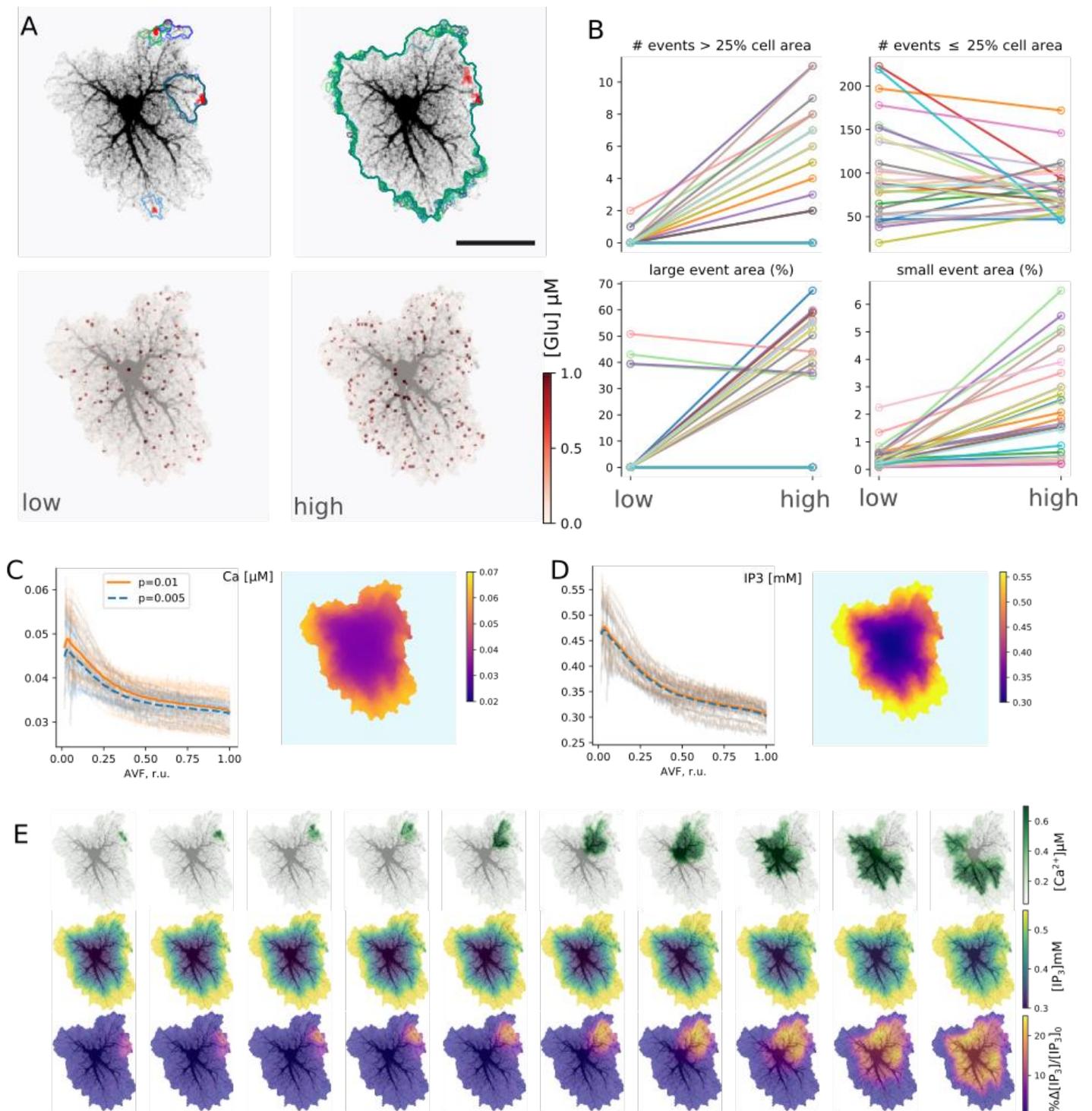
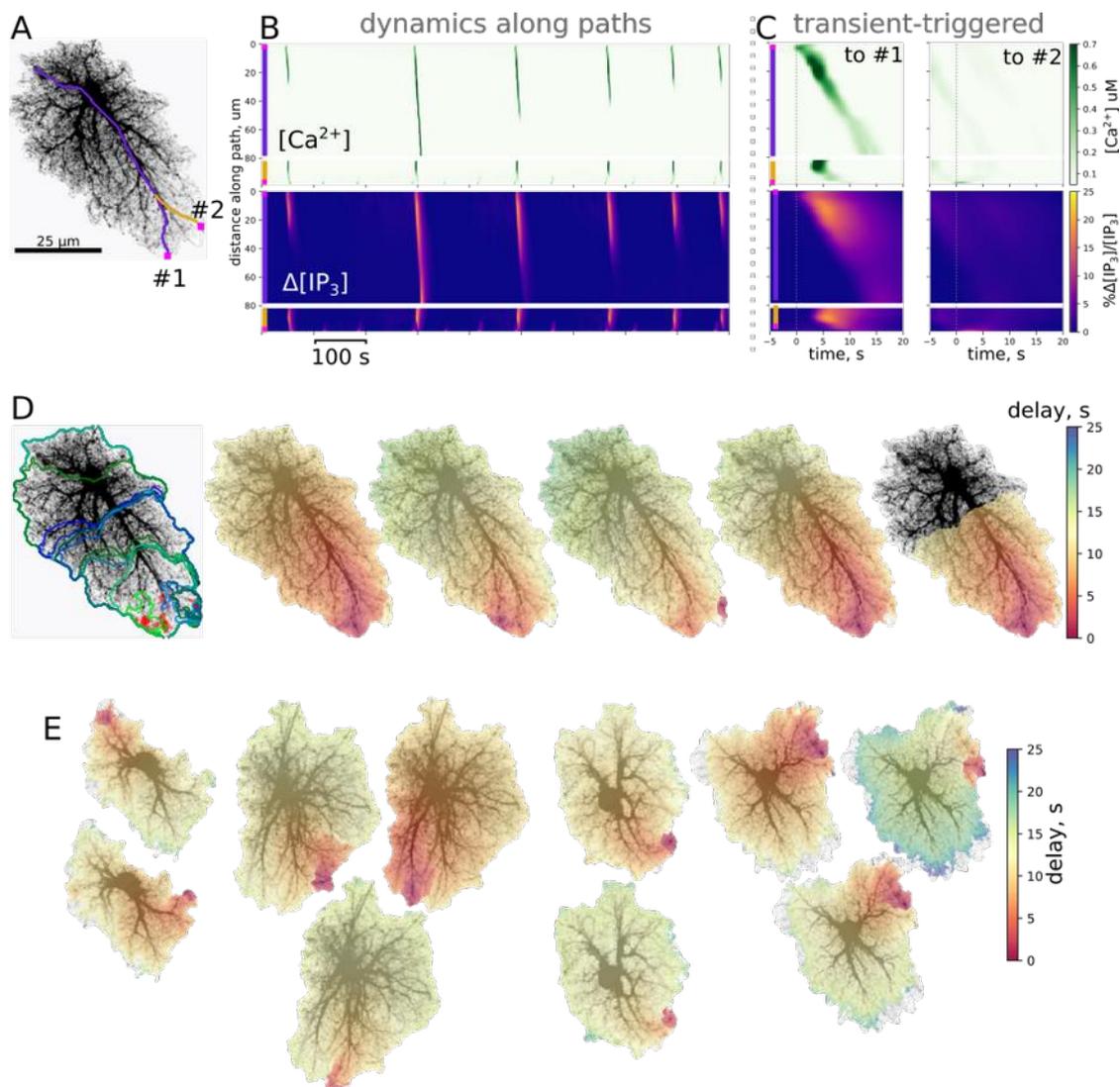


**Рис. 1** Построение модели кальциевой сигнализации в астроцитах. Слева: локальная структура модели учитывает области с высоким (I) и низким значением доли астроцитарного объема (AVF) и межклеточное пространство (III); AVF влияет на относительные вклады обмена через цитоплазматическую мембрану и  $IP_3$ -опосредованный выход кальция из ЭПР. Справа: исходная библиотека пространственных шаблонов, формирование расширенной библиотеки, заполнение ячеек диаграммы Вороного астроцитарными шаблонами и оптимизация контуров клеток.



**Рис. 2** Динамика модели на одноклеточных шаблонах. (A) При низком уровне стимуляции реализуются локализованные небольшие локализованные события; при увеличении уровня стимуляции появляются крупные события, охватывающие всю клетку. Показаны контуры 25 самых крупных событий. Красным отмечены точки инициации кальциевых транзиевтов. (B) увеличение стохастического возбуждения приводит к появлению крупных полноклеточных событий, уменьшению частоты небольших событий и увеличивает размеры небольших событий. (C) Стационарные профили  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{IP}_3$  зависят от AVF, при этом в центральных областях концентрация обоих веществ ниже, чем в периферических. Стимуляция увеличивает стационарный уровень  $\text{Ca}^{2+}$  и не влияет на уровень  $\text{IP}_3$ . (E) Развертка одного кальциевого транзиевта. Изменение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  (вверху),  $\text{IP}_3$  (в центре) и относительное изменение  $\text{IP}_3$  (внизу).



**Рис. 3** Кальциевая активность в одноклеточных шаблонов самоорганизуется в устойчивые паттерны возбуждения.

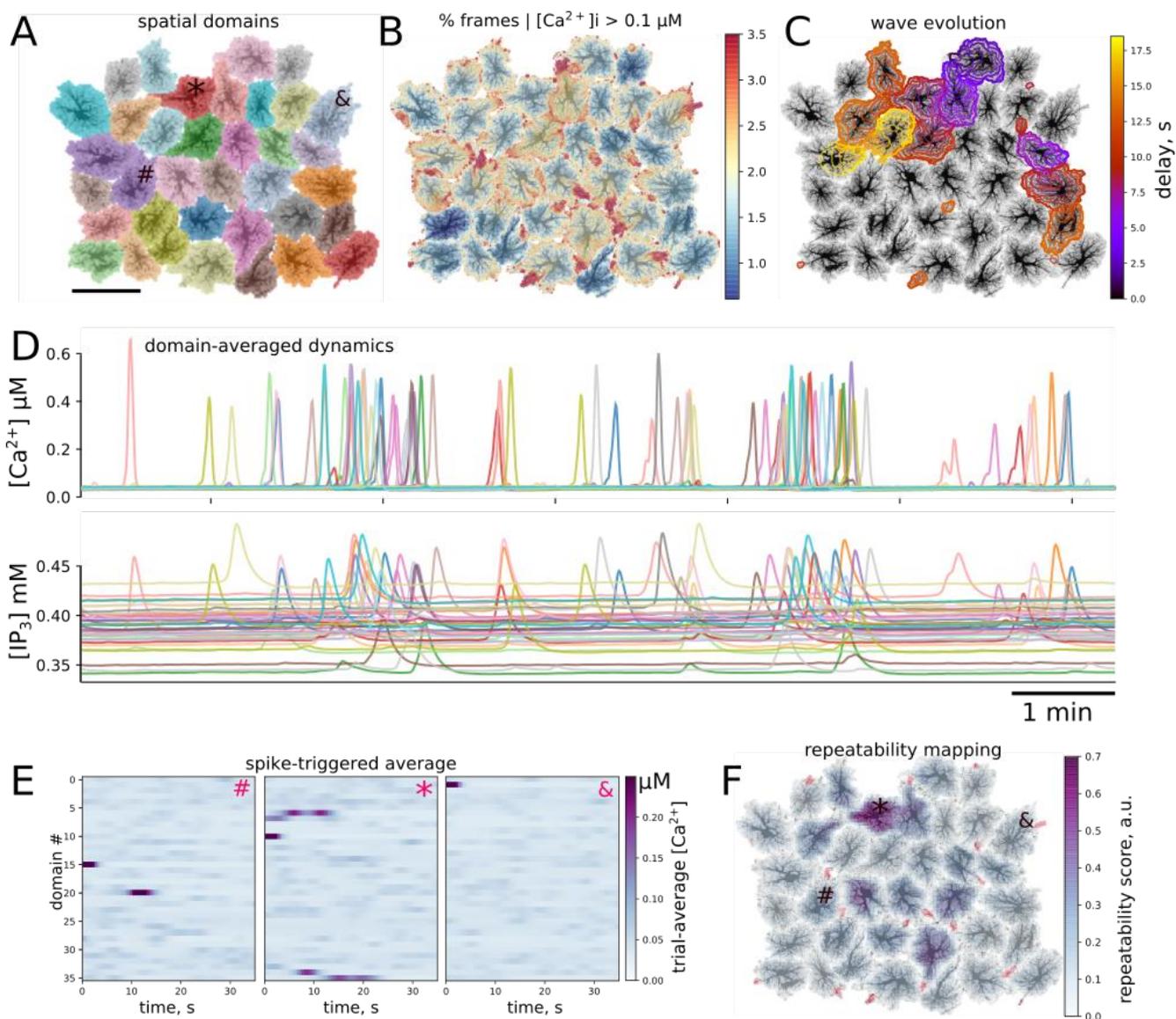
(A) Скан-линии (#1, #2), вдоль которых картируется динамика.

(B) Обе области #1 и #2 являются устойчивыми зонами инициации кальциевых транзиентов. Однако транзиенты, начинающиеся в области #2 практически не распространяются по клетке, в то время как транзиенты, стартующие в области #1 часто распространяются на всю клетку.

(C) Усреднение временных окошек по инициации транзиента в #1 демонстрирует повторяющийся путь распространения возбуждения вдоль линии #1; усреднение по транзиентам в #2 не обнаруживает повторяющихся паттернов активации за исключением небольшой области вокруг точки #2.

(D) Контуры 25 самых крупных событий и точки их инициации (красный цвет); карты распространения полноклеточных кальциевых волн, цветовая шкала кодирует задержку наступления кальциевого пика относительно начала события.

(E) Примеры повторяющихся пространственно-временных паттернов на других клеточных шаблонах, видны полярные варианты активации, чередование расположенных рядом зон активации, разброс по времени распространения событий.



**Рис. 4** Активность в многоклеточных сетевых шаблонах.

(A) Пространственные домены отдельных астроцитов.

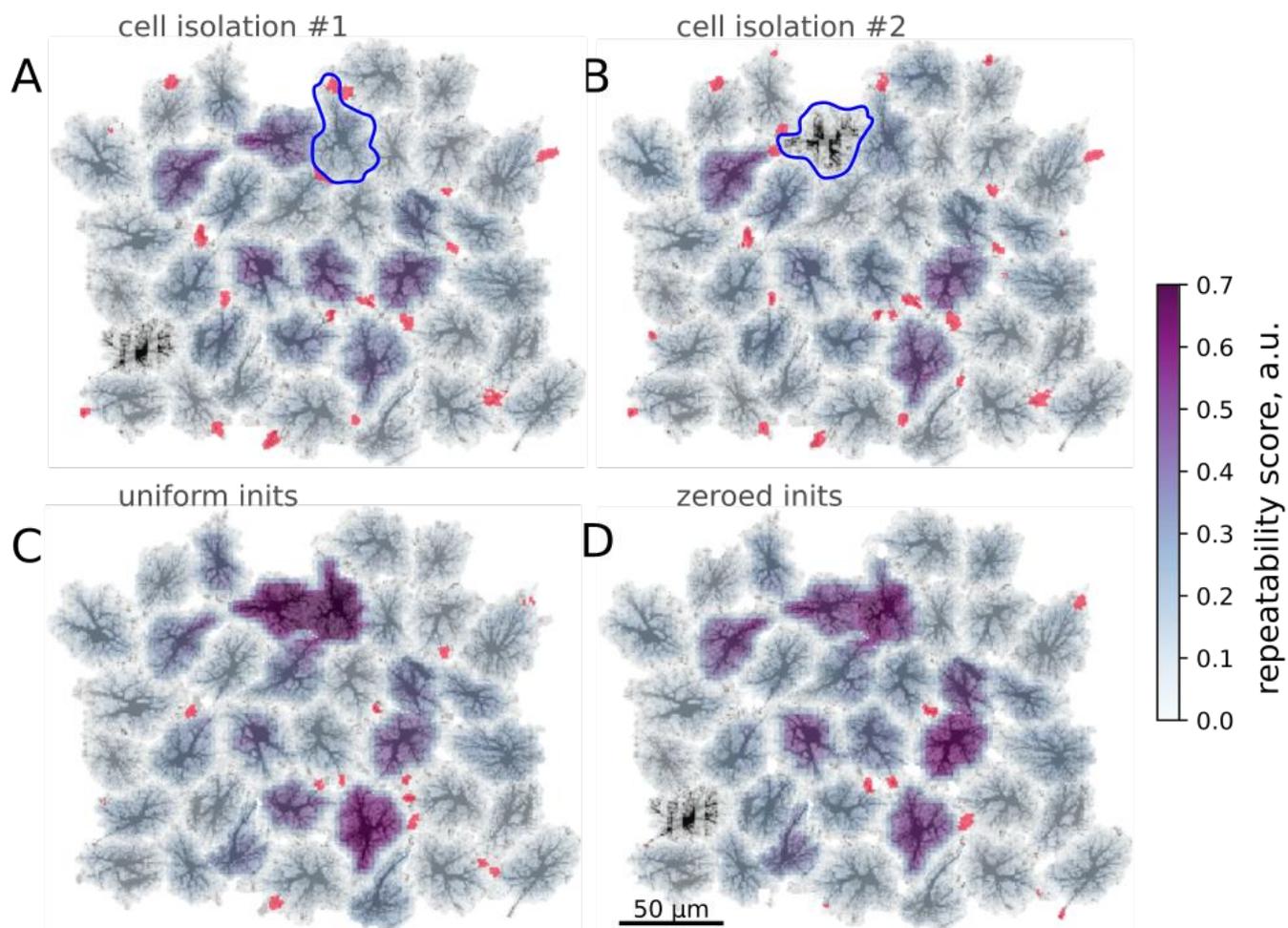
(B) Доля времени, проведенное в состоянии с повышенной концентрацией  $Ca^{2+}$ .

Видны «горячие» зоны на периферии клеточных доменов. (C) пример распространения двух кальциевых волн; контуры разделены интервалами в 1 секунду, цвет кодирует задержку от начала более крупной волны.

(D) Пример динамики  $Ca^{2+}$  и  $IP_3$ , усредненных в пределах пространственных доменов, показанных в (A); видны одиночные события в отдельных клетках и многоклеточные волны.

(E) Усреднение в окне, запускаемое кальциевым спайком в одной клетке: активация некоторых клеток приводит к устойчивой активации других клеток; для клетки, обозначенной как (#) это одна клетка, для клетки, обозначенной как (\*) это несколько клеток, наконец активация ветки, обозначенной (&), не приводит к устойчивой активации других клеток.

(F) Обобщение подхода, приведенного в (E) на небольшие области и картирование коэффициента воспроизводимости паттернов активации следующих за активацией данной области. Видны отдельные клетки – «лидеры», активация которых приводит к устойчивой цепочке активации нескольких соседних клеток.

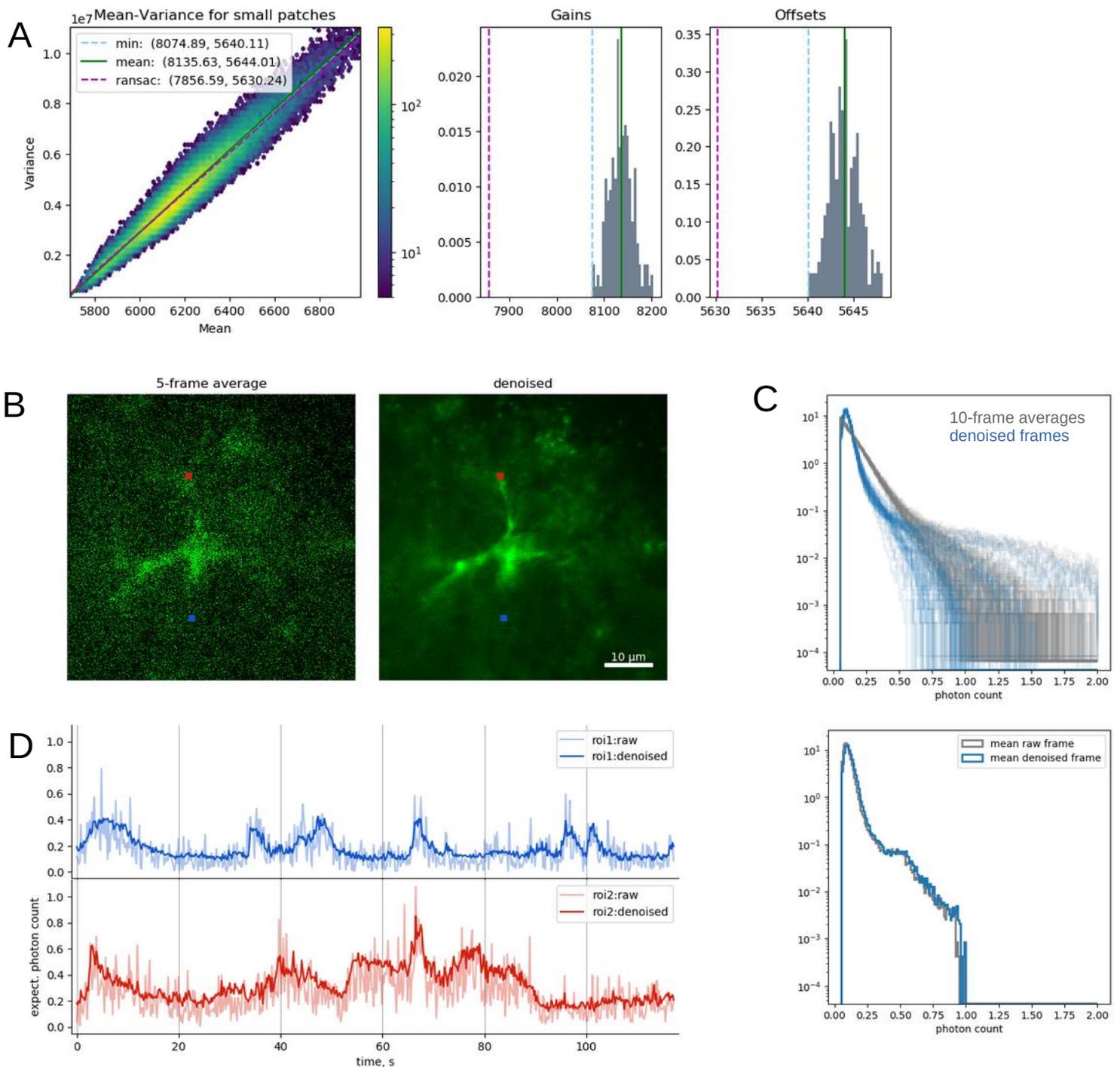


**Рис. 5** Изменения в картах воспроизводимости паттернов активации после изменения пространственных шаблонов. Красным показаны зоны устойчивой инициации кальциевых транзиевтов.

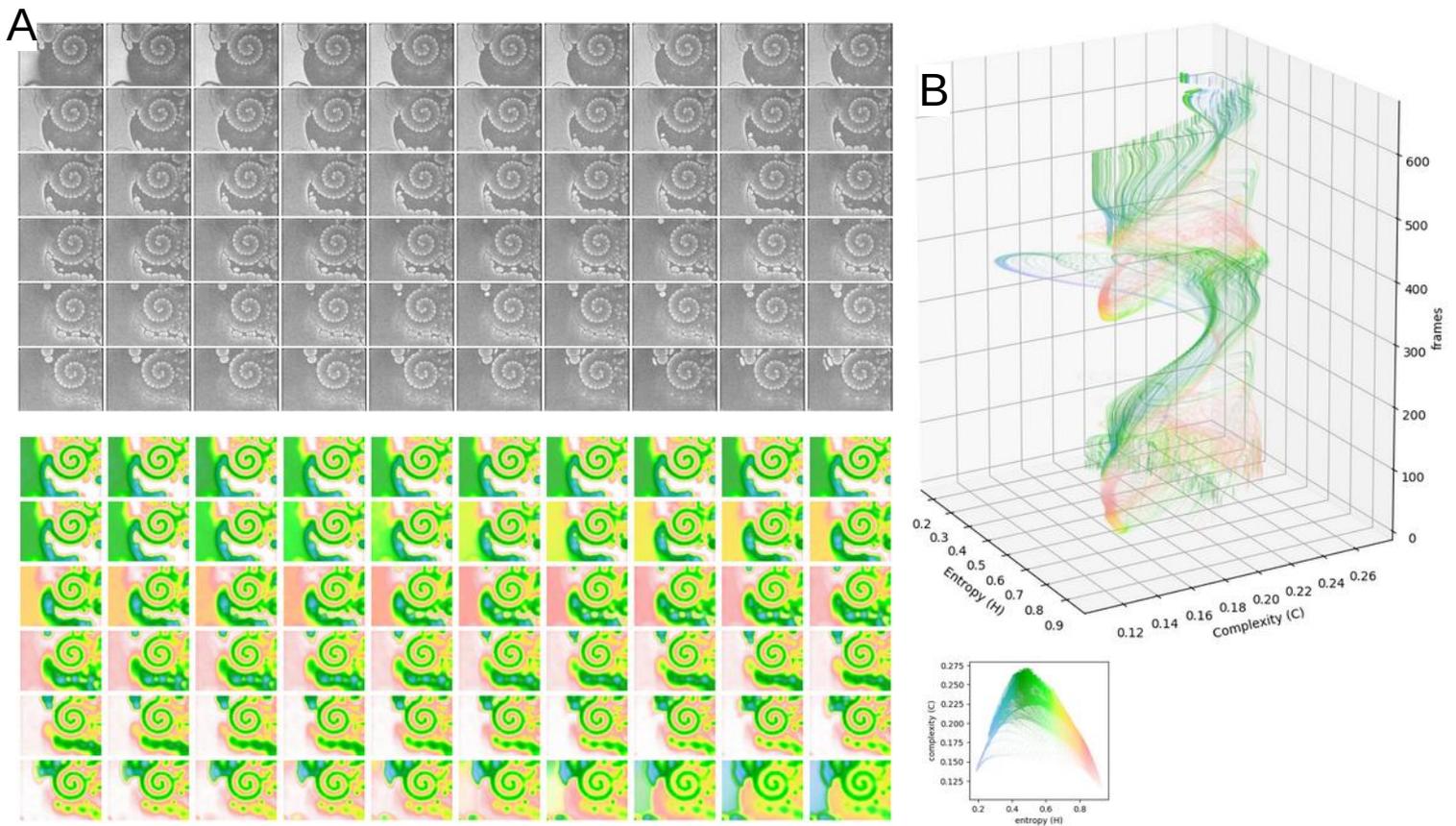
(A-B): Изолирование отдельных клеток.

(C) Замена профилей AVF в зонах активации из панели (A) на усредненные значения: рост воспроизводимости.

(D) удаление клеточного объема в зонах активации из панели (A): сокращение числа доступных зон активации и более устойчивые паттерны распространения активности.



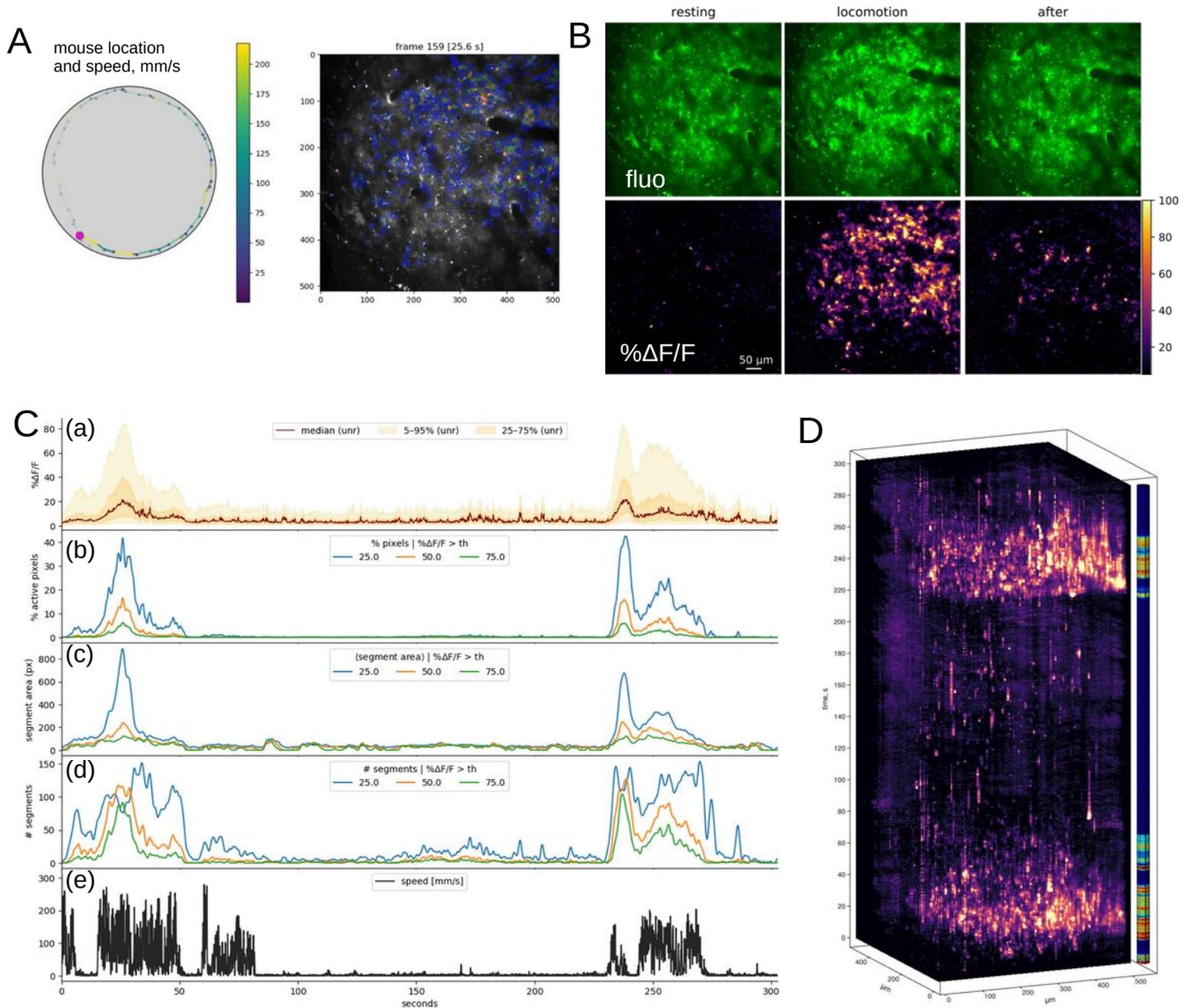
**Рис. 6** Подход к стандартизации данных и алгоритм подавления шума. (A) Подбор коэффициентов регрессии для зависимости дисперсии уровней флуоресценции от среднего значения. Угол наклона соответствует коэффициенту усиления РМТ, а точка пересечения оси X – офсетному значению. (B) Пример подавления шума в конфокальных изображениях на срезе гиппокампа. Слева – среднее по 5 кадрам (на одиночных кадрах структура не видна), справа – одиночный кадр после подавления шума. (C) распределения значений флуоресценции для 10-кадровых средних проекций (серый) и одиночных фильтрованных кадров (синий). Внизу: то же для средней проекции кадра по всей записи. (D) Сравнение реализации локальной динамики флуоресценции из точек (среднее в окошке 5x5 пикселей), обозначенных на панели (B), для исходных данных и после подавления шума. Значения приведены после стандартизации данных, показанной в (A).



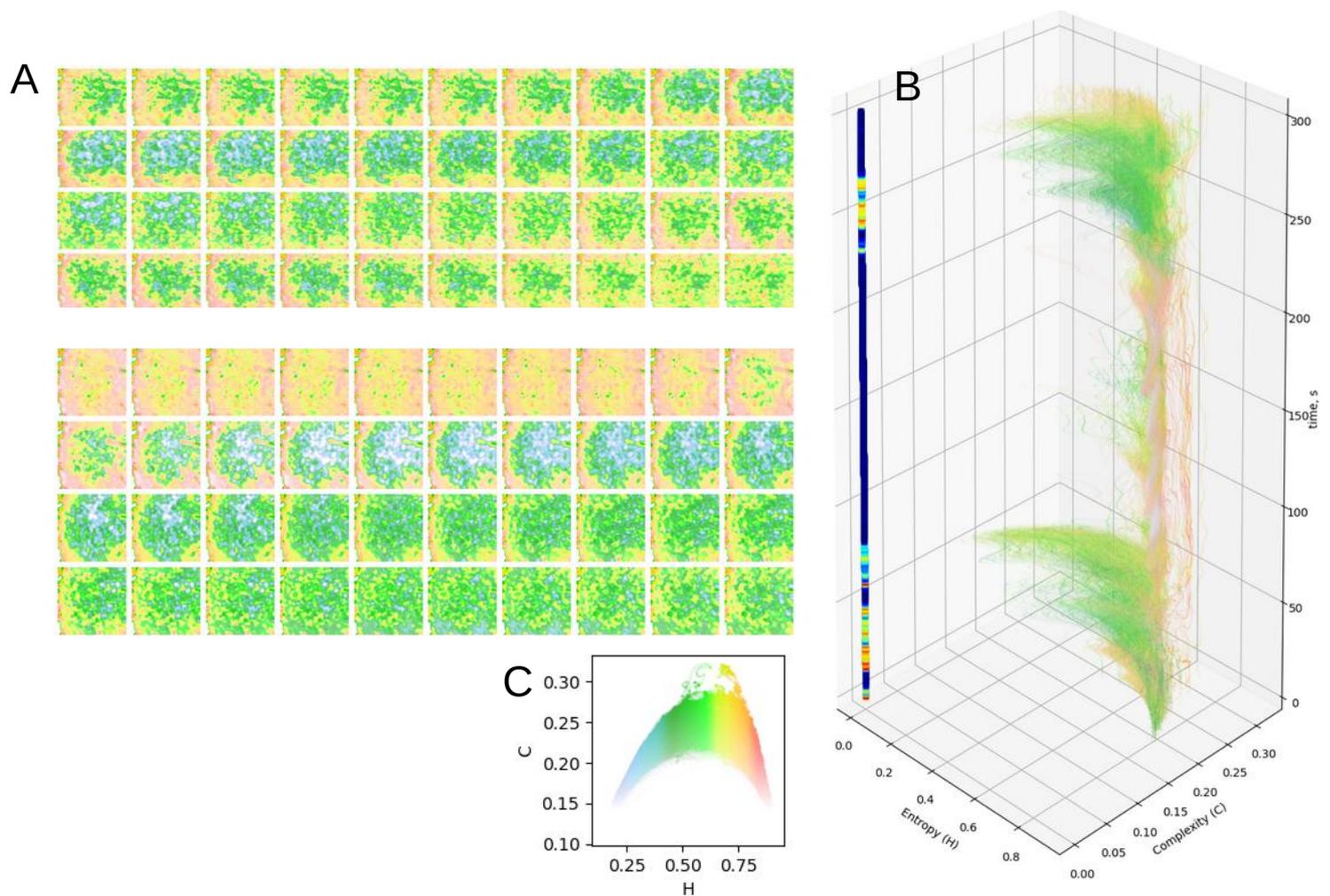
**Рис. 7** Пример расчета показателей энтропии и сложности для данных с колебательной диссипативной структурой (реакция Белоусова-Жаботинского в микроэмульсии)

(А) Вверху: кадры видео съемки процесса самоорганизации в реакции Белоусова-Жаботинского; внизу: показатели энтропии-сложности, основанные на распределении собственных значений матриц ковариации в небольших областях; оттенок цвета кодирует значение энтропии, насыщенность оттенка кодирует значение сложности. На спиральных структурах области с высоким значением сложности (зеленые) соответствуют распространяющимся сегментированным фронтам волны, а области с высокой энтропией (розовые) – равномерно окрашенным следовым значениям после прохождения волны. Справа – цветовая шкала на плоскости энтропия-сложность.

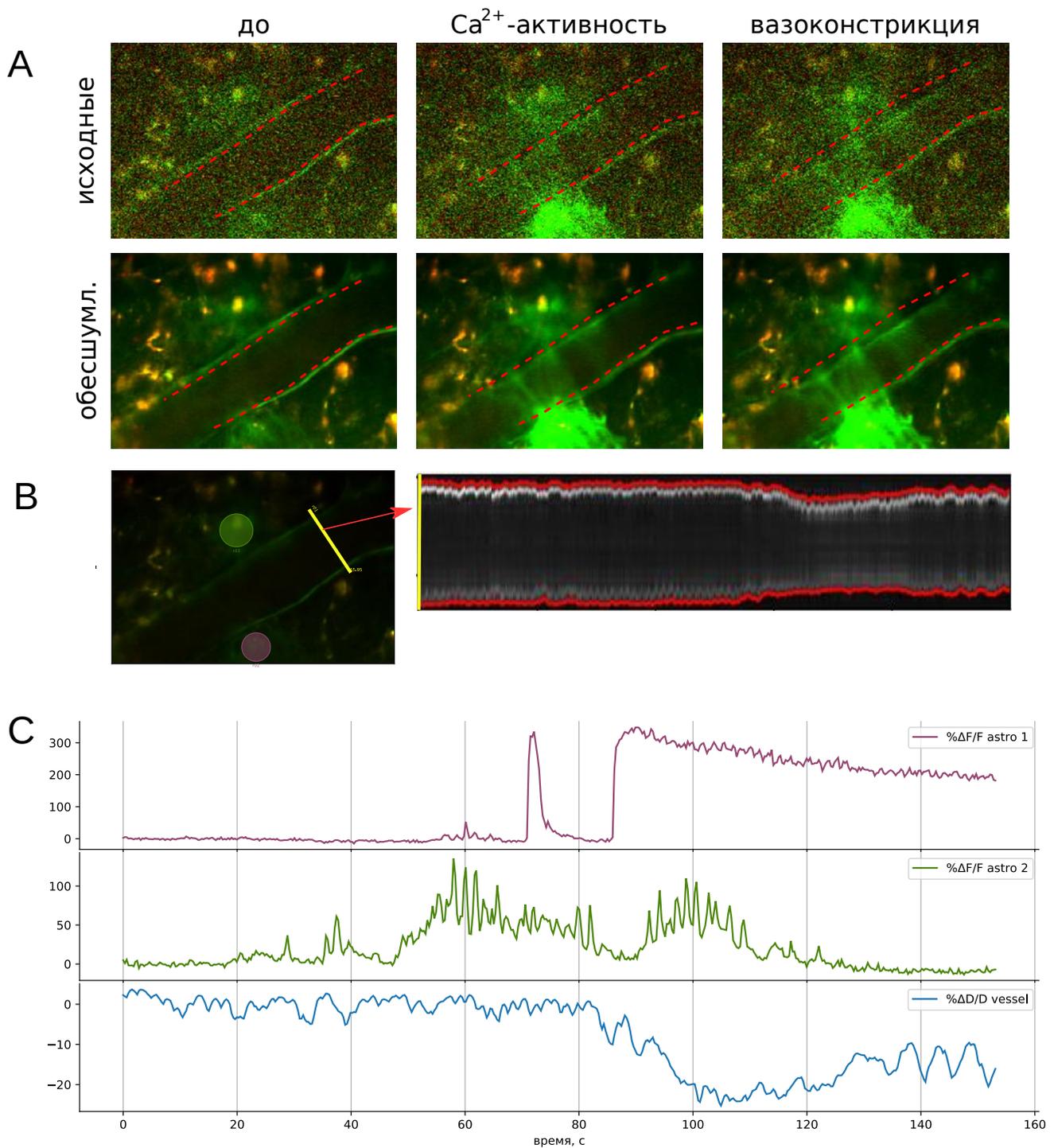
(В) Изменения энтропии и сложности для 500 случайно выбранных точек в кадре, время направлено снизу вверх.



**Рис. 8** Кальциевая активность астроцитов соматосенсорной коры в поведении. (A) В проведенных экспериментах одновременно записывалось положение животного относительно мобильной платформы и скорость перемещения, а также данные двухфотонного имиджинга астроцитов коры, экспрессирующих GsaMP6f. Контурами выделены области, где значение % $\Delta F/F$  превышало пороги в 50, 100 и 150%. (B) Мгновенные снимки флуоресценции (вверху) и относительных изменений флуоресценции (% $\Delta F/F$ ) до двигательной активности животного, во время активности и после нее. (C) Покадровая статистика (% $\Delta F/F$ ). (a): 5,25,50,75 и 95-перцентили значений % $\Delta F/F$ , (b) процент активных пикселей от площади поля зрения по превышению порогов в 25, 50 и 75 % $\Delta F/F$ , (c) средняя площадь изолированных сегментов по превышению тех же порогов, (d) количество сегментов, превышающих те же значения порогов, (e) скорость перемещения животного относительно мобильной платформы (D) 3D-проекция значений % $\Delta F/F$ , цветовая карта столбика кодирует скорость перемещения животного.



**Рис. 9** Двигательная активность животного сопровождается синхронизацией кальциевой активности астроцитов соматосенсорной коры.  
 (A) Картирование энтропии-сложности, основанные на распределении собственных значений матриц ковариации в небольших областях; оттенок цвета кодирует значение энтропии, насыщенность оттенка кодирует значение сложности. Показаны последовательности кадров во время двух эпизодов двигательной активности.  
 (B) Изменения пары энтропия-сложность для 1000 случайно выбранных точек в поле зрения. Цвет столбика-вставки кодирует скорость перемещения животного.  
 (C) Цветовая карта, использовавшаяся для панелей A и B.

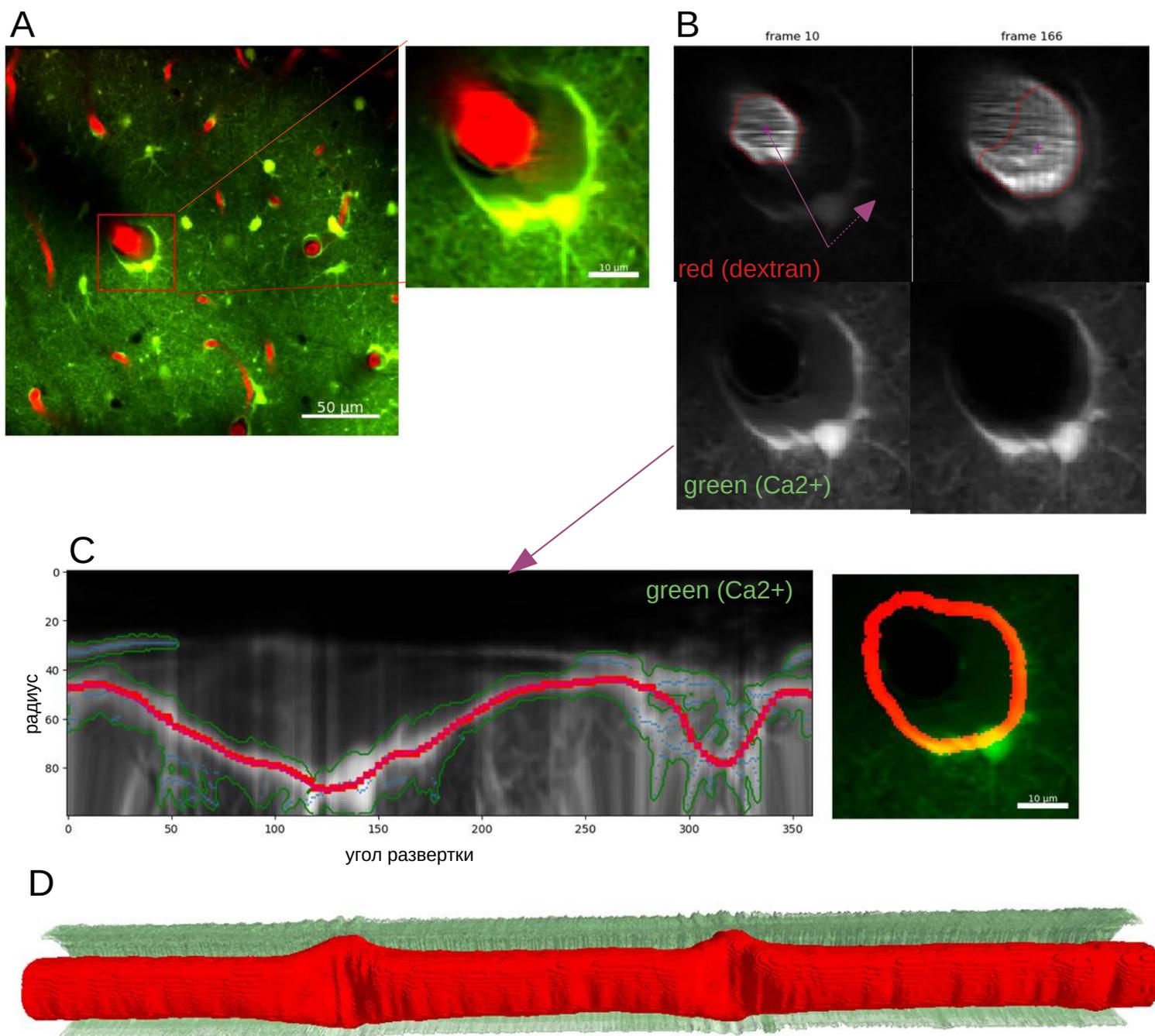


**Рис. 10** Кальциевая активность в астроцитах моторной коры *in vivo* ассоциирована с изменением диаметра сосуда.

(А) Мгновенные снимки в разные моменты времени до и после применения разработанного нами алгоритма подавления шума. Красным контуром показаны границы сосуда в начальный момент времени.

(В) Измерение диаметра просвета сосуда по контурам на скан-линии и 2 области интереса в области расположения двух астроцитов поблизости от сосуда

(С) Кальциевая динамика астроцитов в двух областях интереса (цвет кривых совпадает с цветом областей в (В)) и просвета сосуда. Активность начинается в астроците 2, но именно продолжительное увеличение флуоресценции в астроците 1 приводит к началу уменьшения диаметра сосуда.



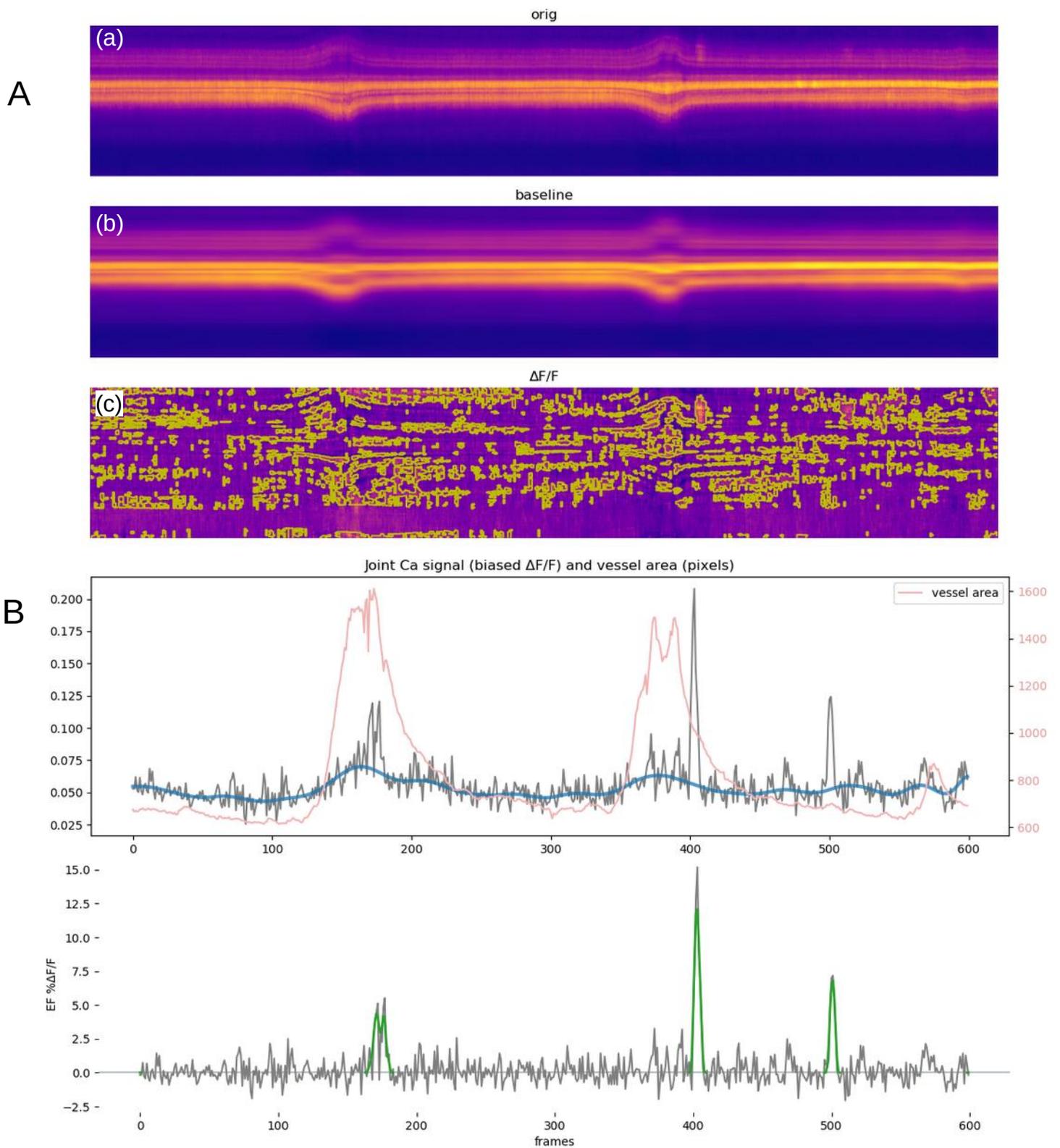
**Рис. 11** Кальциевая активность астроцитарных ножек на фоне вазодилатации, вызванной гипоксией.

(А) Мгновенный кадр регистрируемой в 2 каналах флуоресценции после применения алгоритма подавления шума, показана область интереса вокруг проникающей артериолы.

(В) Вверху: сегментация изображения в красном канале для примерной локализации центра сосуда; видно неравномерное окрашивание расширенного сосуда из-за его наклона относительно оптической плоскости и неравномерности распределения плазмы и эритроцитов в просвете сосуда. Внизу: флуоресценция в зеленом канале, виден отросток астроцита, охватывающий сосуд (астроцитарная «ножка»).

(С) Для отслеживания изменений  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой флуоресценции необходимо сегментировать ножку в каждом кадре. Слева: нормализованная развертка области интереса одного кадра в полярных координатах с началом в точке центра сосуда и проведенный путь по точкам локальных максимумов; справа – реконструкция найденного положения астроцитарной ножки в исходных координатах

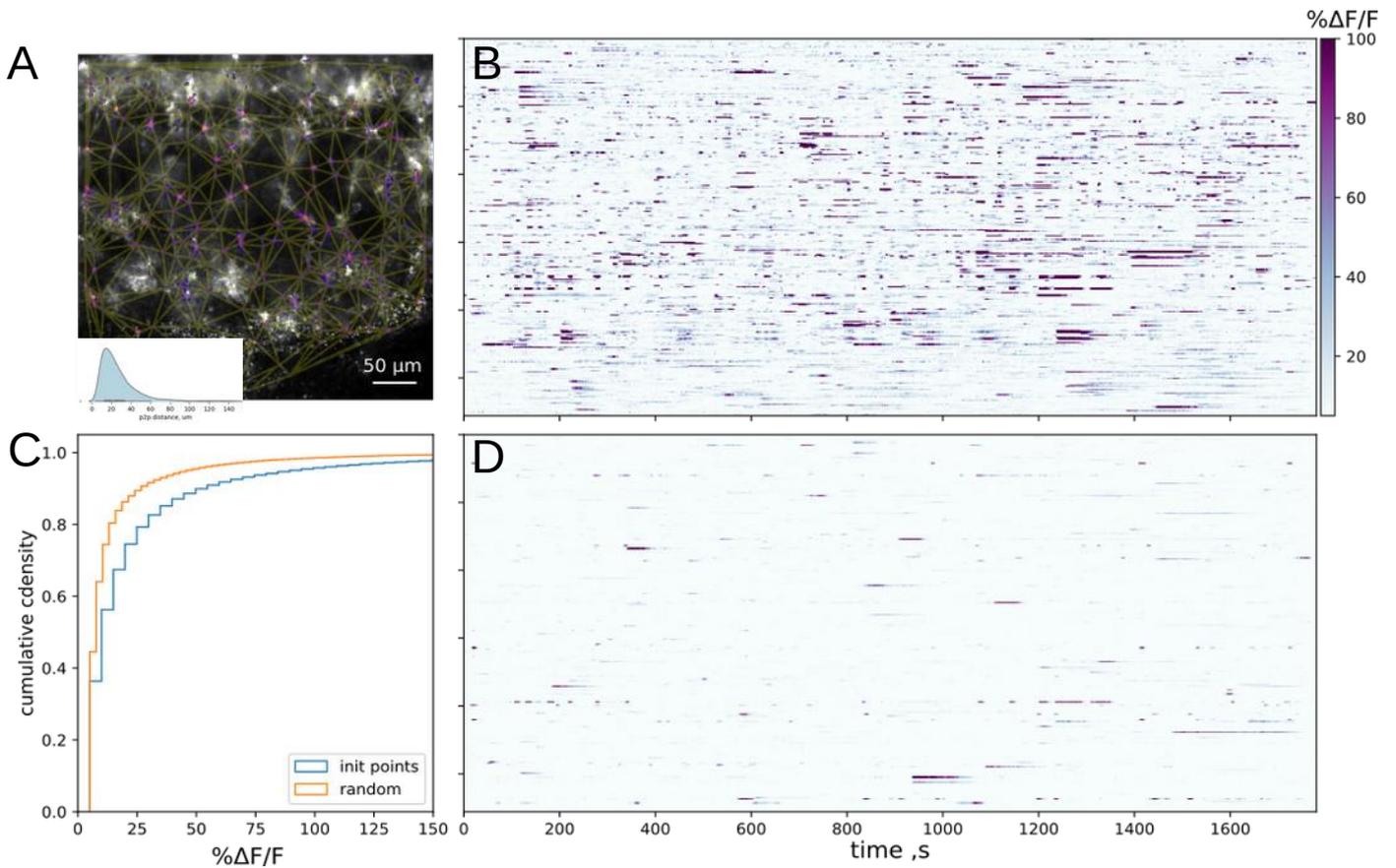
(D) 3D-реконструкция контуров сосуда и положения астроцитарной ножки.



**Рис. 12** Кальциевая активность астроцитарных ножек на фоне вазодилатации, вызванной гипоксией. Выделение относительных изменений флуоресценции в сегментированных структурах.

(А) Развертка кальциевого сигнала в астроцитарной ножке вдоль времени. Ось Y – угол поворота относительно центра сосуда; ось X – время (кадры исходного видео). Сверху виз: (а) видны деформации ножки и отдельные кальциевые события, (б) выделенный фоновый уровень флуоресценции, (с) относительные изменения флуоресценции.

(В) Вверху: наложение динамики площади сосуда и относительных изменений флуоресценции; внизу: относительные изменения флуоресценции после дополнительной коррекции базовой линии и детектированные транзиенты.

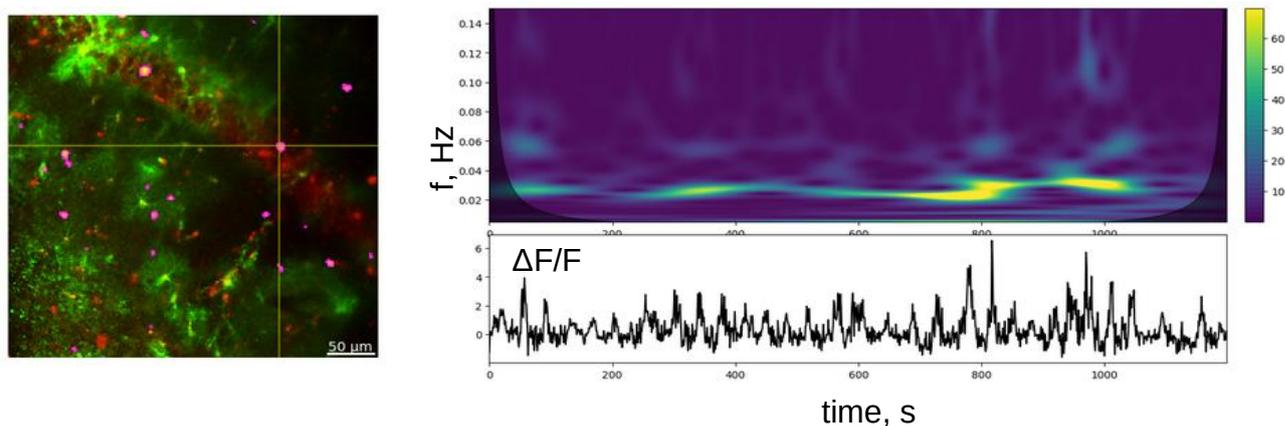


**Рис. 13** Центры инициации кальциевых событий.

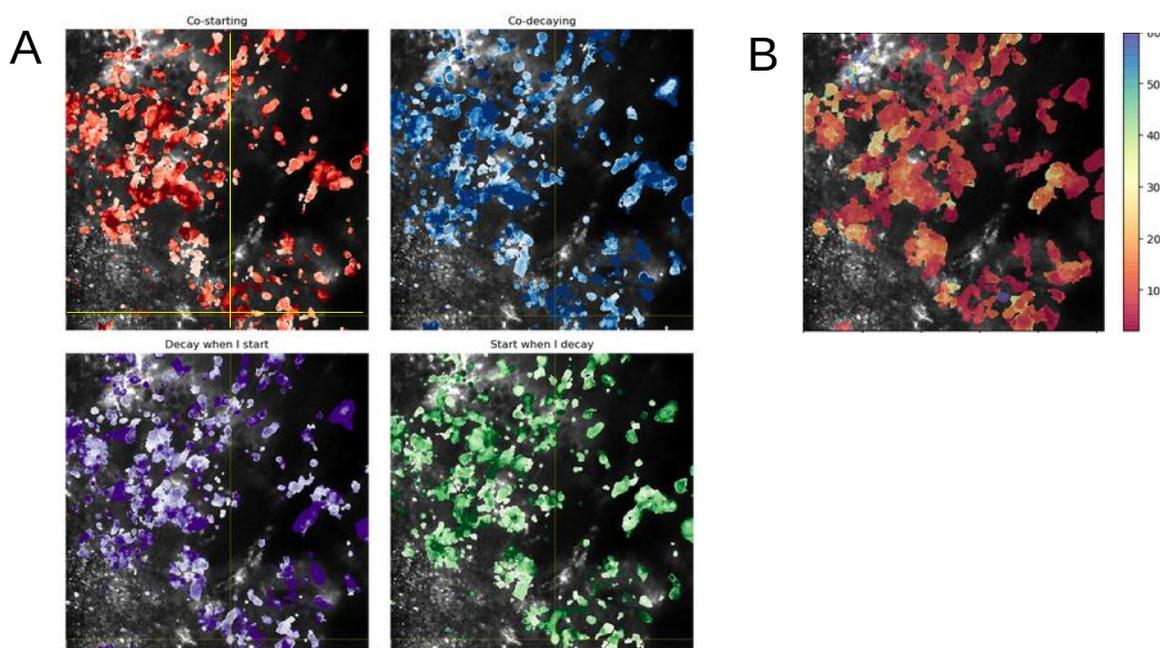
(A) Средний уровень флуоресценции среза гиппокампа (GCaMP6f) и области, в которых устойчиво инициировались кальциевые события (цветовая шкала отражает частоту зарождения событий в этой точке); вставка: распределение расстояний между точками инициации по триангуляции ( $n=10$  срезов, 3 животных).

(B) Растр кальциевой динамики ( $\% \Delta F/F$ ) в центрах инициации событий. Каждая строчка растра – один центр области инициации. Наблюдаются флуктуации флуоресценции различной длительности.

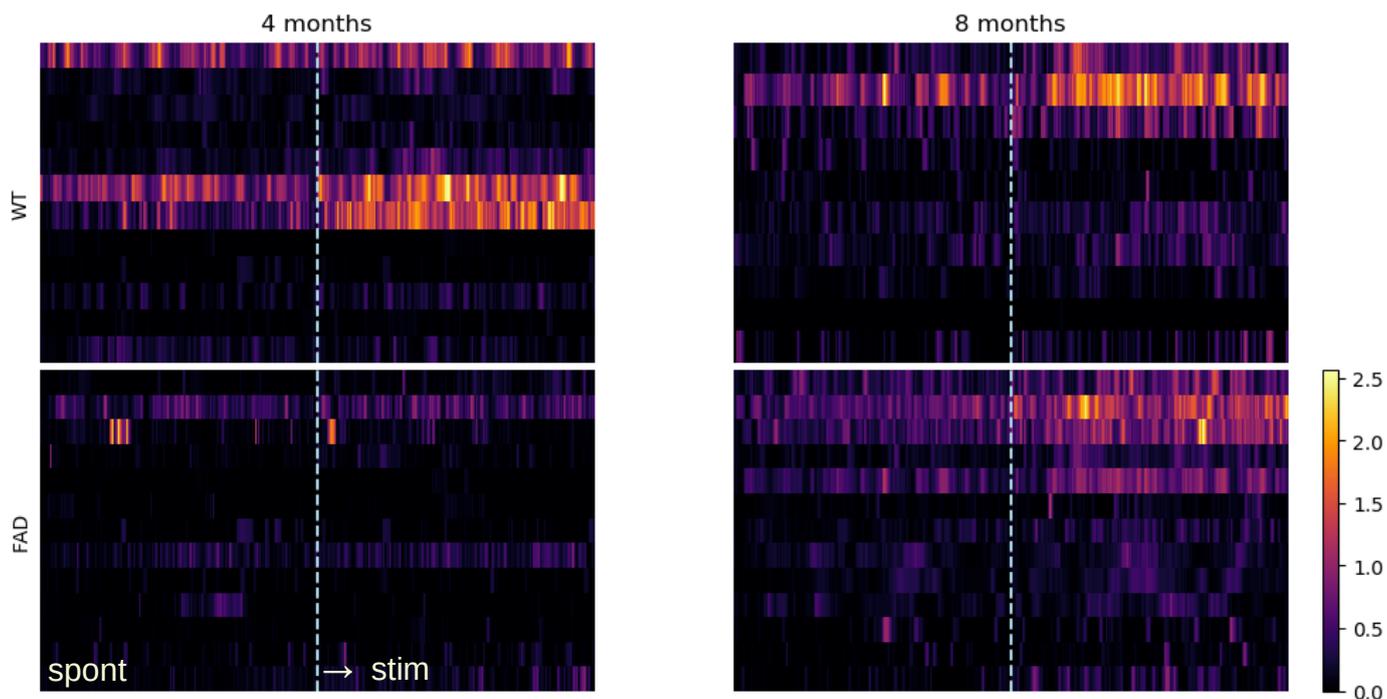
(C-D) Сравнение кальциевой динамики в центрах инициации событий с динамикой в таком же количестве случайно выбранных среди окрашенной области точек. (C) Кумулятивная функция распределения значений  $\Delta F/F$  выше 5%. Кривая для случайных точек быстрее выходит на значение 1, что указывает на преобладание низких значений  $\Delta F/F$ .



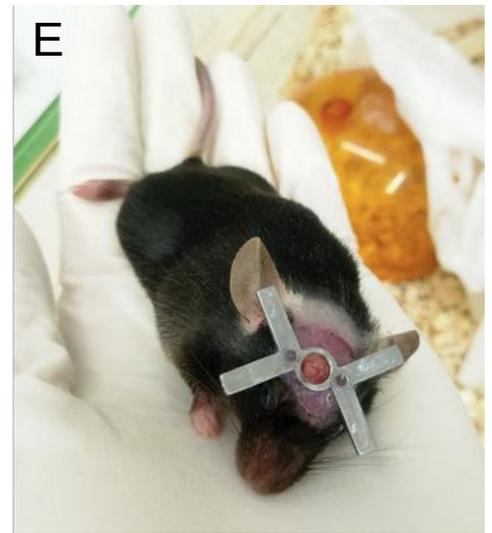
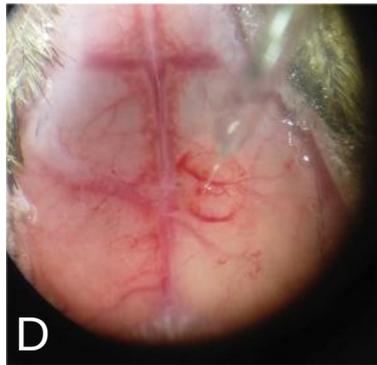
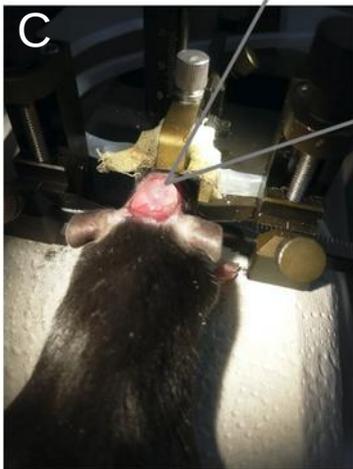
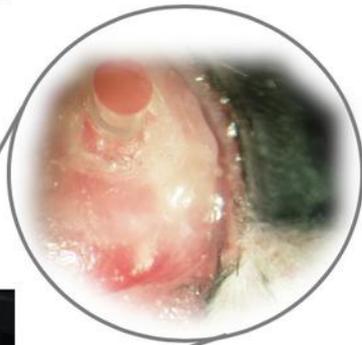
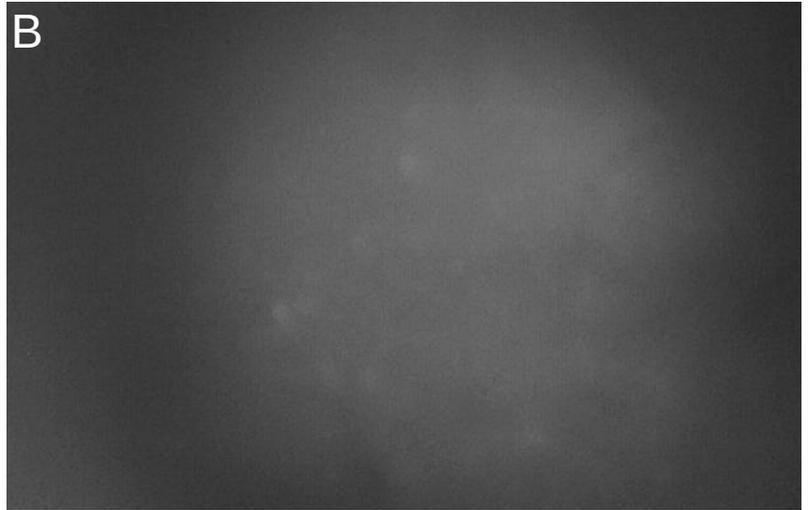
**Рис. 14** Локальные области с периодической кальциевой динамикой. Слева: картирование поля зрения в поиске областей с устойчивой ритмической активностью. Справа: динамика и вейвлет-скейлограмма в области, обозначенной перекрестьем на изображении слева.



**Рис. 15** Перспективные методы описания кальциевой динамики. (А) Картирование областей с динамикой флуоресценции, которая находится в фазе (вверху) и в противофазе (внизу) к динамике в выбранной точке (показана перекрестьем). Вверху слева: области, где сигнал флуоресценции одновременно нарастает с образцом, справа – где одновременно спадает; внизу слева: области, в которых сигнал флуоресценции спадает одновременно с нарастанием в образце, справа – где сигнал нарастает во время падения сигнала в образце. (В) Средние задержки относительно начала события. Выделено 500 наиболее крупных по площади событий, внутри каждого найдена задержка достижения пика нарастания флуоресценции относительно старта события. Задержки, для перекрывающихся событий усредняются. На карте красные области соответствуют областям-«лидерам» с низкой задержкой, более желтые области – «последователи», т.е. зоны, куда кальциевая активация приходит после инициации в другом месте.

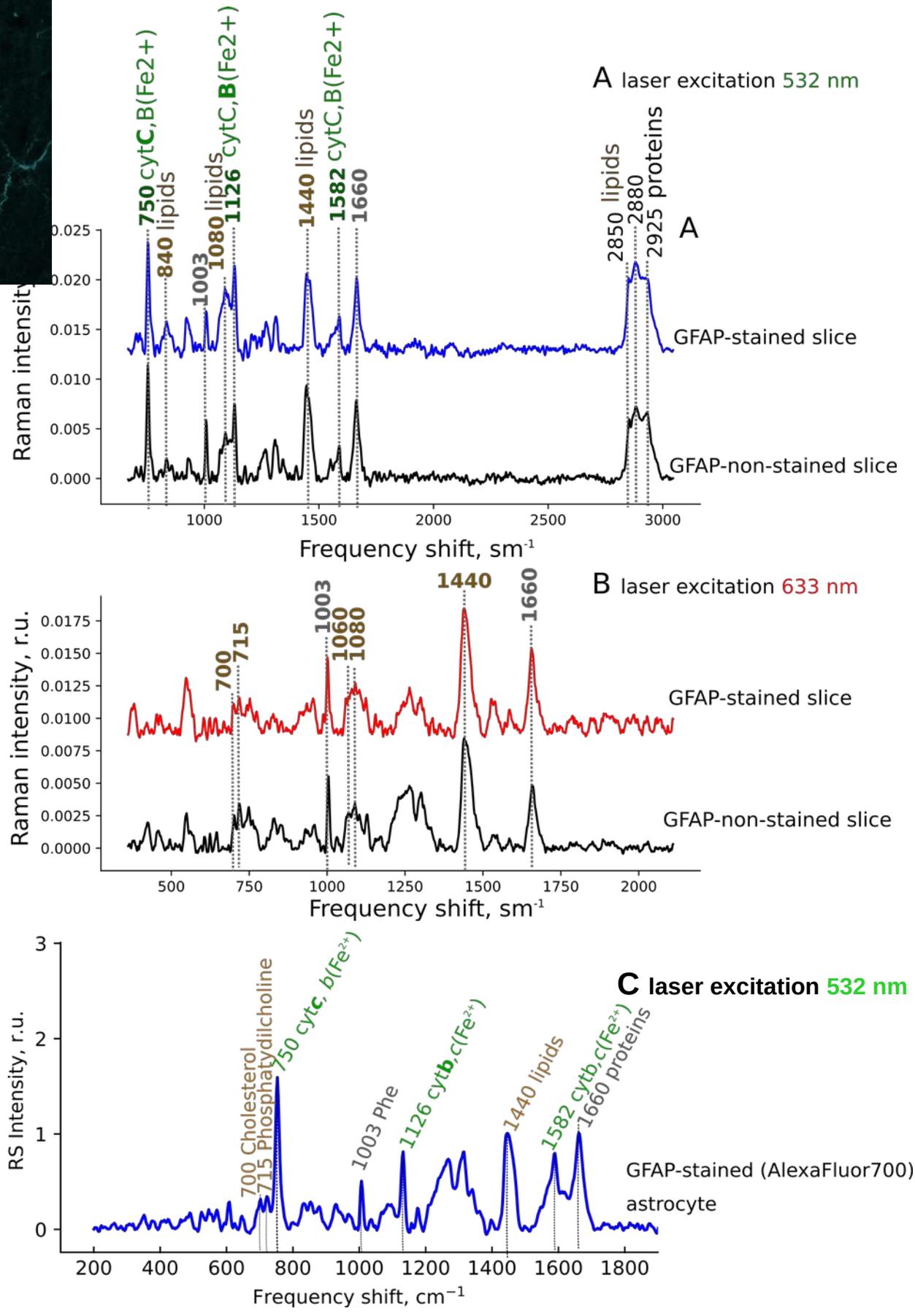
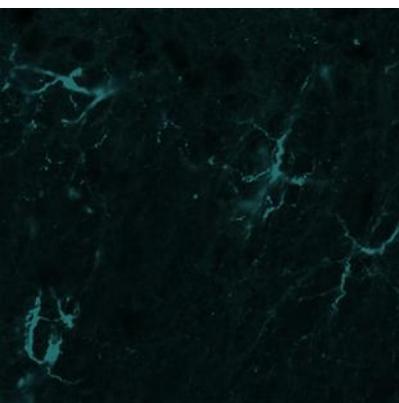


**Рис. 16.** Сравнение уровня кальциевой активности в астроцитах гиппокампа мышей дикого типа и 5xFAD. Представлены группы животных возрастом 4 и 8 месяцев. Каждая строчка раstra – отдельная запись. Цвет кодирует долю активных ( $\Delta F/F > 15\%$ ) пикселей в поле зрения. Пунктирная линия разделяет эпизод до электрической стимуляции и период с электрической стимуляцией коллатералей Шаффера с частотой 1 Гц. Видно, что кальциевая активность астроцитов мышей 5xFAD в возрасте 4 месяца снижена, а в возрасте 8 месяцев мало отличается от контрольной группы, но имеет тенденцию к увеличению числа препаратов, отвечающих на электрическую стимуляцию

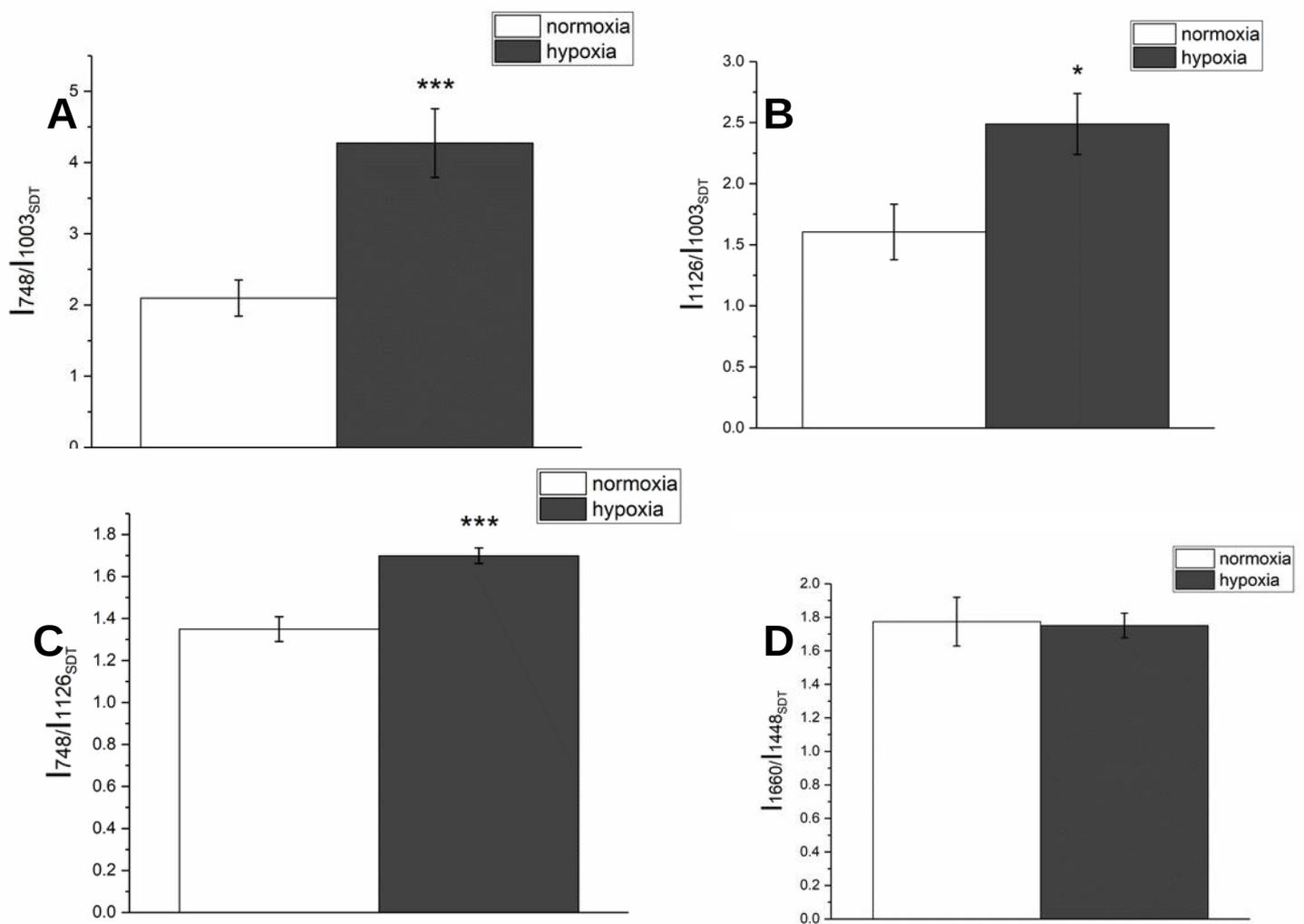


**Рис. 16** Работа с животными *in vivo*.

(A) Мышь с установленным минимикроскопом. (B) пример изображения, полученного при помощи минископа. (C) Установка GRIN-линзы. (D) Инъекция вируса в окно краниотомии. (E) Мышь с установленной пластиной фиксации головы в системе Neurotar.



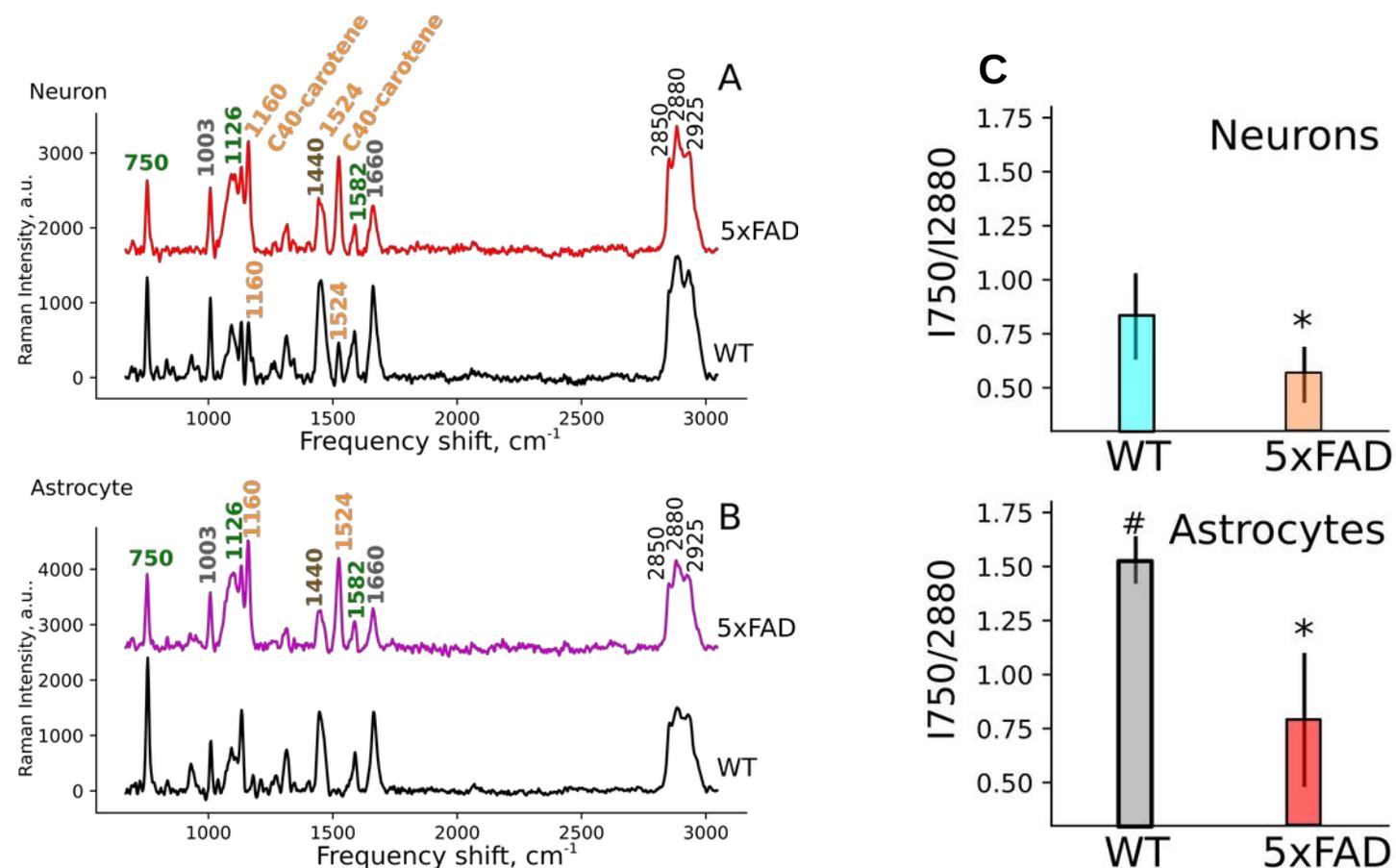
**Рис. 17.** КР-спектры, зарегистрированные от астроцитов гиппокампа срезов мозга мышей, иммунохимически окрашенных на глиальный фибриллярный кислый белок GFAP (синий и красный спектры) и области нейропиля неокрашенных срезов (черные спектры) при лазерном возбуждении с длинами волн 532 нм (рисунки А и С) и 633 нм (рис.В). Вторичные антитела к первичным антителам на GFAP были конъюгированы с флуорофором Су2 (рис.А и В) или AlexaFluor700 (рис.С). Спектры на рис.А и В нормированы на суммарную интенсивность соответствующего спектра и сдвинуты друг относительно друга, спектр на рис.С нормирован на интенсивность пика с положением максимума 1440  $\text{cm}^{-1}$ . Слева вверху показана фотография участка гиппокампа с астроцитами, иммунохимически окрашенными на GFAP (вторичное антитело конъюгировано с Су2). Над пиками указаны положения максимумов и вещества, колебания связей которых приводят к появлению пиков КР



**Рис.18.** Отношения интенсивностей пиков спектров КР, полученных от клеток линии НСТ116 при нормоксии (19% O<sub>2</sub> в среде инкубатора, белые столбики) и при гипоксии (3% O<sub>2</sub>, серые столбики). Перед фиксацией клеток 4% раствором ПФА в среду с клетками был добавлен дитионит натрия, полностью восстанавливающий все компоненты ЭТЦ и O<sub>2</sub>, в результате чего на спектрах КР клеток были “видны” все цитохромы, переведенные в восстановленную форму. Рис.А и В: относительное содержание цитохромов С и В-типов, соответственно, по отношению к фенилаланиновым остаткам белков. Рис.С – относительное содержание цитохромов С-типа по отношению к цитохромам В-типа; рис.Д – относительное содержание белков по отношению к липидам. \*p<0.05; \*\*\*p<0.01 при сравнении клеток, выращенных в условиях нормоксии и гипоксии (непараметрический критерий Манна-Уитни),

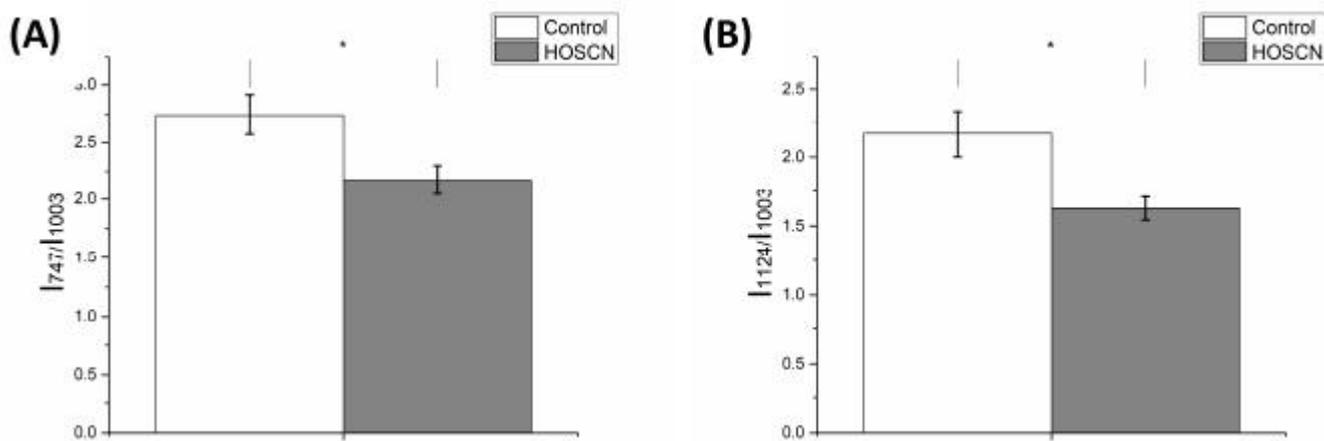
**Таблица 1. Используемые отношения пиков в спектрах КР клеток**

Отношение интенсивностей пиков КР-спектров	Значение
$I_{750}/I_{2880}$	Содержание восстановленных цитохромов С и С1 в ЭТЦ митохондрий по отношению к общему содержанию липидов и белков
$I_{750}/I_{1003}$	Содержание восстановленных цитохромов С и С1 в ЭТЦ митохондрий по отношению к содержанию Phe-остатков в белках, отражающему общее содержание белков
$I_{1126}/I_{1003}$	Содержание восстановленных цитохромов В-типа в ЭТЦ митохондрий по отношению к содержанию Phe-остатков в белках, отражающему общее содержание белков
$I_{750}/I_{1126}$	Содержание восстановленных цитохромов С и С1 по отношению к содержанию восстановленных цитохромов В-типа в ЭТЦ митохондрий
$I_{1660}/I_{1440}$	Содержание общего числа липидов по отношению к общему содержанию белков

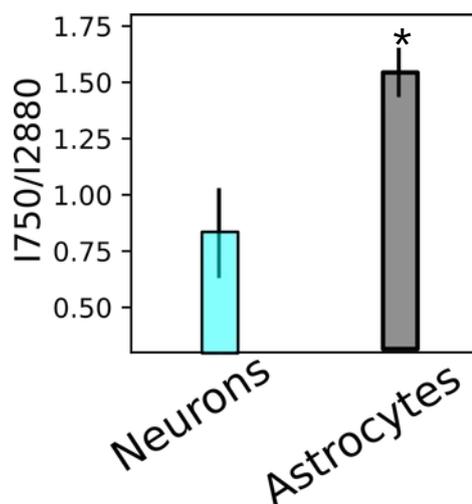
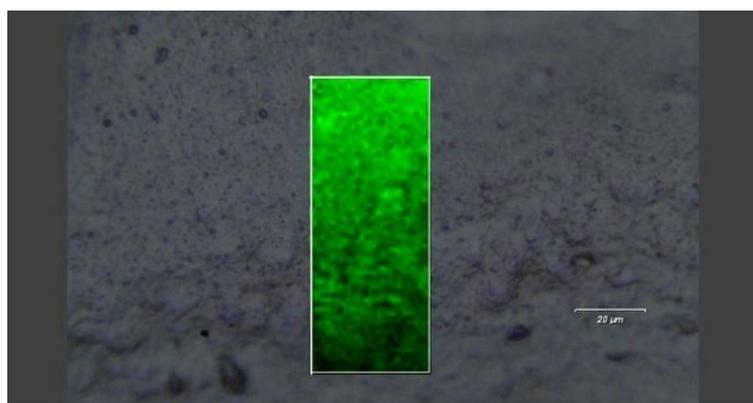


**Рис. 19 А и В** – КР-спектры, зарегистрированные от нейронов (**А**) и астроцитов (**Б**) гиппокампа срезов мозга мышей линий 5xFAD (с болезнью Альгеймера) (красный и фиолетовый спектры) и дикого типа (черные спектры) при длине волны возбуждения 532 нм и мощности 1 мВт на выходе из объектива (x20, NA 0.45). Длительность регистрации спектров составляла 30 с. Спектры сдвинуты друг относительно друга для удобства восприятия. Над пиками указаны положения максимумов: зеленым, коричневым и серым цветами обозначены положения максимумов пиков, связанных с колебаниями связей восстановленных цитохромов С и V-типов, липидов и белков, соответственно. Черным шрифтом показаны положения максимумов пиков, связанных с колебаниями связей в молекулах белков и липидов. Оранжевым цветом показаны положения максимумов пиков, характерных для С<sub>40</sub>-каротиноидов. Спектры приведены после вычитания базовой линии. По осям абсцисс – частотный сдвиг, см<sup>-1</sup>, по осям ординат – интенсивность КР, отн.ед.

**Рис. С** – относительное содержание восстановленных цитохромов С-типа по сравнению с общим содержанием липидов и белков в нейронах и астроцитах гиппокампа мышей дикого типа (столбики WT) и мышей линии 5xFAD. **Рис. D** – относительное содержание липидов по сравнению с белками в цитоплазме нейронов и астроцитов гиппокампа мышей дикого типа (WT) и 5xFAD. \*p<0.05 при сравнении дикого типа и линии 5xFAD; #p<0.05 при сравнении нейронов и астроцитов для мышей дикого типа (на рис.С)



**Рис. 20.** Относительное содержание восстановленных цитохромов С и В-типов (рисунки А и В, соответственно) в контроле и при действии окислителя HOSCN (0.2 мМ) на клетки.



**Рис. 21.** Слева: распределение интенсивности пика с положением максимума 1440 см<sup>-1</sup>, соответствующего содержанию липидов в области скопления нейронов и в нейропиле гиппокампа. Справа: относительное содержание восстановленных цитохромов С-типа в нейронах и астроцитах гиппокампа в срезах мозга мыши. \*p<0.05, непараметрический критерий Манна-Уитни.