

ДВА СУБКОМПАРТМЕНТА ГЛАДКОГО ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА В ПЕРИСИНАПТИЧЕСКИХ ОТРОСТКАХ АСТРОЦИТОВ: УЛЬТРАСТРУКТУРА И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ В СИНАПСАХ ГИППОКАМПА И НЕОКОРТЕКСА

© 2023 г. Е.А. Шишкова*, В.В. Рогачевский*.*#

*Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», Институтская ул., 3, Пушкино Московской области, 142290, Россия

#E-mail: ckpem.icb.ras@gmail.com

Поступила в редакцию 03.02.2023 г.

После доработки 03.02.2023 г.

Принята к публикации 17.02.2023 г.

Перисинаптические отростки астроцитов, участвуя в работе трехчастного синапса, отвечают на его активацию локальной деполяризацией с высвобождением ионов кальция из внутриклеточных депо в узлах ветвления отростков и проявляют локальные или генерализованные кальциевые события. Однако по результатам первых электронно-микроскопических исследований сформировалось мнение, что терминальные ламеллы астроцитов лишены каких-либо органелл, включая основное депо ионов кальция астроцитов – цистерны гладкого эндоплазматического ретикулума (sER). Анализ цистерн гладкого эндоплазматического ретикулума действительно может быть ограничен их слабым электронным контрастом, исследованием астроцитарных отростков на одиночных срезах и недостаточным оптическим разрешением используемых приборов. В данной работе с использованием просвечивающей электронной микроскопии и 3D-реконструкции на серийных срезах мы провели анализ отростков астроцитов в синапсах гиппокампа и коры мозга мыши. В результате усиления контраста элементарных мембран впервые показано, что перисинаптические отростки астроцитов с морфологией тонких веточек содержат два типа цистерн гладкого эндоплазматического ретикулума и микровезикулы. В отличие от веточек, мембранные органеллы в терминальных ламеллах представлены лишь короткими фрагментами тонких цистерн гладкого эндоплазматического ретикулума и микровезикулами, группы которых имеют тенденцию располагаться в непосредственной близости от активных зон наиболее активных синапсов. В работе обсуждается вопрос адекватности применения альтернативных методов электронной микроскопии в исследованиях астроцитарного микроокружения синапсов и структурно-функциональные аспекты компартиментализации цистерн гладкой эндоплазматической сети в перисинаптических отростках астроцитов.

Ключевые слова: перисинаптические и терминальные отростки астроцитов, гладкий эндоплазматический ретикулум, гликоген, просвечивающая электронная микроскопия, сканирующая электронная микроскопия, 3D-реконструкция.

DOI: 10.31857/S0006302923020126, EDN: CAZEOI

Наиболее поразительной особенностью ультраструктуры астроцитов, в отличие от нейронов, является чрезвычайно сложная пространственная организация их разветвленных и взаимосвязанных отростков, что накладывает существенные ограничения на анализ их взаимодействия с

синапсами не только методами высокоразрешающей световой, но и электронной микроскопии [1]. Дистальный отдел отростков представлен контактирующими с синапсами периферическими отростками и узлами их ветвления [2, 3], в которых наблюдаются спонтанные Ca^{2+} -события или фокусы локальной деполяризации со значительной Ca^{2+} -компонентой в ответ на электрическую стимуляцию входящих аксонов [4]. Результаты этих электрофизиологических и имиджинговых экспериментов предполагают наличие в периферических отростках депо ионов Ca^{2+} .

Сокращения: sER – гладкий эндоплазматический ретикулум, PAP – перисинаптические отростки астроцитов, TAP – терминальные отростки астроцитов, SEM – сканирующая электронная микроскопия, 3D – трехмерный, IP3R – рецептор инозитол трифосфата, RyR – рецептор рианодина, PSD – постсинаптическое уплотнение..

Но если в нейронах гладкая эндоплазматическая сеть достаточно подробно описана [5–7], то ультраструктура и распределение органелл в перисинаптических отростках астроцитов до сих пор не изучены в должной мере [1]. Тем не менее, на иллюстрациях в ряде работ можно видеть цистерны гладкого эндоплазматического ретикулума (sER) в перисинаптических отростках в непосредственной близости от интерфейсов «аксон–шипик» (с использованием просвечивающей электронной микроскопии – рис. 31 в работе [8], рис. 2, 5 и 7 в работе [9], рис. 1 и 5 в работе [10], рис. 2 и 5 в работе [11], рис. 2 и 3 в работе [12], рис. 1 и 5 в работе [13], рис. 4 в работе [14]; с использованием серийного сканирования поверхности блока (SBF-SEM) – рис. 5 в работе [15]). Наряду с цистернами sER в перисинаптических отростках было показано наличие иммуномеченных на глиотрансмиттеры и их транспортеры слабоконтрастных микровезикул, сходных с синаптическими [16, 17]. Однако, поскольку кластеры этих микровезикул невозможно было обнаружить в периферических отростках, существует серьезный скептицизм в отношении Ca^{2+} -зависимого высвобождения глиотрансмиттеров [1].

Боле десяти лет назад была акцентирована необходимость анализа ультраструктуры нейрон-глиального взаимодействия с применением сложных и затратных по времени методов трехмерной (3D) реконструкции с высоким пространственным разрешением [1]. Первая попытка анализа sER в астроцитарных отростках с применением 3D-реконструкции была предпринята на серии негативов, полученных при увеличении $\times 6K$ и отсканированных с разрешением 1200 dpi [18], что дает финальное разрешение изображения 3.4 нм/пиксель и приблизительно соответствует порядку разрешений сканирующей электронной микроскопии с сфокусированным ионным пучком (FIB-SEM) – 8–4 нм/пиксель (см., например, работу [7]). В работе [18] авторы не использовали такие усилители контраста как ферри- или ферроцианид калия или тиокарбонгидразид [19, 20], поэтому, как и в пионерской работе на одиночных срезах [21], так и в результате анализа серийных срезов, органеллы в периферических отростках обнаружены не были. В результате, несмотря на ряд приведенных выше фактов наличия органелл в перисинаптических отростках, закрепилось устойчивое мнение, что периферические отростки астроцитов лишены каких-либо органелл, включая элементы эндоплазматической сети, поэтому астроцитарные отростки по настоящее время классифицируют на ветви, содержащие органеллы, и свободные от органелл листочки или ламеллы [2, 22]. Обнаружение органелл и, в частности, цистерн sER в отростках астроцитов действительно может быть ограничено их слабым электронным контрастом, исследова-

нием астроцитарных отростков на одиночных срезах или недостаточным оптическим разрешением используемых приборов. Данная работа отчасти заполняет этот пробел.

В литературе присутствует довольно широкая терминология отростков астроцитов [1], в которой наибольшую путаницу вносят два термина: «перисинаптические астроцитарные отростки» и «периферические астроцитарные отростки» с одинаковой аббревиатурой PAP. Поскольку *en passant* отростки или веточки, проходящие рядом с синапсами, также можно считать перисинаптическими, то для большей ясности здесь и далее мы будем именовать дистальные отростки астроцитов в целом как перисинаптические (PAP), будь то *en passant* или оканчивающиеся вблизи синапсов, и терминальные (TAP), которые оканчиваются, как будет видно по ходу изложения, в значительной части вблизи активных зон синапсов. В данной работе мы сфокусировались главным образом на анализе TAP, но содержащим протяженные цистерны sER веточкам также уделили внимание.

С использованием просвечивающей электронной микроскопии серийных ультратонких срезов мы провели анализ отростков астроцитов в синапсах гиппокампа и слоя I сенсомоторной коры мозга мыши с применением 3D-реконструкции синапсов. Вследствие усиления контраста элементарных мембран путем двойного осмирования с феррицианидом калия в значительной степени возрастает и электронная плотность гранул гликогена, богато представленных в PAP астроцитов слоя I коры [23]. Во избежание интерференции изображений поперечных сечений цистерн sER, имеющих сходные диаметры с β -гранулами гликогена, мы воспользовались феноменом быстрой посттравматической разборки гликогена в результате этаназии путем цервикальной дислокации. Остающиеся в PAP мало-размерные органеллы на малых увеличениях по морфологии и размерам были сходны с гранулами гликогена. Однако при разрешениях изображений, в 10–15 раз превышающих достижимые разрешения в сканирующей электронной микроскопии (SEM), становится очевидно, что эти органеллы имеют мембранную природу.

Анализ свободных от гранул гликогена PAP на серийных срезах показывает, что PAP астроцитов с морфологией тонких веточек содержат микровезикулы и два типа цистерн sER. Изменение морфологии от одного типа sER к другому по ходу одной цистерны предполагает взаимосвязанность двух компартментов sER. Как сужение цистерн до диаметра ~ 20 нм и менее, так и наличие в отростках коротких тонких фрагментов sER предполагает фрагментацию sER с отщеплением от расширенных цистерн тонких коротких фраг-

ментов. В отличие от тонких веточек мембранные органеллы в ТАР представлены лишь короткими тонкими цистернами sER и микровезикулами. Результаты 3D-реконструкции обнаруживают нестохастическое распределение микровезикул и фрагментов тонких цистерн в РАР; цистерны sER и группы микровезикул имеют тенденцию располагаться в непосредственной близости от активных зон наиболее активных синапсов.

Сопоставление с данными иммуноэлектронной микроскопии [16, 17] позволяет считать тонкие sER как ультраструктурной основой и первичным звеном развития спонтанных и индуцированных Ca^{2+} -событий в ТАР, так и необходимым условием для Ca^{2+} -зависимого везикулярного высвобождения глиотрансмиттеров вблизи активных синапсов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Фиксация ткани мозга. В эксперименте использованы самцы мышей линии C57BL/6 (возраст 3 месяца, масса 26–31 г). Одно животное анестезировали изофлураном до снижения частоты дыхательных движений. Эвтаназию другого проводили путем цервикальной дислокации. После декапитации мозг извлекали и к 110–140 с после декапитации получали готовые слайсы толщиной ~0.5 мм при помощи ручного триммера оригинальной конструкции с частотой движения лезвия 80–90 Гц. Получение коронарных срезов проводили на охлажденной силиконовой подложке непосредственно в капле предоблученного в микроволновой печи фиксатора с температурой 4°C, содержащего 3% формалина и 1.25% глутарового альдегида на 0.1 М натрий-какодилатном буфере, содержащем 2 мМ CaCl_2 , 4 мМ MgCl_2 и 50 мМ сахарозы. Временной диапазон между декапитацией и погружением трех-пяти срезов ткани во флакон с тем же фиксатором не превышал 2.5 мин. Флаконы с тканью, содержащие 5 мл того же фиксатора с исходной температурой 4°C, облучали микроволнами при мощности магнетрона 100 Вт в холодной точке микроволновой печи в режиме 20 с вкл./20 с охлаждение/20 с вкл.; температура фиксатора после облучения по данным точечного термометра не превышала 30°C. Спустя 6 ч хранения срезов ткани в фиксаторе при 4°C последний был заменен на вторичный фиксатор без формалина, но содержащий 2.5% глутарового альдегида. Срезы во вторичном фиксаторе были обработаны микроволнами, как описано выше, и оставлены в фиксаторе при 4°C. Спустя сутки образцы были трижды отмыты в вышеуказанном буфере при помощи микроволн.

Постфиксация и заключение ткани в смолы. Образцы постфиксировали дважды. Сначала – 3.5 ч при комнатной температуре в 1%-м растворе вос-

становленного с феррицианидом калия OsO_4 на 0.1 М какодилатном буфере, содержащем 0.01% $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ и 50 мМ сахарозы. 1.5% феррицианида калия ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) добавляли непосредственно перед использованием. Далее образцы были отмыты деионизированной водой в течение ночи. Затем образцы фиксировали в 1%-м растворе OsO_4 на деионизированной воде с 0.01% $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ также в течение 3.5 ч при комнатной температуре. Далее образцы были отмыты деионизированной водой и оставлены в ней на сутки при 4°C. После этого ткань обезвоживали в возрастающих концентрациях этанола, в 100%-м этаноле и 100%-м ацетоне и пропитывали смесью смол со 100%-м ацетоном в объемном отношении 1:1 в течение суток при 4°C (соотношение смесей смол EMBed812/NMA и EMBed812/DDSA составляло 3:7). Образцы переносили в смесь смол без ацетона и полимеризовали 24 ч при 37°C, а затем – 48 ч при 60°C.

Приготовление и контрастирование срезов. Для получения ультратонких срезов на поверхности отвержденных блоков с тканью затачивали пирамидки в области слоев I и II–III сенсомоторной коры и в дистальной относительно сом нейронов зоне слоя *Str. radiatum* в CA1-области гиппокампа. Срезы номинальной толщиной 50–70 нм получали при помощи алмазного ножа на ультрамикротоме EM UC6 (Leica, Германия). Срезы монтировали на гидрофилизированные в тлеющем разряде медные бленды с пленкой-подложкой из пиолоформа, укрепленной аморфным углеродом. Контрастировали срезы последовательно солями лантаноидов (Uranyless [24]) и модифицированным тройным свинцовым красителем Сато [25].

Получение, обработка и анализ изображений. Изображения серийных срезов слоев I и II–III коры мозга фотографировали на фотопленку в режиме монтажа из 2×3 взаимно перекрывающихся кадров при прямом увеличении ×12K на просвечивающем электронном микроскопе JEM-1200EX (Jeol, Япония). Микрофотографии одиночных срезов получали при прямом увеличении ×6–30K. Вращением сеточки серийные срезы ориентировали так, чтобы длинная сторона каждого отдельного среза в серии располагалась параллельно длинной стороне негатива (условная ось X), что позволяло в последующем оценить степень поперечного сжатия срезов, происходящего в процессе их получения (по условной оси Y). Полученные негативы оцифровывали с использованием сканера Perfection V700 (Epson, Япония) с разрешением 2400 dpi. Значения фактического увеличения получали на основе калибровочной реплики (2160 линий на 1 мм; SPI 02902-AB), отснятой на тех же увеличениях. В результате фактическое разрешение одного пикселя изображения, полученного при ×6, ×12, ×15 и

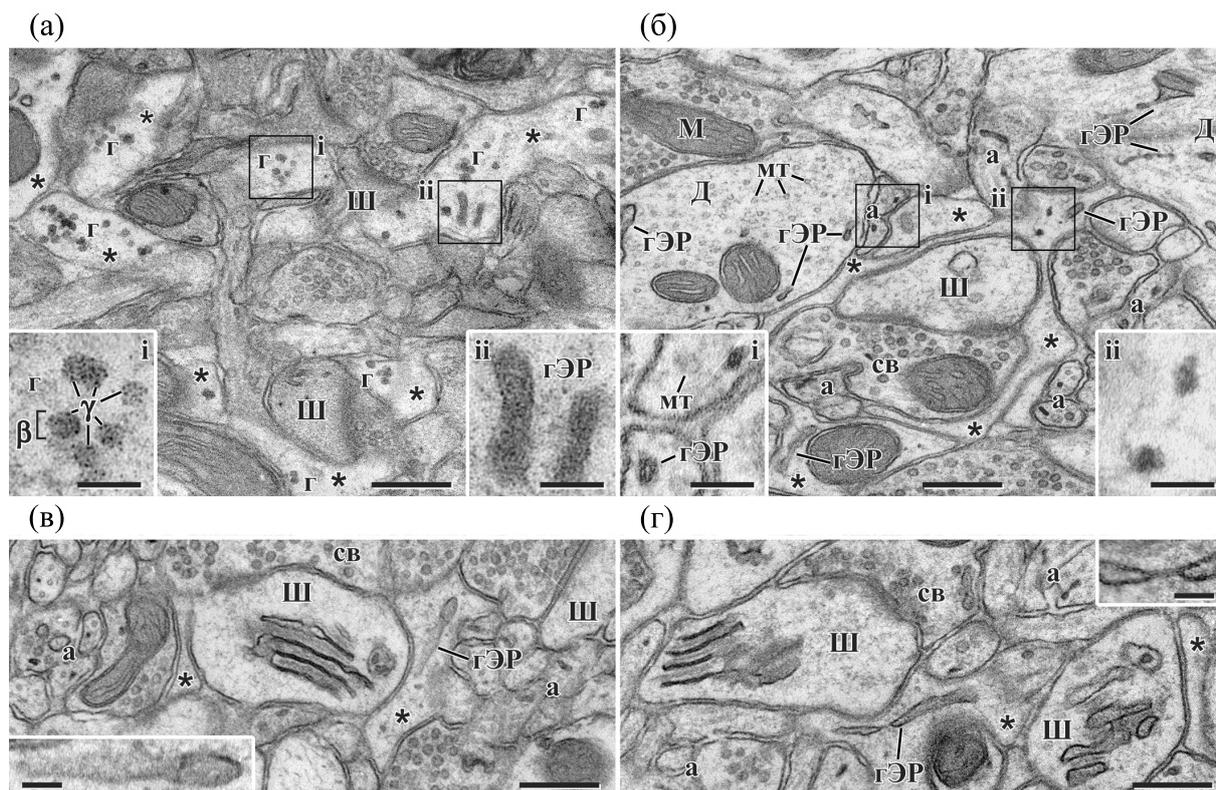


Рис. 1. Ультраструктура органелл астроцитарных отростков в нейропиле слоя I сенсомоторной коры мыши. (а) – Декапитация после глубокой анестезии; (б)–(г) – декапитация после цервикальной дислокации, без анестезии. Звездочками помечены профили сечений перисинаптических астроцитарных отростков. На изображении нейропиля анестезированного животного на панели (а) почти во всех профилях астроцитарных отростков можно наблюдать одиночные гранулы гликогена или их скопления. Стоит обратить внимание на полное отсутствие гранул гликогена на панелях (б)–(г). Условные обозначения и сокращения: i и ii – области, представленные на большем увеличении; а – сечения немиелинизированных аксонов; г – гликоген (β- и γ-частицы); гЭР – гладкий эндоплазматический ретикулум; Д – дендриты; М – митохондрия; мт – микротрубочки; СВ – синаптические везикулы; Ш – головка дендритного шипика. Номинальная толщина среза на панели (а) – 70 нм, на панелях (б)–(г) – 50–60 нм. Шкалы на основных панелях – 250 нм, на врезках i и ii – 100 нм, на врезках панелей (в) и (г) – 50 нм.

×30К, составляло 1.7, 0.85, 0.67 и 0.34 нм соответственно. Эластичную сшивку отдельных кадров в бесшовный монтаж и сборку серий монтажей в стек взаимовыровненных изображений проводили при помощи плагина TrakEM2 для ImageJ [26]. Для оценки средних значений поперечного сжатия срезов измеряли диаметры не менее 300 синаптических везикул в возбуждающих синапсах по осям X и Y по 100 везикул в начале, в середине и в конце серии. Вычисленную степень сжатия срезов использовали для пропорционального растяжения изображений по оси Y. После нивелирования сжатия срезов рассчитывали фактическую среднюю толщину срезов в серии методом измерения диаметров цилиндрических структур [27]. Качественный анализ, 3D-реконструкцию и измерения диаметров цистерн sER проводили в программе Reconstruct 1.1.0.1 [28], визуализацию 3D-объектов – в программе 3ds Max (Autodesk Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор метода эвтаназии для демаскирования цистерн sER. Для лучшей визуализации цистерн sER после глутаральдегидной фиксации ткани мы использовали двойное осмиривание с феррицианидом калия и контрастирование срезов с уранилацетатом, лантаноидами или танинами и солями свинца. Но независимо от способа окраски ультратонких срезов усиление контраста мембран в процессе фиксации с $K_3[Fe(CN)_6]$ значительно усиливает и контраст гликогеновых гранул [29–31].

На рис. 1а представлен фрагмент нейропиля слоя I сенсомоторной коры мозга мыши в состоянии глубокой анестезии. Ранее было отмечено, что среди слоев коры в слое I концентрация гранул гликогена максимальна [23]. В светлых профилях сечений астроцитарных отростков отчетливо наблюдается большое число бета-гранул гликогена. Гранулы с диаметрами порядка 20–

30 нм имеют типичную для них морфологию с наличием рассеянных по профилю высоко электронно-плотных белковых гамма-частиц (увеличенная область i) размером ~3–5 нм [32–35]. В отдельных профилях астроцитов среди гранул гликогена можно наблюдать фрагменты цистерн sER, сходные по диаметрам и электронной плотности с гранулами гликогена (увеличенная область ii). Однако по периферии элементарной мембраны цистерн на цитоплазматическом и люминальном листе бислоя, как и в люмене цистерн, также можно видеть частицы с высокой электронной плотностью, сходные по размерам с гамма-частицами гликогена, что делает их поперечные сечения практически неотличимыми от гликогена. В богатых гликогеном тканях, в гепатоцитах и миоцитах, бета-гранулы гликогена плотно ассоциированы с цистернами эндоплазматического ретикулума [36–39]. По-видимому, сходная ультраструктурная организация гликогенолитического комплекса свойственна и отросткам астроцитов [35, 40]. Так, в центре левой части рис. 1а расположено плотное скопление гранул, среди которых присутствуют поперечные сечения цистерн ретикулума, но ввиду сходства их морфологии с гранулами гликогена идентифицировать их чрезвычайно сложно.

Демаскировать цистерны sER можно, выбрав соответствующий метод эвтаназии и химической фиксации, которые сами по себе могут вносить значительный вклад в экспериментальные данные [41–43]. Так, если анестезия в течение часа не меняет количество гликогена в мозге или печени [44, 45], то ишемия в результате прекращения кровоснабжения или декапитации неанестезированного животного приводит к восполнению концентрации лактата в мозге за счет быстрой разборки гликогена в астроцитах [46, 47] и более чем десятикратному снижению его концентрации в течение одной-двух минут в результате взрывной посттравматической активации сенсорных входов [48–53]. Фиксация путем транскардиальной перфузии анестезированных животных также сильно снижала количество гликогена в мозге по сравнению с микроволновой эвтаназией [23]. Но перфузии предшествовала отмывка в течение 5 мин, а первичный этап фиксации занимал не менее 10 мин. При том, что перисинаптические отростки астроцитов – очень подвижные структуры как *in vitro*, так и *in vivo* [54, 55], любая задержка химической фиксации может значительно влиять на структуру как самих отростков астроцитов, так и лабильных цистерн sER. Поэтому, чтобы демаскировать цистерны sER в астроцитарных отростках, освободив поле зрения от гликогена, мы воспользовались феноменом быстрой посттравматической разборки гликогена в результате цервикальной дислокации с последующей быстрой фиксацией ткани мозга

путем иммерсии и последующей микроволновой обработки, которая, как известно, обеспечивает превосходную сохранность ультраструктуры [56–58].

Перисинаптические отростки астроцитов содержат два типа контрастных цистерн sER. В результате вышеописанных процедур мы получили препараты ткани мозга с астроцитарными отростками, свободными от гранул гликогена. На рис. 1б представлен астроцитарный отросток, изолирующий синапс, дендритный шипик и пресинаптический бутон, от окружающего нейропиля. В просветленной цитоплазме астроцитарных отростков можно наблюдать лишь три типа органелл: митохондрию в расширенном профиле отростка; тангенциальные сечения цистерн sER с диаметрами 30–60 нм, сходные по ширине с цистернами sER в дендритах, а также органеллы сходные по размерам сечений с тонкими «нитевидными» цистернами sER немиелинизированных аксонов. Такие органеллы имеют чуть меньший диаметр (около 10–30 нм, врезка ii на рис. 1б) и электронную плотность, по сравнению с нитевидными цистернами в аксонах (врезка i на рис. 1б).

При анализе даже большого поля изображения расширенные цистерны sER в периферических астроцитарных отростках встречаются редко, но иногда их можно наблюдать не только рядом с головками дендритных шипиков (рис. 1б), но и в непосредственной близости от синаптической щели или интерфейса аксон-шипик (рис. 1в,г). Но в результате предварительного анализа серийных срезов создается впечатление, что такие профили перисинаптических отростков, содержащих длинные (от 0.1 до 3 мкм и более) расширенные цистерны sER, представляют собой тонкие протяженные веточки астроцита, проходящие вблизи синапса. В большинстве же терминальных отростков астроцита, как это будет показано в ходе дальнейшего изложения, органеллы представлены короткими фрагментами «нитевидных» цистерн и/или группами малоразмерных структур, сходных с поперечными сечениями таких цистерн.

Если в высококонтрастных тонких цистернах sER аксонов липидный бислой и люмен цистерны как правило хорошо прослеживаются даже на небольших увеличениях порядка $\times 8K$ с разрешением изображения 1.33 нм/пиксель (рис. 1б, врезка i), то несмотря на общее усиление контраста мембран, органеллы с диаметрами сечений 12–22 нм, представленные на врезке ii на рис. 1б, имеют едва ли прослеживаемые бислой и центральный просвет. Данные органеллы не имеют свойственных гликогеновым гранулам электронно-плотных частиц размером ~3–5 нм, но все же остается неясно, не являются ли они резистентными к разборке «элементарными» бета-частица-

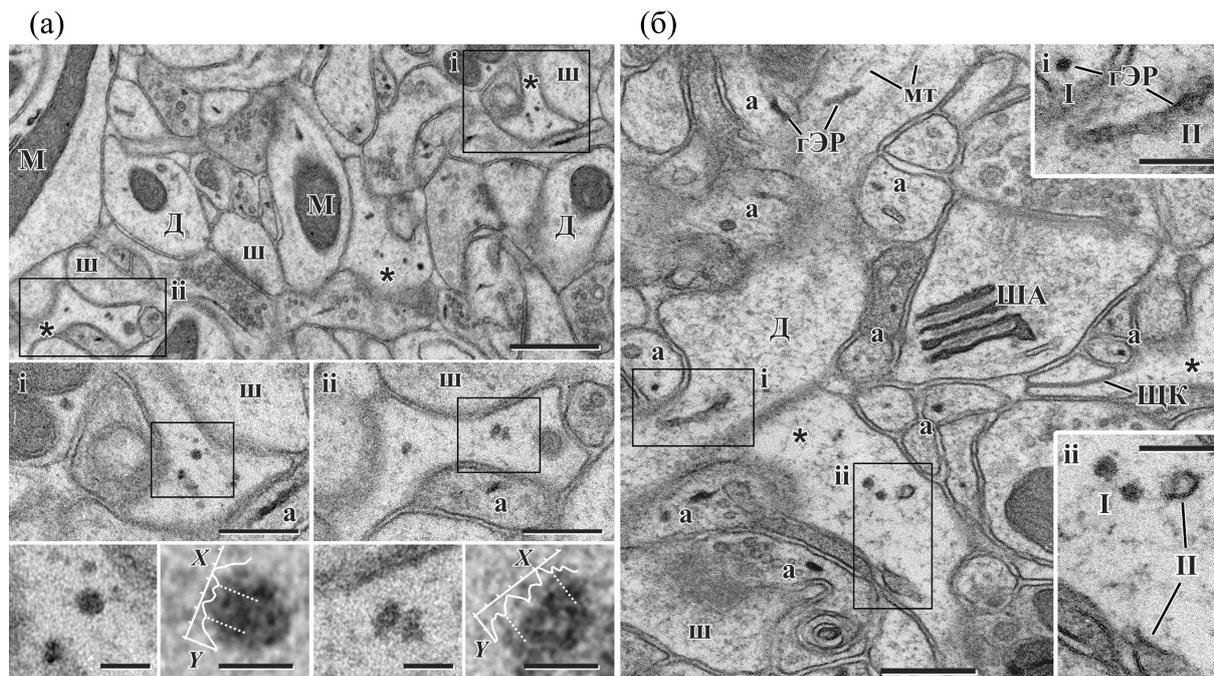


Рис. 2. Ультраструктура цистерн гладкого эндоплазматического ретикулума в отростках астроцитов и нейронов гиппокампа. (а) – Изображение нейропиля молекулярного слоя СА1-области гиппокампа получено при прямом увеличении микроскопа $\times 6\text{K}$ с финальным разрешением изображения 1.7 нм/пиксель. Внутри профилей астроцитарных отростков (помечены звездочками) темные точки неотличимы по электронной плотности и размерам от гранул гликогена. Увеличенные фрагменты *i* и *ii* получены при $\times 15\text{K}$ и $\times 30\text{K}$ с финальным разрешением изображения 0.67 и 0.34 нм/пиксель соответственно. Увеличенные изображения дополнены диаграммами относительной электронной плотности (ось *Y*, шкала серого от 0 до 100%), измеренной с усреднением по 10 пикселям изображения, вблизи осей, проходящих через окончания пунктирных линий (ось *X*, шаг деления 5 нм). Наибольшие и наименьшие диаметры органелл на увеличенных фрагментах врезок *i* и *ii* по осям *X/Y* составляют 17/25 и 24/16 нм соответственно. Диаметры поперечных сечений органелл на врезках *i* и *ii* (в среднем ~ 20 нм) чуть меньше или соответствуют поперечным диаметрам ($\sim 20\text{--}30$ нм) тонких электронно-плотных «нитевидных» цистерн, тангенциальные или продольные сечения которых можно наблюдать в соседних немиелинизированных аксонах. (б) – Изображение из той же области гиппокампа получено при прямом увеличении микроскопа $\times 30\text{K}$. Электронная плотность просвета цистерн sER типа I и типа II и их элементарных мембран в астроцитах сходны с таковыми у цистерн sER в аксонах, дендритах и шипиковом аппарате в нейронах. Условные обозначения и сокращения: *i* и *ii* – области, представленные на большем увеличении; I – тонкие нитевидные контрастные цистерны типа I; II – цистерны типа II с контрастной мембраной и расширенным до 30–60 нм люменом; а – сечения немиелинизированных аксонов; гЭР – гладкий эндоплазматический ретикулум; Д – дендриты; М – митохондрии; мт – микротрубочки; Ш – головка дендритного шипика; ША – шипиковый аппарат; ЩК – щелевой контакт. Шкала на основной панели (а) – 500 нм, на врезках *i* и *ii* панели (а) – 100 нм, на увеличенных фрагментах – 50 и 25 нм соответственно увеличению; на основной панели (б) – 250 нм, на врезках панели (б) – 100 нм.

ми гликогена [59] с гидродинамическим радиусом ~ 12 нм и диаметром ~ 24 нм. Как отмечалось ранее, интерпретация морфологии тонких цистерн осложняется также и тем, что фиксация с восстановленным осмием приводит как к волнообразному искривлению мембран sER [31], так и к коллапсу люмена до столь малых размеров, что его уже невозможно идентифицировать с помощью FIB-SEM с разрешением изображения в 4 нм/пиксель [7].

Чтобы убедиться, что наблюдаемые нами малоразмерные органеллы в отростках астроцитов имеют мембранную природу, мы проанализировали их на больших увеличениях. Если на увеличении $\times 6\text{K}$ (рис. 2а) такие органеллы ни по размерам, ни по электронной плотности совершенно

неотличимы от бета-гранул гликогена (увеличенная область *i*), то более детальный их анализ на изображениях с финальным рабочим разрешением 0.67 и 0.34 нм/пиксель, что в 10–15 раз превышает стандартное разрешение SEM, позволил четко идентифицировать такие объекты как структуры, имеющие мембранную природу. При удачно прошедшем сечении через такие органеллы можно отчетливо наблюдать центральный просвет цистерны и трехслойную элементарную мембрану толщиной в 4 нм, с центральным светлым слоем в $\sim 1.5\text{--}2.0$ нм, соответствующим слою гидрофобных липидных хвостов, и аморфным электронно-плотным материалом, декорирующим бислой как со стороны люмена, так и цитоплазмы. Несмотря на «шум», создаваемый

аморфным материалом по периферии мембраны, наличие бислоя отражается и в минимумах, и в максимумах относительной электронной плотности по ходу осей, проходящих через центры органелл (рис. 2а, увеличенные области на врезках i и ii).

В результате усиления контраста мембран при беглом осмотре нейропиля наибольшее внимание привлекают электронно-плотные цистерны sER в аксонах и в чуть меньшей степени в дендритах (рис. 2б). Для удобства дальнейшего анализа мы условно обозначили сечения тонких контрастных цистерн в аксонах и в астроцитах как цистерны типа I, а цистерны с расширенным просветом в отростках астроцитов и в дендритах, включая их специализированную форму – шипиковый аппарат, мы отнесли к цистернам типа II (рис. 2б, врезки i и ii).

sER дендритов нейронов и шипиковый аппарат вовлечены в развитие ключевых феноменов синаптической пластичности мозга – потенциации и депрессии синаптической передачи, высвобождая ионы Ca^{2+} через рецепторы инозитол трифосфата (IP3Rs) [60, 61] или рианодина (RyR) [62] и обеспечивая обратный захват ионов кальциевой АТФазой эндоплазматического ретикулула (SERCA) [63, 64]. Иммунореактивность на RyR наблюдается и в немиелинизированных аксонах [64, 65], проведение импульса по которым сопровождается быстрыми всплесками Ca^{2+} в аксоплазме [66]. Весьма вероятно, что высокая электронная плотность цистерн как шипикового аппарата, так и цистерн sER в аксонах и дендритах во многом определяется высокой концентрацией в них мембранных белков, в том числе ответственных за Ca^{2+} -регуляцию проведения сигнала и синаптической передачи. Как можно видеть на рис. 2б, цистерны типа I и типа II в астроцитарных отростках сходны по электронной плотности и контрасту с цистернами sER в отростках нейронов – в немиелинизированных аксонах, дендритах и дендритных шипиках. Поэтому весьма вероятно, что электронная плотность цистерн sER в перисинаптических отростках астроцитов также формируется за счет высокой концентрации в них белков, в том числе связанных с ионным обменом и внутриклеточной сигнализацией.

Пул мембранных органелл ТАР представлен микровезикулами и короткими фрагментами цистерн типа I. Ранее было показано, что «нитевидные» цистерны в немиелинизированных аксонах имеют длину до нескольких микрон, соединяя *en passant* бутоны по ходу нервного волокна [7]. По данным флуоресцентной микроскопии инициация спонтанных кальциевых событий в астроцитах происходит на уровне их перисинаптических отростков с последующим распространением

ионов Ca^{2+} в более крупные веточки [3]. Поэтому весьма интригующим было бы предположить наличие таких цистерн в терминальных астроцитарных отростках, которые могли бы обеспечивать центростремительное распространение волны ионов Ca^{2+} от окончаний терминальных отростков до узлов их ветвления или веточек. Однако неизвестно, имеют ли цистерны типа I в астроцитах сходную организацию с цистернами аксонов. При беглом просмотре изображений нейропиля можно обратить внимание на наличие большого числа как строго поперечных сечений контрастных цистерн в немиелинизированных аксонах, так и присутствие в них тангенциальных или продольных сечений sER (рис. 2б). Но обнаружить такие же сечения цистерн в астроцитарных отростках не удастся даже при просмотре большой площади среза. Поэтому остается неясным, являются ли цистерны типа I астроцитов протяженными цистернами или короткими их фрагментами, или даже отдельными везикулами.

Для решения этого вопроса мы провели анализ цистерн sER на серийных срезах. С использованием оптического дисектора мы подсчитали плотность синапсов в гомогенном нейропиле двух слоев сенсомоторной коры. В слоях I и II–III она составляла 188 ± 16 и 154 ± 8 (mean \pm SE, $n = 3$) в 100 мкм^3 соответственно. Несмотря на отсутствие достоверных различий в плотности, большее значение предполагало охват большего числа синапсов в одном поле зрения, поэтому дальнейший анализ цистерн sER мы проводили в нейропиле слоя I коры. Анализ не менее 200 мкм^3 нейропиля слоя I сенсомоторной коры показал отсутствие в астроцитарных отростках протяженных цистерн типа I, сходных с теми, что наблюдаются в немиелинизированных аксонах (белая стрелка в правой части срезов 1–6 на рис. 3а; врезка ii на срезе 4 на рис. 3а). В данной работе мы не проводили масштабного количественно анализа цистерн sER, но детальный качественный анализ даже ограниченного объема нейропиля позволяет составить представление об организации и распределении цистерн типа I в терминальных перисинаптических астроцитарных отростках. Так, в результате 3D-реконструкции сегментов синапсов по шести серийным изображениям, представленным на рис. 3, в терминальных отростках вблизи шести синапсов мы обнаружили лишь восемь цистерн типа I (отмечены стрелками на врезках i–iii на рис. 3б и 3в). Профили цистерн типа I можно было проследить лишь на двух-трех и редко на четырех срезах в серии, что при рассчитанной толщине срезов (42 нм) составляет не более ~130–170 нм (ТАР справа от щелевого контакта на четвертом-пятом срезах и врезка i на четвертом-шестом срезах на рис. 3а). Мы не наблю-

дали проникновения в ТАР ни цистерн типа II, ни цистерн ретикулума, ассоциированного с митохондриями (рис. 3б,в). Другие органеллы в ТАР были представлены только одиночными везикулами или их группами.

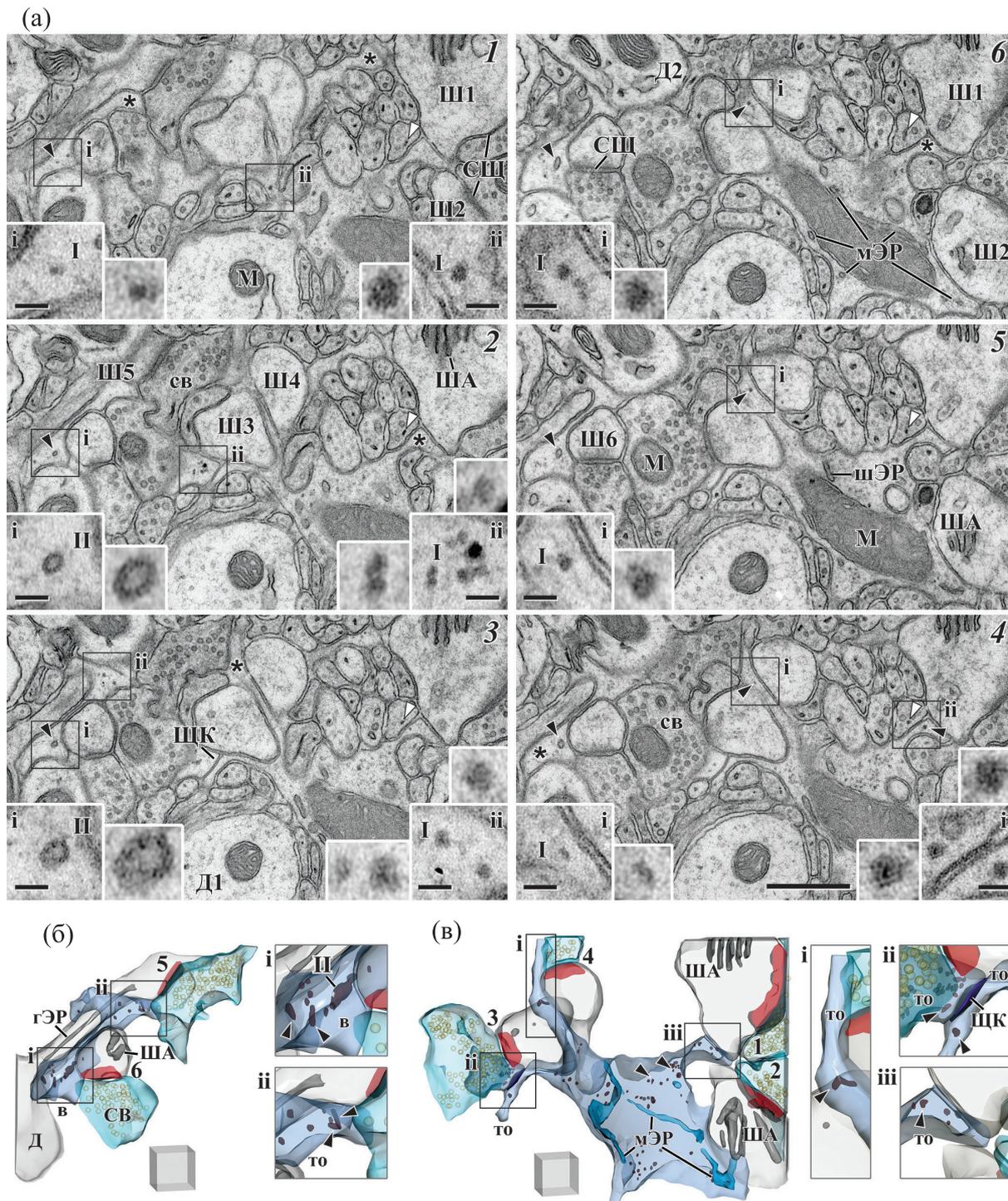
Ранее с использованием иммуноэлектронной микроскопии в перисинаптических отростках астроцитов было показано наличие сходных с синаптическими, но меньшего размера (~30 нм) микровезикул, иммунореактивных на антитела к везикулярным транспортерам глутамата, целлубреину и коагонисту глутаматных NMDA рецепторов D-серину, который высвобождается Ca^{2+} -зависимым образом [16, 17, 67]. Вполне вероятно, что и наблюдаемые нами везикулы, обладая сходными размерами, представляют собой пул микровезикул, содержащих глиотрансмиттеры.

Анализ серий изображений отростков позволяет наблюдать микровезикулы прикрепленные к плазматической мембране, в том числе с образованием омега-подобных профилей (не показано) по типу частичного слияния синаптических везикул с мембраной аксонального бутона. Однако неясно, отражают ли такие профили процесс высвобождения их содержимого, или же интернализацию фрагмента мембраны в форме кавеолы. В то же время на рис. 3а можно видеть постепенное сужение цистерны типа II (черные стрелки на срезах 6-1 слева) с диаметром ~40 нм в цистерну типа I с диаметром ~15–20 нм (врезки i на срезах 3-1 на рис. 3а). Цистерны кортикального sER эукариот – динамичные структуры, подверженные непрерывной перестройке, слиянию и расщеплению [68, 69]. Наблюдаемое на рис. 3а сужение цистерны с увеличением кривизны липидного слоя может быть признаком отщепления тонких коротких фрагментов sER от кончиков цистерн [70] с формированием коротких цистерн типа I. Сужение цистерны типа II можно наблюдать и на врезке рис. 1г. В массе сужения цистерн до считанных нанометров можно наблюдать в нейритах в развивающемся мозге, особенно в конусах роста, в которых происходит активная перестройка sER [31]. Отщепление нанометровых везикулярных фрагментов («везикулярный» sER) от протяженных цистерн было показано в миелинизированных аксонах на серийных срезах и после импрегнации sER тетроксидом осмия [5, 71]. Способствовать расщеплению цистерн sER в астроцитах мог бы как высокий уровень экспрессии ATL3 [72], с наиболее слабой среди атластинов способностью сшивать фрагменты sER [73], так и значительная подвижность перисинаптических отростков [54, 55, 74]. Но с другой стороны, результаты иммуноэлектронной микроскопии показывают наличие кавеолин-1 внутри перисинаптических отростков астроцитов [17], что предполагает интернализацию плазматической

мембраны в форме кавеол. Поэтому непонятно, являются ли источником коротких цистерн типа I более протяженные цистерны типа II, или же они образуются в результате захвата части плазматической мембраны в форме микровезикул и их слияния в трубчатые структуры, подобно тому, как это происходит в эндосомах пресинаптических бутонов [75]. Иными словами, вопрос состоит в том, являются ли наблюдаемые нами цистерны типа I производными протяженной эндоплазматической сети или представляют собой кавеосомы/эндосомы [76], сходные по своей морфологии с цистернами sER.

На изолированной культуре кортикальных астроцитов и в переживающих срезах гиппокампа было показано, что доминантным источником ионов Ca^{2+} для запуска кальциевых событий и высвобождения глиотрансмиттеров являются два внутриклеточных депо ионов Ca^{2+} : RyR- и IP3R-зависимые [67, 77–79]. При этом значительное число работ свидетельствует о проявлении Ca^{2+} -событий на периферии астроцитарного ветвления, в маленьких веточках астроцитарной сети (см. обзор [80]). Так же и фокусы деполяризации наблюдаются в дистальных отростках в непосредственной близости от синапсов, при этом скорость нарастания потенциала в них в ответ на высокочастотную стимуляцию снижается почти на 40% в среде с двукратно сниженной $[Ca^{2+}]_o$ [4]. Все эти данные предполагают наличие в ТАР цистерн sER, несущих IP3R или RyR. Однако по настоящее время данные о наличии RyR или IP3R в РАР, подтвержденные методами иммуноэлектронной микроскопии, отсутствуют.

В работе [17] иммуноцитохимически было показано наличие в РАР специфического маркера sER – Ca^{2+} -связывающего белка кальретикулина. Интересно, что метки на кальретикулин не перекрывались с метками на транспортер глутамата VGLUT1, а метки на VGLUT1 не были локализованы с метками на кавеолин-1. Отсутствие колокализации предполагало наличие отдельных пулов везикул, несущих VGLUT1 и кавеолин-1. Одновременного иммуномечения на кальретикулин и кавеолин-1 авторы не проводили, но отмечали, что если метка на кавеолин-1 располагалась на сходных с синаптическими микровезикулах, то метка на кальретикулин – над трубчатыми структурами. Согласно рис. 3 в работе [17] и рис. 6 в дополнительном материале к ней метка на кальретикулин располагалась над цистернами шириной ~40–60 нм, над сужающимися их участками до ~20 нм и над короткими фрагментами цистерн с диаметром ~16 нм. Размеры таких фрагментов сходны с размерами наблюдаемых нами цистерн типа I. Также и в пресинаптических бутонах иммунная метка на IP3R наблюдается



только в sER, но не в эндосомах [63]. Данные факты в совокупности с результатами иммуноэлектронной микроскопии [17] позволяют с высокой степенью вероятности считать, что обнаруженные нами цистерны типа I имеют эндомембранное происхождение и являются компонентами внутриклеточного депо ионов Ca^{2+} . Неясно, яв-

ляются ли цистерны типа I элементарными фрагментами депо в ТАР, или пул микровезикул гетерогенен и наряду с везикулами, содержащими глиотрансмиттеры, включает и кальциосомы (см. обзор [81]). Тем не менее, являясь единственными фрагментами sER в ТАР, цистерны типа I, по-видимому, представляют собой ультраструктурную

Рис. 3. Ультраструктура цистерн sER в астроцитарных отростках в нейропиле слоя I сенсомоторной коры мозга мыши. (а) – Фрагмент из шести срезов (1–6) в серии, характеризующий морфологию и распределение цистерн sER в терминальных астроцитарных отростках в непосредственной близости от активных зон синапсов. Фрагменты изображений серийных срезов захватывают шесть синапсов в окружении двух отростков астроцита – тонкой веточки с терминальным отростком вблизи синапсов Ш5–Ш6 слева и широкой веточки, содержащей митохондрию с перимитохондриальными цистернами ретикулума, от которой отходят терминальные отростки вблизи синапсов Ш1–Ш4. Астроцитарные отростки помечены звездочками. Стоит обратить внимание на то, что ни цистерна типа II из тонкой веточки, ни одна из цистерн sER, ассоциированной с митохондрией, не распространяется в ТАР, которые содержат только микровезикулы и цистерны sER типа I. В центре правой части панели (а) выделена область с цистерной типа I в терминальном отростке, которая прослеживается только на трех срезах (врезки i на срезах 4–6 панели (а); врезка i на панели (в)). Справа от щелевого контакта цистерну типа I можно проследить только на двух срезах (срезы 4 и 5 панели (а); врезка iii панели (в)). С учетом рассчитанной средней толщины срезов в серии (42 нм) длина этих цистерн составляет 84 и 126 нм соответственно. См. детальное описание в основном тексте. (б) – 3D-реконструкция фрагмента дистальной тонкой веточки и терминальной перисинаптической ламеллы астроцита. Фрагмент тонкой веточки содержит цистерну sER типа II (II на врезке i), а также микровезикулы и цистерны типа I (отмечены стрелками на врезках i–iii). Тонкий уплощенный участок терминального отростка, отходящий от веточки к синапсу 5, лишен цистерн sER и микровезикул, но их можно наблюдать в расширении терминального отростка вблизи интерфейса «аксон–шипик» (врезка ii). (в) – Фрагмент расширенной астроцитарной веточки или узла ветвления терминальных перисинаптических отростков астроцита, содержащего митохондрию (не показана) и ассоциированные с ней цистерны гладкого и шероховатого ER. Цистерны типа I и микровезикулы проявляют дифференциальное распределение в ТАР, которое коррелирует с морфологическими критериями активности синапсов. См. детальное описание в основном тексте. Условные обозначения и сокращения: в – веточка астроцита, Д1 и Д2 – дендриты, М – митохондрии, мЭР – ассоциированный с митохондриями эндоплазматический ретикулум, СВ – синаптические везикулы, СЩ – синаптическая щель, то – терминальный отросток, Ш1–Ш6 – головки дендритных шипиков, соответствуют номерам синапсов 1–6 на 3D-реконструкции; ША – шипиковый аппарат, шЭР – фрагмент шероховатого компартмента эндоплазматического ретикулума, ЩК – щелевой контакт между ТАР. В электронной версии РАР окрашены серо-голубым, шипики – серым, sER шипиков и шипиковый аппарат – темно-серым, пресинаптические бутоны – аквамаринным, PSD – красным, цистерны типа I и типа II и микровезикулы – темно-коричневым. Шкала на основной панели (а) – 500 нм, на врезках – 50 нм; шкалы на панелях (б) и (в) – куб с гранью 250 нм.

основу и первичное звено в развитии Ca^{2+} -событий в ТАР.

Цистерны sER типа I и микровезикулы в ТАР локализованы с активными зонами активных синапсов. Подавляющее число спонтанных Ca^{2+} -событий в астроцитарной сети не распространяется центростремительно по веточкам астроцита, а локально затухает [3]. Также и стимуляция входов к группе синапсов приводит к возникновению кратковременных разного размера фокусов деполяризации ТАР [4]. Это говорит о том, ответы периферических астроцитарных отростков на синаптическую активность и спонтанная Ca^{2+} -активность ТАР могут быть связаны как с активностью конкретного синапса, с которым контактирует отросток, так и со структурной организацией самого ТАР.

Мы провели пилотный анализ распределения цистерн sER и везикул в ТАР, представленных на рис. 3. Если шесть реконструированных синапсов упорядочить по возрастанию признаков их зрелости и функциональной активности, таких как размер постсинаптического уплотнения (PSD) [82] или активной зоны синапса и степени организации цистерн sER и шипикового аппарата [6], можно обнаружить взаимосвязь между активностью синапса и распределением цистерн типа I и микровезикул. Так, дендритный шипик 4 лишен не только шипикового аппарата, но и отдельных цистерн sER, что наряду с макулярной формой и диаметром PSD ~250 нм свидетельствует о слабой

активности синапса. В ТАР вблизи этого синапса расположена единственная цистерна типа I, удаленная от интерфейса «аксон–шипик» на 260 нм (врезки i на срезах 4–6 на рис. 3а и 3в). Шипик 5 также лишен шипикового аппарата, но в его ножке расположена цистерна sER, доходящая до головки с PSD диаметром ~275 нм (срезы 1–4 на рис. 3а и 3б). Его пресинаптический бутон содержит большее число синаптических везикул, а в непосредственно прилегающем к синаптической щели ТАР (звездочка на срезе 1 на рис. 3а) можно наблюдать две коротких цистерны типа I и несколько микровезикул (врезка ii на срезе 3 на рис. 3а, врезка ii на рис. 3б). В головке шипика 6 с диаметром PSD ~270 нм можно видеть цистерны слабо развитого шипикового аппарата (срез 1 на рис. 3а и 3б), значительное число синаптических везикул в бутоне, а в прилегающей тонкой веточке РАР расположены микровезикулы, цистерны типа I и длинная цистерна типа II, проходящая в непосредственной близости от синаптической щели (черная стрелка в левой части серии изображений на рис. 3а, врезка i на рис. 3б). При том, что в головке шипика 3 можно наблюдать лишь отдельные цистерны sER, в его ножке располагается хорошо развитый шипиковый аппарат (не показан), а PSD диаметром ~340 нм свидетельствует о значительно большей его активности по сравнению с синапсами 4–6. В перисинаптическом астроцитарном отростке справа от щелевого контакта расположена короткая цистерна типа I, тогда как в отростке с большей площадью контакта с

синаптической щелью (слева от щелевого контакта) можно наблюдать как цистерну типа I, так и не менее 10 микровезикул (врезки ii на рис. 3в и срезе 2 на рис. 3а). Также и вблизи интерфейсов «аксон—шипик» высокоактивных синапсов 1 и 2, один из которых обладает высокоразвитым шипиковым аппаратом и наибольшей площадью PSD, можно наблюдать скопления микровезикул и цистерн типа I (врезка ii на срезе 4 на рис. 3а; врезка iii на рис. 3в). Синапсы 1 и 2 на смежных срезах в серии (не показано) имеют большую площадь контакта с ТАР по сравнению с синапсами 3–6, соответственно и большее число микровезикул и цистерн типа I вблизи с границами интерфейсов «аксон—шипик».

Очевидно, что распределение цистерн sER в ТАР не случайно и результат пилотного анализа всего лишь шести близлежащих синапсов свидетельствует о тенденции микровезикул и цистерн типа I располагаться вблизи синаптических щелей или интерфейсов «аксон—шипик» тех синапсов, которые имеют характерные признаки высокой активности. Такое распределение мембранных органелл в РАР согласуется с относительным числом деполяризуемых ТАР в результате высокочастотной стимуляции и пропорцией грибовидных дендритных шипиков. Простой расчет по рис. 4 в работе [4] показывает, что если в фокальной плоскости толщиной 1 мкм и площадью 100 мкм² наблюдается ~25 фокусов деполяризации, то с учетом плотности синапсов в слоях II–III коры (см. выше) отношение числа спотов деполяризации к плотности синапсов составит 25/154 (~1/6 или ~16%). Это значение приблизительно соответствует или чуть больше пропорции наиболее активных синапсов, образованных на грибовидных шипиках (см., например, работы [83, 84]). На рис. 3 из шести синапсов лишь один имеет высокоразвитый шипиковый аппарат, а два из шести синапсов имеют большую площадь PSD. Вероятно, при нормальных физиологических условиях только ТАР этих наиболее крупных синапсов могли бы проявлять деполяризацию, тогда как активация ТАР менее активных синапсов могла бы происходить в результате развития судорожных состояний. В этом отношении интересно было бы исследовать ультраструктуру и перераспределение sER в ТАР в состоянии эпилепсии, поскольку при развитии эпилептического статуса наблюдается как снижение величины Ca²⁺-событий, так и сопряжения астроцитов посредством щелевых контактов [85].

В отличие от дендритных шипиков, которые сохраняют форму часы, дни и месяцы [86, 87], РАР — это очень пластичные структуры, меняющие свою форму как *in vitro*, со скоростью до 500 нм в минуту, так и *in vivo* [54, 55, 74]. Локальный фотолиз связанного глутамата вблизи синап-

са приводит к увеличению его изоляции астроцитарными ламеллами [55], что объясняется высокой аффинностью глиальных клеток к нейротрансмиттерам [88] и селективной ассоциацией РАР с наиболее активными синапсами [10]. Если в шипиках транспорт цистерн sER и везикул осуществляется миозинами II, VI, V [89], то о механизмах транспорта эндомембран в РАР ничего не известно. Поскольку кортикальный sER связан с цитоскелетом [68], то в отсутствие активного транспорта мембранные органеллы могли бы затягиваться в ламеллы пассивным образом одновременно с их ростом в окружении синапса. Однако тенденция цистерн типа I и микровезикул располагаться группами вблизи синаптической щели активных синапсов позволяет предполагать существование механизма активного направленного транспорта мембранных органелл в ТАР. Потенциальным мотором в этом процессе мог бы служить немышечный миозин Va, который в культивируемых астроцитах осуществляет направленный везикулярный транспорт [90].

Выше мы отмечали отсутствие в ТАР расширенных цистерн типа II. При том, что ТАР часто имеют форму сильно уплощенных ламелл, протиснутых между отростками нейронов, затягивать крупные цистерны типа II в ТАР, как это происходит в шипиках, в минутных временных интервалах было бы энергетически невыгодно. В то же время нанометровые размеры элементарных цистерн sER могут способствовать их мобильности, облегчая направленную транспортировку через уплощенные участки. Если движение ламелл к активированному синапсу занимает минуты [55], то перестройка структуры кортикального sER занимает считанные секунды [68, 69]. Пластичность ТАР в совокупности с быстрой перестройкой sER и мобильностью его элементов могли бы обеспечивать быструю тонкую настройку нейрон-глиального взаимодействия в синапсах в зависимости от пресинаптической активности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе мы предприняли первую попытку более детально исследовать sER в отростках астроцитов, ультраструктурные детали которого лежат не только за пределами оптического разрешения SEM-методов, широко используемых в анализе синапсов, но и за пределом разрешений просвечивающей электронной микроскопии, обычно используемых при анализе нервной ткани посредством 3D-реконструкций. В последние несколько лет были опубликованы работы по определению количества и распределению гранул гликогена в окружении синапсов на основе SEM (FIB-SEM — [47, 91]; SBF-SEM — [92]). Наши результаты показывают, что по крайней мере

часть органелл в PAP, воспринимаемых на SEM-изображениях как гранулы гликогена, в действительности имеют мембранную природу и представляют собой микровезикулы или сечения коротких фрагментов sER. С учетом того, что число микровезикул и цистерн sER может быть значительно меньше числа гранул гликогена, наблюдаемых в условиях анестезии, полученные нами данные не подвергают сомнению значимость исследований гликогена в PAP методами SEM, но предостерегают от возможности получения при подсчете числа гранул преувеличенных значений.

Мы не уделяли достаточного внимания эндоплазматическому ретикулуму в веточках астроцитов и ассоциированному с митохондриями, как впрочем и другим органеллам, имеющим мембранную природу, таким как эндосомы, мультивезикулярные тела, и органеллам, связанным с лизосомальной деградацией, фокусируясь лишь на упущенном по настоящее время звене в развитии Ca^{2+} -событий и в индукции Ca^{2+} -зависимого высвобождения глиотрансмиттеров – на потенциальном депо ионов Ca^{2+} в астроцитах в непосредственной близости от пре- и постсинаптических компартментов. Результаты показывают, что хотя TAP и лишены вышеперечисленных органелл, в них присутствуют мембранные органеллы нанометровых размеров, которые разрешимы только на увеличениях, позволяющих четко идентифицировать элементарные мембраны. Нанометровые размеры и концентрация этих органелл вблизи интерфейсов «аксон–шипик» предполагают их активный транспорт в тончайшие отростки астроцитов и динамическое перераспределение между синапсами с разной функциональной активностью.

Наличие таких органелл поднимает как минимум несколько технических и фундаментальных вопросов. Можно ли облегчить визуализацию наноразмерных органелл в PAP в условиях анестезии, без элиминации гранул гликогена? Как эти органеллы распределены в окружении синапсов различных типов, форм и размеров? Могут ли цистерны sER расщепляться до микровезикул и гетерогенен ли пул последних? Какова буферная емкость для ионов Ca^{2+} у тонких коротких фрагментов sER и достаточна ли она для запуска Ca^{2+} -событий? В какой степени физическая изоляция интерфейса «аксон–шипик» функционально более значима, чем присутствие в TAP цистерн sER и микровезикул с глиотрансмиттерами? Некоторые из этих вопросов можно решить как усовершенствованием протоколов фиксации ткани и контрастирования ультратонких срезов, так и детальным количественным анализом sER и микровезикул в TAP на основе 3D-реконструкций си-

напсов, тогда как другие требуют интеграции комплементарных экспериментальных подходов.

В целом факты, представленные в данной работе, могут служить основой для смены парадигмы «отсутствия органелл в терминальных отростках астроцитов» на парадигму, которая предполагает динамическую регуляцию состава и числа органелл в перисинаптических ламеллах в зависимости от активности синапса, и открывает новые перспективы в исследованиях нейрон-глиального взаимодействия и понимании функциональной роли астроцитарного микроокружения в пластичности трехчастного синапса и развитии патологических процессов в мозге.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена на оборудовании ЦКП ПНЦБИ РАН (№670266, <http://www.ckrp.ru/cfp/670266/>).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование проведено в рамках выполнения государственного задания ПНЦБИ РАН (№075-00957-23-01) при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-34-90068).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Эксперименты на анестезированных и неанестезированных животных проведены в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите животных 2010/63/EU. Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. Reichenbach, A. Derouiche, and F. Kirchhoff, *Brain Res. Rev.*, **63**, 11 (2010).
2. B. S. Khakh and M. V. Sofroniew, *Nature Neuroscience*, **18**, 942 (2015).
3. M. Arizono, V. V. G. K. Inavalli, A. Panatier, et al., *Nature Commun.*, **11**, 1906 (2020).
4. M. Armbruster, S. Naskar, J. P. Garcia, et al., *Nature Neurosci.*, **25**, 607 (2022).
5. J. Špaček and A. R. Lieberman, *J. Cell Sci.*, **46**, 129 (1980).
6. J. Špaček and K. M. Harris, *J. Neurosci.*, **17**, 190 (1997).

7. Y. Wu, C. Whiteus, C. S. Xue, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **114**, E4859 (2017).
8. J. Špaček, Anat. Embryol., **171**, 235 (1985).
9. J. Špaček and K. M. Harris, J. Comp. Neurol., **393**, 58 (1998).
10. R. Ventura and K. M. Harris, J. Neurosci., **19**, 6897 (1999).
11. M. A. Xu-Friedman, K. M. Harris, and W. G. Regehr, J. Neurosci., **21**, 6666 (2001).
12. C. Genoud, C. Quairiaux, and P. Steiner, PLoS Biol., **4**, e343 (2006).
13. M. R. Witcher, S. A. Kirov, and K. M. Harris, Glia, **55**, 13 (2007).
14. K. Chounlamounry and J.-P. Kessler, Glia, **59**, 655 (2011).
15. M. Bellesi, L. de Vivo, G. Tononi, et al., BMC Biol., **13**, 66 (2015).
16. P. Bezzi, V. Gundersen, J. L. Galbete, et al., Nature Neurosci., **7**, 613 (2004).
17. L. H. Bergersen, C. Morland, L. Ormel, et al., Cereb Cortex, **22**, 1690 (2012).
18. I. Patrushev, N. Gavrilov, V. Turlapov, et al., Cell Calcium, **54**, 343 (2013).
19. M. J. Karnovsky, In *Abstr. Book of the 11th Annual Meet. of the American Society for Cell Biology*, Abstracts 284, 146 (1971).
20. A. M. Seligman, H. L. Wasserkrug, and J. S. Hanker, J. Cell Biol., **30**, 424 (1966).
21. B. Fernandez, I. Suarez, and G. Gonzalez, Anat. Anz., **156**, 31 (1984).
22. A. Semyanov and A. Verkhratsky, Trends Neurosci., **44**, 781 (2021).
23. Y. Oe, O. Baba, H. Ashida, et al., Glia, **64**, 1532 (2016).
24. N. Benmeradi, B. Payre, and S. L. Goodman, Microsc. Microanal. **21** (Suppl. 3), 721 (2015).
25. T. Hanaichi, T. Sato, T. Iwamoto, et al., J. Electron Microsc. (Tokyo), **35**, 304 (1986).
26. S. Saalfeld, R. Fetter, A. Cardona, et al., Nature Methods, **9**, 717 (2012).
27. J. C. Fiala, K. M. Harris, J. Microsc., **202**, Pt 3, 468 (2001).
28. J. C. Fiala, J. Microsc., **218** (Pt 1), 52 (2005).
29. W. C. De Bruijn, J. Ultrastruct. Res., **42**, 29 (1973).
30. L. A. Langford and R. E. Coggeshall, Anat. Rec., **197**, 297 (1980).
31. E. A. Shishkova, I. V. Kraev, and V. V. Rogachevsky, Biophysics, **67**, 5, 752 (2022).
32. P. Drochmans, J. Ultrastruct. Res., **6**, 141 (1962).
33. J. P. Revel, J. Histochem. Cytochem., **12**, 104 (1964).
34. L.-E. Thornell, J. Ultrastruct. Res., **49**, 157 (1974).
35. C. Prats, T. E. Graham, and J. Shearer, J. Biol. Chem., **293**, 19, 7089 (2018).
36. K. K. Rybicka, Tissue Cell, **28**, 3, 253 (1996).
37. M. L. Entman, S. S. Keslensky, A. Chu, et al., J. Biol. Chem., **255**, 13, 6245 (1980).
38. Y. Hirata, M. Atsumi, Y. Ohizumi, et al., Biochem. J., **371**, 81 (2003).
39. C. Lavoie, L. Roy, J. Lanoix, et al., Prog Histochem Cytochem., **46**, 1 (2011).
40. M. S. Muller, R. Fox, A. Schousboe, et al., Glia, **62**, 526 (2014).
41. S. P. J. Brooks, B. J. Lampi, and C. G. Bihun, Contemp. Top. Lab. Anim. Sci., **38**, 19 (1999).
42. C. W. Scouten, R. O'Connor, and M. Cunningham, J. Microsc. Today, **14**, 3, 26 (2006).
43. R. Kasukurthi, M. J. Brenner, Amy M. Moore, et al., J. Neurosci. Methods, **184**, 303 (2009).
44. S. R. Nelson, D. W. Schulz, J. V. Passonneau, et al., J. Neurochem., **15**, 1271 (1968).
45. F. D. Morgenthaler, D. M. Koski, R. Kraftsik, et al., Neurochem. Int., **48**, 616 (2006).
46. L. F. Obel, M. S. Müller, A. B. Walls, et al., Front. Neuroenergetics, **4**, 3, 1 (2012).
47. J. S. Coggan, D. Keller, C. Calò, et al., PLoS Comput. Biol., **14**, 8, e1006392 (2018).
48. O. H. Lowry, J. V. Passonneau, F. X. Hasselberger, et al., J. Biol. Chem., **239**, 18 (1964).
49. H. Watanabe and J. V. Passonneau, Brain Res., **66**, 147 (1974).
50. R. A. Swanson, S. M. Sagar, and F. R. Sharp, Neurol. Res., **11**, 24 (1989).
51. R. A. Swanson, M. M. Morton, S. M. Sagar, et al., Neuroscience, **51**, 2, 451 (1992).
52. T. Matsui, T. Ishikawa, H. Ito, et al., J. Physiol., **590**, 607 (2012).
53. M. K. Brewer and M. S. Gentry, in *Advances in Neurobiology, 23: Brain Glycogen Metabolism* (Springer Nature Switzerland AG, 2019), pp. 17–81.
54. J. Hirrlinger, S. Hulsmann, and F. Kirchhoff, Eur. J. Neurosci., **20**, 2235 (2004).
55. Y. Bernardinelli, J. Randall, E. Janett et al., Curr. Biol., **24**, 1679 (2014).
56. G. R. Login and A. M. Dvorak, Histochem. J., **20**, 373 (1988).
57. G. R. Login and A. M. Dvorak, *The Microwave Tool Book* (Beth Israel Hospital, 1994).
58. F.E. Jensen and K.M. Harris, J. Neurosci. Methods, **29**, 217 (1989).
59. M. A. Sullivan, S. T. N. Aroney, S. Li, et al., Biomacromolecules, **15**, 660 (2014).
60. T. Satoh, C. A. Ross, A. Villa, et al., J. Cell Biol., **111**, 615 (1990).
61. N. Holbro, Å. Grunditz, and T. G. Oertner, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **106**, 15055 (2009).
62. P. Jedlicka, A. Vlachos, S. W. Schwarzacher, et al., Behav. Brain Res., **192**, 12 (2008).
63. K. Takei, H. Stukenbrok, A. Metcalf, et al., J. Neurosci., **12**, 489 (1992).
64. A. H. Sharp, P. S. McPherson, T. M. Dawson, et al., J. Neurosci., **13**, 3051 (1993).
65. H. Shimizu, M. Fukaya, and M. Yamasaki, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **105**, 11998 (2008).
66. R. Barzan, F. Pfeiffer, and M. Kukley, Front. Neurosci., **10**, 135 (2016).
67. J.-P. Mothet, L. Pollegioni, G. Ouanounou, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **102**, 5606 (2005).
68. Y. Du, S. Ferro-Novick, and P. Novick, J. Cell Sci., **117**, 2871 (2004).
69. J. Espadas, D. Pendin, R. Bocanegra, et al., Nature Commun., **10**, 5327 (2019).
70. S. Wang, H. Tukachinsky, F. B. Romano, et al., eLife, **5**, e18605 (2016).
71. J. D. Lindsey and M. H. Ellisman, J. Neurosci., **5**, 12, 3135 (1985).
72. N. Rismanchi, C. Soderblom, J. Stadler, et al., Hum. Mol. Genet., **17**, 11, 1591 (2008).

73. X. Hu and F. Wu, *Prot. Cell*, **6**, 4, 307 (2015).
74. M. Krzisch, S. G. Temprana, L. A. Mongiat, et al., *Brain Struct. Funct.*, **220**, 4, 2027 (2015).
75. G. Matthews, *Neuron*, **44**, 223 (2004).
76. R. G. Parton and K. Simons, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 185 (2007).
77. N. J. Willmott, K. Wong, and A. J. Strong, *J. Neurosci.*, **20**, 5, 1767 (2000).
78. X. Hua, E. B. Malarkey, V. Sunjara, et al., *J. Neurosci. Res.*, **76**, 86 (2004).
79. M. W. Sherwood, M. Arizono, C. Hisatsune, et al., *Glia*, **65**, 3, 502 (2017).
80. E. Shigetomi, S. Patel, and B. S. Khakh, *Trends Cell Biol.*, **26**, 4, 300 (2016).
81. J. Meldolesi and T. Pozzan, *J. Cell Biol.*, **21**, 142, 1395 (1998).
82. Y. Takumi, V. Ramírez-León, P. Laake, et al., *Nature Neurosci.*, **2**, 7, 618 (1999).
83. M. G. Stewart, N. I. Medvedev, V. I. Popov, et al., *Eur. J. Neurosci.*, **21**, 3368 (2005).
84. V. I. Popov, N. I. Medvedev, I. V. Patrushev, et al., *Neuroscience*, **149**, 549 (2007).
85. A. Plata, A. Lebedeva, P. Denisov, et al., *Front. Mol. Neurosci.*, **11**, 215 (2018).
86. A. Matus, *Curr. Opin. Neurobiol.*, **15**, 76 (2005).
87. A. J. G. D. Holtmaat, J. T. Trachtenberg, L. Wilbrecht, et al., *Neuron*, **45**, 279 (2005).
88. A. H. Cornell-Bell, P. G. Thomas, and S. J. Smith, *Glia*, **3**, 322 (1990).
89. M. E. Brown and P. C. Bridgman, *J. Neurobiol.*, **58**, 1, 118 (2004).
90. S. J. Stachelek, R. A. Tuft, L. M. Lifschitz, *J. Biol. Chem.*, **276**, 35652 (2001).
91. C. Cali, J. Baghabra, D.J. Boges, et al., *J. Comp. Neurol.*, **524**, 23 (2016).
92. M. Bellesi, L. de Vivo, S. Koebe, et al., *Front. Cell Neurosci.*, **12**, 308 (2018).

Two Subcompartments of the Smooth Endoplasmic Reticulum in Perisynaptic Astrocytic Processes: Ultrastructure and Distribution in Hippocampal and Neocortical Synapses

E.A. Shishkova* and V.V. Rogachevsky*

**Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

Perisynaptic astrocytic processes involved in the tripartite synapse functioning respond to its activation by local depolarization with calcium release from the intracellular stores inside nodes of astrocytic processes and develop local and generalized calcium events. However, based on the first electron microscopy studies a point of view was formed that terminal astrocytic lamellae are devoid of any organelles, including the main astrocytic calcium store – the cisternae of the smooth endoplasmic reticulum. Indeed, analysis of smooth endoplasmic reticulum cisternae could be limited by their weak electron contrast, the studying of astrocytic processes on single sections, and insufficient optical resolution of the equipment used. Here, by using serial section transmission electron microscopy and 3D reconstructions, we analyzed astrocytic processes in murine hippocampal and cortical synapses. As a result of unit membranes contrast enhancement, it was shown for the first time that perisynaptic processes of astrocytes with a morphology of thin branchlets contain two types of smooth endoplasmic reticulum cisternae and microvesicles. Unlike branchlets, membrane organelles inside terminal lamellae were comprised by only short fragments of thin smooth endoplasmic reticulum cisternae and microvesicles, whose groups tend to be located in close proximity to active zones of the most active synapses. We speculate both on reliability of the alternative methods in electron microscopy while studying astrocytic microenvironment of synapses and structure-function aspects of smooth endoplasmic reticulum cisternae compartmentalization inside the perisynaptic processes of astrocytes.

Keywords: perisynaptic and terminal astrocytic processes, smooth endoplasmic reticulum, glycogen, transmission electron microscopy, scanning electron microscopy, 3D reconstruction