

Влияние реактивной глии Бергмана на кратковременную синаптическую пластичность в моделях мозжечковой нейродегенерации, вызванной хронической активацией ChR2 и экспрессией мутантного атаксина-1

А.Н. Шуваев^{1,3}, О.С. Белозор¹, О.И. Можей², Д.А. Яковлева³, А.Н. Шуваев³, М.В. Смольникова^{1,4},
Е.А. Пожиленкова¹, С. Каспаров⁵, В.В. Салмин¹, А.Б. Салмина¹

¹ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого», Красноярск, Россия;

²ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет», Калининград, Россия;

³ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», Красноярск, Россия;

⁴Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», Красноярск, Россия;

⁵Университет Бристоля, Бристоль, Великобритания

Введение. Нарушение синаптической пластичности происходит на ранних стадиях нейродегенеративного процесса и потенциально обратимо. Исследование механизмов, ассоциированных с синаптической пластичностью при нейродегенеративных состояниях мозжечка, открывает возможности для исследования потенциальных терапевтических средств.

Цель работы — исследование влияния астроцитарного звена на парное облегчение (PPF) в синапсах коры мозжечка мышей с помощью комплекса методов иммуногистохимического, оптогенетического и электрофизиологического анализа.

Материалы и методы. Опыты проведены на 12-недельных мышах линии CD1. Модель астроглиоза мозжечка мыши создавали с помощью хронической активации светочувствительных каналов ChR2 в глии Бергмана и после экспрессии в ней мутантного атаксина-1. Для моделирования астроцитопосредованной нейродегенерации мозжечка мышам интракортикально вводили векторные конструкции AVV GFAP-ChR2-mKate с последующей хронической 4-дневной фотостимуляцией *in vivo* и LVV GFAP-ATXN1[Q85]-Flag без фотостимуляции. Мышам контрольных групп вводили физиологический раствор или LVV GFAP-ATXN1[Q2]-Flag. Динамику PPF-возбуждающих постсинаптических токов клеток Пуркинье регистрировали с помощью метода локальной фиксации потенциала. Экспрессию anti-GFAP, mKate и anti-Ataxin1 в коре мозжечка изучали методом иммуногистохимии.

Результаты. Для реактивной глии коры мозжечка после хронической фотостимуляции характерно повышение иммунореактивности анти-GFAP и изменение морфологии в виде извитости их отростков. У таких животных в синапсах клеток Пуркинье с параллельными волокнами коэффициент PPF был значительно увеличен из-за нарушения обратного захвата глутамата и перераздражения пресинапса этим нейромедиатором. Однако фотоактивация реактивной глии Бергмана приводила к резкому замедлению глутамат-глутаминового цикла и истощению пула глутамата на пресинапсе с последующим постепенным уменьшением коэффициента PPF. Подобные патологические механизмы найдены в нейродегенеративной модели с селективным поражением глии Бергмана мутантным атаксином-1.

Заключение. Астроциты оказывают влияние на кратковременную синаптическую пластичность, такую как PPF. При астроглиозе мозжечка нарушение PPF носит многоуровневый характер: изначально высокий уровень PPF значительно уменьшается после активации глии Бергмана, что связано с нарушением обратного захвата глутамата реактивной глией.

Ключевые слова: кратковременная синаптическая пластичность; PPF; астроглиоз; спиноцереbellарная атаксия 1-го типа; обратный захват глутамата.

Источник финансирования. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 17-54-10005 КО_а и Программы 5/100 в ФГАОУ ВО «БФУ им. И. Канта».

Адрес для корреспонденции: 660022, Россия, Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1. ФГБОУ ВО КГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого. E-mail: shuvaevanton@hotmail.com. Шуваев А.Н.

Для цитирования: Шуваев А.Н., Белозор О.С., Можей О.И., Яковлева Д.А., Шуваев А.Н., Смольникова М.В., Пожиленкова Е.А., Каспаров С., Салмин В.В., Салмина А.Б. Влияние реактивной глии Бергмана на кратковременную синаптическую пластичность в моделях мозжечковой нейродегенерации, вызванной хронической активацией ChR2 и экспрессией мутантного атаксина-1. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2021; 15(1): 51–58.

DOI: 10.25692/ACEN.2021.1.6

Поступила 25.02.2020 / Принята в печать 15.12.2020

The effect of reactive Bergmann glia on short-term synaptic plasticity in cerebellar neurodegenerative models, caused by chronic activation of ChR2 and expression of the mutant ataxin-1

Anton N. Shuvaev^{1,3}, Olga S. Belozor¹, Oleg I. Mozjei², Daria A. Yakovleva³, Andrey N. Shuvaev³, Marina V. Smolnikova^{1,4},
Elena A. Pozhilenkova¹, S. Kasparov⁵, Vladimir V. Salmin¹, Alla B. Salmina¹

¹*Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russia;*

²*Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia;*

³*Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia;*

⁴*Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russia;*

⁵*University of Bristol, Bristol, United Kingdom*

Introduction. Synaptic plasticity is impaired in the early stages of a neurodegenerative process but is potentially reversible. The study of mechanisms associated with synaptic plasticity in neurodegenerative cerebellar conditions has enabled the search for potential therapeutic agents.

This study **aimed** to investigate the effect of the astrocytic link on paired-pulse facilitation (PPF) in cerebellar cortical synapses of mice, using a set of immunohistochemical, optogenetic, and electrophysiological analysis methods.

Materials and methods. Experiments were conducted on 12-week-old CD-1 mice. The model of murine cerebellar astroglialosis was created using chronic activation of light-sensitive ChR2 channels in Bergmann glia and after they expressed the mutant ataxin-1. To model astrocyte-mediated neurodegeneration, these mice were intracortically administered AVV GFAP-ChR2-mKate vector constructions with subsequent chronic 4-day light stimulation *in vivo* and LVV GFAP-ATXN1[Q85]-Flag without light stimulation. Mice in the control group were administered normal saline or LVV GFAP-ATXN1[Q2]-Flag. Changes in the PPF-excitatory postsynaptic currents in Purkinje cells were registered using the patch-clamp technique. Immunohistochemistry was used to examine anti-GFAP, mKate, and anti-Ataxin1 expression in the cerebellar cortex.

Results. For the reactive glia in the cerebellar cortex after chronic photostimulation, increased anti-GFAP immune reactivity and morphology changes in the form of process tortuosity were common. In Purkinje cell synapses with parallel fibers in these animals, the PPF coefficient was significantly increased because of impaired glutamate reuptake and presynaptic overexcitation with this neuromediator. However, photoactivation of reactive Bergmann glia led to a sharp slowing down of the glutamate-glutamine cycle and glutamate pool depletion in the presynapse, with a subsequent gradual reduction in the PPF coefficient. Such pathological mechanisms were found in the neurodegenerative model with selective damage to Bergmann glia by the mutant ataxin-1.

Conclusion. Astrocytes affect short-term synaptic plasticity such as PPF. In cerebellar astroglialosis, the PPF disturbance is multilevel: the high baseline level of PPF is significantly reduced after Bergmann glial activation, which is related to impaired glutamate reuptake by reactive glial cells.

Keywords: short-term synaptic plasticity; PPF; astroglialosis; spinocerebellar ataxia type 1; glutamate reuptake.

Acknowledgments. The study was funded by the grant of the RFBR 17-54-10005 KO_a and Program 5/100 in Cant Baltic Federal University.

For correspondence: 660022, Russia, Krasnoyarsk, Partizana Zheleznyaka str., 1. Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University.
E-mail: shuvaevanton@hotmail.com. Shuvaev A.N.

For citation: Shuvaev A.N., Belozor O.S., Mozjei O.I., Yakovleva D.A., Shuvaev A.N., Smolnikova M.V., Pozhilenkova E.A., Kasparov S., Salmin V.V., Salmina A.B. [The effect of reactive Bergmann glia on short-term synaptic plasticity in cerebellar neurodegenerative models, caused by chronic activation of ChR2 and expression of the mutant ataxin-1]. *Annals of clinical and experimental neurology*. 2021; 15(1): 51–58. (In Russ.)

DOI: 10.25692/ACEN.2021.1.6

Received 25.02.2020 / Accepted 15.12.2020

Введение

Клетки Пуркинье (КП) являются центральными нейронами в отношении обработки афферентной информации, поступающей в мозжечок [1]. Интеграция полученной информации приводит к формированию памяти и обучения новым двигательным навыкам [2]. Основным механизмом памяти является синаптическая пластичность — изменение силы (усиление или ослабление) синаптической передачи [3].

Одна из форм кратковременной синаптической пластичности — парное облегчение (PPF) — имеет решающее значение для обработки информации в сложных нейронных цепях, к которым относятся и КП с их контактами [5]. Во время прохождения импульса по пресинаптической мембране открываются потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы, что приводит к увеличению содержания внутриклеточного кальция в цитозоле клетки и запуску экзоцитоза синаптических везикул, заполненных нейромедиатором. Если в ближайшее время (во интервале до 100 мс) приходит повторный импульс, то концентрация Ca^{2+} не успевает вернуться к исходным значениям и превосходит таковую, полученную после первого импульса. Это приводит к большему высвобождению нейромедиатора из пресинаптических везикул [5]. Таким образом, считается, что механизмы, лежащие в основе PPF, протекают исключительно на пресинапсе [6].

С другой стороны, важным аспектом накопления нейромедиатора в синаптических везикулах является глутамат-глутаминовый цикл, который протекает в астроцитах. Замедление цикла на любом из его этапов вызывает уменьшение пула нейромедиатора, готового высвободиться из пресинаптической мембраны [7].

Глия Бергмана (ГБ) — это высокоспециализированные астроциты, располагающиеся в коре мозжечка. ГБ тесным образом связана с главными нейронами этой области — КП. В норме ГБ играет ключевую роль в обратном захвате глутамата посредством транспортёров возбуждающих аминокислот и тем самым препятствует развитию эксайтотоксичности [8]. При нейродегенеративном процессе обратный захват глутамата ГБ нарушается, что негативно влияет на функции нейронов, в том числе на синаптическую пластичность [9, 10].

Все вышесказанное подчеркивает необходимость исследования вклада астроцитов в нарушение синаптической пластичности при конкретной нейродегенерации мозжечка. К примеру, при одной из самых распространённых патологий в этой области — спиноцеребеллярной атаксии 1-го типа — было показано, что мутантный белок Атаксин 1 вызывает патологические изменения не только в КП, но и в глии коры мозжечка [11, 12]. Нами ранее показано, что при модельных спиноцеребеллярных атаксиях 1-го типа у мыши нарушается синаптическая пластичность [13]. Однако связь реактивных астроцитов при данном заболевании с нарушением синаптической пластичности не исследована.

Цель настоящей работы — изучение вклада реактивной ГБ в кратковременную синаптическую пластичность (PPF) в моделях мозжечковой нейродегенерации, вызванной хронической активацией ChR2 и экспрессией мутантного атаксина-1.

Материалы и методы

Производство AVV- и LVV-конструкций

Для достижения большого уровня экспрессии AVV- и LVV-векторов был использован GFAP-промотор [14]. Метод конструирования AVV GFAP-ChR2-mKate и LVV описаны ранее [15–17]. Векторы нарабатывались в культурах НЕК 293 с последующим высвобождением частиц с помощью сонификации. Для концентрации векторов использовали ультрацентрифугу «OptimaX» («Beckmann Coulter»). Аликвотированные образцы хранили при $-80^{\circ}C$ в течение 6 мес.

Моделирование нейродегенерации

Опыты проведены на 12-недельных мышах линии CD1. У мышей 1-й опытной группы моделировали нейродегенерацию путём интракорткального введения 10 мкл AVV GFAP-ChR2-mKate ($3,7 \times 10^7$ ЕД/мл) в червь мозжечка (возраст p84) с последующей 4-дневной фотостимуляцией заражённой области. Применяли паттерны голубого света 20/20 мс продолжительностью 60 с и с перерывами на 60 с в течение 4 дней. Для лучшего покрытия светом коры мозжечка мы расширили перфорационное отверстие в костях черепа до $2,5 \times 2,5$ мм и зафиксировали светодиод непосредственно над отверстием. Мышам 1-й контрольной группы после введения того же количества AVV GFAP-ChR2-mKate фотостимуляцию не проводили. Для исключения токсического влияния AVV данные сравнивали с показателями животных, получивших инъекцию фосфатно-солевого буфера (PBS).

У мышей 2-й опытной группы моделировали нейродегенерацию путём интракорткального введения 3 мкл LVV GFAP-ATXN1[Q85]-Flag ($6,8 \times 10^9$ ЕД/мл) в червь мозжечка (возраст p21). Мышам 2-й контрольной группы интракорткально в червь мозжечка инъецировали 3 мкл LVV GFAP-ATXN1[Q2]-Flag ($6,5 \times 10^9$ ЕД/мл). Исследования проводили после 9 нед экспрессии LVV в коре мозжечка (возраст p84). Корректность введения конструкций оценивали по флуоресценции mKate и anti-Flag методом иммуногистохимии. Для нейрофизиологических исследований проводили котрансфекцию LVV GFAP-ATXN1[Q2]-Flag/AVV GFAP-ChR2-mKate или LVV GFAP-ATXN1[Q85]-Flag/AVV GFAP-ChR2-mKate.

Исследования выполняли после утверждения заявки и протокола на использование лабораторных животных на заседании биоэтической комиссии по работе с животными при локальном этическом комитете КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (выписка из протокола № 4 от 15.11.2017 г.).

Иммуногистохимическое исследование

Экспрессию маркёров ГБ исследовали с использованием метода непрямой иммуногистохимии для свободно плавающих срезов [18].

Полученные с помощью микротомы «ThermoScientific Microm HM 650» срезы толщиной 50 мкм промывали в PBS («Sigma»), блокировали 3% бычьим сывороточным альбумином («Sigma») в PBS и 1% Triton X-100 в течение 1 ч при комнатной температуре, затем инкубировали в течение ночи с первичными антителами к GFAP и ataxin-1 (все 1 : 1000; «Abcam») с 3% бычьим сывороточным альбумином в PBS и 0,2% Triton X-100 при $4^{\circ}C$.

После инкубации с первичными антителами срезы промывали в PBS, инкубировали со вторичными антителами Goat anti-Rabbit Alexa Fluor488 1 : 1000 («Abcam»), Goat anti-Chicken Alexa Fluor647 1 : 1000 («Abcam») в течение 2 ч при комнатной температуре, затем промывали в PBS. Наносили монтирующую жидкость Fluoroshield Mounting Medium with DAPI («Abcam»), накрывали срез покровным стеклом и микроскопировали с использованием конфокального микроскопа «Olympus FV 10i».

Метод локальной фиксации потенциала

Подготовку переживающих срезов мозжечка (250 мкм) и регистрацию токов в режиме «whole cell» проводили согласно ранее описанным протоколам [13].

После внутрибрюшной анестезии хлоралгидратом (400 мг/кг массы тела) мышь декапитировали. Нарезку мозга осуществляли в ледяном растворе Рингера (234 мМ сахарозы, 26 мМ NaHCO₃, 2,5 мМ KCl, 1,25 мМ NaH₂PO₄, 11 мМ глюкозы, 10 мМ MgSO₄ и 0,5 мМ CaCl₂, 0,5) pH 7,4, проводили оксигенацию смесью 95% O₂ и 5% CO₂. Срезы изготавливали с помощью вибротома («Thermo Scientific»; «Microtom CU65»). Эксперименты проводили в омывающем срезы внеклеточном растворе (125 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl, 2 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, 1,25 мМ NaH₂PO₄, 26 мМ NaHCO₃, 10 мМ D-глюкоза, 0,05–0,1 мМ пикротоксин), осуществляли оксигенацию смесью 95% O₂ и 5% CO₂ при комнатной температуре. Внутриклеточный раствор для фиксации потенциала клеток содержал 140 мМ Cs-глюконат, 8 мМ KCl, 10 мМ HEPES, 1 мМ MgCl₂, 2 мМ MgATP, 0,4 мМ NaGTP, и 0,4 мМ EGTA (pH 7,3).

Анализ данных проводили с помощью усилителя «pClamp10» («Molecular Devices») в программах «Pachmaster» («НЕКА») и «Clampfit 10.5» («Axon Instruments»). Потенциал КП фиксировали на –70 мВ для записи возбуждающих постсинаптических токов (ВПСТ). Повторное раздражение пресинаптических везикул через 50 мс производили для записи PPF.

PPF вычисляли по формуле:

$$PPF = \frac{2\text{-я амплитуда ВПСТ}}{1\text{-я амплитуда ВПСТ}}$$

Для записи астроцит-опосредованных эффектов на PPF ВПСТ записывали каждые 3 с. После записи стабильного уровня PPF в течение 3 мин паттерн вспышек голубого света (20/20 с в течение 60 с) был применён для стимуляции ГБ, экспрессирующей ChR2. Последующая регистрация PPF производилась в течение 4 мин. Мы проверяли mKate флюоресценцию до начала записи PPF для поиска зон мозжечка, экспрессирующих ChR2.

Статистические методы и обработка данных

В экспериментах было использовано не менее 4 животных в каждой группе, до 15 независимых измерений на группу. Для анализа динамики PPF производилось нормирование данного показателя к уровню до фотостимуляции. На графиках представлены усреднённые показатели PPF за 1 мин (20 измерений по каждой записи). Для нахождения статистически значимых различий использовали весь массив данных, полученных за 1 мин. Количество записей токов в каждой выборке отвечало нормальному распределению (оценка по критерию Колмогорова–Смирнова). Стати-

стический анализ различий между группами проводили с помощью непарного *t*-критерия Стьюдента. Различия принимали значимыми при $p \leq 0,05$. Результаты представлены в виде $M \pm m$, где M — среднее значение, m — стандартная ошибка среднего, p — уровень значимости.

Результаты

После введения AVV GFAP-ChR2-mKate без фотостимуляции в кору мозжечка на 4-е сутки наблюдалась mKate-флюоресценция (красный цвет) радиальных отростков ГБ, локализуемая с anti-GFAP-сигналом (фиолетовый цвет) (рис. 1, А, верхняя часть). Хроническая 4-дневная фотостимуляция данной области вызывала усиление mKate-флюоресценции и изменение морфологии отростков ГБ в виде их извитости (рис. 1, А, нижняя часть).

Исследование электрофизиологических свойств КП при раздражении пресинаптических везикул выявило увеличение коэффициента PPF в группе животных с хронической 4-дневной фотостимуляцией по сравнению с контролем ($1,57 \pm 0,01$ и $1,53 \pm 0,02$ соответственно; $p = 0,004$; рис. 1, В).

Мы применили острое одномоментное раздражение светом переживающих срезов во время записи PPF для оценки динамики этого показателя при активированной ГБ, экспрессирующей ChR2. Сам свет не оказывал значимого эффекта после его 1-минутного применения во время записи PPF у животных, инъецированных PBS. К 5-й минуте (точка 2) после активации не замечено значимых отклонений, и PPF составлял $100,6 \pm 1,3\%$ к контрольному значению (точка 1); $p = 0,66$. Эти данные сопоставимы с таковыми без применения света ($99,3 \pm 1,2\%$; $p = 0,49$; рис. 1, С). В группе животных, экспрессирующих ChR2, без хронической фотостимуляции к 5-й минуте PPF значительно увеличивался и составлял $104,0 \pm 1,1\%$ ($p = 0,002$; рис. 1, D). У животных после хронической фотостимуляции острая активация ГБ вызывала противоположный эффект — значительную депрессию PPF к 4-й минуте ($97,5 \pm 1,1\%$; $p = 0,04$). К 5-й минуте данный показатель значимо отличался от такового у животных, не подвергшихся хронической фотостимуляции ($p = 0,0013$; рис. 1, D).

Выявленные изменения PPF в оптогенетической модели астроглиоза могут быть связаны, в первую очередь, с нарушением обратного захвата глутамата в синапсе между пресинаптическими везикулами и КП [19]. Для моделирования данного состояния мы исследовали динамику PPF у животных, экспрессирующих ChR2, в присутствии 500 нМ блокатора транспортера возбуждающих аминокислот (ТВОА).

В присутствии ТВОА коэффициент PPF был значительно увеличен по сравнению с контролем ($1,85 \pm 0,02$ и $1,53 \pm 0,02$ соответственно; $p = 4,1 \times 10^{-7}$; рис. 2, А). Одноминутная фотостимуляция приводила к постепенному снижению PPF, наиболее выраженному к 5-й минуте ($96,8 \pm 0,88\%$; $p = 0,047$). В этой временной точке нормированные показатели PPF с добавлением и без добавления ТВОА значимо различались ($p = 4,1 \times 10^{-6}$; рис. 2, В).

В модели селективного астроглиоза, вызванного экспрессией мутантного атаксина-1 в ГБ, мы обнаружили схожие патогенетические процессы. После введения LVV GFAP-Ataxin1[Q2]-Flag и LVV GFAP-Ataxin1[Q85]-Flag в кору мозжечка на 9-й неделе наблюдалось равномерное свечение anti-Ataxin1 в зоне радиальных отростков ГБ,

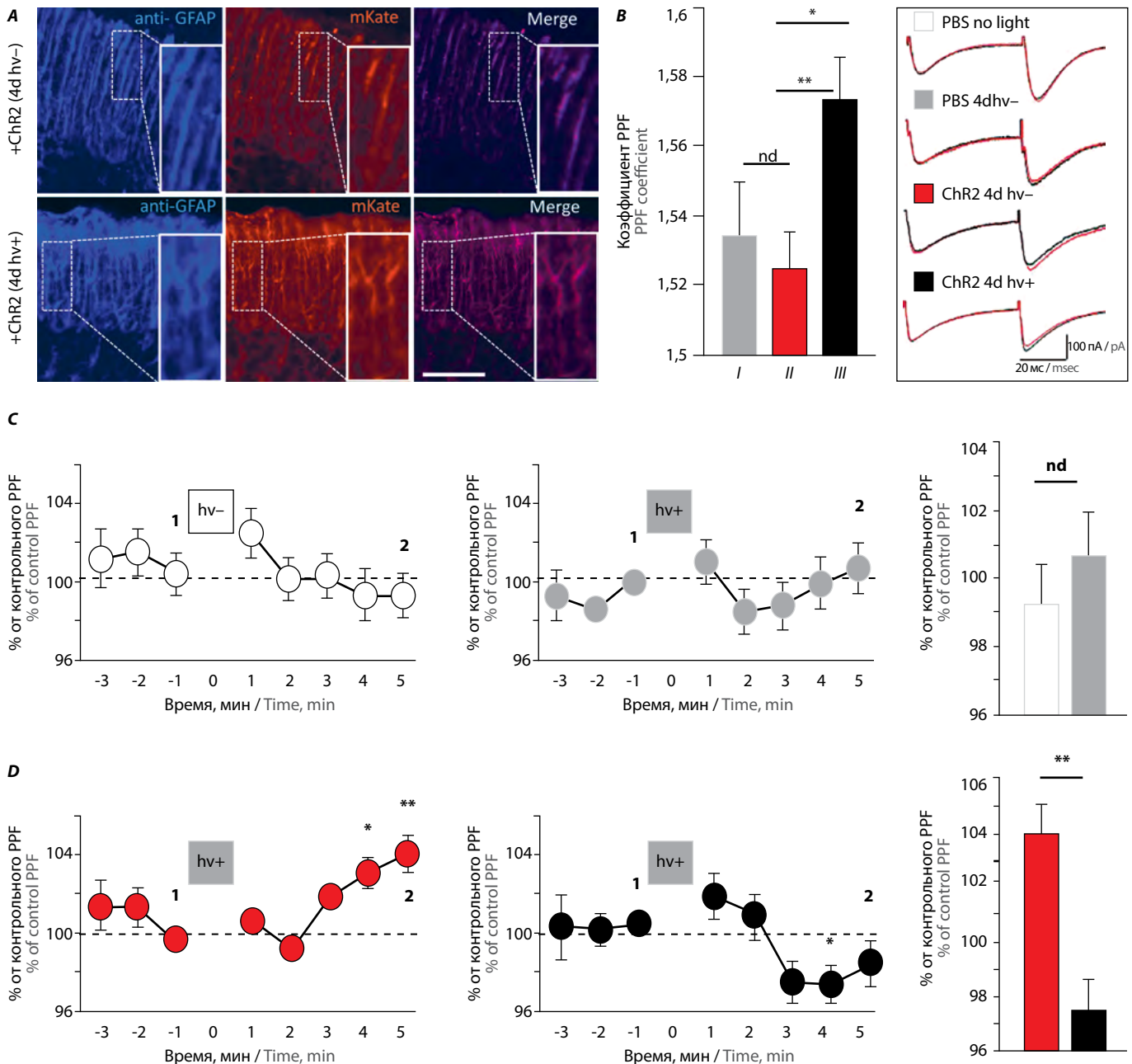


Рис. 1. Хроническое раздражение ChR2 ГБ вызывает нарушение PPF.

A — конфокальное изображение ГБ, экспрессирующей ChR2, меченной anti-GFAP (фиолетовый цвет) и mKate (красный цвет). Без хронической фотостимуляции (4d hv-) ГБ имеет прямую радиальную исчерченность. Четырёхдневная хроническая фотостимуляция (4d hv+) приводит к появлению извитых отростков ГБ. Шкала 100 мкм.

B: *I* — усреднённое значение PPF. Репрезентативные кривые ВПСТ до (*II*) и после (*III*) острой фотостимуляции.

C — графики флуктуации PPF у животных, инъецированных PBS, без фотостимуляции (слева) и в ответ на острую фотостимуляцию (в центре). Справа — усреднённый график нормированных PPF в точке 2.

D — графики флуктуации PPF у животных, инъецированных ChR2, в ответ на острую фотостимуляцию без (слева) и после (в центре) хронической фотостимуляции. Справа — усреднённый график нормированных амплитуд в точке 2.

Fig. 1. Chronic irritation of ChR2 in Bergmann glia causes impaired PPF.

A — confocal image of a Bergmann glia expressing ChR2, labeled with anti-GFAP (purple) and mKate (red). Without chronic photostimulation (4d hv-), a Bergmann glial cell has a radially striated appearance. Four-day chronic photostimulation (4d hv+) leads to tortuosity of the Bergmann glial cell processes. The scale is 100 microns.

B: *I* — graph of averaged PPF values. Representative curves of excitatory postsynaptic currents (EPSCs) are shown on the right, before (*II*) and after (*III*) acute photostimulation.

C — graphs of PPF fluctuation in animals injected with PBS, without photostimulation (left) and in response to acute photostimulation (at the middle). On the right is the graph showing averaged normalized PPF at point 2.

D — graphs of PPF fluctuation in animals injected with ChR2, in response to acute photostimulation, with no (left) and after (at the middle) chronic photostimulation. On the right is the graph showing normalized amplitudes at point 2.

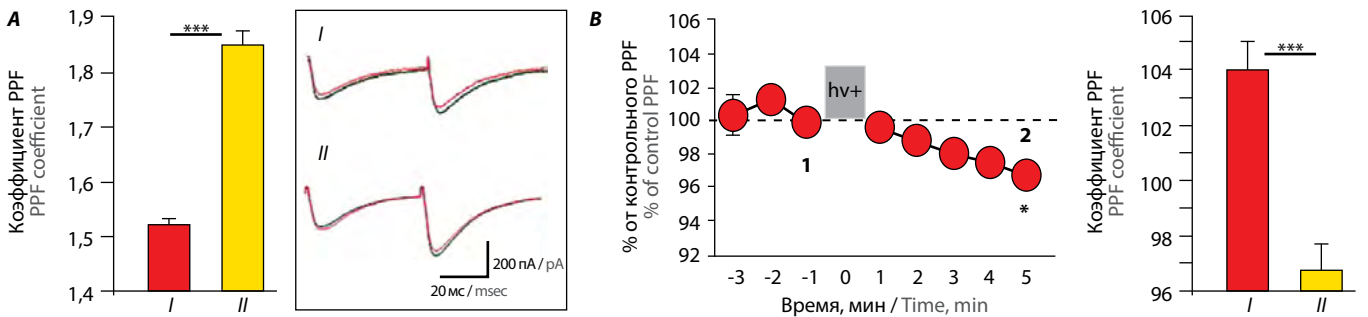


Рис. 2. Уменьшение обратного захвата глутамата ГБ в присутствии 500 нМ ТВОА приводит к нарушению PPF.
A — график усреднённых значений PPF до (*I*) и после (*II*) добавления ТВОА. Репрезентативные кривые ВПСТ показаны справа до (чёрные кривые) и после (красные кривые) острой фотостимуляции.
B: слева — график флуктуации PPF у животных, инъецированных ChR2, в ответ на острую фотостимуляцию в присутствии 500 нМ ТВОА; справа — усреднённый график нормированных амплитуд в точке 2.

Fig. 2. A decrease in glutamate reuptake by Bergmann glial cells in the presence of 500 nM of excitatory amino acid transporter leads to PPF disturbances.
A — graph of averaged PPF values before (*I*) and after (*II*) adding EAAT. Representative curves of EPSCs are shown on the right, before (black curves) and after (red curves) acute photostimulation.
B — on the left is the graph of PPF fluctuation in animals injected with ChR2, in response to acute photostimulation and in the presence of 500 nM of EAAT. The averaged graph of normalized amplitudes at point 2 is on the right.

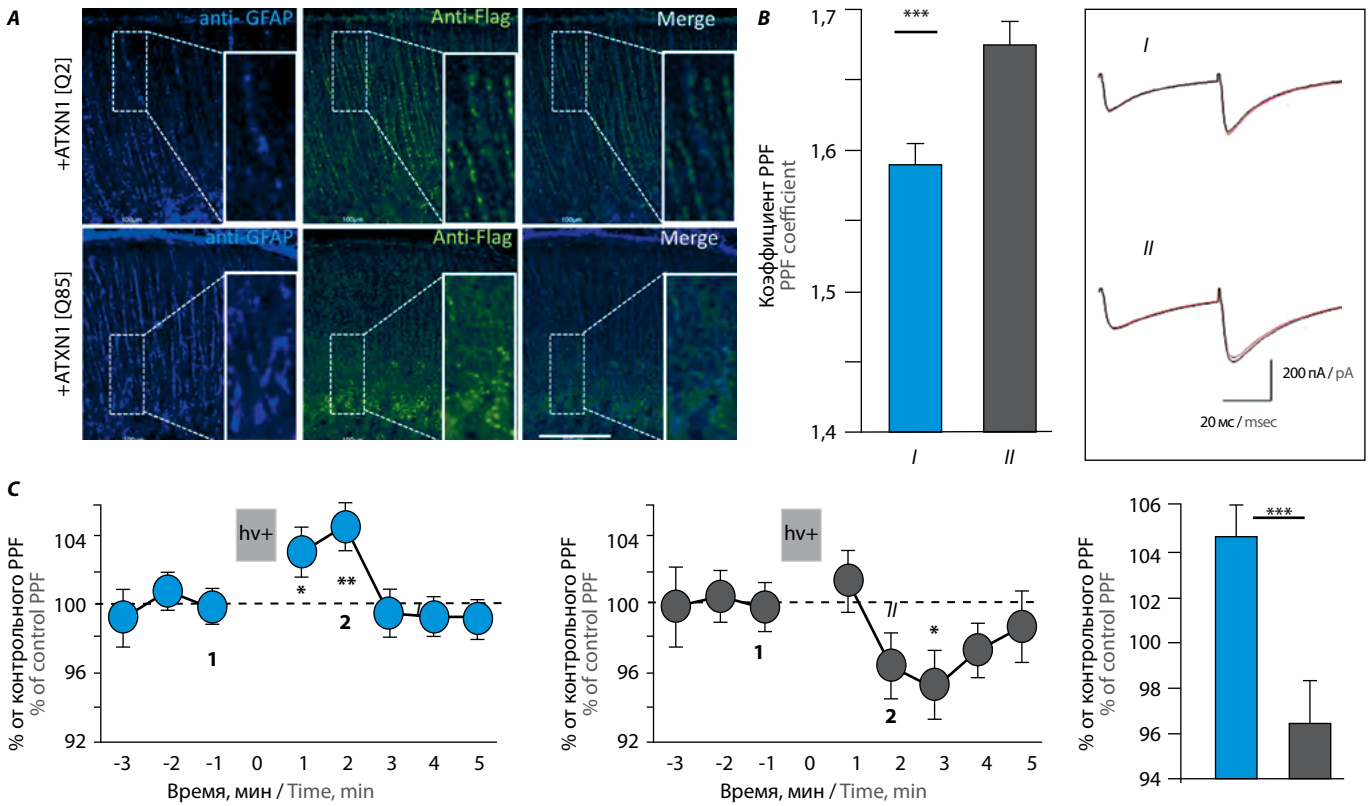


Рис. 3. Экспрессия мутантного атаксина-1 в ГБ вызывает нарушение PPF.
A — конфокальное изображение ГБ после введения PBS и экспрессирующей нормальной атаксин-1 (ATXN1[Q2]) и мутантный атаксин-1 (ATXN1[Q85]), меченные anti-GFAP (фиолетовый) и anti-Ataxin1 (зелёный). Шкала 100 мкм.
B — график усреднённых значений PPF животных, экспрессирующих в ГБ ATXN1[Q2]/ChR2 (*I*) и ATXN1[Q85]/ChR2 (*II*). Репрезентативные кривые ВПСТ показаны справа до (чёрные кривые) и после (красные кривые) острой фотостимуляции.
C — графики флуктуации PPF у данных животных в ответ на острую фотостимуляцию. Справа — усреднённый график нормированных амплитуд в точке 2.

Fig. 3. Expression of mutant ataxin-1 in Bergmann glial cells causes PPF disturbances.
A — confocal image of Bergmann glia after PBS administration, expressing normal ataxin-1 (ATXN1[Q2]) and mutant ataxin-1 (ATXN1[Q85]), labeled with anti-GFAP (purple) and anti-Ataxin1 (green). The scale is 100 microns.
B — graph of averaged PPF values of animals expressing ATXN1[Q2]/ChR2 (*I*) and ATXN1[Q85]/ChR2 (*II*) in GB. Representative curves of EPSCs are shown on the right, before (black curves) and after (red curves) acute photostimulation.
C — graph of PPF fluctuation in animal data in response to acute photostimulation. The averaged graph of normalized amplitudes at point 2 is on the right.

меченных anti-GFAP. Интенсивность anti-GFAP сигнала в срезах, экспрессирующих LVV GFAP-Ataxin1[Q85]-Flag, была усилена (рис. 3, А). Для исследования электрофизиологических свойств КП и активации ГБ производилась ко-трансфекция LVV GFAP-Ataxin1[Q2]-Flag или LVV GFAP-Ataxin1[Q85]-Flag совместно с AVV GFAP-ChR2-mKate.

Исследование электрофизиологических свойств КП при раздражении пресинаптических везикул выявило значительное увеличение коэффициента PPF в группе животных, экспрессирующих мутантный атаксин-1, по сравнению с контролем ($1,68 \pm 0,02$ и $1,59 \pm 0,02$ соответственно; $p = 0,00013$; рис. 3, В). Острое одноминутное раздражение светом переживающих срезов, экспрессирующих ATXN1[Q2]/ChR2, вызывало увеличение PPF относительно пресинаптического уровня с максимальным эффектом на 2-й минуте ($104,7 \pm 1,4\%$; $p = 0,006$; рис. 3, С, Л). Острая фотостимуляция срезов, экспрессирующих ATXN1[Q85]/ChR2, приводила к уменьшению PPF с минимальным эффектом на 3-й минуте ($95,3 \pm 2,0$; $p = 0,029$; рис. 3, С, И). На 2-й минуте после острой фотоактивации нормированные коэффициенты статистически различались у данных двух групп ($p = 0,0007$; рис. 3, С, III).

Обсуждение

Для исследования влияния нормальной и реактивной ГБ на кратковременную синаптическую пластичность (PPF) были созданы две модели селективного астроглиоза посредством применения неспецифического (хроническая фотоактивация ChR2) и специфического (экспрессия мутантного атаксина-1) раздражителей астроцитов коры мозжечка. Эти модели позволяют четко обозначить влияние астроцита на пресинаптическую мембрану, в которой протекает PPF.

Высокая экспрессия векторных конструкций была обеспечена включением промотера GFAP, специфичного для глияльных клеток [14]. Выявлено, что реактивация ГБ связана с усилением anti-GFAP-сигнала и изменением морфологии её отростков. В ГБ, экспрессирующей мутантный атаксин-1, также был усилен anti-GFAP-сигнал. Необходимо дальнейшее изучение морфологии ГБ для более подробного описания глиоза, вызванного хронической активацией ChR2 и экспрессией мутантного атаксина-1.

PPF считается событием, протекающим всецело на пресинаптической мембране [6]. Однако было показано, что при PPF изменение амплитуды второго ответа в паре свя-

зано также с пролонгированием времени восстановления ВПСТ [12]. Время восстановления ВПСТ отражает период пребывания нейромедиатора в синаптической щели и зависит от обратного его захвата астроцитами [20]. Реактивные астроциты теряют способность адекватно удалять глутамат из синаптической щели. В нашей работе мы показали, что реактивная ГБ способствует увеличению PPF вследствие излишнего присутствия нейромедиатора в синаптической щели и перераздражения глутаматных рецепторов на пресинаптической мембране с последующей её деполаризацией. Однако во время активации нормальной ГБ происходит повышение обратного захвата нейромедиатора и усиление глутамат-глутаминового цикла, что приводит, в конечном итоге, к увеличению уровня глутамата в синаптических везикулах на пресинапсе и нарастанию со временем PPF. Реактивная глия теряет способность захватывать глутамат из синаптической щели и имеет противоположный эффект — со временем происходит уменьшение PPF. Данный феномен связан, наиболее вероятно, с нарушенным Na^+ градиента и неспособностью быстро удалить Na^+ и Ca^{2+} , поступающие в цитозоль ГБ через ChR2 во время острой фотостимуляции.

При сравнении двух моделей астроглиоза мозжечка мы выявили идентичное влияние реактивной ГБ на PPF, что указывает на схожие патогенетические процессы в синапсах при различных нейродегенеративных состояниях. Развитие эксайтотоксичности модулирует синаптическую пластичность, тем самым внося функциональные нарушения нейронной сети мозжечка. Данное состояние не связано с органическим поражением структур нейронов и может быть устранено посредством усиления клиренса нейромедиатора из синаптической щели.

Заключение

При нейродегенеративных заболеваниях мозжечка нарушение кратковременной синаптической пластичности, такой как PPF, в синапсах КП носит неспецифический характер и связано с угнетением обратного захвата глутамата ГБ. Патогенетические процессы в модели с хроническим раздражением ChR2 и в модели селективной экспрессии мутантного атаксина-1 в ГБ схожи. Изначально высокий уровень PPF у таких животных уменьшается при активации реактивной ГБ, что диаметрально противоположно событиям, протекающим в нормальной ГБ. Изучение нарушения механизмов развития синаптической пластичности в нейрональных клетках мозжечка является необходимым элементом стратегии терапии нейродегенеративных состояний различного генеза.

Список литературы / References

1. Goodlett C.R., Mittleman G. The Cerebellum. In: Conn P.M. (ed.). *Conn's Translational Neuroscience*. London, 2016: 191–212. DOI: 10.1016/C2014-0-02630-5.
2. Tyrrell T., Willshaw D. Cerebellar cortex: its simulation and the relevance of Marr's theory. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1992; 336(1277): 239–257. DOI: 10.1098/rstb.1992.0059. PMID: 1353267.
3. Hughes J.R. Post-tetanic potentiation. *Physiol Rev*. 1958; 38(1): 91–113. DOI: 10.1152/physrev.1958.38.1.91. PMID 13505117.
4. Regehr W.G. Short-term presynaptic plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012; 4(7): a005702. DOI: 10.1101/cshperspect.a005702. PMID: 22751149.
5. Díaz-Rojas F., Sakaba T., Kawaguchi S.Y. Ca^{2+} current facilitation determines short-term facilitation at inhibitory synapses between cerebellar Purkinje cells. *J Physiol*. 2015; 593(22): 4889–4904. DOI: 10.1113/JP270704. PMID: 26337248.
6. Zucker R.S., Regehr W.G. Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol*. 2002; 64: 355–405. DOI: 10.1146/annurev.physiol.64.092501.114547. PMID 11826273.

7. Tani H., Dulla C.G., Farzampour Z. et al. A local glutamate-glutamine cycle sustains synaptic excitatory transmitter release. *Neuron*. 2014; 81(4): 888–900. DOI: 10.1016/j.neuron.2013.12.026. PMID: 24559677.
8. Lee A., Anderson A.R., Beasley S.J. et al. A new splice variant of the glutamate-aspartate transporter: cloning and immunolocalization of GLAST1c in rat, pig and human brains. *J Chem Neuroanat*. 2012; 43(1): 52–63. DOI: 10.1016/j.jchemneu.2011.10.005. PMID: 22026960.
9. Valtcheva S., Venance L. Control of long-term plasticity by glutamate transporters. *Front Synaptic Neurosci*. 2019; 11: 10. DOI: 10.3389/fnsyn.2019.00010. PMID: 31024287.
10. Belozor O.S., Yakovleva D.A., Potapenko I.V. et al. Extracellular S100 β disrupts Bergman glia morphology and synaptic transmission in cerebellar Purkinje cells. *Brain Sci*. 2019; 9(4): pii: E80. DOI: 10.3390/brainsci9040080. PMID: 31013844.
11. Klement I.A., Skinner P.J., Kaytor M.D. et al. Ataxin-1 nuclear localization and aggregation: role in polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic

- mice. *Cell*. 1998; 95(1): 41–53. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81781-x. PMID: 9778246.
12. Zinebi F, Russell R.T, McKernan M., Shinnick-Gallagher P. Comparison of paired-pulse facilitation of AMPA and NMDA synaptic currents in the lateral amygdala. *Synapse*. 2001; 42(2): 115–127. DOI: 10.1002/syn.1107. PMID: 11574948.
13. Shuvaev A.N., Hosoi N., Sato Y. et al. Progressive impairment of cerebellar mGluR signalling and its therapeutic potential for cerebellar ataxia in spinocerebellar ataxia type 1 model mice. *J Physiol*. 2017; 595(1): 141–164. DOI: 10.1113/JP272950. PMID: 27440721.
14. Liu B., Paton J.F., Kasparov S. Viral vectors based on bidirectional cell-specific mammalian promoters and transcriptional amplification strategy for use in vitro and in vivo. *BMC Biotechnol*. 2008; 8: 49. DOI: 10.1186/1472-6750-8-49. PMID: 18485188.
15. Gourine A.V., Kasymov V., Marina N. et al. Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. *Science*. 2010; 329(5991): 571–575. DOI: 10.1126/science.1190721. PMID: 20647426.

Информация об авторах

Шуваев Антон Николаевич — к.м.н., с.н.с. НИИ молекулярной медицины и патобиохимии ФГБОУ КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, Россия

Белозор Ольга Сергеевна — ассистент каф. биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, Россия

Можей Олег Игоревич — аспирант Института живых систем ФГАОУ ВО БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия

Яковлева Дарья Андреевна — студент биологического факультета ФГАОУ ВО СФУ, Красноярск, Россия

Шуваев Андрей Николаевич — к.ф.-м.н., зав. каф. медико-биологических систем и комплексов ФГАОУ ВО СФУ, Красноярск, Россия

Смольникова Марина Викторовна — к.б.н., н.с. НИИ медицинских проблем Севера ФГБНУ КНЦ СО РАН, Красноярск, Россия

Пожиленкова Елена Анатольевна — к.б.н., исполнительный директор НИИ молекулярной медицины и патобиохимии ФГБОУ КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, Россия

Каспаров Сергей — проф. каф. физиологии, фармакологии и нейронаук Университета Бристолья, Великобритания

Салмин Владимир Валерьевич — д.ф.-м.н., зав. каф. медицинской и биологической физики ФГБОУ КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, Россия

Салмина Алла Борисовна — д.м.н., проф., зав. каф. биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, рук. НИИ молекулярной медицины и патобиохимии ФГБОУ КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, Россия

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

16. Figueiredo M., Lane S., Stout R.F. Jr. et al. Comparative analysis of optogenetic actuators in cultured astrocytes. *Cell Calcium*. 2014; 56(3): 208–214. DOI: 10.1016/j.ceca.2014.07.007. PMID: 25109549.
17. Hewinson J., Paton J.F., Kasparov S. Viral gene delivery: optimized protocol for production of high titer lentiviral vectors. *Methods Mol Biol*. 2013; 998: 65–75. DOI: 10.1007/978-1-62703-351-0_5. PMID: 23529421.
18. Han C.L., Zhao X.M., Liu Y.P. et al. Gene expression profiling of two epilepsy models reveals the ECM/Integrin signaling pathway is involved in epileptogenesis. *Neuroscience*. 2019; 396: 187–199. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2018.10.021. PMID: 30452975.
19. Satake S., Inoue T., Imoto K. Paired-pulse facilitation of multivesicular release and intersynaptic spillover of glutamate at rat cerebellar granule cell-interneuron synapses. *J Physiol*. 2012; 590(22): 5653–5675. DOI: 10.1113/jphysiol.2012.234070. PMID: 22930264.
20. Armbruster M., Hanson E., Dulla C.G. Glutamate clearance is locally modulated by presynaptic neuronal activity in the cerebral cortex. *J Neurosci*. 2016; 36(40): 10404–10415. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2066-16.2016. PMID: 27707974.

Information about the authors

Anton N. Shuvaev — PhD (Med.), senior researcher, Research Institute of Molecular Medicine and Pathological Biochemistry, Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russia

Olga S. Belozor — assistant, Department of biological chemistry with courses of medical, pharmaceutical and toxicological chemistry, Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russia

Oleg I. Mozhei — postgraduate student, Institute of Living Systems, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

Daria A. Yakovleva — student, Biological faculty, Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia

Andrey N. Shuvaev — PhD (Phys.), Head, Department of medical and biological systems and complexes, Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia

Marina V. Smolnikova — PhD (Biol.), researcher, Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russia

Elena A. Pozhilenkova — PhD (Biol.), assistant, Department of biological chemistry with courses of medical, pharmaceutical and toxicological chemistry; director, Research Institute of Molecular Medicine and Pathological Biochemistry, Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russia

Sergey Kasparov — Prof., Department of physiology, pharmacology and neuroscience, Bristol University, Great Britain

Vladimir V. Salmin — D. Sci. (Phys.), assistant professor, Head, Department of medical and biological physics, Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russia

Alla B. Salmina — D. Sci. (Med.), Prof., Head, Department of biological chemistry with courses of medical, pharmaceutical and toxicological chemistry; Head, Research Institute of Molecular Medicine and Pathological Biochemistry, Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russia.

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.