

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623261>

Электронный ключ к тайнам астроцитов

В.В. Рогачевский*, Е.А. Шишкова

Институт биофизики клетки Российской академии наук, Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской Академии наук», Пушкино, Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Перисинаптические отростки астроцитов (РАР), участвуя в работе трёхчастного синапса, отвечают на его активацию локальной деполяризацией с высвобождением ионов Ca^{2+} из внутриклеточных депо в узлах ветвления отростков и проявляют локальные или генерализованные кальциевые события [1, 2]. Результаты этих электрофизиологических и имиджинговых экспериментов предполагают наличие в периферических отростках астроцитов депо ионов Ca^{2+} . Однако по результатам первых электронно-микроскопических исследований сформировалось устойчивое мнение, что терминальные отростки астроцитов (ТАР), контактирующие с синапсом и лежащие в непосредственной близости к интерфейсу «аксон–шипик», лишены каких-либо органелл, включая основное депо ионов Ca^{2+} астроцитов — цистерны гладкого эндоплазматического ретикулума (sER) [3]. По этой же причине существует серьезный скептицизм и в отношении Ca^{2+} -зависимого высвобождения глутаминотрансмиттеров *in vivo*. Обнаружение и анализ цистерн sER действительно могут быть ограничены 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 первый детальный анализ ТАР в синапсах гиппокампа и коры мозга мыши. Применение альтернативных методов фиксации ткани мозга и контрастирования ультратонких срезов [4, 5] позволило усилить контраст элементарных мембран, включая мембраны цистерн sER нейронов и астроцитов. Однако данный подход усиливал и контраст гранул гликогена, маскирующих сходные с гранулами гликогена сечения цистерн sER. Для демаскирования цистерн sER в отростках астроцитов мы воспользовались быстрой разборкой гликогена в результате неанестетической эвтаназии. Освобождение от гранул гликогена профилей астроцитов позволило отчетливо наблюдать протяжённые цистерны sER, сходные по диаметрам (30–60 нм) и электронному контрасту с цистернами sER дендритов нейронов и его производному в дендритных шипиках — шипиковому аппарату. Наряду с протяжёнными цистернами sER цитоплазма РАР содержала сечения контрастных структур диаметром 10–30 нм, которые на малых увеличениях, с финальным разрешением изображения 1,7 нм/пиксель, по морфологии и размерам не отличались от гранул гликогена. Анализ на больших увеличениях, с рабочим разрешением 0,67–0,34 нм/пиксель изображения, что в 10–15 раз превышает стандартное разрешение сканирующей электронной микроскопии, позволил четко идентифицировать такие объекты, как органеллы, имеющие мембранную природу.

Анализ серийных срезов показывает, что данные структуры в РАР составляют два пула органелл: короткие, длиной ~130–170 нм, «нитевидные» цистерны sER с диаметром 10–30 нм и микровезикулы. При этом если РАР с морфологией тонких веточек содержат два типа цистерн sER (короткие «нитевидные» и протяжённые расширенные цистерны) и микровезикулы, то мембранные органеллы в ТАР представлены лишь короткими фрагментами «нитевидных» цистерн sER и микровезикулами, группы которых имеют тенденцию располагаться в непосредственной близости от активных зон наиболее активных синапсов. Такое нестохастическое распределение цистерн sER и микровезикул предполагает существование механизма активного направленного транспорта мембранных органелл в сильно уплощённых ламеллах ТАР. Сопоставление с литературными данными иммуноэлектронной микроскопии о расположении в РАР специфического маркера sER, Ca^{2+} -связывающего белка кальретикулина, позволяет считать наблюдаемые нами тонкие цистерны sER как ультраструктурной основой и первичным звеном в развитии спонтанных и индуцированных Ca^{2+} -событий в ТАР, так и необходимым условием для Ca^{2+} -зависимого везикулярного высвобождения глутаминотрансмиттеров вблизи активных синапсов.

Несмотря на устоявшееся мнение об отсутствии органелл в ТАР, полученные данные предполагают существование динамической регуляции состава и числа органелл в ламеллах РАР в зависимости от активности синапса и открывают новые перспективы в исследованиях нейрон-глиального взаимодействия и понимании функциональной роли астроцитарного микроокружения в пластичности трёхчастного синапса и развитии патологических процессов в мозге.

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

Рукопись получена: 15.05.2023

Рукопись одобрена: 26.11.2023

Опубликована online: 20.01.2024

Как цитировать:

Рогачевский В.В., Шишкова Е.А. Электронный ключ к тайнам астроцитов // Гены и клетки. 2023. Т. 18, № 4. С. 540–543.
DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623261>

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-34-90068.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Armbruster M., Naskar S., Garcia J.P., et al. Neuronal activity drives pathway-specific depolarization of peripheral astrocyte processes // Nature Neuroscience. 2022. Vol. 25, N 5. P. 607–616. doi: 10.1038/s41593-022-01049-x
2. Arizono M., Inavalli V.V.G.K., Panatier A., et al. Structural basis of astrocytic Ca^{2+} signals at tripartite synapses // Nature Communications. 2020. Vol. 11, N 1. P. 1906. doi: 10.1038/s41467-020-15648-4
3. Semyanov A., Verkhatsky A. Astrocytic processes: from tripartite synapses to the active milieu // Trends in Neuroscience. 2021. Vol. 44, N 10. P. 781–792. doi: 10.1016/j.tins.2021.07.006
4. Shishkova E., Kraev I., Rogachevsky V. Evaluation of Oolong Tea Extract Staining of Brain Tissue with Special Reference to Smooth Endoplasmic Reticulum // Biophysics. 2022. Vol. 67. P. 752–760. doi: 10.1134/S0006350922050177
5. Шишкова Е.А., Рогачевский В.В. Два субкомпартамента гладкого эндоплазматического ретикулума в перисинаптических отростках астроцитов: Ультраструктура и распределение в синапсах гиппокампа и неокортекса // Биофизика. 2023. Т. 68, № 2. С. 320–333. doi: 10.31857/S0006302923020126

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

* В.В. Рогачевский; адрес: Российская Федерация, 142290, Пущино, ул. Институтская, д. 3; e-mail: ckpem.icb.ras@gmail.com

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623261>

An electronic key to the mysteries of astrocytes

V.V. Rogachevsky*, E.A. Shishkova

Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Federal research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”, Pushchino, Russian Federation

ABSTRACT

Perisynaptic astrocytic processes (PAP) involved in the tripartite synapse respond to local depolarization activation with calcium release from intracellular stores inside astrocytic process nodes, resulting in local and generalized calcium events [1, 2]. Electrophysiology and imaging experiments demonstrate the existence of Ca^{2+} stores in astrocytic peripheral processes. However, the initial electron microscopic studies suggested that terminal astrocytic processes (TAP), in contact with synapse and located near the axon-spine interface, lack organelles, including the main astrocytic Ca^{2+} store — the cisternae of the smooth endoplasmic reticulum (sER) [3]. The Ca^{2+} -dependent release of gliotransmitters *in vivo* is highly doubtful. This is due to several factors. These include the weak electron contrast of sER cisternae which restricts their detection and analysis, the examination of astrocytic processes on single sections, and the limited optical resolution of the equipment used.

Here, we conducted the first comprehensive analysis of TAP in murine hippocampal and cortical synapses, using serial section transmission electron microscopy and 3D reconstructions. The use of alternative approaches to brain tissue fixation and ultrathin staining allowed to increase the contrast of subunit membranes, such as those in sER cisternae of neurons and astrocytes [4, 5]. However, this technique increased the contrast of individual glycogen granules, which obscured cross-sections of sER cisternae due to their similarity in appearance to glycogen granules. To overcome this, we used the rapid disassembly of glycogen during non-anesthetic euthanasia to reveal sER cisternae in astrocyte processes. The removal of glycogen granules from astrocyte sections allowed the clear observation of the long sER cisternae. These cisternae have a diameter ranging from 30 to 60 nm and exhibit similar electron contrast to that of sER cisternae found in neuronal dendrites, including their specialized form in dendritic spines (spine apparatus). In addition to the extended sER cisternae, the PAP cytoplasm contains cross-sections of contrast structures that measure between 10 and 30 nm in diameter. When observed at low magnification, with a final image resolution of 1.7 nm per pixel, these structures appear morphologically and dimensionally indistinguishable from glycogen granules. Analysis at higher magnifications, with a working image resolution of 0.67–0.34 nm/pixel — ten to fifteen times higher than standard scanning electron microscopy resolution — enabled clear identification of membrane-bound organelles.

Serial sections analysis reveals that PAP structures contain two distinct pools of organelles: short (~130–170 nm) “filiform” cisternae of sER with a diameter of 10–30 nm and microvesicles. Additionally, if PAPs with branchlet morphology feature two types of sER cisternae (short “filiform” and extended dilated cisternae) and microvesicles, then TAP membrane organelles are represented only by fragments of short “filiform” sER cisternae and microvesicles. Groups of these slender cisternae and small vesicles are commonly found in close proximity to the active zones of the most active synapses. The non-random distribution of sER cisternae and microvesicles indicates the presence of an active mechanism for directed transport of membrane organelles within highly flattened TAP lamellae. We analyzed our results alongside existing immunoelectron microscopy data from the literature that examines the location of the Ca^{2+} -binding protein calreticulin, a specific sER marker, in PAP. The observed thin sER cisternae serve as an ultrastructural foundation and primary contributor to the development of spontaneous and induced Ca^{2+} events in the PAPs, as well as a requirement for Ca^{2+} -dependent vesicular release of gliotransmitters located near active synapses.

Despite the well-established belief that organelles are absent in TAP, the data suggest a dynamic regulation of organelle composition and number within PAP lamellae, dependent on synapse activity. These findings open new avenues for investigating neuron-glia interaction and the functional role of astrocytic microenvironments in tripartite synapse plasticity and pathological processes in the brain.

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

To cite this article:

Rogachevsky VV, Shishkova EA. An electronic key to the mysteries of astrocytes. *Genes & Cells*. 2023;18(4):540–543. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623261>

Received: 15.05.2023

Accepted: 26.11.2023

Published online: 20.01.2024

ADDITIONAL INFORMATION

Funding sources. This study was supported by the RFBR project No. 20-34-90068.

Authors' 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, and final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

REFERENCES

1. Armbruster M, Naskar S, Garcia JP, et al. Neuronal activity drives pathway-specific depolarization of peripheral astrocyte processes. *Nature Neuroscience*. 2022;25(5):607–616. doi: 10.1038/s41593-022-01049-x
2. Arizono M, Inavalli VVGK, Panatier A, et al. Structural basis of astrocytic Ca^{2+} signals at tripartite synapses. *Nature Communications*. 2020;11(1):1906. doi: 10.1038/s41467-020-15648-4
3. Semyanov A, Verkhratsky A. Astrocytic processes: from tripartite synapses to the active milieu. *Trends in Neuroscience*. 2021;44(10):781–792. doi: 10.1016/j.tins.2021.07.006
4. Shishkova E, Kraev I, Rogachevsky V. Evaluation of Oolong Tea Extract Staining of Brain Tissue with Special Reference to Smooth Endoplasmic Reticulum. *Biophysics*. 2022;67:752–760. doi: 10.1134/S0006350922050177
5. Shishkova E., Rogachevsky V. Two subcompartments of the smooth endoplasmic reticulum in perisynaptic astrocytic processes: ultra-structure and distribution in hippocampal and neocortical synapses. *Biophysics*. 2023;68:246–258. doi: 10.1134/S0006350923020215

AUTHORS' CONTACT INFO

* V.V. Rogachevsky; address: 3 Institutskaya street, 142290 Pushchino, Russian Federation; e-mail: ckpem.icb.ras@gmail.com