

DOI: 10.5862/JPM.242/8

УДК: 577.35

П.А. Егорова¹, О.Л. Власова¹, И.Б. Безпрозванный^{1,2}¹ Санкт-Петербургский политехнический университет
Петра Великого, Российская Федерация;² Юго-Западный медицинский центр университета Техаса, США

ОГРАНИЧЕНИЕ ИМПУЛЬСНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК ПУРКИНЬЕ МОЗЖЕЧКА ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ ПУТЕМ АКТИВАЦИИ SK-КАНАЛОВ *IN VIVO*

Изучено действие внутривенных инъекций активатора кальций-активируемых калиевых каналов малой проводимости 2-го и 3-го типов (SK2/SK3) СуРРА на частоту генерации активности клеток Пуркинье (КП) коры мозжечка шестимесячных лабораторных мышей-самцов. Методом внеклеточной регистрации активности КП *in vivo* было показано, что инъекции 1 мМ СуРРА приводят к уменьшению частоты активности КП на 16 % через час, на 49 % через два часа и на 61 % через три часа после введения активатора. Полученные результаты подтверждают важную роль SK-каналов в регуляции спонтанной активности КП *in vivo*. Поскольку нарушения биофизических и физиологических функций КП наблюдаются в случае церебеллярных атаксий, сделан вывод о том, что SK-каналы служат потенциальной мишенью для лечения подобных нарушений.

АТАКСИЯ, МОЗЖЕЧОК, КЛЕТКИ ПУРКИНЬЕ, SK-КАНАЛЫ, СУРРА.

Введение

Мозжечок является важным отделом головного мозга, который отвечает за координацию движений, моторные функции, мышечный тонус, регуляцию равновесия, а также за моторное обучение. Точная слаженность импульсной активности нейронов мозжечка во времени обуславливает быстроту реакции и четкость движений. Важную роль в контроле моторных функций играют проводящие пути мозжечка, поскольку именно по ним происходит передача информации другим отделам нервной системы [1]. Единственный эфферентный путь, идущий от коры мозжечка к его глубинным ядрам, осуществляется через аксональные отростки клеток Пуркинье (КП). Последние являются круп-

ными ГАМКергическими нейронами, т. е. клетками центральной нервной системы, основным тормозным нейромедиатором которых является γ -аминомасляная кислота (ГАМК). Таким образом, КП являются ключевыми элементами коры мозжечка, а правильное функционирование этих нейронов обеспечивает скорость и слаженность движений [2].

Действительно, поражение КП приводит к нарушению согласованности движений различных мышц, что является клиническим симптомом в случае таких нейродегенеративных заболеваний, как аутосомно-доминантные церебеллярные атаксии (АДЦА) [3]. У большинства пациентов, больных атаксией, на последних стадиях заболевания наблюдается практически

полная дегенерация КП [4]. Однако экспериментальные исследования показали, что симптомы АДЦА на ранних стадиях, возможно, вызваны не клеточной дегенерацией, а нарушениями биофизических и физиологических свойств КП. Подтверждением этой гипотезы служит потеря регулярности пейсмейкерной активности КП, обнаруженная на мышинных моделях АДЦА в случаях эпизодической атаксии 2-го типа (ЭА2) [5], а также некоторых типов спиноцереbellарных атаксий (СЦА) [6, 7]. На основании полученных результатов было высказано предположение о положительном терапевтическом действии на пациентов препаратов, способных нормализовать регулярную активность КП.

Известно, что кальций-активируемые калиевые каналы малой проводимости (СК-каналы) участвуют в контроле пейсмейкерной активности КП [8]. Активация СК-каналов приводит к возникновению следовой гиперполяризации клеточной мембраны, что обуславливает регулярность генерации потенциала действия и ограничивает частоту импульсного сигнала КП [9]. Следовательно, семейство СК-каналов служит потенциальной фармакологической мишенью для лечения церебеллярных атаксий.

Некоторый терапевтический эффект активаторов СК-каналов был обнаружен в случае заболеваний ЭА2 [10, 11], СЦА2 [12] и СЦА3 [6] методами электрофизиологии

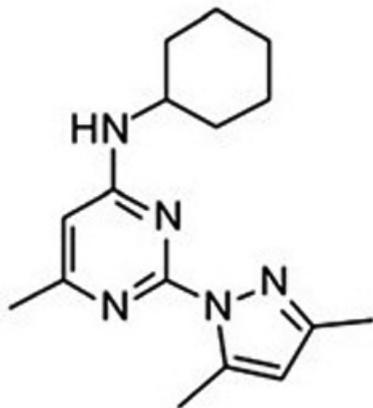


Рис. 1. Структурная химическая формула СуРРА – активатора СК-каналов

in vitro на мозжечковых срезах подопытных мышей. Однако крайне важным представляется изучение импульсной активности КП и их ответа на применение модуляторов СК-каналов в условиях проведения эксперимента *in vivo*. Кроме того, в мировой научной практике подобных исследований практически не проводили.

Цель работы состояла в выявлении влияния внутривенных инъекций активатора СК2/СК3-каналов СуРРА на импульсную активность КП коры мозжечка лабораторных мышей (СуРРА – циклогексил-2-(3,5-диметилпиразол)-6-метил-4-пиримидинамин (рис. 1)).

Постановка задачи

Предыдущие исследования показали, что модуляторы СуРРА и NS 309 (6,7-дихлор-1H-индол-2,3-дион-3-оксим) нормализуют спайковую активность КП СЦА2 мышей *in vitro*, обращая пачечную активность в тоническую. При этом действие на тоническую активность клеток выражалось в уменьшении частоты генерации спайков [12]. Затем было изучено влияние аппликаций растворов активаторов СК-каналов на активность КП *in vivo* [13]. В данных экспериментах наблюдался аналогичный эффект воздействия рассматриваемых модуляторов на частоту простых спайков (ПС) КП: действие модулятора NS 309 приводило к более существенному понижению частоты по сравнению с действием СуРРА. Данное наблюдение объясняется большей эффективностью связывания молекул NS 309 с СК-каналами по сравнению с СуРРА [14].

Итак, предыдущие исследования методом внеклеточной регистрации активности от одиночного отведения КП показали принципиальную возможность модуляции работы КП *in vivo* посредством поверхностной аппликации растворов активаторов СК-каналов [13]. Однако данный способ доставки потенциальных терапевтических средств не вполне приемлем для клинических испытаний. В связи с этим было решено провести серию экспериментов по внутривенному введению растворов одного из исследуемых веществ и оценить влияние активации СК-каналов на электрофизио-

логические свойства КП *in vivo* в данном случае. В качестве тестируемого активатора SK-каналов было выбрано вещество СуРРА, поскольку данный модулятор имеет высокую специфичность активации SK-каналов 2-го и 3-го типов.

Методика экспериментов

Работа выполнялась на 35 беспородных лабораторных мышах-самцах шестимесячного возраста из когорты питомника Рапполово. Для проведения опытов использовалась техника внеклеточной регистрации импульсной активности КП от одиночного отведения *in vivo* (адаптирована из ранее опубликованной работы [13]). Внутривентрикулярная наркотизация подопытных животных проводилась дробным способом, с использованием уретана (Sigma-Aldrich, США) из расчета 1200 мг на килограмм массы тела для начальной инъекции. Затем через 40 минут данная концентрация увеличивалась до 1800 мг/кг. После достижения эффекта анестезии мышь закрепляли на стереотаксической установке (RWD Life Science, США). Температуру тела подопытного животного поддерживали на уровне 37 °С за счет подушки с подогревом (Harvard Apparatus, США), контролируемой по принципу обратной связи. Затем в области червя мозжечка снимался скальп под ламбовидным швом и просверливалась кость черепа. Внеклеточная регистрация импульсной активности выполнялась в IV – V дольках червя мозжечка с использованием стеклянных микроэлектродов сопротивлением 3 – 10 МОм из боросиликатного стекла (их внешний диаметр – 1,50 мм, внутренний – 0,86 мм; Sutter Instrument, США), заполненных 2,5 М раствором хлорида натрия NaCl. Погружение микроэлектрода в кору мозжечка осуществлялось с помощью одноосевого масляного гидравлического микроманипулятора (Narishige Group, Япония) на глубину до 5 мм. В работе исследовали влияние активатора SK2/SK3-каналов СуРРА (Sigma-Aldrich, США) на импульсную активность КП. Данное вещество сначала растворяли в ДМСО (диметилсульфоксид) с целью получения стокового раствора. Непосредственно пе-

ред экспериментом СуРРА растворяли в 0,9 %-м растворе NaCl (физиологический раствор) из замороженных аликвот стокового раствора. В качестве контроля использовали среду для тестируемого вещества, представляющую собой раствор ДМСО в физиологическом растворе.

Продолжительную регистрацию паттернов активности проводили от одиночной клетки. Активность КП идентифицировали по наличию в картине разряда сложного спайка (СС), а также по наличию тормозной паузы ПС после сложного разряда. Возникновение СС обусловлено синаптической активацией КП афферентами лазающих волокон, что приводит к генерации кальций-зависимых ПД в дендритах, тогда как ПС возникают в результате синаптической активации параллельными волокнами, известными также как аксоны гранулярных клеток [15]. Все опыты по внеклеточной регистрации активности КП проводили в течение временного периода продолжительностью не более пяти часов после последней инъекции анестетика. Регистрируемые электрические импульсы усиливали с помощью дифференциального усилителя (AC/DC Differential Amplifier, A-M Systems, Inc, США), обрабатывали с помощью фильтров высоких (10 кГц) и низких (100 Гц) частот, оцифровывали с помощью аналого-цифрового преобразователя NI PCI-6221 (National Instruments, США) и хранили для дальнейшего компьютерного анализа. Для регистрации электрофизиологической активности использовали программу **Bioactivity Recorder v. 5.9**. Характеристики импульсной активности оценивали с помощью программы Clampfit v10.3.1.5. Последующий статистический анализ осуществляли с помощью программ Origin и MS Excel.

Введение тестируемых веществ осуществляли путем внутривенной инъекции в хвостовую вену подопытного животного. Используемая концентрация раствора составляла 1 мМ СуРРА. Непрерывную запись активности проводили в течение 5 мин до инъекции препарата и 30 мин после нее. Также проводили короткие (30 с) записи через 60, 90, 120, 150 и 180 мин после

внутривенной инъекции. Влияние модулятора оценивали для каждой клетки через 30, 60, 90, 120, 150 и 180 мин после внутривенной инъекции по изменению частоты ПС. Всего в опытах было зарегистрировано 33 случая активности КП, из которых статистически было обработано 12 клеток, поскольку регистрируемая импульсная активность остальных нейронов не сохранялась в течение трех часов после внутривенной инъекции. Наши эксперименты были направлены на изучение влияния модулятора SK2/SK3-каналов СуРРА, при этом анализа частоты СС мы не проводили, поскольку известно, что SK-каналы вовлечены в генерацию ПС [8].

С целью анализа полученных данных определяли средние значения частоты ПС. Данные представляли в виде относительных частот с учетом среднеквадратичного отклонения, т. е. в виде $(F_i / F_0) \pm \sigma$, где F_0 – значение частоты ПС за 5 мин до инъекции тестируемого вещества, F_i – значение частоты ПС после его внутривенной инъекции (через 30, 60, 90, 120, 150 и 180 мин для каждой клетки), σ – среднеквадратичное отклонение.

Далее проводили проверку статистической гипотезы по критерию согласия Пирсона о том, что ряд экспериментальных данных в каждый момент времени имеет форму нормального распределения. Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим применением теста Бонферрони. Анализировали влияние исследуемых веществ на относительную частоту регистрируемой активности КП. В каждый рассматриваемый момент времени сравнивали влияние инъекции 1 мМ СуРРА на относительную частоту ПС, чтобы установить действие инъекции раствора ДМСО на этот же показатель в физиологическом растворе.

Основные результаты и их обсуждение

В рамках настоящей работы была проведена серия экспериментов по внеклеточной регистрации активности КП коры интактного мозжечка *in vivo* на беспородных лабораторных мышах-самцах в возрасте 6

мес. В большинстве экспериментов частота спонтанных ПС составляла значения в диапазоне 15 – 50 Гц, однако встречались и сигналы с частотой от 4 до 90 Гц. В качестве контрольных были проведены эксперименты, в которых делали внутривенную инъекцию чистым физиологическим раствором в хвостовую вену мышцы. Характерный пример зарегистрированного паттерна разряда КП в течение пяти минут до внутривенной инъекции физиологического раствора и трех часов после нее приведен на рис. 2, а (кривая 1). Ниже на рис. 2, а представлена временная зависимость скользящего среднего частоты генерации ПС КП (кривая 2). Поведение частоты импульсной активности во времени было получено с шагом в 60 с. На рис. 2, б показаны фрагменты, которые соответствуют записи сигнала в контрольном эксперименте, через 1, 2 и 3 ч после внутривенной инъекции физиологического раствора. В каждом из фрагментов выявляются как простые, так и сложные спайки (обозначены точкой сверху). График скользящего среднего частоты генерации ПС (кривая 2 на рис. 2, а), а также увеличенные фрагменты записи активности (рис. 2, б) иллюстрируют незначительное уменьшение частоты генерации ПС. Присутствие в записи активности простых и сложных спайков, а также тормозной паузы после сложного разряда однозначно позволяет идентифицировать нейрон как КП.

Эксперименты по внутривенному введению 1 мМ СуРРА показали, что данный активатор SK-каналов способен модулировать электрофизиологические свойства КП *in vivo*. Характерный пример регистрации картины разряда КП до и после внутривенной инъекции 1 мМ СуРРА в хвостовую вену мышцы в возрасте 6 мес. приведен на рис. 3. Рис. 3, а (кривая 1) иллюстрирует паттерн, который мы наблюдали в течение пяти минут до и трех часов после внутривенной инъекции 1 мМ СуРРА. Ниже на рис. 3, а представлено скользящее среднее частоты генерации ПС КП (кривая 2), график относится к соответствующей записи активности КП. Значения частоты активности вычислялись с шагом в 60 с. На рис. 3, б приведены фрагменты, которые

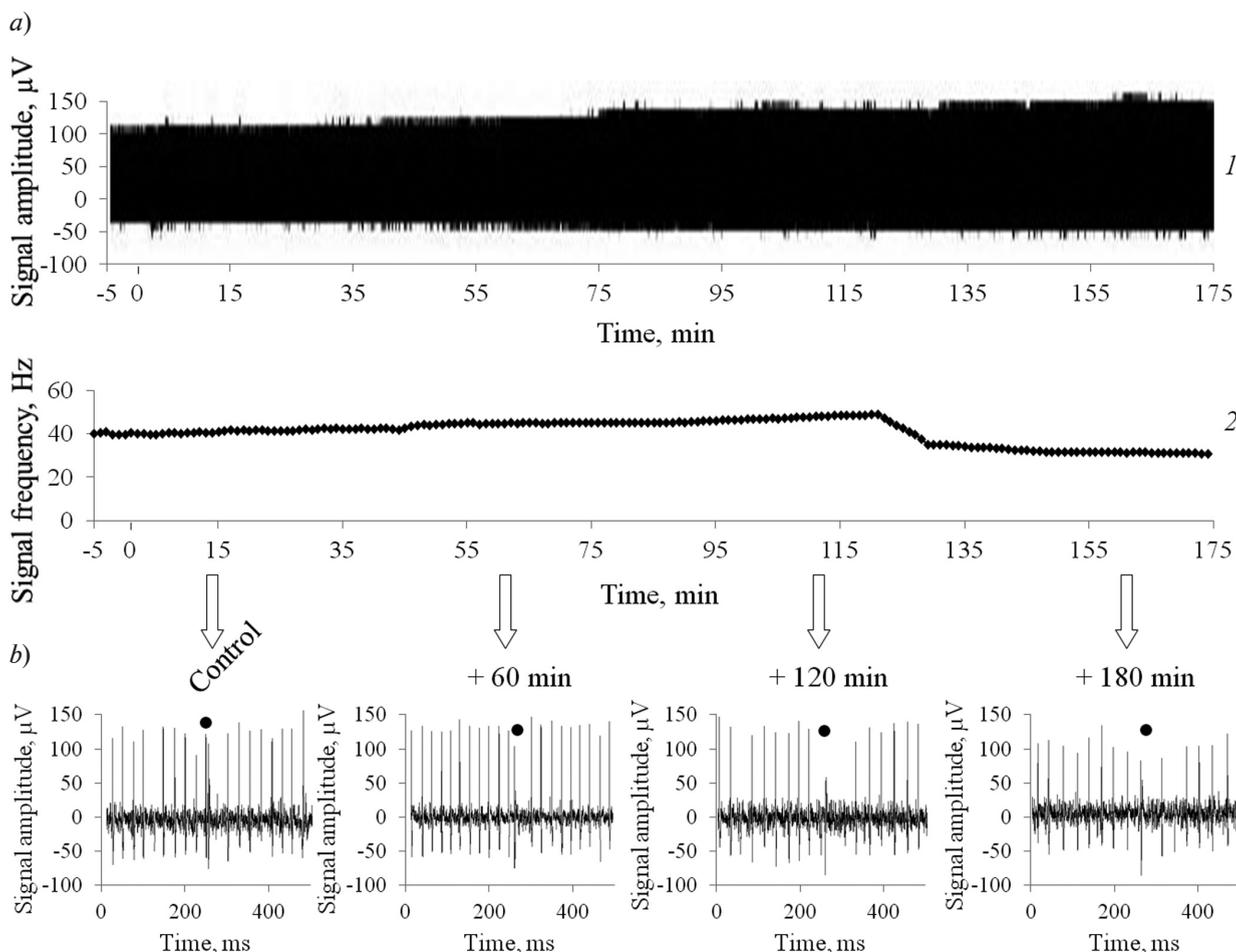


Рис. 2. Зависимость частоты генерации простых спайков клеткой Пуркинью (КП) от времени до и после внутривенной инъекции 0,9% NaCl. Приведены паттерн разряда КП (1) до и после инъекции, а также скользящее среднее частоты ПС (2) (см. также пояснения в тексте)

соответствуют записи сигнала в контрольном эксперименте через 1, 2 и 3 ч после внутривенной инъекции 1 мМ СуРРА. Графическое изображение скользящего среднего частоты импульсной активности (кривая 2 на рис. 3, а), а также увеличенные фрагменты записи активности (рис. 3, б) иллюстрируют значительное уменьшение частоты генерации ПС клеткой Пуркинью. Так, через три часа после внутривенной инъекции 1 мМ СуРРА в случае данной КП наблюдалось уменьшение генерации ПС приблизительно в 7 раз (кривая 2 на рис. 3, а).

На рис. 4 представлено обобщение данных, полученных в вышеописанных экспериментах. Так, было показано, что в течение

первого часа после внутривенной инъекции физиологического раствора ($n = 3$) наблюдается незначительное повышение частоты генерации ПС (примерно на 10 – 11 %), в течение второго часа после инъекции наблюдается незначительное уменьшение частоты импульсного сигнала относительно начального значения (примерно на 2 – 7 %), при этом в течение третьего часа после внутривенной инъекции 0,9 % NaCl наблюдается дальнейшее понижение частоты активности, достигающее в среднем до 25 %.

Полученные данные позволяют заключить, что сама процедура внутривенной инъекции и собственно физиологический раствор не оказывают существенного влияния на активность КП, то есть эффекты,

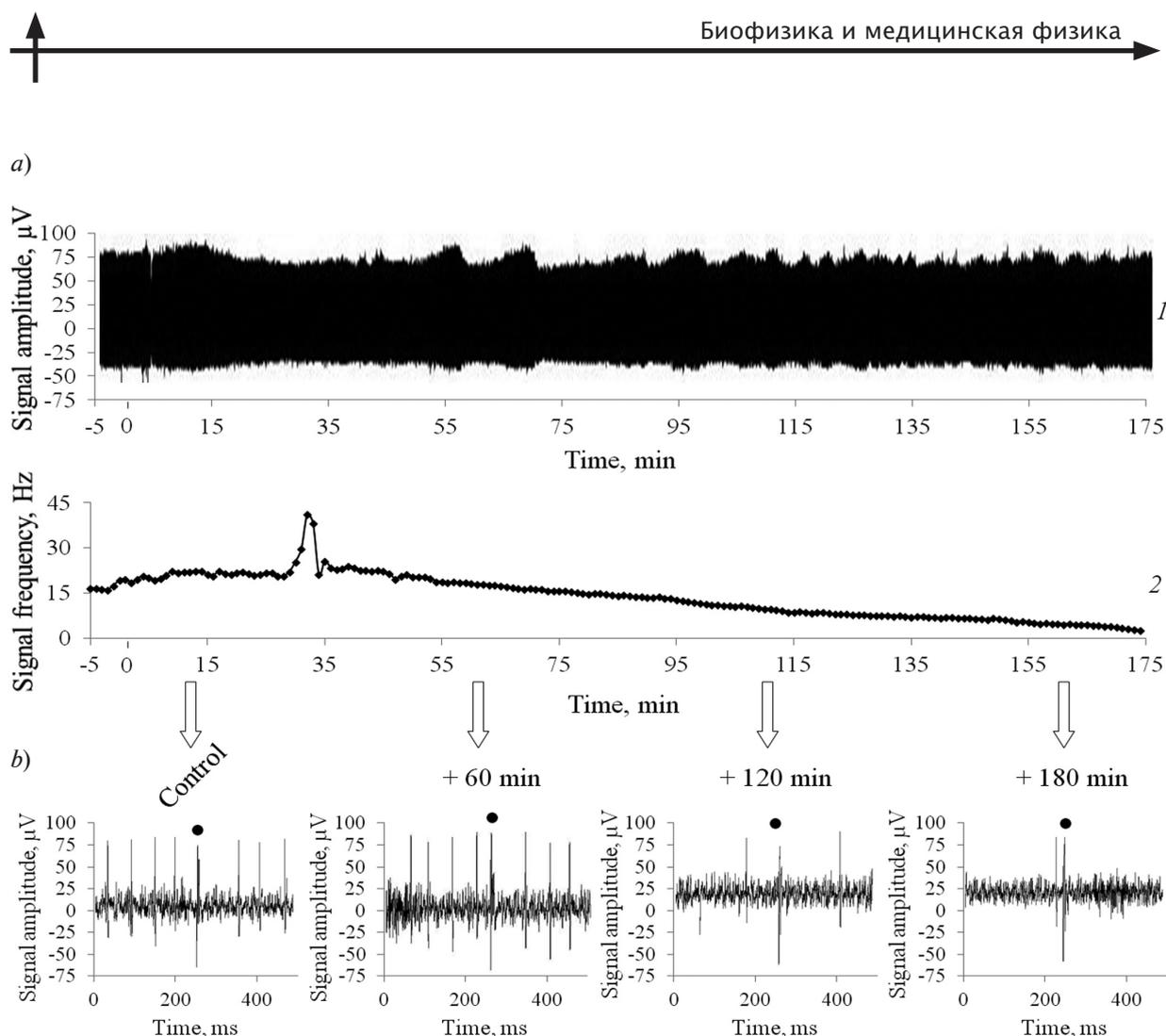


Рис. 3. Зависимость частоты генерации простых спайков клеткой Пуркинью (КП) от времени до и после внутривенной инъекции 1 мМ СуРРА. Приведены паттерн разряда КП (1) до и после инъекции, а также скользящее среднее частоты ПС (2) (см. также пояснения в тексте)

наблюдаемые при инъекции исследуемого активатора SK-каналов, вызваны его действием.

Также в представленных экспериментах исследовали влияние селективного для SK3/SK2-каналов модулятора СуРРА в концентрации 1 мМ. В результате этих экспериментов в ответ на инъекцию активатора наблюдалось два типа реакций КП. В первом случае это было прогрессивное понижение частоты генерации ПС КП, во втором – никаких существенных изменений электрофизиологических свойств КП. Согласно нашим предположениям, отсутствие реакции на инъекцию СуРРА было вызвано непопаданием шприцевой иглы в хвостовую вену (количество неудачных

экспериментов $n = 3$). В связи с этим анализ проводился только для первого указанного случая, т. е. для удачных внутривенных инъекций 1 мМ СуРРА (см. рис. 4 для $n = 6$). Статистическая обработка полученных экспериментальных данных показала, что в течение первых 30 мин после внутривенной инъекции 1 мМ СуРРА изменения частоты ПС не происходит; однако уже через 60 мин после инъекции активатора наблюдается понижение частоты генерации импульсов на 16 % относительно исходного значения (см. рис. 4). В дальнейшем наблюдается прогрессирующее снижение частоты активности КП. Так, через 90 мин после инъекции СуРРА наблюдается понижение частоты ПС в среднем на 32 % относитель-

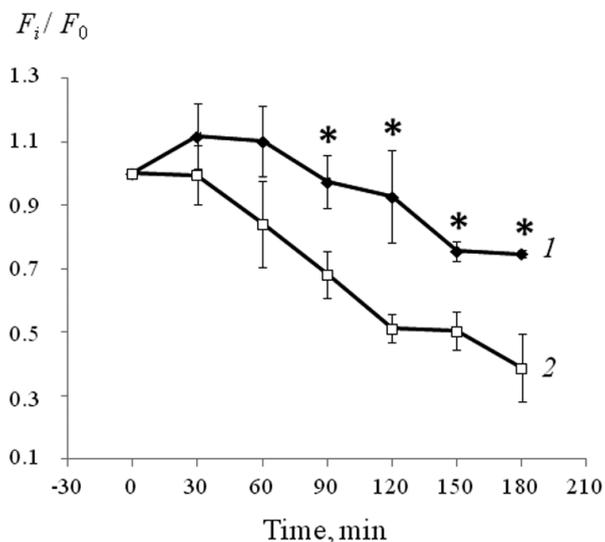


Рис. 4. Зависимость относительной частоты активности нейронов от времени после инъекции двумя препаратами: 0,9 % NaCl (1) и CuPPA (2).

Статистическое сравнение было представлено между указанными экспериментальными группами через каждые 30 мин после инъекции. Достоверность различий составила 95% (отмечена *)

но исходного значения, через 120 мин — на 49 %, через 150 мин — на 50 % и через 180 мин — на 61 % (см. рис. 4).

Статистический анализ всех данных показал (см. рис. 4), что воздействие CuPPA на активность КП достоверно отличается от влияния физиологического раствора уже через 90 мин от момента инъекции (достоверность составила 95 %) и продолжает отличаться с той же достоверностью до конца анализируемого трехчасового промежутка. При этом через три часа относительное значение частоты ПС после внутривенной инъекции физиологического раствора составляет в среднем 0,75, тогда как значение данного параметра через такой же временной интервал после инъекции CuPPA со-

ставляет 0,39 отн. ед. (см. рис. 4).

Заключение

В настоящем исследовании были представлены экспериментальные результаты по внутривенной доставке положительного модулятора SK-каналов CuPPA. Активация SK-каналов является потенциальным методом терапевтического лечения церебеллярных атаксий [6, 10–12]. Выбранный способ доставки продемонстрировал, что молекулы CuPPA способны непосредственно или опосредовано, через взаимодействие с другими метаболическими посредниками, контролировать активность КП *in vivo*. Полученные результаты крайне важны, поскольку внутривенное введение потенциального терапевтического агента является более приемлемым для клинических испытаний, чем методы, используемые ранее в аналогичных экспериментах по оценке влияния модуляторов SK каналов на активность КП *in vivo* [13].

Таким образом, в настоящей работе впервые было продемонстрировано, что в результате внутривенных инъекций активатора SK2/SK3-каналов CuPPA наблюдается статистически значимое понижение частоты генерации активности КП *in vivo*. Полученные данные означают, что внутривенное введение активатора SK-каналов способно регулировать электрофизиологическую активность КП *in vivo*, путем ограничения генерации импульсной активности КП.

Работа выполнена при финансовой поддержке стипендии Президента РФ СП-3635.2016.4 (раздел работы, соответствующий разделу «Постановка задачи»), гранта Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках государственного задания № 17.1360.2014/К (раздел работы, соответствующий рис. 2), а также гранта Российского научного фонда № 14-25-00024 (раздел работы, соответствующий рис. 3 и рис. 4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

[1] Smeets C.J., Verbeek D.S. Climbing fibers in spinocerebellar ataxia: A mechanism for the loss of motor control // *Neurobiol. Dis.* 2016. Vol. 88. No. 1. Pp. 96–106.

[2] Ito M. Historical review of the significance of the cerebellum and the role of Purkinje cells in

motor learning // *Ann. NY Acad. Sci.* 2002. Vol. 978. No. 12. Pp. 273–288.

[3] Shakkottai V.G., Fogel B.L. Clinical neurogenetics: autosomal dominant spinocerebellar ataxia // *Neurol. Clin.* 2013. Vol. 31. No. 4. Pp. 987–1007.

- [4] Geschwind D.H., S. Perlman S., Figueroa C.P., et al. The prevalence and wide clinical spectrum of the spinocerebellar ataxia type 2 trinucleotide repeat in patients with autosomal dominant cerebellar ataxia // *Am. J. Hum. Genet.* 1997. Vol. 60. No. 4. Pp. 842–850.
- [5] Walter J.T., Alvina K., Womack M.D., et al. Decreases in the precision of Purkinje cell pacemaking cause cerebellar dysfunction and ataxia // *Nat. Neurosci.* 2006. Vol. 9. No. 3. Pp. 389–397.
- [6] Shakkottai V.G., do Carmo Costa M., Dell’Orco J.M., et al. Early changes in cerebellar physiology accompany motor dysfunction in the polyglutamine disease spinocerebellar ataxia type 3 // *J. Neurosci.* 2011. Vol. 31. No. 36. Pp. 13002–13014.
- [7] Kasumu A.W., Liang X., Egorova P., et al. Chronic suppression of inositol 1,4,5-triphosphate receptor-mediated calcium signaling in cerebellar purkinje cells alleviates pathological phenotype in spinocerebellar ataxia 2 mice // *J. Neurosci.* 2012. Vol. 32. No. 37. Pp. 12786–12796.
- [8] Womack M.D., Khodakhah K. Somatic and dendritic small-conductance calcium-activated potassium channels regulate the output of cerebellar Purkinje neurons // *J. Neurosci.* 2003. Vol. 23. No. 7. Pp. 2600–2607.
- [9] Cingolani L.A., Gumnopoulos M., Vaccaccio A., et al. Developmental regulation of small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels and function in rat Purkinje neurons // *J. Neurosci.* 2002. Vol. 22. No. 11. Pp. 4456–4467.
- [10] Alvina K., Khodakhah K. KCa channels as therapeutic targets in episodic ataxia type-2 // *J. Neurosci.* 2010. Vol. 30. No. 21. Pp. 7249–7257.
- [11] Alvina K., Khodakhah K. The therapeutic mode of action of 4-aminopyridine in cerebellar ataxia // *J. Neurosci.* 2010. Vol. 30. No. 21. Pp. 7258–7268.
- [12] Kasumu A.W., Hougaard C., Rode F., et al. Selective positive modulator of calcium-activated potassium channels exerts beneficial effects in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 2 // *Chem. Biol.* 2012. Vol. 19. No. 10. Pp. 1340–1353.
- [13] Egorova P.A., Karelina T.V., Vlasova O.L., et al. The effect of SK channel modulators on the simple spike firing frequency in discharge of cerebellar Purkinje cells in laboratory mice // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology.* 2014. Vol. 50. No. 2. Pp. 114–120.
- [14] Hougaard C., Eriksen B.L., Jorgensen S., et al. Selective positive modulation of the SK3 and SK2 subtypes of small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels // *Br. J. Pharmacol.* 2007. Vol. 151. No. 5. Pp. 655–665.
- [15] Raman I.M., Bean B.P. Ionic currents underlying spontaneous action potentials in isolated cerebellar Purkinje neurons // *J. Neurosci.* 1999. Vol. 19. No. 5. Pp. 1663–1674.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

ЕГОРОВА Полина Анатольевна — ассистент кафедры медицинской физики Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого.

195251, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
bio_polya@mail.ru

ВЛАСОВА Ольга Леонардовна — доктор физико-математических наук, профессор кафедры медицинской физики, директор НОЦ Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого.

195251, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
olvlasova@yandex.ru

БЕЗПРОЗВАННЫЙ Илья Борисович — доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной нейродегенерации НОЦ ФОМБТ Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, заведующий кафедрой медицинской физики; профессор физиологии на отделении физиологии Юго-Западного медицинского центра университета Техаса, Даллас, США.

195251, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
5323 Harry Hines Blvd., Даллас, Техас, 75390 США
mnlabspb@gmail.com

Egorova P.A., Vlasova O.L., Bezprozvanny I.B. THE LIMITATION OF THE PURKINJE CELL'S IMPULSE ACTIVITY IN THE LABORATORY MICE'S VERMIS BY IN VIVO ACTIVATION OF SK CHANNELS.

This study has tested the effect of intravenous injections of CyPPA [the activator of small conductance calcium-activated potassium channels of types 2 and 3 (SK2/SK3)] on the firing frequency of cerebellar Purkinje cells of laboratory male mice at the age of 6 months via the method of extracellular in vivo recordings from Purkinje cells. This method revealed that 1 mM CyPPA tail vein injections lead to progressive reduction of Purkinje cells firing frequency. Thus, simple spike's firing frequency decreases by 16% in one hour after injection, by 49% in two hours after injection, and by 61% in three hours. The obtained results confirmed the hypothesis about the important role of SK channels in the maintenance of Purkinje cells spontaneous activity in vivo. Since deterioration of biophysical and physiological functions is observed in many cerebellar ataxias, SK channels can serve as a potential target for the treatment of such disorders.

ATAXIA, CEREBELLUM, PURKINJE CELLS, SK CHANNELS, CYPPA

REFERENCES

- [1] **C.J. Smeets, D.S. Verbeek**, Climbing fibers in spinocerebellar ataxia: A mechanism for the loss of motor control, *Neurobiol Dis.* (88) (2016) 96–106.
- [2] **M. Ito**, Historical review of the significance of the cerebellum and the role of Purkinje cells in motor learning, *Ann. NY Acad. Sci.* (978) (2002) 273–288.
- [3] **V.G. Shakkottai, B.L. Fogel**, Clinical neurogenetics: autosomal dominant spinocerebellar ataxia, *Neurol. Clin.* 31(4) (2013) 987–1007.
- [4] **D.H. Geschwind, S. Perlman, C.P. Figueroa, et al.**, The prevalence and wide clinical spectrum of the spinocerebellar ataxia type 2 trinucleotide repeat in patients with autosomal dominant cerebellar ataxia, *Am. J. Hum. Genet.* 60(4) (1997) 842–850.
- [5] **J.T. Walter, K. Alvina, M.D. Womack, et al.**, Decreases in the precision of Purkinje cell pacemaking cause cerebellar dysfunction and ataxia, *Nat. Neurosci.* 9(3) (2006) 389–397.
- [6] **V.G. Shakkottai, M. do Carmo Costa, J.M. Dell'Orco, et al.**, Early changes in cerebellar physiology accompany motor dysfunction in the polyglutamine disease spinocerebellar ataxia type 3, *J. Neurosci.* 31(36) (2011) 13002–13014.
- [7] **A.W. Kasumu, X. Liang, P. Egorova, et al.**, Chronic suppression of inositol 1,4,5-triphosphate receptor-mediated calcium signaling in cerebellar purkinje cells alleviates pathological phenotype in spinocerebellar ataxia 2 mice, *J. Neurosci.* 32(37) (2012) 12786–12796.
- [8] **M.D. Womack, K. Khodakhah**, Somatic and dendritic small-conductance calcium-activated potassium channels regulate the output of cerebellar Purkinje neurons, *J. Neurosci.* 23(7) (2003) 2600–2607.
- [9] **L.A. Cingolani, M. Gymnopoulos, A. Baccaccio, et al.**, Developmental regulation of small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel expression and function in rat Purkinje neurons, *J. Neurosci.* 22(11) (2002) 4456–4467.
- [10] **K. Alvina, K. Khodakhah**, KCa channels as therapeutic targets in episodic ataxia type-2, *J. Neurosci.* 30(21) (2010) 7249–7257.
- [11] **K. Alvina, K. Khodakhah**, The therapeutic mode of action of 4-aminopyridine in cerebellar ataxia, *J. Neurosci.* 30(21) (2010) 7258–7268.
- [12] **A.W. Kasumu, C. Hougaard, F. Rode, et al.**, Selective positive modulator of calcium-activated potassium channels exerts beneficial effects in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 2, *Chem. Biol.* 19(10) (2012) 1340–1353.
- [13] **P.A. Egorova, T.V. Karelina, O.L. Vlasova, et al.**, The effect of SK channel modulators on the simple spike firing frequency in discharge of cerebellar Purkinje cells in laboratory mice, *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology.* 50(2) (2014) 114–120.
- [14] **C. Hougaard, B.L. Eriksen, S. Jorgensen, et al.**, Selective positive modulation of the SK3 and SK2 subtypes of small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels, *Br. J. Pharmacol.* 151(5) (2007) 655–665.
- [15] **I.M. Raman, B.P. Bean**, Ionic currents underlying spontaneous action potentials in isolated cerebellar Purkinje neurons, *J. Neurosci.* 19(5) (1999) 1663–1674.

THE AUTHORS

EGOROVA Polina A.

Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University

29 Politechnicheskaya St., St. Petersburg, 195251, Russian Federation

bio_polya@mail.ru

VLASOVA Olga L.

Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University

29 Politechnicheskaya St., St. Petersburg, 195251, Russian Federation

olvlasova@yandex.ru

BEZPROZVANNY Ilya B.

Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University

29 Politechnicheskaya St., St. Petersburg, 195251, Russian Federation

mnlabspb@gmail.com