к плазматической мембране (ПМ), где взаимодействуют с потенциал-независимым кальциевым каналом Orail, обеспечивая приток кальция в хранилище, восполняя его (Bogeski, Kilch, 2012; Kraft, 2015). Взаимодействие комплекса Ca²⁺-депо/STIM/ Orai широко изучено на не-нейрональных клетках, и его нарушение связывают с различными иммунологическими заболеваниями (Lee et al., 2016). В сравнении с обширной литературой о функциях STIM/Orai в невозбудимых клетках, имеется лишь скудное количество информации об их роли в центральных нейронах. Известно, что STIM и Orai локализуются в тканях головного мозга (Skibinska-Kijek et al., 2009; Segal, Korkotian, 2016), a STIM1/Orai1 могут быть преобразованы из диспергированной формы в точечную при истощении запасов кальция, индуцированного тапсигаргином (Klejman et al., 2009). Также они играют важную роль в регуляции подвижности конусов роста аксонов (Mitchell et al., 2012), в регуляции потенциалзависимых кальциевых каналов (Park, Shcheglovitov, Dolmetsch, 2010) и в пагубных последствиях хронической эпилепсии (Ryskamp et al., 2019) и окислительного стресса (Henke et al., 2013). Однако функциональная дифференциация двух форм STIM: STIM1 и STIM2, экспрессирующихся в центральных нейронах, до сих пор была неясна. Некоторые исследования лишь позволили предположить, что STIM2 является доминирующим видом в нейронах гиппокампа (Sun et al., 20014; Zhang et al., 2015).

1.3. Функции шипикового аппарата

Накопление кальция в постсинаптических окончаниях лежит в основе синаптической передачи, управляя широким спектром механизмов

синаптической пластичности для эффективного обучения и памяти. Возбуждающие или тормозные входы приводят к дифференцированному Ca^{2+} локальному увеличению В дендритных шипиках, которые функционируют как единицы биофизических и биохимических вычислений в нейроне, регулируя их продолжительность и распределение (Leung et al., 2021). Являющийся продолжением гЭР, ША регулирует медленную и быструю динамику кальция в шипиках, участвуя во многих сигнальных функциях, таких как кальциевая регуляция, синтез белка и клеточный апоптоз. Объем хранилища ША влияет на временную динамику Ca²⁺, его распределение в соседние участки дендрита и связывание с многочисленными Ca²⁺-регулируемыми сигнальными путями (Padamsey, Foster, Emptage, 2019). Объем ША положительно коррелирует с общим объемом шипика (Rosado et al., 2022), с размером головки шипика (что косвенно подтверждается в экспериментах с СП) (Vlachos et al., 2009) и может увеличиваться за счет активности NMDAR (Padamsey, Foster, Emptage, 2019). Отсутствие ША приводит к снижению ДВП гиппокампа в области СА1 и нарушениям пространственного обучения (Deller et al., 2003). ША облегчает процесс индуцированного кальцием высвобождения кальция (CICR, calcium-induced calcium release), посредством которого ионы кальция, проникшие в дендритный шипик благодаря синаптической активности, вызывают высвобождение дополнительного кальция из внутриклеточных запасов кальция. Так, активация постсинаптических NMDAR глутаматом в нейронах области СА1 гиппокампа запускает активацию рианодиновых рецепторов (RyR) и CICR из хранилища. Этот выброс Ca²⁺ обычно ограничивается головкой шипика (Padamsey, Foster, Emptage, 2019), однако способен распространяться и дальше по дендриту, проникая в соседние шипики, особенно в молодых нейронах (Lee et al., 2016). Так, в молодых (P8-P17) тканях постсинаптические RyR CA3-CA1 областей гиппокампа опосредуют распространяющийся сигнал Ca²⁺ от активных синапсов, запускаемый

NMDAR-опосредованным притоком Ca^{2+} в дендрит и соседние коактивные синапсы, снижая их индукционный порог пластичности (Lee et al., 2016).

Время активации CICR, порядка нескольких десятков миллисекунд, определяется самыми быстрыми ионами кальция, достигающими RyR путем диффузии. Моделирование показывает, что RyR расположены в ША у основания шейки шипика, и их активация запускается связыванием двух ионов Ca²⁺, которые перемещаются от головы к шейке внутри цитоплазмы шипика и генерируют поток кальция из ША вниз, в дендритный стержень, что подтверждается экспериментально (Basnayake et al., 2019). Иммунологические эксперименты также показывают совместную локализацию SP и RyR в ША (Vlachos et a., 2009). RyR – опосредованный CICR из депо может привести либо к ДВП, либо к ДВД, в зависимости от характера синаптической активности. Механизмы ДВП и ДВД лежат в основе синаптической пластичности и требуют увеличения постсинаптической концентрации [Ca²⁺]_c. Кофеин, высвобождающий Ca²⁺ из депо, увеличивает число активных AMPAR, тем самым усиливая функцию синапсов в культурах нейронов гиппокампа (Vlachos et a., 2009) и индукцию ДВП, как было показано на срезах гиппокампа (Segal, 2005; Grigoryan, Segal, 2016). В дополнение к ДВП, RyR также способствуют ДВД, а их генетическая абляция ингибирует вызванную низкочастотной стимуляцией ДВД в той же области мозга (Vlachos et al., 2009). Кроме того, было показано, что индуцированный глутаматом рост новых шипиков в коре ГМ также опосредуется высвобождением Ca²⁺ из ЭРхранилищ (Kwon, Sabatini, 2011).

Помимо RyR, высвобождение кальция из ША усиливается за счет активации IP3R, которыми богаты дендритные ответвления (Vlachos et al., 2009). Активация mGluR1 на ПМ вызывает повышение концентрации инозитолтрифосфата через фосфолипазу С (PLC). Это, в свою очередь, усиливает высвобождение Ca²⁺ из депо в цитоплазму за счет стимуляции IP3R на мембранах ЭР. Активация IP3R может распространять кальциевую волну

вдоль дендритного сегмента или ограничиваться постсинаптическими микродоменами, в зависимости от уровня окружающего инозитолтрифосфата в цитоплазме. IP3R может коактивироваться внутриклеточным Ca^{2+} , и эти два механизма, RyR-опосредованный CICR и IP3R-индуцированное высвобождение Ca^{2+} из ЭР-хранилищ, способны к взаимному усилению (Yousuf et al., 2020).

В ЭР хранилищах Ca²⁺ связывается с кальций-связывающими белками (CBP, calcium-binding proteins), такими как кальнексин и кальретикулин. Каждый CBP связывается с несколькими ионами Ca²⁺ с низким сродством и высокой емкостью для того, чтобы экспортеры могли легко отделить Ca²⁺ от СВР. Депо также поддерживает концентрацию свободного Ca²⁺, которая определяет движущую силу его высвобождения. Для компенсации истощения пула Ca²⁺ его накопление в ЭР осуществляется за счет использования Ca²⁺насосов семейства сарко/ЭР Са²⁺-АТФаз (SERCA) совместно с депоуправляемым кальциевым входом (SOCE, store-operated calcium entry) через депо-управляемые кальциевые каналы (SOCs, store-operated channels). Функционирование SOC зависит от концентрации Ca²⁺ внутри депо и кальретикулина, на долю которого приходится почти половина общего связывания Ca²⁺ в ЭР. Кальретикулин действует не только как Ca²⁺-буфер, но также как шаперон и регулятор насосов SERCA. Истощение запасов кальция в ЭР определяется STIM, которые диффузно распределены на мембране ЭР в состоянии покоя. Когда хранилище опустевает, трансмембранные кальциевые накапливаются на мембране истощенного ЭР-депо. сенсоры STIM ближайшего к ПМ, где активируют Orai, обеспечивая приток Ca²⁺ в депо, чтобы пополнить его (Yousuf et al., 2020). На первом этапе каналы Orail перекачивают Ca²⁺ из внеклеточной среды в цитоплазму, после чего он поступает в ША через насосы SERCA, расположенные в основном в головном отделе ША (Basnayake et al., 2019). STIM1 и STIM2, обнаруженные в нервной ткани, по-видимому, связаны с разными функциями в развивающихся и зрелых нейронах, хотя оба связаны с каналом Orai. Ингибирование насосов

SERCA тапсигаргином приводит к медленной утечке Ca^{2+} из ЭР, стимулируя олигомеризацию STIM1 и образование комплексов STIM1/Orai1, а антагонисты STIM/Orai-зависимого SOCE снижают ДВП в нейронах гиппокампа. Синаптическая активность имеет решающее значение для поддержания морфологии зрелых дендритных шипиков, так как блокада синаптической активности с помощью тетродотоксина (TTX, Sokolov, Mukhina, 2022) вызывает связанное с STIM увеличение спонтанных кальциевых всплесков и уменьшение доли зрелых шипиков по сравнению с долей незрелых филоподий (Chen, Chen, Shen, 2019; Kushnireva et al., 2021).

Комплекс STIM/Orai также изучается В контексте развития нейродегенеративных заболеваний, в частности болезни Альцгеймера. STIM1 и STIM2 участвуют в поддержании гомеостаза Ca²⁺ в нейронах и участвуют в продукции бета-амилоидного пептида (А*β*), который накапливается при БА. Сверхэкспрессия этих белков может инициировать патологическую SOCЕ-зависимых механизмов, активацию деактивацию ИЛИ нарушая синаптическую передачу и тем самым стимулируя нейродегенеративные механизмы (Majewski et al., 2020).

Повышение концентрации Ca^{2+} в головке шипика вследствие синаптической стимуляции сопровождается выраженным истощением кальциевого резервуара ША менее чем за десятки миллисекунд за счет лавинообразного высвобождения кальция в основании шипика, и для следующего цикла передачи сигналов требуется его пополнение. Однако остаётся неясным, какими механизмами достигается это пополнение (SOCE) в шипиках, не вызывающее при этом высвобождения кальция (CICR). Решение этого противоречия имеет решающее значение не только для определения вычислительной мощности дендритных шипиков на основе передачи сигналов Ca^{2+} , но также и для характеристики динамики Ca^{2+} , лежащей в основе индукции ДВП и ДВД.

1.4. Роль митохондрий в регуляции кальциевой сигнализации

Митохондрии играют важную роль в передаче сигналов Ca²⁺ в нейронах. Они обладают буферной способностью для связывания Ca²⁺, которая возникает из-за их сильно гиперполяризованной мембраны. Значения мембранного потенциала функционирующих митохондрий в культуре нейронов коры ГМ крысы варьируют в пределах ≈100 – ≈160 мВ (Gerencser et al., 2012). МtMP обеспечивает быстрый перенос Ca²⁺ через ВММ по его электрохимическому градиенту в органеллу с помощью митохондриального кальциевого унипортера (MCU), несмотря на низкое сродство последнего к ионам Ca²⁺. Митохондриальный матрикс накапливает высокие уровни Ca²⁺ как во время глобальных сигналов Ca²⁺, так и в ответ на умеренное локальное увеличение [Ca²⁺]_c (Chamberland, Moratallaab, Topolnik, 2019). Это поглощение уравновешивается оттоком Ca²⁺ через Na⁺/Ca²⁺ антипортер или, реже, через пору перехода проницаемости митохондрий (mPTP). Эти пути также чувствительны к деполяризации митохондриальной мембраны (Chamberland, Moratallaab, Topolnik, 2019; Vianello et al., 2012). Небольшие преходящие митохондриальные деполяризации отражают митохондриальную буферную уровнем $[Ca^{2+}]_c$. высоким Согласно активность В микродоменах с исследованиям в изолированных митохондриях, поглощение 17 мкМ Ca²⁺ вызывает деполяризацию митохондрий на 2-3 мВ (Duchen, Leyssens, Crompton, 1998), в то время как гораздо большая потеря MtMP сопровождается открытием mPTP, неселективных пор во внутренней митохондриальной мембране. Через них может проникнуть любая молекула массой менее 1500 Да, что может привести к повышению осмотического давления, набуханию митохондрий и последующему разрыву наружной мембраны или истощению веществ матрикса, в т.ч. и Ca²⁺ (Vos, Lauwers, Verstreken, 2010). Временное открытие поры может быть вызвано перегрузкой Ca²⁺ и характеризуется разобщением цепи окислительного фосфорилирования, что приводит к снижению продукции АТФ (Митрошина и др., 2017), но обратимо при восстановлении клеточного гомеостаза. Напротив, постоянное открытие mPTP запускает митохондриально-опосредованный апоптоз за счет

высвобождения цитохрома С (Vianello et al., 2012; Yousuf et al., 2020). Митохондрии способны буферизовать около 75 мкМ Ca²⁺ до его высвобождения, и эта точка максимальной буферизации, по-видимому, зависит от скорости поглощения Ca²⁺. Быстрая деполяризация митохондрий также приводит к последующему высвобождению кальция (Levy et al., 2003). Интересно, что содержание Ca²⁺ в митохондриях ([Ca²⁺]_m) обратно митохондрий. пропорционально скорости движения Подвижные митохондрии, как правило, имеют более низкий сигнал [Ca²⁺]_m, однако уровни [Ca²⁺]_т не влияют на направление движения, и не было показано различий в [Ca²⁺]_т между антероградным и ретроградным движением митохондрий. Митохондриальная подвижность на основе микротрубочек управляется уровнями [Ca²⁺]_с, однако прямой приток Ca²⁺ в митохондриальный матрикс через MCU, опосредованный Miro1, также способен изменять митохондриальную подвижность. В экспериментах с мутациями в Miro1 структурных Ca²⁺ -связывающих доменах под названием EF-руки (EF-hand) движение митохондрий не прекращалось, несмотря на повышение уровня [Ca²⁺]_с. Блокирование MCU также позволяло сохранять митохондриальное движение даже в присутствии высоких уровней [Ca²⁺]_с, но только частично, указывая на то, что [Ca²⁺]_с вносит значительный вклад в митохондриальную подвижность. Miro1 может изменять уровень притока Ca²⁺ в митохондрии, действуя как сенсор [Ca²⁺]_с, подобно STIM на мембранах ЭР, влияя на количество притока Ca²⁺ в митохондрии и их скорость, которая может регулироваться количеством белка Mirol, связанного с кинезиновыми моторами в конкретный момент времени, при этом как только концентрация $[Ca^{2+}]_{m}$ достигает критического уровня, взаимодействие Miro1 С кинезиновыми комплексами разрушается и митохондрии останавливаются. Приток Ca²⁺ в митохондрии увеличивает продукцию АТФ за счет активации цикла трикарбоновых кислот (TCA), а также повышает активность ферментов электрон-транспортной цепи и комплекса АТФ-синтазы, так что в конечном итоге остановка митохондрий выгодна вблизи синаптических областей

(Chang, Niescier, Min, 2011). Стабильные постсинаптические митохондрии также обеспечивают АТФ-зависимые механизмы пластичности, локальную рибосомозависимую трансляцию белков на основе мРНК (Rangaraju et al., 2019), возможно привлекаемую локальными градиентами Ca²⁺. Отдельные митохондрии даже способны проникать в зрелые шипики с большим объемом головы и ША, где они, возможно, подпитывают локальные механизмы трансляции (Li et al., 2004; Sheng, Cai, 2012).

1.5. Роль митохондрий в поддержании синаптической пластичности

Развитие, созревание и поддержание функционирующих синапсов требуют поддержания ионного баланса, протеостаза и модификации синаптических протеомов за счет значительных затрат энергии (Rangaraju et al., 2019). Большое значение для пластичности имеет локальная специфичность этих процессов, имеющая преимущество по сравнению с эгенерализованной доставкой белков сомы. Чтобы удовлетворить ИЗ глобальные и локальные потребности в энергии, клетки регулируют митохондриальное движение, деление, слияние и «парковку» митохондрий в каждой области клетки. Нейрональные митохондрии играют решающую роль в поддержании синаптических функций, в частности, обеспечивая локальную трансляцию как в базовых условиях, так и при процессах пластичности (Spillane et al., 2013; Rangaraju et al., 2019; Rajgor, Welle, Smith, 2021). B изящном исследовании Rangaraju и др. (2019) из лаборатории Шумана использовались ингибиторы АТФ, местное ингибирование митохондриальных компартментов и визуализация вновь синтезированных белков для того, чтобы трансляция обеспечивается показать. что локальная локальными митохондриальными кластерами. Трансляция белков, необходимых для морфологической пластичности, происходит с мРНК, локализованных вблизи синапсов. Так, индуцированная глутаматом ДВП не устанавливалась в участках, содержащих нефункционирующие митохондрии, что морфологические предотвращало характерные лля ЭТОГО механизма

изменения. Кроме того, в областях без митохондрий наблюдалось значительное снижение синтеза белка по сравнению со стимулированными областями с функциональными митохондриями, хотя на базовых уровнях активности нейронов энергетические потребности локальной трансляции адекватно удовлетворялись глобальными уровнями АТФ, доступными в дендрите, или АТФ, продуцируемым соседними функционирующими митохондриями (Rangaraju et al., 2019).

Колебания [Ca²⁺]_с, глюкозы и АТФ, синаптическая активность, нейротрансмиттеры факторы И роста способны регулировать позиционирование, митохондриальный транспорт и динамику. Перемещение этих органелл в места, требующие энергии, такие как синапсы, дендритные шипики и аксоны (Godoy et al., 2014), имеет важное значение для их функционирования. Митохондриальная морфология дифференцируется не только в зависимости от типа клеток, но и от локализации в конкретном клеточном компартменте и может изменяться с возрастом (Faitg et al., 2021). In vitro и in vivo визуализация аксональных митохондрий часто показывает, что они короткие, в то время как дендритные митохондрии имеют более вытянутую морфологию и часто обнаруживают большую сложность, чем аксональные (Lewis et al., 2018). Эта сложность может быть выражена, по крайней мере, в терминах длины или объема и склонности митохондрий к образованию скоплений в виде трубочек, часто перекрывающихся в дендритных стержнях. Например, в опытах Faitg и др., (2021) средний объем отдельных митохондрий в нейронах гиппокампа варьировал от 0,11 до 1 мкм³, тогда как митохондрии аксонов имели средний объем 0,12-0,27 мкм³ и не мкм³: лостигали значений >1 соматические митохондрии занимали промежуточные значения (0,14-0,16 мкм³) (Faitg et al., 2021). В другом исследовании с кортикальными нейронами длина дендритных митохондрий варьировала от 0,52 до 13,28 мкм, тогда как длина аксональных митохондрий была значительно меньше — от 0,3 до 1,13 мкм (Lewis et al., 2018). Более 50% отростков дендритов в противовес значению менее 1% в аксонах заполнено

митохондриями (Lewis et al., 2018; Rangaraju et al., 2019). В ещё одном исследовании сравнивались митохондрии в пресинаптических бутонах и постсинаптических дендритах гиппокампа. Площадь пресинаптических митохондрий была почти вдвое меньше, в среднем 0,077 мкм² против постсинаптических 0,146 мкм². Кроме того, пресинаптические митохондрии были значительно темнее, т. е. имели более высокую электронную плотность, чем постсинаптические (Freeman et al., 2017). Возможно, вытянутая морфология митохондрий в дендритах обеспечивает им биоэнергетическое преимущество (Chang, Honick, Reynolds, 2006) а увеличение плотности наибольшей об Тубулярные свидетельствует ИХ активности. митохондриальные тяжи в дендритах наблюдаются в нейронах гиппокампа, средняя длина которых иногда даже превышает 10-30 мкм! в длину (Li et al., 2004; Rangaraju et al., 2019). Их можно назвать митохондриальным кластером. Такая структура, скорее всего, представляет собой отдельные митохондрии, подвергающиеся слиянию продольной наружной (НММ) и внутренней митохондриальной (BMM) мембран (Shim et al., 2012; Eisner, Csordás, эллиптических Hajnóczky. 2013), поскольку размер митохондрий В нормальных условиях значительно меньше (см. цифры выше). Такие кластеры могут быть расщеплены с помощью митохондриальных разобщителей, таких карбонилцианид-п-трифторметоксифенилгидразон (FCCP) как или карбонилцианид м-хлорфенилгидразин (CCCP) (Liu et al., 2009). Кластеризация митохондрий повышает их функциональную стабильность, оптимизируя использование локального пула митохондрий в клеточных компартментах в базовых условиях и во время активности. Слияние и деление, направление движения и парковка митохондрий имеет большое значение для удовлетворения изменяющихся энергетических потребностей различных областей клетки.

В нейронах движение митохондрий осуществляется путем их прикрепления к микротрубочкам и зависит от их полярности (Sheng, Cai, 2012). В аксонах микротрубочки имеют отчетливую полярность, так что

антероградный транспорт митохондрий по (+)-концевым микротрубочкам перемещает их к конусу роста или пресинаптическому концу аксона с помощью белков семейства кинезинов (KIF, kinesin superfamily), а ретроградный транспорт по (-)-терминальным микротрубочкам использует двигательный белковый комплекс динеина, направляя митохондрии к соме. В дендритах микротрубочки могут проявлять смешанную полярность, так что KIF и динеиновые моторы могут управлять транспортом грузов в дендритах либо антероградно, либо ретроградно, в зависимости от полярности микротрубочек (Sheng, Cai, 2012). Имеются также сообщения о том, что перемещение митохондрий на короткие расстояния в областях, богатых актиновым цитоскелетом, таких как конус роста аксона, пресинаптические терминали, а иногда и в крупных дендритных шипиках, наблюдаемых в коре и гиппокампе, осуществляется с помощью миозиновых моторов (Li et al., 2004; Sheng, Cai, 2012). Доля подвижных митохондрий колеблется от 5-20 до 35-45% митохондриального пула в культуре нейронов гиппокампа, причем движение митохондрий происходит более интенсивно в аксонах, чем в дендритах, где могут быть митохондрии часто относительно неподвижны как В синаптических, так и в несинаптических областях. Движение увеличивается при блокировании активности с помощью TTX (блокатор натриевых каналов) во всех отростках нейронов, в то время как индуцированная глутаматная эксайтотоксичность вызывает стойкое увеличение [Ca²⁺]_с, замедляя движение и способствуя округлению митохондрий во всех отростках нейронов (Chang, Honick, Reynolds, 2006). В физиологических условиях приток Ca²⁺ происходит в области с высокой метаболической потребностью, такие как окончания аксонов и комплексы постсинаптических структур, где митохондрии имеют По разным данным, 36% ~50% тенденцию накапливаться. OT ДО пресинаптических окончаний аксонов нейронов гиппокампа содержат митохондрии (Chang, Honick, Reynolds, 2006; Rangaraju et al., 2019). Устойчивое повышение уровня [Ca²⁺]_с в некоторых областях клетки может быть маркером локальной активности или дефицита АТФ, который будет

рекрутировать и удерживать митохондрии для остановки в этих областях, ATΦ таким образом уравновешивая производство с локальными потребностями (Wang, Schwarz, 2009). Были выяснены многочисленные сигнальные пути, которые регулируются Ca²⁺, модулируя подвижность или индуцируя остановку митохондриальных пулов. Подвижность на основе микротрубочек опосредована КІГ Са²⁺-зависимым митохондриальных образом, а HMM-заякоренная митохондриальная Rho GTPase 1 (Miro1) является сенсором Ca²⁺ для митохондриальной локализации в синапсах. Ассоциация Mirol с РТЕN-индуцированной киназой 1 (PINK1) c привлечением белка Parkin необходимы для остановки подвижных митохондрий (Macaskill et al., 2009; Wang et al., 2011; Sheng, Cai, 2012). митохондрий во время активности нейронов вызывается Остановка высвобождаемым синапсом глутаматом, который активирует NMDAR и индуцирует приток Ca²⁺, который связывается с Miro1. Митохондриальная Miro1, остановка, опосредованная может привлекать проходящие митохондрии к активным синапсам, где потребность в АТФ и буферизации кальция будет выше (Macaskill et al., 2009). В культуре нейронов гиппокампа крысы перфузия с 30 мкМ глутамата (с 1 мкМ глицина для активации NMDAR) в течение 10 мин снижала количество подвижных митохондрий на 95% в присутствии внеклеточного Ca²⁺ ([Ca²⁺]₀), но только 28% снижение подвижности наблюдалось при отсутствии [Ca²⁺]₀. В том же исследовании было продемонстрировано, что движущиеся митохондрии останавливались в областях, которые были положительными для синаптического маркера синаптофизина и белка синаптических везикул 2 (SV2), а дальность локализации митохондрий в дендритах относительно ближайшего синапса уменьшалась после применения глутамата. Все это указывает на то, что митохондрии привлекаются в синаптические зоны во время активности (Macaskill et al., 2009). В дополнение к этим механизмам также обнаружена положительная корреляция между антероградным митохондриальным транспортом в аксонах и электрическим потенциалом через ВММ (MtMP, Ψm,

mitochondrial membrane potential), увеличивающим продукцию АТФ. Так, максимальная скорость продукции АТФ в изолированных митохондриях примерно удваивается с увеличением Ψ m на каждые 10 мВ (Gerencser et al., 2012). Митохондрии с высоким мембранным потенциалом также склонны накапливаться в синапсах (Vos, Lauwers, Verstreken, 2010). Можно сделать вывод, что подвижность и пространственное распределение митохондрий для продукции АТФ могут динамически регулироваться локальным цитозольным кальцием ([Ca²⁺]_c).

Моделирование и электрофизиологические эксперименты показывают, что соседние синаптические входы могут суммироваться нелинейно и превращать дендритный компартмент или кластер шипиков в отдельную суммирующую единицу активности. Экспериментально наблюдаемые признаки синаптической кластеризации выражаются В совместном использовании синаптических входов от одного и того же аксона двумя или образование более соседними отростками. То есть синапсов и ИХ кластеризация является следствием их взаимного расположения с ближайшим аксоном (Klejman et al., 2009). О наличии кластеризации свидетельствуют и описанные выше механизмы переноса внутриклеточных сигнальных молекул путем диффузии от стимулируемого шипика на определенное расстояние к соседним дендритным шипикам, которые могут «обучиться» сходному Имеются также доказательства межкластерной паттерну активности. конкуренции: индукция ДВП в нескольких шипах на одном и том же дендритном сегменте может вызывать сокращение шипов и ослабление более удаленных, нестимулированных синапсов соседних, шипиков (Nishiyama, Yasuda, 2015). Можно ожидать, что объединенный кластер шипиков должен иметь свой стабильный источник энергии в виде митохондриального кластера, который будет ограничивать диффузию Ca²⁺ и продукцию АТФ преимущественно в этом районе. Расчеты Rangaraju и др. предполагают, что митохондриальные кластеры, охватывающие около 30 мкм длины дендритов, способны к локальному синтезу АТФ для обеспечения

энергией 30–300 шипов (с равномерным распределением 1–10 шипов на мкм длины дендрита) (Rangaraju et al., 2019). Такая компартментализация дает преимущество в момент получения одновременного возбуждения для нескольких дендритных шипиков, при которых продукция АТФ из одной локальной митохондрии или уровень АТФ в дендрите был бы явно недостаточным, а ожидание притока АТФ из соседних митохондрий отрицательно сказалось бы на зависящую от времени пластичность и конкурентоспособность данного синаптического кластера. Высокочастотный возбуждающий вход, приводящий к значительному повышению локального уровня [Ca²⁺]_с, также требует немедленного поглощения, что успешно осуществляется в случае кластеризации митохондрий. Можно дополнить, переформулировав тезис о пластичности по Хэббу (теория Хэбба описывает закономерности синаптической пластичности в процессах запоминания и обучения, Hebb, 1949) следующим образом: «Шипики, которые многократно активны в одно и то же время одними и теми же входами, будут иметь тенденцию становиться «ассоциированными», так что активность в одном будет способствовать активности в другом. Вместе они представляют кластерную единицу информации в головном мозге, и такая единица будет обеспечиваться собственным митохондриальным кластером».

Преимущества такой кластерной митохондриальной структуры для одного шипика: моделирование показывает, что доступность АТФ в дендритах прямо пропорциональна длине митохондрий (Leung et al., 2021). В случае, когда возбуждение получают одновременно несколько шипиков кластера, это вызовет более обширный суммарный постсинаптический ответ, и тогда такой кластер, имеющий под собой протяженную объединённую митохондриальную структуру, действующую, в данном случае, как единое целое, будет обеспечивается большей энергией (рисунок 1).



Рисунок 1 – Стилизация дендрита на основе реального изображения. Распределение митохондрий в дендритном стержне: два кластера шипиков соединяются, каждый со своим аксональным пресинаптическим входом, и конкурируют за подвижные внесинаптические митохондрии (стрелка). Более активный кластер шипиков привлекает внесинаптические митохондрии, а также более эффективно стабилизирует соседний митохондриальный кластер за счет увеличения потребности в АТФ. Активные шипики получают более высокие уровни АТФ из своих локальных синаптических митохондрий по сравнению с шипиками, которые не получают достаточных синаптических входов. Таким образом, можно предположить как межкластерную, так и внутрикластерную конкуренцию

шипов.

В патологических случаях может произойти срыв такой кластерной организации: уменьшение количества зрелых функциональных шипиков, что приведет к дезорганизации синаптического кластера, а нарушение митохондриального привлечения и кластеризации митохондрий сделает энергопродукцию более хаотичной.

Преимущества для отдельного шипика, принимающий локальный сигнал: известно, что внутри кластера шипики могут конкурировать за ограниченные ресурсы. После индукции ДВП происходит заметная потеря мелких шипиков, что сопровождается увеличением оставшихся шипиков, так что общая площадь синаптической поверхности на длину дендрита остается постоянной (Lu, Zuo, 2017). Существуют гипотезы, суть которых состоит в

кажущуюся морфологическую том, что, несмотря на целостность митохондриального кластера, ограниченные пространства, представленные соединениями крист, создают латеральные градиенты критических метаболитов и макромолекул внутри крист. Например, в митохондриях головного мозга кристы соединены с поверхностью ВММ через узкие длинные трубчатые участки. Моделирование предполагает, что такие соединения могут приводить к микрокомпартментации внутри митохондрий, что может иметь важное функциональное значение, создавая барьер для диффузии молекул между кристами и межмембранными пространствами. Перестройка таких барьеров изменяет выход энергии (Perkins et al., 2001), позволяя нацеливать АТФ на локальный уровень. Однако требуются подтверждения подобных пространственноэкспериментальные функциональных разграничений.

1.6. Взаимодействия эндоплазматического ретикулума и митохондрий

Митохондриальные кластеры занимают большую часть дендритных ветвей и тесно связаны с ЭР, особенно в основании шипиков (Leung et al., 2021). Однако такое распределение ЭР и митохондрий непостоянно. Контакты между митохондриями и ЭР вдоль дендритов обеспечивают функциональную межорганеллярную связь И играют ведущую роль В регуляции постсинаптической передачи сигналов кальция. Нарушение регуляции этой связи было продемонстрировано при нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезни Альцгеймера и Паркинсона (Leung et al., 2021). Места контакта между митохондриями BMM и ЭР (MERC, mitochondria-ER contact), составляющие около 2-20% площади поверхности митохондрий, были обнаружены с помощью ЭМ-исследований, а затем продемонстрированы в экспериментах димеризационно-зависимых с использованием флуоресцентных белков. Мембранные компоненты из определенного набора белковых и липидных комплексов, которые образуют MERC, называются митохондриально-ассоциированными мембранами ЭР (МАМ). Термин МАМ

используется описания для результатов экспериментов по биохимической/функциональной характеристике изолированных контактов митохондриями ЭP, а термин MERC используется между И при морфофункциональной визуализации (Giacomello, Pellegrini, 2016).

МЕRС обеспечивают прямой путь переноса кальция из ЭР в митохондрии и необходимы для митохондриальных функций, включая продукцию АТФ. Увеличение площади поверхности МЕRС увеличивает приток кальция в митохондрии и, следовательно, стимулирует продукцию АТФ (Leung et al., 2021). Ширина МЕRС не является конститутивной и может меняться в зависимости от метаболического статуса клетки. Чрезмерное расширение или, наоборот, сужение МЕRС нарушает эффективный перенос кальция из ЭР хранилищ в митохондрии. Поглощение Ca²⁺ наиболее эффективно, когда мембрана ЭР обращена к HMM на расстоянии ≈ 15 нм, но не более 30 нм, т.к. тогда кальций будет просачиваться и диффундировать в цитоплазму, и не менее 10 нм, что определяется длиной выступающей части IP3R или RyR (Giacomello, Pellegrini, 2016). Фиксация контакта митохондрий с ЭР поддерживается белками митофузинами (Mfn) 1 и 2 (Yousuf et al., 2020).

Высвобождение Ca²⁺ из ЭР-хранилищ способно контролировать подвижность митохондрий за счет локального увеличения $[Ca^{2+}]_c$ (рисунок 2). Торможение движения митохондрий на оптимальном расстоянии от активных Ca²⁺-рецепторных каналов на ЭР необходимо для буферизации митохондрий кальцием, что также служит средством стимуляции митохондриальной продукции АТФ. Хотя митохондрии хранят меньше Ca²⁺, чем ЭР, они являются важными буферами $[Ca^{2+}]_c$. Потенциал-зависимые анионные каналы (VDAC), расположенные на HMM, ответственны за быстрый перенос Ca²⁺ из ЭР хранилищ в митохондрии, и их функция приводит к образованию богатых Ca²⁺ микродоменов в митохондриальном межмембранном пространстве (Rizzuto et al., 2012).



Б



Рисунок 2 – Синаптические взаимодействия эндоплазматического ретикулума (ЭР) и митохондрий. А – Зрелый грибовидный дендритный шипик содержит шиповый аппарат

(ША), который необходим для синаптической передачи и пластичности. Насос SERCA опосредует поглощение Ca²⁺ в ША благодаря синаптической активности или STIM/Oraiзависимому механизму поступления кальция в депо. Возбуждающий импульс (молния)

активирует приток кальция через постсинаптический NMDAR, что запускает индуцированное кальцием высвобождение кальция из ША через RyR. Этот переходный процесс Ca²⁺ распространяется вдоль шейки шипа к дендриту. В свою очередь, эта триггерная молекулярная передача сигналов приводит к высвобождению Ca²⁺ из IP3рецепторов, которые локализованы на ЭР. Кальций, высвобождаемый из RyR и IP3R, может привлекать мобильные внесинаптические митохондрии, расположенные в пределах

5–10 мкм от основания шипика. Мобильные митохондрии движутся по микротрубочкам, управляемые белком семейства кинезинов (KIF). Удержание и накопление митохондрий происходит в зоне локального повышенного содержания кальция вокруг ЭР. Кальций, высвобождающийся из IP3R в область вокруг потенциалзависимых анионных каналов

(VDAC), проходит в межмембранное пространство митохондрий, а затем через митохондриальный унипортер кальция (MCU) перемещается в митохондриальный матрикс. Стабильные постсинаптические митохондрии обеспечивают АТФ-зависимые механизмы пластичности, локальную рибосомозависимую трансляцию белков на основе мРНК, возможно, привлекаемых локальными градиентами Ca²⁺. Находящаяся рядом филоподия не получает пресинаптической информации и поэтому не может участвовать в

синаптической пластичности. Б – Зрелые и незрелые дендритные отростки получают возбуждающие пресинаптические сигналы. Более интенсивный постсинаптический ответ возникает в зрелом шипике, содержащем как NMDA, так и AMPA-рецепторы.

Синаптический вход инициирует высвобождение кальция из ША и ЭР, индуцируя локальную трансляцию белков, связанных с пластичностью (PRP). PRP также могут проникать в соседний, коактивированный, но еще незрелый шипик, вызывая внедрение АМРА-рецепторов в постсинаптическую мембрану. Стабильный постсинаптический митохондриальный кластер секвестрирует [Ca²⁺]_с, который высвобождается во время активности. Митохондрии ограничивают распределение кальция вдоль дендрита, поддерживая автономию отдельного шипика. Новые митохондрии сливаются в кластер.

Их контакты с ЭР поддерживают митофузины (Mfn) 1/2. Рецептор сигма-1 (σ-1R)

помогает стабилизировать и присоединять IP3R к VDAC в митохондриальноассоциированных мембранах ЭР (MERC). Приток Ca²⁺ через MCU также опосредован митохондриальной Rho GTP-азой 1 (Miro1), которая способна функционировать как сенсор [Ca²⁺]_m. Miro1 модулирует уровень поступления Ca²⁺ в митохондриальный матрикс. Он также участвует в MAM – механизме стабилизации митохондрий. Больший
объем митохондриального кластера позволяет производить более высокие уровни АТФ для эффективного производства PRP, способствуя функциональной и морфологической пластичности. Также показано, что отдельные митохондрии способны проникать в зрелые шипики с большим объемом головки и ША, где они, возможно, питают локальные механизмы трансляции.

Баланс $[Ca^{2+}]_m$ поддерживается за счет притока через MCU и оттока через митохондриальный натрий-кальциевый обменник (NCLX), но при повышенных уровнях активности митохондрии также способны буферизовать избыток $[Ca^{2+}]_c$ за счет осаждения внутри матрикса в виде фосфата кальция (Yousuf et al., 2020).

Рецепторы сигма-1 (σ-1R), обнаруженные на МАМ, могут влиять на митохондриальную передачу Ca²⁺-сигналов. Рецепторы σ-1 способны проявлять шаперонную активность, стабилизируя IP3R к VDAC в МАМ в условиях истощения запасов Ca²⁺ в ЭР, предотвращая деградацию входа Ca²⁺ в митохондрии, восстанавливая Ψm и последующую продукцию ATΦ (Rizzuto et al., 2012). Нокаут σ-1R в нейронах гиппокампа приводит к укорочению и уменьшению размеров митохондрий, а также вызывает снижение MtMP и высвобождение цитохрома С, что приводит к нарушению работы цитоскелетных сетей, потере зрелых дендритных шипиков и образованию незрелых дендритных шипиков (Weng, Tsai, Su, 2017; Ryskamp, Zhemkov, Bezprozvanny, 2019). Генетическая делеция σ-1R также ухудшает стабильность MAM и приводит к снижению протяжённости MERC (Zhemkov et al., 2021). Уменьшенное количество σ-1R наблюдалось посмертно в гиппокампе пациентов с БА, и некоторые полиморфизмы гена σ -1R сосуществуют с хорошо известным фактором риска болезни Альцгеймера аполипопротеином $\varepsilon 4$ (APOE $\varepsilon 4$) (Jia, Zhang, Huang, 2019).

Деление и слияние митохондрий также могут регулироваться ЭР, например, с помощью белка Wnt-5a, члена семейства секретируемых гликопротеинов wingless/integrase (Wnt), который индуцирует увеличение оттока Ca^{2+} из ЭР через IP3R и RyR. Это, в свою очередь, активирует Ca^{2+} -

зависимые сигнальные молекулы, включая CaMKII, протеинкиназу C (PKC) и кальциневрин, которые могут способствовать фосфорилированию динаминродственного белка 1 (Drp1), связанному с повышенной фрагментацией митохондрий (Godoy et al., 2014). Хотя в состоянии покоя фрагментированные дендритные митохондрии менее полезны для выработки энергии, но они способны увеличивать выработку ATФ при высоких уровнях возбуждения за счет более высокой выработки H_2O_2 (Dromard et al., 2021).

1.7. Нарушения функциональной связи ЭР и митохондрий в контексте болезни Альцгеймера

Согласно «гипотезе МАМ» предполагается, что БА является следствием нарушения ЭР-митохондриальных взаимодействий, поскольку исследования показывают повышенную экспрессию МАМ-ассоциированных белков в мозге людей и мышей с БА, вплоть до времени появления бляшек амилоида β , что предшествует более распространенной «амилоидной гипотезе». Например, фибробласты, полученные от пациентов с БА, симптомы которых включают нарушение метаболизма липидов, имеют более чем 200 нм удлинение MERC и повышенный обмен липидов (Giacomello, Pellegrini, 2016). Пресенилины 1 и 2 являются ДВУМЯ высокогомологичными изоформами пресенилина млекопитающих, с мутациями, связанными примерно с 40% всех известных случаев семейной БА (Tu et al., 2006). Фокус исследований представляет их гамма-секретазная активность в МАМ, где они влияют на процессинг (посттрансляционные модификации) белка-предшественника амилоида (АРР) с образованием амилоида β . Пресенилин 1 играет важную роль во взаимодействиях между митохондриями и ЭР в области синаптических контактов. Пресенилин 2 в присутствии митохондриального гибридного белка Mfn2, расположенного в HMM, ассоциированном с Mfn1 на мембране ЭР, способствует связыванию митохондрий с последним (Yousuf et al., 2020). Мутантные пресенилины также участвуют в нарушении передачи сигналов Ca²⁺ в нейронах в результате высвобождения избыточных количеств Ca²⁺ из хранилищ с помощью RyR и IP3R. Уровни экспрессии RyR повышены в

культивируемых нейронах, экспрессирующих мутантный PS1, и у мышей линии 3xTg (несущих три трансгенные мутации: *APP KM670/671NL {шведский}, MAPT P301L и PSEN1 M146V*), что проявляется уже в молодом возрасте особей (Stutzmann et al., 2006).

Наиболее интересным и не связанным с гамма-секретазной активностью пресенилинов является их участие в роли каналов пассивной утечки Ca²⁺ из ЭР-хранилищ в гиппокампе, показанное в лаборатории Безпрозванного (Tu et al., 2006). Повышение уровней Ca²⁺ в покое, наблюдаемое в клетках, трансфицированных PS1, может быть связано с «утечкой» из хранилищ и тем фактом, что насосу SERCA требуется больше времени, чтобы перекачать Са²⁺ обратно в **у**текаюший депо. Расчеты предсказывают, что В физиологических условиях помпа SERCA достигает термодинамического равновесия, когда [Ca²⁺]_{ER} составляет 2.4 мМ, однако визуализация дает значения в диапазоне 100-500 мкМ [Ca²⁺]_{ER}. Исследователи предложили объяснение этой разницы как опосредованную пресенилином утечку Ca²⁺ сквозь мембраны ЭР (рисунок 3).



Рисунок 3 – Схема альтернативных функций PS1 и их нарушений при мутации. PS1 (слева), возможно, действует как канал для пассивной утечки Ca²⁺ из ША и/или может

усиливать Ca²⁺-индуцированное высвобождение Ca²⁺ из RyR. Предполагается, что Nконцевой фрагмент PS1 напрямую связывается с RyR, повышая его чувствительность к [Ca²⁺]_i и вероятность открытия канала. Ионы кальция диффундируют к синаптическим митохондриям, проникая в матрикс через VDAC/MCU, где они стимулируют продукцию

АТФ. Мутации гена PS1, возможно, отменяют функцию утечки, что приводит к переполнению запасов Ca²⁺ в ША. Альтернативно, mPS1 (справа) может резко снижать

скорость открытия/закрытия RyR и ограничивать утечку Ca²⁺ из хранилища ЭР посредством еще неизученных механизмов. Значительно сниженные уровни кальция, высвобождаемого из ША, недостаточны для локальной продукции АТФ синаптическими митохондриями. Наблюдаемое увеличение экспрессии RyR в клетках с мутантной формой PS1, показанное в литературе, может являться компенсаторным механизмом увеличения утечки Ca²⁺ из переполненного хранилища в отсутствие правильной регуляции

пресенилином.

Уровень Ca²⁺ в ЭР определяется балансом между его активной закачкой через SERCA и пассивной утечкой в цитозоль. Однако в экспериментах с мутантной формой PS1-M146V утечка Ca²⁺ не осуществлялась, что приводило к переполнению запасов Ca²⁺ и повышенным уровням высвобождаемого Ca²⁺ при активации IP3R (Tu et al., 2006).

Согласно альтернативной гипотезе, пресенилины не обязательно напрямую регулируют утечку Ca^{2+} из ЭР-депо. Существуют доказательства того, они служат регуляторами изоформ рианодиновых рецепторов (RyR1-3), которые, в свою очередь, ответственны за утечку за счет CICR (Del Prete, Checler, Chami, 2014). Несколько исследований установили совместную локализацию и молекулярную связь между этими белками на мембранах ЭР (Lee et al., 2006; Del Prete, Checler, Chami, 2014). Функциональная связь между пресенилинами и RyR подчеркивается ещё и тем фактом, что нарушение функции или мутации пресенелинов приводят к увеличению экспрессии изоформ RyR2 и RyR3 (Del Prete, Checler, Chami, 2014). Повышенные уровни экспрессии RyR обнаружены в моделях, экспрессирующих мутантные PS1, и это, возможно, компенсаторный механизм, связанный с потерей функции PSутечки (Del Prete, Checler, Chami, 2014). Также предполагается, что N-

концевые фрагменты пресенилина 1 или 2 взаимодействуют с RyR, значительно повышая его чувствительность к [Ca²⁺]_с и вероятность открытия этого канала-рецептора (Rybalchenko et al., 2008). Мутантный пресенилин может резко снижать скорость открытия и закрытия RyR и, следовательно, утечку ионов кальция из ЭР-хранилищ. Однако важно отметить, что утечка Ca^{2+} с помощью RyR напрямую зависит от уровня $[Ca^{2+}]_c$. Следовательно, утечка будет усиливаться при высокой синаптической активности и в тех местах на дендритном стержне, где расположены синапсы. В многочисленных исследованиях отмечается, что продукция АТФ митохондриями тесно связана с высвобождением кальция через RyR в области MAM (De la Fuente, Sheu, 2019; Gao, Yan, Zhu, 2020). Вероятно, снижение высвобождения Ca²⁺ через RyR из ША и в зоне МАМ из-за мутаций в гене пресенилина приводит к недостатку обеспечения митохондрий кальциевым сигналом для инициации продукции АТФ даже в областях с высокой синаптической активностью. Наблюдаемое увеличение экспрессии RyR в клетках с мутантным PS1 может быть компенсаторным механизмом для увеличения утечки кальция из переполненного депо в отсутствие нормальной регуляции пресенилином.

Постсинаптические области являются одними основных ИЗ потребителей энергии, которая используется для поддержания ионного баланса, ферментативных процессов и локального синтеза белка. Синапсы связаны с обширными и резкими колебаниями уровня Ca²⁺, который участвует в передаче сигналов на стыке цитозоля, ЭР и митохондрий. Эта передача сигналов направлена на быструю и точную регуляцию уровня АТФ. Энергоснабжение и транспортировка митохондриальных кластеров жизненно важны для поддержания синаптической передачи. Так, в исследовании Du и (2010)было обнаружено, функциональности, дp. что нарушение проницаемости и трафика синаптических митохондрий происходит значительно раньше, чем то же среди внесинаптических митохондрий, а также задолго до образования амилоидных бляшек в мышиной модели БА. Гистопатологические признаки, возникающие при старении мозга или БА,

связаны с функциональной недостаточностью синаптических митохондрий. Поврежденные митохондрии постепенно увеличивают и генерализуют окислительный стресс, синаптическую дисфункцию, потерю контактов и всё это завершается дегенерацией нейронов (Müller et al., 2010; Smit-Rigter et al., 2016). В частности, нарушения митохондриального энергетического метаболизма связаны с белками, ответственными за продукцию ATФ (Yu et al., 2018). По всей видимости, именно в нарушениях кальциевого гомеостаза между синаптическими митохондриальными кластерами и локальными депо кальция следует искать первопричины многих, если не BCeX, нейродегенеративных патологий.

Даже при отсутствии нейродегенерации может наблюдаться возрастное снижение когнитивных функций в сочетании с потерей синапсов в некоторых наиболее активных областях неокортекса и гиппокампа. Так, при нормальном старении в пирамидных клетках слоя III префронтальной коры (наиболее уязвимой клеточной популяции при БА) значительно снижается плотность «тонких» мелкоголовчатых шипиков, которые обычно характеризуются как высокопластичные обучающиеся шипики (Dumitriu et al., 2010). Однако уменьшение плотности не влияет или оказывает лишь незначительное влияние на грибовидные при нормальном старении (Perez-Alvarez et al., 2020). Тогда как при БА с помощью электронной микроскопии выявляют патологическое снижение общей плотности шипиков, уменьшение их размеров наряду с наличием аномально крупных выпячиваний в разных областях головного мозга, а также морфологические аномалии ША и митохондрий (Baloyannis, 2015).

Возможно, что часть всего пула тонких пластических шипиков обогащена ЭР или ША за счет экстенсивной синаптической активации, приводящей к инициации ДВП. В свою очередь, активация может стабилизировать морфологию шипиков при ДВП-процессах и увеличить объем головы, перемещая их, таким образом, в пул зрелых шипиков

(Korkotian, Segal, 2000). Оставшаяся группа слабо активируемых тонких шипиков, не получившая ЭР-включений, может быть полностью устранена. В экспериментах показано, что увеличенные и сгруппированные синаптические входы тонких высокопластичных шипиков таких ΜΟΓΥΤ частично компенсировать проплешины синаптической сети и улучшать результаты тестов на пластичность и когнитивные способности (Pereira et al., 2014). Предполагается, что это требует привлечения большего количества митохондрий за счет локальной кальциевой активности. Нарушение регуляции кальциевых сигналов из ЭР-хранилищ может ухудшать показатели вероятность ЭP пластичности, проникновения снижая В тонкие, синаптоподин-негативные шипики, лишая их возможности обогатиться энергией и созреть, оставляя лишь перспективу элиминации.

В длительно культивируемых нейронах гиппокампа крысы (15–21 DIV), которые имитируют физиологическое старение, наблюдается резкое снижение SOCE и Orai1/STIM1, в то время как уровни кальция в депо ЭР и вызванное кофеином высвобождение, напротив, повышены. Механизм возрастной супрессии SOCE может быть предложен для объяснения утраты грибовидных шипиков как при физиологическом старении, так и при снижении когнитивных функций при БА (Segal, Korkotian, 2016; Calvo-Rodríguez et al., 2016). Нестабильность крупных дендритных шипиков наблюдалась в гиппокампе после нарушения нормальной регуляции механизма SOCE с помощью σ-1R при некоторых заболеваниях, включая БА (Попугаева, Власова, Безпрозванный, 2015; Ryskamp et al., 2019).

Нарушение передачи Ca^{2+} сигналов из ЭР в митохондрии также несет негативные физиологические последствия для стареющих нейронов, поскольку такая передача необходима для обеспечения стабильных поставок АТФ из постсинаптических митохондрий по запросу. Эффективное поглощение Ca^{2+} , вытекающего из ЭР, падает в результате митохондриальной деполяризации в стареющих нейронах. В качестве компенсаторного

механизма в клетках может развиваться увеличение числа контактов MERC, что, как это ни парадоксально, приводит к перегрузке $[Ca^{2+}]_m$, нарушая функции митохондрий и продукцию АТФ соответственно (Calvo-Rodríguez et al., 2016). Аналогичная ситуация наблюдается при нейродегенерации, когда регуляция утечки Ca²⁺ из ЭР в митохондрии нарушается из-за мутаций в гене пресенилина, что патологически перегружает депо кальцием (Sun et al., 2014). Однако аномально повышенный уровень Ca²⁺, высвобождаемый при активации, может стать неэффективным и даже токсичным для митохондрий, «настроившихся» на низкое потребление Ca²⁺ в MERC. Такая дезорганизация может накладываться на уже существующие возрастные функциональные нарушения MERC/MAM и митохондриального гомеостаза.

Повсеместно распространенный подвижный ЭР в молодых нейронах чаще проникает в пул тонких высокопластичных шипиков, трансформируясь, таким образом, в ША и стабилизируя шипики. Митохондрии экстенсивно привлекаются в дендритную область под активными постсинаптическими компартментами, чтобы связаться с ЭР и произвести целевое высвобождение АТФ. При нормальном старении митохондрии теряют свой мембранный потенциал в состоянии покоя и способность адресно вырабатывать АТФ. Следовательно, самые стабильные грибовидные шипики привлекают больше митохондрий, чтобы компенсировать недостаток АТФ/энергии за счет расширения областей MERK. При нейродегенерации дисфункциональные митохондрии не могут обеспечить достаточный приток АТФ и секвестрацию кальция, вызывая деградацию зрелых шипиков и переполнение запасов ЭР кальцием, что приводит к общему нарушению ЭР, дисфункции и, в конечном итоге, гибели клетки.

Многомерность малозаметных изменений состояния депо ЭР и их последствий, динамическая вездесущность ЭР в нейронах и тесная функциональная связь с митохондриями, а также с другими мембранными

органеллами, делает его одним из основных участников патологических процессов старения и нейродегенерации.

ГЛАВА 2. Материалы и методы исследования

Исследования проводились на кафедре фармакологии и фармации Пермского государственного исследовательского национального нейрональной базе лаборатории университета И на пластичности Института департамента мозге имени Вейцмана. Bce наук 0 экспериментальные процедуры осуществлялись в соответствии с ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами», нормативами, данными в приказе Минздрава Росии №267 от 19.06.03 «Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации», санитарноэпидемиологическими правилами СП 2.2.1.3218-14, правилами Институционального комитета по уходу и использованию животных Института им. Вейцмана и Израильского национального руководства по уходу за животными (номер официального утверждения: 00650120-3 от 20 января 2020 года).

2.1. Получение первичных культур нейронов гиппокампа.

Для исследования морфологических, кальциевых и электрофизиологических событий в нейронах гиппокампа (Sokolov et al., 2023) изготавливалась диссоциированная первичная нейрон-глиальная культура клеток. Эмбрионы крыс линии Wistar в эмбриональный день 19 (Е19) извлекали из матки беременной самки, умерщвлённой путём цервикальной дислокации с предварительной седацией, и немедленно обезглавливали в стерильных условиях. Гиппокампы иссекались из головного мозга и помещались в охлажденную (4°С), насыщенную кислородом среду Leibovitz L15 (Gibco, Гейтерсберг, Мэриленд, США), обогащенную 30 мМ глюкозой и гентамицином (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Мэриленд, США, 20 мкг/мл), где механически диссоциировались с помощью узкого кончика пипетки Пастера

и суспендировались в среду для посева, состоящую из 5% лошадиной сыворотки и 5% фетальной телячьей сыворотки, приготовленную в минимальной базовой среде (MEM; Gibco) и обогащенную 0,6% глюкозой, гентамицином и 2 мМ ГлутаМАКС (Gibco). Около 10⁵ клеток в 1 мл среды высевали на круглые покровные стекла диаметром 13 мм, предварительно каждую 24-луночного покрытые полилизином, В лунку планшета. Поддержание роста и жизнеспособности культур осуществлялось В инкубаторе (Tuttnauer USA) при температуре 37°С и атмосфере, обогащённой 5% CO₂.

Около 10⁵ клеток в 1 мл среды высевали на круглые покровные стекла диаметром 13 мм, предварительно покрытые полилизином, в каждую лунку 24-луночного планшета. Поддержание роста и жизнеспособности культуры осуществлялось в условиях CO₂ инкубатора при температуре 37°C и газовой смеси, содержащей 5% CO₂.

2.2. Трансфекция клеточной культуры

Нейроны трансфицировали на 7 день in vitro (DIV). Готовили смесь из Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher, Уолтем, Массачусетс, США) по 1 мкл в 50 мкл Opti-MEM (Thermo Fisher) на лунку и инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре в ламинарном боксе. Отдельно готовили смесь ДНК и Opti-MEM (≈1 мкг каждой плазмиды в 50 мкл на лунку) и также инкубировали в течение 5 мин. Затем два прединкубированных препарата совместно инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре в ламинарном боксе. Полученную смесь добавляли в каждую культуральную лунку, содержащую ≈600 мкл базового раствора, в объёме 100 мкл и оставляли для индукции трансфекции в течение 3 часов перед полной заменой среды на новую. В большинстве случаев для всех агентов наблюдался равнозначный выход трансфекции – 10-20% клеток на стекло. Для морфологического анализа клеток использовали плазмиду синего флуоресцентного белка EBFP (Enhanced blue fluorescent protein, рисунок 4), зелёного флуоресцентного белка EGFP (Enhanced green fluorescent protein) или красного флуоресцентного белка DsRed (red fluorescent protein). Нейроны трансфицировали человеческим пресенилином 1 (PS1) или мутантным пресенилином 1 M146V (mPS1), STIM1-STIM2-YFP, митохондриальным mCherry или кальциевым сенсором (mtRCaMP, рисунок 4; Akerboom et al., 2013), сенсором митохондриальной морфологии (mtDsRed) или АТФ-сенсором (AT1.03CR, получена от доктора Imamura, Kyoto University, Япония). Культуры использовали для визуализации в период 10-20 DIV, в зависимости от эксперимента. Котрансфицированные клетки не демонстрировали различий в спонтанной кальциевой активности, морфологии, плотности шипиков и выживаемости в сравнении с клетками, трансфицированными только морфологическим маркером, ИЛИ нетрансфицированными клетками. Методология трансфекции основана на стандартных протоколах (Korkotian, Meshcheriakova, Segal, 2019).



Рисунок 4 – Пример нейрона, трансфицированного EBFP (монохромный) и mtRCaMP (красный). А – общий план нейрона (EBFP). Б – общий план того же нейрона (mtRCaMP). В – увеличение изображения в белой рамке с панели А - дендритные отростки чётко визуализируются. Г – увеличение изображения в белой рамке с панели Б – использование mtRCaMP позволяет визуализировать [Ca²⁺]_m в митохондриях / митохондриальных кластерах.

2.3. Генотипирование

Для исследования экспрессии ранних генов использовались 22 самца мышей, не несущих гена SYNPO в обоих аллелях своей ДНК (SPKO, SYNPO

нокаут), 12 самцов, гетерозиготных по данному гену и 6 самцов нетрансгенных мышей (или «дикого типа», WT), получаемых в одном помете с трансгенными. Все группы мышей произошли от разведения гетерозиготных мышей SPKO, полученных от доктора Frotscher (Гамбургский университет) с генетическим фоном 129P2/OlaHsd (№: 028822, Лаборатория Джексона). Для получения информации о генотипе мыши, ДНК из кончиков хвостов экстрагировались с использованием стандартного набора DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Хильден, Германия). Затем с помощью ПЦР амплифицировались последовательности интереса. SYNPO (SP) праймеры:

- 1. 5'-GCGGTGGCTGACTGTGGTGACT;
- 2. 5'-CAGGCGCAGGCAGAGGGTGAACG;
- 3. 5'-CCAGCTGGCGAAAGGGGGGATGTG.

Образцы анализировали в агарозном геле (1% агарозы в трис-буфере), с использованием бромистого этидия качестве интеркалирующего В флуоресцентного индикатора ДНК (рисунок 5). Согласно маркеру молекулярной массы фрагменты рестрикции соответствовали: SPKO: 398 п.н.; WT: 492 п.н.



Рисунок 5 – Результат электрофоретического разделения продуктов ПЦР. Согласно маркеру молекулярной массы фрагменты рестрикции соответствуют: SPKO: 398 п.н.; SP WT: 492 п.н. Агарозный гель окрашен бромистым этидием.

2.4. Поведенческий эксперимент

Поскольку в более ранних исследованиях не было заметной разницы между дикими и гетерозиготными мышами (Deller et al., 2003), в поведенческом эксперименте результаты двух групп, WT и SPKOгетерозиготы, были объединены. Мышей содержали при 12-часовом цикле «день-ночь» и предоставляли свободный доступ к пище и воде. Исследования проводились в одно и то же время в часы периода активности грызунов. В обогащённом открытом поле 6-месячных самцов мышей WT/гетерозиготы и SPKO делили на две подгруппы: первая подгруппа исследовала новую среду обогащённого открытого поля в течение 5 минут дважды, с интервалом в 20 минут. Обогащённое открытое поле (или «новая среда») представляло собой квадратный короб (30×30 см) со стенками высотой 15 см, с размещёнными в нём незнакомыми для животных небольшими объектами разной формы, в условиях пониженной освещённости. Стандартный небольшой (8 см) вращающийся диск помещался посередине короба совместно с другими предметами для исследования. В каждом сеансе исследования мышей помещали в центр поля. Через пятьдесят минут после начала первого мышей анестезировали исследования хлоралгидратом И подвергали транскардиальной перфузии. Мыши, не участвующие в поведенческом эксперименте, находились в условиях пониженного освещения в домашней клетке, со свободным доступом к пище и воде, в течение 50 минут, после чего также подвергались седации и транскардиальной перфузии.

2.5. Иммуногистохимический анализ

<u>Иммуногистохимия на срезах гиппокампа.</u> У мышей после транскардиальной перфузии с фосфатным забуференным физиологическим раствором (PBS) и с 4% параформальдегидом (PFA) извлекали мозг и выдерживали в 4% PFA в течение 24 часов, а затем в течение 48 часов в 30% сахарозе и 1% PFA (4°C). С помощью криотома изготавливались коронарные срезы толщиной 25 мкм через дорсальный гиппокамп. Срезы блокировались 20% фетальной телячьей сывороткой (FCS) или 2% нормальной лошадиной сывороткой с 0,2% или 0,3% Triton X-100 в PBS в течение 1 ч при комнатной

температуре (RT), затем инкубировали 12 часов при 4°C с первичными антителами в 2% FCS и 0,2% Triton в PBS. Антитела:

- 1. Arc антимышиные 1:200 (Novous Biologicals, Кембридж, Великобритания, подарок М. Cohen-Armon);
- 2. с-Fos (Sigma-Aldrich, подарок доктора R. Eilam, Институт Вейцмана).

Срезы инкубировали со вторичными антимышиными/антикроличьими антителами в 2% FCS в PBS (1:100, 1:100; Jackson ImmunoResearch, JAC) в течение 1,5 ч RT, далее с 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) 1 ч RT. Срезы переносились на предметные стекла, подвергались заливке Aqua-Poly/Mount (Polysciences, Inc., Вашингтон, Пенсильвания, США) и защищались покровным стеклом.

<u>Иммуногистохимия культуры нейронов гиппокампа.</u> Покровные стекла промывались стандартным внеклеточным раствором, затем фиксировались 4% PFA в 0.1M PBS (pH 7,4) в течение 30 мин, тщательно промывались в PBS с последующей инкубацией в присутствии 10% нормальной лошадиной сывороткой в 0,1% Triton X-100, содержащем PBS, в течение 1 ч, затем инкубировались в течение 24 ч при 4°C с первичным антителом против Агс или с-Fos (мышиные моноклональные антитела, разведение 1:200 в PBS), далее инкубировались с вторичными антителами и DAPI и монтировались на предметные стекла с монтажной средой, препятствующей выцветанию.

2.6. Анализ гибели клеток

Для определения количества мертвых/живых клеток покровные культуральные стёкла первоначально инкубировали с 2 мкМ кальцеина-АМ в стандартной среде для записи, затем проводили визуализацию в присутствии 2,5 мкМ йодида пропидия (PI) при комнатной температуре. С помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM 880 с водоиммерсионным объективом 20× (1,0 NA) получали двухканальные изображения [Calcein AM/PI], где зеленые (488 нм) и красные (545 нм) флуоресцентные клетки представляли

собой живые и мертвые клетки соответственно. Подсчитывалось процентное соотношение живых и мертвых клеток: живые клетки (клетки, окрашенные в зеленый цвет) или мертвые/умирающие клетки (клетки, окрашенные в красный цвет) умножаются на 100% и делятся на общее количество клеток (зеленых и красных) в поле 200 × 200 микрон. Клетки, которые потеряли флуоресценцию (вытек кальцеин-АМ), либо приобретают красное окрашивание (РІ попадает в клетку), не считались живыми. Стандартное программное обеспечение для обработки изображений (Image J 1.52p, NIH, Bethesda, MD, США) использовалось для подсчета количества мертвых/живых клеток.

2.7. Визуализация

Для визуализации живых клеток, культуры помещали на предметный столик прямого лазерного сканирующего конфокального микроскопа Zeiss LSM 880 с использованием 40-кратного водно-иммерсионного объектива общее x400 без план-апохромат (1.0)NA. увеличение составляло использования зума, разрешающая способность 0.028 мкм). В процессе визуализации выцветание не обнаруживалось. Стандартная регистрирующая среда содержала (в мМ): NaCl 129, KCl 4, MgCl2 1, CaCl2 2, глюкозу 10 и HEPES 10, pH доводили до 7,4 с помощью NaOH и осмоляльность до 320 мОсм сахарозой. Культуру инкубировали с Fluo-2 AM (2 мкМ, Thermo Fisher) в течение 1 часа RT для отображения флуктуаций цитозольного кальция, возникающих в результате синатиптической активности или посредством изменений внеклеточного кальция в окружающей среде. Для визуализации потенциала митохондриальной мембраны клетки инкубировали с перхлоратом метилового эфира тетраметилродамина (TMRM, 100 нМ) в течение 15 минут RT. Производилась визуализация клеточной морфологии (пример на рисунке 6), митохондриальной морфологии, флуктуаций митохондриального цитозольного И кальция, И митохондриального потенциала. Все измерения проводились с одинаковыми параметрами для всех групп, такими как: мощность лазера, толщина оптического среза,

продолжительность воздействия и пространственное разрешение. Для возбуждения флуоресценции EBFP, применялся ультрафиолетовый диодный лазер (экситация λ =405 нм) с регистрацией эмиссии от 410 до 483 нм, для EGFP/Fluo-2 - аргоновый лазер (экситация λ =488 нм) с регистрацией эмиссии от 491 до 530 нм фильтром, гелий-неоновый лазер (экситация λ =543) с регистрацией эмиссии от 556 до 695 нм для DsRed/MtDSRed. Для визуализации фиксированных культур и срезов использовали 63-кратный объектив план-апохромат (1.4 NA). Для каждой группы производилось равное количество микрофотографий с одинаковыми параметрами интенсивности лазера.



Рисунок 6 – Пример визуализации участка дендрита культивируемого нейрона, трансфицированного EGFP. Морфология дендритных отростков (шипиков и филоподии) чётко дифференцируется.

2.8. Статистический анализ

Интенсивность флуоресценции рассчитывали с использованием ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) и программного обеспечения Matlab R2010b (MathWorks Inc., Natick, MA, USA). Измерения проводились двойным слепым методом для обеспечения беспристрастности наблюдений.

Митохондриальный потенциал рассчитывали по формуле 1, разработанной Koopman и др. (2008):

$$\Delta \Psi = -60 \times \log \left(7.6 \times \frac{F_{MT}}{F_{nuc}} \right) (1)$$

где Δψ - отрицательный мембранный потенциал на внутренней митохондриальной мембране, F_{MT} – измеренное значение флуоресценции, F_{nuc} – значение флуоресценции в области ядра клетки (шум).

Нормализация флуоресцентного сигнала [Ca²⁺]_с и [Ca²⁺]_m производилась по формуле 2:

$$\frac{\Delta F}{F}$$
 (2)

где ΔF – абсолютное значение флуоресцентного сигнала, F – усреднённое значение базового уровня сигнала.

Нормальность распределения данных определялась с помощью критерия Колмогорова-Смирнова с поправкой Лиллиефорса или критерия Шапиро-Уилка. Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) использовали при сравнении трех групп с одной переменной. Последующее попарное сравнение групп проводили с помощью апостериорных тестов Тьюки, Бонферрони или Фишера. Сравнения двух групп проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента (при нормальном распределении) или U-критерия Манна-Уитни, в зависимости от обстоятельств, в программе OriginPro (OriginLab Co., Нортгемптон, Массачусетс, США). Результаты ошибка значение ± стандартная выражены как среднее среднего. Статистическая значимость была установлена на уровне p < 0.05. При графическом представлении данных в графиках или гистограммах полосы погрешности отображают диапазон стандартной ошибки среднего. Пороги оценки статистически значимого результата: * - значимо, 0,05 > p > 0,01; ** очень значимо, 0.01 > p > 0.001; *** - высокий уровень значимости, p < 0.001; н/д - недостоверно, $p \ge 0.05$.

ГЛАВА 3. Результаты исследования и их обсуждение

3.1. Исследование влияния белка пресенилина 1 и его мутантной формы на выживаемость культивируемых нейронов гиппокампа

Диссоциированные первичные культуры нейронов гиппокампа широко используются в качестве модельной системы для изучения клеточных и молекулярных свойств, а также механизмов генерации потенциала действия и синаптической передачи в системе *in vitro* (Sokolov et al., 2023). В первом эксперименте культура нейронов гиппокампа крыс была трансфицирована человеческим пресенилином 1 (PS1), его мутантной формой M146V (mPS1) и морфологическим маркером EGFP (для группы контроля – только маркером Клетки инкубировали морфологии). с разобщителем окислительного фосфорилирования карбонил цианид т-хлорфенил гидразоном (СССР, carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone) в концентрация 10 мкМ в течение 2 часов. В исходных условиях перед инкубацией процент здоровых клеток на поле достоверно не различался между группами. После инкубации нейроны, трансфицированные mPS1, демонстрировали повреждённую чаще морфологию (46,51±4,29% повреждённых клеток на поле) в сравнении с группами контроля (5,04±1,45%) и PS1 (18,31±2,34%, рисунок 7).



Рисунок 7 – Выживаемость клеток в присутствии карбонил-цианид-м-хлорфенилгидразона (СССР, 10 мкМ). А – контрольные клетки и клетки, трансфицированные

PS1 и mPS1 после 2-х часов инкубации с СССР (морфологический маркер EGFP), шкала 50 мкм. Б – клетки с mPS1 демонстрируют морфологические нарушения (увеличения с панелей А) после 2-х часов инкубации с СССР, тогда как клетки контроля и PS1 ещё не имеют видимых повреждений. Шкала 10 мкм. В – процент здоровых и повреждённых клеток в контрольной среде. Процент повреждённых клеток с mPS1 достоверно выше таковых в контрольной группе (*p* < 0,05). Г – процент здоровых и повреждённых клеток после инкубации с СССР в течение 2-х часов. Процент повреждённых клеток с PS1 достоверно выше, чем в контроле (*p* < 0,01), но наибольший процент повреждённых клеток наблюдается в группе mPS1, в сравнении с группами контроля и PS1 (*p* < 0,001). АNOVA, апостериорный критерий Бонферрони.</p>

Эти результаты свидетельствуют о снижении устойчивости мутантных клеток к повреждению под влиянием функций пресенилина 1, что приводит к более раннему началу развития процессов апоптоза, в сравнении с контрольными группами.

Для того, что подтвердить, что демонстрируемые нейронами повреждения действительно влекут за собой процессы апоптоза, мы использовали более чувствительный метод оценки — анализ мертвых/живых клеток (по Sadeh et al., 2015). Метод позволил наблюдать признаки гибели клеток до и после воздействия СССР. Культуры клеток до и после инкубации с СССР в течение 3 часов загружали кальцеином АМ (2 мкМ, индикатор цитозольного кальция) и проводили анализ в присутствии 2,5 мкМ йодида пропидия (рисунок 8). Особенностью йодида пропидия является то, что он не проникает через интактную клеточную мембрану. Однако в повреждённых клетках вещество попадает в ядро и связывается с ДНК. Оценку спонтанного и индуцированного апоптоза производили с помощью флуоресцентной микроскопии. Подсчитывалось процентное соотношение живых и мертвых трансфицированных и нетрансфицированных клеток в каждой группе. Количество (окрашенных кальцеином зеленый цвет) живых В ИЛИ мертвых/умирающих клеток (окрашенных йодидом пропидия в красный цвет) в поле (рисунок 8, А-В) умножали на 100% и делили на общее количество клеток (зеленых и красных) в исследуемом поле. Клетки, которые утрачивали

окрашивание кальцеином и приобретали красное окрашивание (йодид пропидия попал в клетку), не считались живыми.



Рисунок 8 – Выживаемость клеток в присутствии кальцеина и йодида пропидия до и после 3 часов инкубации с карбонил-цианид-м-хлор-фенилгидразоном (СССР, 10 мкМ). А – контрольные клетки в исходных условиях (верхние панели) и после инкубации с СССР (нижние панели). Трансфицированные клетки с EBFP (синий) в поле совместно с нетранфицированными клетками загружены кальцеином (зелёный). Мёртвые клетки содержат йодид пропидия (красный). Шкала 20 мкм. Б – то же для клеток,

трансфицированных PS1. В – то же для клеток, трансфицированных mPS1. Г – процент мёртвых трансфицированных (вверху) и не трансфицированных (внизу) клеток до и после 3-х часовой инкубации с СССР. Д – процент живых трансфицированных (вверху) и не трансфицированных клеток до и после 3-х часовой инкубации с СССР. Для Г&Д – п (контроль) = 57, n (контроль + СССР) = 64, n (PS1) = 38, n (PS1 + СССР) = 67, n (mPS1) =

37, n (mPS1 + CCCP) = 68 полей; ANOVA, апостериорный анализ Фишера.

Мутантные клетки демонстрировали окрашивание йодидом пропидия чаще, чем контрольные трансфицированные, даже в исходной среде для визуализации (рисунок 8, Г, верхняя панель). После трёхчасовой инкубации с 10 мкМ СССР наибольшее количество мёртвых/наименьшее количество живых клеток наблюдалось в группе нейронов, трансфицированных мутантным PS1, тогда как не трансфицированные клетки не имели значимых различий в процентах живых и мёртвых клеток между группами (рисунок 8, Г, Д). Эквивалентное количество полей было взяло для анализа в каждой группе. Анализ изображений производился двойным слепым методом.

Аномально высокий уровень кальциевой флуоресценции (кальцеина) в клетках после инкубации с СССР, влекущий за собой клеточную гибель, потребовал дальнейшего детального изучения.

3.2. Исследование влияния белка пресенилина 1 и его мутантной формы на митохондриальную и клеточную морфологию, мембранный потенциал митохондрий и митохондриальные функции в культуре нейронов гиппокампа

Культура нейронов гиппокампа была трансфицирована PS1, mPS1, морфологическим маркером EBFP и маркером митохондриального кальция mtRCaMP. Производилась покадровая визуализация клеток в присутствии 10 мкМ СССР при комнатной температуре. После 30 минутной инкубации наблюдались морфологические изменения, происходящие на фоне аномально высокого подъёма цитозольного ([Ca²⁺]_c) и митохондриального кальция ([Ca²⁺]_m), которые выражались в появлении новых шипиков и филоподий и/или разрастании уже имеющихся отростков (рисунок 9, А-В). Был проведён

анализ количества вырастающих отростков под воздействием СССР по категориям: филоподии/тонкие шипики, грибовидные шипики и короткие шипы (пеньки/обрубки). Различия между группами в исходных условиях были небольшими (снижение зрелых грибовидных шипиков в группе mPS1 в сравнении с PS1) или отсутствовали совсем (рисунок 9, Г-Е). После инкубации с СССР большинство новых отростков представляли собой филоподии (рисунок 9, Е), однако наибольшее влияние препарат оказал на плотность дендритных филоподий в нейронах mPS1. Нужно также отметить, что уже существующие шипы/филоподии могли претерпевать морфологические изменения при инкубации с СССР, в результате чего изменялось их отнесение к той или иной категории.



Рисунок 9 – Влияние карбонил-цианид-м-хлор-фенилгидразона (СССР) на клеточную морфологию (монохромный), цитозольный (зелёный, Fluo-2) и митохондриальный (красный, mtRCaMP) кальций. А – контрольная клетка до и после 30-минутной инкубации с СССР (10 мкМ), шкала 5 микрон. Б – то же для клетки PS1. В – то же для клетки mPS1. Г – усреднённое количество коротких шипиков-пеньков в исходных условиях (baseline) и после 30-минутной инкубации с СССР на дендритных участках длиной 50 мкм. Д –

усреднённое количество грибовидных шипов в исходных условиях и после 30-минутной инкубации с СССР. Е – наибольшее количество новых филоподий наблюдалось в группе mPS1. Для Г&Е – шипиков/филоподий после инкубации с СССР значимо больше во всех трех группах (*p* < 0,001). Эквивалентное количество дендритных сегментов сравнивали для каждой клетки, n = 15 клеток для каждой группы, ANOVA, апостериорные тесты Бонферрони, три клеточные культуры.

Общее количество шипиков и филоподий в целом увеличивалось во всех группах под воздействием СССР: контроль с $2,48\pm0,22/5,57\pm0,37$ до $3,32\pm0,27/8,34\pm0,69$ (p < 0,01 / p < 0,001); PS1 с $3,04\pm0,43/5,28\pm0,49$ до $3,28\pm0,36/7,6\pm0,53$ (p > 0,05 / p < 0,01); mPS1 с $2,143\pm0,25/5,5\pm0,41$ до $2,36\pm0,27/10,39\pm0,6$ (*p* > 0,05 / p < 0,001) шипиков / филоподий на 50 мкм дендрита, соответственно. Эффект роста/разрастания имеющихся филоподий/шипиков под влиянием СССР проявлялся только в условиях аномального подъёма на рисунке 10.



Рисунок 10 – Влияние пресенилина 1 на митохондриальный кальций ([Ca²⁺]_m) и митохондриальный потенциал мембраны (ΔΨm). А – применение 10 мкМ СССР (прединкубация с СССР 10 мин) индуцирует аномальный подъём [Ca²⁺]_c (Fluo-2) и сопряжённый с ним резкий подъём [Ca²⁺]_m (mtRCaMP), нормализованная флуоресценция по формуле 2. Усреднённая кинетика возрастания [Ca²⁺]_c и [Ca²⁺]_m отличается от контроля и PS1 у клеток mPS1, статистические сравнения на графике с 600-ой по 1200 секунду

инкубации (20-30 минут инкубации). Б – усреднённые значения пиковой Fluo-2 флуоресценции без нормализации в группах до и после 30 минутной инкубации с СССР (10 мкМ). В – усреднённые значения пиковой mtRCaMP флуоресценции без нормализации в группах до и после инкубации. А-В – n (контроль) = 18 клеток, n (PS1) = 15 клеток, n (mPS1) = 15 клеток из 3-х клеточных культур, ANOVA, апостериорные тесты Фишера. Г – деполяризация митохондриальной мембраны (TMRM, нижняя панель, в мВ) под воздействием СССР на фоне подъёма [Ca²⁺]_с (Fluo-2, верхняя панель), прединкубация с СССР (10 мкМ) в течение 10 мин, статистические сравнения полных кривых. Д – усреднённые значения пиковой Fluo-2 флуоресценции без нормализации в группах до и

после 30 минутной инкубации с СССР. Е – усреднённые пиковые значения ТМRM флуоресценции, пересчитанной по формуле 1. Для Г-Е – n = 13 трансфицированных клеток в каждой группе, ANOVA, апостериорные тесты Фишера.

Клетки mPS1 демонстрировали более ранний подъём $[Ca^{2+}]_c$ (p < 0.05) и [Ca²⁺]_т (*p* < 0,001) в сравнении с группой контроля и PS1 (рисунок 10, А). Аналогичный эксперимент, проведённый с индикатором мембранного потенциала митохондрий TMRM продемонстрировал его диссипацию на фоне (рисунок 10, Γ). $[Ca^{2+}]_{c}$ В этих PS1 подъёма условиях клетки продемонстрировали наибольшую устойчивость К утрате Ψm под воздействием СССР.

Кроме того, в эксперименте с использованием митохондриального морфологического mtDSRed маркера было выявлено, что длина митохондриальных кластеров В исходных условиях В клетках, экспрессирующих mPS1, достоверно снижена (в среднем 2,05 \pm 0,07 мкм, p <0,001) в сравнении с группами контроля (3,51±0,16 мкм) и PS1 (4,3±0,16 мкм), примеры продемонстрированы на рисунке 11.



Рисунок 11 – Примеры дендритных областей, трансфицированных EBFP (синий контур) и mtDSRed (монохром) в исходных условиях (baseline), через 30 минут и 1 часа инкубации с CCCP (10 мкМ), n = 10 клеток в каждой группе, три клеточные культуры 10-14 DIV, для каждой клетки анализировали сопоставимое количество дендритных сегментов 1-го и 2-го порядка. Митохондрии в клетках с mPS1 демонстрируют уменьшенную, «скруглённую» морфологию. После 1 часа инкубации с CCCP (10 мкМ, нижние панели) клетки PS1 демонстрировали наибольшую длину митохондриальных кластеров в сравнении с контролем и mPS1 (*p* < 0,001).

наибольшую Проведённые эксперименты показали уязвимость митохондриальной морфологии, Чт и [Ca²⁺]_m mPS1 нейронов в условиях повреждения. В совокупности эти данные указывают на то, что именно митохондриальная дисфункция является определяющим фактором раннего наступления процессов мутантных апоптоза В клетках В условиях Важность повреждения. поддержания митохондриального кальциевого гомеостаза и его влияние на митохондриальную морфологию, подвижность и функции описано в литературе (Безпрозванный, 2010; Лукъянова, 2019), кроме

того, известно, что уровень кальция в митохондриях находится в прямой зависимости от его снабжения со стороны ЭР (Лычковская, 2016). В связи с этим, возникает необходимость изучения кальциевой динамики ША и её влияния на функции постсинаптических митохондрий.

3.3. Исследование механизмов восполнения шипикового аппарата кальцием в культивируемых нейронах гиппокампа

Для того, чтобы исследовать механизм восполнения ША, следуя методам, разработанным Liang и др., 2002; Korkotian, Holcman, Segal, 2004, блокировалась синаптическая активность и синаптические входы (NMDAR с помощью конкурентного антагониста APV {R-2-амино-5-фосфонопентаноат}, AMPAR с помощью конкурентного антагониста AMPA и каинатных рецепторов - DNQX {6,7-динитрохиноксалин-2,3-дион} и натриевые каналы с TTX) помощью В культивируемых нейронах гиппокампа, котрансфицированных EBFP И флуоресцентным синаптоподином. Единственным известным источником Ca²⁺ в этих условиях остается механизм SOCE, связанный с путем STIM1/Orai1 (Korkotian, Oni-Biton, Segal, 2017). Для мониторинга колебаний кальция в шипиках, содержащих ША, использовался высокоаффинный кальциевый сенсор Fluo-2 (см. Главу 2). В таких условиях наблюдались колебания, которые были ограничены шипиками и не присутствовали в дендритах (рисунок 12, А, Б). Кроме того, эти паттерны кальциевой активности, связанные с комплексом STIM1/Orai1, были намного медленнее (секундного порядка) и имели меньшую амплитуду по сравнению с паттернами, запускаемыми синаптическими входами (порядка нескольких сотен миллисекунд).

Запасы кальция в ША истощали с помощью кофеина, чтобы подтвердить, что механизм SOCE приводит к накоплению кальция в ША, (Korkotian, Segal, 2011) и обнаружили асимметричное высвобождение Ca²⁺, в основном в направлении основания шипика (рисунок 12, Б, нижняя панель).

Этот результат согласуется с временной шкалой активации CICR и лежащим в его основе гетерогенным распределением RyR (см. Главу 1).



Рисунок 12 – Заполнение и истощение ША в дендритных шипиках медленными и быстрыми переходными кальциевыми событиями. А – верхняя панель: EBFP в качестве морфологического маркера (синий) и синаптоподин (SP, красный), инкубация с высокоаффинным кальциевым сенсором Fluo-2. На изображении выделяется большой SPположительный шипик, имеющий контакт с аксоном (бледно-синяя стрелка), и несколько SP-отрицательных шипиков. Нижняя панель: показана та же область, обведённая белым контуром и двумя областями интереса - позади, в основании шипика (розовый) и впереди (бледно-синий) ША, помеченного SP. Синаптическая активность блокировалась с

помощью TTX (1 мкМ), APV (50 мкМ) и DNQX (20 мкМ). Б – верхняя панель: волнообразная активность Ca²⁺ в результате SOCE происходит только в головке шипика. Нижняя панель: динамика Ca²⁺-активности в голове шипика в сравнении с основанием в дендрите после добавления кофеина (5 мМ). После применения кофеина высвобождение Ca²⁺ наблюдается в направлении основания шипика, но не в головке. В – верхняя панель: запись волнообразной Ca²⁺-активности в головке шипика. Нижняя панель: усреднение n=18 сегментов колебаний волнообразных колебаний, превышающих порог в 1 стандартное (CO) отклонение (CO = 0,046 в примере записи, показанной на верхней панели).

Колебания концентрации Ca²⁺ в головке шипика коррелируют во времени, следуя с частотой около 1 Гц, как показывает автокорреляционная функция (рисунок 13), и эти данные совместимы с предыдущим анализом переходных кальциевых событий – ПКС (Zheng et al., 2015).



Рисунок 13 – Автокорреляционная функция сигналов активности кальция в головке шипика и в его основании в дендрите. Два сигнала начинают декоррелировать (первые нули) на 0,96 с и 0,56 секундах, соответственно.

Сравнивая ПКС во время синаптических входов и SOCE в головке шипика по сравнению с основанием в дендрите, мы выяснили, что входы ПКС достигают пика примерно через 0,25 с после стимуляции, в то время как увеличение SOCE очень небольшое, максимум находится около 0,6 секунд. Интересно, что эта разница еще более заметна в области основания. На основании этого предполагается, что во время процесса SOCE только небольшое количество кальция достигает основания шипика в дендрите (рисунок 14). Для этого эксперимента мы использовали культивируемые нейроны гиппокампа, трансфицированные плазмидой, несущей флуоресцентный SP. В возрасте 3 недель (21 DIV, зрелая культура) нейроны инкубировали с кальциевым сенсором Fluo-2 и регистрировали спонтанную активность с помощью быстрого сканирования (см. методы визуализации в Главе 2). Эксперименты подтвердили, что STIM/Orai комплекс отвечает за пополнение запасов кальция в ША (рисунок 14).



Рисунок 14 – Сравнение переходных кальциевых событий (ПКС), связанных с синаптической активностью, и SOCE шипика. Случайно выбранная область содержит типичный грибовидный SP-положительный шипик с PSD (не показана, схематически отмечена красными рамками) и прилегающим дендритным шафтом (синие рамки). Типичное единичное спонтанное событие в обеих областях показано сплошными линиями. Затем кальций удаляли из внеклеточной среды и в течение 15 минут инкубировали в присутствии DNQX (7 мкМ), APV (20 мкМ) и TTX (1 мкМ), которые истощали запасы Ca²⁺ и не позволяли новым ионам кальция проникать в шипик в

результате синаптического взаимодействия. Затем в присутствии блокаторов восстанавливали исходную внеклеточную концентрацию кальция ([Ca²⁺]_o, 2 мM), после чего наблюдались медленные и низкоамплитудные кальциевые волны в области PSD, но не в дендрите, что свидетельствует об активности механизма депо-управляемого входа кальция/SOCE. Типичные SOCE показаны пунктирными линиями. Временная шкала SOCE в два раза больше, а амплитуда SOCE меньше по сравнению с синаптической активностью/ПКС.

Мы также исследовали условия пополнения Ca²⁺ для шипиков, содержащих ША, с использованием визуализации кальция в культивируемых нейронов гиппокампа. Для идентификации шипиков, содержащих ША, мы использовали SP в качестве маркера (оранжевые включения на рисунке 15, A₁-A₂, Б). Чтобы продемонстрировать, что ША пополняется в отсутствие какой-

либо активности, мы заблокировали как потенциал-зависимые каналы, так и глутаматергические рецепторы, добавив TTX (1 мкМ), APV (50 мкМ) и DNQX (20 мкМ). В отсутствие внеклеточного кальция ($[Ca^{2+}]_o$) в шипах не обнаруживаются ПКС независимо от того, содержат ли они ША или нет (рисунок 15, В).

Напротив, при наличии $[Ca^{2+}]_{o}$ заметные ПКС возникают только в головках SP⁺ шипиков (рисунок 15, Γ_1 - Γ_2). Поступление кальция не приводило к ПКС в основаниях шипиков SP⁺ и SP⁻, что подтверждает нашу гипотезу о том, что медленное поступление Ca²⁺, фактически представляющее собой SOCE, не активирует RyR (см. Главу 1). Однако, чтобы подтвердить работоспособность RyR в этих условиях, мы активировали их с помощью агониста механизма кальций-зависимой кальциевой секреции через RyR – кофеина. Эта активация привела к существенному ПКС и увеличению уровня $[Ca^{2+}]_c$ только в основании SP⁺-шипиков, в которых, в основном, расположены RyR (рисунок 15, Д₁-Д₂ и E₃).

Для дальнейшего количественного определения спонтанной активности Ca²⁺ мы также подтвердили, что как амплитуды (2,2 против 1,54 условных единиц (у.е.) флуоресценции (рисунок 15, E₁), так и длительность (1,4 против 0,8 сек) значительно больше у SP⁺-шипиков по сравнению с SP⁻.



Рисунок 15 – Локальные запасы кальция в дендритных шипиках. А₁ – дендрит культивируемого нейрона гиппокампа крысы, трансфицированный SP (красные точки) и проинкубированный с Fluo-2. А₂ – увеличение A₁ с двумя шипиками одинаковой длины ≈1,2 мкм: слева, SP⁺ (серый кружок); справа, SP⁻ (фиолетовый кружок). Б – отмечены головные области шипиков SP^{+/-} (красным) и их основания (синим). В – записи в среде без Ca²⁺ и с блокаторами активности. Поддержание этих условий в течение 15 минут частично

истощило запасы кальция и инициировало SOCE (не показано). Г₁ – цветовое представление ПКС за вычетом фона (низкий уровень Ca²⁺: синий/голубой; и более

высокие уровни: красный > желтый > зеленый). Г₂ – записи из тех же областей с блокаторами активности и в присутствии внеклеточного Ca²⁺ (2 мМ). Д₁ – примеры ПКС, вызванного кофеином {фоновые уровни флуоресценции вычтены; те же цвета, что и для

Г₁. Д₂ – высвобождение кальция из внутренних запасников в результате применения кофеином (5 мМ), уникально наблюдаемое в основаниях SP⁺ -шипика. Е₁ – амплитуды и

продолжительность колебаний $[Ca^{2+}]_c$ в SP⁺ (серая точка) и SP⁻ головках шипиков (фиолетовая точка), n = 16 парных сравнений для обеих групп, p < 0.001, *t*-тест). E₂ – частота колебаний $[Ca^{2+}]_c$ в SP⁺ головках шипиков (серый), дендритах (черный) и в SP⁻ шипиках (фиолетовый). E₃ – кофеиновые ответы в SP⁺ головках шипиков, в группе SP⁻ дендриты и головки шипов имели примерно равные значения, но эти ответы значительно слабее, чем в участках дендритов группы SP⁺ дендритов (все группы: n = 16, p < 0.001).

Кроме того, частоты активации (рисунок 15, E_2) были выше в головке SP⁺шипиков (серым, 0,5 Гц) по сравнению с SP⁻-шипиками (фиолетовым, 0,2 Гц) или дендритами (черным, 0,1 Гц); n = 16, p < 0,001, дисперсионный анализ (ANOVA). Следовательно, мы заключаем, что SOCE происходит преимущественно в головках SP⁺-шипиков и требует присутствия ША. Таким образом, эти результаты подтверждают нашу первоначальную теорию о том, что в отсутствие синаптической активности ионы кальция попадают в шипик через SOCE и хранятся в ША.

Представленные результаты подтверждают, что STIM/Orai комплекс отвечает за пополнение запасов кальция в ША. Поскольку в центральных нейронах экспрессируются две изоформы белка STIM, STIM1 и STIM2, возникла необходимость исследования их функциональных особенностей.

3.4. Исследование различий в функциях кальциевых сенсоров STIM1 и STIM2 и их связь с локальными флуктуациями [Ca²⁺]с

Согласно данным, представленным в литературе, как STIM1, так и STIM2 экспрессируются в нейронах гиппокампа (Korkotian et al., 2017). Предполагается, что они располагаются в разных нейрональных компартментах или, возможно, экспрессируются на различных этапах

развития нейрона и предназначены для разных функций. В настоящем исследовании было обнаружено, что наблюдается достоверная разница в уровнях STIM1 и STIM 2 в дендритных отростках (филоподиях и шипиках), связанная с возрастом клетки. Так, STIM1 изоформа более распространена в 10-дневных клетках *in vitro* (10 DIV) в сравнении с изоформой STIM2 (рисунок 16), более характерной для нейронов 20 DIV. Это указывает на то, что STIM1 может играть роль в развитии нейронов и формировании синапсов, в отличие от STIM2, который может функционировать в поддержании и регуляции депо-управляемых токов кальция в зрелых нейронах.



Рисунок 16 – Визуализация STIM1 и 2 в культивируемых нейронах гиппокампа с помощью методов иммуногистохимии в присутствии [Ca²⁺]₀ и без него. А&Б - образцы

дендритов, рандомно найденных в культуре возрастом 10 DIV, позитивных на STIM1 (красный) и STIM2 (синий) в клетках, трансфицированных EGFP (зеленый), для визуализации морфологии в присутствии и в отсутствие [Ca²⁺]₀. Очевидно, что 10-дневная культура содержит больше включений STIM1, чем STIM2, а в 20-дневном нейроне наблюдается противоположное соотношение. В бескальциевом состоянии STIM2 локализуется в отростках в молодой и, особенно, в зрелой культуре. В – количественная оценка результатов представлена гистограммой. Разница между STIM1 и 2 в 10 DIV в контроле (+ Ca²⁺) и в отсутствие [Ca²⁺]₀ (– Ca²⁺) очень значительна (контроль: n = 10 дендритов из пяти клеток для каждой группы, ANOVA, *p* < 0,001; в бескальциевой среде: n = 10 дендритов из пяти клеток (контрольные условия: n = 10 дендритов из пяти клеток (контрольные условия: n = 10 дендритов из пяти клеток для каждой группы АNOVA, *p* < 0,001). Г – на гистограмме показана разница между уровнями STIM1 и 2 в 20 DIV в обоих условиях, результаты с высокой достоверностью (контрольные условия: n = 10 дендритов из пяти клеток для каждой группы АNOVA, *p* < 0,001).

Чтобы дополнительно изучить роль STIM1 в формировании дендритных отростков (филоподий И шипиков), ΜЫ произвели конфокальную визуализацию дендритов трансфицированных культивируемых нейронов с высоким разрешением в 10 и 20 DIV (рисунок 17). В молодом возрасте дендриты подвижны, отростки (шипики и филоподии) на них появляются и исчезают. Сравнивая одни и те же дендриты в условиях с Ca²⁺ и без него (через 15 мин в среде без $[Ca^{2+}]_0$), мы обнаружили, что новые филоподии на 10 DIV снабжены включениями STIM1 (рисунок 17, А). Это не относится к дендритным шипикам, которые гораздо менее подвижны по сравнению с филоподиями и имеют меньше включений STIM1 в более зрелых нейронах (рисунок 17 В, Г). Возрастная разница между уровнями STIM1 и 2 четко визуализируется в живой ткани, не подвергавшейся фиксации (рисунок 17, Д), ясно указывая на то, что это несоответствие является подлинным.

Предполагается, что STIM2 является датчиком уровня запасов кальция в клетке. Сравнивая реакцию STIM1 и STIM2 на снижение [Ca²⁺]₀, что, как известно из литературных источников (см. Главу 1), вызывает истощение кальциевых запасов, мы ожидали обнаружить движение молекул STIM в

цитозоле к мембранному Orai1. В нашем эксперименте включения STIM1 не меняли своего положение в течение 15 минут депривации кальция (рисунок 17, Б), но включения STIM2 интенсивно перемещались в филоподии/шипы (рисунок 17, В, Г). Таким образом, только STIM2 достоверно реагирует на снижение $[Ca^{2+}]_0$ в окружающей среде (рисунок 17, Б, Г) и мы полагаем, что это движение связано с запуском механизма притока Ca^{2+} после его депривации.



Рисунок 17 – Флуоресценция STIM 1 и 2 в живых клетках в дендритных отростках (филоподиях, шипиках), в их основаниях и в смежных областях дендрита в контрольной среде (2 мМ Ca²⁺) и через 15 мин после инкубации со средой без Ca²⁺. А – флуоресценция STIM1 (красный) и 2 (зеленый) в клетках, инкубированных с Ca²⁺ и без него, 10 DIV. Б – гистограмма: усредненная флуоресценция минус фон для каждой группы, 10 DIV. Разница между уровнями STIM1 и 2 в основании в обоих условиях и разница между STIM2 с Ca²⁺

и без него в отростках очень значима (n = 10 дендритов из шести клеток для каждой группы, ANOVA, p < 0.001). В – флуоресценция STIM1 (красный) и 2 (зеленый) в клетках, инкубированных с Ca²⁺ и без него, 20 DIV. Г – гистограмма: усредненная флуоресценция минус фон для каждой группы, 20 DIV. Разница между уровнями STIM1 и 2 в основаниях отростков в обоих условиях не значима, но разница между STIM2 в среде с Ca²⁺ и без него в отростках достоверна (n = 8 дендритов из четырех клеток для каждой группы, ANOVA, p < 0,001). Д – флуоресценция STIM1 и STIM2 в областях отростков (филоподий или шипиков) и их основаниями совместно с вычитанием фона на 10 DIV, 15 DIV и 20 DIV. DIV 10: n = 34; DIV 15: n = 30; DIV 20: n = 35 отростков. Е – пример перемещения включений STIM1/2 в отростке (шипике) в среде с Ca²⁺, после 15-ти минутной инкубации без него, и после возвращения Ca²⁺ в среду, 15 минут давалось на восстановление концентрации Ca²⁺. Белый контур присутствует на панелях Е в качестве примера исследуемых областей.

Связь STIM1 с морфологическими изменениями в нейронах также подробно изучали с помощью визуализации дендритных сегментов в присутствии флуоресцентного STIM1 (рисунок 18). Молодые нейроны гораздо более динамичны, чем старые, и новые филоподии и шипы могут образовываться и устраняться в течение 15 минут, также и во время визуализации. В нейронах промежуточного возраста (15 DIV) как филоподии, так и новые шипы могут формироваться в течение 15 мин наблюдения, а в клетках 20 DIV наблюдается существенно меньшее количество динамичных отростков. Во всех случаях большинство новых отростков включали в себя STIM1. Синими стрелками на примере с панели A₂ рисунка 18 отмечены зрелые грибовидные шипики или шипики обрубки, светлыми стрелками отмечены филоподии, образовавшиеся за время записи.

Наибольшее количество отростков, имеющих включения STIM1, наблюдались на 10 DIV, наименьшее – на 20 DIV (рисунок 18, Б-Г). Эти данные указывают на доминирующую роль включений STIM1 в поддержании пластичности нейронов на стадии созревания.


Рисунок 18 – Связь между STIM1 и ростом отростков. А₁ – включения STIM1 показаны в двух моментах времени; t = 0 и t = 15 мин на А₂. Верхние панели изображений демонстрируют EGFP (морфологический маркер, зелёный) и STIM1-mCherry (красный). Нижние панели показывают те же поля с затемненным EGFP. Б – общее соотношение филоподий и шипиков, содержащих STIM1, в 10, 15 и 20 DIV показано в абсолютных значениях. Усреднённое количество отростков на поле (филоподий и шипиков) показано для всех трех возрастов (n = 40 полей для каждого возраста). В – нормализованная доля STIM1-положительных отростков в процентах от общего количества отростков на поле. Г – количество новых отростков, содержащих включения STIM1 для DIV 10, 15 и 20 в стандартном поле за 30 мин.

Известно, что включения STIM1 подвижны, перемещаются вдоль дендритов, проникая в дендритные шипики и филоподии. Чтобы исследовать возможную связь подвижности STIM1 с локальными колебаниями окружающего $[Ca^{2+}]_c$, мы проследили за включениями STIM1, используя записи конфокальной визуализации, и обнаружили, что они движутся вдоль дендритов с невысокой скоростью (рисунок 19, А). Одновременное измерение окружающего $[Ca^{2+}]_c$ четко указывает на то, что прохождение точек STIM1 в области фокуса связано с переходным локальным всплеском $[Ca^{2+}]_c$.



Рисунок 19 – Подвижные и стабильные включения STIM1, EBFP (синий), STIM1 (красный). А – три изображения демонстрируют один и тот же дендритный сегмент в моменты времени 0, 30 и 50 секунд. Сегмент содержит одно стабильное включение и одно подвижное включения STIM1. Подвижное включение переместилось слева направо. Б – при помощи Fluo-2 (зелёный) происходила визуализация [Ca²⁺]_c. В – в момент времени, когда включение присутствует в области фокуса (красный кружок), могут возникать

переходные кальциевые события (ПКС). Г – в соседней области (белый кружок) дендрита не наблюдаются ни включения, ни ПКС.

Локальный подъем [Ca²⁺]_с наступает при появлении включений STIM1 в зоне фокуса исследования (рисунок 20). Этот локальный подъём [Ca²⁺]_с не наблюдается в областях дендрита, прилегающих к области нахождения перемещающихся включений STIM1 (рисунок 20, В).



Рисунок 20 – Подвижные и стабильные включения STIM1 и их связь с ПКС. A₁–A₃. На панелях показан уровень [Ca²⁺]_с в том же дендритном сегменте, что и на рисунке 19 A, и в тех же временных точках. Области анализа отмечены белый стрелкой. Текущее местоположение мобильного включения STIM1 отмечено красным контуром на A₂.

Другой красный контур, идентичный на всех трёх панелях, соответствует стабильному включению STIM1. В смежных областях данного участка дендрита не наблюдается других включений, как и Ca²⁺-событий. Б – усредненные данные, n = 10 областей сравнения из разных клеток и разных культур. Анализировались события в трёх временных точках: непосредственно перед входом включений в выбранную зону фокуса (до), при наличии включения в этой области (во время) и сразу после того, как подвижные включения покинули область (после). Одновременно производились измерения из случайно выбранной близлежащей (смежной) области дендрита. Статистика для STIM1 (красным) и смежных областей (серым) для этих временных точек. В – та же статистика, как и в Б, но для флуоресцентного сигнала Fluo-2 (тёмно-зелёный) и он же в смежной области (светлозелёный).

Такой локальный подъем $[Ca^{2+}]_c$ отличается от вызванного нейронной активностью синхронизированным потенциалом действия обратного распространения, который имеет быстрое время нарастания, менее 0,5 секунд до пика и быстрое затухание, и не связан с подъёмом флуоресценции Fluo-2, вызванной подвижными включениями STIM1 (рисунок 21, Б). Время подъёма флуоресценции Fluo-2 существует в зависимости от подъёма флуоресценции STIM1 (рисунок 21, А), и его длительность зависит от скорости перемещения включения. Результаты показывают, что чем меньше размер включения STIM1, тем оно более подвижно (рисунок 21, Б, В, Г).



Рисунок 21 – Подвижные включения STIM1 вызывают локальный подъём [Ca²⁺]_c. А – усреднённые флуоресценция Fluo-2 (вверху, зеленый) и флуоресценция STIM1 (внизу, красный), n=10 дендритов. Флуоресценция STIM1 предшествует повышению [Ca²⁺]_c и сохраняется после того, как происходит спад [Ca²⁺]_c. Б-Г – скорость движения (мкм/50 секунд с трех типов включений STIM1, ранжированных по размерам (большие: > 2 мкм, средние: 1–2 мкм и маленькие: <1 мкм в диаметре) в трех возрастных группах: 10, 15 и 20 DIV. Малые точки двигаются быстрее средних и крупных во всех возрастных группах (*p* < 0,05). Более высокая скорость движения наблюдается при 15 DIV в сравнении с 10 и 20

DIV для средних и малых включений STIM1 (средние: n = 27, 19 и 17 для 10, 15 и 20 DIV соответственно, F = 3,58, *p* < 0,05; малые: n = 27, 14 и 8, F = 3,02, *p* < 0,05). Д – глобальное

событие [Ca²⁺]_с, вызванное сетевой активностью нейронов, не связано с изменением флуоресценции STIM1 и имеет более быстрый временной шаг в сравнении с изменением [Ca²⁺]_с, вызванным включением STIM1.

Мы провели более детальное исследование влияния включений STIM на изменения [Ca²⁺]_с. Эксперимент проводили с участием культур разных возрастов как для STIM1, так и для STIM2 (рисунок 22). Во всех случаях сравнения проводились с соседними областями в дендритах, не снабженных включениями STIM. В нормальных условиях не было выявлено корреляции между перемещениями включений STIM2 по дендриту и какими-либо изменениями в $[Ca^{2+}]_c$ (рисунок 22, Γ -E), в отличие от случаев со STIM1 (рисунок 22, 3). В целом, включения STIM2 имеют гораздо более низкую подвижность, чем включения STIM1 (рисунок 22, А, И), или они вовсе неподвижны (84%) всех включений STIM2 стабильны, 30 n = репрезентативных включений из шести клеток, DIV 20). Общее количество подвижных/стабильных включений на сегменты длиной 50 мкм: DIV 10: 0,4± $0.2 / 3.3\pm0.4$ (9 клеток, n = 14 сегментов); DIV 15: $0.5\pm0.4 / 3.4\pm0.4$ (шесть клеток, n = 13 сегментов); DIV 20: 0.9 ± 0.3 / 4.3 ± 0.2 (шесть клеток, n = 10 сегментов). При формировании новых филоподий на DIV 10 включения STIM2 не были замечены в связи с новообразованными отростками (рисунок 22, Л). Таким образом, мы подтвердили гетерогенность функций включений STIM1 и STIM2 в развивающейся и зрелой культуре нейронов гиппокампа.



Рисунок 22 – Подвижные включения STIM2 и их сравнение с включениями STIM1. А – иллюстрация стабильных и мобильных точек STIM2-YFP (зеленый) в течение 500 с, DIV 10, морфологический маркер EBFP (синий). Б – тот же дендритный сегмент показан с флуоресценцией Calcium Orange (СО, красный). Желтым и белым кружками отмечены две

области: с включением STIM2 и смежная область соответственно. В₁-В₃ – панели показывают область фокуса исследования, отмеченную стрелкой, до, во время и после пребывания включения точки STIM2 (желтый контур). Слева показана контуром область стабильного включения. Г – усредненная флуоресценция мобильного STIM2 до, во время и после входа включения в интересующую область (слева, красные столбцы) и в смежной области дендрита (серый), n = 6 парных областей, пять клеток DIV 10. Д – флуоресценция СО в то же время и в тех же областях, что и для Г, та же статистика. Е – соответствующий график, демонстрирующий изменение флуоресценции STIM2 (красный) и CO (зеленый) с

течением времени внутри отмеченной области. Ж – смежная область без STIM2 и

кальциевых событий. 3 – флуоресценция включения STIM1 с течением времени внутри отмеченной области для сравнения с STIM2: можно обнаружить ПКС (Fluo-2, зеленая кривая). И – средняя скорость подвижных включений за 50 с, DIV 15, независимо от их размера, STIM1: 5,9±0,8 мкм, n = 27 репрезентативных подвижных включений из 9 клеток; STIM2: 0,9±0,1 мкм, n = 20 репрезентативных подвижных включений из 8 клеток. Подвижность включений STIM2 намного ниже, чем у STIM1, разница достоверна, *t* = 6,39, *p* < 0,001. К – пример клетки в 10 DIV, котрансфицированной STIM1 (красный) и STIM2 (зеленый). EBFP в качестве морфологического маркера клеток (синий). Л – пример спонтанного роста филоподий на DIV 10 в течение 1000 секунд в нейроне, трансфицированном STIM2 (зеленый). Не наблюдается какой-либо связи роста с включения STIM2.

Характер изменений концентрации кальция в связи с движением STIM1 также изучали путем тщательной локализации флуоресцентных включений с локальными изменениями цитозольного кальция в областях фокуса (где присутствовало включение) и смежных областях дендрита, где включения отсутствовали (рисунок 23). Проникновение включений STIM1 в область интереса сопровождалось увеличением спонтанных кальциевых всплесков (рисунок 23, А, зелёные стрелки на В), сходных с описанными ранее в литературе в качестве кальциевых искр (Ross, 2015). Эти события продолжительнее, чем случайный шум, и наблюдаются только при наличии включений STIM1 в зоне фокуса (весьма значимые статистические различия на рисунке 23, E_1 - E_3 , Γ). Хотя настоящие результаты не указывают на механизм, с помощью которого STIM1 вызывает кальциевую искру/всплеск, предыдущие исследования предположили такие механизмы (Ross, 2015; Dittmer et al., 2017), и необходимы дальнейшие эксперименты, чтобы прояснить эту возможность в культивируемых нейронах.



Рисунок 23 – Подвижность включений STIM1 коррелирует с локальными всплесками Ca²⁺. А – перемещение STIM1-включения из области 1 в область 2 (вверху, слева) и по сравнению со смежной областью, где включения STIM1 не наблюдались (вверху, справа). Ниже показаны колебания [Ca²⁺]_c в соответствующей области 1 (красный) и в смежной с ней области, а также колебания кальция в области 2 (синий), куда переместилось

включение STIM1, также с сигналом от смежной области. Б₁-Б₃ – усредненная флуоресценция STIM1 и флуоресценция Fluo2 в двух областях и моментах времени, когда был обнаружен STIM1, а также количество связанных с ними всплесков Ca²⁺ за 20 секунд и то же в смежных с ними областях, n = 9 клеток, из каждой по набору групп сравнения, DIV 15. В – масштабированный сигнал из области 1 в присутствии (слева) и отсутствии (справа) включения STIM1. Мы использовали 2 стандартных отклонения от среднего (зелёные линии), для идентификации и подсчёта всплесков Ca²⁺-флуоресценции

(отмечены зелеными стрелками). Γ – усреднённая флуоресценция STIM1 и [Ca^{2+}]_{c} в областях стабильных включений и смежных с ними областей за отрезок времени 10 секунд, количество связанных Ca^{2+} -всплесков за 20 секунд, n = 9 клеток, DIV 15.

Эти эксперименты показывают, что STIM1, но не STIM2, связан с локальной динамикой $[Ca^{2+}]_c$ и образованием новых филоподий. Поскольку филоподии обнаруживаются преимущественно в молодых нейронах, тогда как в более старых нейронах они преобразуются или замещаются стабильными шипиками, проведённые сравнения STIM1-ассоциированных филоподий и зрелых дендритных шипиков в 10 DIV и 20 DIV культурах (рисунок 17) показали, что нахождение STIM1 связано в большей степени с филоподиями и в меньшей степени с шипиками в молодых культурах. Однако это нивелировалось в более зрелых/старых нейронах, где STIM2 играет роль в притоке Ca^{2+} , в первую очередь в ситуации с его дефицитом. Таким образом, можно сделать вывод, что STIM1 играет важную роль в формировании филоподий в молодых клетках, а STIM2 лежит в основе механизма, ответственного за приток кальция при низком уровне его запасов, особенно в зрелых нейронах.

3.5. Исследование фундаментальной связи уровня цитозольного кальция с функцией митохондрий

В культивируемых нейронах гиппокампа можно обнаружить два типа спонтанной активности: синхронизированную активность, выраженную в виде сетевых разрядов с участием нейронов, одновременно генерирующих потенциалы действия (ПД) и локальные синаптические события. Во время сетевого разряда генерируются потенциалы действия, распространяющиеся из сомы обратно в дендриты (обратные ПД), которые охватывают все проксимальные дендриты нейрона. Этот тип активности мы будем называть генерализованным. Другой тип активности является локальным и включает прежде всего, но не исключительно, синаптический вход. Такая активность может быть ограничена небольшой областью дендрита, но, если она достаточно сильна, то может распространяться от места генерации к остальной части дендрита или к соме.

Измерения спонтанной активности $[Ca^{2+}]_{c}$ В культивированных нейронах гиппокампа производились с помощью флуоресцентного высокоаффинного сенсора Fluo-2. Записывались два типа событий: локальные и генерализованные. Локальные переходные кальциевые события (ПКС) были ограничены небольшой областью дендрита размером 2-5 мкм. И предположительно вызваны локальной синаптической активностью, в то время как генерализованные кальциевые события (ГКС) были связаны с случаях события [Ca²⁺]_с сопровождались обратными ПД. В обоих отсроченными всплесками [Ca²⁺]_m. Кальциевые события в митохондриях, вызванные обратными ПД, имели более длительную кинетику подъёма, сохраняясь в конце нисходящей части генерализованного [Ca²⁺]_с -события и наблюдались во всех митохондриальных кластерах клетки. В случае кратковременные $[Ca^{2+}]_{m}$ локальных всплесков изменения уровня ограничивались той частью митохондриального кластера, которая находилась непосредственно в очаге активности [Ca²⁺]_с, и быстро угасали, а ответов в соседних областях дендрита, за редким исключением, не наблюдалось. Результаты флуоресценции показывают, анализа что локальные цитоплазматическая и митохондриальная концентрации кальция коррелируют между собой, демонстрируя сигнальный путь Ca²⁺, который соединяет постсинаптическую мембрану с местными митохондриальными кластерами.

В первой серии экспериментов мы сосредоточились на локальных событиях. Мы одновременно визуализировали $[Ca^{2+}]_c$ и $[Ca^{2+}]_m$ в высоком разрешении и с достаточно высокой скоростью в участках дендритов (пример на рисунке 24), и обнаружили изменения этих двух параметров с течением времени: практически синхронные всплески в обоих каналах визуализации, которые ограничены небольшой областью (например, Ц {*центр*} на рисунке 24), чаще всего, в непосредственной близости от дендритного шипика.



Рисунок 24 – Митохондриальные кластеры (красным – mtRCaMP). Области регистрации [Ca²⁺]_m обведены белыми тонкими линиями: центральная (Ц), смежные правая (П), левая (Л), и дальняя (Д) области в дендрите (синий, EBFP) Белыми жирными линиями обведены регионы регистрации локальных изменений [Ca²⁺]_c.

Изменения [Са²⁺]_с в шипике предшествовали аналогичным изменениям в [Ca²⁺]_с дендрита и [Ca²⁺]_m в этом дендрите (рисунок 25). Усредненный ответ $[Ca^{2+}]_{m}$ В области митохондриального кластера, расположенного непосредственно под шипиком (Ц), имеет аналогичный ход времени, включая время пика и затухания со средней продолжительностью около 304±28 мс (рисунок 25, А). Локальные события [Ca²⁺]_с в шипике были приняты за 100%, и [Ca²⁺]_т ответы в центральных (подшипиковых) областях митохондриальных кластеров наблюдались в 70% случаев с коэффициентом корреляции R, равным 0,704 (*p* < 0,001). В то же время, в смежных областях кластера (Л и П на рисунке 24) и дальних митохондриях или их кластерах (как Д на рисунке 24) события выявлялись в незначительном количестве случаев. То есть, имела место значительная корреляция с источником локального события [Ca²⁺]_с (рисунок 25, Б).



Рисунок 25 – Локальные изменения кальция в культуре нейронов гиппокампа. А – локальные всплески [Ca²⁺]_с в области шипика (вверху, чёрный) и в дендрите (вверху, зелёный), и связанные с ними всплески [Ca²⁺]_m (внизу, красный) в области митохондрии под шипиком в то же время, n = 12 событий (усреднение с области Ц рисунка 24). Б – процент событий [Ca²⁺]_c (зеленый) и ответов [Ca²⁺]_m (красный) в дендрите, связанных с синаптическими событиями [Ca²⁺]_c (черный) в области шипика (принятыми за 100%), в центральной, смежных и дальних регионах в тот же момент времени, соответственно: n=3 клетки, 55 ПКС в хорошо визуализируемых грибовидных шипиков в проксимальных участках дендрита, амплитуда которых превышала 2 стандартных отклонения (CO).

Связанными событиями [Ca²⁺]_с и [Ca²⁺]_т считались всплески Ca²⁺, пиковая амплитуда которых также превышала 2CO, отсутствием ответа считался сигнал, не превышающий 2CO. В – измеренные пиковые значения амплитуды [Ca²⁺]_т событий во время событий

[Ca²⁺]_c, наблюдаемых в центральной области и смежных областях различных митохондриальных кластеров (n = 91 измерение ПКС для n = 13 кластеров под грибовидными шипиками в проксимальных дендритах, с 8-ми клеток, 2 клеточные культуры; *p* < 0,001, *t*-тест). Γ – события [Ca²⁺]_c (зеленый): малые (амплитуда пика до 0,45, n = 18), средние (0,45 – 0,8, n = 55) и большие (более 0,8 у.е. флуоресценции, n = 18) и происходящие в это же время события [Ca²⁺]_m (те же, что и для В); малые [Ca²⁺]_m / средние [Ca²⁺]_m - * (0,05 > *p* > 0,01), малые [Ca²⁺]_m / большие [Ca²⁺]_m - * (0,05 > *p* > 0,01), средние [Ca²⁺]_m / большие - не достоверно (н/д), однофакторный дисперсионный анализ, F = 4,43674, апостериорный критерий Фишера.

Усреднённые сигналы ряда типичных событий локальных В центральной и смежных (Л или П) областях (как на рисунке 24) продемонстрирован на рисунке 25 А, где фокус событий находился в центре, а изменения флуоресценции и [Ca²⁺]_m, и [Ca²⁺]_c были, действительно, ограничены небольшой областью дендрита (набор данных из единичных случаев для усреднения представлен в приложении 1). Кроме того, те или иные дальние области дендрита (как на рисунке 24, область Д) содержат митохондриальные кластеры, которые также могут генерировать локальные всплески кальция, не зависящие от изменений в области Ц или смежных областях митохондриального кластера (Л, П), даже если они находятся на расстоянии менее 10 мкм друг от друга (рисунок 25, Б). Наложение сигналов флуоресценции в смежных областях (в то же время, что и события в области фокуса исследования, центральная область на рисунке 26, А или дальняя область на рисунке 26, Б) показывает отсутствие связанных локальных событий как для [Ca²⁺]_с, так и для [Ca²⁺]_m, что подтверждает тот факт, что локальные события ограничены в своём распределении по дендриту и буферизуются локальным участком митохондриального кластера. Такое чрезвычайную обслуживания разграничение имеет важность для

постсинаптическими митохондриями конкретных активных отростков шипиков или созревающих филоподий.



Рисунок 26 – Распределение уровней [Ca²⁺]_m, обнаруженных во время локальных событий [Ca²⁺]_c. А – усреднённый сигнал [Ca²⁺]_c, в области Ц (см. рисунок 24) и в смежных

областях (Л, П) во время локальных событий [Ca²⁺]_с в области Ц (верхняя панель, зелёный) и соответствующий сигнал [Ca²⁺]_m (нижняя панель, красный), n = 7. Б – усреднённый сигнал [Ca²⁺]_c, в области Ц, П и Д во время локальных событий [Ca²⁺]_c в области Д (верхняя панель) и соответствующий сигнал [Ca²⁺]_m в тех же областях (нижняя панель, красный), n = 5.

Статистически, изменения в области активности значительно выше, чем те, которые можно обнаружить на расстоянии 2-3 мкм от фокуса наблюдения (рисунок 25, Б) и даже в соседнем сегменте того же митохондриального кластера (рисунок 25 В, Г). Единичный пример сопряжённых локальных событий [Ca²⁺]_с и [Ca²⁺]_т показан на рисунке 27.



Рисунок 27 – пример локализации ответа [Ca²⁺]_m на единичное локальное событие [Ca²⁺]_c в подшипиковой области. Синим (EBFP) показан контактирующий с аксоном дендритный

шипик, в основании которого имеется митохондриальный кластер (красным, mtRCaMP).

За локальным всплесков [Ca²⁺]_с в подшипиковой области (цифра 2, Fluo-2, зелёные кривые) следует всплеск [Ca²⁺]_m (красные кривые), но только в зоне 2. Смежная область кластера (1) демонстрирует весьма незначительный подъём флуоресценции, а в зоне отсутствия митохондрии нет информации в сигнале, тогда как сигнал [Ca²⁺]_с, напротив, незначительно отражается в смежном пространстве дендрита.

Более того, амплитуда событий [Ca²⁺]_с несколько коррелировала с уровнями [Ca²⁺]_m (рисунок 25, Г): меньшие ПКС были связаны с более низкой амплитудой событий [Ca²⁺]_m, и наоборот. Этот эксперимент демонстрирует, что локальный [Ca²⁺]_m следует за локальным [Ca²⁺]_c и может быть связан с регуляцией митохондриальных Ca²⁺ функций.

Мы также визуализировали в тех же клетках, находящихся в стандартной среде для визуализации (контрольная среда), некоторые глобальные/сетевые кальциевые события или ГКС, где [Ca²⁺]_с повышается одновременно во всем дендрите (рисунок 28, А). В этих условиях не было в [Ca²⁺]_m между митохондриальными кластерами или их различий подобластями во всей клетке (в качестве примера показан сигнал из областей рисунка 24 (смежная/П, Ц и Д, область Л демонстрирует аналогичный сигнал, не представлен на рисунке). Можно отметить медленный общий подъём $[Ca^{2+}]_m$, сменяющийся медленным общим спадом, на которые накладываются отдельные события [Ca²⁺]_m с гораздо более высокой кинетикой, так называемые «всплески». Они инициируются в начале ГКС [Ca²⁺]_с и продолжают возникать еще некоторое время, а именно, в течение нескольких секунд после него. Чтобы рассмотреть функциональную значимость этих изменений Ca²⁺, мы использовали два фармакологических препарата, которые взаимодействуют с митохондриальными функциями: кофеин и СССР. Кофеин является агонистом RyR, повышая их чувствительность к Ca²⁺ во время кальций-инициированной секреции кальция, CICR (см. Главу 1). Кофеин способен увеличивать выброс Ca²⁺ из ЭР в областях MERC, что, как предполагается, модулирует митохондриальные функции (Dragicevic et al.,

2012; Xu et al., 2020). СССР является митохондриальным разобщителем и в его присутствии митохондрии теряют свой мембранный потенциал и способность запасать кальций (Kann, Kovács, Heinemann, 2003; Kann et al, 2003; Koncha et al, 2021). Эти два препарата по-разному изменяли кинетику связанных с $[Ca^{2+}]_c$ событий $[Ca^{2+}]_m$, но увеличивали общую амплитуду кальциевых событий как в цитозоле, так и в митохондриях (рисунок 28, Б, В). Изменения в динамике и амплитуде синхронизированного сетевого всплеска $[Ca^{2+}]_c$ и изменения активности $[Ca^{2+}]_m$ не совпадали, указывая на то, что последние не являются прямым результатом изменений $[Ca^{2+}]_c$, индуцированных обратным ПД.



Рисунок 28 – Глобальные изменения [Ca²⁺]_m в культивируемых нейронах гиппокампа. А – примеры глобальных событий в смежном, центральном и дальнем регионах (согласно рисунку 24). Б – амплитуда сигнала существенно повышается в кофеине. В – амплитуда

сигнала существенно повышается с СССР, но с отличающейся кинетикой. Сигнал [Ca²⁺]_с в дендритах показан зеленым, сигнал [Ca²⁺]_m – красным. А-В – для всех регионов ответ

 $[Ca^{2+}]_m$ эквивалентен в контрольной среде, с кофеином и СССР.

В целом, кофеин (5 мМ) вызывал увеличение частоты ГКС в $[Ca^{2+}]_c$ и параллельное увеличение коррелированных подъёмов $[Ca^{2+}]_m$ (рисунок 29, А). Добавление в среду СССР (10 мкМ) вызывало комплексное воздействие на клетки. Первоначально это проявлялось в высокочастотных синаптических всплесках, за которыми следовало увеличение количества и интенсивности глобальных сетевых всплесков (рисунок 29, Б). Также наблюдалось увеличение базального уровня $[Ca^{2+}]_c$, а затем и $[Ca^{2+}]_m$, вероятно, из-за высокой частоты всплесков. При снижении амплитуды и частоты событий, которое происходило через 5-10 минут после применения препарата, $[Ca^{2+}]_m$ постепенно снижался в результате индуцированного процесса разобщения митохондриальных мембран (рисунок 29, Б).



Рисунок 29 – Пример спонтанной активности [Ca²⁺]_с и коррелированных подъёмов [Ca²⁺]_m до и с применением фармпрепаратов. А – при добавлении кофеина (5 мкМ) в среду для

визуализации непосредственно во время записи происходит увеличение амплитуды и частоты спонтанных глобальных событий [Ca²⁺]_c, увеличение уровня [Ca²⁺]_m, связанное с тем, что кинетика ответов [Ca²⁺]_m запаздывает по отношению к событиям [Ca²⁺]_c, не успевая вернуться к базовому уровню до начала следующего спайка. Данный эффект сохраняется, пока в среде присутствует кофеин. Б – при добавлении СССР (10 мкМ) в контрольную среду начальная стадия эффекта имеет сходство с таковой у кофеина, однако примерно через 5 минут после аппликации СССР наблюдается полное прекращение спонтанной активности и падение уровня флуоресценции [Ca²⁺]_m. Сигнал [Ca²⁺]_c показан зелёным цветом (Fluo-2), сигнал [Ca²⁺]_m - красным (mtRCaMP).

Эти результаты также подтвердили более ранние предположения (Storozhuk et al., 2005; Tonkikh, Carlen, 2009) о том, что начальный компартмент, поражаемый СССР, является пресинаптическим окончанием, вызывающим кальций-зависимое повышение высвобождения нейротрансмиттеров, в то время как дендритные митохондрии поражаются несколькими минутами позже. Усреднённое количество сетевых всплесков в контрольной среде для визуализации, в присутствии кофеина и СССР в первые 5 минут инкубации и после представлено на рисунке 30, Б. Как кофеин, так и СССР не оказывали существенного влияния на кинетику [Ca²⁺]_с (рисунок 30, А, верхняя панель), но они оказывали существенное влияние на временную динамику связанного подъема [Ca²⁺]_m на фоне ГКС/обратного ПД: амплитуда ответа увеличивалась и пролонгировалась в присутствии кофеина (рисунок 30, А, нижняя панель, фиолетовая кривая), вызывающего высвобождение Ca²⁺ из ЭР депо. Это свидетельствует о том, что митохондрии буферизуют не только окружающий цитозольный, но и секретирующийся из ЭР кальций в областях МАМ. Смещение амплитуды ответа на начало ГКС и резкий спад в условиях с СССР (там же, серая кривая), в свою очередь, является подтверждением нарушения буферирующих митохондриальных кальциевых функций. В присутствии СССР подъёмы уровня [Ca²⁺]_m, связанные с ГКС в цитозоле, в первую секунду подъёма [Ca²⁺]_с наблюдались чаще и со значительно большей амплитудой, нежели в контроле или с кофеином (первая пара красных пунктирных линий на рисунке 30, А), а на поздней стадии, подъём [Ca²⁺]_m на

фоне спада [Ca²⁺]_с (вторая пара красных пунктирных линий на рисунке 30, А) снижался гораздо быстрее, чем в контроле и особенно с кофеином.



Рисунок 30 – Глобальные события Ca²⁺ (ГСК) в контроле, с кофеином и СССР. А – усреднённая амплитуда событий [Ca²⁺]_с в дендрите, связанных с обратным ПД (вверху) и

связанные с ними события $[Ca^{2+}]_m$ (внизу). Контроль: восемь клеток, n=16 митохондриальных кластеров; кофеин (5 мМ): четыре клетки, n = 12 кластеров; СССР (10 мкМ): четыре клетки, n = 12 кластеров. Было взято эквивалентное количество событий с каждого кластера. Использовались две клеточные культуры гиппокампа. Сравнивали нормированную флуоресценцию двух периодов времени: в 1-ю секунду (см. пунктирные красные линии) от начала подъема $[Ca^{2+}]_c$: $[Ca^{2+}]_m$ СССР / контроль и СССР / кофеин - *, *p* < 0,05 , контроль / кофеин - н/д; второй период – в 3-ю секунду от начала события $[Ca^{2+}]_c$: $[Ca^{2+}]_m$ контроль / кофеин/СССР - ***, *p* < 0,001; ANOVA, F(1-я сек) = 93,39491, F(3-я сек) = 628,7667, апостериорный критерий Тьюки. Б – количество ГКС в контроле и кофеине (в течение первых пяти минут после инфузии и позже, вверху) и столько же в контроле и СССР (внизу) за единицу времени (200 секунд). Контроль / кофеин 5 мин - ***, *p* < 0,001; контроль / кофеин > 5 мин - **, 0.01 > *p* > 0,001; контроль / СССР 5 мин - **, 0,01 > *p* > 0,001; контроль / СССР > 5 мин - ***, *p* < 0,001, *t*-критерий.

Для дальнейшей детализации изменений [Ca²⁺]_m, связанных как с локальными, так с глобальными событиями [Ca²⁺]_с, мы нормировали и усреднили события для достаточного количества митохондрий из разных клеток (рисунок 31, A). Мы обнаружили, что на фоне общего подъёма [Ca²⁺]_m в ответ на глобальное событие [Ca²⁺]_с, возникают отдельные быстрые всплески [Ca²⁺]_m, амплитуда которых была достаточной для надежной идентификации. В частности, мы использовали критерий отбора с двумя стандартными отклонениями, как показано на встроенной панели на рисунке 31, А. Кинетика этих всплесков [Ca²⁺]_m, в частности, длительность и амплитуда, были крайне схожи с всплесками [Ca²⁺]_m, которые наблюдались в ответ на локальные события [Ca²⁺]_с (рисунок 25). Мы исследовали параметры этих всплесков (рисунок 31, Б). Амплитуда и продолжительность таких всплесков на фоне общего подъёма [Ca²⁺]_т в сравнении с локальными всплесками [Ca²⁺]_т не отличались. Однако в кофеине в обоих случаях происходило достоверное увеличение продолжительности события (контроль / кофеин на фоне ГКС 325±23 / 406±41 мсек и локальные всплески контроль / кофеин 304±28 / 468±43 мсек, рисунок 31, В₂). Это увеличение справедливо и для цитозольных ПКС (рисунок 31, В₁, фиолетовая кривая). В случае с СССР происходили довольно быстрый рост и затухание отдельных событий в сравнении с таковыми с кофеином. Сходство всплесков на фоне общего подъёма [Ca²⁺]_m с локальными событиями [Ca²⁺]_т подтверждается их прямым сравнением друг с другом в контроле и с обоими препаратами (рисунок 31, Д₁-Д₃): не было статистически значимых различий между усреднёнными локальными всплесками и усреднёнными всплесками на фоне ГКС: 304±28 / 324±23 мсек для контроля, 468±43 / 405±41 мсек для кофеина и 194±18 / 171±11 мсек для СССР, соответственно.

Мы произвели подсчёт обоих типов событий в митохондриях и выяснили, что с кофеином количество локальных событий [Ca²⁺]_m, связанных с цитозольными ПКС, значительно увеличилось, в то время как количество этих событий в присутствии СССР уменьшалось (рисунок 31, Г, закрашенные

столбцы). Аналогичным образом количество всплесков на фоне общего подъёма $[Ca^{2+}]_m$, связанного с ГКС в цитозоле, резко возрастало в контроле и кофеине (рисунок 31, E₂, периоды 2 и 3), тогда как с СССР увеличение наблюдалось только в начале всплеска ГСК (период 2 на панели E₁), но затем (период 3) наблюдался резкий спад (рисунок 31, E₂). Оба препарата вызывали сильное увеличение частоты всплесков $[Ca^{2+}]_m$ на фоне общего подъёма, связанного с ГКС. Такие всплески не синхронизированы (рисунок 31, E₁), поэтому нивелируются при усреднении митохондриальных ответов (как на рисунке 30, А, нижняя панель).



Рисунок 31 – Сравнение отдельных изолированных всплесков митохондриального кальция во время глобального и локального кальциевых событий в цитозоле. А - пример глобального события [Ca²⁺]_c. Общий подъём Ca²⁺ в митохондриях во время глобального события [Ca²⁺]_c содержит отдельные изолированные всплески [Ca²⁺]_m. Б – усреднение всплесков с общих глобальных подъёмов [Ca²⁺]_m; n = 6 глобальных подъёмов в каждой группе сравнения; сравнивали равное количество всплесков из каждого подъёма. В₁-В₂ –

усреднение локальных изменений [Ca²⁺]_c (B₁) и соответствующего [Ca²⁺]_m (B₂) в тех же областях дендрита в контроле (черный), с кофеином (5 мМ, фиолетовый) и с СССР (10 мкМ, серый), синхронизированных по пику локального события [Ca²⁺]_c; п (контроль) = 26

ПКС; n (кофеин) = 27 ПКС; n (СССР) = 12 ПКС из разных кластеров. Γ – количество

локальных ПКС в цитозоле (пустые фигуры) и связанных с ними локальные митохондриальные кальциевые реакции (закрашенные фигуры) в кластерах в контроле (черный), кофеине (фиолетовый) и СССР (серый) за единицу времени (50 секунд); n = 6 кластеров в каждой группе; [Ca²⁺]_c, F = 8,9924: контроль/кофеин - ***, контроль/СССР – н/д, кофеин/СССР - *; [Ca²⁺]_m, F = 22,16832: контроль/кофеин - *, контроль/СССР - **, кофеин/СССР - ***; однофакторный дисперсионный анализ, апостериорный критерий

Фишера. Д₁-Д₃ – сравниваются амплитуды усредненных отдельных всплесков из глобальных [Ca²⁺]_m событий (красный) и локальных всплесков [Ca²⁺]_m (черный) в контроле (Д₁), кофеине (Д₂) и СССР (Д₃) в кластерах; статистика такая же, как для B₁-B₂.

Е₁-Е₂ – пример записи цитозольного кальция (зеленый) и митохондриального кальция (красный). Запись разделена на периоды времени: 1 - до глобального кальциевого события, 2 - от начала подъема до 2/3 спада от пика, 3 - до возврата кальция к исходному уровню, 4 - после глобального события. Количество локальных и глобальных событий [Ca²⁺]_m в виде всплесков из временных периодов в Е₁, нормализованные к временному интервалу 5 секунд (E₂), n = 3 клетки в каждой группе, эквивалентное количество кластеров: 1 - контроль / кофеин** / СССР; F = 14,89975; 2 - контроль / кофеин* / СССР***; F = 7,32176; 3 - контроль/кофеин/СССР***; F = 87,52905; 4 - контроль /

кофеин*** / СССР*; F = 31,49251, однофакторный дисперсионный анализ, апостериорные тесты Тьюки.

Для того, чтобы убедиться, что отдельные изолированные всплески митохондриального кальция не являются шумом или влиянием Fluo-2 флуоресценции, мы трансфицировали клетки только маркером [Ca²⁺]_m mtRCaMP. В трансфицированных клетках ΜЫ наблюдали сигнал митохондриального кальция в идентифицируемых кластерах, который мог быть чётко разделён на глобальные и локальные события, находящиеся выше уровня шума (рисунок 32). После применения кофеина (5 мМ) мы наблюдали отчётливый подъём [Ca²⁺]_m (рисунок 32) и соответствующее увеличение длительности и частоты глобальных и локальных событий, которые мы продемонстрировали выше, на рисунках 30 и 31.



Рисунок 32 – Влияние кофеина (5 мМ) на митохондриальный кальций. Флуоресцентный сигнал из клетки, трансфицированной только mtRCaMP. В исходных условиях чётко прослеживается наличие как глобальных (чёрные стрелки), так и локальных (серая подсветка, увеличение масштаба на панелях под сигналом) событий. Локальные события могут быть чётко визуализированы, поскольку превышают по амплитуде уровень шума и установленные на стандартном отклонении критерии анализа. Добавление кофеина в среду для визуализации индуцирует увеличение частоты событий. На этом фоне наблюдается общей подъём уровня флуоресценции mtRCaMP.

Исходя из полученных результатов мы предполагаем, что отдельные изолированные всплески на фоне общего подъёма [Ca²⁺]_m и локальные события [Ca²⁺]_m являются единым функциональным механизмом кластеров, необходимым для регуляции митохондриальных функций.

3.6. Влияние PS1 и его мутантной формы на сетевую активность и митохондриальные функции

Чтобы изучить аспекты влияния PS1 на кальций-зависимые функции нейронов гиппокампа, мы трансфицировали культуру с PS1 и его мутантной

формой M146V (mPS1). Для идентификации мы использовали котрансфекцию с EBFP. Производились записи спонтанной сетевой активности – ГСК в контрольной группе (транфицированной только EBFP), в PS1 и в мутантных клетках (рисунок 33) в исходной среде для визуализации и в условиях повреждения - с добавлением индуктора генерации супероксидного анионрадикала параквата параквата (PQ, 20 мкМ).



Рисунок 33 – Спонтанная сетевая активность нейронов в контрольных, PS1 и mPS1 – трансфицированных нейронах в нормальной среде и в присутствии параквата (PQ, 20 мкМ). А – примеры активности трансфицированных и нетрансфицированных клеток (EBFP - синий, Fluo-2-зелёный). Не было зафиксировано значимых различий между транфицированными и интактными нейронами (*p* > 0,05). Б – примеры спонтанной активности трансфицированных клеток в контроле и в присутствии PQ (20 мкМ, предварительная инкубация 4 часа). В – абсолютные значения количества ГКС в трансфицированных нейронах в нормальной среде и с PQ (контроль: n = 10, mPS1: n = 29, PS1: n = 32, контроль+PQ: n = 11, mPS1+PQ: n = 22, PS1+PQ: n = 16 клеток), *t*-тесты.

Хотя в нормальных условиях количество вызванных сетевой активностью ГКС не различалось между группами, после токсического

воздействия паракватом в группе PS1 активность достоверно угнеталась, незначительное снижение активности было отмечено в группе контроля (что может свидетельствовать о достаточной устойчивости контрольных клеток к лёгкому токсическому воздействию в сравнении с ситуацией сверхэкспрессии PS1), однако в клетках с мутантной формой пресенилина наблюдался противоположный эффект – достоверное усиление активности (рисунок 33, Б, В). Результаты этого эксперимента косвенно свидетельствуют о различном кальциевом статусе хранилищ нейронов под влиянием пресенилиновых функций.

Применение экзогенного нейротоксина параквата, механизм действия которого основан на ингибировании цепи переноса электронов В митохондриях, является мощным инструментом ДЛЯ изучения митохондриальной дисфункции. Однако, препарат вызывает гибель клеток при хроническом лечении низкими дозами (Куликова и др., 2019), тогда как в вышеописанном эксперименте ограничились одноразовой ΜЫ предварительной 4-х часовой инкубацией культуры нейронов с 20 мкМ параквата, что не приводило к клеточной смерти во временных рамках визуализации активности. В следующем эксперименте, в котором мы отслеживали спонтанную активность трансфицированных пресенилином 1 и его мутантной формой нейронов гиппокампа, мы применяли СССР (10 мкм) для усугубления тяжести митохондриальной дисфункции, которая, в свою очередь, приводит к практически немедленному изменению кальциевого гомеостаза, что влечёт за собой скорый клеточный апоптоз (см. рисунок 8). Применение CCCP В этих условиях двухфазное лействие. имело первоначально вызывающее увеличение частоты ГКС продолжительностью около десяти минут, за которым следовала депрессия активности и сопутствующее увеличение окружающего цитозольного [Ca²⁺]_с. В этом отношении наблюдалась поразительная разница между mPS1, PS1 и контрольными трансфицированными нейронами - первая группа повышала [Ca²⁺]_с быстрее, чем две другие группы или нетрансфицированные клетки в

том же окружении (рисунок 34, A-B). Первоначальный эффект СССР заключался в увеличении частоты ГКС в контроле и PS1, но не в mPS1 (рисунок 34, Г-Е) с последующим снижением этого свойства во всех группах (там же). Амплитуды ГКС увеличивались в контроле и mPS1, но не в PS1 как для трансфицированных, так и для не трансфицированных клеток (рисунок 34, 3, И).

Таким образом, мы обнаружили достоверно сниженную реакцию митохондриального кальция в клетках с mPS1, которая усугублялась в начальный период инкубации с СССР.

Далее мы исследовали функциональную связь между ГКС и связанными с ними подъёмами уровней [Ca²⁺]_m. Мы усреднили эквивалентное количество ГКС с каждой клетки, зарегистрированных с помощью Fluo-2, и связанные с $[Ca^{2+}]_{m}$ ними подъёмы флуоресценции с помощью датчика митохондриального кальция mtRCaMP (рисунок 35). СССР усиливал амплитуду всплесков [Ca²⁺]_с контрольных клеток, в то время как [Ca²⁺]_m ответы оставались неизменными (рисунок 35, A, B). В группе PS1 не было обнаружено цитозольных различий в ГКС, тогда как митохондриальный ответ был значимо повышен. Мутантные клетки в присутствии СССР (10 мкМ) увеличивали амплитуду цитозольного ГКС, как и в контрольной группе, но их митохондриальные кальциевые ответы значимо снижались (рисунок 35, В, Д). В целом, амплитуда всплесков [Ca²⁺]_с у мутантных клеток была незначительно снижена до и значительно снижена после применения СССР, в сравнении с контролем (рисунок 35, C, Γ).



Рисунок 34 – Спонтанная сетевая активность нейронов в контрольных, PS1 и mPS1 – трансфицированных нейронах в нормальной среде и в присутствии СССР (10 мкМ). А-В –

примеры спонтанной сетевой активности (ГКС) в контроле, PS1, mPS1 и нетрансфицированных клетках для каждой группы до и после применения 10 мкМ СССР (красная пунктирная линия, Fluo-2 флуоресценция). Г-Е – усредненные ГКС на временном отрезке 200 секунд в трансфицированных и нетрансфицированных нейронах в исходных условиях в течение первых 10 минут инкубации с 10 мкМ СССР и через 10 минут, n = 15

клеток в каждой группе, ANOVA, апостериорные тесты Бонферрони, три клеточные культуры, DIV 10-14. Ж – усреднённая частота спонтанных всплесков сети за 200 секунд в трансфицированном контроле (К), PS1 и mPS1 до в первые 10 минут инкубации с 10 мкМ СССР. З – нормализованная пиковая амплитуда ГКС в трансфицированных клетках контроля (К), PS1 и mPS1 до и в течение первых 10 минут инкубации с СССР. И –



нормализованные пиковые амплитуды ГКС в нетрансфицированных клетках для каждой группы до и в течение первых 10 минут инкубации с СССР. Ж-И – статистика, как в Г-Е.



ответа (красным) в контрольной среде и первые 10 минут инкубации с СССР (10 мкМ); n = 12 клеток для каждой группы, эквивалентное количество событий оценивали в каждой

группе сравнения, *t*-критерий. Ж&З – сравнение усредненных пиковых амплитуд цитозольных кальциевых событий и связанных с ними митохондриальных кальциевых ответов между группами до и после инкубации с СССР, статистика как в Г-Е, ANOVA, апостериорный критерий Фишера.

В виду того, что СССР индуцирует частотное усиление ГКС с последующим полным прекращением активности, для дальнейшего анализа локальных ПКС мы использовали только результаты, полученные в опытах с паракватом. Локальное событие учитывалось, если оно происходило в головке шипика, было связано по времени с изменением $[Ca^{2+}]_c$ в дендрите и с изменением $[Ca^{2+}]_m$, превышая по амплитуде установленный порог оценки в 2 стандартных отклонения (по аналогии с анализом с рисунка 25). Усреднение производилось по пику всплеска в головке шипика. На рисунке 36 В схематически представлены области анализа локальных ПКС.





связанные с ними ответы митохондриального кальция в нормальной среде и в присутствии параквата (PQ, 20 мкМ). А – усреднённые ПКС в цитозоле в головке шипика и его основании в дендрите показаны чёрным и зеленым цветом, соответственно (Fluo-2); митохондриальный кальций - красным (mtRCaMP). Б – то же в присутствии параквата. A&Б - контроль (K): n = 50; PS1: n = 38; mPS1: n = 46 сопряжённых областей регистрации

в дендритах/постсинаптических митохондриях. Для каждого случая брали по 5 типичных ПКС от каждой области, использовалось эквивалентное количество областей интереса из разных клеток, задействованы 4 клеточные культуры. В – схематическое изображение области интереса. Г – процент пиковой митохондриальной флуоресценции от пика локального кальциевого события (в головке шипика) в цитозоле, принятого за 100%.

Мы получили схожие результаты после анализа митохондриальных ответов на глобальные и локальные цитозольные кальциевые события. В обоих случаях замечено значительное снижение кальциевой активности постсинаптических митохондрий в клетках, экспрессирующих мутантный пресенилин.

3.7. Влияние PS1 и его мутантной формы на потенциал мембраны митохондрий

Предполагалось, изменённый кальциевый что функциональный профиль в клетках с мутантной формой PS1 будет косвенно влиять также и на характеристики митохондриального мембранного потенциала, особенно в контексте локальных ПКС. Мы использовали Fluo-2 и TMRM для одновременной визуализации ПКС в цитозоле и регистрировали возможные изменения потенциала мембраны митохондрий. Пересчёт флуоресценции TMRM в милливольты производили по формуле 1 (см. Главу 2). Детальный анализ $\Delta \Psi m$ с использованием критерия стандартного отклонения показал, что некоторые, но не все изменения Чт следуют за локальными событиями цитозольного кальция, и наоборот. Кроме того, эти изменения могут быть противонаправленными, как показано на усреднённых графиках деполяризующих и гиперполяризующих случаев изменения потенциала постсинаптических митохондрий, или вообще отсутствовать (рисунок 37). Примеры скачков потенциала в сопряжении с ПКС представлены в приложении 2. Сравнив изменения Чт в группах контрольных клеток, PS1 и mPS1, мы пришли к выводу, что митохондрии клеток со сверхэкспрессией пресенилина имеют тенденцию к большему количеству гиперполяризующих всплесков в ответ на локальные ПКС.



Рисунок 37 – Изменения потенциала мембраны митохондрий (ΔΨm), связанные с локальной кальциевой активностью (ПКС). А – усреднённые нормированные графики деполяризующих реакций Ψm для нейронов контроля, PS1 и mPS1 (вверху). Столбцы снизу демонстрирует усреднённые значения пиковой амплитуды деполяризации ΔΨm во время ПКС. Б – усреднённые нормированные графики гиперполязирующих реакций Ψm для нейронов контроля, PS1 и mPS1 (вверху). Столбцы снизу демонстрирует усреднённые значения пиковой амплитуды деполяризации ΔΨm во время ПКС. Б – усреднённые пормированные графики гиперполязирующих реакций Ψm для нейронов контроля, PS1 и mPS1 (вверху). Столбцы снизу демонстрирует усреднённые значения пиковой амплитуды гиперполяризации ΔΨm во время ПКС. В – столбцы сверху демонстрируют процентное соотношение случаев депорязации, гиперполяризации и отсутствия реакции Ψm на ПКС в группах, снизу – сравнения между группами каждого типа случаев. ANOVA, апостериорный критерий Фишера.

Амплитуда ΔΨm в PS1 клетках в ответ на локальное кальциевое событие является наиболее существенной, тогда как в целом изменения затрагивают незначительный диапазон - не более 2-4 мВ. Результаты показывают, что связь между ПКС в цитозоле и ΔΨm присутствует, хотя и не является обязательной. Гетерогенность реакции потенциала мембраны митохондрий возможно, связана с поглощением ими цитозольного кальция или его выделением в исследуемый момент времени. Однако эти процессы могут оказывать влияние на локальную продукцию АТФ синаптическими митохондриями. В норме

 Ca^{2+} матрикс митохондрий поступление В приводит снижению К электрохимического градиента на их внутренних мембранах для увеличения продукции АТФ (Байдюк и др., 2017). Кинетика взаимосвязи ДУт с флуктуациями цитозольного И митохондриального кальция требует отдельного обширного детального анализа, который планируется в будущих экспериментах.

3.8. Исследование влияния изменений [Ca²⁺]_m на уровень продукции АТФ постсинаптическими митохондриями

Аккумулирование Ca²⁺ в митохондриальном матриксе активирует матриксные Ca²⁺ -зависимые дегидрогеназы (см. Главу 1), которые, в свою очередь, активируют продукцию АТФ митохондрией (Байдюк и др., 2017). Кинетика взаимосвязи всплесков [Ca²⁺]_m (mtRCaMP) с динамикой производства АТФ была изучена в контрольных, PS1 и mPS1 -трансфицированных клетках с использованием генетически кодируемого флуоресцентного сенсора (рисунок 38).



Рисунок 38 – Взаимосвязь всплесков [Ca²⁺]_m и АТФ контрольных и mPS клетках. А – шипик в контрольной клетке, трансфицированной АТФ-плазмидой (зелёный) и mtRCaMP (жёлтый). Б – шипик в клетке mPS1. А, Б – области детекции АТФ отмечены белыми овалами, измерения [Ca²⁺]_m производились в зоне, ограниченной внешним контуром митохондрии. Шкала 1 мкм. В – усреднённые всплески [Ca²⁺]_m и АТФ в контрольной клетке. Г - всплески [Ca²⁺]_m и АТФ в клетка mPS1. В, Г – нормализованная флуоресценция [Ca²⁺]_m (красным) и АТФ в основании шипика (вверху, чёрным), шейке и головке (внизу, серым и

чёрным, соответственно). Д – усреднённая пиковая амплитуда всплесков [Ca²⁺]_m и АТФ в основании шипиков контроля и mPS1. Е – усреднённая пиковая амплитуда АТФ в шейке и голове шипиков.



Рисунок 39 – Взаимосвязь [Ca²⁺]_т всплесков и секреции АТФ в постсинаптических митохондриях с событиями [Ca²⁺]_с в грибовидных шипиках. А – пример грибовидного

шипика, имеющего в своём основании митохондрию. Зоны анализа флуоресценции обведены синим контуром. Б – примеры локальных событий [Ca²⁺]_c и связанных АТФвсплесков в тот же момент времени в исследуемых зонах (1,2,3 с панели А). В – усреднение по началу (красный пунктир) локальных событий [Ca²⁺]_c с разных шипиков разных клеток в исследуемых зонах. Г – АТФ-сигнал с исследуемых областей в тот же момент времени, что и В, красный пунктир указывает на начало инициирующего события [Ca²⁺]_c. Д – усреднение ответов [Ca²⁺]_m на соответствующие по амплитуде и кинетике события [Ca²⁺]_c, зона 1 не содержит сигнала mtRCaMP (уровень шума, см. рисунок 28). Е – усреднение базовой АТФ-флуоресценции и пиков локальных событий в исследуемых областях. Ж – усреднение базовой mtRCaMP-флуоресценции и пиков локальных событий в исследуемых областях. З – усреднение базовой Fluo-2 -флуоресценции и пиков локальных событий в исследуемых областях.

Приведённые данные демонстрируют статистически достоверную взаимосвязь между всплесками $[Ca^{2+}]_m$ и уровнем секреции АТФ. Амплитуда АТФ-сигналов после нормализации была сопоставима с амплитудой всплесков $[Ca^{2+}]_m$ в контрольных условиях. Пиковые всплески $[Ca^{2+}]_m$ в мутантных клетках были на 30% ниже по амплитуде (p < 0,01), чем в контроле, что согласуется с предыдущим экспериментом (рисунок 36), и это обусловливало более низкий уровень секреции АТФ, особенно в области основания шипиков (p < 0,001, рисунок 38, Д).

Для более подробного исследования кинетики взаимосвязи АТФ всплесков и локальных событий [Ca²⁺]_m и [Ca²⁺]_c, мы сопоставили временные рамки локальных событий, инициируемых [Ca²⁺]_c в головке шипиков, их продолжение в шейке у основания в дендрите и в концевых участках постсинаптических митохондриальных кластеров, в направлении дендритного шафта (области 1,2 и 3 на рисунках 39 и 40, соответственно). Усреднение этих данных производили для двух типов шипов – грибовидных (рисунок 39), с наибольшей верояностью содержащих отграниченный ША и коротких шипиков-обрубков (рисунок 40). В случаях с грибовидными шипиками, которые являются относительно обособленным компартментом в результате отграничения узкой шейкой от дендритного шафта, наблюдалась значимая тенденция к увеличению амплитуд



Рисунок 40 – Взаимосвязь [Ca²⁺]т всплесков и секреции АТФ в постсинаптических митохондриях с событиями [Ca²⁺]с в коротких шипиках. А – пример короткого шипикапенька, имеющего в своём основании митохондрию. Зоны анализа флуоресценции обведены синим контуром. Б – примеры локальных событий [Ca²⁺]_с и связанных АТФвсплесков в тот же момент времени в исследуемых зонах (1,2,3 с панели А). В – усреднение по началу (красный пунктир) локальных событий [Ca²⁺]_с с разных шипиков
разных клеток в исследуемых зонах. Г – АТФ-сигнал с исследуемых областей в тот же момент времени, что и В, красный пунктир указывает на начало инициирующего события $[Ca^{2+}]_c$. Д – усреднение ответов $[Ca^{2+}]_m$ на соответствующие по амплитуде и кинетике события $[Ca^{2+}]_c$, зона 1 не содержит сигнала mtRCaMP (уровень шума, см. рисунок 28). Е – усреднение базовой АТФ-флуоресценции и пиков локальных событий в исследуемых областях. Ж – усреднение базовой mtRCaMP-флуоресценции и пиков локальных событий в исследуемых областях. З – усреднение базовой Fluo-2 -флуоресценции и пиков локальных событий в исследуемых областях.

реакций $[Ca^{2+}]_m$ и АТФ-всплесков в области 2 – непосредственно в участках митохондрий под шипиком, как это показано на рисунке 39, Г-Ж. В случае усреднения событий с коротких шипиков, не имеющих чётко обособленную от дендрита головку, не было значимой разницы в интенсивности сигналов АТФ в шейке и дендрите (области 2 и 3 на рисунке 40, Г, Е), как и чёткой шипик-направленной реакции $[Ca^{2+}]_m$ (там же, Д, Ж) в ответ на событие в цитозоле (там же, В, З).

Эти результаты демонстрируют возможность наличия вектора притока ионов кальция в митохондрию со стороны синапса для узконаправленной секреции молекул АТФ в зоне активации.

3.9. Вклад кальциевых депо в экспрессию генов, процессы обучения и памяти

Долговременная потенциация является наиболее исследуемой формой пластичности, связанной с изменением синаптической эффективности и лежит в основе формирования памяти и обучения (Соколова, Штарк, Лисачёв, 2010). Зубчатая извилина гиппокампа (DG, gyrus dentatus) — область, необходимая для процессов пространственного обучения и процессов памяти. Поскольку Arc и c-Fos являются ранними генами, зависящими от активности, их экспрессию в гранулярных клетках DG дорсального гиппокампа мы исследовали с помощью методов иммуногистохимии у шестимесячных мышей WT (контроль) и SPKO (нокаут по гену SYNPO) после воздействия

новой среды (обогащённое открытое поле) и контрольных мышей, не подвергавшихся поведенческому эксперименту.

Согласно результатам эксперимента, представленным на рисунке 41, мыши, подвергавшиеся помещению в обогащённое открытое поле дважды по 5 минут с 20-ти минутным перерывом – всего 50 минут эксперимента, что является достаточным временем для экспрессии ранних генов (Павлов, Мухин, 2021; Казанская и др., 2021), имели значительно большее количество Агс-позитивных нейронов в группе SPKO, чем мыши дикого типа (рисунок 41). Экспрессия с-Fos также была повышена в обоих группах мышей, освоивших новую среду, но существенно не различалась между этими двумя группами.



Рисунок 41 – Увеличение экспрессия Arc и с-Fos в зубчатой извилине гиппокампа (DG) в результате освоения новой среды. А – примеры Arc-позитивных (слева, зеленый) и с-Fos-позитивных (посередине, красный) клеток и их комбинированных изображений на фоне DAPI-окрашенных клеточных ядер (справа, синий, объединение) в DG дорсального гиппокампа, у интактных SPKO (вверху) и SPKO-активных мышей (внизу). Б – то же, для интактных мышей группы контроля (К) и контроль-активных мышей. Шкала 50 мкм (размеры изображений 135 × 135 мкм). В – плотность Arc-положительных клеток в

четырех группах (SPKO n = 10; SPKO / активные n = 12; контроль n = 6 (WT n = 2,

гетерозиготы n = 4); контроль-активные n = 6 (WT n = 2, гетеро n = 4). «SPKO –

SPKO/акт» – p < 0,001; «SPKO/акт – Контроль/акт» – p = 0,001; «Контроль –

Контроль/акт» – p = 0,002. Г – плотность с-Fos -позитивных клеток в четырех группах

(SPKO n = 5; SPKO/активные n = 7; Ctrl n = 3 (WT n = 1, гетерозиготы n = 2); Контроль/акт n = 3 (WT n = 1, гетерозиготы n = 2); «SPKO + SPKO/акт» – p = 0,041. Для каждой мыши было сделано среднее значение по 16-ти изображениям левой (8) и правой (8) DG, U-тесты.

Таким образом, мыши SPKO, у которых отсутствует шипиковый аппарат, демонстрируют больше активированных клеток, чем у мышей с нормальным генотипом. В целом, этот результат показывают более высокую возбудимость взрослых мышей SPKO по сравнению с их аналогами дикого Ca^{2+} типа. Поскольку внутриклеточная концентрация отрицательно регулирует возбудимость посредством активации кальций-зависимых К+ токов (Kshatri et al., 2018), снижение доступности Ca^{2+} , как в мозге SPKO, может вызвать повышенную возбудимость. Следовательно, возникает необходимость компенсировать эффект снижения [Ca²⁺]_с в постсинаптических участках для поддержания синаптической пластичности. Необходимы дальнейшие эксперименты для изучения этих возможностей на клеточном и молекулярном уровнях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе исследовано влияние белка пресенилина 1 на кальциевый гомеостаз в нейронах гиппокампа. В первую очередь было приводит обнаружено, что мутантная форма пресенилина 1 к физиологическим изменениям состояния нейронов, которые проявляются в контрольных условий некоторыми случае отягощения токсичными компонентами, вызывающими повреждение митохондрий, что приводит к преждевременной гибели клеток (см. рисунки 7, 8). Выявленный в экспериментах неконтролируемый рост дендритных отростков на фоне предапоптотического подъёма цитозольного кальция, индуцированного воздействием СССР, проявляется в мутантных клетках с подавляющей долей филоподиального роста (рисунки 9 и 10). Еще одно проявление патологического влияния mPS1 было выявлено нами при исследовании морфологического статуса постсинаптических митохондрий, демонстрирующих сокращение протяжённости кластеров. Воздействие СССР приводило к расщеплению митохондрий, сокращению длины и приобретению нехарактерной округлой формы (рисунок 11).

Мутация в гене пресенилина 1 оказывает патологическое влияние на баланс кальция в синаптической зоне, где происходит тесное взаимодействие между основными функциональными молекулами синаптической щели и элементами постсинаптической мембраны. К важнейшим участникам синаптической активности в постсинаптической области следует отнести локальные митохондрии и ответвления эндоплазматического ретикулума, осообенно в тех случаях, когда последний отделяется от остальной сети и приобретает статус автономной органеллы в виде шипикового аппарата. В дополнение способности, снабжен К депонирующей он актинассоциированным белком синаптоподином, который позволяет шипиковому аппарату удерживаться в стратегически важной позиции - поблизости от постсинаптической плотности, взаимодействуя с ней посредством элементов высокодинамичного актинового цитоскелета. По всей вероятности, кальций-

аккумулирующая ёмкость шипикового аппарата невелика, однако она пропорциональна очень ограниченному объёму постсинаптической плотности и шипиков в целом. В работе продемонстрирована (см. рисунки 12-15), важнейшая функция пополнение запасов кальция в шипиковом аппарате, которая зависит от регулирующей функции эндоплазматических кальциевых сенсоров, подающих сигнал к инициации притока кальция через каналы типа Orai, расположенные на плазматической мембране в непосредственной близости от ЭР. Было установлено, что белки-сенсоры кальция STIM1 и STIM2 в центральных нейронах экспрессируются в разных пропорциях. Показано, что включения STIM1 преобладают в молодых клетках, более подвижны, запускают локальные всплески Ca²⁺, чем инициирует рост незрелых отростков типа филоподий или тонких шипиков, лишенных функциональной связи с пресинаптическими терминалями аксонов (см. рисунки 16-23). И напротив, белок STIM2 возникает позже и гораздо менее подвижен. Наши данные показывают, что он экспрессируется в более зрелых нейронах, где мобилизуется в ответ на снижение уровня кальция в тех или иных компартрментах эндоплазматического ретикулума, а также может мигрировать в зрелые дендритные шипики, где снабжает кальцием их шипиковый аппарат, что согласуется с исследованиями других авторов (Popugaeva et al., 2015). Предположительно, именно включения STIM2 ответственны за медленный, низкоамплитудный приток кальция в шипики в те периоды, когда синаптическая активность в них отсутствует (Sun et al., 2014). Подобные условия были нами смоделированы путем применения бликаторов синаптической активности (см. рисунки 12, 14, 15). В частности, нами продемонстрировано, что выделение запасённого кальция из депо происходит не «безадресно», а именно в направлении дендритной оси (см. рисунок 15).

У основания ножки шипиков, там, где она переходит в дендритную ось, как правило располагаются отдельные митохондрии и/или их кластеры. Нами было показано, что основной мишенью ионов кальция являются нижележащие митохондриальные кластеры. Они предотвращают его диффузию вдоль дендритной оси (см. рисунок 27). Благодаря этому, отдельные синаптические входы слабо влияют на соседние синапсы. Этим, предположительно, достигается избирательность механизмов выработки долговременной потенциации и депрессии в отдельных синапсах, без затрагивания других. Оба эти механизма активируются кальцием и могут сосуществовать, то есть работать, не перекрываясь друг с другом в соседних постсинаптических отростках или их кластерах. По существу, речь идет о механизме избирательного синаптического усиления или ослабления, предсказанных Дональдом Хэббом около 80 лет назад для нейронных ансамблей (Hebb, 1949).

Были зарегистрировали быстрые (в миллисекундном диапазоне), чрезвычайно локальные (в пределах 1-3 мкм) и адресные (только в прилежащем митохондриальном компартменте) всплески митохондриального кальция, зарегистрированные с помощью высокоспецифичного индикатора (см. рисунки 24-27). Также было показано, что флуктуации кальция, связанные с дендритными потенциалами действия обратного распространения, вызывают кальциевые события в митохондриях, но уже не локального, а общего характера. Более того, по динамике и форме эти глобальные всплески весьма напоминают одиночные синаптические события в митохондриях, но в этом случае не одиночные, а многократно повторяющиеся, вызывающие общий подъём уровня митохондриального кальция (рис. 28-32).

Таким образом, впервые было показано, что кальциевые сигналы в митохондриях, располагающихся под шипиками, фактически следуют за флуктуациями этого иона в чрезвычайно малых объемах окружающего цитозоля. Впервые продемонстрированы отдельные всплески кальция в митохондриях, длительностью порядка нескольких десятков миллисекунд, что вполне сопоставимо с длительностью типичного синаптического входа. Именно такие всплески были обнаружены в случае локального типа активности, изолированного в пространстве и во времени. На фоне

событий _ потенциалов действия обратного генерализованных распространения, общий уровень митохондриального кальция повышался по той причине, что локальные всплески следовали один за другим и приводили к наращиванию общего уровня митохондриального кальция. Так или иначе, кальциевые всплески наблюдались в митохондриях в обоих случаях. Но в первом – был отчётливо показан вектор притока ионов Ca²⁺ со стороны синапса (рисунок 25). Использованные токсические компоненты – паракват и СССР нарушали цитоплазматический и митохондриальный кальциевый гомеостаз, а также снижали нормальный потенциал митохондриальных мембран, в первую очередь в клетках, содержащих mPS1, но гораздо менее выраженно – в контрольных и трансфицированных PS1 нейронах гиппокампа (рис. 33-37).

Дальнейшие эксперименты были сосредоточены на изучении функционального предназначение одиночных или серийных всплесков митохондриального кальция. Применение специфического белкового сенсора АТФ позволило прояснить, что дендритные шипики, снабженные ША, способны вызывать специфические и достаточно локальные подъёмы уровня АТФ в процессе своей синаптической активности (рисунок 38). Шипики, лишенные ША, демонстрировали такую зависимость гораздо менее выражено, что указывает на то, что они могут получать АТФ не адресно, а из соседних активных зон, однако в меньшем объёме (см. рисунки 39-40).

Таким образом, было установлено, что механизмы высвобождения и пополнения запасов кальция в локальных кальциевых депо, представленных в виде ответвлений гладкого эндоплазматического ретикулума или шипикового аппарата, напрямую влияют на локальное производство АТФ. В рамках работы приводятся достаточные доказательств секреции АТФ в направлении дендритных шипиков под воздействием локального притока кальция из эндоплазматического ретикулума или шипикового аппарата. Однако,

проводятся дальнейшие работы по замерам уровней АТФ в синаптической области, как в физиологических условиях, так и в модели БА.

Главным прикладным значением работы являются исследованные аспекты нейродегенеративных процессов в головном мозге. Эти аспекты инициируют особый интерес к митохондриальным исследованиям в контексте старения и нейродегенерации. По результаты исследования синаптических аспектов митохондрий - их взаимодействий с шипиковым аппаратом, синаптической активностью и кальциевым гомеостазом локального значения, мы можем сформулировать предположение о том, что мутация пресенилина 1 или дефицит его экспрессии/функциональности может привести к нарушению в снабжении синапсов АТФ. Так, мутантный пресенилин 1 не обеспечивает достаточных кальциевых сигналов в митохондриях на фоне локальных синаптических событий (рисунок 38). Это может приводить к дефициту снабжения энергией наиболее активных – грибовидных шипиков, создаёт риск их деградации и синаптической депривации всего нейрона в целом. В свою очередь, малоактивный или неактивный нейрон имеет склонность к запуску апоптотических процессов (Fishbein, Segal, 2007). Другим фактором риска, спровоцированным мутацией пресенилина 1, можно считать перегрузку кальцием локальных депо, особенно ША. В литературе высказаны предположения (Popugaeva, Supnet, Bezprozvanny, 2012), подкрепленные нашими наблюдениями, что мутантный пресенилин снижает эффективность секреции кальция из депо. С одной стороны, это лишает митохондрии притока кальция, а с другой – перегружает ими ША, что может приводить к синаптической дисфункции.

Устранение синаптических депо генетическим нокаутом изменяет экспрессию связанных с обучением генов в нейронах гиппокампа. Для проверки этой гипотезы нами была изучена экспрессия ранних генов *Arc* и *с*-*Fos*, связанных с механизмами пространственного обучения, во время поведенческой стимуляции мышей, свободно перемещающихся по арене

открытого поля. Сам факт активности повышает уровень экспрессии ранних генов, связанных с механизмами пространственного обучения (рисунок 41). Однако у трансгенных животных, с нокаутом гена SYNPO (синаптоподин) наблюдалась повышенная экспрессия ранних генов по сравнению с контролем, что подтверждает нашу гипотезу на уровне *in vivo* эксперимента, а не только нейронной культуры. Предполагается, что кофеин, разгружая переполненные кальциевые депо, будет противодействовать развитию БА, поскольку он усиливает функциональные реакции митохондрий, что хорошо согласуется с полученными результатами.

В последние годы основной фокус исследований БА приходился на механизмы образования амилоидных бляшек и другие, более поздние признаки этого заболевания. Данная работа исследует именно ранние, пока недоступные для диагностики симптомы, которые согласуются и со случаями его спорадического возникновения. Результаты проведённых исследований поддерживают гипотезу о том, что нарушение функционального статуса митохондрий может быть отправной точкой инициации нейродегенерации. Однако, влияние кальциевого гомеостаза на деятельность глиальных клеток, и в частности, участие в нём белка пресенилина 1 осталось за рамками представленного исследования, которое сосредоточено на изучении постсинаптического компонента. В литературе существуют сведения, касающиеся функции астроцитов в так называемых трёхчастных синапсах и их роли в возникновении нейродегенераций (Браже и др., 2019; Кушнирёва, Коркотян, Семьянов, 2019; Маслова, Шевченко, Куприянов, 2019; Mitroshina et al., 2023). Наши наблюдения кальциевой динамики и потенциала мембран митохондрий в астроцитах и их влияние на выполнение астроцитами синаптических функций, не представленные в работе, имеют некоторые отличия и требуют дальнейших исследований.

Представленная работа связывает воедино элементы постсинаптической ультраструктуры нейронов, морфологические особенности дендритов, и их

постсинаптических отростков, локальную митохондриальную регуляцию, переходные процессы кальциевых событий в постсинаптической плотности и экспрессию ранних генов. На наш взгляд, этот подход представляет в новом свете некоторые важные функции взаимодействия эндоплазматического ретикулума с локально расположенными митохондриями, как в нормальных условиях, так и при патологии в нейронах гиппокампа. Он открывает некоторые терапевтические перспективы воздействия на патологию нейронов, приняв в качестве мишени ЭР-зависимый кальциевый гомеостаз в постсинаптических митохондриальных кластерах.

выводы

1. Пополнение кальциевых запасов в ША происходит за счет сенсорных белков STIM. Секреция кальция из ША направлена в сторону дендритной оси.

2. Сенсорные белки STIM1 и STIM2 экспрессируются на разных стадиях жизни нейронов и выполняют различные функции. Так, белок STIM1 экспрессируется в молодых нейронах и проявляет высокую мобильность, обеспечивая приток кальция извне, стимулируя рост незрелых отростков – будущих шипиков. STIM2 экспрессируется, в основном, в зрелых нейронах и мобилизуется в ответ на снижение уровня кальция.

3. Кальциевые градиенты, возникающие в дендритах в результате синаптической деятельности, практически незамедлительно секвестрируются локальными постсинаптическими митохондриями. Они играют роль ключевых сигналов к высвобождению АТФ.

4. Диффузия ионов кальция в дендрите пространственно отграничена не только между митохондриями, но и в пределах одного митохондриального кластера.

5. Мутантная форма пресенилина 1 выраженно снижает утечку кальция из ША в областях МАМ, что приводит к снижению кальциевых

всплесков в митохондриях. Сигнальный дефицит в митохондриях приводит к изменению их морфологических характеристик.

6. Возникающее в результате мутации пресенилина 1 нарушение сигнальных путей от кальциевых депо к митохондриям не позволяет последним нужным образом регулировать продукцию и высвобождения АТФ в область постсинапса.

7. Митохондриальный разобщитель СССР и индуктор генерации супероксидного анион-радикала паракват вызывают нарушение кальциевого гомеостаза, морфологические изменения и дальнейшую нейродегенерацию.

8. Последствия генетической абляции ША, приводящие к гиперэкспрессии раннего гена *Arc* в гиппокампе функционально подобны эффектам, оказываемым мутантной формой пресенилина 1 на кальциевый гомеостаз в *in vitro* экспериментах.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- [Ca²⁺]_с цитозольный кальций
- [Ca²⁺]_m митохондриальный кальций
- $[Ca^{2+}]_o$ кальций во внешней среде
- АТФ аденозинтрифосфорная кислота
- БА болезнь Альцгеймера
- ВММ внутренняя мембрана митохондрий
- ГКС глобальные кальциевые события (спонтанная сетевая Ca²⁺ активность)
- ДВД долговременная депрессия
- ДВП долговременная потенциация
- НММ наружная мембрана митохондрий
- ПКС переходные (локальные) кальциевые события
- СМЗ синаптическое мечение и захват
- ПД потенциал действия
- ПМ плазматическая мембрана
- ША шипиковый аппарат
- ЭР эндоплазматический ретикулум, гЭР гладкий, шЭР, рЭР шероховатый
- АМРАR рецепторы α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты
- АРОЕ є4 аполипопротеин є4
- APV R-2-амино-5-фосфонопентаноат
- СаМ кальмодулин
- СаМКІІ кальмодулин-зависимая протеинкиназа ІІ
- CaN кальцинейрин
- CBP calcium-binding proteins / кальций-связывающие белки
- CICR *calcium-induced calcium release* / индуцированное кальцием высвобождения кальция
- CRE-cAMP response elements / ц $AM\Phi$ -зависимые элементы
- CREB *cAMP response element-binding protein* / белок, присоединяющийся к цАМФ-регулируемому участку

DIV – days in vitro / дней in vitro

DNQX – 6,7-динитрохиноксалин-2,3-дион

EBFP – enhanced blue fluorescent protein / усиленный синий флуоресцентный белок

IP3R – инозитол-1,4,5-трисфосфатные рецепторы

MAM – *mitochondria-associated membrane* / митохондриальноассоциированные мембраны

mGluR – метаботропные глутаматные рецепторы

MERC – mitochondria-associated ER contacts / контакты между ЭР и митохондриями

mPS, mPS1 – PS1-M146V

MtMP – mitochondrial membrane potential / потенциал мембраны митохондрий

NMDAR – рецепторы N-метил-D-аспартата

РLС – фосфолипаза С

PQ – paraquat / паракват

PS1 – пресенилин 1 (*Human*)

PSD – postsynaptic density / постсинаптическая плотность

RyR – рианодиновые рецепторы

SERCA – сарко/ЭР Ca^{2+} -АТ Φ аза

SOCE – store-operated calcium entry / депо-управляемые кальциевый вход

SP – synaptopodin / синаптоподин

TMRM – tetramethylrhodamine / перхлорат метилового эфира тетраметилродамина

TTX – *tetrodotoxin* / тетродотоксин

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

 Байдюк Д.Е., Бобков А.В., Степанов А.В., Дерке Ш., Сакута Г.А. Митохондриальный аппарат кардиомиоцитов в норме и при патологии: структура, пространственная организация и роль кальция // Цитология. 2017.
 Т. 59. № 10. С. 643-653.

2. Безпрозванный И.Б. Система кальциевой сигнализации при нейродегенерации // Acta Naturae (русскоязычная версия). 2010. Т. 2. № 1. С. 80-88.

3. Браже А.Р., Доронин М.С., Попов А.В. [и др.]. Исследование паттернов кальциевой динамики в сетях астроцитов головного мозга // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2019. Т. 105. № 11. С. 1436-1451.

4. Гордлеева С.Ю., Матросов В.В., Казанцев В.Б. Кальциевые колебания в астроцитах. Часть 1. Астроцит как генератор кальциевых колебаний // Известия высших учебных заведений. Прикладная нелинейная динамика. 2012. Т. 20. № 3. С. 29-39.

5. Казанская Л.С., Ивашкина О.И., Торопова К.А., Анохин К.В. Сопоставление паттернов экспрессии генов с-Fos и Arc в головном мозге мышей при формировании и извлечении обстановочной ассоциативной памяти // Сборник трудов XXV научной школы-конференции молодых ученых по физиологии и высшей нервной деятельности и нейрофизиологии. 2021. № 1. С. 133-136

6. Куликова О.И., Федорова Т.Н., Орлова В.С. Моделирование болезни Паркинсона с помощью экзогенных нейротоксинов (обзор литературы) // Токсикологический вестник. 2019. Т. 155. № 2. С. 9-15.

Лукьянова, Л.Д. Сигнальные механизмы гипоксии: монография /
 Л. Д. Лукьянова; Российская академия наук. - Москва: РАН, 2019. - 214 с

Лычковская Е.В., Труфанова Л.В., Белова О.А., Семенчуков А.А.,
 & Герцог Г.Е. Роль митохондрий в регуляции кальциевой сигнализации лимфоцитов // Сибирское медицинское обозрение. 2016. Т. 101. № 5 С. 5-14.

9. Маслова А.Ю., Шевченко П.П., Куприянов А.Н. Астроциты и их феноменальные возможности в терапии болезни Альцгеймера // Современные проблемы науки и образования. 2019. № 6. (приложение "Медицинские науки"). С. 3.

10. Митрошина Е.В., Абогессименгане Б.Ж., Уразов М.Д., Хамрауй И., Мищенко Т.А., Астраханова Т.А., Щелчкова Н.А., Лапшин Р.Д., Шишкина Т.В., Белоусова И.И., Мухина И.В., Ведунова М.В. Адаптационная роль глиального нейротрофического фактора при ишемии головного мозга // Современные технологии в медицине. 2017. Vol. 9 (1). Р. 68-77.

 Павлов К.И., Мухин В.Н. Физиологическтие механизмы нейропластичности как основа психических процессов и социальнопрофессиональной адаптации (часть 2) // Психология. Психофизиология. 2021.
 V. 14. № 4. С. 128-143.

12. Попугаева Е.А., Власова О.Л., Безпрозванный И.Б. Передача сигнала в нейронах с участием ионов кальция и нейродегенеративные заболевания // Труды СанктПетербургского политехнического университета Петра Великого. 2015. № 517. С. 209-219.

13. Соколова О.О., Штарк М.Б., Лисачев П.Д. Нейрональная пластичность и экспрессия генов // Успехи физиол. наук. 2010. Т. 41. № 1. С. 26-44.

14. Akerboom J., Carreras Calderón N., Tian L., Wabnig S., Prigge M., Tolö J., Gordus A., Orger M.B., Severi K.E., et al. Genetically encoded calcium indicators for multi-color neural activity imaging and combination with optogenetics // Front Mol Neurosci. 2013. Vol. 4 (6):2.

15. Aloni E., Verbitsky S., Kushnireva L., Korkotian E., Segal M. Increased excitability of hippocampal neurons in mature synaptopodin-knockout mice // Brain Struct Fun. 2021. Vol. 226 (7). P. 2459-2466.

16. Baloyannis S.J. What has electron microscopy contributed to Alzheimer's research // Future Neurology. 2015. Vol. 10 (6). P. 515-527.

Basnayake K., Mazaud D., Bemelmans A., Rouach N., Korkotian E.,
Holcman D. Fast calcium transients in dendritic spines driven by extreme statistics
// PLOS Biol. 2019. Vol. 17:e2006202.

 Bogeski I., Kilch T., Niemeyer B. A. ROS and SOCE: recent advances and controversies in the regulation of STIM and Orai // J. Physiol. 2012. Vol. 590.
 P. 4193-4200.

19. Calvo-Rodríguez M., García-Durillo M., Villalobos C., Núñez L. In vitro aging promotes endoplasmic reticulum (ER)-mitochondria Ca2+ cross talk and loss of store-operated Ca2+ entry (SOCE) in rat hippocampal neurons // Biochim Biophys Acta. 2016. Vol. 1863 (11). P. 2637-2649.

20. Chamberland S., Moratallaab A. Z., Topolnik L. Calcium extrusion mechanisms in dendrites of mouse hippocampal CA1 inhibitory interneurons // Cell Calcium. 2019. Vol. 77. P. 49-57.

21. Chang D.T., Honick A.S., Reynolds I. J. Mitochondrial trafficking to synapses in cultured primary cortical neurons // J Neurosci. 2006. Vol. 26 (26). P. 7035-7045.

22. Chang K.T., Niescier R.F., Min K.T. Mitochondrial matrix Ca2+ as an intrinsic signal regulating mitochondrial motility in axons // Proc Natl Acad Sci U S A. 2011. Vol. 108 (37). P. 15456-61.

23. Chen Y.F., Chen L.H., Shen M.R. The distinct role of STIM1 and STIM2 in the regulation of store-operated Ca2+ entry and cellular function // J Cell Physiol. 2019. Vol. 234 (6). P. 8727-8739.

24. Cummings J.A., Mulkey R.M., Nicoll R.A., Malenka R.C. Ca2+ signaling requirements for long-term depression in the hippocampus // Neuron 1996. Vol. 16. P. 825-833.

25. De la Fuente S., Sheu S. S. SR-mitochondria communication in adult cardiomyocytes: A close relationship where the Ca2+ has a lot to say // Arch Biochem Biophys. 2019. Vol. 663. P. 259-268.

26. Deller T., Bas Orth C., Del Turco D., Vlachos A., Burbach G. J., Drakew A., Chabanis S., Korte M., Schwegler H., Haas C. A., Frotscher M. A role for synaptopodin and the spine apparatus in hippocampal synaptic plasticity // Ann Anat. 2007. Vol. 189 (1). P. 5-16.

27. Deller T., Korte M., Chabanis S., Drakew A., Schwegler H., Stefani G. G., Zuniga A., Schwarz K., Bonhoeffer T., Zeller R., Frotscher M., Mundel P. Synaptopodin-deficient mice lack a spine apparatus and show deficits in synaptic plasticity // Proc. Natl. Acad. Sci. 2003. Vol. 100. P. 10494-10499.

28. Del Prete D., Checler F., Chami M. Ryanodine receptors: physiological function and deregulation in Alzheimer disease // Mol Neurodegener. 2014. Vol. 21 (9).

29. Dittmer P.J., Wild A. R., Dell'Acqua M. L., Sather W. A. STIM1 Ca2+ sensor control of L-type Ca2+ channel-dependent dendritic spine structural plasticity and nuclear signaling // Cell Rep. 2017. Vol. 19. C. 321-334.

30. Dragicevic N., Delic V., Cao C., Copes N., Lin X., Mamcarz M., Wang L., Arendash G.W., Bradshaw P.C.: Caffeine increases mitochondrial function and blocks melatonin signaling to mitochondria in Alzheimer's mice and cells // Neuropharmacology. 2012. Vol. 63 (8). P. 1368-79.

31. Dromard Y., Arango-Lievano M., Fontanaud P., Tricaud N., Jeanneteau F. Dual imaging of dendritic spines and mitochondria in vivo reveals hotspots of plasticity and metabolic adaptation to stress // Neurobiol Stress. 2021. Vol. 15. P. 100402.

32. Duchen M.R., Leyssens A., Crompton M. Transient mitochondrial depolarizations reflect focal sarcoplasmic reticular calcium release in single rat cardiomyocytes // J Cell Biol. 1998. Vol. 142 (4). P. 975-988.

33. Du H., Guo L, Yan S., Sosunov A. A., McKhann G. M., Yan S. S. Early deficits in synaptic mitochondria in an Alzheimer's disease mouse model // Proc Natl Acad Sci U S A. 2010. Vol. 107 (43). P. 18670-5.

34. Dumitriu D., Hao J., Hara Y., et al. Selective changes in thin spine density and morphology in monkey prefrontal cortex correlate with aging-related cognitive impairment // J Neurosci. 2010. Vol. 30 (22). P. 7507-7515.

35. Eisner V., Csordás G., Hajnóczky G. Interactions between sarcoendoplasmic reticulum and mitochondria in cardiac and skeletal muscle - pivotal roles in Ca²⁺ and reactive oxygen species signaling. J Cell Sci. 2013. Vol. 126 (14). P. 2965-2978.

36. Faitg J., Lacefield C., Davey T., White K., Laws R., Kosmidis S., Reeve A. K., Kandel E. R., Vincent A. E., Picard M. 3D neuronal mitochondrial morphology in axons, dendrites, and somata of the aging mouse hippocampus // Cell Rep. 2021. Vol. 36 (6). P. 109509.

37. Feske S., Gwack Y., Prakriya M., Srikanth S., Puppel S. H., Tanasa B., et al. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function // Nature. 2006. Vol. 441. P. 179-185.

38. Freeman D.W., Petralia R.S., Wang Y.X., Mattson M.P., Yao P.J. Mitochondria in hippocampal presynaptic and postsynaptic compartments differ in size as well as intensity // Matters (Zur). 2017. Vol. 2017.

39. Frotscher M., Studer D., Graber W., Chai X., Nestel S., Zhao S. Fine structure of synapses on dendritic spines // Front Neuroanat. 2014. Vol. 94 (8).

40. Gao P., Yan Z., Zhu Z. Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes in Cardiovascular Diseases // Front Cell Dev Biol. 2020. Vol.
8. P. 604240.

41. Gerencser A.A., Chinopoulos C., Birket M.J., et al. Quantitative measurement of mitochondrial membrane potential in cultured cells: calcium-induced de- and hyperpolarization of neuronal mitochondria // J Physiol. 2012. Vol. 590 (12). P. 2845-2871.

42. Giacomello M., Pellegrini L. The coming of age of the mitochondria-ER contact: a matter of thickness // Cell Death Differ. 2016. Vol. 23 (9). P. 1417-27.

43. Godoy J.A., Arrázola M.S., Ordenes D., Silva-Alvarez C., Braidy N., Inestrosa N. C. Wnt-5a ligand modulates mitochondrial fission-fusion in rat hippocampal neurons // J Biol Chem. 2014. Vol. 289 (52). P. 36179-36193.

44. Grigoryan G., Segal M. Ryanodine-mediated conversion of STP to LTP is lacking in synaptopodin-deficient mice // Brain Struct Funct. 2016. Vol. 221 (4).P. 2393-7.

45. Henke N., Albrecht P., Bouchachia I., Ryazantseva M., Knoll K., Lewerenz J., et al. The plasma membrane channel ORAI1 mediates detrimental calcium influx caused by endogenous oxidative stress // Cell Death Dis. 2013. Vol. 4:e470.

46. Higley M.J., Sabatini B.L. Calcium signaling in dendritic spines // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2012. Vol. 4:a005686.

47. Holbro N., Grunditz A., Wiegert J. S., Oertner T. G. AMPA receptors gate spine Ca2+ transients and spike-timing-dependent potentiation // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2010. Vol. 107. P. 15975-15980.

48. Huganir R.L., Nicoll R.A., AMPARs and synaptic plasticity: The last 25 years // Neuron 2013. Vol. 80. P. 704-717.

49. Jedlicka P., Deller T. Understanding the role of synaptopodin and the spine apparatus in Hebbian synaptic plasticity - new perspectives and the need for computational modeling // Neurobiol Learn Mem. 2017. Vol. 138. P. 21-30.

50. Jia H., Zhang Y., Huang Y. Imaging sigma receptors in the brain: new opportunities for diagnosis of Alzheimer's disease and therapeutic development // Neurosci Lett. 2019. Vol. 691. P. 3-10.

51. Kann O., Kovács R., Heinemann U. Metabotropic receptor-mediated Ca2+ signaling elevates mitochondrial Ca2+ and stimulates oxidative metabolism in hippocampal slice cultures // J. Neurophysiol. 2003. Vol. 90 (2). P. 613-21.

52. Kann O., Schuchmann S., Buchheim K., Heinemann U. Coupling of neuronal activity and mitochondrial metabolism as revealed by NAD(P)H fluorescence signals in organotypic hippocampal slice cultures of the rat // Neuroscience. 2003. Vol. 119 (1). P. 87-100.

53. Kedrov A.V., Durymanov M., Anokhin K.V. The Arc gene: Retroviral heritage in cognitive functions // Neurosci Biobehav Rev. 2019. Vol. 99. P. 275-281.

54. Klejman M.E., Gruszczynska-Biegala J., Skibinska-Kijek A., Wisniewska M. B., Misztal K., Blazejczyk M., et al. Expression of STIM1 in brain and puncta-like co-localization of STIM1 and ORAI1 upon depletion of Ca2+ store in neurons // Neurochem. Int. 2009. Vol. 54. P. 49-55.

55. Koncha R.R., Ramachandran G., Sepuri N.B.V., Ramaiah K.V.A. CCCP-induced mitochondrial dysfunction - characterization and analysis of integrated stress response to cellular signaling and homeostasis // J. FEBS 2021. Vol. 288 (19). P. 5737-5754.

56. Koopman W.J., Distelmaier F., Esseling J.J., Smeitink J.A., Willems P.
H. Computer-assisted live cell analysis of mitochondrial membrane potential, morphology and calcium handling // Methods. 2008. Vol. 46 (4). P. 304-11.

57. Korkotian E., Frotscher M., Segal M. Synaptopodin regulates spine plasticity: mediation by calcium stores // J Neurosci. 2014. Vol. 34 (35). P. 11641-11651.

58. Korkotian E., Holcman D., Segal M. Dynamic regulation of spinedendrite coupling in cultured hippocampal neurons // Eur J Neurosci. 2004. Vol. 20 (10). P. 2649-63.

59. Korkotian E., Meshcheriakova A., Segal M. Presenilin 1 Regulates [Ca2+]i and Mitochondria/ER Interaction in Cultured Rat Hippocampal Neurons // Oxid Med Cell Longev. 2019. Vol. 2019. P. 7284967.

60. Korkotian E., Oni-Biton E., Segal M. The role of the store-operated calcium entry channel Orai1 in cultured rat hippocampal synapse formation and plasticity // J Physiol. 2017. Vol. 595 (1). P. 125-140.

61. Korkotian E., Segal M. Structure-function relations in dendritic spines: is size important? // Hippocampus. 2000. Vol. 10 (5). P. 587–95.

62. Korkotian E., Segal M., Synaptopodin regulates release of calcium from stores in dendritic spines of cultured hippocampal neurons // J. Physiol. 2011. Vol. 589. P. 5987-5995.

63. Kraft R. STIM and ORAI proteins in the nervous system // Channels 2015. Vol. 9. P. 245-252.

64. Kshatri A.S., Gonzalez-Hernandez A., Giraldez T. Physiological Roles and Therapeutic Potential of Ca2+ Activated Potassium Channels in the Nervous System // Front Mol Neurosci. 2018. Vol. 30 (11). P. 258.

65. Kushnireva L., Korkotian E., Segal M. Calcium Sensors STIM1 and STIM2 Regulate Different Calcium Functions in Cultured Hippocampal Neurons // Front Synaptic Neurosci. 2021. Vol. 12. P. 573714.

66. Kwon H.B., Sabatini B.L. Glutamate induces de novo growth of functional spines in developing cortex // Nature. 2011. Vol. 474 (7349). P. 100-4.

67. Lee K.F., Soares C., Thivierge J. P., Béïque J. C. Correlated Synaptic Inputs Drive Dendritic Calcium Amplification and Cooperative Plasticity during Clustered Synapse Development // Neuron. 2016. Vol. 89 (4). P. 784-99.

68. Lee S.Y., Hwang D.Y., Kim Y.K., et al. PS2 mutation increases neuronal cell vulnerability to neurotoxicants through activation of caspase-3 by enhancing of ryanodine receptor-mediated calcium release // FASEB J. 2006. Vol. 20 (1). P. 151-3.

69. Lee W.C., Bonin V., Reed M., et al. Anatomy and function of an excitatory network in the visual cortex // Nature. 2016. Vol. 532. P. 370–374.

70. Leung A., Ohadi D., Pekkurnaz G., Rangamani P. Systems modeling predicts that mitochondria ER contact sites regulate the postsynaptic energy landscape // NPJ Syst Biol Appl. 2021. Vol. 7 (1). P. 26.

71. Levy M., Faas G. C., Saggau P., Craigen W. J., Sweatt J. D. Mitochondrial regulation of synaptic plasticity in the hippocampus // J Biol Chem. 2003. Vol. 278 (20). P. 17727-34.

72. Lewis T.L, Kwon S. K., Lee A., et al. MFF-dependent mitochondrial fission regulates presynaptic release and axon branching by limiting axonal mitochondria size // Nat Commun. 2018. Vol. 9. P. 5008.

73. Liang Y., Yuan L. L., Johnston D., Gray R. Calcium signaling at single mossy fiber presynaptic terminals in the rat hippocampus // J Neurophysiol. 2002. Vol. 87 (2). P. 1132-7.

74. Lisman J., Schulman H., Cline H., The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory // Nat. Rev. Neurosci. 2002. Vol. 3. P. 175-190.

75. Liu X., Weaver D., Shirihai O., Hajnóczky G. Mitochondrial 'kiss-andrun': interplay between mitochondrial motility and fusion-fission dynamics // EMBO J. 2009. Vol. 28 (20). P. 3074-3089.

76. Li Z., Okamoto K., Hayashi Y., Sheng M. The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses // Cell. 2004. Vol. 119 (6). P. 873-87.

77. Lu J., Zuo Y. Clustered structural and functional plasticity of dendritic spines // Brain Res Bull. 2017. Vol. 129. P. 18-22.

78. Maggio N., Vlachos A. Synaptic plasticity at the interface of health and disease: new insights on the role of endoplasmic reticulum intracellular calcium stores // Neuroscience. 2014. Vol. 281. P. 135-46.

79. Majewski L., Maciąg F., Boguszewski P.M., Kuznicki J. Transgenic Mice Overexpressing Human STIM2 and ORAI1 in Neurons Exhibit Changes in Behavior and Calcium Homeostasis but Show No Signs of Neurodegeneration // Int J Mol Sci. 2020. Vol. 21 (3). P. 842.

80. Macaskill A.F., Rinholm J.E., Twelvetrees A.E., et al. Miro1 is a calcium sensor for glutamate receptor-dependent localization of mitochondria at synapses // Neuron. 2009. Vol. 61 (4). P. 541-555.

81. Mitchell C.B., Gasperini R. J., Small D. H., Foa L. STIM1 is necessary for store-operated calcium entry in turning growth cones // J. Neurochem. 2012. Vol. 122. P. 1155-1166.

82. Mitroshina E., Kalinina E., Vedunova M. Optogenetics in Alzheimer's Disease: Focus on Astrocytes // Antioxidants (Basel). 2023. Vol. 12 (10). P. 1856.

83. Mitroshina E.V., Krivonosov M.I., Pakhomov A.M., Yarullina L.E., Gavrish M.S., Mishchenko T.A., Yarkov R.S., Vedunova M.V. Unravelling the Collective Calcium Dynamics of Physiologically Aged Astrocytes under a Hypoxic State In Vitro // Int J Mol Sci. 2023. Vol. 24 (15). P. 12286.

84. Müller W.E., Eckert A., Kurz C. et al. Mitochondrial Dysfunction: Common Final Pathway in Brain Aging and Alzheimer's Disease—Therapeutic Aspects // Mol Neurobiol. 2010. Vol. 41. P. 159-171.

85. Murakoshi H., Yasuda R. Postsynaptic signaling during plasticity of dendritic spines // Trends Neurosci. 2012. Vol. 35. P. 135.

86. Nishiyama J., Yasuda R. Biochemical Computation for Spine Structural Plasticity // Neuron. 2015. Vol. 87 (1). P. 63-75.

87. Ofer N., Berger D. R., Kasthuri N., Lichtman J. W., Yuste R. Ultrastructural analysis of dendritic spine necks reveals a continuum of spine morphologies // Dev Neurobiol. 2021. Vol. 81 (5). P. 746-757.

88. Okuno H., Akashi K., Ishii Y., et al. Inverse synaptic tagging of inactive synapses via dynamic interaction of Arc/Arg3.1 with CaMKII β // Cell. 2012. Vol. 149 (4). P. 886-898.

89. Ostroff L.E., Botsford B., Gindina S., et al. Accumulation of Polyribosomes in Dendritic Spine Heads, But Not Bases and Necks, during Memory Consolidation Depends on Cap-Dependent Translation Initiation // J Neurosci. 2017. Vol. 37 (7). P. 1862-1872.

90. Ostroff L.E., Cain C. K., Bedont J., Monfils M. H., LeDoux J. E. Fear and safety learning differentially affect synapse size and dendritic translation in the lateral amygdala // Proc Natl Acad Sci U S A. 2010. Vol. 107 (20). P. 9418-9423.

91. Padamsey Z., Foster W.J., Emptage N.J. Intracellular Ca2+ Release and Synaptic Plasticity: A Tale of Many Stores // Neuroscientist. 2019. Vol. 25 (3). P. 208-226.

92. Park C.Y., Shcheglovitov A., Dolmetsch R. The CRAC channel activator STIM1 binds and inhibits L-type voltage-gated calcium channels // Science 2010. Vol. 330. P. 101-105.

93. Penzes P., Cahill M. E., Jones K. A., VanLeeuwen J.-E., Woolfrey K.
M., Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders // Nat. Neurosci. 2011.
Vol. 14. P. 285-293.

94. Pereira A.C., Lambert H.K., Grossman Y.S., et al. Glutamatergic regulation prevents hippocampal-dependent age-related cognitive decline through dendritic spine clustering // Proc Natl Acad Sci U S A. 2014. Vol. 111 (52). P. 18733-18738.

95. Perez-Alvarez A., Yin S., Schulze C., et al. Endoplasmic reticulum visits highly active spines and prevents runaway potentiation of synapses // Nat Commun. 2020. Vol. 11. P. 5083.

96. Perkins G.A., Renken C.W., Frey T.G., Ellisman M.H. Membrane architecture of mitochondria in neurons of the central nervous system // J Neurosci Res. 2001. Vol. 66 (5). P. 857-65.

97. Popov A.V., Kushnireva L.A., Doronin M.S., Henley J.M. Kainate Receptors are the Key to Understanding Synaptic Plasticity, Learning and Memory (Review) // Современные технологии в медицине (eng). 2017. Vol. 9 (4). P. 228-237.

98. Popov V., Medvedev N.I., Davies H.A., Stewart M.G. Mitochondria form a filamentous reticular network in hippocampal dendrites but are present as discrete bodies in axons: a three-dimensional ultrastructural study // J Comp Neurol. 2005. Vol. 492 (1). P. 50-65.

99. Popugaeva E., Pchitskaya E., Speshilova A., Alexandrov S., Zhang H., Vlasova O., Bezprozvanny I. STIM2 protects hippocampal mushroom spines from amyloid synaptotoxicity // Mol Neurodegener. 2015. Vol. 10. P. 37.

100. Popugaeva E., Supnet C., Bezprozvanny I. Presenilins, deranged calcium homeostasis, synaptic loss and dysfunction in Alzheimer's disease // Messenger. 2012. Vol. 1. P. 5362.

101. Rajgor D., Welle T.M., Smith K. R. The Coordination of Local Translation, Membranous Organelle Trafficking, and Synaptic Plasticity in Neurons // Front Cell Dev Biol. 2021. Vol. 9. P. 711446.

102. Rangaraju V., Lauterbach M., Schuman E.M. Spatially Stable Mitochondrial Compartments Fuel Local Translation during Plasticity // Cell 2019. Vol. 176 (1-2). P. 73-84.

103. Redondo R., Morris R. Making memories last: the synaptic tagging and capture hypothesis // Nat Rev Neurosci. 2011. Vol. 12. P. 17-30.

 Rizzuto R., De Stefani D., Raffaello A., Mammucari C. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling // Nat Rev Mol Cell Biol. 2012. Vol. 13 (9). P. 566-78.

105. Rosado J., Bui V.D., Haas C.A., Beck J., Queisser G., Vlachos A. Calcium modeling of spine apparatus-containing human dendritic spines demonstrates an "all-or-nothing" communication switch between the spine head and dendrite // PLoS Comput Biol. 2022. Vol. 18 (4):e1010069.

106. Ross W.N. Understanding calcium waves and sparks in central neurons // Nat. Rev. Neurosci. 2015. Vol. 13. P. 157-168.

107. Rybalchenko V., Hwang S.Y., Rybalchenko N., Koulen P. The cytosolic N-terminus of presenilin-1 potentiates mouse ryanodine receptor single channel activity // Int J Biochem Cell Biol. 2008. Vol. 40 (1). P. 84-97.

108. Ryskamp D.A., Korban S., Zhemkov V., Kraskovskaya N., Bezprozvanny I. Neuronal Sigma-1 Receptors: Signaling Functions and Protective Roles in Neurodegenerative Diseases // Front Neurosci. 2019. Vol. 13. P. 862.

109. Ryskamp D.A., Zhemkov V., Bezprozvanny I. Mutational Analysis of Sigma-1 Receptor's Role in Synaptic Stability // Front Neurosci. 2019. Vol. 13. P. 1012.

110. Sadeh N., Verbitsky S., Dudai Y. and Segal M. Zeta Inhibitory Peptide, a Candidate Inhibitor of Protein Kinase Mzeta, Is Excitotoxic to Cultured Hippocampal Neurons // J Neurosci. 2015. Vol. 35 (36). P. 12404-12411.

111. Salmina A.B., Malinovskaya N.A., Morgun A.V., Khilazheva E.D., Uspenskaya Y.A., Illarioshkin S.N. Reproducibility of developmental neuroplasticity in in vitro brain tissue models // Rev Neurosci. 2022. Vol. 33 (5). P. 531-554.

112. Segal M. Dendritic spines and long-term plasticity // Nat. Rev. Neurosci. 2005. Vol. 6. P. 277-284.

113. Segal, M., and Korkotian, E. Endoplasmic reticulum calcium stores in dendritic spines // Front. Neuroanat. 2014. Vol. 8. P. 64.

114. Segal M., Korkotian E. Roles of Calcium Stores and Store-Operated Channels in Plasticity of Dendritic Spines // Neuroscientist. 2016. Vol. 22 (5). P. 477-485.

115. Sheng Z.H., Cai Q. Mitochondrial transport in neurons: impact on synaptic homeostasis and neurodegeneration // Nat Rev Neurosci. 2012. Vol. 13. P. 77-93.

116. Shim S.H., Xia C., Zhong G., et al. Super-resolution fluorescence imaging of organelles in live cells with photoswitchable membrane probes // Proc Natl Acad Sci U S A. 2012. Vol. 109 (35). P. 13978-13983.

117. Skibinska-Kijek A., Wisniewska M. B., Gruszczynska-Biegala J., Methner A., Kuznicki J. Immunolocalization of STIM1 in the mouse brain // Acta Neurobiol. Exp. 2009. Vol. 69. P. 413-428.

118. Smit-Rigter L., Rajendran R., Silva C. A., et al. Mitochondrial Dynamics in Visual Cortex Are Limited In Vivo and Not Affected by Axonal Structural Plasticity // Curr Biol. 2016. Vol. 26 (19). P. 2609-2616.

119. Sokolov R.A., Jappy D., Podgorny O.V., Mukhina I.V. Nitric Oxide Synthase Blockade Impairs Spontaneous Calcium Activity in Mouse Primary Hippocampal Culture Cells // Int J Mol Sci. 2023. Vol. 24 (3). P. 2608.

120. Sokolov R.A., Mukhina I.V. Spontaneous Ca2+ events are linked to the development of neuronal firing during maturation in mice primary hippocampal culture cells // Arch Biochem Biophys. 2022. Vol. 30 (727). P. 109330.

121. Spillane M., Ketschek A., Merianda T.T., Twiss J.L., Gallo G. Mitochondria coordinate sites of axon branching through localized intra-axonal protein synthesis // Cell Rep. 2013. Vol. 5 (6). P. 1564-1575.

122. Sree S., Parkkinen I., Their A., Airavaara M., Jokitalo E. Morphological Heterogeneity of the Endoplasmic Reticulum within Neurons and Its Implications in Neurodegeneration // Cells. 2021. Vol. 10 (5). P. 970.

123. Steinbeck J.A., Henke N., Opatz J., Gruszczynska-Biegala J., Schneider L., Theiss S., et al. Store-operated calcium entry modulates neuronal network activity in a model of chronic epilepsy // Exp. Neurol. 2011. Vol. 232. P. 185-194.

124. Storozhuk M.V., Ivanova S.Y., Balaban P.M., Kostyuk P.G. Possible role of mitochondria in posttetanic potentiation of GABAergic synaptic transmission in rat neocortical cell cultures // Synapse. 2005. Vol. 58 (1). P. 45-52.

125. Stutzmann G.E., Smith I., Caccamo A., Oddo S., Laferla F.M., Parker I. Enhanced ryanodine receptor recruitment contributes to Ca2+ disruptions in young, adult, and aged Alzheimer's disease mice // J Neurosci. 2006. Vol. 26 (19). P. 5180-5189.

126. Sun S., Zhang H., Liu J., Popugaeva E., Xu N.-J., Feske S., et al. Reduced synaptic STIM2 expression and impaired store-operated calcium entry cause destabilization of mature spines in mutant presenilin mice // Neuron 2014. Vol. 82. P. 79-93.

127. Svoboda K., Tank D.W., Denk W. Direct measurement of coupling between dendritic spines and shafts // Science. 1996. Vol. 272. P. 716-719.

128. Tonkikh A.A., Carlen P.L. Impaired presynaptic cytosolic and mitochondrial calcium dynamics in aged compared to young adult hippocampal CA1 synapses ameliorated by calcium chelation // Neuroscience. 2009. Vol. 159 (4). P. 1300-8.

129. Tu H., Nelson O., Bezprozvanny A., et al. Presenilins form ER Ca2+ leak channels, a function disrupted by familial Alzheimer's disease-linked mutations // Cell. 2006. Vol. 126 (5). P. 981-993.

130. Vasilev D.S., Dubrovskaya N.M., Zhuravin I.A., Nalivaeva N.N. Developmental Profile of Brain Neprilysin Expression Correlates with Olfactory Behaviour of Rats // J Mol Neurosci. 2021. Vol. 71 (9). P. 1772-1785.

131. Verkhratsky A. Physiology and Pathophysiology of the Calcium Store in the Endoplasmic Reticulum of Neurons // Physiological Reviews. 2005. Vol. 85 (1). P. 201-79.

132. Vianello A., Casolo V., Petrussa E., et al. The mitochondrial permeability transition pore (PTP) — An example of multiple molecular exaptation? Biochimica et Biophysica Acta (BBA) // Bioenergetics. 2012. Vol. 1817 (11). P. 2072-2086.

133. Vlachos A., Ikenberg B., Lenz M., et al. Synaptopodin regulates denervation-induced homeostatic synaptic plasticity // Proc Natl Acad Sci U S A. 2013. Vol. 110 (20). P. 8242-8247.

134. Vlachos A., Korkotian E., Schonfeld E., Copanaki E., Deller T., SegalM. Synaptopodin regulates plasticity of dendritic spines in hippocampal neurons //J Neurosci. 2009. Vol. 29 (4). P. 1017-1033.

135. Vlachos A. Synaptopodin and the spine apparatus organelle— Regulators of different forms of synaptic plasticity? Annals of Anatomy -Anatomischer Anzeiger. 2012. Vol. 194 (4). P. 317-320.

136. Vos M., Lauwers E., Verstreken P. Synaptic mitochondria in synaptic transmission and organization of vesicle pools in health and disease // Front Synaptic Neurosci. 2010. Vol. 2. P. 139.

137. Wang X., Schwarz T.L. The mechanism of Ca2+ -dependent regulation of kinesin-mediated mitochondrial motility // Cell. 2009. Vol. 136 (1). P. 163-174.

138. Wang X., Winter D., Ashrafi G., et al. PINK1 and Parkin target Miro for phosphorylation and degradation to arrest mitochondrial motility // Cell. 2011. Vol. 147 (4). P. 893-906.

139. Weng T.Y., Tsai S.Y.A., Su T.P. Roles of sigma-1 receptors on mitochondrial functions relevant to neurodegenerative diseases // J Biomed Sci. 2017. Vol. 24. P. 74.

140. Wu Y., Whiteus C., Xu C.S., et al. Contacts between the endoplasmic reticulum and other membranes in neurons // Proc Natl Acad Sci U S A. 2017. Vol. 114 (24). P. 4859-4867.

141. Xu H., Gan C., Gao Z., Huang Y., W S., Zhang D., Wang X., Sheng J.: Caffeine Targets SIRT3 to Enhance SOD2 Activity in Mitochondria // Front Cell Dev Biol. 2020. Vol. 1 (8). P. 822. 142. Yousuf M.S., Maguire A.D., Simmen T., Kerr B.J. Endoplasmic reticulum-mitochondria interplay in chronic pain: The calcium connection // Mol Pain. 2020. Vol. 16:1744806920946889.

143. Yu H., Lin X., Wang D., et al. Mitochondrial Molecular Abnormalities Revealed by Proteomic Analysis of Hippocampal Organelles of Mice Triple Transgenic for Alzheimer Disease // Front Mol Neurosci. 2018. Vol. 11. P. 74.

144. Yuste R., Bonhoeffer T. Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity // Annu. Rev. Neurosci. 2001. Vol. 24.P. 1071-1089.

145. Yuste R. Dendritic Spines // MIT press. 2010.

146. Yuste R., Denk W., Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration // Nature. 1995. Vol. 375. P. 682-684.

147. Yuste R., Majewska A., Holthoff K. From form to function: Calcium compartmentalization in dendritic spines // Nat. Neurosci. 2000. Vol. 3. P. 653-659.

148. Zalk R., Lehnart S.E., Marks A.R. Modulation of the ryanodine receptor and intracellular calcium // Annu Rev Biochem. 2007. Vol. 76. P. 367-385.

149. Zhang H., Wu L., Pchitskaya E., Zakharova O., Saito T., Saido T., et al. Neuronal store-operated calcium entry and mushroom spine loss in amyloid precursor protein knock-in mouse model of Alzheimer's disease // J. Neurosci. 2015/ Vol. 35. P. 13275-13286.

150. Zheng K., Bard L., Reynolds J. P., King C., Jensen T. P., Gourine A. V., Rusakov D. A. Time-resolved imaging reveals heterogeneous landscapes of nanomolar Ca2+ in neurons and astroglia // Neuron. 2015. Vol. 88. P. 277–288.

151. Zhemkov V., Geva M., Hayden M.R., Bezprozvanny I. Sigma-1 Receptor (S1R) Interaction with Cholesterol: Mechanisms of S1R Activation and Its Role in Neurodegenerative Diseases // Int J Mol Sci. 2021. Vol. 22 (8). P. 4082.

152. Zhuravin I.A., Dubrovskaya N.M., Vasilev D.S., Postnikova T.Y., Zaitsev A.V. Prenatal hypoxia produces memory deficits associated with impairment of long-term synaptic plasticity in young rats // Neurobiol Learn Mem. 2019. Vol. 164. P. 107066.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1



Приложение 1 – Набор данных для усреднения локальных событий по критерию двух стандартных отклонений (СО, пунктирные линии). А₁-А₁₀ – примеры сопряжённых локальных ПКС [Ca²⁺]_c (зелёным, Fluo-2, нормализованный сигнал) и [Ca²⁺]_m (красным,

mtRCaMP, нормализованный сигнал). Увеличение масштаба сигнала mtRCaMP с конкретными точками данных на вставочной панели. Временной шаг – 10 мс. Б₁-Б₂ – наложение событий [Ca²⁺]_c с A₁-A₁₀ и получение усреднённого графика. В₁-В₂ – наложение событий [Ca²⁺]_c с A₁-A₁₀ и получения усреднённого графика. Г – пиковые значения Fluo-2 (ось х) и mtRCaMP (ось у), полученные из событий A₁-A₁₀. Красная линия – линейная корреляция. Коэффициент корреляции г-Пирсона (r = 0,851) рассчитывался на основе данных пиковых значений.



Приложение 2 – Набор данных, демонстрирующих реакции потенциала мембраны митохондрий (TMRM) на локальные переходные кальциевые события (ПКС, Fluo-2). Вверху, слева – деполяризующие реакции в митохондриях, превышающие порог в два стандартных отклонения (красные линии), справа – гиперполяризующие реакции в ответ на локальное событие [Ca²⁺]_c. Внизу представлены примеры ПКС, не получающие

реакцию в TMRM сигнале.