

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ "КРАСНОЯРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ПРОФЕССОРА В.Ф. ВОЙНО-
ЯСЕНЕЦКОГО" МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Шуваев Антон Николаевич

**Клеточные и молекулярные механизмы развития
полиглутаминовых атаксий и патогенетические принципы их
коррекции**

3.3.3. – патологическая физиология

1.5.22. – клеточная биология

Диссертация
на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Научные консультанты
доктор медицинских наук
Салмина Алла Борисовна
доктор медицинских наук
Каспаров Сергей Ашотович

Красноярск – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|----|
| ВВЕДЕНИЕ..... | 6 |
| Актуальность темы исследования..... | 6 |
| Цели и задачи работы..... | 9 |
| Научная новизна..... | 10 |
| Теоретическая и практическая значимость работы..... | 12 |
| Методология и методы исследования..... | 13 |
| Положения, выносимые на защиту..... | 13 |
| Степень достоверности..... | 14 |
| Личный вклад соискателя..... | 14 |
| Апробация работы..... | 15 |
| Структура и объем диссертации..... | 16 |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ..... | 17 |
| 1.1. Общие сведения о полиглутаминовых СЦА – определение, классификация, клиника, эпидемиология, и лечение..... | 17 |
| 1.1.1. Общие сведения о полиглутаминовых СЦА..... | 17 |
| 1.1.2. Заболеваемость полиглутаминовыми СЦА..... | 18 |
| 1.2.3. Клинические проявления полиглутаминовых СЦА..... | 25 |
| 1.2.4. Дифференциальный диагноз полиглутаминовых СЦА..... | 29 |
| 1.2.5. Симптоматическое лечение больных с полиглутаминовыми СЦА..... | 30 |
| 1.2. Патогенез развития СЦА 1..... | 33 |
| 1.2.1. Динамические мутации. Механизм тринуклеотидного удлинения..... | 33 |
| 1.2.2. Гены, ответственные за развитие полиглутаминовых СЦА..... | 37 |
| 1.2.3. Строение и функция нормальных полиглутаминовых белков на примере атаксина 1 и атаксина 3..... | 39 |
| 1.2.4. Строение и функция полиглутаминовой цепочки..... | 45 |
| 1.2.5. Посттрансляционные изменения удлинённых полиглутаминовых белков: влияние на нейротоксичность..... | 46 |

| | |
|--|----|
| 1.2.6. Теория потери функции при экспрессии мутантных полиглутаминовых белков..... | 48 |
| 1.2.7. Теория приобретения токсических функций при экспрессии мутантных белков..... | 50 |
| 1.2.8. Нарушение генетических механизмов при приобретении мутантными полиглутаминовыми белками токсических функций | 53 |
| 1.3. Клеточные нарушения..... | 57 |
| 1.3.1. mGluR1 путь передачи сигналов и его нарушение | 58 |
| 1.3.2. Нарушение морфологии КП при полиглутаминовых СЦА..... | 68 |
| 1.3.3. Вклад астроглии в патогенез полиглутаминовых СЦА..... | 62 |
| 1.3.4. Надмолекулярные патологические механизмы. Надмолекулярные ансамбли..... | 63 |
| 1.3.5. Формирование атаксического синдрома..... | 69 |
| 1.4. Перспективы патогенетического лечения полиглутаминовых СЦА. Экспериментальная терапия..... | 74 |
| 1.4.1. Предотвращение экспрессии мутантного гена..... | 74 |
| 1.4.2. Снижение токсичности мутантных белков..... | 75 |
| 1.4.3. Усиление клиренса мутантных белков..... | 76 |
| 1.4.4. Воздействие на пути передачи сигналов..... | 77 |
| 1.4.5. Трансплантация стволовых клеток..... | 78 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ..... | 82 |
| 2.1. Общая характеристика исследуемого материала..... | 82 |
| 2.1.1. Экспериментальные модели..... | 82 |
| 2.1.2. Подходы к патогенетическому лечению СЦА1 модельных животных..... | 84 |
| 2.2 Методы исследования..... | 85 |
| 2.2.1. Создание вирусных векторов..... | 85 |
| 2.2.2. Введение векторных конструкций..... | 87 |
| 2.2.3. Культивирование и ведение МСК..... | 89 |
| 2.2.4. Генетические методы..... | 90 |

| | |
|---|-----|
| 2.2.5. Исследование поведения животных..... | 90 |
| 2.2.6. Вестерн-блоттинг..... | 93 |
| 2.2.7. Изготовление срезов живых тканей..... | 94 |
| 2.2.8. Электрофизиологические методы исследования..... | 94 |
| 2.2.9. Ca^{2+} имиджинг..... | 97 |
| 2.2.10. Введение биоцитина и морфологический анализ КП..... | 98 |
| 2.2.11. Статистический анализ результатов..... | 99 |
| ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ..... | 101 |
| 3.1. Спектр патогенетических изменений при полиглутаминовых СЦА..... | 101 |
| 3.1.1. Нейрон-обусловленные нарушения в универсальной полиглутаминовой модели..... | 101 |
| 3.1.1.1. Нарушение морфологии КП в полиглутаминовой модели СЦА..... | 101 |
| 3.1.1.2. Нарушение синаптической пластичности КП в полиглутаминовой модели СЦА..... | 104 |
| 3.1.1.3. Нарушение экспрессии RoR α в полиглутаминовой модели СЦА..... | 110 |
| 3.1.2. Нейрон-опосредованные нарушения у СЦА1 модельных мышей..... | 112 |
| 3.1.2.1. Нарушение синаптической передачи у B05 СЦА1 модельных мышей..... | 113 |
| 3.1.2.2. Нарушение синаптической пластичности у B05 СЦА1 модельных мышей..... | 115 |
| 3.1.3. Влияние ГБ на патогенез СЦА1..... | 131 |
| 3.1.3.1. Хроническая активация ГБ приводит к изменению её морфологии..... | 131 |
| 3.1.3.2. Патологическая активация ГБ влияет на морфологию КП..... | 141 |
| 3.1.3.3. Хроническая активация ГБ изменяет синаптическую передачу в синапсах ПВ КП..... | 148 |
| 3.1.3.4. Экспрессия мутантного атаксина 1 в ГБ мозжечка приводит к увеличению τ ПВ ВПСТ..... | 155 |
| 3.1.3.5. Активация ГБ вызывает нарушение кратковременной пластичности в ПВ-КП синапсах..... | 159 |

| | |
|--|-----|
| 3.1.3.6. Экспрессия мутантного ATXN1 влияет на долговременную синаптическую пластичность в синапсах ПВ-КП..... | 180 |
| 3.1.3.7. Патологическая активация ГБ снижает экспрессию EAAT1 в коре мозжечка..... | 181 |
| 3.2. Доставка рекомбинатных генов..... | 186 |
| 3.2.1. Обоснованность использования LVV конструкций для экспрессии таргетных генетических последовательностей..... | 186 |
| 3.2.2. Векторная экспрессия mGluR1 в КП..... | 193 |
| 3.2.3. Клиренс мутантных полиглутаминовых белков с помощью LVV конструкций..... | 207 |
| 3.3. Введение стволовых клеток..... | 222 |
| 3.4. Фармакотерапия..... | 235 |
| 3.4.1. Баклофен..... | 235 |
| 3.4.1.1. Баклофен улучшает синаптическую передачу и пластичность в КП у СЦА1 модельных животных..... | 235 |
| 3.4.1.2. Баклофен улучшает координацию у СЦА1 модельных животных..... | 239 |
| 3.4.2. Мемантин..... | 244 |
| 3.4.2.1. Выявление NMDA токов в КП..... | 245 |
| 3.4.2.2. Побочные эффекты мемантина..... | 249 |
| 3.4.2.3. Мемантин уменьшает нарушение морфологии ГБ и КП..... | 260 |
| 3.4.2.4. Мемантин уменьшает нарушение синаптической передачи..... | 268 |
| 3.4.2.5. Мемантин предотвращает потерю EAAT1 после хронической оптогенетической стимуляции ГБ..... | 270 |
| ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ..... | 274 |
| Заключение..... | 288 |
| Выводы..... | 290 |
| Практические рекомендации..... | 292 |
| СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ, ПРИНЯТЫХ В РАБОТЕ..... | 294 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... | 295 |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования.

Полиглутаминовые спиноцеребеллярные атаксии образуют одну из наиболее часто встречающихся групп наследственных нейродегенеративных заболеваний мозжечка. Среди них, спиноцеребеллярная атаксия 1 типа (СЦА1) доминирует в славянской популяции (1; 2). Более того, в России регистрируется резкое увеличение заболеваемости СЦА1 у коренного населения Якутии. Это самый большой очаг заболеваемости СЦА1 в мире (3). На сегодняшний момент патогенетической терапии полиглутаминовых спиноцеребеллярных атаксий не разработано, заболевание неуклонно прогрессирует и заканчивается смертью от поражения зон ствола мозга, отвечающих за витальные функции. Отсутствие патогенетической терапии при полиглутаминовых спиноцеребеллярных атаксиях требует изучения данных состояний и делает эту проблему актуальной.

Полиглутаминовые спиноцеребеллярные атаксии характеризуется чрезмерным удлинением CAG тринуклеотидных повторов соответствующих генов (4). Такая мутация приводит к появлению патологических белков с удлинённой полиглутаминовой цепочкой, их неправильной конформации, и приобретению ими токсических свойств, что вызывает гибель клеток мозга (5). Изначально считалось, что мутация в различных генах при разных полиглутаминовых спиноцеребеллярных атаксиях должна приводить к разным нарушениям функций мутантных белков и различным проявлениям заболевания. Однако клинически наблюдается большая схожесть проявлений при всех полиглутаминовых атаксиях, лишь с некоторыми индивидуальными особенностями (6), что может указывать на подобные процессы в патогенезе данных заболеваний, а значит и схожие подходы к их коррекции. Однако изменение молекулярных каскадов, приводящих к морфологическим и функциональным нарушениям структур мозжечка при полиглутаминовых

спиноцеребеллярных атаксиях, слабо изучены, общие принципы развития патологии не показаны.

Поэтому в данной работе было уделено внимание общим патогенетическим аспектам, возникающим при развитии полиглутаминовых атаксий. Известно, что наиболее рано и выражено вовлекается в патологический процесс клетки Пуркинье. Их гибель, тесным образом связана с негативными эффектами мутантных полиглутаминовых белков. Так, атаксин 1 образует с другими белками комплекс, взаимодействующий с ядерным рецептором регуляции транскрипции, $ROR\alpha$ (7). Его мутантная форма с удлинённой полиглутаминовой цепочкой не имеет возможности образовывать комплексы с $ROR\alpha$, что приводит к деградации данного рецептора и нарушению транскрипции десятков различных генов, отвечающих за метаболизм, рост и развитие клеток, а также элиминацию синапсов (8). Вероятно этот механизм лежит в основе нарушения развития клеток Пуркинье и при других полиглутаминовых спиноцеребеллярных атаксиях, но такие исследования не проводились.

Ранее было показано на нокаутных животных, что выше описанные витальные функции в клетках Пуркинье критически зависят от наличия и активации метаботропного глутаматного рецептора 1 типа, $mGluR1$ (9). Также данный рецептор был замечен в развитии кратко- и долговременной синаптической пластичности в синапсах клеток Пуркинье с параллельными и лиановидными волокнами (9). Однако роль $mGluR1$ в патогенезе спиноцеребеллярных атаксий и, в частности СЦА1, ранее не была изучена. Поэтому выявление эффектов мутантных полиглутаминовых белков на функцию $ROR\alpha$ и связанных с ним экспрессируемых белков, таких как $mGluR1$, представляет особый интерес.

Поэтому наиболее перспективными подходами к коррекции $mGluR1$ -опосредованного пути передачи сигналов в клетках Пуркинье при полиглутаминовых спиноцеребеллярных атаксиях является усиление

выведения мутантных нерастворимых белков с помощью убиквитин-протеасомной системы (10) и активация комплекс-образующих с mGluR1 метаботропных рецепторов, таких как ГАМКв рецепторы. Данной задачи можно достичь при помощи таргетной доставки рекомбинантного гена, а также имеющихся на рынке фармакологических препаратов – активаторов ГАМКв рецептором, таких как баклофен.

Высокий интерес представляет также трансплантация стволовых клеток в область нейродегенерации. Попадая в организм реципиента, стволовые клетки выделяют ряд биологически активных веществ таких, как факторы роста (BDNF, NT-3 or GDNF) и т.д. и могут способствовать поддержанию нормальной морфологии и функции нейронов (11). Из большого ряда стволовых клеток, мезенхимальные стволовые клетки (МСК) представляются наиболее перспективными, так как уже используются в экспериментах на моделях нейродегенерации в силу их высокой потенциальной пользы в лечении данных состояний, а также низкой опасности в отношении формирования новообразований (12).

Ранее было показано, что нормальный атаксин 1 локализуется в ядре не только нейронов, но и других клеток мозжечка, в частности, астроцитов (13). Но вовлечение астроцитов в патогенез полиглутаминовых спиноцеребеллярных атаксий, а также молекулярная основа данного процесса, является наименее изученной темой. Изучение нейрон-астроцитарных взаимодействий коры мозжечка поможет адаптировать опыт контроля эксайтотоксичности и активации нейропротекции в синапсах большого мозга с помощью уже известных фармакологических средств, таких как мемантин, к патологическим условиям при полиглутаминовых спиноцеребеллярных атаксиях.

Цель исследования

Выявление новых клеточных и молекулярных механизмов развития полиглутаминовых атаксий с использованием общих полиглутаминовых и оптогенетических моделей, а также частных моделей спиноцеребеллярной атаксии 1 типа; разработка на их основе подходов к патогенетической коррекции данных состояний.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. Создать векторные модели, описывающие общие и частные звенья патогенеза полиглутаминовых атаксий: модель спиноцеребеллярной атаксии 1 типа с отсроченной экспрессией мутантного атаксина 1 в клетках Пуркинье, оптогенетическую модель астроглиоза мозжечка и модель с селективной экспрессией мутантного атаксина 1 в глии Бергмана.
2. В модели спиноцеребеллярной атаксии 1 типа и полиглутаминовой модели показать молекулу-мишень для мутантных белков, влияющую на морфологию клеток Пуркинье и экспрессию на поверхности их дендритов mGluR1. Изучить процессы кратко- и долговременной синаптической пластичности в условиях недостаточности mGluR1 в данных моделях.
3. На оптогенетической модели астроглиоза мозжечка и модели с селективной экспрессией мутантного атаксина 1 в глии Бергмана показать клеточные нарушения трёхкомпонентного синапса и установить вклад транспортёра глутамата EAAT1 в эксайтотоксичность в описанных моделях.
4. На трансгенной полиглутаминовой модели оценить внутривенный путь векторной доставки аденовирусного рекомбинантного гена MSCV-GFP-P2A-CRAG с последующим синтезом в клетках Пуркинье сигнальной ГТФазы CRAG, влияющей на клиренс мутантных

- полиглутаминовых нерастворимых белков. Показать положительный эффект от введения на морфологию клеток Пуркинье в данной модели. Оценить восстановление синаптической пластичности на полиглутаминовой модели и модели с селективной экспрессией мутантного атаксина 1 в клетках Пуркинье при данном типе введения рекомбинантного гена.
5. Оценить эффект от введения мезенхимальных стволовых клеток в подболобочное пространство в области верхних двухолмий трансгенных модельных полиглутаминовых животных на морфологию клеток Пуркинье, и mGluR1-обусловленные процессы в них. Описать восстановление двигательных навыков у данных животных после введения мезенхимальных стволовых клеток.
 6. На трансгенной модели с селективной экспрессией мутантного атаксина 1 в клетках Пуркинье показать эффекты и длительность влияния низких доз баклофена, после его однократного введения в кору мозжечка, на mGluR1-опосредованный путь передачи сигналов.
 7. В оптогенетической модели астроглиоза мозжечка показать эффект от длительного приёма мемантина per os на ключевые звенья патогенеза в развитии эксайтотоксичности, оценить морфологию и функцию глии Бергмана и клеток Пуркинье, а также на восстановление двигательных функций у данных животных. Оценить возможные побочные эффекты при длительном приёме мемантина.

Научная новизна

Созданы модели спиноцеребеллярной атаксии 1 типа: с отсроченным началом заболевания, максимально приближенная по времени к естественному дебюту у больных и с селективной экспрессией атаксина 1 в астроцитах мозжечка. Создана оптогенетическая модель астроглиоза

мозжечка, описывающая астроцитарное звено патогенеза полиглутаминовых спиноцеребеллярных атаксий.

Показан общий молекулярный механизм нарушения морфологии клеток Пуркинье при полиглутаминовых спиноцеребеллярных атаксиях в виде уменьшения экспрессии RoRa. Был количественно оценён эффект от недостаточности mGluR1 в моделях спиноцеребеллярной атаксии 1 типа посредством регистрации и измерения характеристик mGluR1-опосредованных медленных возбуждающих синаптических токов. Показана зависимость моторного обучения от mGluR1-опосредованной синаптической пластичности, так как у животных с нарушением долговременной депрессии и эндоканнабиноид-опосредованного подавления синаптического возбуждения наблюдалось развитие атаксического фенотипа.

Показана успешная внутривенная доставка рекомбинантного гена в клетки Пуркинье, экспрессирующего сигнальную ГТФазу CRAG. Доказано восстановление mGluR1-опосредованного пути передачи сигналов при экспрессии CRAG в двух моделях полиглутаминовых спиноцеребеллярных атаксий.

Показана эффективная трансплантация мезенхимальных стволовых клеток при их инъекции в подболобочное пространство в области верхних двухолмий трансгенным модельным полиглутаминовым животным. Установлено, что наличие мезенхимальных стволовых клеток в коре мозжечка восстанавливает морфологию клеток Пуркинье и mGluR1-опосредованный путь передачи сигналов.

Экспериментально доказано, что однократное введение низких доз баклофена в кору мозжечка трансгенных животных с селективной экспрессией мутантного атаксина 1 в клетках Пуркинье вызывает длительное восстановление mGluR1-опосредованного пути передачи сигналов посредством активации ГАМКв рецепторов и приводит к уменьшению атаксического фенотипа.

Установлено, что долговременный приём мемантина животными с оптогенетической моделью астроглиоза мозжечка оказывает выраженное влияние на трёхкомпонентный синапс в виде восстановления морфологии клеток Пуркинье и глии Бергмана. Уменьшение эксайтотоксичности в синапсах клеток Пуркинье во время применения мемантина происходит из-за восстановления экспрессии транспортёра возбуждающих аминокислот EAAT1 в глии Бергмана.

Теоретическая и практическая значимость работы

Данное исследование имеет важное значение как для практической, так и для фундаментальной медицины. Выявлены молекулярные механизмы нарушения сигнализации в клетках Пуркинье при полиглутаминовых атаках на ранней и развёрнутой стадии заболевания.

Полученные данные о молекулярно-клеточных механизмах позволяют разработать таргетное патогенетическое лечение полиглутаминовых сниноцеребеллярных атаксий, которое может быть направлено на коррекцию как астроцитарного, так и нейронного компонента синапса коры мозжечка.

Открытые нами изменения на ранней стадии заболевания, такие как нарушение сигнализации mGluR1, могут быть частично скорректированы такими препаратами, как баклофен. Этот препарат уже используется в рутинной практике врача для лечения других заболеваний. Нарушения, имеющие место на поздней стадии, такие как эксайтотоксичность, могут быть успешно скорректированы мемантином, который способствует сохранению EAAT1 – молекул, участвующих в захвате возбуждающих аминокислот, в том числе, глутамата, из синаптической щели. Также положительные эффекты CRAG и стволовых клеток на мозжечок модельных животных помогут в дальнейшем более эффективно бороться с этими полиглутаминовыми заболеваниями на любой стадии.

Выявленные нами общие звенья патогенеза, позволяют вышеуказанные фармакологические средства использовать в клинических исследованиях для разработки терапии полиглутаминовых спиноцереbellярных атаксий.

Методология и методы исследования

Работа проведена на срезах мозжечка мышей линий CD1 и C57BL/6. Использовались иммуногистохимическое, электрофизиологические методы, исследование поведения животных, оптогенетические методы, введение веществ в мозжечок с помощью стереотаксической установки, генетические методы исследования (ПЦР), Ca^{2+} имиджинг. Достоверность полученных данных подтверждена методами математической статистики.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Общими звеньями патогенеза полиглутаминовых спиноцереbellярных атаксий являются нарушение mGluR1-опосредованного пути передачи сигналов и развитие эксайтотоксичности, что приводит к изменению морфологии клеток Пуркинье и глии Бергмана, а также нарушению синаптической пластичности нейронов коры мозжечка и появлению атаксического синдрома у модельных животных.
2. Коррекция mGluR1-опосредованного пути передачи сигналов в клетках Пуркинье возможна двумя путями: 1- поддержание достаточного количества mGluR1 на шипиках дендритов при сохранной морфологии клеток Пуркинье посредством усиления клиренса мутантных белков и введения стволовых клеток в зону нейродегенерации; 2- перераспределение молекулярной сигнализации с помощью комплекс-образующих с mGluR1 метаботропных рецепторов, таких как ГАМКв.
3. Уменьшение явлений эксайтотоксичности в синапсах клеток Пуркинье возможно при длительном введении мемантина животным с оптогенетической неспецифической моделью астроглиоза мозжечка, общей

для всех полиглутаминовых спиноцеребеллярных атаксий. Мемантин восстанавливает морфологию глии Бергмана и клеток Пуркинье, а также улучшает трансинаптическую передачу в синапсах коры мозжечка. Побочными эффектами, в виде появления тревожности при хроническом потреблении мемантина, можно пренебречь, в силу выраженного его положительного влияния на нейроны мозжечка при нейродегенеративном процессе.

Степень достоверности

Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается тем, что научные положения и выводы обоснованы и получены с использованием системного подхода к решению поставленных задач. В экспериментах использовалась достаточная выборка исследуемых животных в соответствии с основными регламентами работы с лабораторными живыми объектами. Эксперименты проводились на высокотехнологичном оборудовании с использованием современных методов исследований. Полученные результаты были подвергнуты адекватному статистическому анализу.

Личный вклад соискателя

Автором были определены цели и задачи, разработан дизайн исследования, отработаны протоколы экспериментальной части работы. Усреднённая полиглутаминовая модель, а также векторные модели СЦА1 были созданы при совместном участии учёных Университета Гунма (Н. Nitai, К. Takayama, Н. Nosoі, Т. Torashima), а также Университета Бристоля (S. Kasparov). Также векторная модель селективной экспрессии мутантного атаксина 1 в астроцитах и S100 β опосредованная модель астроглиоза были разработаны и изучались совместно с исследователем КрасГМУ Белозор О.С. Автором самостоятельно набран экспериментальный материал для исследований,

проведены поведенческие тесты на животных, иммуногистохимическая окраска препаратов и их микроскопия, созданы модели животных, проведено ПЦР исследование, электрофизиологические измерения и оптогенетическая стимуляция. Автором проведена статистическая обработка полученных данных, и интерпретация результатов; подготовка публикаций и оформление рукописи диссертации.

Апробация работы

Данные, полученные в работе, были представлены на международных конференциях как устные и стендовые доклады: на 35-й ежегодной конференции японского общества Нейронаук, г. Ниагоя, 2012; 36-й ежегодной конференции японского общества Нейронаук «Neuroscience 2013», г. Киото; 5-й ежегодной конференции международного общества радиационной нейробиологии, г. Такасаки, 2013; «Russia-Japan medical symposium», г. Красноярск, 2018 г.; «II Всероссийской научной конференции с международным участием «ОПТОГЕНЕТИКА+ 2018», г. Санкт-Петербург, 2020г; научной конференции с международным участием «Разработка лекарственных средств - традиции и перспективы», г. Томск 2021г; «IV Всероссийской научной конференции с международным участием «ОПТОГЕНЕТИКА+ 2023», г. Санкт-Петербург, 2023г.

По результатам работы опубликовано 20 печатных работ в журналах, индексируемых аналитическими базами Scopus, Web of Science, RSCI, в том числе в журналах, рекомендованных ВАК для публикации материалов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук.

Работа была выполнена при поддержке грантов: Грант Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере «УМНИК» 2017-2019 гг. (11950ГУ/2017); Гранты РФФИ КО_a 2017-2019 гг. (17-54-10005) и Аспиранты 2019-2022 гг. (19-315-90044), Грант Красноярского краевого фонда науки 2021-2022 гг. (№ 636).

Структура и объем диссертации

Диссертация оформлена в соответствии с Национальным стандартом Российской Федерации ГОСТ Р7.0.11-2011. Материал диссертации изложен на 346 страницах машинописного текста, иллюстрирован 115 рисунками и 19 таблицами. Работа состоит из введения, 4 глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов), заключения, выводов, списка литературы. Список литературы включает 527 источников, в том числе 15 отечественных и 512 зарубежных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О ПОЛИГЛУТАМИНОВЫХ СЦА – ОПРЕДЕЛЕНИЕ, КЛАССИФИКАЦИЯ, КЛИНИКА, ЭПИДЕМИОЛОГИЯ, И ЛЕЧЕНИЕ

1.1.1. Общие сведения о полиглутаминовых СЦА

В 1991 году был открыт новый тип мутаций в геноме человека – так называемые, динамические мутации, вызванные увеличением числа копий (экспансией) простых повторяющихся последовательностей (14). Как было выявлено позже, сюда относится широкий спектр как наиболее простых (CAG, GCG, GCC, GAA, CTG) (15); (16); (17); (18); (19); (20); (21); (22); (23); (24); (25); (26); (27); (28), так и более сложных (CTGG, ATTCT, CCCCGCCCCGCG) последовательностей (29); (30); (31). Наиболее обширной и гетерогенной группой являются заболевания с увеличением числа копий CAG последовательности. Так как CAG тринуклеотид кодирует аминокислоту глутамин, эти заболевания называются полиглутаминовыми (32).

На сегодняшний день, существует, по крайней мере, девять таких заболеваний. Первым заболеванием, описанным в 1991г., связанным с увеличением CAG повторов и вызывающих прогрессирующую дегенерацию двигательных нейронов, явилась спинобульбарная мышечная атрофия (СБМА), или болезнь Кеннеди (33). Впоследствии также этот патологический механизм был обнаружен у восьми других заболеваний, включая болезнь Гентингтона (БГ), дентаторубропаллидолюисову атрофию (DRPLA или синдром Haw River), и шесть типов спиноцеребеллярных атаксий (СЦА1, 2, 3, 6, 7, и 17) (34) (Таблица 1).

| Заболевание | Локус | Белок | Норма повторов | Патология |
|--------------|-----------|------------------------------|----------------|-----------|
| СБМА | Xq11-q12 | Андрогеновый рецептор | 6–36 | 38–62 |
| ДРПЛА | 12p13 | Атрофин 1 | 3–38 | 49–88 |
| БГ | 4p16.3 | Гентингтин | 6–35 | 36–265 |
| СЦА1 | 6p23 | Атаксин 1 | 6–39 | 41–83 |
| СЦА2 | 12q24 | Атаксин 2 | 14–32 | 34–77 |
| СЦА3 | 14q24-q31 | Атаксин 3 | 12–40 | 55–86 |
| СЦА6 | 19p13 | P/Q Ca ²⁺ каналы | 4–18 | 21–33 |
| СЦА7 | 3p21-p12 | Атаксин 7 | 7–18 | 37–306 |
| СЦА17 | 6q27 | Белок, объединяющийся с ТАТА | 25–43 | 45–63 |

Таблица 1. Белки, мутации которых приводит к появлению полиглутаминовых СЦА. В таблице представлены расположения мутаций генов, кодирующих белки, их название и длина полиглутаминовой цепочки в норме и патологии.

Среди этих заболеваний выделяется группа, имеющая схожее течение, патофизиологию и проявления – это полиглутаминовые СЦА (см. таблицу 1). Их совокупная заболеваемость имеет большую вариабельность 1-9 на 100,000 населения, и в более точных расчётах приближается к 4-5 больным на 100,000 населения.

1.1.2. Заболеваемость полиглутаминовыми СЦА

СЦА1 наблюдается приблизительно у 1-2 людей на 100 тыс. общемирового населения (35). СЦА2 была выявлена в 14% случаев из группы всех СЦА, что составляет приблизительно 0,6 на 100 тыс. населения (36); (37); (38). СЦА3 у некоторых народов – это наиболее часто встречаемая форма аутосомно-доминантных атаксий (39); (40). Принято полагать, что частота встречаемости СЦА3 составляет 1,5-2 человека на 100 тыс. населения (41). Распространение в Мире СЦА6 – менее 1 человека, и в более точных

расчётах приближается к 0.02-0.31 на 100 тыс. населения (42), (43), (44), (45), (37), (46), (47), (48), (49). Заболеваемость СЦА 7 в нескольких исследованиях составляла 2% от всех СЦА, или в более точных расчётах, 0.05-0.2 (среднее 0,08) на 100 тыс. (50), (51). Менее 100 семей с СЦА17 было описано на сегодняшний день. Поэтому предварительный уровень заболеваемости можно вывести как 0,0015 на 100 тыс. населения (52), (53), (54) (см. рисунок 1).

Таким образом, на долю полиглутаминовых СЦА приходится до 60% от всех СЦА, тогда как остальные диагностируемые формы занимают не более 5%, а 35-40% – это СЦА с неизвестной мутацией, выявляемые лишь фенотипически (55). В то же время, среди полиглутаминовых СЦА доминируют СЦА1 и СЦА3, на которые приходится более 2/3 от всех регистрируемых заболеваний (37% и 42% соответственно) (см. рисунок 1).

Развитие такой дисциплины, как археогенетика, позволило ответить на вопрос, когда появились в человеческой популяции полиглутаминовые СЦА (то есть, возникли мутации в генах, ответственных за развитие данных заболеваний). Мутация гена – это довольно редкое явление, поэтому характерной особенностью полиглутаминовых заболеваний является наличие основателя – человека, у которого впервые возникла определённая мутация, и который несёт уникальную генетическую информацию, называемую гаплотипом. Как правило, у полиглутаминовых заболеваний прослеживается несколько гаплотипов основателей – от 2-3 до отдельных гаплотипов в каждой исследуемой популяции (56), (57). Чем выше скорость мутации и/или чем она «старше», тем в больших поколениях она встречается, тем шире ареал её распространения и тем выше частота заболеваемости (56), (58). Однако зачастую эти два фактора являются взаимоисключающими. Поэтому полиглутаминовые СЦА можно условно разделить на 2 группы, исходя из скорости мутации и давности её возникновения. В первую группу относятся заболевания, преимущественно, с ранним возникновением, но низкой

скоростью мутации (см. рисунок 1). Представителем этой группы является СЦА3. При исследовании СЦА3 было выделено 3 основных гаплотипа (59), (60). Самый старый из них имеет азиатское происхождение и возник в эпоху халколита, примерно 5,800 ($5,774 \pm 1,116$) лет назад, а по другим данным, более 7000 лет назад. Его носители проживают сейчас на Тайване, в Индии, Японии и даже на крайнем северо-востоке Австралии (61). Второй гаплотип является гораздо поздней мутацией, возникшей в раннем средневековье, около 1,400 ($1,416 \pm 434$) лет назад на территории современной Португалии. (56). Однако этот европейский гаплотип широко распространён по Земному шару. Носители его живут в северной Америке, Германии, Франции, Португалии, Бразилии и даже Индии, и Китае, что можно объяснить активной деятельностью португальцев в эпоху Великих географических открытий. Так же наличие португальского гаплотипа было найдено у аборигенов Австралии, проживающих на Грут-Айленд и Арнем-Ленд, что можно объяснить контактами их с Макасарцами – одним из народов Индонезии, находящихся под протекторатом Португалии в 16-17 столетиях (59). Эффект основателя также был найден у камбоджийских семей, что указывает на ещё более позднее его возникновение (55).

При исследовании семей больных СЦА6, был выделен изначальный гаплотип, который присутствует у английских, японских, бразильских и финских семей больных СЦА6 (62), что указывает на давнее его происхождение, то есть на время до разделения человечества на расы. Однако было показано, что эффект основателя возможен в немецкой (северная Рейн-Вестфалия) (63) и японской (префектура Тоттори) (64) популяциях, что указывает на возникновение этих гаплотипов примерно 10-20 поколений назад.

СЦА1, СЦА2, СЦА7 и СЦА17, в отличие от СЦА3 и СЦА6 имеют высокую степень мутации. Мутации, обусловившие эти заболевания относительно молоды – в большинстве случаев, они присутствуют всего

лишь в 12-17 поколениях, однако распространены повсеместно в различных этнических группах.

Определить количество гаплогрупп и возраст мутаций второй по распространённости СЦА, СЦА1 затруднительно, в связи с недостаточностью исследований в этой области. У японцев, мутация в гене СЦА1, возможно, возникла у одного индивида, который жил в префектуре Мияги или префектуре Ямагата. Это событие относительно близкого прошлого (около 17 поколений назад, или 1500-1550 г.н.э.) (65). Якутский гаплотип более древний. Установлено, что происхождение СЦА1 в якутской популяции связано с эффектом основателя, при этом, время распространения мутированного гена в Якутии оценивается исследователями, по одним оценкам, в 37 поколений, или 915-1110 лет назад (66), а по другим, 1500-1750 лет назад (67), то есть, до миграции якутов из средней Лены в места нынешнего их проживания и формирования якутского этноса (68). Поэтому не удивительно, что якутский гаплотип был выявлен при исследовании китайской популяции. Якутский гаплотип был найден у китайцев наряду с собственно китайским и вышеописанным японским гаплотипами (69). В индийской популяции СЦА1 встречается редко (70), однако здесь были выделены сразу 2 гаплотипа, которые, с большой долей вероятности, имеют древнее происхождение (71). Первый из этих гаплотипов, как и гаплотип СЦА2 присутствует у хиндустанцев, проживающими в штате Бихар (72). Второй гаплотип сформировался отдельно от первого, так как встречается исключительно у тамильцев, проживающих в штате Тамилнад, в двух деревнях Раджапалаям и Котгамеду (73).

Среди 26 семей с СЦА2 из Европы, Северной Африки и Карибских островов, описанных Didierjean et al (74), было найдено несколько мутаций основателей. Из них можно выделить относительно молодой западноевропейский гаплотип и более ранний общеевропейский, который присутствовал, как в двух французских, четырёх немецких, так и одной

сербской семье. Отдельно стоят североафриканский и карибский гаплотипы. Индийский гаплотип, пожалуй, не является общеиндоевропейским, так как было показано, что он происходит из индийского штата Бихар и встречается исключительно у хиндустанцев, проживающих в этой области, или выходцев из неё (75).

СЦА7 диагностируется в семьях различных этнических групп, включая детей из Европы (Бельгии, Финляндии, Франции, Германии, Швеции и Великобритании), Ближнего Востока (Израиля), Африки (Алжира, Марокко, Ливии, Туниса и ЮАР), Северной Америки (американцы европеоидной и негроидной рас), Южной Америки (Бразилии), Вест-Индии (Ямайки) и Азии (Кореи и Филиппин) (76); (77); (78); (79); (80); (81); (82); (46). Предыдущие исследования, проведённые Stevanin с соавторами, выявили 4 гаплотипа у 41 семей со СЦА7, проживающих в Азии, Северной Африке, Европе, Ближнем Востоке и Южной Америке, а также два гаплотипа в Германии и Италии (46). Позже было показано, что и скандинавские семьи, больные СЦА7, имеют в своей основе одну общую мутацию основателя (83).

Как минимум три гаплотипа было выявлено при изучении больных СЦА17. Интересен тот факт, что японская девочка с СЦА17 из префектуры Ниигата имела *de novo* дупликацию в её отцовском аллеле (84). Поэтому её можно с полным правом считать «основателем» нового гаплотипа. В двух семьях с СЦА17, проживающих в северной Германии, также был выявлен один и тот же гаплотип. Его отличительной чертой является высокая степень нестабильности повторов СAG (85). Однако в остальных случаях удлинение повторов при СЦА17 имеет мейотическую стабильность при передаче генетического материала через поколения (86); (87). Распространение СЦА17 может быть занижено, так как некоторые больные СЦА17 имеют фенотип, схожий с БГ.

Исследование полиглутаминовых заболеваний в РФ насчитывает более 20 лет. Заболеваемость полиглутаминовыми заболеваниями схожа с

такowymi в европейских популяциях, но есть и отличия. Из 375 российских семей (исключая якутскую популяцию), отягощённых различными формами полиглутаминовых заболеваний, СЦА1, 2, 3, 6 и 7 диагностирована в 76 семьях. Заболеваемость СЦА распределяется так: СЦА1 – в 28 семьях (45,9%), СЦА2 – в 21 (34,4%), СЦА3 – в 7 (11,5%), СЦА6 – в 1 семье (1,6%), СЦА7 – также в 1 семье (1,6%) и СЦА17 в 3 семьях (4,9%). Таким образом, характерной особенностью в российской популяции является низкая заболеваемость СЦА3, тогда как в популяциях США и Японии – это наиболее частая патология (88).

Наряду со временем возникновения и скоростью накопления мутации фактором, способствующим росту полиглутаминовых заболеваний, является изоляция. Изоляция может проявляться не только в низкой миграции в другие регионы из-за удалённости места проживания или этнических особенностей, но также традицией близкородственных браков (89); (90). Самым ярким примером природной изоляции является популяция маленького острова Флориш группы Азорских островов, где наблюдается самая высокая заболеваемость СЦА3 в Мире. Она составляет 1 на 140 человек (91). Менее выраженная природная изоляция также чётко прослеживается в более обширной якутской популяции, где заболеваемость СЦА1 составляет около 38 случаев на 100 тыс. населения (92). Однако высокая изолированность определённой группы людей может быть обусловлена не только географическими факторами. Культурная и этническая изоляция малых народностей Индии, подчинённых кастовой системе, также приводит к впечатляющим последствиям. Так, малохарактерная для Индии СЦА1, наблюдается у тамильских семей, проживающих исключительно в двух деревнях Раджапалаям и Коттамеда штата Тамилнад, с частотой 1 больной СЦА1 на 15 здоровых жителей (73). В общем, изоляция не оказывает глобального влияния на заболеваемость (64),

однако является решающим фактором для конкретной группы людей, длительно проживающих на одной территории.

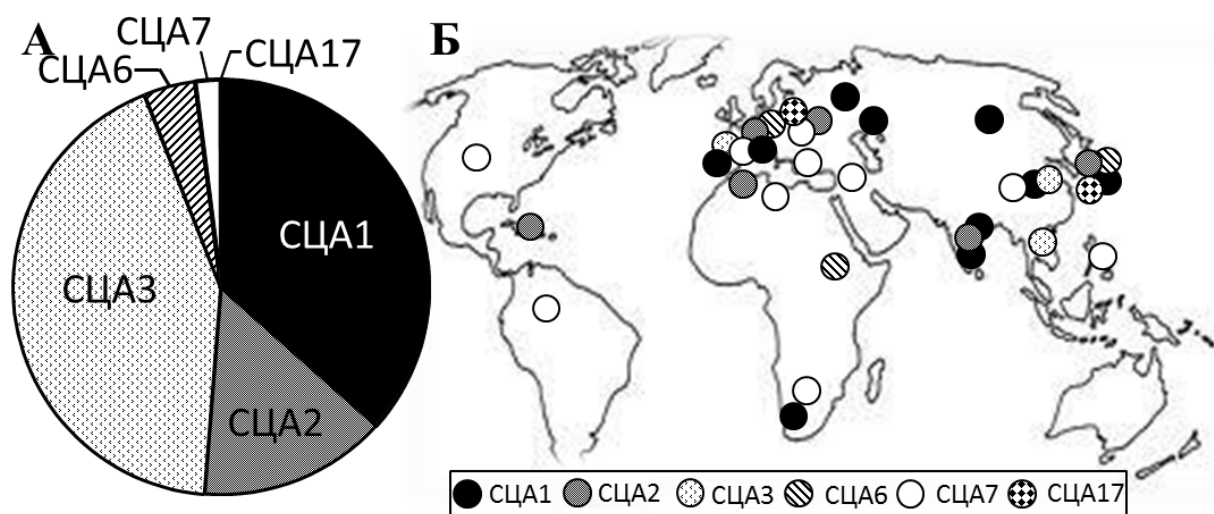


Рисунок 1. Распространение полиглутаминовых заболеваний. А. На диаграмме показано процентное соотношение полиглутаминовых СЦА относительно общей заболеваемости на 100000 населения (Так как СЦА17 составляет всего лишь 0,037% от общего числа, на графике эта величина не обозначается). Б. На мировой карте показано точками соответствующего цвета место возникновения гаплотипа соответствующего заболевания (93).

Таким образом, можно заключить, что полиглутаминовые СЦА возникли очень давно, распространены по всему земному шару. Крайне малый охват населения планеты в плане диагностики полиглутаминовых заболеваний, не позволяет с точностью определить заболеваемость и распространённость среди различных групп населения, так как наиболее обширные регионы, такие как Африка, Индия, Юго-Восточная Азия, остаются практически неисследованными в плане этих заболеваний. Однако анализируя данные исследований в области популяционной генетики, можно выявить ряд черт, характерных для полиглутаминовых СЦА. Это наличие основателя, зависимость распространённости от давности и частоты возникновения мутации, а также превалирование полиглутаминовых СЦА в

изолированных популяциях. Можно также предположить, что в долгосрочной перспективе (несколько тысяч лет) мы сталкиваемся с заболеваниями с низкой степенью мутации, так как высокая степень приводит к быстрому удлинению CAG повторов и проявлению заболевания в более молодом возрасте у последующих поколений, что неминуемо ведёт к исключению таких людей из процесса воспроизведения при проявлении симптомов до зрелого возраста.

1.1.3. Клинические проявления полиглутаминовых СЦА

Отличительной клинической особенностью полиглутаминовых СЦА является зависимость времени начала и выраженности симптомов от длины CAG повторов гена, кодирующего мутантный белок (94); (95). Чем длиннее цепочка CAG повторов, тем раньше возникает и тяжелее протекает заболевание (14); (96); (97). Однако крайне длинные цепочки и промежуточное количество CAG повторов встречаются редко. Существуют единичные зафиксированные случаи, когда признаки заболевания уже были выражены при рождении или возникали в течение первых лет жизни (15), (98). Также редко фиксируются случаи возникновения симптомов в старческом возрасте (99). Чаще всего, эти заболевания начинаются в молодом зрелом возрасте (см. таблицу 2).

| Заболевание | Крайнее | Среднее | Ссылка |
|--------------|---------|---------|--------------|
| СЦА1 | 4-74 | 36 | (100) |
| СЦА2 | 1-65 | 32 | (101) |
| СЦА3 | 5-70 | 36 | (102); (103) |
| СЦА6 | 30-71 | 52 | (44) |
| СЦА7 | 0-70 | 35 | (78) |
| СЦА17 | 6-48 | 33 | (105) |

Таблица 2. Крайнее и среднее количество глутаминовых остатков в полиглутаминовой цепочке белков, вызывающих СЦА.

Клиническая картина полиглутаминовых СЦА, в общем, однотипна, однако имеются и отличия. Однотипность заболевания обусловлена приобретением токсических функций при избирательной экспрессии мутантных белков в определённых структурах центральной нервной системы (см. ниже). В общем, мутантные полиглутаминовые белки экспрессируются в большом мозге, включая кору и подкорковые ганглии, мозжечке, продолговатом и спинном мозге. Поражение этих структур вызывает нарушение высших корковых функций, экстрапирамидные синдромы, атаксические явления, нарушение бульбарных функций и периферические парезы. Индивидуальные особенности конкретного полиглутаминового заболевания во многом зависят от степени экспрессии патологического белка в той или иной области (Таблица 3).

| Заболевание | Белок | Область экспрессии | Ссылка |
|--------------------|-----------------------------------|---|---------------|
| СЦА1 | Атаксин 1 | Мозжечок, ствол мозга | (105) |
| СЦА2 | Атаксин 2 | Мозжечок, ствол мозга | (106) |
| СЦА3 | Атаксин 3 | Мозжечок, ствол мозга, базальные ганглии | (16) |
| СЦА6 | $\alpha 1a$ субъединица VGCC | Мозжечок | (17) |
| СЦА7 | Атаксин 7 | Сетчатка и мозжечок | (18) |
| СЦА17 | Белок, объединя- ющийся с TATA | Стриатум и мозжечок | (104) |

Таблица 3. В таблице представлены названия заболеваний, а также белков их вызывающих. Вынесены области наибольшей экспрессии полиглутаминовых белков, вызывающих СЦА с соответствующими ссылками.

При спиноцеребеллярных атаксиях 1, 2, 3, 6, 7 и 17-го типов на первый план выступает атаксический мозжечковый синдром. Симптомы поражения мозжечка представлены в виде нарушения походки, неразборчивой речи, нарушения равновесия, проблемами со спуском по лестнице или при внезапных поворотах, оживлением глубоких сухожильных рефлексов,

гиперметрическими саккадами, нистагмом, дисметрией, дисдиадохокинезом, гипотонией, кинетическим или постуральным тремором и др. Однако также присутствуют, в той или иной степени, и другие вышеперечисленные синдромы. Так, бульбарный синдром представлен дизартрией, дисфагией, параличом взора вверх, и нарушением дыхания. Нарушения высшей нервной деятельности более мягкие, чем при таких полиглутаминовых заболеваниях, как ДРПЛА и БГ, и представляют собой лишь нарушение исполнительных функций, эмоций, не плавность речи, нарушение зрительной памяти. Однако при СЦА7 и СЦА 17 могут встречаться более выраженные расстройства, в виде деменции и психических нарушений. Намного реже наблюдается экстрапирамидный синдром в виде дистонии (блефароспазм, тортиколлис, писчий спазм, дистония ног), паркинсонизма, хореи. При СЦА17, так как вышеперечисленные экстрапирамидные расстройства более выражены, и имеет место тяжёлая деменция в финале заболевания, это делает её схожей с клиникой БГ. Отложения патологических белков при СЦА 1, 2, 3, 6, 7 и 17 находят, преимущественно, в коре мозжечка, зубчатых ядрах и продолговатом мозге.

Однако экспрессия полиглутаминовых белков, не ограничивается одной лишь ЦНС. Так при СЦА7 имеет место отложения агрегатов патологического белка в тонкой кишке, поджелудочной железе и сердечно-сосудистой системе, а также сетчатке глаза, что приводит к атрофии последней. Более того, при очень большом удлинении САГ повторов в соответствующих генах, имеют место задержка развития, нарушения сердечно-сосудистой системы и дегенерация сетчатки и при других видах СЦА (СЦА1, СЦА2) (107).

При СЦА1, первые клинические проявления возникают обычно на третьем-четвёртом десятилетии жизни, хотя ранние и поздние (между 4 и 74 годами жизни) случаи также были описаны (108), (109). Фенотип очень variabelен и может быть определён, как панцеребеллярный синдром с атаксией ходьбы,

позы и конечностей, дизартрией и глазодвигательными нарушениями, такими как установочный нистагм, плавные саккадические движения глаз, нарушение зрительной супрессии вестибуло-окулярного рефлекса и уменьшение оптокинетического нистагма. Позже развиваются медленные саккадические движения и офтальмопарез при вовлечении структур моста. Пирамидные знаки (спастичность, гиперрефлексия и разгибательные подошвенные рефлексы) встречаются часто, но амиотрофия и потеря чувствительности также могут возникать. Дисфагия, хореиформная гиперкинезия, стридорозное (резкое свистящее) дыхание и паралич голосовых связок обычно имеют место на поздних стадиях заболевания (110). Нарушение критики к своему состоянию наблюдается часто, но редко прогрессирует до выраженной деменции (111). Клинические симптомы СЦА1 иногда помогают отличить её от других форм СЦА. Но нарушение вызванных двигательных потенциалов более специфично для СЦА1, и показывает изменение времени периферического или центрального проведения (112).

Время начала СЦА3 очень вариабельно, но в основном – это второе-пятое десятилетие жизни (113). Фенотип – один из наиболее разнообразных среди СЦА. Типичные симптомы СЦА (см. СЦА1) обнаруживаются у большинства пациентов. Однако СЦА3 может протекать, как чистая «мозжечковая» атаксия или семейный паркинсонизм (114), как наследственная спастическая параплегия, наследственная нейропатия или синдром беспокойных ног (115). Нарушения сна часты при СЦА3 и, в большинстве случаев, являются следствием синдрома беспокойных ног и периодических движений ног во сне в ответ на (эндогенную) допаминергическую стимуляцию (115). Редко распознающийся, но частый и более специфический признак СЦА3 – это нарушение температурной чувствительности (102). Ложный экзофтальм, фациолингвальные псевдофасцикуляции и дистония считались характерными

симптомами болезни Мачадо-Джозефа (116). Однако они не специфичны для этого заболевания.

Из-за поражения мозжечка больные полиглутаминовыми СЦА становятся обездвиженными через 5-20 лет после начала заболевания. Выраженная атаксия значительно влияет на активность таких больных. Часто у них наблюдается ожирение вследствие гиподинамии. Однако продолжительность жизни сокращается из-за вовлечения в патологический процесс ствола мозга, где находятся центры жизнеобеспечения (дыхательный, сердечный, глотательный и т.д.). В терапии больных СЦА3 и СЦА6 практикуется наложение гастростомы вследствие выраженного нарушения глотания (117). По этой причине, у этих больных происходит снижение массы тела. При СЦА1 и 3 аспирационная пневмония и апноэ являются непосредственной причиной смерти (118).

1.1.4. Дифференциальный диагноз полиглутаминовых СЦА

Полиглутаминовые СЦА необходимо отличать от множества других приобретённых и наследственных заболеваний. На первом этапе, они диагностируются на основании семейного анамнеза, общего исследования и средств нейровизуализации.

Постановка диагноза требует следующих моментов:

- Обнаружение при неврологическом осмотре типичных клинических симптомов и синдромов, включая нарушение координации походки и движений пальцев/рук, часто сочетающиеся с дизартрией и нистагмом.
- Исключение негенетических причин заболевания (таких как алкоголизм, авитаминоз, рассеянный склероз, цереброваскулярные заболевания, первичные опухоли и их

метастазы, паранеопластические заболевания, связанные со скрытой карциномой яичников, молочных желёз или лёгких).

Подтверждение наследственной природы заболевания производится посредством положительного семейного анамнеза, обнаружения генетической мутации, вызывающей заболевание, или обнаружения клинического фенотипа, характерного для того или иного полиглутаминового заболевания. Молекулярное генетическое исследование доступно в клинических лабораториях для диагностики всех известных на сегодняшний день полиглутаминовых СЦА. Подтверждение явных фенотипов проводится с помощью методов ПЦР. ПЦР методы определяют аллели с длиной до 115 CAG повторов (119), (120).

У некоторых больных с отсутствием семейного анамнеза иногда невозможно поставить диагноз наследственной атаксии, когда все возможные генетические исследования не показывают отклонения от нормы.

1.1.5. Симптоматическое лечение больных с полиглутаминовыми СЦА

Лечение у таких пациентов остаётся симптоматическим, так как на сегодняшний день не выявлено причин купирующих или даже замедляющих прогрессирование существующих симптомов (121). Больные должны наблюдаться у невролога с частотой каждые три – шесть месяцев, с периодическими консультациями психиатра и терапевта (122), (123). Симптоматическое лечение доступно для широкого спектра проявлений, даже для очень редких и плохо изученных. Здесь можно выделить два подхода к коррекции патологических проявлений – медикаментозная и немедикаментозная терапия. Симптоматическое немедикаментозное лечение включает в себя применение вспомогательных предметов таких, как трости и ходунки, предотвращающие падение; переустройство квартиры с установкой поручней, подъёмных туалетных сидений и скатов для инвалидных колясок,

приобретение лёгких столовых приборов и специальных вешалок для одежды помогает вести наиболее независимую жизнь от окружающих. Широко применяется терапия речевых расстройств и дизартрии. При выраженной дизартрии используются планшеты для письма и электронные устройства с целью коммуникации с окружающими. Когда дисфагия становится выраженной, эзофагоскопия может помочь установить конкретное место задержки пищи. Немаловажную роль в сохранении максимально возможного объёма движений играет контроль веса, так как ожирение значительно ограничивает передвижение и самообслуживание таких больных. Хотя не было выявлено влияния на прогрессирование нарушения движений и мышечной слабости ЛФК и физиотерапии, больные должны быть, по возможности, активны. При утомляемости немедикаментозное лечение включает в себя обучение больных и сиделок, коррекция поведения, физическая активность (124). Важным моментом является уход за больным, диета, специальные приспособления и социальная адаптация в обществе и семье больных полиглутаминовыми заболеваниями (125).

Симптоматическая медикаментозная терапия включает в себя общеукрепляющие средства, витамины, ноотропы и церебропротекторы. В последнее время стали внедряться такие препараты, как литий (126), (127) и инсулиноподобный фактор роста 1 (128), которые улучшают неврологические функции модельных мышей и пациентов со СЦА1. Широко также применяется симптоматическое лечение различных проявлений СЦА. Ряд научных статей описывает лечение экстрапирамидных, психических болевых симптомов, которое, в основном, проводится по широко распространённым, общепринятым схемам. Так, положительное влияние на хореиформные движения оказывают нейролептики, такие как галоперидол и оланзапин. Гипокинезия лечится антипаркинсоническими препаратами, которые, однако, могут увеличить хорею. (129), (130), (131). Психотропные

средства хорошо купируют такие расстройства, как депрессия и психотические симптомы. Лечение депрессии и эпилептических приступов осуществляются по стандартным схемам у таких больных (132), (133). При диссомнии и синдроме беспокойных ног лечение проводится агонистами допамина и леводопой (134). Боль обычно возникает из-за различных причин. Это может быть костно-мышечная, нейропатическая, вторичная, вызванная дистонией, или смешанная боль. Судороги мышц могут быть сняты мексилетином или карбамазепином (135); (136). В лечении мозжечкового синдрома нет достаточно убедительных положительных результатов. Имеют место лишь отдельные случаи клинических исследований в области коррекции мозжечкового синдрома доступными фармакологическими средствами. Большинство сообщений об успешных клинических исследованиях относится к СЦА 3. Так, было показано, что сульфаметоксазол и триметоприм улучшают походку и координацию движений (137); тетрагидробиоптерин – временные тесты (138); талтирелин гидрат – мозжечковую дизартрию (139); тандоспирон – показатели шкалы атаксии (140); ламотриждин – походку (141). Также имеется одно сообщение о положительном влиянии ацетазоламида на показатели атаксической шкалы (142) при СЦА6. Тем не менее ни один из известных методов лечения нельзя назвать эффективным, и проблема разработки методов патогенетической терапии стоит чрезвычайно остро для всех СЦА.

Предотвращение вторичных осложнений у пациентов с полиглутаминовыми СЦА заключается в контроле респираторных нарушений таких, как пневмонии. Наиболее тяжёлые осложнения связаны с бульбарным парезом, такие осложнения (асфиксия и аспирационная пневмония) могут быть опасны для жизни больного. Такие больные должны принимать пищу тщательно измельчённой и избегать веществ, трудно поддающихся жеванию и глотанию (143).

Веществами противопоказанными к применению являются алкоголь и препараты, вызывающие доказанное поражение нервных клеток (такие, как изониазид и др.). L-допа-содержащие препараты могут увеличить хорею. Также негативное влияние оказывают алкоголь и курение. Больные склонные к падениям должны избегать скользких и неровных поверхностей.

Заключение. Полиглутаминовые заболевания самые распространённые формы наследственных атаксий, имеют в своей основе схожие патогенетические механизмы и проявления. Заболеваемость в РФ имеет некоторые отличия от общемировых показателей. Даже без учёта якутской популяции, заболеваемость СЦА1 выходит на первое место в нашей стране. Подходы к симптоматической терапии однотипны для всех полиглутаминовых заболеваний, в том числе к СЦА1 и не обеспечивают увеличения продолжительности и значимого повышения качества жизни. В связи с этим, необходима разработка патогенетического лечения, основанного на знаниях о поражении молекул-мишеней и путей передачи сигналов клеток коры мозжечка и структур продолговатого мозга, отвечающих за жизненно важные функции.

1.2. Патогенез развития СЦА 1

1.2.1. Динамические мутации. Механизм тринуклеотидного удлинения

Полиглутаминовые СЦА относятся к обширной группе динамических мутаций, отличительной чертой которых является изменение длины тринуклеотидных повторов на определённом участке ДНК при делении соматических или зародышевых клеток. Увеличение цепочки СAG повторов в человеческой ДНК играет ключевую роль в патогенезе полиглутаминовых заболеваний. Изначально увеличение СAG повторов было обнаружено, как событие, связывающее два поколения, возникающее во время репликации ДНК. Однако более поздние исследования с использованием модельных систем бактерий, дрожжей и мышей показали, что такое увеличение

возможно и в соматических клетках во время репликации (144), репарации ДНК (145), транскрипции (146) и рекомбинации (147). Однако основными механизмами удлинения тринуклеотидных повторов являются два: зависимый от репликации, и зависимый от репарации (148); (149).

С нарастанием длины многих тринуклеотидных повторов, возрастает опасность нарушения нормальной структуры цепочки ДНК. В основе данной патологии лежит феномен самоорганизации нуклеотидных молекул. Так, различные длинные области с повторами, в том числе и CAG цепочка, сами по себе способны образовывать стабильные вторичные структуры. CxG повторы (где x – это A, T или G), то есть, CAG, CTG (147) и CGG (150) могут образовывать связи между двумя соседними парами CG с появлением внеспиральных структур ДНК. Это такие структуры, как шпильки, i-мотивы (151), e-мотивы и квадруплексная ДНК (152). Так как нуклеотиды AT связаны двумя, а GC — тремя водородными связями, на разрыв GC требуется больше энергии. Процент GC-пар и длина молекулы ДНК определяют количество энергии, необходимой для диссоциации цепей: длинные молекулы ДНК с большим содержанием GC более тугоплавки (153). Это явление лежит в основе нарушения репликации и репарации при полиглутаминовых заболеваниях. Ферменты, участвующие в данных процессах сверхэнергозависимы. Энергия нужна не только для распознавания повреждений, но и разрыва водородных связей между комплементарными основаниями. Поэтому значительное увеличение количества «тугоплавких» связей C-G значительно замедляет и даже останавливает продвижение таких ключевых ферментов, как MSH2/MH6 при репарации и FEN-1 при репликации (154).

Удлинение, по определению, происходит из захвата петлеобразной промежуточной структуры ДНК в геномную ДНК. Во время репарации MSH2/MH6 комплекс объединяется с единичным ошибочно спаренным основанием, что приводит к повороту ДНК на 60° на участке неправильного

спаривания. Этот изгиб является важным этапом в распознавании, и переход от изогнутой к нормальной структуре распознаётся MSH2/MSH6, как нарушенный участок ДНК (155). Однако объединение MSH2/MSH3 со шпилькой CAG приводит к подавлению АТФазной активности этого белкового комплекса, что ведёт к нарушению его объединения с ДНК и изменению его сродства к нуклеотидам. Сама форма шпильки предотвращает соскальзывание комплекса с участка повреждения. В итоге комплекс MSH2/MSH3, не просто объединяется, а «припаивается» к шпильке, поэтому он распознаёт неправильно спаренные основания, но, объединившись, не может исправить нарушения (156). Система репарации неправильно спаренных оснований будет работать нормально на большинстве участков генома, но не на участке CAG шпильки. При вышеописанных нарушениях происходит «захват» промежуточной структуры, вызывая удлинение на участке CAG шпильки. Удлинение у животных может возникать и в составе системы репарации разрыва одноцепочечной ДНК, как следствие репарации путём выщепления оснований [BER], и возможно, в составе системы вырезания нуклеотидов [NER], по крайней мере, в соматических клетках (157).

В половых клетках репарация также играет важное значение. Нарушение репарации при образовании вторичных внеспиральных структур приводит к стабильному переносу петель ДНК без их вырезания при первом митотическом делении, где они могут выступать в качестве матрицы для нового синтеза. Кроме того, подготовка к делению клетки включает в себя такой важный процесс, как репликация ДНК. Было также показано, что удлинённая CAG цепочка нарушает работу этого процесса. Увеличение CAG повторов происходит при удалении РНК-затравок и соединении фрагментов Окадзаки. Исследования на дрожжах показали, что вторичные структуры более часто образуются на отстающей нити ДНК, и эти структуры более подвержены мутации (158). При застройке брешей по отстающей цепи,

содержащей повторы, образуются флэп-структуры, которые в норме расщепляются FEN1. Фермент FEN-1 существует в виде кольца, которое скользит вдоль нити ДНК до его объединения с флэп-структурой. Это объединение приводит к отсоединению флэп-структуры (159). Если в пределах флэп-структуры находятся повторы, то возможно формирование вторичных неспиральных свисающих участков, что препятствует отщеплению вытесняемой цепи флэп-эндонуклеазой. Если флэп-структура не удалена, (лигирование) сшивание перемещённой нити происходит с нитью дополнительной ДНК. Таким образом, задержка в расщеплении образующейся в результате ресинтеза свисающей цепи ДНК приводит к увеличению числа повторов (160).

Внеспиральные структуры ДНК присутствуют в нестабильных, более сложных мини сателлитах таких, как теломеры. Эти множественные структуры, играют роль в геномной и хромосомной нестабильности. Также было показано, что CAG/CTG и CGG/CCG цепочки могут содержать ломкие участки (161); (162), и что они более склонные к порыву и повреждению ДНК, чем нормальные участки (163). Ломкие участки были описаны в дрожжах (164); (165); (166); (167) и клетках млекопитающих (168). Обычный ломкий участок в геноме млекопитающих определяется как локус, который имеет промежутки и разрывы в состоянии репликационного стресса (163); (168); (169). В данном состоянии, система контрольных точек может остановить клеточный цикл и активировать соответствующий клеточный ответ (167), (170); (171). В соответствии с этим, повреждение системы контрольных точек или белков прогрессии клеточного цикла увеличивает нестабильность хромосом и их перестройку (167); (172); (173). На модели дрожжей было показано, что удаление Mec1 (гомолог человеческого ATR) и Rad53 (гомолог человеческого Chk2) приводит к увеличению ломкости удлинённых CAG повторов (174). Новые данные о вовлечении механизма репарации ДНК при удлинении свидетельствуют о том, что среда,

окружающая хроматин, может определять восприимчивость особого повторяющегося локуса к повреждению ДНК и нестабильности, следующей за репарацией (175); (176); (177); (178); (179).

Вышеописанные генетические механизмы лежат в основе феномена антиципации. Она наблюдается при доминантных заболеваниях, когда происходит более раннее начало заболевания и усиление симптомов в последующих поколениях. Вариации в возрасте начала заболевания, особенно уменьшение возраста, начала заболевания в последующих поколениях, является отличительной чертой полиглутаминовых заболеваний. Оно связано с тем, что длина CAG повторов меняется во время передачи — то есть, зародышевый мозаицизм—молекулярное объяснение этого феномена. Тогда как нормальные аллели передаются без изменений, чистые удлинённые аллели нестабильны число CAG повторов имеет тенденцию к увеличению во время передачи (от +0,5 CAG повторов для СЦА3 до +12 CAG повторов для СЦА7) (180). Отцовское увеличение аллеля более нестабильно. Отцовская нестабильность аллелей часто связана с большим количеством митотических делений при созревании сперматозоидов во время гаметогенеза, но также может быть связано с повреждением активности и снижением концентрации белков, восстанавливающих ДНК (181). Частота таких увеличений указывает на степень нестабильности в поколениях и, стало быть, на антиципацию. У СЦА1 она составляет 15% (182), у СЦА3 8% (183), а также у других полиглутаминовых СЦА, за исключением СЦА6.

1.2.2. Гены, ответственные за развитие полиглутаминовых СЦА

При каждой полиглутаминовой СЦА определён единственный ген, ответственный за это заболевание. Так, ATXN1 единственный известный ген, ассоциированный с СЦА1. Он расположен на коротком плече 6-й хромосомы в позиции 23, а точнее, между парами оснований 16,299,342 и 16,761,720 (14); (105). А ATXN3 (известный ранее, как MJD1) единственный известный

ген, вызывающий СЦА3. Он располагается на 14 хромосоме, в позиции 21, а конкретно между парами оснований 92,524,895 и 92,572,964 (184).

Увеличение СAG повторов в вышеуказанных генах является мутационным механизмом во всех семьях, больных СЦА1 и СЦА3, исследованных на сегодняшний день (14), (96), (97), (185). СAG повторы очень полиморфны в нормальной популяции и их число варьирует от 4 до 39 (14). При СЦА1, СAG повторы нестабильны и их количество составляет от 40 до 91. Чем длиннее цепочка этих повторов, тем раньше начинается заболевание и тем тяжелее его клинические проявления (14); (96); (97). Нормальный аллель гена АТХN3 состоит из менее, чем 44 СAG повторов (186). В общем, 93.5% нормальных аллелей имеют менее 31 СAG повторов. Но эта прямая зависимость тяжести заболевания от длины цепочки повторов в гене не всегда однозначна. Так, аллели гена АТХN1 с 39-44 СAG повторами могут не вызывать атаксии (187), (188), (189), при условии, что в этих аллелях (как правило, начиная с 21 СAG и более повторов) прерывается 1-3 САТ тринуклеотидами, тогда как аллели, вызывающие заболевания, имеют непрерывные СAG повторы (190); (191). В гене АТХN3 цепочку СAG прерывают 3, 4 и 6-й позициях не САТ, а САА и ААГ тринуклеотиды, соответственно (192), (193). Отличие непатогенных прерывистых аллелей от патогенных не прерывистых аллелей в 39-44 повторов требуют дополнительных исследований (190).

Мутантные нормальные (промежуточные) аллели – это аллели с 36-38 СAG повторами, но без вставок САТ. Мутантные нормальные аллели не ассоциированы с симптомами заболевания, но могут увеличиваться при передаче в последующих поколениях. Удивительно то, что большинство отцовских трансмиссий мутантного *СЦА1* аллеля очень нестабильны, медленны и увеличивают число повторов. Нестабильность СAG повторов, передающаяся преимущественно по отцовской линии, является молекулярной основой феномена антиципации при СЦА1 (194).

Также выделяют аллели со сниженной пенетрантностью. В качестве примера, женщина с 44 CAG повторами, с CAT включениями имела отца с проявлениями СЦА1, но у самой никаких проявлений не было в свои 66 лет (187); поэтому, можно считать, что она имела сниженную пенетрантность. Аллели гена ATXN3 со сниженной пенетрантностью состоят из 45 - 51 CAG повтора (195), (186), и носители их могут иметь и не иметь клинические проявления в течение их жизни.

Полной пенетрантностью аллелей гена ATXN1 считаются аллели с 39-91 CAG повторами, без прерывания CAT (191), (187), (188), (189). Аллель с 39 CAG повторами, без CAT включений считается пороговой, при которой появляются симптомы заболевания (196). Для гена ATXN3 этот показатель несколько ниже 52 - 86 CAG повторов без прерывания. Был описан случай начала заболевания СЦА1 в подростковом возрасте, где имело место увеличение до 91 CAG повтора (191).

1.2.3. Строение и функция нормальных полиглутаминовых белков на примере атаксина 1 и атаксина 3.

Продуктом экспрессии генов, ответственных за развитие вышеперечисленных полиглутаминовых заболеваний, являются белки. Это различные по своему строению и размеру образования, однако имеющие схожие функции. Общей функцией этих белков является их влияние на процесс переноса и преобразования генетической информации клетки от ДНК к РНК (Таблица 4). Это могут быть непосредственно факторы транскрипции, как α 1ACT и ТВР, объединяющиеся с последовательностью ДНК, так и влияющие на этот процесс опосредованно, то есть, являющиеся коактиваторами или корепрессорами в составе транскрипционных белковых комплексов, такие как атрофин 1, атаксины 1, 3 и 7. Атаксин 2 же оказывает влияние, но на следующую ступень передачи генетической информации – на процессинг РНК. Помимо влияния на транскрипцию, данные белки могут

обладать и другими немаловажными функциями – регулировать функцию цитоскелета, как атаксин 3, или участвовать в деградации субстратов неправильно упакованных белков, как атаксин 1 и атаксин 3. Отличительной особенностью гена *SACNA1A* является то, что он кодирует белок, выполняющий 2 различные функции – он является, выше упомянутым, фактором транскрипции, и, в то же время, образует пору потенциал зависимого Ca^{2+} канала (197).

| Заболевание | Белок | Функция | Источник |
|--------------|------------------------------|---|-----------------|
| СЦА1 | Атаксин 1 | Регулятор транскрипции | (198); (199) |
| СЦА2 | Атаксин 2 | Регулятор процессинга РНК | (200) |
| СЦА3 | Атаксин 3 | Регулятор транскрипции и белкового гомеостаза | (201) |
| СЦА6 | α 1ACT | Фактор транскрипции | (197) |
| | α 1a субъединица VGCC | Ca^{2+} канал – гомеостаз кальция | |
| СЦА 7 | Атаксин 7 | Коактиватор транскрипции | (202) |
| СЦА17 | Белок, объединяющийся с TATA | Фактор транскрипции | (203); (204) |

Таблица 4. Название и функции полиглутаминовых белков в норме.

Вышеуказанные функции данных белков тесно связаны с их строением (Рисунок 2). Транскрипция ДНК, происходит в ядре клетки, поэтому все вышеперечисленные белки имеют в своём составе последовательности, под названием, сигналы ядерной локализации (**NLS**). Подавляющее большинство ядерных белков импортируется в ядро по стандартному NLS-зависимому механизму. Необходимость пребывания полиглутаминовых белков, в частности, атаксина 1 внутри ядра для развития функций, в том числе

токсических эффектов, подтверждена генетическими исследованиями. Атаксин 1 содержит последовательность NLS на его С конце (205). Атаксин-7 имеет не 1, а сразу 3 NLS последовательности. Инактивирование NLS, как это видно на примере атаксина 1, при помощи замещения одной аминокислоты, Лиз в положении 776 на Тре, нарушает процесс перемещения его в ядро клетки, что приводит к отсутствию патогенетических явлений, несмотря на сохраняющуюся увеличенную полиглутаминовую цепочку. Эти результаты показывают, что свойство мутантного атаксина 1 вызывать заболевание связано с пребыванием его в ядре клетки (205).

Внутриядерные взаимодействия полиглутаминовых белков с белками комплексов-модуляторов транскрипции протекают не по всей их длине, а в определённых участках. Так, атаксин 1 имеет обширный участок, включающий АХН домен, объединяющийся с РНК. АХН домен схож по строению с определённым участком фактора транскрипции НВР1 (белок 1, объединяющийся с высокоподвижной группой бокса фактора транскрипции) (206). Однако АХН домены НВР1 и атаксина 1 приобретают различную конформацию, что приводит к значительным их отличиям (207). Было высказано предположение, что АХН домен атаксина 1 объединяется с регуляторной РНК и что по аналогии с НВР1, он также участвует в регуляции транскрипции (208). Кроме его роли в транскрипции, свойство объединяться с РНК (аминокислоты 541-767) указывает на возможную роль атаксина 1 в процессинге РНК включая регуляцию сплайсинга РНК, стабилизацию мРНК, транспорт мРНК и ядерный экспорт мРНК (209). Более доказано свойство АХН домена атаксина 1 в объединении с белками комплекса-модулятора транскрипции (210). Так, несколько регуляторов транскрипции взаимодействуют с атаксином 1 через АХН домен. Такие регуляторы транскрипции включают в себя корепрессор SMRT (silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors – медиатор сайленсинга ретиноидных рецепторов и рецепторов гормонов щитовидной железы) (211),

SENS дрозофилы (Senseless - Нечувствительность) и его гомолог у млекопитающих Gfi1 (growth factor-independent 1 – независимый от фактора роста (белок) 1) (212), человеческий гомолог репрессора дрозофиллы CIC (Caricua) (213) и комплекс ROR α -Tip60 (9).

Атаксин 3 содержит несколько консервированных последовательностей, схожих с NR- и CoRNR-боксами L-x-x-L-L/[IL]-x-x-[IV]-I коактиваторов и корепрессоров транскрипции, соответственно (214). С помощью этих участков атаксин 3 взаимодействует с гистонами и гистонацетилаферазами CBP, p300, и PCAF, которые работают, как коактиваторы транскрипции. Также регуляция транскрипции происходит с помощью двух UIM последовательностей атаксина 3 через (де-) убиквитинирование гистонов (215). Также было показано, что атаксин 3 взаимодействует с убиквитин-подобным (UBL) доменом гомологичных факторов, объединяющихся с убиквитином и протеасомами таких, как hHR23A и hHR23B (216); (217); (218). Эти факторы также вовлечены в путь эксцизионной репарации нуклеотидов посредством нацеливания убиквитинированного фактора эксцизионной репарации XPC/Rad4 на протеасомы (219).

Однако было показано, что в цитоплазме полиглутаминовые белки также выполняют важные функции. Поэтому они должны экспортироваться из ядра в цитозоль клетки. У атаксина 3, 7 и атрофина 1 была определена специфическая последовательность - NES (nuclear export signal) (наличие NES последовательности у атаксина 1 не доказано), с помощью которой происходит распознавание белков, нуждающихся в экспорте из ядра клетки (220); (221). Данная последовательность также, как и NLS, может располагаться, как на С, так и на N концах и даже посередине белковой цепочки (Рисунок 2).

Главная цитозольная функция атаксина 3 заключается в контроле качества клеточных белков (222). В частности, вышеупомянутая функция UIM последовательностей не столь однозначна (223). Убиквитинирование

выполняет множество клеточных функций и в цитоплазме, такие как цитоплазматический транспорт, сопровождение специфических белков через внутриклеточные пути, и направление белков к протеасомам. Кроме того, убиквитин-протеасомный путь вовлечён в процессинг мутантных и повреждённых белков, которые вызывают нейродегенеративные заболевания. (224); (225). Функциональные исследования показывают, что атаксин 3 – это убиквитин протеаза (226); (227), а Джозефиновый домен выступает в роли каталитического домена этой протеазы (228). Также Джозефиновый домен (226) функционально относится и вовлечён в механизм образования цитоскелета, транспорт везикул и клатрин-зависимый эндо- и экзоцитоз (229). У атаксина 1 АХН домен, также играет важную роль в непатогенных функциях в цитозоле клетки, что доказано в отношении димеризации белка полной длины, его агрегации, а также во взаимодействии атаксина 1 с другими белками цитозоля клетки (Таблица 5) (230).

| Биологическая значимость | Белок | Область взаимодействия с атаксином 1 | Модуляция с помощью ПолиQ | Источник |
|--------------------------|-----------------|--------------------------------------|---------------------------|----------|
| Регуляция транскрипции | BOAT | SAR | Нет | (231) |
| | CCNK | Нет данных | Неизвестно | (232) |
| | CIC | АХН | Неизвестно | (233) |
| | DAZAP2 | Нет данных | Неизвестно | (232) |
| | DERP6 | Нет данных | Неизвестно | (232) |
| | PQBP1 | Нет данных | Да | (232) |
| | NCOR2/SMART | С-конец (более вероятно, АХН) | Нет | (233) |
| | HIVEP1 | Нет данных | Неизвестно | (232) |
| | HDAC3 | Нет данных | Да | (234) |
| | SIX5 | Нет данных | Неизвестно | (232) |
| | SPEN | Нет данных | Неизвестно | (232) |
| | SP1 | АХН | Да | (232) |
| | YY1AP1 | Нет данных | Неизвестно | (232) |
| | ZXH1 | Нет данных | Неизвестно | (232) |
| | GFI-1/SENSELESS | АХН | Нет | (212) |
| SMART | Нет данных | Нет | (235) | |

| | | | | |
|--|------------------------|--------------|------------|--------------|
| | RoR α | Нет данных | Нет | (9) |
| Модуляция апоптоза, регуляция транскрипции | DNAJA3 | Нет данных | Неизвестно | (232) |
| Объединение РНК, регуляция трансляции | PUM1 | Нет данных | Неизвестно | (232) |
| | RBM9 | Нет данных | Неизвестно | (232) |
| | RBPM5 | N-конец | Неизвестно | (232) |
| | A2BP1 | Нет данных | Неизвестно | (232) |
| Процессинг пре-мРНК 3' | FLJ12529 | Нет данных | Неизвестно | (232) |
| | NUDT21 | Нет данных | Неизвестно | (232) |
| | U2AF2 | Нет данных | Неизвестно | (232) |
| | p80 коилин | C-конец | Нет | (236) |
| | TAP/NXF1 | Нет данных | Неизвестно | (209) |
| Сплайсинг пре-мРНК | BAT2 | Нет данных | Неизвестно | (232) |
| Созревание малых ядерных нуклеопротеидов, сплайсинг РНК | COIL/ P80 | C-конец | Нет | (232); (236) |
| Сумоилирование | Sumo-1 | Множ. домены | Да | (237) |
| Убиквитинирование белков | Убиквитин | Нет данных | Да | (238) |
| | TRIM32 | Нет данных | Неизвестно | (232) |
| | CHIP | Нет данных | Нет | (239) |
| | UbcH6 | C-конец | Нет | (240) |
| Убиквитинирование, модуляция активности шаперонов | STUB1/CHIP | Нет данных | Нет | (241) |
| Дегградация с помощью УПС, белок-мишень для ER | A1UP/UBQLN4 | SAR | Нет | (242), (232) |
| Деубиквитинирование | USP54 | Нет данных | Неизвестно | (232) |
| | UPS7 | C-конец | Да | (243) |
| Фосфорилирование | Фосфат | C-конец | Да | (244) |
| | Акт (Протеин киназа B) | Нет данных | Неизвестно | |
| Передача сигналов | CRK | Нет данных | Неизвестно | (232) |
| | TBC1D5 | Нет данных | Неизвестно | (232) |
| | TRAF2 | Нет данных | Неизвестно | (232) |
| | Глутаматная передача | – | – | (245) |
| | Drd2-передача | – | – | (246) |

| | | | | |
|---------------------|--------------|------------|------------|-------|
| | Wnt-передача | – | – | |
| | ИФ | – | – | |
| | YWHAЕ/YWHAZ | С-конец | Да | (245) |
| Стабилизация | USP7 | С-конец | Да | (243) |
| | 14-3-3 | С-конец | Да | (243) |
| | CFL1 | Нет данных | Неизвестно | (232) |
| Цитоскелет | ITSELF | SAR | Нет | (232) |
| Неизвестно | ATXN2 | Нет данных | Неизвестно | (247) |
| | C1oRF94 | Нет данных | Неизвестно | (232) |
| | GAPDH | N-конец | Нет | (232) |
| | KIAA0174 | Нет данных | Неизвестно | (232) |
| | KLHL12 | Нет данных | Неизвестно | (232) |
| | PLEKHA5 | Нет данных | Неизвестно | (232) |
| | | | | (232) |

Таблица 5. Белки, взаимодействующие с атаксином 1. Приведены их названия, место взаимодействия с атаксином 1 и влияние на них удлинённой полиглутаминовой цепочки. SAR – самоорганизующаяся область

Таким образом, можно заключить, что наиболее важные функциональные зоны полиглутаминовых белков не только были выделены в отдельные домены, но даже названы в честь своих белков или вызываемых их заболеваний, как АХН (Атаксин 1/HBP1) домен и Джозефиновый домен (208). Однако функции их различны. Среди известных белков, объединяющихся с Atxn1, более 16 вовлечены в регуляцию транскрипции и более 9 в процесс объединения РНК и его метаболизм. Особое значение также необходимо уделить свойству атаксина 1 объединяться с белками, участвующими в деградации белков и фосфорилировании.

1.2.4. Строение и функция полиглутаминовой цепочки

У других последовательностей полиглутаминовых белков не было выявлено ярко выраженной функции, за исключением полиглутаминовой цепочки, которая присутствует во всех этих белках. Функция полиглутаминовой

цепочки изучена достаточно подробно в отношении чрезмерного её удлинения, тогда как физиологическая функция этой цепочки нормальной длины изучена слабо. Как и другие низко дифференцированные участки белков, полиглутаминовая цепочка образует гибкую прокладку между белковыми доменами, что помогает последним взаимодействовать с другими молекулами и выполнять их функции (248); (249); (250). С этим феноменом связана ещё одна нормальная функция полиглутаминовой цепочки в белках – это стабилизация белок-белкового взаимодействия (251). Из специфических функций, в частности у атаксинов 1 и 3 дикого типа, можно отметить, что нормальная патологически не удлинённая полиглутаминовая цепочка играет важную роль в нормальной конформации этих белков и нормальном их взаимодействии с другими белками клетки, а также нормальном клиренсе с помощью убиквитин-протеасомной системы.

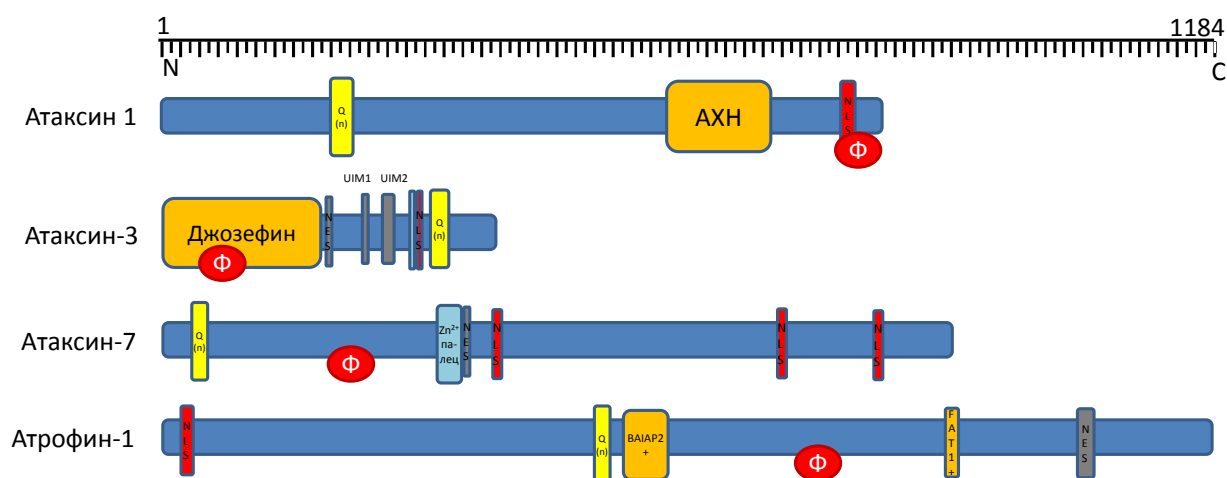


Рисунок 2. Двумерное строение полиглутаминовых белков, вызывающих СЦА. Вверху показана мерная шкала, обозначающая количество аминокислот.

1.2.5. Посттрансляционные изменения удлинённых полиглутаминовых белков: влияние на нейротоксичность

На завершающем этапе биосинтеза полиглутаминовые белки, как и большинство белков клетки, подвергаются посттрансляционным изменениям. Основными изменениями для рассматриваемых белков являются фосфорилирование, ацетилирование, убиквитирование, сумоилирование, трансглутаминирование и протеолитическое расщепление.

Фосфорилирование – это посттранскрипционное изменение, которое, регулирует расположение, изменение конформационной структуры и функцию белков. Данное посттрансляционное изменение достигается с помощью киназ, а полиглутаминовые белки – это известные их субстраты. Так, полиглутаминовый атаксин 3 – это субстрат киназы 2 (252) и гликоген синтетаз киназы 3b (253). Полиглутаминовый атаксин 3 фосфорилируется с помощью гликогенсинтетаз киназы 3b на серине 256. Замена этого серина на аланин увеличивает полимеризацию атаксина 3, что наводит на мысль о роли фосфорилирования в образовании агрегатов атаксина 3. На моделях дрозофил со СЦА 1 было показано, что активирование фосфатидил-инозитол 3-киназного/Akt пути может усугубить дегенерацию структур глаза, связанную с экспрессией мутантного атаксина 1. Для атаксина 1 фосфорилирование серина 776 играет наиважнейшую роль в объединении с белками-модуляторами транскрипции, такими как CIC (254) RBM17 (RNA-binding motif protein 17 – белок 17, объединяющийся с РНК-связывающим мотивом) и 13-3-3 (190). Однако были показаны и негативные эффекты при фосфорилировании атаксина 1 на серине 776. Так, замена серина 776 на аланин на нефосфорилируемую аминокислоту уменьшает накопление белка во внутриклеточных включениях и уменьшает токсические свойства удлинённого полиглутаминового белка (255). Таким образом, фосфорилирование усиливает токсические эффекты атаксина 1 с расширенной полиглутаминовой цепочкой (255).

1.2.6. Теория потери функции при экспрессии мутантных полиглутаминовых белков

Идея того, что мутантные полиглутаминовые белки имеют частичную потерю функций, достаточно молода. На данный момент подавляющее большинство исследований направлены на выявление и изучение приобретённых токсических функций этих белков. Однако в отношении СЦА1 был сделан прорыв в понимании роли частичной потери функций атаксина 1 в патогенезе этого заболевания. Было показано, что удаление копии *Atxn1* дикого типа в модели нокинных СЦА1 мышей (*Atxn1*^{154Q/-}) ведёт к усилению фенотипов СЦА1 (252). Более того, фенотипы и нейропатология у *Atxn1*^{154Q/+} мышей частично подавлены посредством умеренной сверхэкспрессии его укороченного паралога, *Atxn1-L* (209). Атаксин 1-L имеет большое сходство с атаксином 1, он взаимодействует со всеми тестированными белками, объединяющимися с атаксином 1, однако у него отсутствует полиглутаминовый тракт (209), (254). Все вместе эти данные указывают на частичное замещение функций атаксина 1 атаксином 1-L и на частичное смягчение фенотипов СЦА1.

Патологические механизмы при выпадении функции мутировавшего полиглутаминового белка довольно простые. Отсутствие белка в корректной конформации в случае полиглутаминовых белков-модуляторов транскрипции, в первую очередь, выражается в дисрегуляции экспрессии определённых генов (Рисунок 3). Эти важные данные были получены из экспериментов на нокаутных животных. Однако степень выраженности симптомов заболевания зависит от выключения экспрессии конкретного полиглутаминового белка. Так, в отсутствие атаксина 3 у нокаутных мышей, не происходило подавление работы транскрипционного фактора DAF-16, что проявлялось, как сверхэкспрессия некоторых генов, кодирующих белки теплового шока (255). До 12 недель у таких животных наблюдалось незначительное снижение веса, но не было выявлено атрофии структур ЦНС и атаксии. Было

замечено лишь беспокойство животных при исследовательском поведении и во время теста «открытое поле» (258). Также о незначительных последствиях при потере функции атрофина 1 говорят эксперименты на мышах с мутантным атрофином 1 с отрезанным С-концом (259).

Более пристальное внимание стоит уделить потере функции мутантного атаксина 1. При сравнении атаксин 1 нокаутных и трансгенных СЦА1 мышей, было показано, что дисрегуляция 28% от всех исследованных генов при СЦА1 вызвано потерей функций атаксина 1, а остальная, часть, была связана с приобретением его токсических функций (256). Среди почти двухсот этих генов есть очень важные, участвующие в функции разных отделов ЦНС, регуляции поведения животных, их двигательной активности, развитии нервных клеток и синаптической пластичности (260). У атаксин 1 нокаутных мышей имеет место нарушение функции гиппокампа (отклонения исследовательского поведения в новой обстановке, запоминания пространства), кратковременной синаптической пластичности, двигательной активности и некоторых нейроповеденческих отклонений при отсутствии видимых нейроанатомических нарушений (260).

Преыдушие исследования показали, что атаксин 1 взаимодействует и функционально синергичен с цинк-пальцевым транскрипционным фактором Sp1, который участвует в регуляции экспрессии допаминового рецептора D2 (Drd2) (246). Так, уровень экспрессии допаминового рецептора D2 (Drd2) значительно снижен в мозжечке нокаутных мышей с недостаточностью атаксина 1, и у молодых пятинедельных СЦА1 трансгенных мышей, экспрессирующих человеческий атаксин 1 с удлинённой полиглутаминовой цепочкой в КП мозжечка (246). Рецепторы Drd2 влияют на работу ионных каналов, фосфолипаз, тирозин киназных рецепторов, глутаматэргическую и ГАМК-эргическую нейротрансдукцию и стимулируют MAP киназные пути передачи сигналов (261). Примечательно то, что подавление функции Drd2 у мышей ведёт к уменьшению двигательной активности и связанному с этим

неврологическому дефициту, нарушению ответу на некоторые вводимые препараты и изменение электрофизиологических характеристик от Drd2-экспрессирующих нейронов (246). Эти наблюдения проливают свет на роль Drd2-зависимый допаминергический путь передачи сигналов в регуляции двигательного поведения и некоторых форм запоминания и памяти и указывают на возможные нарушения Drd2-зависимых функций, лежащих в основе развития нейроповеденческого дефицита у атаксин 1-нокаутных мышей и раннего двигательного дефицита при СЦА1.

Микроматричный анализ показал, что потеря функции атаксина 1, приводит к нарушению регуляции экспрессии генов, связанных с инициацией трансляции, путями передачи сигналов от Wnt-рецепторов, и гормонов щитовидной железы, объединением нуклеиновых кислот и каскадами внутриклеточных сигналов (262). Wnt путь передачи сигналов пересекается с RA путём при регуляции нейрогенеза, дифференцировки и специализации нейронов (263). Повреждение Wnt-рецепторного и RA путей у атаксин 1-нокаутных мышей указывает на то, что Atxn1 может регулировать генетические программы, требующиеся для правильной нейронной специализации во время развития мозжечка. Однако данные предположения входят в противоречие с вышеописанными результатами, что у атаксин 1 нокаутных мышей отсутствуют видимые нейроанатомические нарушения (260). Ответ на данный вопрос может содержаться в том, что в патологии СЦА1 не встречается полное выключение функции атаксина 1, такое, как это показывают модельные нокаутные СЦА1 организмы, поэтому эти данные имеют важность лишь в сочетании с данными, полученными на мышцах, экспрессирующих мутантные полиглутаминовые белки.

1.2.7. Теория приобретения токсических функций при экспрессии мутантных белков

Генетические исследования на мышах и дрозофилах свидетельствуют о механизме приобретения токсических функций, так как мыши с недостаточностью атаксина 1 и атаксина 3 не имеют атаксии и патологии КП мозжечка (260); (264), как было указано выше, эти данные идут вразрез с теорией о потере функций или гаплонедостаточности атаксина 1 и атаксина 3, являющиеся одним из патогенетических механизмов при СЦА1 и СЦА3. Эксперименты на линиях трансгенных мышей, экспрессирующих мутантный человеческий *СЦА1* аллель, показали, что появляющаяся при этом атаксия, в чистом виде, не зависит от гибели клеток, но зависит от дисфункции нейронов и морфологических повреждений, которые возникают задолго до явлений апоптоза (265), (266). В основе этой клеточной дисфункции лежит появление и накопление токсических мутантных полиглутаминовых белков. Мутантные, неправильно упакованные белки, способные к образованию агрегатов, наблюдаются при различных нейродегенеративных заболеваниях таких, как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз и полиглутаминовые заболевания (267); (268). Однако механизм появления агрегатов при полиглутаминовых заболеваниях имеет свои особенности. Удлинение полиглутаминовой цепочки приводит к изменению пространственной структуры белка и неправильной его конформации. При неправильной же конформации, как было показано на примере атаксина 1, происходит выпячивание гидрофобных остатков, что уменьшает растворимость таких белков (260). Также, согласно модели «полярных застёжек» («молний»), полиглутаминовые цепочки образуют удлинённые противоположные по направлению бета-цепи, удерживающиеся вместе благодаря водородным связям между основной и побочной цепями амидов, что способствует слипанию таких мутантных белков и ещё большему образованию агрегатов. Эти механизмы хорошо изучены *in vitro*, что позволило описать кинетику агрегации (269); (270). Так были выделены скрытый, растянутый во времени, период формирования агрегатов и быстрый

период присоединения мономеров полиглутамина к растущим агрегатам (271); (272).

Длительное время ведутся дискуссии, какая фракция мутантного белка более токсична, растворимая или нерастворимая. Изначально неправильно упакованные мутантные белки слипаются между собой, образуя ди- и олигомеры, которые обладают токсическими свойствами. И их токсичность, вероятнее всего, более выражена, чем видимых агрегатов, так как они способны передвигаться в цитоплазме и ядре клетки и взаимодействовать с другими белками, такими как близко родственные белки и белки-мишени в каскаде передачи сигналов (273). Было, в частности, доказано, что внутриядерное перемещение атаксина 1 более критично для клеточной гибели, чем образование агрегатов (205), (274); (275). Феномен взаимодействия с белками-мишенями лежит в основе патологического изменения экспрессии генов при полиглутаминовых СЦА (см. ниже).

Усиление взаимодействия полиглутаминовых белков с белками-мишенями наблюдается и при других СЦА. Так, свойство растворимой фракции мутантного атаксина 3 взаимодействовать с E3 убиквитин-лигазой «паркин», играющей роль в патогенезе Паркинсонизма, намного сильнее, чем у атаксина 3 дикого типа (276). Однако в большинстве случаев, объединяясь с белками-мишенями, олигомеры существенно увеличивают массу этого комплекса, по сравнению с нормальным белком, что ведёт к значительному замедлению таких биологических процессов, как транслокация, активация субстратов и т.п. (277).

При дальнейшей адгезии олигомерных мутантных белков образуется полимерная структура, которая неспособна к перемещению в цитоплазме и нерастворима. Однако было показано, что агрегаты иммуноположительны и к вышеупомянутым близко родственным белкам, и к белкам-мишеням, а также, к молекулам фибрина, компонентам убиквитин-протеасомной системы, состоящие из субъединиц убиквитина и протеасом т.д. (278); (275).

Совокупность этих нерастворимых структур, образует агрегаты. Образование агрегатов представляется, как логическое завершение неправильной конформации мутантных белков. На моделях клеток и животных было показано, что агрегаты способны образовываться при всех полиглутаминовых заболеваниях.

1.2.8. Нарушение генетических механизмов при приобретении мутантными полиглутаминовыми белками токсических функций.

Неправильно конформированный мутантный полиглутаминовый белок, как это было показано на атаксине 1, в силу своих токсических свойств, также может вызывать изменение экспрессии генов, однако механизм более сложен, чем при простой недостаточности его в организме (256) (Рисунок 3). Так как нормальные полиглутаминовые белки являются коактиваторами одних генов и корепрессорами других, то нарушение транскрипции при СЦА с динамическими мутациями может протекать в направлении подавления или активации, в зависимости от точки приложения конкретного мутантного белка. Наибольшее влияние на нарушение экспрессии оказывают агрегаты через объединение последних с белками-мишенями. Белками-мишенями, в данном случае, являются либо сами транскрипционные факторы, либо белки транскрипционного комплекса. Наиболее часто патологические процессы при полиглутаминовых СЦА протекают в направлении подавления экспрессии генов. Три механизма торможения транскрипции были показаны для полиглутаминовых белков, включая секвестрацию активаторов/коактиваторов транскрипции посредством включений полиглутамин-содержащих белков (279); (280); (281); (282); (283), ингибирование гистонов ацетил трансферазной активности коактиваторов таких, как СВР/p300 (284), и прямую корепрессорную активность (285); (286).

В мозжечке наиболее часто наблюдается патологическое взаимодействие мутантных полиглутаминовых белков с другими белками, содержащими

короткие полиглутаминовые цепочки, такие как белок, объединяющийся с транскрипционным активатором CREB, или СВР, как это было показано на моделях животных с БГ и ДРПЛА (282). Также было показано токсическое изменение самого транскрипционного коактиватора CREB мутантными полиглутаминовыми белками в моделях СБМА и СЦА3 (281). При СЦА7, в сетчатке глаза атаксин 7 активно подавляет другой фактор транскрипции – CRX, что вызывает подавление множества фоторецептор-специфических генов (280).

Супрессорные свойства мутантного атаксина 1 также ярко выражены, однако механизм взаимодействия его с транскрипционным комплексом более сложен. Это не только приобретение новых супрессорных свойств, но и усиление или ослабление физиологической супрессии. Так, растворимая фракция удлинённого атаксина 1 способна объединяться с такими факторами транскрипции, как PQBP-1 и Brn-2 (287) и, усиливая свою супрессорную функцию, чрезмерно подавлять экспрессию одних генов и способствовать прогрессии СЦА1. С другой стороны, повышенное сродство мутантного атаксина 1 к некоторым белкам транскрипционного комплекса, таким как Rbm17, лежит в основе недостаточной супрессии транскрипции других генов (Рисунок 3) (256).

Потеря функции

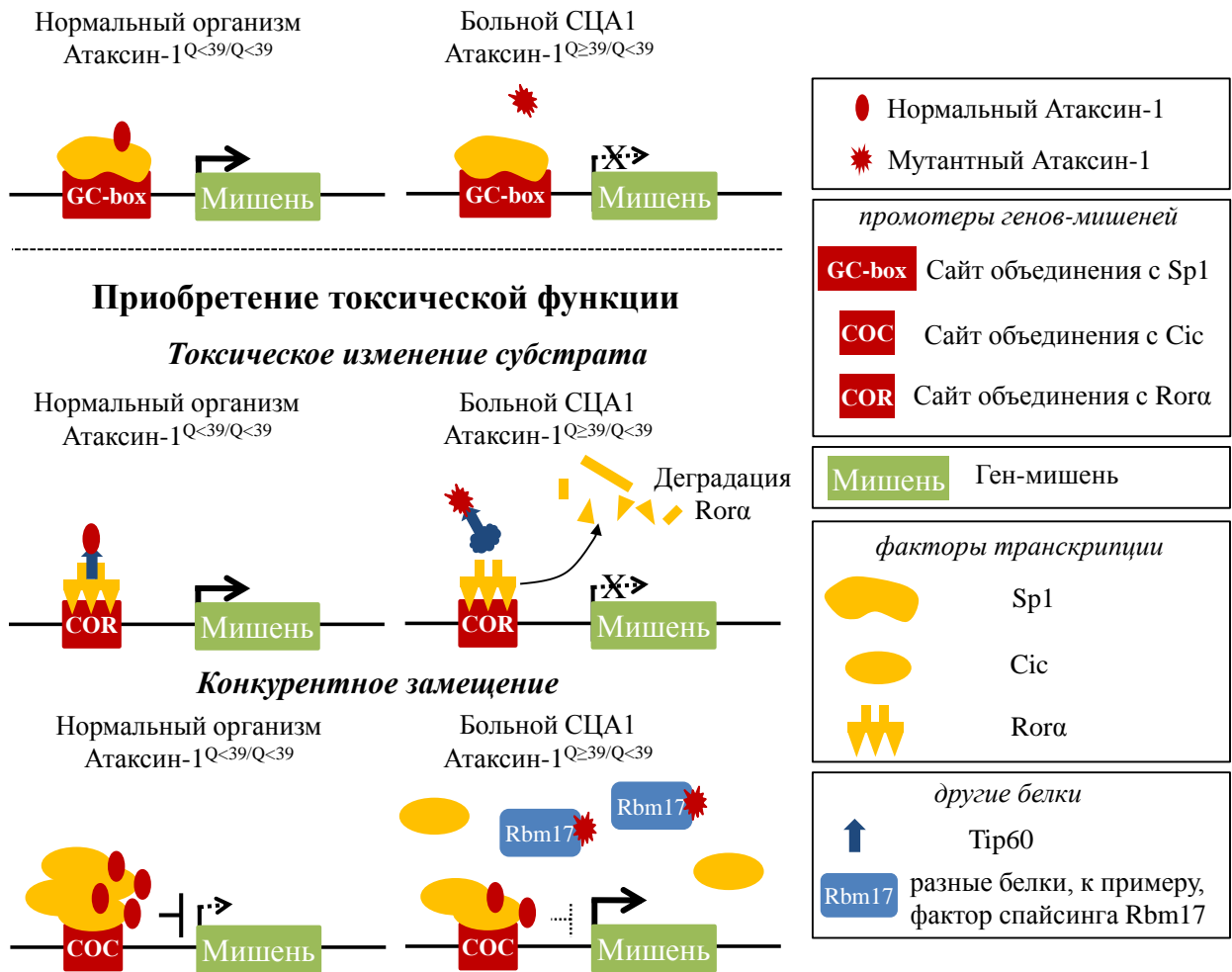


Рисунок 3. Типы транскрипционных нарушений при СЦА1. Объединение промотора гена-мишени с комплексом атаксин 1-фактор транскрипции, в норме, приводит к запуску транскрипции гена-мишени. У СЦА1 больных и модельных организмов мутантный атаксин 1 приобретает неправильную конформацию и не может объединиться с фактором транскрипции Sp1, что ведёт к торможению экспрессии гена-мишени (246). Приобретение токсических функций атаксина 1 может вызывать неправильную конформацию не только этого белка, но и его субстратов таких, как Tip60. Неправильная конформация последнего препятствует его объединению с фактором транскрипции Rora и последующей активации транскрипции гена-мишени (288); (289). В некоторых случаях, мутантный атаксин 1 потенциально способен взаимодействовать с факторами транскрипции,

такими как Cіс, но он ассоциирован, преимущественно, с другими белковыми комплексами, такими как Rbm17, тогда как уменьшение атаксин 1-Cіс комплексов дестабилизирует Cіс и уменьшает уровень последнего на промоторах, что приводит к уменьшению репрессии генов-мишеней (Переработано от (256)).

Однако имеет место и подавление активации генов по тем же механизмам, что и при СЦА3, СЦА7, БГ и СБМА (см. выше). К примеру, токсическое влияние мутантного атаксина 1 на белок транскрипционного комплекса Tip60, приводит к изменению конформации последнего и отсутствию взаимодействия с фактором транскрипции ROR α и подавлению экспрессии генов. Так, было выявлено, в общей сложности, около трёхсот генов с нарушенной экспрессией у СЦА1 модельных мышей. Из них следует отметить наиболее важные гены, кодирующие mGluR1, кальбиндин, и другие, экспрессирующиеся при активации фактора транскрипции ROR α . Успешное объединение нормального атаксина 1 с такими транскрипционными факторами, как RoR α , Tip60 и YAP, отвечает за правильное развитие мозжечка и, в частности, КП (9); (290). Транскрипционный фактор RoR α – чрезвычайно важный и поэтому, наиболее изученный транскрипционный фактор на данный момент (9); (256). Анализ показал, что КП животных с отсутствием экспрессии RoR α , у так называемой *staggerer* линии мышей, запаздывают в развитии и сохраняют недоразвитые свойства в течение всей жизни. Морфологически, это выражается в уменьшении дендритов КП с уменьшением шипиков, исчезновением синапсов КП с параллельными волокнами и сохранением временных лазающих волокон (291); (292). Электрофизиологические эксперименты показали, что КП с отсутствием RoR α , имеют множественную иннервацию лазающими волокнами типичными для эмбриональной стадии и происходящими от нижних олив, во взрослом состоянии (293). Это доказывает, что активность параллельных

волокон важна для нормального развития и последующего уменьшения лазающих волокон. Кроме того, нарушение работы RoR α ведёт к селективной деградации нейронов мозжечка. К 12 месяцам жизни, в мозжечке *staggerer* гетерозиготных мышей находится на 35% меньше КП, на 35% меньше гранулярных клеток, и на 40% меньше клеток нижних олив. (294). Однако при СЦА1 имеет место не полное выключение функций ядерного рецептора RoR α , а лишь его нарушение из-за неправильного взаимодействия последнего с мутантным атаксином 1. Поэтому деградация нейронов КП и их атрофия имеет менее выраженный характер, чем у мышей линии *staggerer* (295).

1.3. Клеточные нарушения

Учитывая всё выше сказанное, можно заключить, что полиглутаминовые СЦА – это чрезвычайно сложные заболевания. С одной стороны, единственный мутантный ген при каждом рассмотренном заболевании, кодирует единственный мутантный белок. Однако данный белок вступает во взаимодействие с десятками белков-коактиваторов транскрипции, которые в свою очередь, управляют работой десятков факторов транскрипции (Таблица №5) и, тем самым, осуществляют контроль над сотнями генов-мишеней (256). Таким образом, имеет место нарушение работы сотен генов, функция которых, зачастую, является невыясненной. Однако постепенно прослеживаются некоторые пути передачи сигналов, потенциально, оказывающие важное влияние на жизнедеятельность КП, их пластичность и развитие атаксии. Это, без сомнения, гены, отвечающие за экспрессию таких белков КП, как кальбиндин; белков изменяющих метаболизм клеток через каскады сигналов: mGluR1, IP₃ (296); белков, взаимодействующих с факторами роста: IGFBR, TGFB (297); белков RAS (298), белков клеточного цикла и дифференцировки генетического материала: CREB (299), Cyclin D1; белков, отвечающих за миграцию клеток при эмбриогенезе: Tiam2 и др. (256).

1.3.1. mGluR1 путь передачи сигналов и его нарушение

Особый интерес для понимания молекулярного патогенеза мозжечкового атаксического синдрома вызывает mGluR1. На сколько важна нормальная работа mGluR1, было показано в работах с использованием мышей с отсутствием mGluR1 (300), так как эти мыши имели выраженную атаксию, нарушение образования синапсов между КП и ЛВ и отсутствие LTD (301); (302); (303). Экспрессия mGluR1 в мозжечке таких мышей восстанавливает нормальное образование синапсов между КП и ЛВ, синаптическую пластичность и двигательный контроль мозжечка (300).

Эти рецепторы широко экспрессируются на постсинаптической мембране КП. Сама КП возбуждается при высвобождении глутамата из пресинаптических окончаний ПВ и ЛВ через активацию, в основном, постсинаптических глутаматных рецепторов AMPA-типа. Однако механизм активации mGluR1 более сложен. При более сильном раздражении, таком как, высоко частотное раздражение ПВ происходит вытекание глутамата из синаптической щели, и ведёт к активации парасинаптически расположенных mGluR1. Предыдущие исследования показали, что mGluR1 вовлечены в образование медленных ВПСТ, эндоканнабиноид-опосредованного ретроградного торможения ПВ ВПСТ, которое известно, как синаптически вызванное торможение возбуждения, и запуск долговременной депрессии в ПВ-КП синапсах (Рисунок 4). Эти рецепторы, также, играют важную роль в других важных внутриклеточных процессах таких, как рост клеток, их дифференцировка и выживание. В частности, коактивация mGluR1 и ГАМКв рецепторов увеличивают нейрогенез у взрослых посредством активации стволовых клеток, находящихся в нейрогенных нишах мозга. Также они влияют на синаптические и внесинаптические процессы (304), (305).

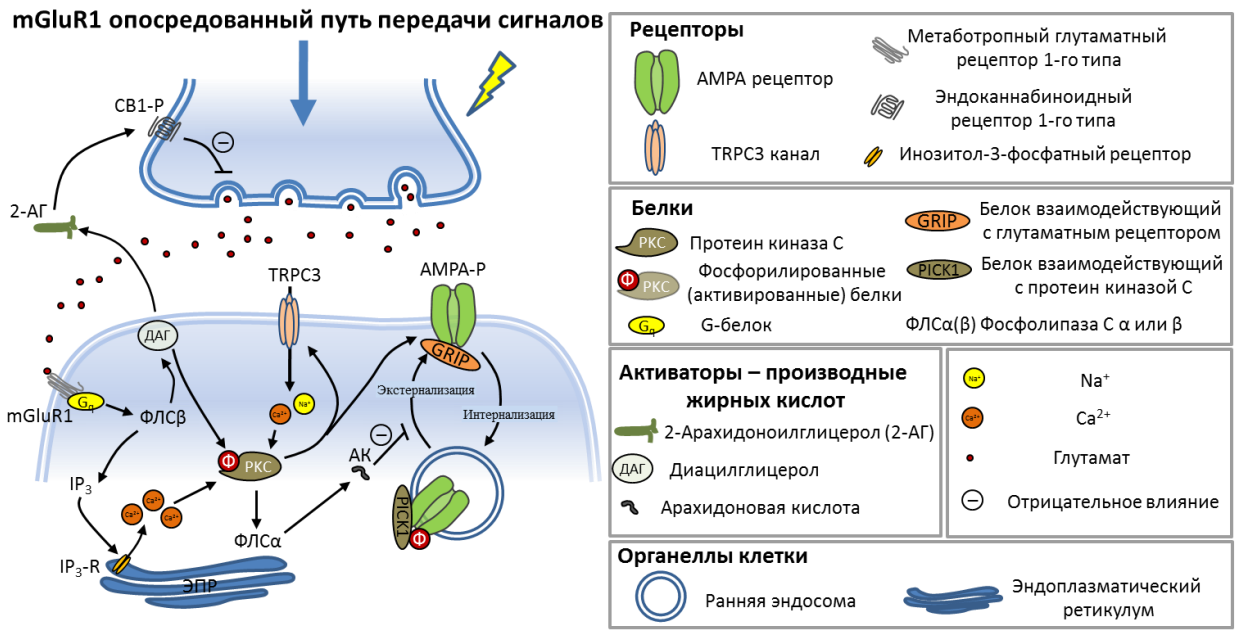


Рисунок 4. mGluR1 опосредованный путь передачи сигналов и участие mGluR1 в процессах кратковременной и долговременной памяти КП. Импульс, приходящий в пресинаптическое окончание, провоцирует выделение нейромедиатора глутамата в синаптическую щель. Так как mGluR1 расположены на периферии постсинаптической мембраны (парасинаптическое расположение), требуется усиленное или высоко частотное раздражение пресинаптических терминалий для образования излишек и вытекания глутамата за пределы синаптической щели в места расположения mGluR1. При активации mGluR1 происходит изменение метаболизма клетки посредством активации каскада сигналов, что можно регистрировать электрофизиологически, как 1. Увеличение медленных TRPC3 ВПСТ; 2. Появление кратковременного торможения глутаматергической активности пресинаптических терминалий (эндоканнабиноид опосредованная пластичность) и 3. Долговременная пластичность, имеющая в основе LTD с интернализацией AMPA рецепторов.

Несмотря на большие достижения нормальной молекулярной физиологии в этой области, патология mGluR1 при полиглутаминовых СЦА исследована слабо. Имеются отдельные данные о том, что на ранней стадии СЦА1, в силу

вышеописанных генетических нарушений, происходит количественное уменьшение экспрессии IP_3 и mGluR1, (256). У выше упомянутой staggerer линии мышей наблюдается нарушение каскада передачи сигналов белков, которые экспрессируются с помощью RoR α , в том числе и mGluR1 опосредованный путь с нарушением медленных ВПСТ и синаптической пластичности (306), что косвенно может свидетельствовать о подобной патологии у СЦА1 модельных мышей и больных СЦА1, так как у них так же имеет место деградация RoR α . Более детальные исследования в этом направлении были проведены совсем недавно. Было показано, что агонисты mGluR1 усиливают фосфорилирование (косвенный признак интернализации) AMPA рецепторов и уменьшают атаксический синдром у СЦА1 модельных мышей (307). Однако выраженной корреляции функции mGluR1 с мозжечковой атаксией показано не было. Нарушение mGluR1 опосредованного пути передачи сигналов выявлено и в моделях мышей с БГ (308), что может говорить о неспецифическом негативном воздействии полиглутаминовых белков на работу mGluR1. Однако нарушение функции этих важных рецепторов на моделях других полиглутаминовых атаксий таких, как СЦА3, показано не было.

1.3.2. Нарушение морфологии КП при полиглутаминовых СЦА

Нарушение размера и формы КП начинается с ранней стадии полиглутаминовых СЦА. Самые первые эксперименты на КП мозжечка СЦА1 мышей показали различие в морфологии при сравнении их с контрольными животными уже в возрасте P25 (266). В это время, тела КП содержат цитоплазматические вакуоли, которые, возможно, образуются из инвагинаций внешней мембраны клетки, так как они содержат белки из плазматической мембраны клетки, включая mGluR1, GluR $\Delta 1/\Delta 2$, CluRP2/3 и PKC γ (307). В возрасте 4 недель, единичные внутриклеточные агрегаты, содержащие мутантный атаксин 1, обнаруживаются во многих КП. С 5

недель жизни, наблюдается уменьшение проксимальных ветвей дендритов, уменьшение их ветвления и уменьшение тел нейронов, в сравнении с контрольной группой (309). Однако основные электрофизиологические свойства КП у полиглутаминовых СЦА в этом возрасте, и, в частности, СЦА1 трансгенных мышей схожи с нейронами дикого типа (310), несмотря на их морфологические и молекулярные различия (210). Электрофизиологические исследования, проведённые на нокинных *Scal*^{2Q/154Q} мышах, выявили возраст-зависимое расстройство синаптической пластичности гиппокампа в сочетании с когнитивными расстройствами, такими как нарушение обучения и памяти (311). Удивительно то, что не было выявлено никаких синаптических нарушений (в возрасте 5 недель) возбуждающих постсинаптических токов (ВПСТ) мозжечка, вызываемых раздражением лазающих (ЛВ) и параллельных волокон (ПВ).

В возрасте 8 недель, наблюдается умеренный глиоз в молекулярном слое мозжечка. Умеренная потеря нейронов впервые наблюдается в возрасте 12 недель. Почти сразу после этого, в возрасте 15 недель, имеет место истончение молекулярного слоя мозжечка в сочетании с появлением разноразмерных КП. Хотя первые лёгкие двигательные нарушения наблюдаются у мышей в 5-недельном возрасте в отсутствие нарушения равновесия и двигательной координации, атаксия выявляется лишь на 12 неделе после рождения. Поэтому, выраженная нейропатология развивается в КП у СЦА1 трансгенных мышей до начала атаксических явлений. В общем, эти данные схожи с таковыми, полученными от нокинных мышей с искусственным удлинением 154 CAG повторов в мышинном *Scal* гене (*Scal*^{2Q/154Q}) (311).

У некоторых модельных мышей с СЦА3 выраженное уменьшение размеров КП, атрофия их дендритов и апоптоз были выявлены уже с 3-й недели жизни (312).

1.3.3. Вклад астроглии в патогенез полиглутаминовых СЦА

В исследованиях последних десяти лет было показано, что активное участие в развитии нейродегенеративных заболеваний принимает участие клетки глии. Они могут оказывать непосредственное негативное воздействие на нейроны (313), (314). Микроглия и астроциты реагируют на повреждение мозга, действуя разнонаправленно. С одной стороны, они защищают нейроны от негативного воздействия, с другой стороны являются активными участниками нейровоспалительных структурных и функциональных изменений (315), (316). Развитие астроглиоза сопровождает практически все известные патологии мозга. Астроглиоз является патологическим процессом, заключающимся в аномальном увеличении размеров и числа астроцитов за счет их активации и повреждения, связанных с ними, нейронов при инфекции, ишемии мозга, травме ЦНС, аутоиммунных и нейродегенеративных заболеваниях (313).

Вклад астроцитов в развитие СЦА1 был показан в нескольких работах. Так, Svetanovich с соавторами показала, что астроциты становятся реактивными уже на ранней стадии заболевания, когда мутантный атаксин 1 обнаруживается только в КП и задолго до развития выраженных атаксических расстройств (317).

Однако активация глии не всегда происходит в ответ на повреждение нейронов. Это могут быть патологические процессы в самой глии, которые запускают дегенерацию КП как это показано на модели СЦА7 (318); (319), (320).

ГБ – это специализированные астроциты с отростками радиальной направленности в коре мозжечка. В ГБ с явлениями астроглиоза уменьшается экспрессия EAAT, которые удаляют глутамат из синаптической щели. Это вызывает эксайтотоксичность с последующими морфологическими и функциональными изменениями КП (321).

В основе эксайтотоксичности лежит избыточная активация постсинаптических NMDA-рецепторов (322). Активация NMDA рецепторов сопровождается избыточным поступлением ионов Ca^{2+} внутрь нейронов и последующим каскадом патологических биохимических реакций, которые в итоге запускают апоптоз нейронов и их фагоцитоз макрофагами (323); (324); (325). Необходимо упомянуть, что на процесс нейродегенерации влияют и другие факторы: окислительный стресс, митохондриальная дисфункция, дефицит нейротрофических факторов и воспалительные процессы (326), (327).

1.3.4. Надмолекулярные патологические механизмы.

Надмолекулярные ансамбли.

На поздней стадии заболевания вышеперечисленные патофизиологические механизмы приводят к общим глобальным клеточным нарушениям, таким как эксайтотоксичность, ЭПР стресс, срыв УПС и апоптоз.

Агрегаты. Появление новых связей и отсутствие старых при мутационной замене аминокислот в составе белков приводит к изменению пространственной структуры белка, неправильной конформации и образованию нерастворимых фракций (агрегатов). Мутантные, неправильно упакованные белки, образующие агрегаты, наблюдаются и при различных нейродегенеративных заболеваниях таких, как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз и полиглутаминовые заболевания (268); (328); (329). Изначально неправильно упакованные мутантные белки слипаются между собой, образуя ди- и олигомеры, которые обладают токсическими свойствами. И их токсичность более выражена, чем видимые агрегаты, так как они способны передвигаться в цитоплазме клетки и взаимодействовать с другими белками, такими как близко родственные белки и белки-мишени в каскаде передачи сигналов (330). Именно этим можно объяснить приобретение токсических свойств полиглутаминовых

белков и развитие вышеописанных негативных эффектов на транскрипцию. Объединяясь с белками-мишенями, олигомеры существенно увеличивают массу этого комплекса, по сравнению с нормальным мономером дикого типа, что ведёт к значительному замедлению таких биологических процессов, как транслокация, активация субстратов и т.п. (331).

При дальнейшей адгезии олигомерных мутантных белков образуется полимерная структура, которая неспособна к перемещению в цитоплазме и нерастворима. Однако было показано, что агрегаты иммуноположительны и к вышеупомянутым близко родственным белкам, и к белкам-мишеням, а также, к молекулам фибрина, компонентам убиквитина и т.д. Совокупность этих нерастворимых структур, образует агрегаты. Образование агрегатов представляется, как логическое завершение неправильной конформации мутантных белков. Появление неподвижных агрегатов, по всей видимости, вносит значительный вклад в механизм потери функций полиглутаминовых белков. На моделях клеток и животных было показано, что агрегаты способны образовываться при всех полиглутаминовых СЦА (332). При СЦА6 они имеют только цитоплазматическое расположение (333), тогда как при остальных, рассматриваемых нами заболеваниях, в том числе, и внутриядерное (334).

Поражение органелл. Органеллы клетки испытывают всю совокупность патологических процессов, протекающих на молекулярном уровне.

Протеасомы. Убиквитин-протеасомная система – одна из основных протеолитических систем в клетках млекопитающих. Эта система вовлечена в деградацию 80—90% всех коротко живущих белков цитозоля, включая неправильно упакованные белки (335), (336). Деградация белков с помощью данной системы протекает в два шага: (1) убиквитинирование, т.е., связывание убиквитина с белком-мишенью через последовательные действия ферментов активирующих убиквитин (E1), связывающих убиквитин (E2) и лигирование убиквитина (E3); и (2) дегенерацию, т.е., распознавание Lys48

полиубиквитиновой цепочки с помощью 26S протеасомы и деградации белка-мишени с образованием свободного убиквитина при помощи убиквитин-возобновляемого фермента. Сам атаксин 3 является деубиквитирующим ферментом, тесно связанным с работой УПС. Однако существует и неспецифический механизм, присущий всем полиглутаминовым заболеваниям. Неправильно упакованные белки требуют усиленной работы убиквитин-протеасомной системы по их расщеплению и выведению, что, в итоге приводит к перенапряжению и срыву механизмов данной системы. Недостаточность убиквитин-протеасомной системы ведёт к накоплению склонных к агрегации белков, которые, вовлечены в развитие полиглутаминовых заболеваний (241). С помощью методов иммуногистохимии было выявлено совместное расположение агрегатов полиглутаминовых белков с протеасомами, что наводит на мысль о тесной их связи с убиквитин-протеасомной системой (337). В различных исследованиях было показано, что агрегация белков препятствует нормальной работе убиквитин-протеасомной системы. Здесь действует принцип положительной обратной связи – белковая агрегация усиливает дисфункцию УПС через секвестрацию 26S протеасомного комплекса, что ещё больше усиливает процесс агрегации (335).

ЭПР участвует в производстве и созревании белков. Нарушения процессов конформационного созревания белков в ЭПР называют ЭПР стрессом. Мутантные полиглутаминовые белки при срыве УПС могут напрямую вызывать ЭПР стресс, так как в последнем происходит массовое их накопление (338). Множество работ показали, что агрегация мутантных белков провоцирует ЭПР стресс в моделях клеток животных различных нейродегенеративных заболеваний (339). При появлении патологически упакованных белков в ЭПР, включаются компенсаторные механизмы, увеличивающие экспрессию ферментов таких, как оксидредуктазы, участвующие в образовании дисульфидных связей в белках. Продуктом

окисления сульфгидрильных групп белков являются активные формы кислорода, принимающие непосредственное участие в развитии окислительного стресса (340). При полиглутаминовых заболеваниях таких, как СЦА 2 и СЦА3, накопление мутантных белков приводит к значительному повреждению ЭПР (341); (264).

Митохондрии. Структурно-функциональные нарушения митохондрий, наряду с ЭПР стрессом и срывом УПС, являются одним из основных звеньев в патогенезе дегенеративных заболеваний нервной системы (342). Мутантные полиглутаминовые белки, в частности атаксин 3 и атаксин 7, и их агрегаты, вследствие своей токсичности, способны напрямую влиять на функции митохондрий (343); (344). Также было установлено, что при нейродегенеративных процессах в клетке, различные органеллы оказывают негативное влияние друг на друга, образуя, в своём роде, «порочный круг». В частности, ЭПР, находящийся в состоянии стресса, способствует развитию дегенеративных изменений в митохондриях (345). Вся совокупность специфических и неспецифических воздействий при полиглутаминовых СЦА на митохондрии приводит к развитию митохондриальной дисфункции, которая включает в себя такие проявления, как снижение синтеза АТФ, продукцию активных форм кислорода и активизацию механизмов запрограммированной гибели клетки (346).

Апоптоз. Финальной стадией нейродегенеративных заболеваний, в том числе и полиглутаминовых СЦА, является запрограммированная клеточная гибель, или апоптоз. Ca^{2+} зависимый путь апоптоза играет наиважнейшую роль в патогенезе данных заболеваний.

Однако неспецифические патогенные факторы также оказывают значительное влияние на апоптоз. В частности, апоптоз наблюдался в КП, имеющих агрегаты мутантных полиглутаминовых белков, но не в КП без агрегатов (347). Данный феномен был описан в патогенезе различных нейродегенеративных заболеваний (348). Выраженное влияние на апоптоз

при полиглутаминовых СЦА оказывает каспаза-зависимый путь передачи сигналов. Каспаза 1 – это ключевой триггер апоптотического пути при СЦА3 и БГ (349). Её активация затрагивает такие финальные каспазы апоптоза, как каспаза 3. Активация финального каскада каспаз через каспазу 3 также имеет место при экспрессии мутантного атаксина 2, содержащего ALS область (350). Данный путь апоптоза может быть активирован и другими компонентами, тесно связанными с патофизиологией нейродегенеративных заболеваний. Так, на поздних стадиях, при повреждении ЭПР и митохондрий, происходит массивный выброс Ca^{2+} из эндогенного депо (351). В результате разрушения мембран органелл высвобождается каспаза-12, которая активируется Ca^{2+} . Каспаза 12, в свою очередь, активирует каспазу 9, а каспаза 9 – финальные каспазы апоптоза такие, как каспазы 3, 6 и 7. При разрушении митохондрий высвобождается цитохром c, который включается в состав апоптосомы, также активирующей каспаза-12 опосредованный путь апоптоза (352).

При полиглутаминовых СЦА апоптозу подвергаются не только структуры мозжечка, но и другие отделы ЦНС, в особенности продолговатый мозг. Апоптоз структур мозжечка и ствола мозга выражается, морфологически, в уменьшении их объёма, а функционально в выпадении функций и формировании различных неврологических синдромов (см. раздел выше).

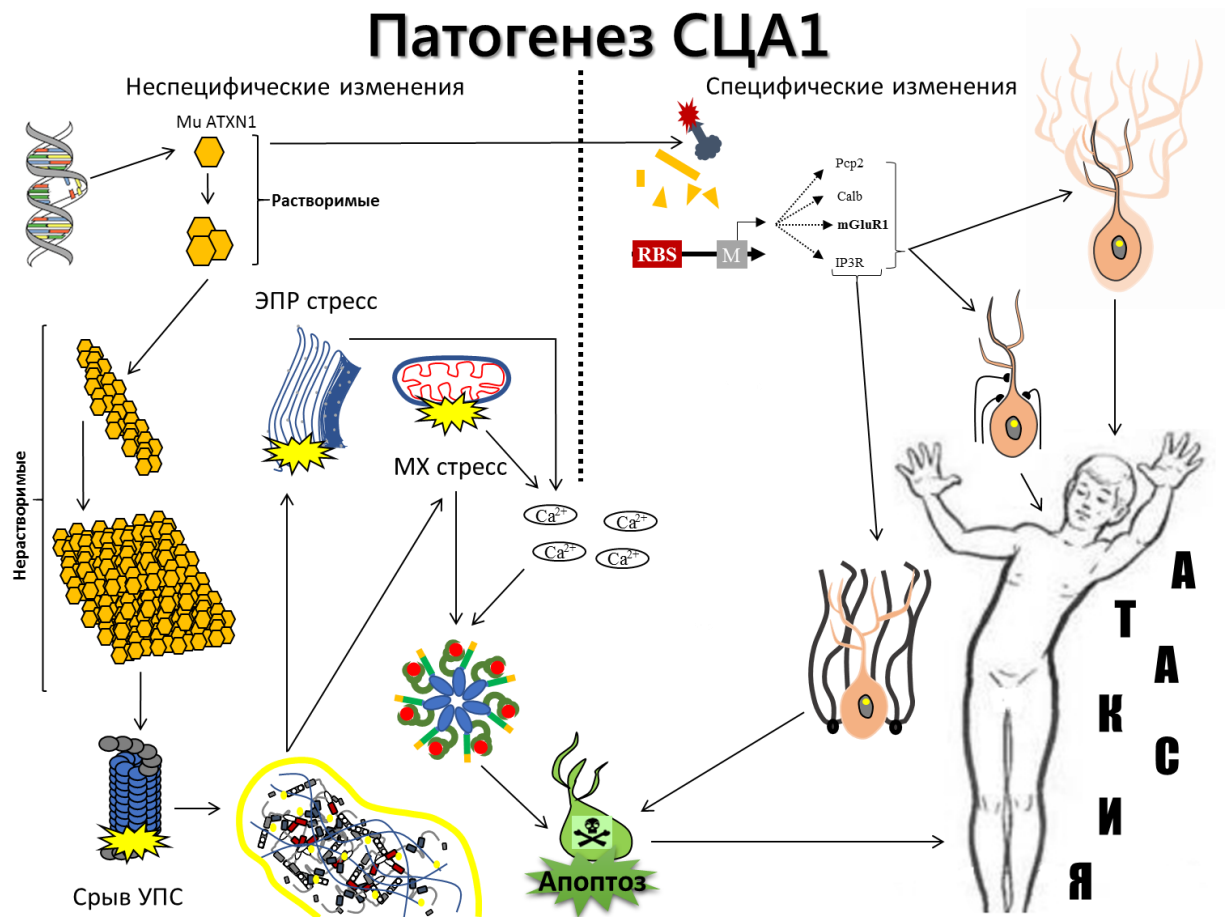


Рисунок 5. Основные звенья патогенеза полиглутаминовых СЦА на примере СЦА1. Мутация в гене ATXN1 приводит к появлению белка с увеличенной полиглутаминовой цепочкой, что приводит к неправильной её конформации. Растворимые формы этого белка не могут взаимодействовать с белковым комплексом, участвующим в активации транскрипции важных для жизнедеятельности клетки генов. Снижение экспрессии этих генов приводит к подавлению синтеза таких белков, как mGluR1, кальбиндин, IP₃-R и др. Это сказывается отрицательно на морфологии клеток. Деградация КП вызывает активацию глии коры мозжечка, в частности, ГБ. Это приводит к гибели нервных клеток. Другой путь нарушений связан с появлением нерастворимых форм мутантного атаксина 1 в виде агрегатов, которые обладают цитотоксическим эффектом. Нерастворимые агрегаты не могут быть переработаны УПС и вызывают митохондриальный и ЭПР стресс, высвобождению свободных радикалов и эксайтотоксичности. Это запускает

каскад апоптоза клеток коры мозжечка. Совокупность всех перечисленных патологических механизмов приводит к нарушению функции мозжечка в виде атаксии.

1.3.5. Формирование атаксического синдрома

Патофизиология атаксии. Разрыв нейронных связей в следствие дисфункции синапсов и снижения возбудимости на ранних стадиях и апоптоза клеток мозжечка на поздних при полиглутаминовых СЦА имеет доминирующее значение при расстройстве совершения движений и удержания позы у таких больных, что проявляется как атаксия.

Мозжечок самым тесным образом связан с регуляцией движений и позы. Сложное движение требует создания нейронами программы, которая бы чётко и аккуратно координировала множество его составляющих (353); (354). Считается, что основа программы таких сложных движений, как ходьба, хранится в коре больших полушарий (355), однако анализ движения (скорость, сила, дистанция и т.д.) совершается в коре мозжечка при сопоставлении информации от уже произведённого и желаемого движений (356). Такие эфферентные (желаемые) импульсы сравниваются с афферентной (действительной информацией) в мозжечке, что позволяет осуществлять тонкую настройку движений. Афферентная информация от вестибулярной системы, спинного мозга и коры больших полушарий поступает в нижние оливы, а оттуда по лазающим волокнам подходит к клеткам Пуркинье коры мозжечка. Другая часть афферентации поступает через моховидные волокна, которые идут от ядер моста, спинного мозга, вестибулярных ядер и опосредованно через клетки-зёрна оказывают на клетки Пуркинье возбуждающее действие (357).

Кора же мозжечка в функциональном плане устроена неоднородно. Её разделяют на зоны, которые, в свою очередь, подразделяются на микрозоны.

Микрозоны – это отграниченных друг от друга компартменты в виде тонких параллельно идущих цепей клеток Пуркинье (358) (Рисунок 6). КП в каждой микрозоне посылают импульсы к малым группам субкортикальных ядерных нейронов, которые, в свою очередь, соединяются с соответствующими двигательными нейронами. У нормальных взрослых животных, КП в каждой микрозоне получают обычные возбуждающие сигналы от ЛВ из чётко определённой подгруппы нейронов оливы в продолговатом мозге при синхронизации последних и генерации суммарного импульса (см. рисунок) (359), (360); (361); (362).

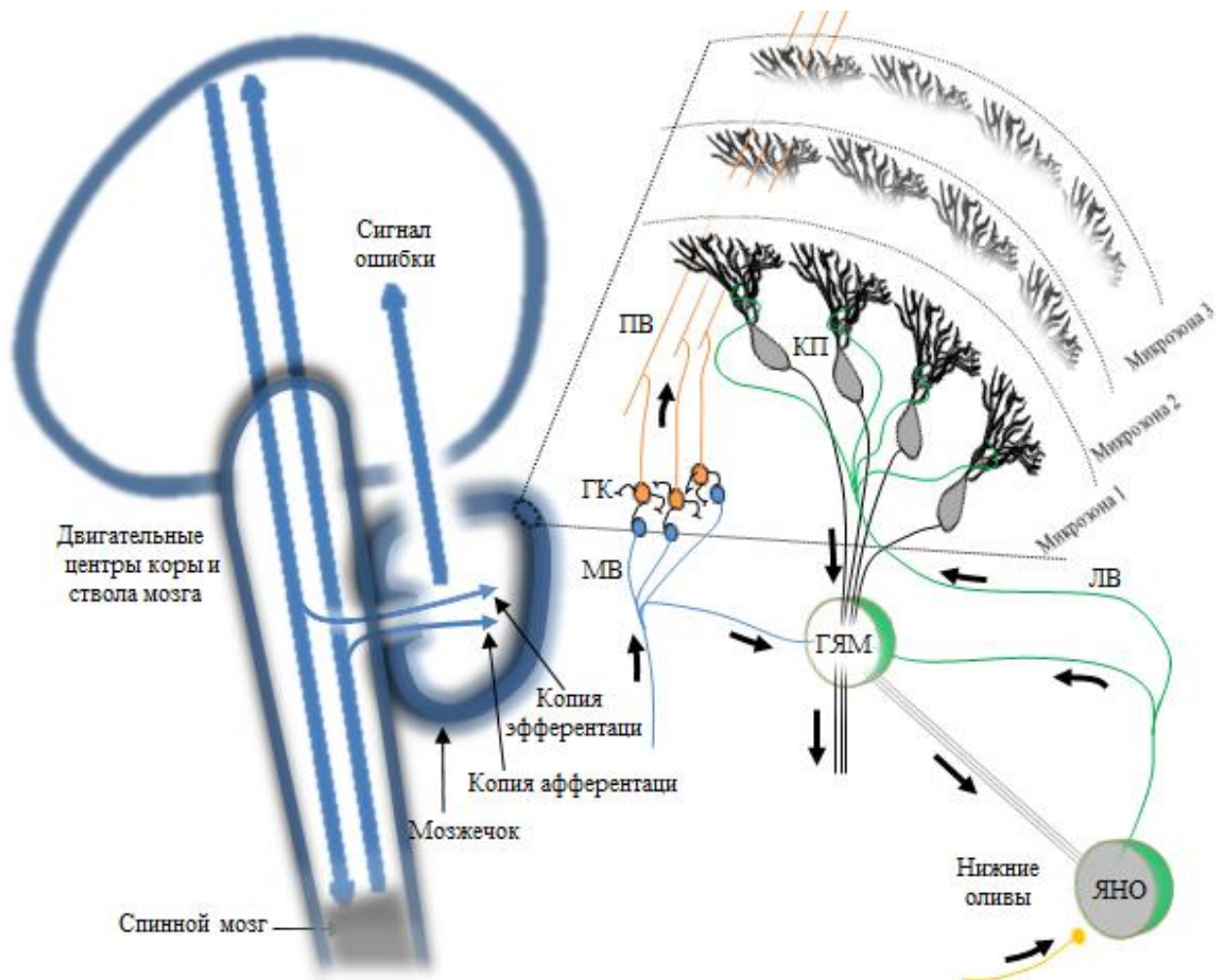


Рисунок 6. Строение коры мозжечка. Слева показаны афферентные и эфферентные пути, связывающие кору и спинной мозг. Эти пути дают «ответвления» в мозжечок, который проверяет информацию и выдаёт сигнал

ошибки, тонко регулирую движения. Такая регуляция достигается сложной организацией коры мозжечка, которая разделена на микрозоны. В микрозоне содержится несколько КП, к которым подходят ПВ от ГК и ЛВ от ЯНО. После обработки информации КП посылает эфферентный сигнал в ГЯМ.

Поэтому в конце XX века и в начале 2000-х годов широкое распространение получила теория развития атаксии при нарушении элиминации добавочных ЛВ, иннервирующих клетки Пуркинье. Согласно этой идее, роль ЛВ заключается в передаче сигналов этой координирующей программы КП, а от КП в другие структуры нервной системы. У взрослых мышей дикого типа с моноиннервированными КП, каждая КП предположительно следует указаниям одной подгруппы синхронно работающих нейронов в определённый момент времени. У взрослых мышей дикого типа, коррекция ошибки может быть проведена с большой точностью при помощи отдельных функциональных единиц мозжечка, которые контролируют определённые составляющие конкретного движения. Поэтому моноиннервация, согласно этой теории, наиважнейшее звено механизма коррекции ошибки. Но у взрослых мутантных PKC γ , mGluR1 и GluR δ 2 мышей или мышей дикого типа не старше 3 недель, КП с множественной иннервацией ЛВ получают импульсы от двух и более различных подгрупп нейронов олив. Это затрудняет для таких КП генерацию синхронного ответа на импульсы одной подгруппы нейронов олив. Поэтому, страдает согласованная передача активности от одного нейрона к другому в каждой функциональной единице мозжечка, и нарушается координация движений. КП микрозоны получают не только действительные сигналы об ошибке, но также другие сигналы через излишние синапсы ЛВ. Это значит, что сила синапсов между ПВ и КП в конкретных микрозонах будут неправильно изменяться при восприятии ими множества различных сигналов. Как следствие, мозжечок не может должным образом контролировать сложные движения. Такое стройное и обоснованное

объяснение структурных изменений при атаксии мозжечка долгое время считалось единственно верным. Однако в последнее время появляются работы, указывающие, что у мышей, имеющих множество синапсов ЛВ с одной КП вовсе отсутствует нарушение координации движений (363). Более того, давно уже было замечено, но стало актуальным после выхода выше указанной работы Капо, что частота возбуждений КП, порождаемых лазающими волокнами, очень мала, чтобы нести в себе информацию о специфических параметрах движений. Также, период элиминации ЛВ у грызунов завершается к 3 неделям жизни (363), что соответствует, примерно окончанию периода раннего детства человека (3 года) (364), Однако и в 1,5-2 года малыши активны и при сохраняющейся множественной иннервации мозжечка, не только не имеют атаксии, но и любят кружиться, нагружая, тем самым центры, ответственные за контроль движений. Не стоит также отрицать, что ЛВ могут играть важную роль для двигательного запоминания, выступая как обучающие (365) и ошибочные (366) сигналы, которые корректируют ответы КП на импульсы ПВ через LTD (367); (368). Поэтому данный вопрос требует дальнейшего изучения.

Теория нарушения процессов синаптической пластичности, неоднократно упоминались множеством авторов. Суть этой теории заключается в изменении ответа нервной клетки на изменяющиеся условия окружающей её среды. Считается, что в процессе усовершенствования движений, такая основа программы должна быть изменена или улучшена, если животное учится производить движение плавно или технически отточено (369); (354). Поэтому животные с поражениями мозжечка могут, в общем, совершать сложные движения, но только неточно и неуверенно (370). Данная теория получила широкое распространение, когда учёные показали отсутствие или существенное нарушение синаптической пластичности у модельных мышей с различными моделями наследственных заболеваний мозжечка. При СЦА20 мутирует ген, ответственный за экспрессию фермента, вовлечённого в

биосинтез эндоканнабиноидов, играющих важную роль в развитии кратковременной СВ1 зависимой депрессии (371). Данное нарушение также зарегистрировано и при полиглутаминовых СЦА – в мозжечке у staggerer мышей, имитирующих во многом, модель СЦА1 (305) и в сетчатке глаза у модельных СЦА 7 мышей, где было найдено нарушение посттетанической потенциации, относящейся также к кратковременной синаптической пластичности (372). При некоторых других же СЦА таких, как СЦА14 было выявлено нарушение долговременной пластичности, где выпадение функции близко родственных РКС ведёт к нарушению LTD (373). Также, на основании положительных данных от экспериментального лечения тетрагидробиоптерином, было высказано предположение о нарушении LTD у СЦА3 больных (374).

Однако теория нарушения синаптической пластичности также ставится под сомнение, так как в ряде экспериментов было показано, что потеря LTD, сама по себе, не ведёт к нарушению двигательного обучения (375). В действительности было показано, что LTD является лишь частью сложного механизма памяти, и потеря LTD может переключить этот механизм на другие его компоненты. В последнее время был опубликован ряд работ, отмечающий, что наличие или отсутствие дополнительных синапсов с КП является лишь частным случаем в процессе синаптогенеза, который тесным образом связан с процессами запоминания и функционирования клетки в организме, приспособляющимся к новым требованиям окружающей среды. Так, само по себе обучение вызывает изменение не только концентрации постсинаптических рецепторов (LTD), но и концентрации синапсов уже на второй день обучающего эксперимента (376). Такое сложное многоуровневое изменение структур мозжечка в ответ на получение новой информации, объединяет обе вышеуказанные теории, однако не объясняет все аспекты процесса запоминания.

Суммируя всё выше сказанное, можно заключить, что устройство нейронной сети мозжечка показывает на чрезвычайную важность КП, на которых сходятся входящие сигналы и в которых происходит сравнение и обработка полученной информации, и передача её далее в моторные зоны. Это имеет решающее значение в патологии полиглутаминовых СЦА, так как КП здесь является классической мишенью. Как следствие, структуры, лежащие выше мозжечка, не получают скорректированную восходящую сенсорную информацию от нижележащих структур и не могут должным образом посылать нисходящие импульсы для контроля сложных движений и тонуса мышц для сохранения позы и контроля равновесия.

1.4. Перспективы патогенетического лечения полиглутаминовых СЦА. Экспериментальная терапия

Патогенетическое лечение полиглутаминовых СЦА ещё не существует, но в настоящее время проводится его разработка с учётом всех выше указанных патологических механизмов. Вкратце, методы лечения можно разделить на несколько групп: предотвращение экспрессии мутантного гена, повышение клиренса мутантных белков, снижение токсичности этих белков, влияние на нисходящие пути передачи сигналов, ингибирование трансглутаминаз, дисрегуляция транскрипции, влияние на функцию митохондрий, активация каспаз и влияние на клеточную гибель, влияние на окислительное повреждение и трансплантация.

Однако все эти методы находятся в стадии разработки и апробированы лишь на культурах клеток и моделях животных.

1.4.1. Предотвращение экспрессии мутантного гена

Самые ранние исследования в этой области показали, что подавление транскрипции гена мутантного аллеля через интерференцию РНК является эффективным методом для предотвращения экспрессии исследуемого гена *in*

vitro (культура клеток) и *in vivo* (мозг) при полиглутаминовых СЦА, в частности, СЦА1 (377). Сайленсинг мутантных аллелей с помощью РНК интерференции является стратегией, которая доказала, в последующем, свою эффективность в предотвращении инициации каскада нейротоксических событий, снижении образования внутриклеточных агрегатов и улучшении поведенческого фенотипа у СЦА1, СЦА3 и СЦА7 мышей (378), (379), (380). Проявление рекомбинантного аденовирус-ассоциированного вектора, экспрессирующего короткие петли РНК, направленных против мутантного гена человеческого атаксина 1, значительно улучшает СЦА1 поведенческий фенотип в моделях мышей (377); (378). Однако применение данной терапии у больных с полиглутаминовыми СЦА, проблематично, поскольку не существует векторов, которые могли бы эффективно доставлять гены в большие участки мозга человека, в особенности у взрослых людей. Кроме того, такие ингибиторные РНК не могут различать мутантный, так и здоровый аллели, и подавляют оба. С другой стороны, атаксин 1 нокаутные мыши не имеют фенотипа СЦА1, что может рассматриваться как аргумент в пользу их использования (381).

1.4.2. Снижение токсичности мутантных белков

Воздействие на белки во время их созревания, главным образом, на процессы ацетилирования и фосфорилирования, позволяет уменьшить их токсичность. Нацеливание регуляции транскрипции с помощью модуляции ацетилирования/деацетилирования гистонов, рассматривается как возможная терапевтическая стратегия (382). К сожалению, неудачные результаты нескольких исследований поставили под вопрос пользу модуляторов ацетилирования гистонов в лечении нейродегенерации, показав, что такое лечение мало специфично относительно вышеупомянутых целей, а также малоэффективно. Более важным феноменом в регуляции функции белков является фосфорилирование. Как было указано выше, фосфорилирование

полиглутаминовых белков оказывает огромное влияние на их внутриядерное расположение и агрегацию (253), (383). Делая мутантный полиглутаминовый белок менее токсичным с помощью изменения сайта фосфорилирования, можно предотвратить развитие атаксии и нейродегенерации (255), (383). Также есть сообщение о повышении экспрессии искусственных белков, в частности аналога атаксина 1, не несущего патологической цепочки. Данная сверхэкспрессия вытесняет мутантный атаксин 1 из процессов взаимодействия, что приводит к уменьшению симптомов болезни у модельных СЦА1 мышей (378).

1.4.3. Усиление клиренса мутантных белков

Ранее различные терапевтические подходы в лечении полиглутаминовых СЦА изучались на моделях животных и молекулах шаперонов. Увеличенные уровни определённых молекул шаперонов таких, как белок теплового шока 70 (HSP70) и HSP40, подавляют как агрегацию, так и токсичность мутантного атаксина 1 в системе культур клеток (278) и в моделях болезни Гентингтона и СЦА1 в дрозофилах и мышах (384), (384), (385). Атаксин 3 сам способен регулировать уровень HSP70, что при мутации первого также вызывает усугубление клиренса мутантных белков (386). Уменьшение токсичности и агрегации на модели дрозофил с СЦА3 было замечено на фоне экспрессии другого белка теплового шока, HSP104 (387).

Кроме молекул шаперонов, другие полиглутамин-опосредованные агенты, подавляющие агрегацию такие, как химические шапероны (389), синтетические и рекомбинантные пептиды (390), (391), внутриклеточные антитела и различные другие вещества (392), (393) также уменьшают полиглутаминовую токсичность. Параллельно этому, ингибитор деацетилазы гистонов (HDACi) подавляет полиглутаминовую токсичность в культурах клеток и на модели дрозофил с полиглутаминовыми СЦА (394), (395).

Среди всех специфических молекул, потенциально способных воздействовать на токсичность полиглутаминовых белков, особый интерес вызывает молекула CRAG. Молекула CRAG – это нейронная ГТФаза, присутствующая в норме в нейронах, названная по первым буквам CRMP5 (semaphorin response mediator proteins)-ассоциированная ГТФаза (396). Экспрессия CRAG очень высока в развивающемся мозге и снижается с возрастом. Однако было показано, что функция CRAG в наследственных полиглутаминовых заболеваниях возрастает при накоплении увеличенного полиглутаминового белка (397). Эта экспрессия CRAG, регулируемая при развитии, может быть тесным образом связана с началом полиглутаминового заболевания. Было показано, что, лентивирус-вызванная экспрессия CRAG в клетках Пуркинье мозжечка мышей значительно уменьшает количество полиглутаминовых агрегатов и активирует подавленную дифференцировку дендритического дерева, что приводит к уменьшению проявлений атаксии (311). При более пристальном изучении было показано, что CRAG взаимодействует с полиглутаминовой частью белка и усиливает деградацию последнего через ядерный убиквитин-протеасомный путь (394) и, частично, через c-Fos-зависимый путь, тем самым, уменьшая цитотоксичность в культурах клеток (398). Поэтому всё вышесказанное свидетельствует о том, что нацеленная экспрессия CRAG является потенциальным методом генетической терапии полиглутаминовых заболеваний.

1.4.4. Воздействие на пути передачи сигналов

Пути передачи сигналов такие как гетиноид/тиреоид- Wnt- и Drd2- допаминергические пути, участвующие в изменении двигательных функций, имеют наибольшее вовлечение в патологический процесс при СЦА1 (245); (246). Также были показаны неплохие результаты при воздействии на mGluR1 каскад сигналов КП. В частности, было показано уменьшение атаксического синдрома у модельных СЦА1 мышей (306). Управляя этими

каскадами сигналов, можно выработать рациональную стратегию терапевтического воздействия на патогенез СЦА1 и других нейродегенеративных заболеваний. Однако воздействие на данные пути передачи сигналов, зачастую, зависит от применения очень специфических веществ таких, как селективные агонисты или антагонисты, что значительно затрудняет исследования в этой области (306). Нужно признать, что открытие новых путей передачи сигналов, регулируемых белками, является крайне важной задачей, так как ведёт к пониманию молекулярных механизмов, запускающих нейродегенеративный процесс, и даёт возможность обнаружить потенциальные терапевтические цели, которые могут предотвратить нейронную дисфункцию и двигательный дефицит на ранних досимптомных стадиях заболевания у больных СЦА1.

1.4.5. Трансплантация стволовых клеток

Данный метод лечения привлекает своим потенциальным эффектом даже на поздних стадиях развития полиглутаминовых СЦА, так как дифференцировка стволовых клеток может заместить клетки умершие. Исследования показали, что не только нервные, но и эмбриональные и мезенхимальные стволовые клетки, могут исправлять неврологические нарушения (399). Лечение стволовыми клетками больных нейродегенеративными заболеваниями, такими как болезнь Паркинсона, болезнь Гентингтона, а также с повреждением спинного мозга, обретает всё больший интерес в свете его потенциального влияния на патологические симптомы при помощи возмещения умерших клеток. Уже появились первые сообщения о положительном эффекте от лечения мезенхимальными стволовыми клетками, выделенными из пупочной вены, больных СЦА1, СЦА2 и СЦА3 (400). Однако механизмы влияния стволовых клеток на патологический процесс при нейродегенеративных заболеваниях, в том числе и полиглутаминовых СЦА, мало изучены. Предполагается, что этот эффект

трёхсторонний. Попадая в организм реципиента, стволовые клетки выделяют ряд биологически активных веществ таких, как факторы роста (BDNF, NT-3 or GDNF) и т.д. вещества, что может само по себе, оказывать положительное влияние на окружающие клетки (10), (393). Также, стволовые клетки способны к дифференцировке и образованию различных типов клеток, в том числе, и нейронов. Исследования показали, что направленная активация клеток-предшественников нейронов, в том числе нейронов мозжечка таких, как клетки Пуркинье и гранулярные клетки из стволовых клеток эмбриона (СКЭ) возможна при помощи эффективного метода дифференцировки сигнальными молекулами BMP4 и FGF8 (401); (402). Интересен тот факт, что исследователям удалось вырастить 1-3% Пуркинье-подобных нейронов из общего числа постмитотических клеток, производных СКЭ. Наиболее интересным направлением исследований сейчас является исследование функции таких выделенных из СКЭ Пуркинье-подобных клеток в моделях животных с СЦА1. К тому же, получение Пуркинье-подобных клеток из СКЭ должно быть полезно для исследований *in vitro* для выяснения патогенеза и разработки лекарств для лечения СЦА1 и других заболеваний. Однако дифференцировка, выживание и созревание стволовых клеток в мозге реципиента зависят от многих факторов, которые должны быть тщательно проанализированы и поняты для применения этого метода лечения в будущем. Это самый спорный аспект в лечении стволовыми клетками, так как в действительности дифференцировка стволовых клеток в мозге происходит крайне редко (403); (393). Кроме того, имеются риски их трансформации в опухоли. Поэтому данный метод лечения в клинике на данный момент практически не применяется.

В настоящее время патогенетическое лечение полиглутаминовых СЦА не разработано, однако ведутся интенсивные доклинические исследования на основе уже открытых патологических механизмов. Идеальным лечением

полиглутаминовых заболеваний может быть сочетание вышеприведённых и симптоматических терапевтических средств. Вещества, которые тормозят PI-3K/Akt путь передачи сигнала или малые пептиды, препятствующие взаимодействию 14-3-3 с атаксином 1 могут играть роль только в лечении СЦА1, так как являются специфичными молекулами, другие же, как вещества, влияющие на белковый клиренс или стволовые клетки, могут использоваться для лечения различных полиглутаминовых СЦА, и могут сочетаться между собой.

Таким образом, анализируя данные литературы, можно прийти к выводу, что полиглутаминовые СЦА имеют большое сходство между собой, как в клинике заболевания, так и в строении патологических белков, и в механизмах развития патологического процесса. Полиглутаминовые СЦА характеризуются, мозжечковым и стволовым синдромами, медленно прогрессирующими атаксией и бульбарными расстройствами. В структуре всех СЦА это наиболее частые типы, которые распространены повсеместно по Земному шару. Изначально мутация различных генов при полиглутаминовых СЦА, приводит к образованию патологических полиглутаминовых белков с удлинёнными полиглутаминовыми цепочками, которые, в свою очередь, приводят к специфическим и неспецифическим проявлениям. Большой спектр специфических нарушений, в основном, обусловлен модуляцией транскрипции более сотни различных генов. Часть из которых, подвергаются модуляции как при СЦА1, так и при СЦА3 и других заболеваниях рассматриваемой группы. Нарушение транскрипции таких генов, как $RoR\alpha$ и др., приводит к изменению морфологии клеток с преобладающим уменьшением площади дендритического дерева. При СЦА1 также имеет место селективная деградация mGluR1 рецепторов, что приводит к широкому спектру патофизиологических эффектов (нарушение регуляции TRPC3 каналов, гомеостаза Ca^{2+} , отсутствие LTD и т.д.).

Неспецифические механизмы, развивающиеся на более поздних стадиях, связаны, в основном, с образованием токсичных олигомеров мутантных полиглутаминовых белков, его агрегацией, напряжением и срывом убиквитин-протеасомных механизмов, развитием ЭПР стресса, Ca^{2+} цитотоксичностью и апоптозом КП. Эти поздние патологические процессы схожи у большинства нейродегенеративных заболеваний и не являются особенностью полиглутаминовых СЦА. Несмотря на подробное изучение патогенетического процесса при этих СЦА, на сегодняшний день не найдено адекватного патогенетического лечения. Поэтому дальнейшие исследования в области как отдельных взаимодействий мутантных белков с другими белками, так и наблюдение за функцией целой КП, весьма актуальны и помогут в дальнейшем разработать методы лечения.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Общая характеристика исследуемого материала

Эксперименты выполнены на мышах линий B16 и CD1 и модельных трансгенных мышах СЦА1 (B05 и СЦА1 KI) и СЦА3. В общей сложности, было использовано 9 моделей животных, охватывающих все наиболее важные звенья патогенеза полиглутаминовых атаксий (Рисунок 7). Животные находились в комнате с 12-ч световым/темновым режимом со свободным доступом к воде и пище. Все манипуляции с животными проводились в соответствии с Японским Актом по Благополучию и Манипуляциям с Животными, и Инструкциям по Правильному Проведению Экспериментов с Животными, опубликованных Научным Советом Японии, и экспериментальные протоколы были утверждены на Внутривузовской Комиссии Университета Гунма (07-015 и 04-44). Все эксперименты проводились с учётом уменьшения страдания животных и уменьшения их количества.

2.1.1. Экспериментальные модели:

1. Отсроченная лентивирусная модель СЦА1 избирательной экспрессии мутантного атаксина 1 в КП мозжечка животных B16 (введение LVV MSCV-ATXN1[Q76]-GFP в кору мозжечка) была создана при совместном участии учёных Университета Гунма Н. Hirai и Н. Hosoi (404).
2. Классическая модель СЦА1 с использованием трансгенных мышей линии B05, селективно экспрессирующих мутантный атаксин 1 в КП мозжечка (265).
3. Максимально приближенная к реальному течению заболевания, СЦА1 модель с использованием СЦА1-KI мышей, с неспецифической экспрессией атаксина 1 (310).

4. Модель «усреднённого» полиглутаминового заболевания с использованием мышей линии B16, экспрессирующих удлинённую полиглутаминовую цепочку без других функциональных сайтов белка (сделана на основе трансгена ATXN-3, не содержащего Джозефинового домена - 286 аминокислот на N-конце) была создана при совместном участии учёных Университета Гунма Н. Hirai и Т. Torashima (405).
5. Второй вариант модели с той же патологической последовательностью сделан на основе LVV MSCV-polyQ/GFP для исследования токсических эффектов LVV была создана при совместном участии учёных Университета Гунма Н. Hirai и К. Takayama (406).
6. Модель нейродегенерации «staggerer», вызванная делецией 122-bp гена roga, кодирующего фактор транскрипции «ROR α » (407).
7. Lentivirusная модель СЦА1 избирательной экспрессии мутантного атксина 1 в астроцитах (введение LVV GFAP-Атаксин 1[Q85]-Flag в кору мозжечка) была создана при участии профессора Университета Бристоль S. Kasparov (408).
8. Оптогенетическая аденовирусная модель «усреднённого» «неспецифической» нейродегенерации мозжечка (введение AVV GFAP-ChR2-mKate) была создана при участии профессора Университета Бристоль S. Kasparov (408).
9. Модель нейродегенерации, вызванная астроцитозом мозжечка (введение белка S100 β в кору мозжечка) (409).

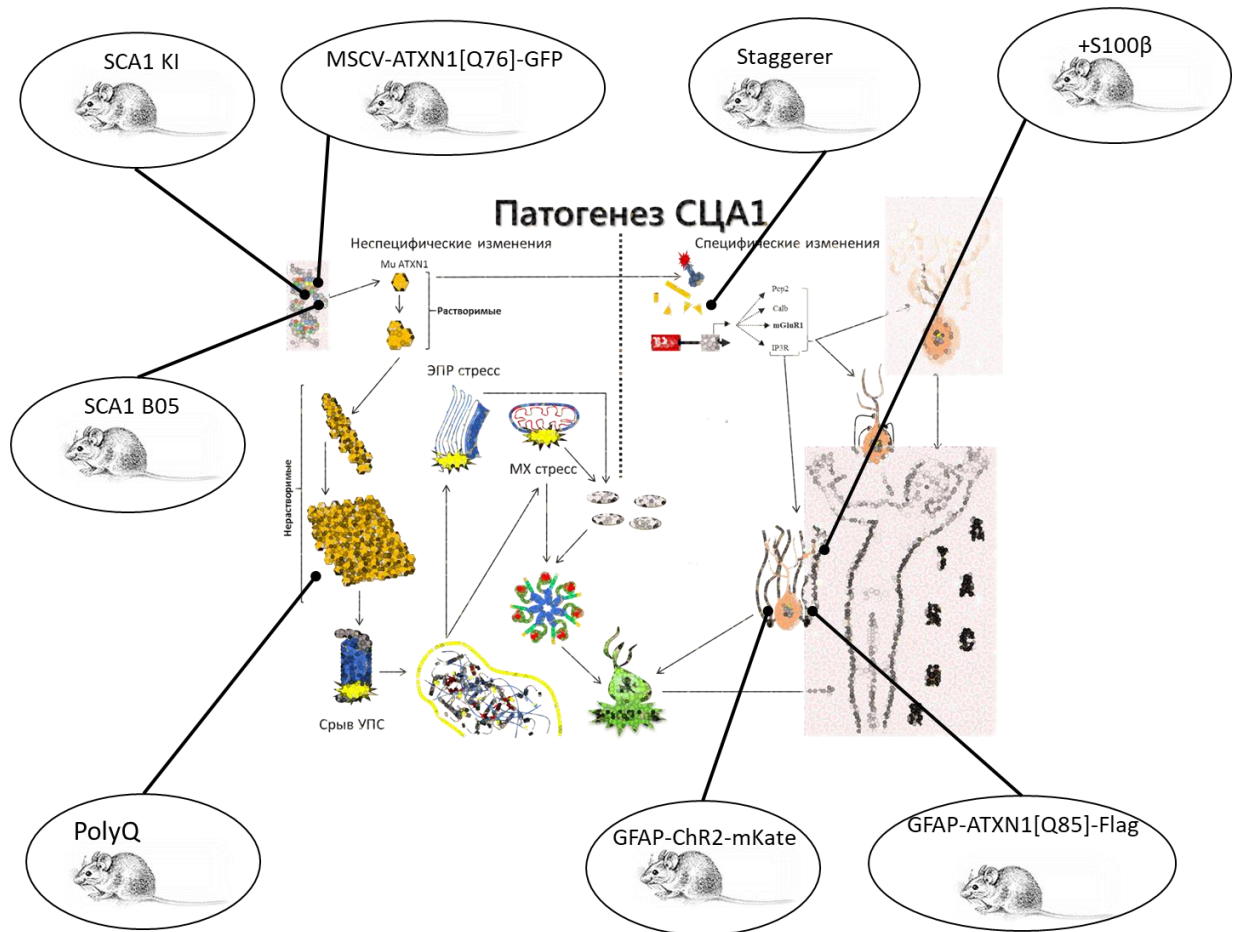


Рисунок 7. Модели животных, использованные в данной работе для изучения звеньев патогенеза полиглутаминовых СЦА. Каждой модели соответствует отдельное звено патогенеза (объяснение в тексте).

2.1.2. Подходы к патогенетическому лечению СЦА1 модельных животных:

1. Доставка рекомбинантного гена: Заместительная терапия плохо синтезируемых белков: MSCV-GFP-P2A-mGluR1-WPRE; L7-4mCMV-GFP-P2A-mtTA+TRE-NA-mGluR1. Клиренс агрегированных белков посредством активации белков убиквитин-протеасомной системы: MSCV-GFP-P2A-CRAG.
2. Введение стволовыми клетками: Мезенхимальные стволовые клетки из костного мозга мыши, линия KUM10 (МСК).

3. Фармакотерапия: воздействие на пути передачи сигналов: баклофен.

Воздействие на эксайтотоксичность: мемантин.

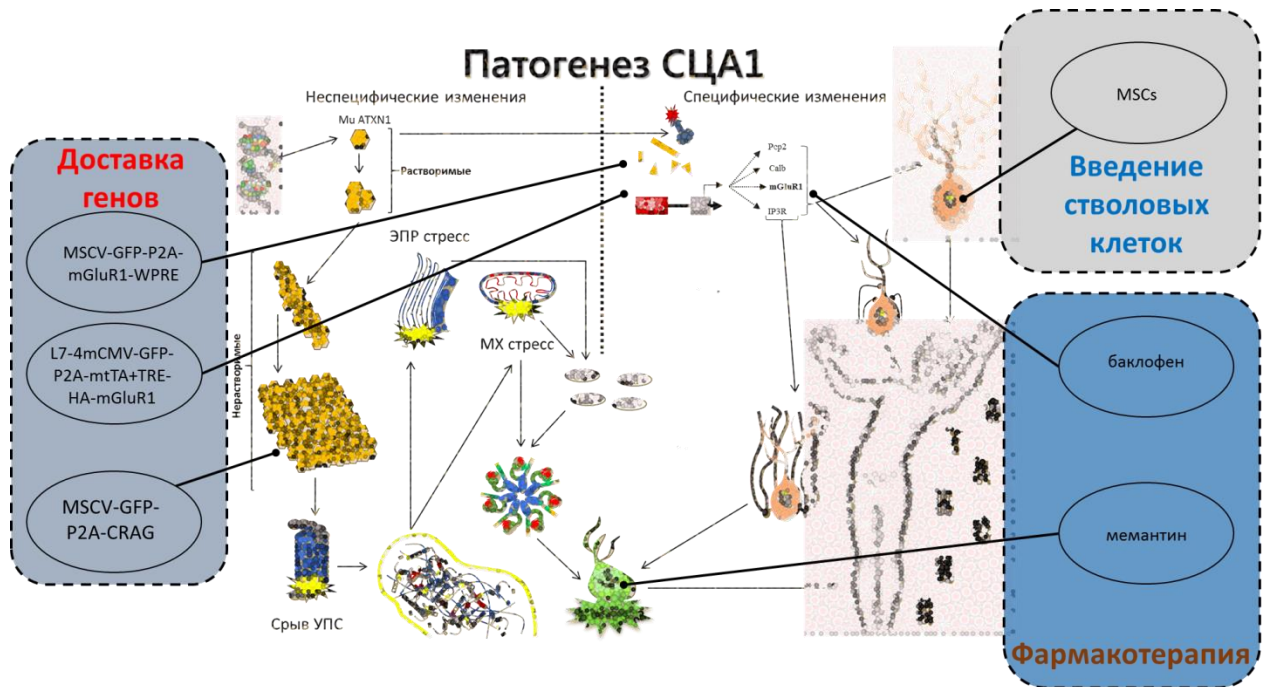


Рисунок 8. Точки приложения терапии в патогенезе полиглутаминовых СЦА. Подходы выделены в три группы: введение рекомбинантного гена, введение стволовых клеток и фармакотерапия.

2.2 Методы исследования

В данной работе были использованы генетические, иммунологические, гистохимические, электрофизиологические и визуализационные методы исследования.

2.2.1. Создание вирусных векторов

Создание лентивирусных векторов (LVV).

Белок вируса типа G Везикулярного стоматита (VSV-G) псевдотипов векторов ВИЧ были использованы в исследованиях. Основа плазмид-хелперов была выделена из рCAGGS (410). Вирусные векторы были сконструированы для экспрессии GFP или GFP и укороченной формы

атаксина 3 с 69 глутаминовыми повторами (удлинённая полиглутаминовая цепочка; polyQ) (405) под контролем мышинового промотора вируса стволовых клеток (MSCV) (411) или укороченного L7 промотора (tr-L7), включающего в себя, 1 kb оригинального специфического L7 промотора клеток Пуркинье (412). Детальное производство векторов было описано в наших работах (413), (414). Коротко, вирусные вектора производились при трансфекции клеток эндонефроса человека (НЕК) 293Т в смеси с четырьмя плазмидами с использованием метода кальций фосфатной преципитации. Клетки культивировались в Dulbecco's модифицированной Eagle's среде (DMEM) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, 50 Ед/мл пенициллина G и 50µг/мл стрептомицина (рН 7.35) при 37°C в 5% CO₂ окружении. Клетки были посеяны в один слой за 24 ч до трансфекции. Смесь из четырёх плазмид, содержащих pCAGkGP1R, pCAG4RTR2, pCAG-VSV-G и pCL20c-основных лентивирусных плазмид. 16 часов после трансфекции, клетки были промыты солевым фосфатным буфером, не содержащим Ca²⁺ и Mg²⁺ (PBS(-)) дважды. Среда, содержащая частицы векторов, были собраны 40 ч после трансфекции. Среда с образцами, содержащая вирусных частиц были профильтрованы через 0.22-µм мембрану и отцентрифугированы при 25,000 об/мин в течение 90 мин. Супернатант удаляли. По окончании центрифугирования вирусы были суспензированы в 90µл PBS(-) (рН 7.4). Вирусные титры были в пределах 5x10⁹-5x10¹⁰ трансдукций ЕД/мл. Вирусные вектора содержались при 4°C и использовались для инъекции в течение 1 недели.

Создание аденоассоциированных вирусных векторов (AAV).

N-концевой укороченный атаксин 3 с чрезмерно увеличенной полиглутаминовой цепочкой был избирательно экспрессирован в КП с помощью КП специфического L7 промотора (405). Для экспрессии терапевтического гена в КП с помощью аденоассоциированного вирусного вектора серотипа-9 (AAV9), мы использовали мышинового промотора вируса

стволовых клеток (MSCV), который имеет сильную транскрипционную активность в КП (415). Экспрессия плазмид pAAV/MSCV-GFP-P2A-CRAG была получена через ферментативные реакции с использованием pNAV (416) и pCL20c/MSCV-GFP-P2A-CRAG (417). Рекомбинантные одноцепочечные AAV9 вектора были созданы при помощи котрансфекции HEK293 клеток с тремя плазмидами, pAAV/MSCV-GFP-P2A-CRAG, pHelper (Stratagene, La Jolla, CA, USA), и pAAV2/9 (предоставлены Dr. J. Wilson). Вирусные частицы были очищены с помощью преципитации аммонием сульфатом и йодиксанол непрерывное центрифугирование с постоянным повышением скорости, как было описано ранее (418). Геномный титр очищенных AAV9 векторов, определяемых с помощью real-time ПЦР были 9.9×10^{14} векторных геномов/мл.

Создание аденовирусных векторов (AVV)

Для достижения высокого уровня экспрессии ChR2 в ГБ, мы использовали AVV с увеличенным GFAP промотором (419). Векторная конструкция GFAP-ChR2-mKate использовалась ранее (420), (421). Этот вектор с красным флуоресцирующим белком, mKate, использовался, как маркер трансдуцированных клеток. Пролиферация AVV происходила в клетках HEK 293 до полного цитопатического эффекта, после чего, вирусные частицы высвобождались посредством сонификации. Мёртвые остатки HEK клеток удалялись центрифугированием ($3000 \times g$ 10 мин). AVV очищались при ультрацентрифугировании (Optima X, Beckmann Coulter, Brea, CA, USA) в градиенте CsCl, аликвотировались и хранились при -80 °C.

2.2.2. Введение векторных конструкций

Вирусные векторы, были введены двум группам мышей: незрелым мышам на 6-7 день после рождения (P6-P7) и трёхнедельным мышам (P21-P25), в период, когда завершается формирование нейронных путей. Незрелые и трёхнедельные мыши анестезировались при помощи 2% изофлурана

(скорость подачи: 1 л/мин). Трёхнедельным мышам внутрибрюшинно вводился хлорал гидрат (350 мг/кг веса животного), соответственно для создания глубокой анестезии. Вирусные векторы вводились в кору мозжечка, согласно протоколам, разработанным нами (413); (414). Каждая мышь (P21-25) фиксировалась в стереотаксическом аппарате, место последующего введения выбривали. Делался срединный сагиттальный разрез кожи мозгового черепа, и оголялись кости черепа в области расположения мозжечка. Просверливалось трепанационное отверстие 5–6 мм каудальнее брегмы. Поршень шприца типа Hamilton присоединялся к микрокомпрессору (UltramicroPump II; World Precision Instruments (WPI), Sarasota, FL, USA), а кончик его шприца помещался в область молекулярного слоя коры червя мозжечка (6-я доля), затем 10 μ л раствора вируса вводилось со скоростью 200 нл/мин с помощью микропроцессорного контроллера (Micro4; WPI). Использовались данные объём и скорость, так как при быстром введении тканей в области инъекции подвергаются набуханию, при медленном введении раствор вируса может распространяться на соседние доли мозжечка через межклеточные пространства, что приводит к инфицированию больших областей. После окончания введения вируса, шприц удалялся, кожа черепа ушивалась, животному присваивался порядковый номер. Для создания оптогенетической модели нейродегенерации, после завершения введения векторной конструкции, отверстие введения на черепе расширялось, к нему подводился светодиод, который надёжно фиксировался к костям черепа с помощью цемента. После всех описанных процедур животное помещалось на обогревающую подушку до выхода его из наркоза. После выхода животного из наркоза, его помещали в обычную клетку к другим животным.

Введение AAV в яремную вену животным и их ПЦР тестирование

Мышата в возрасте P1 и P2 получали инъекцию очищенного раствора AAV9 через внешнюю яремную вену с помощью 0.1-мл шприца Гамильтон (Hamilton Company, Reno, NV, USA) тонкой иглой диаметром 0,32мм (Becton

Dickinson & Co, Franklin Lakes, NJ, USA). Животные без введения AAV использовались как контроль.

2.2.3. Культивирование и ведение МСК

Культивирование МСК

KUM10, линия мезенхимальных стволовых клеток (МСК), выделялась из костного мозга мышей линии C57/B6. Клетки культивировались в среде M061101, содержащей 10 % фетальной бычьей сыворотки и антибиотиков (GP BioSciences, Yokohama, Japan) в присутствии 5 % CO₂ при 37 °C.

Введение в оболочки, покрывающие мозжечок

Мышей анестезировали кетаминном (100 мг/кг) и ксилазином (20 мг/кг) и помещали на стереотаксическое устройство. Кожа рассекалась сагиттально для обнажения черепа. Просверливалось небольшое отверстие 0 мм латеральнее и 5 мм каудальнее брегмы. Кончик иглы шприца (Hamilton, Reno, NV, USA) вводился через твёрдую мозговую оболочку в мягкие мозговые оболочки над верхним двухолмием. Шприц был соединён с микроинжектором (UltramicroPump II; World Precision Instruments (WPI), Sarasota, FL, USA), который управлялся контроллером (Micro4; WPI). GFP-меченные МСК (6×10^5 клеток) с помощью LVV MSCV-GFP, суспензированные в 10 μ л культуральной среде, вводились со скоростью 300 нл/мин.

Инtrateкальное введение МСК

Глубоко анестезированные мыши помещались на стереотаксический аппарат. Введение производилось в области между затылочной костью и 1-м шейным позвонком, где оболочки покрывают продолговатый мозг. Таким образом, игла шприца (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) вводилась в субарахноидальное пространство. После удаления, приблизительно 15 μ л СМЖ, 3×10^3 МСКs суспензированных в 10 μ л культуральной среды, вводились в течение 1 мин.

2.2.4. Генетические методы

Генотипирование с помощью рутинного ПЦР исследования

Три недели после введения AAV в вену, производилось генотипирование мышей (гетерозиготные модельные мыши или мыши дикого типа) с помощью стандартного метода ПЦР при использовании специфических праймеров 5'-ATGTACCCATACGATGTTCC-3' (прямой) и 5'-CTAGCGAGGGAATGAAGAAT-3' (обратный).

Количественная RT-ПЦР

РНК выделялось из полушарий мозжечка животных в возрасте P45 или P46 с помощью набора RNeasy (Qiagen, Hilden, Germany), и подвергалось обратной транскрипции с помощью набора ReverTra AceR qPCR RT Kit (TOYOBO, Osaka, Japan). Измерения производились с помощью набора THUNDERBIRD qPCR Mix (TOYOBO) на амплификаторе Dice TP800 (Takara-Bio, Shiga, Japan) с циклами 95 °C в течение 5 сек и 60 °C в течение 30 сек. Уровень VEGF мРНК нормировался к уровню GAPDH. Изменения экспрессии VEGF были представлены относительно уровня показателей животного дикого типа. Использованы следующие пары праймеров: GAPDH, 5'-ACAACCTTTGGCATTGTGGAA-3', 5'-GATGCAGGGATGATGTTCTG-3'; VEGF, 5'-CTGTGCAGGCTGCTGTAACG-3', 5'-GTTCCCGAAACCCTGAGGAG-3'.

2.2.5. Исследование поведения животных

Тест «Rotarod»

Координацию исследовали с помощью метода вращающейся дорожки «Rotarod» (Rota-Rod Treadmill МК-610; Muromachi Kikai). Применялся протокол с постепенным нарастанием скорости вращения «accelerating protocol» (с 0 до 40 об/мин в течение 3 минут). В течение последующих 2 минут дорожка вращалась с одинаковой скоростью 30 об/мин. Каждому животному давалось 4 попытки. Интервал между попытками составлял 30

минут. Мы записывали время нахождения животного на вращающейся дорожке и брали среднее значение.

Исследование движений задних конечностей

Протокол исследования был разработан Endo et al., 2009 (422). Животных анестезировали 2% изофлураном, после чего им приклеивали круглые отражательные элементы (2 мм в диаметре) на выбранные участки кожи левой конечности: гребень подвздошной кости, большой вертел, коленное сочленение, латеральную лодыжку, пятый плюснефаланговый сустав, и палец на ступне. Движения конечности записывались с частотой 200 кадров/сек с помощью высокоскоростной камеры (HAS-220, DITECT, Inc.). Анализ движений производился в сагиттальной плоскости, параллельно направлению движения мышцы. Программа анализа изображений «DIP-Motion Pro 2D» (DITECT, Inc.) использовалась для обработки движений в двух измерениях точек на суставах и для реконструирования диаграммы движения конечности.

Выработка условного рефлекса на отрицательное подкрепление (Fear conditioning)

Протокол проводился три дня подряд в соответствии со стандартным подходом (423). Тестовое устройство представляло собой акриловую квадратную камеру (размер 33 x 25 x 28 см), которая была помещена внутрь звуконепропускаемой камеры (размер 170 x 210 x 200 см) для минимизации внешнего шума во время испытаний. Над тестовой камерой устанавливали подсветку (светодиоды 100 люкс) и динамик для подачи условного раздражителя. Сетчатый пол был подключен к генератору (Ugo Basile, Gemonio, Италия) для подачи электрического сигнала в качестве безусловного стимула. В 1-й день создавали условия для замирания (тест на кондиционирование). Мышей помещали в камеру и позволяли свободно

исследовать в течение 120 с. После этого предъявляли слуховой стимул (белый шум, 55 дБ) в течение 30 с, а в течение последних 2 с белого шума подавали электрический разряд 0,3 мА. Чтобы установить связь условного и безусловного рефлексов повторяли раздражение три раза за сеанс через 120, 240 и 360 с после начала испытания. Процесс тестирования фиксировали с помощью системы видеоанализа животных ANY MAZE (Behavior Tracking Software, Stoelting, Чикаго, Иллинойс, США). Мы измеряли эпизоды замирания и время замирания (в секундах) во время теста. Спустя 24 часа проводили контекстный тест, при котором мышей помещали в ту же камеру на 300 с при отсутствии каких-либо раздражителей. Сигнальный тест был проведен на 3-й день в новой среде. Эта тестовая камера отличалась цветом стен, структурой пола (без решетки) и освещенностью 30 люкс, что обеспечивало новый контекст по сравнению с камерой, связанной с условиями первого дня. Тест состоял из 180-секундного периода исследования новой среды мышами с последующей подачей белого шума в течение 180-секунд, но без электростимула.

Приподнятый крестообразный лабиринт

Приподнятый крестообразный лабиринт использовали для исследования тревожноподобного поведения (424). Лабиринт состоял из двух открытых рукавов (6 см × 32 см) и двух закрытых рукавов (6 см × 32 см с непрозрачными стенками высотой 19 см) с центральной площадкой 6 см × 6 см и был поднят на 54 см над полом. В окружающей комнате было темно, а лабиринт освещался верхним светом. Мышь помещали в центр лабиринта лицом к открытому рукаву и позволяли исследовать его в течение 5 минут. В течение этого времени движение определялось автоматически с помощью системы видеоанализа животных ANY MAZE. Регистрировалось время нахождения в закрытых рукавах. Перед каждым испытанием лабиринт очищали 70%-ным этанолом (425).

Тест подвешивания мыши за хвост

Тест подвешивания за хвост (TST) используется для выявления поведенческого отчаяния и для оценки эффектов антидепрессантов у мышей (426), (427). Мышь подвешивали за хвост на высоте более 10 см от пола на 6 мин. Периоды и время полной неподвижности определяли с помощью системы видеонализа ANY MAZE. Мыши, которые взбирались по собственному хвосту или падали вниз, были исключены из анализа.

2.2.6. Вестерн-блоттинг

Кора мозжечка, трансгенных животных и экспрессирующих вирусные генетические конструкции, была исследована с помощью вестерн-блоттинга, согласно установленным протоколам (417). Исследуемый материал был растворён в лизирующем буфере, содержащем 50 мл PBS и 5 мл EDTA, 0.4% раствор Triton X-100 был также добавлен вместе с коктейлем ингибиторов протеаз (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan). После обработки ультразвуком, концентрированные белки в образцах определялись с помощью прибора NIPA (non-interfering protein assay; Calbiochem, Darmstadt, Germany). Затем, образцы подвергались электрофорезу в 10% SDS полиакриламидном геле и переносились на PVDF мембраны (Immobilon; Millipore, Temecula, CA, USA), с последующим блокированием 4% раствором обезжиренного сухого молока в Tris-буферизованном солевом растворе, содержащем 0.2% Tween-20. Блоты инкубировались вместе с поликлональными антителами кролика или мыши к исследуемым белкам. Вторичные антитела были HRP-конъюгированы с антикроличьими или антимышиными IgG (Bio-Rad, Tokyo, Japan), соответственно, в разведении 1:4000. Иммунореактивные банды визуализировались с помощью усиленного хемилюминесцентного реагента (ECL plus; GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA).

2.2.7. Изготовление срезов живых тканей

Мыши (P26-P35 и P36-45) были декапетированы, вскрыта черепная коробка и забран головной мозг. Головной мозг целиком был охлаждён в ледяном растворе Рингера ((в мМ): 234 сахарозы, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 10 MgSO₄, 0.5 CaCl₂, 26 NaHCO₃, 11 D-глюкозы), в течение 1 мин, который аэрировался смесью газов 95% O₂ и 5% CO₂. Затем был выделен червь мозжечка и использовался для приготовления парасагиттальных срезов. Для записи полевых потенциалов производилась фронтальная нарезка полушарий большого мозга. Срезы (толщиной 250-µм) были нарезаны с помощью вибротома (D.S.K. Super microslicer Zero 1, Japan) и инкубировались до момента их использования в эксперименте, но не менее 1 часа при комнатной температуре во внеклеточном растворе, имеющим следующий состав (в мМ): 125 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 26 NaHCO₃, 10 D-глюкозы и 0.1 пикротоксина, который аэрировался смесью газов 95% O₂ и 5% CO₂.

2.2.8. Электрофизиологические методы исследования

Метод локальной фиксации потенциала (Patch clamp)

Записи в режиме «целая клетка» проводились, согласно принципам, описанным ранее (413); (417), (428). Потенциал КП был фиксирован на уровне -70 мВ для записи ПВ-возбуждающих постсинаптических токов (ВПСТ) и на уровне -10 мВ для записи ЛВ-ВПСТ. Селективная стимуляция ЛВ и ПВ была подтверждена при помощи подавляющих парных импульсов (PPD) и усиливающих парных импульсов (PPF) амплитуд ВПСР в межстимуляционном интервале в 50 мсек, соответственно. Записи в режиме «целая клетка» производились с визуально различимых КП с использованием 40х водно-иммерсионного объектива, прикреплённого к прямому микроскопу (Axioskop; Zeiss, Oberkochen, Germany), при комнатной температуре (26 °С). Сопротивление фиксирующих пипеток составляло 3–

4 МΩ. Эти пипетки заполнялись внутриклеточным раствором, содержащим (в мМ) 65 К-глюконата, 65 Cs-метансульфоната, 10 KCl, 1 MgCl₂, 4 Na₂АТФ, 1 NaГТФ, 20 HEPES, 0.4 EGTA и 5 сахарозы (pH 7.3, выверенная с помощью CsOH). Срезы продолжительно инкубировались во внеклеточном растворе, содержащем (в мМ): 125 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 26 NaHCO₃, 10 d-глюкозы и 0.1 пикротоксина. Данный раствор постоянно аэрировался смесью газов, содержащим 95% O₂ и 5% CO₂. Пипетки для стимуляции (диаметр кончика 5–10-μм) заполнялись простым внеклеточным раствором и использовались для наложения прямоугольного импульса при очаговой стимуляции (продолжительность, 100 мсек; амплитуда, 5–500 μА). КП были фиксированы при –70 мВ для записи ПВ-ВПСТ и при –10 мВ для записи ЛВ-ВПСТ. Селективная стимуляция ЛВ и ПВ была подтверждена при помощи ППИ и УПИ амплитуд ВПСТ в межстимуляционном интервале 50 мсек, соответственно. Усилитель EPC-8 (НЕКА Instruments, Lambrecht, Germany) и программное обеспечение pCLAMP9 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) использовались для записи и анализа данных. Производилась фильтрация сигналов с частотой 3 кГц и оцифровка с частотой 10 кГц (Digidata 1320A; Molecular Devices). Чтобы найти множественную иннервацию ЛВ КП, стимуляционный электрод систематически перемещался вдоль гранулярного слоя, также увеличивалась сила раздражения в каждой точке соприкосновения электрода с гранулярным слоем. LTD была исследована, как это описано ранее (427); (416). После получения стабильных ПВ-ВПСТ, регистрируемых в течение 10 мин, LTD вызывалась при помощи совместной стимуляции, состоящей из 30 единичных ПВ стимулов вместе с деполяризационным импульсом смещения изначального потенциала с –70 мВ до +20 мВ, длительностью 200 мсек. Гиперполяризационный импульс (–10 мВ, 50 мсек) был применён за 420 мсек до каждого ПВ стимула для наблюдения за сопротивлением доступа. Если сопротивление изменялось более чем на 20%, такие записи не включались в результаты исследований. ПВ-ВПСТ

регистрировались каждые 10 сек при помощи стеклянного электрода, расположенного в молекулярном слое (продолжительность импульса, 10 мсек; сила, 20–100 мкА) приблизительно в удалении на 100 мкм от мягкой мозговой оболочки. Амплитуды ПВ-ВПСТ усреднённые за 1 мин были выбраны как среднее значение (6 импульсов за 1 минуту). Усреднённые амплитуды ПВ-ВПСТ после стимуляции анализировались и выражались в процентном соотношении к усреднённым амплитудам до применения стимуляции. Для записи медленных ВПСТ, сила электрического раздражения была отрегулирована относительно АМРА вызванных быстрых ВПСТ амплитудой 500 рА. Для выделения медленных ВПСТ срезы омывались 6-циано-2,3-дигидрокси-7-нитро-квиноксидом (CNQX), антагонистом глутаматных АМРА рецепторов. Затем, медленные ВПСТ вызывались наложением электрического стимула на ПВ в 200 Гц.

Запись полевых потенциалов

Срезы мозга перфузировали насыщенным кислородом (95% O₂ + 5% CO₂) внеклеточным раствором, содержащим (в мМ) 125 NaCl, 2,5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 1,25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃ и 10 глюкоза при pH 7.2 со скоростью ~2 мл/мин. Для оценки суммарной синаптической активности нейронов пВПСП регистрировали из зон CA1 и CA3 вентрального гиппокампа с помощью электродов из боросиликатного стекла с сопротивлением 5–10 МОм, заполненных внеклеточным раствором. Активность нейронов вызывали электрической стимуляцией (длительность 0,1 мс, 0,33 Гц) с использованием платиноиридиевого электрода 5 МОм, помещенного на коллатераль Шаффера. Регистрация данных (фильтр 3 кГц) и преобразование в цифровой формат осуществлялись с помощью усилителя НЕКА ЕРС10. Были измерены амплитуда пВПСП, время нарастания, τ и коэффициент усиления парных импульсов (PPF). PPF регистрировали с

интервалом 50 мс между первым и вторым пВПСП и измеряли как отношение второго пВПСП к первому пВПСП.

2.2.9. Ca^{2+} имиджинг

ПВ стимулировали импульсами тока (60 мсек, 5-100 μA) через стеклянную пипетку, заполненную внеклеточным раствором. Для улучшения визуализации стимулируемой зоны дендритов в КП на конфокальном изображении, кончик стимуляционной пипетки погружался в раствор раствором PBS, содержащий 0.1-0.2% Alexa Fluor 488-конъюгированным козы к IgG кролика (Life Technologies) в течение 3-10 сек до использования (429). Сигнал от подсвеченного кончика пипетки на поверхности молекулярного слоя никогда не забивал Ca^{2+} сигналы дендритов КП, так как её фокус всегда был выше. Для записи Ca^{2+} сигналов, делались конфокальные флуоресцентные изображения с частотой ~ 30 кадров/сек (33 мсек экспозиция, 512×512 пикселей, без фильтра) с помощью $40\times$ водно иммерсионного объектива (LUMPLFLN 40XW, Olympus, Tokyo, Japan), CCD камеры (iXon3 DU-897E-CS0-#BV-500, Andor, Belfast, Northern Ireland) и высоко скоростной заглушки (CSU-X1, Yokogawa Electric, Tokyo, Japan), прикреплённой к микроскопу (BX51WI, Olympus, Tokyo, Japan). Исследуемая область дендритов КП была выбрана так, чтобы ветвление дендритов лежало максимально в одной плоскости, чтобы избежать перекрытия с сигналами вне фокуса. Более 5 исследуемых областей (ROI) одного и того же размера (обычно десятки ROI) исследовались для описания процесса в дендритах, и каждая ROI сравнивалось с нефлуорисцирующим внеклеточным пространством, чтобы избежать возможной неправильной оценки флуоресценции из-за заднего фона. Правильность положения ROI также подтверждалась на усреднённых снимках или изображениях с максимальной проецированной интенсивностью, полученных от более 300 снимков. Размер ROI был намного меньше, чем внутренний размер Ca^{2+} сигнала дендритов,

распространяющегося радиально от точки стимуляции. Таким образом мы смогли минимизировать появление ложных Ca^{2+} сигналов. Средняя флуоресценция во время t (F_t) в каждой ROI измерялась относительно свечения заднего фоне, и Ca^{2+} -зависимое увеличение флуоресценции измерялось при подсчёте $\Delta F/F_{\text{базового}}$, где $F_{\text{базовое}}$ – это средняя интенсивность свечения до стимуляции ПВ и $\Delta F = F_t - F_{\text{базовое}}$. Свечение заднего фона было получено из области, не содержащей элементы записи на том же снимке. Ca^{2+} трейсы ($\Delta F/F_{\text{базовый}}$) от каждой ROI было показано одинаково, с некоторыми вариациями. Для оценки Ca^{2+} сигналов, пиковых значений, интегралов и времени полуспада измерялись значения из всех Ca^{2+} трейсов, и их максимальные значения были взяты для репрезентативных данных конкретной клетки. Для достижения mGluRs-опосредованных процессов в ПВ-КП синапсах, была применена короткая высокочастотная тетанус-стимуляция. Сила импульса была подобрана так, что амплитуда первой ПВ ВПСТ была примерно 100 pA и без признаков активации ЛВ. После обнаружения Ca^{2+} сигналов, вызванных раздражением ПВ, NBQX (10-20 μM) и D-AP5 (50-100 μM) применялись внеклеточно для изоляции mGluR-опосредованных медленных Ca^{2+} сигналов в дендритах.

2.2.10. Введение биоцитина и морфологический анализ КП

Для последующей визуализации морфологии КП, 0.5% биоцитин (Sigma-Aldrich, CO., St. Louis, USA), разведённый во внутриклеточном растворе, вводился посредством пассивной диффузии через фиксирующую пипетку в КП в режиме «целая клетка». Срезы мозжечка затем фиксировались в 4% растворе параформальдегида. После фиксации в течение одной ночи при 4°C, срезы были промыты в фосфатно-солевом буфере (3 раза по 5 мин) и обработаны 0.1 М в фосфатно-солевом буфере (pH 7.4), содержащим конъюгированный стрептавидин-Алекса 594. После 2 ч инкубации в этом растворе при комнатной температуре, в темноте, срезы

были нанесены на предметные стёкла и покрыты покровным стеклом с добавлением монтирующей жидкости. Срезы анализировались с помощью конфокального лазер-сканирующего микроскопа (LSM 5 PASCAL; Carl Zeiss, Вена, Австрия). При конфокальной микроскопии срезы мозжечка сканировались с интервалом глубины в 1µм в режиме Z-stack. Для визуализации дендритов, флуоресценция, исходящая от Алекса-546 (возбуждаемая Гелиевым/Неоновым лазером) и GFP (возбуждаемая аргоновым лазером) собиралось в два канала с фильтрами на 560 нм и 480-520 нм, соответственно. Подсчёт площади дендритов КП, меченых биоцитином, производился с помощью анализирующей программы IP Lab.

2.2.11. Статистический анализ результатов

При оценке полученных фактических данных были использованы методы статистического описания, а также методы проверки статистических гипотез. Полученные значения выражались, как среднее \pm стандартная ошибка среднего, с приведением количества исследованных КП или животных, либо в виде Me (Q1; Q3) где Me – медиана, Q1 и Q3 – нижний и верхний квартили. В экспериментах использовалось не менее 3 животных в каждой группе, до 15 независимых измерений на группу.

При нормальном распределении выборки (оценка по критерию Колмогорова-Смирнова) статистический анализ различий между группами проводили с помощью непарного/парного t-теста Стьюдента. При распределении отличном от нормального использовали U-критерий Манна-Уитни. При сравнении нескольких групп использовали дисперсионный анализ через апостериорный критерий Тьюки. В анализе таблиц сопряжённости для выборок маленьких размеров использовался точный тест Фишера после множественной парной коррекции Холмса. Во всех случаях различия принимали значимыми при $p \leq 0,05$.

Мы оценивали дендритную и соматическую ёмкости путем оптимизации двухчленного экспоненциального ряда кривой зависимости тока от скачка напряжения, чтобы найти постоянные времени τ_i . Здесь $R_{ss} = 4 \text{ M}\Omega$ – входное сопротивление, A_i – свободные параметры. Индексы d и s обозначают дендритный и соматический компоненты соответственно. Результирующая емкость затем рассчитывалась как $C_i = \tau_i / R_m$ $\{i = d, s\}$. R_m – сопротивление мембраны. Оптимизация проводилась в программе ClampFit 10.7 software.

$V_{\text{шаг}} = 10 \text{ мВ}$ (430):

$$I_{\text{clamp}}(t) = V_{\text{step}} \left(\frac{1}{R_{ss}} - A_d \tau_d e^{-t/\tau_d} - A_s \tau_s e^{-t/\tau_s} \right).$$

DSE анализировали с использованием уравнения двойной экспоненциальной формы сигнала

$$DSE = 100 + A \left(e^{-\frac{t}{\tau_1}} - e^{-\frac{t}{\tau_2}} \right) \left\{ A = \frac{100a\tau_1\tau_2}{\tau_1 - \tau_2} \right\}$$

Эта кривая удобна для предсказания изменений проводимости в синапсах (431). Эта модель была подогнана к экспериментальным данным путем минимизации суммы квадратов остатков по Нелдеру-Миду, чтобы найти « A » – максимальное снижение ВПСТ в процентах от начального уровня, и « τ_1 » и « τ_2 » – периоды полураспада для ВПСТ, чтобы достичь минимума и восстановиться до начальных 100%, соответственно. Для получения 95% доверительных интервалов для параметров A , τ_1 и τ_2 использовался метод параметрической начальной загрузки. Этот анализ был выполнен с использованием пакета Python 3.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Спектр патогенетических изменений при полиглутаминовых СЦА

Сложные разнонаправленные патологические механизмы при СЦА1 обуславливают широкий спектр нарушений, как в КП, так и в других клетках коры мозжечка. Для наглядной демонстрации общности этих процессов мы сравнили СЦА1 модели с другими моделями нейродегенерации мозжечка. Во всех этих моделях мы нашли нарушение морфологии КП, транссинаптической передачи и синаптической пластичности, связанной с mGluR1 передачей сигналов.

3.1.1. Нейрон-обусловленные нарушения в универсальной полиглутаминовой модели

Первая модель – это трансгенная универсальная полиглутаминовая модель (PolyQ). Мы создали модельных мышей, которые экспрессируют укороченный с N-конца атаксин 3 с аномально расширенным поли-Q-участком, селективно в КП. Так как специфический Джозефиновый домен был удалён, то эта модель может считаться универсальной полиглутаминовой моделью спиноцеребеллярных атаксий. В этой модели мы наблюдали нарушение морфологии КП и синаптической передачи.

3.1.1.1. Нарушение морфологии КП в полиглутаминовой модели СЦА

Ёмкость мембраны КП у данных гетерозиготных полиглутаминовых животных (174.2 ± 12.6 pF, n=27) была значительно меньше таковой в сравнении с животными дикого типа (808.8 ± 20.1 pF, n=24) (Рисунок 9А), что показывает, в первую очередь, на значительное уменьшение площади дендритов. Другие пассивные свойства мембраны тела КП, как сопротивление доступа и сопротивление мембраны не отличались в этих исследуемых группах. Внутриклеточное окрашивание и иммуноокраска КП с

помощью биоцитина подтвердила значительное нарушение строения и ветвления дендритов в данных клетках у гетерозиготных полиглутаминовых животных в сравнении с животными дикого типа (Рисунок 9Б). Анализ кинетики ПВ ВПСТ показал значительное ускорение времени подъёма и коэффициента спада (τ) у гетерозиготных полиглутаминовых животных в сравнении с животными дикого типа (Рисунок 9В и Таблица 6), что можно объяснить падением ёмкости дендритов за счёт их укорочения и большей компактности. Не было найдено значимых отличий в кинетике ЛВ ВПСТ, а также PPF и PPD в данных исследуемых группах (Рисунок 9В, Г и Таблица 6) (432).

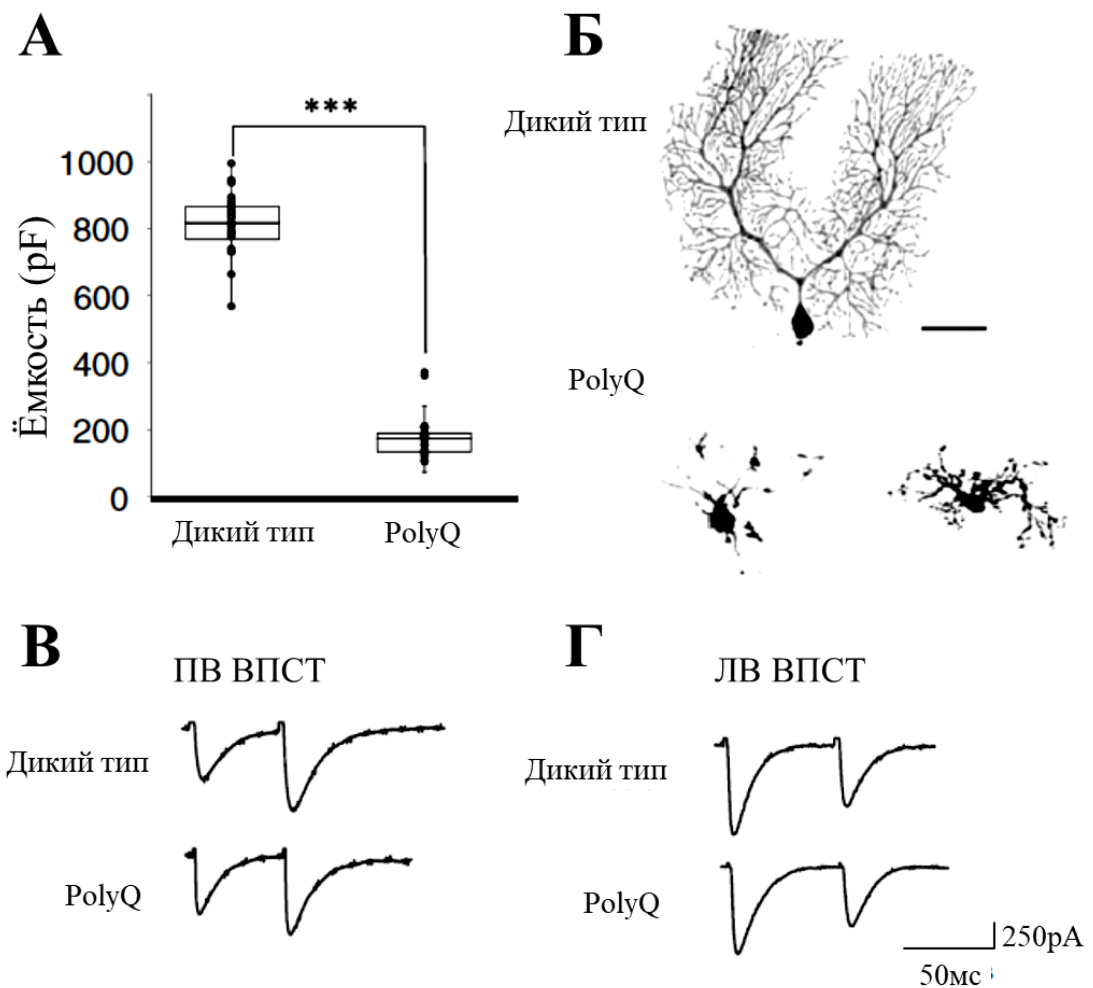


Рисунок 9 Нарушение ветвления дендритов КП у гетерозиготных полиглутаминовых мышей в возрасте 12-16 недель. А Ёмкость мембраны КП у животных дикого типа и гетерозиготных полиглутаминовых мышей. Каждая точка на графике показывает ёмкость отдельной КП в pF. Коробки и усы показывают стандартную ошибку среднего и среднеквадратичное отклонение, соответственно. Срединных линии в коробках показывают средние значения в каждой группе. Звёздочки показывают статистически значимые отличия в сравнении с соответствующей контрольной группой, полученные с помощью непарного критерия Стьюдента, ***p <0.001. Б Репрезентативные изображения биоцитин-меченых КП. Мерная шкала, 50 мкм. В, Г Репрезентативные кривые ПВ ВПСТ (В) и ЛВ ВПСТ (Г) (432).

| | Cm (pF) | Ra (MΩ) | Rm (MΩ) | ПВ ВПСТ | | | | ЛВ ВПСТ | | |
|-----------------------------|--------------|------------|--------------|-----------|-----------|-----------|--------------|-----------|-----------|-----------|
| | | | | Подъём | Спад | PPF | Макс | Подъём | Спад | PPD |
| ДТ без введения (n=24/4) | 808.8 ± 20.1 | 10.0 ± 0.3 | 249.9 ± 22.1 | 2.9 ± 0.2 | 9.6 ± 0.6 | 1.6 ± 0.1 | 724.5 ± 51.9 | 0.7 ± 0.0 | 5.8 ± 0.5 | 0.7 ± 0.2 |
| PolyQ без введения (n=27/4) | 174.2 ± 12.6 | 13.4 ± 0.7 | 300.6 ± 33.9 | 1.6 ± 0.1 | 4.1 ± 0.3 | 1.5 ± 0.1 | 721.3 ± 87.9 | 0.8 ± 0.1 | 5.9 ± 0.4 | 0.7 ± 0.0 |

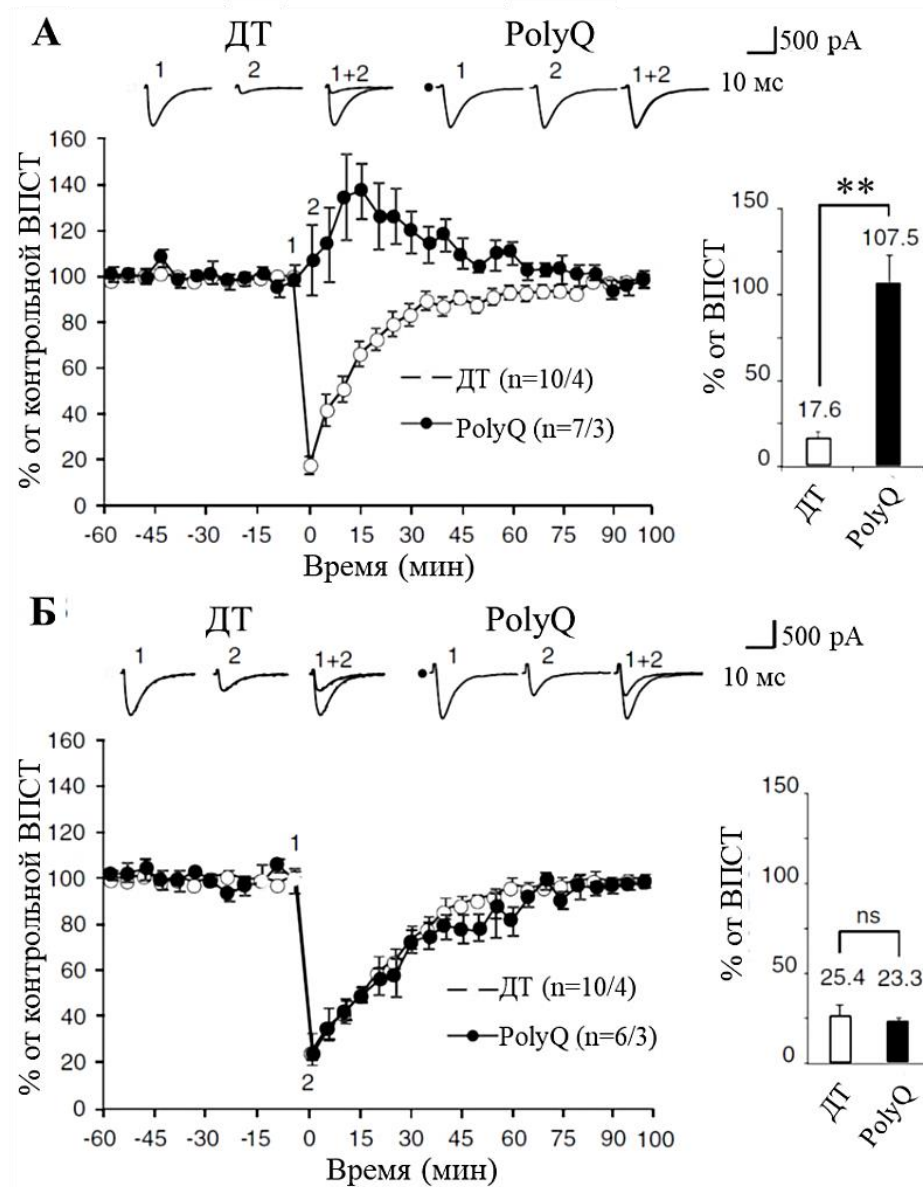
Таблица 6. Электрофизиологические свойства нативных КП дикого типа и КП от PolyQ трансгенных животных. Исследованы животные в возрасте 13-16 недель. Ra, сопротивление доступа; подъём, время подъёма; спад, константа время спада; PPF, коэффициент усиления парных импульсов; PPD, коэффициент угнетения парных импульсов. Показатели PPF и PPD были получены при наложении двух импульсов с разницей во времени в 50 мс. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего (SEM) (432).

3.1.1.2. Нарушение синаптической пластичности КП в полиглутаминовой модели СЦА

Мы исследовали SSE для проверки mGluR1 сигнального пути в КП PolyQ трансгенных животных. В ответ на тетанус стимуляцию, амплитуда ПВ ВПСТ в контрольной группе КП от животных дикого типа (ДТ) уменьшалась до $17,6 \pm 2,3\%$ от уровня до стимуляции. Возвращение амплитуды до исходных значений занимало более 60 с. В противовес этому, амплитуда ПВ ВПСТ в КП от PolyQ трансгенных животных повышалась до $107,5 \pm 12,4\%$ непосредственно после стимуляции и в максимуме достигала 140 % от уровня контрольных значений ($p < 0,01$) (Рисунок 10А). Это доказывает, что у PolyQ трансгенных животных имеет место нарушение mGluR1 сигнального пути. Однако здесь нельзя исключить нарушение выделения эндоканнабиноидов. Для проверки этой гипотезы мы исследовали mGluR независимую эндоканнабиноид-опосредованную синаптическую пластичность (DSE). Однако DSE в КП от PolyQ трансгенных животных не была нарушена и статистически значимо не отличалась от DSE в КП от животных ДТ (Рисунок 10Б) (432).

Рисунок 10 Нарушение синаптически вызванного подавления возбуждения (SSE), но не подавления возбуждения посредством деполяризации (DSE) в ПВ ВПСТ у PolyQ трансгенных животных. Амплитуда ПВ ВПСТ была фиксирована на уровне приблизительно 400 pA до стимуляции SSE или DSE. А Динамика изменения амплитуд ПВ ВПСТ до и после тетанус-стимуляции показывает абсолютное отсутствие SSE в КП PolyQ трансгенных животных. Справа показан график усреднённых амплитуд ПВ ВПСТ сразу после тетанус-стимуляции (временная точка 2) нормированных к уровню до стимуляции (временная точка 1). Б Динамика изменения амплитуд ПВ ВПСТ до и после 5 секундной деполяризации показывает сохранение DSE в КП

PolyQ трансгенных животных. Справа показан график усреднённых амплитуд ПВ ВПСТ сразу после деполяризации (временная точка 2) нормированных к уровню до стимуляции (временная точка 1). Во вкладках над графиками А и Б показаны последние ПВ ВПСТ до стимуляции (1) и первая ПВ ВПСТ после стимуляции (2). Количество (n) исследованных КП и животных (КП/животные) указано на графиках в скобках. Звёздочки показывают статистически значимые отличия в сравнении с соответствующей контрольной группой, полученные с помощью непарного критерия Стьюдента, $**p < 0.01$ (432).



Для исключения патологического механизма депрессии амплитуды ПВ ВПСТ при DSE у PolyQ трансгенных животных не связанного с выделением эндоканнабиноидов, мы провели такой же эксперимент в присутствии AM251, антагониста пресинаптических эндоканнабиноидных рецепторов CB1. В присутствии AM251 DSE полностью блокировалась (Рисунок 11). В совокупности эти данные показывают, что эндоканнабиноид-опосредованная кратковременная пластичность нарушается у PolyQ трансгенных животных в следствие уменьшения сигнализации по mGluR сигнальному пути (432).

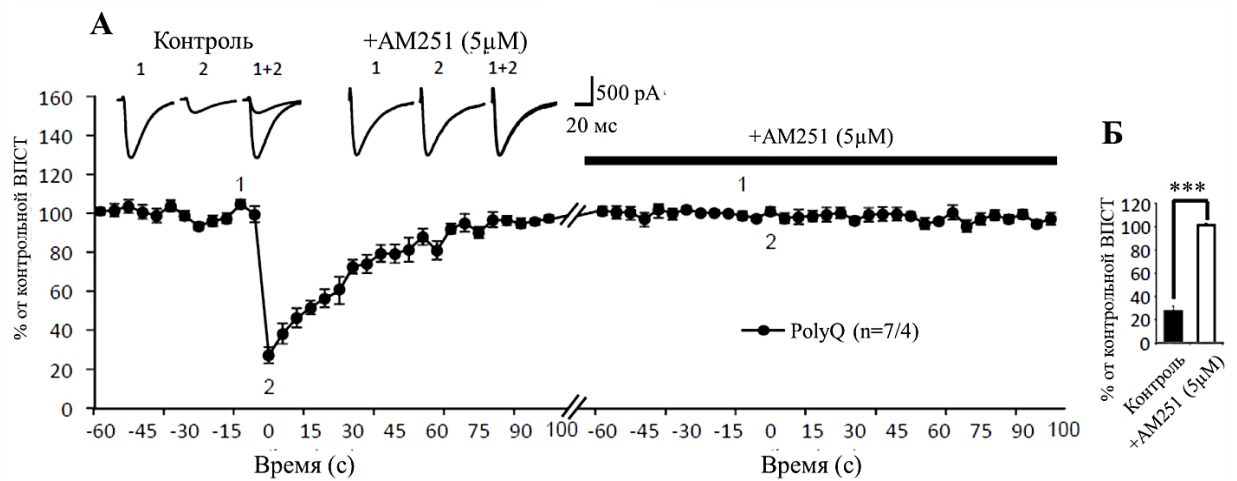


Рисунок 11. подавления возбуждения посредством деполяризации (DSE) в ПВ ВПСТ у PolyQ трансгенных животных и её подавление в присутствии AM251. **А** Репрезентативные кривые ПВ ВПСТ до (1) и сразу после (2) деполяризации, полученные в отсутствии (контроль) и в присутствии антагониста CB1 рецепторов (+AM 251 (5 μM)). Основное изображение: Динамика изменения амплитуд ПВ ВПСТ до и после 5 секундной деполяризации в отсутствии (слева) и в присутствии (справа) of AM 251 (5 μM). Амплитуды ПВ ВПСТ были нормированы к уровню до деполяризации. Количество (n) исследованных КП и животных (КП/животные) указано на графиках в скобках. **Б** График усреднённых амплитуд ПВ ВПСТ сразу после деполяризации (временная точка 2) нормированных к уровню до стимуляции

(временная точка 1) в отсутствии (контроль) и присутствии антагониста ВС1 рецепторов (+АМ 251 (5 μM)). Звёздочки показывают статистически значимые отличия в сравнении с соответствующей контрольной группой, полученные с помощью непарного критерия Стьюдента, *** $p < 0.001$ (432).

Другой функцией mGluR1 является IP3-опосредованная Ca^{2+} мобилизации с последующей активацией различных типов протеин киназ С (PKC) (433). У мутантных мышей с отсутствием mGluR1 или молекул его каскада (Gaq, фосфолипаза $\text{C}\beta 4$, DAG или PKC γ), множественная иннервация ЛВ КП присутствует и у взрослых животных, так как нарушается элиминация ЛВ на 3 неделе постнатального развития (434).

Отсутствие или нарушение функции mGluR1 вызывает последующие изменения в работе и структуре PKC γ . На моделях, содержащих мутантную PKC γ с нарушенным С1 доменом было показано её цитоплазматическое накопление при отсутствии связывания с DAG (435). Более того, даже PKC γ дикого типа, при таких повторных неблагоприятных стимулах может дестабилизироваться и объединяться посредством межмолекулярных взаимодействий с последующей агрегацией и потерей функции (Рис 12) (436).

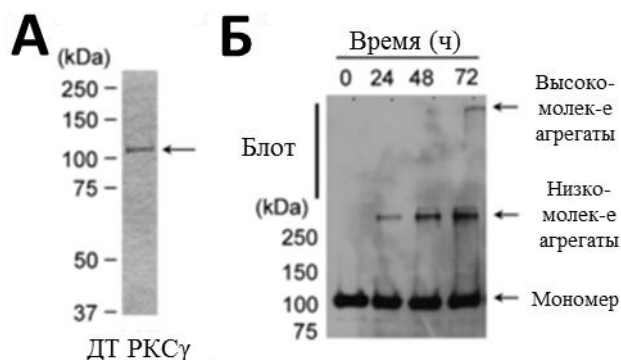


Рисунок 12. ДТ PKC γ формирует амилоид-подобные фибриллы *in vitro*. (А) Представлена окраска «Coomassie Brilliant Blue» очищенной рекомбинантной

РКС γ ДТ. Стрелки показывают рекомбинантный протеин. (Б) Очищенная рекомбинантная РКС γ ДТ инкубировалась при 37°C в течение определённого времени и перенесена в SDS-PAGE с мечением анти-РКС γ . Данные представлены в экспериментах от трёх мышей с одинаковыми результатами (436).

Потеря функции данного фермента у РКС γ нокаутных животных вызывала увеличение количества синапсов КП с ЛВ в более половине случаев регистрации ЛВ ВПСТ у молодых (А) и взрослых (В) животных. Введение же изоформ РКС γ снижало количество синапсов ЛВ и КП (Рис 13) (437).

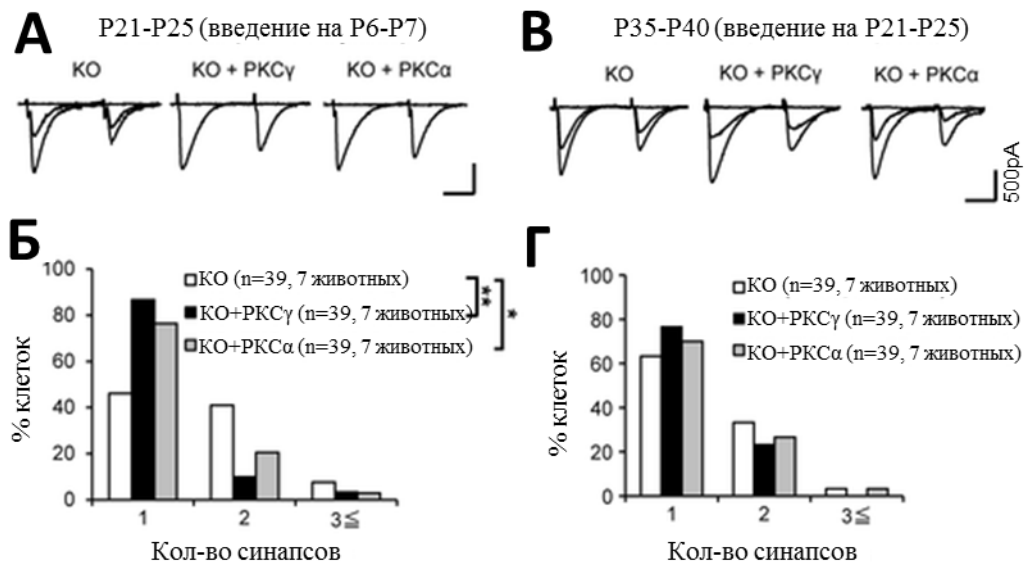


Рисунок 13. Восстановление элиминации синапсов с ЛВ от векторной экспрессии РКС изоформ в КП РКС γ -КО животных. (А и В) Репрезентативные кривые ЛВ ВПСТ в КП от РКС γ КО животных без (слева) или с введением в мозжечок лентивирусных конструкций, экспрессирующих рекомбинантную РКС γ (в середине) или рекомбинантную РКС α (справа) на P6-P7 (А) или P21-P25 (С). Электрофизиологический анализ проводился через 2-3 недели после векторной инъекции. (Б и Г) Частотная гистограмма КП, отражающая количество синапсов с ЛВ. Данные получены от РКС γ КО

КП без (белые колонки) и с введением в мозжечок векторов, экспрессирующих РКС γ (чёрная колонка) или РКС α (серая колонка) на P6–P7 (Б) или P21–P25 (Г). По горизонтали показано количество кривых ЛВ ВПСТ, соответствующих количеству синапсов. Количество использованных КП и животных показано на каждом графике. $**p = 0.0021$ и $*p = 0.0233$, тест Крускала-Волиса (437).

Подобные патологические изменения наблюдались нами в модели полиглутаминовых мышей, у которых более половины всех КП содержали множественные синапсы с ЛВ (Рис 14).

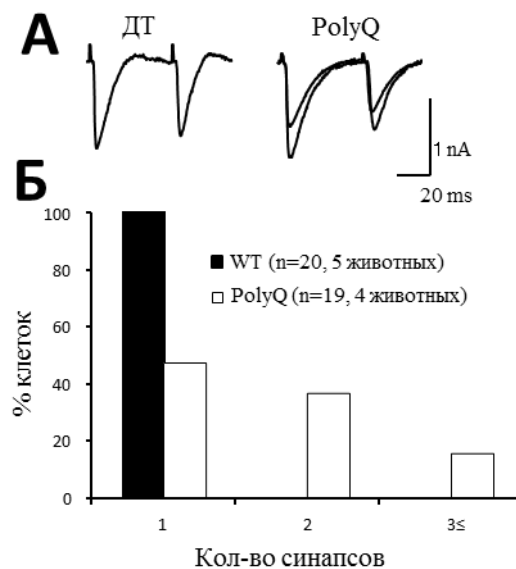


Рисунок 14. Нарушение элиминации синапсов с ЛВ у животных с полиглутаминовой моделью нейродегенерации мозжечка. А Репрезентативные кривые ЛВ ВПСТ в КП от ДТ и PolyQ животных. Б Частотная гистограмма КП, отражающая количество синапсов с ЛВ. Данные получены от КП ДТ (чёрная колонка) и PolyQ (белая колонка). По горизонтали показано количество кривых ЛВ ВПСТ, соответствующих количеству синапсов. Количество использованных КП и животных показано на каждом графике.

3.1.1.3. Нарушение экспрессии ROR α в полиглутаминовой модели СЦА

Мы считаем, что вышеописанные нарушения морфологии КП и mGluR сигнализации у PolyQ модельных животных имеют общий источник нарушения в виде дефицита белка ROR α . Данные нарушения в общей полиглутаминовой модели мы показали впервые. Для этого мы использовали гомозиготных мышей staggerer, у которых наблюдается значительная недостаточность экспрессии белка ROR α , который важен для развития дендритов КП, миграции и организации КП в один слой, и функционального нарушения mGluR сигнализации (303). Этот фенотип имел схожие черты с фенотипом PolyQ трансгенных мышей, но был менее выраженным (Рисунок 15) (432).

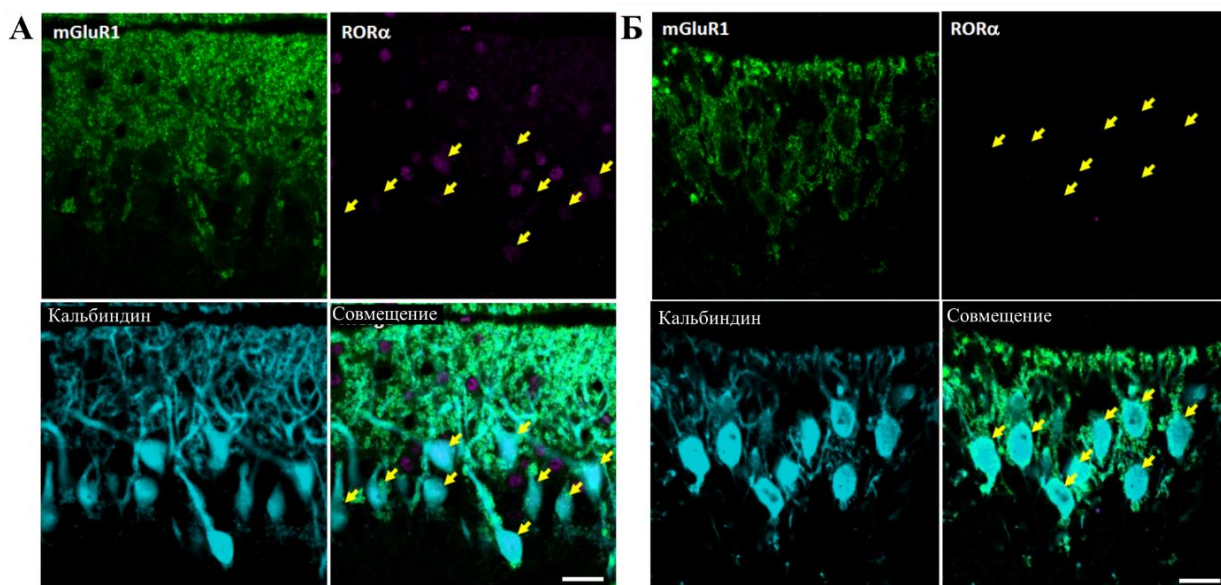


Рисунок 15. Схожесть фенотипов КП PolyQ трансгенных мышей и гомозиготных мышей «staggerer». Микрофотографии срезов мозжечка PolyQ трансгенных мышей (А) и мышей staggerer (Б) в возрасте 13 недель иммуномеченные mGluR1 (зелёная метка), ROR α (пурпурная метка) и кальбиндин (голубая метка). Тела КП отмечены стрелками. В обеих линиях мышей наблюдалось нарушение организации тел КП, бедное ветвление дендритов и гранулярная агрегация mGluR1 (в сравнении с хорошим

распространением mGluR1 в КП дикого типа на Рисунок 3). Примечательно то, что ROR α отсутствует в коре мозжечка гомозиготных мышей *staggerer* и значительно уменьшено в КП PolyQ трансгенных мышей. Мерная шкала: 20 μ m (432).

ROR α хорошо экспрессируется в КП животных дикого типа и является транскрипционным фактором, который инициирует экспрессию различных молекул, вовлечённых в развитие дендритов глутаматные пути передачи сигналов (9). Мыши *staggerer* имеют делецию 122 пар оснований в гене *roga* (406), и имеют нарушение ROR α -опосредованной транскрипции генов. Для понимания патологической общности PolyQ трансгенных мышей и мышей *staggerer*, экспрессия ROR α и mGluR1 белков была исследована с помощью ИГХ. Большое количество ROR α экспрессировалось в ядрах КП и, в меньшей степени, в ядрах корзинчатых и веретенообразных клеток у животных дикого типа (Рисунок 16А). В противовес этому, в ядрах КП PolyQ трансгенных животных наблюдалось значительное уменьшение экспрессии ROR α , а в интернейронах было сохранено или даже усилено (Рисунок 16Б). Более того, белок mGluR, который располагается на терминалях ПВ, давал равномерную окраску МС в срезах животных дикого типа (Рисунок 16А). В случае же PolyQ трансгенных животных и мышей *staggerer*, он формировал агрегаты (Рисунок 15 и Рисунок 16Б). Эти результаты показывают, что уменьшение количества ROR α в ядрах КП и последующие дефекты ROR α -опосредованной транскрипции у PolyQ трансгенных животных могут лежать в основе патологического фенотипа, схожего с фенотипом ROR α -дефицитных гомозиготных мышей *staggerer* (432).

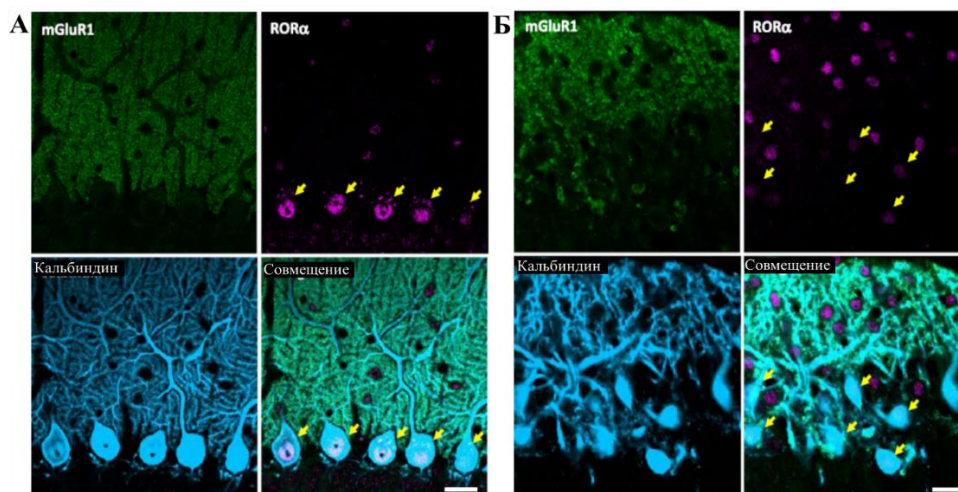


Рисунок 16. Нарушение экспрессии ROR α в ядрах КП PolyQ трансгенных животных. Микрофотографии срезов мозжечка иммуномеченные mGluR1 (зелёная метка), ROR α (пурпурная метка) и кальбиндин (голубая метка). **А** У мышей дикого типа, белок ROR α присутствовал в ядрах КП (стрелки слева) и интернейронах, тогда как mGluR1 локализовался в шипиках дендритов (изображения справа). **Б** В мозжечке PolyQ трансгенных животных, ядра интернейронов были чётко иммуноокрашены анти-ROR α , тогда как тела КП (стрелки справа) имели слабое иммуноокрашивание к ROR α или не имели его вовсе. Белок mGluR1 экспрессировался в дендритах КП PolyQ трансгенных животных, но образовывал большие кластеры в сравнении с животными дикого типа. Мерная шкала, 20 μ m (432).

3.1.2. Нейрон-опосредованные нарушения у СЦА1 модельных мышей

Подобные данные мы получили от трансгенных СЦА1 мышей. Проблемой использования трансгенных животных для изучения заболевания, проявляющегося в зрелом возрасте, может быть появление ранних патологических проявлений. Для этого мы исследовали синаптическую передачу и пластичность у СЦА1 B05 трансгенных животных в 3, 5 и 12 недель после рождения.

3.1.2.1. Нарушение синаптической передачи у B05 СЦА1 модельных мышей

Мы описали базовые синаптические ответы в ПВ-КП синапсах у данных животных при записи ВПСТ в ответ на различные по силе раздражения ПВ. Во всех трёх возрастных категориях (3, 5 и 12 недель), не было выявлено значительных различий (Рисунок 17, $p = 0.48$; 0.50 и 0.36 , соответственно). Однако ПВ ВПСТ были более быстрыми у 5 и 12 недельных СЦА1 B05 трансгенных животных по сравнению с животными дикого типа (Таблица 7; время подъёма у 12 недельных животных, $p < 0.05$; константа времени спада у 5 недельных животных, $p < 0.05$ и у 12 недельных животных, < 0.01) (404).

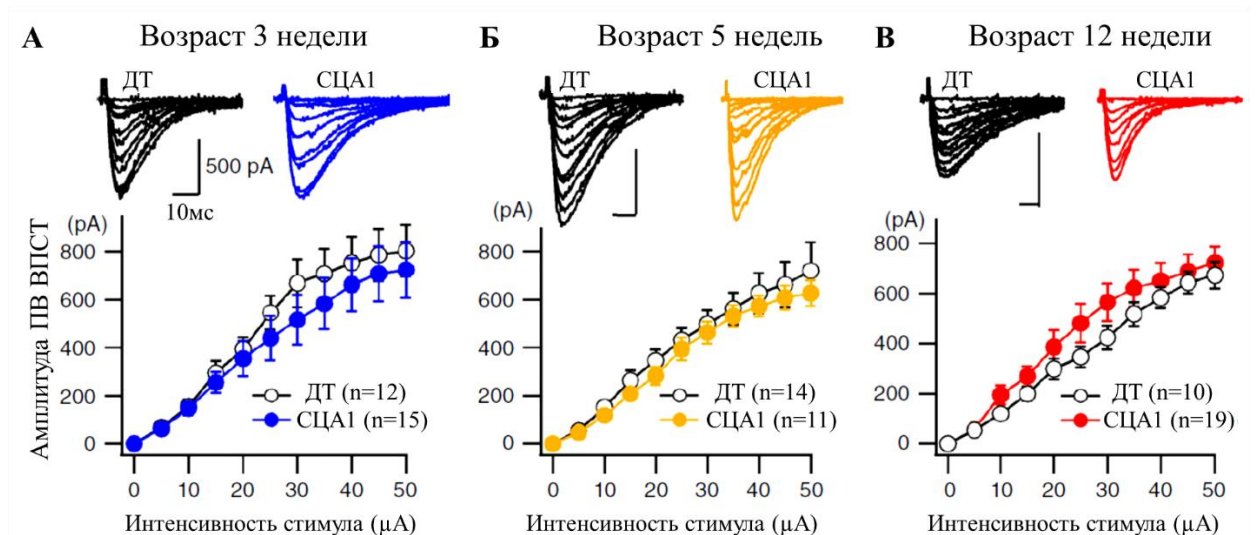


Рисунок 17. Отсутствие нарушений базовых быстрых синаптических ответов в ПВ-КП синапсах у СЦА1 B05 трансгенных животных А–В, усреднённое соотношение между силой стимула ПВ и амплитуды ВПСТ 3 недельных (А), 5 недельных (В) и 12 недельных (С) животных ДТ (белые круги) и СЦА1 B05 трансгенных животных (закрашенные круги). Сверху показаны репрезентативные кривые ПВ ВПСТ. Количество исследованных КП показаны в скобках от, по крайней мере, трёх животных в каждой группе. Не

было выявлено различий с помощью однофакторного дисперсионного анализа (404).

| | | ПВ ВПСТ | | | ЛВ ВПСТ | | | |
|---------------|------|--------------------|----------------------------|----------|----------------|--------------------|----------------------------|-------------|
| | Мыши | время подъёма (мс) | τ (мс ⁻¹) | PPF | Амплитуда (рА) | время подъёма (мс) | τ (мс ⁻¹) | PPD |
| 3 нед | | 2.9 ± 0.4 | 9.4 ± 0.9 | 1.7 ± | 814.6 ± 80.3 | 1.3 ± 0.2 | 7.9 ± 0.4 | 0.74 ± 0.02 |
| ДТ | | (13) | (13) | 0.1 (7) | (10) | (9) | (10) | (10) |
| 3 нед | | 2.5 ± 0.2 | 7.9 ± 0.8 | 1.8 ± | 801.9 ± 81.3 | 1.2 ± 0.1 | 8.0 ± 0.8 | 0.74 ± 0.01 |
| СЦА1 | | (15) | (15) | 0.1 (8) | (10) | (10) | (10) | (10) |
| В05 | | | | | | | | |
| 5 нед | | 3.0 ± 0.2 | 10.9 ± 0.8 | 1.7 ± | 840.7 ± | 1.3 ± 0.07 | 8.1 ± 0.8 | 0.65 ± 0.04 |
| ДТ | | (14) | (14) | 0.1 (14) | 101.4 (10) | (10) | (10) | (10) |
| 5 нед | | 2.6 ± 0.4 | *7.4 ± 0.8 | 1.7 ± | 783.1 ± 59.7 | 1.3 ± 0.1 | 8.3 ± 0.7 | 0.70 ± 0.07 |
| СЦА1 | | (11) | (11) | 0.1 (11) | (10) | (10) | (10) | (10) |
| В05 | | | | | | | | |
| 12 нед | | 2.8 ± 0.3 | 10.0 ± 1.0 | 1.6 ± | 797.3 ± 66.8 | 1.4 ± 0.1 | 8.1 ± 0.8 | 0.71 ± 0.04 |
| ДТ | | (9) | (9) | 0.2 (9) | (10) | (10) | (10) | (10) |
| 12 нед | | *1.7 ± 0.2 | **5.2 ± 0.7 | 1.6 ± | 883.2 ± 108.3 | *1.1 ± 0.1 | 7.8 ± 0.5 | 0.76 ± 0.03 |
| СЦА1 | | (16) | (19) | 0.1 (19) | (10) | (10) | (10) | (10) |
| В05 | | | | | | | | |

Таблица 7. Базовые AMPA рецептор-опосредованные быстрые ВПСТ в КП животных ДТ и СЦА1 В05 трансгенных животных. В ПВ ВПСТ и ЛВ ВПСТ была исследована их кинетика (10–90% время подъёма и константа времени спада) и амплитуды. Коэффициенты PPF и PPD анализировались после наложения двойных стимулов с интервалом в 50 мс. Двухфакторный дисперсионный анализ по генотипу и возрасту показали значительные эффекты генотипа только относительно времени подъёма и константы времени спада ПВ ВПСТ без влияния на возраст (время подъёма; генотип,

$F_{1,72} = 7.46$, $P < 0.01$; возраст, $F_{2,72} = 1.98$, $P = 0.16$; взаимодействие, $F_{2,72} = 0.80$, $P = 0.45$: константа времени спада; генотип, $F_{1,75} = 20.42$, $P < 0.0001$; возраст, $F_{2,75} = 1.41$, $P = 0.25$; взаимодействие, $F_{2,75} = 1.84$, $P = 0.17$). Апостериорный тест между животными ДТ и СЦА1 В05 (генотип) показал значительное различие в возрасте 5 недель в константе времени спада и в возрасте 12 недель во времени подъёма и константы времени спада ПВ ВПСТ. Тест множественного сравнения показывает значительное различие времени подъёма ЛВ ВПСТ в возрасте 12 недель между животными ДТ и СЦА1 В05 трансгенными животными. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$. Количество исследованных КП показаны в скобках (404).

3.1.2.2. Нарушение синаптической пластичности у В05 СЦА1 модельных мышей

Для описания возрастной зависимости функциональных нарушений mGluR сигнализации в синапсах ПВ-КП СЦА1 модельных В05 мышей, мы исследовали mGluR-опосредованные медленные ВПСТ в выше указанных трёх временных точках. В присутствии NBQX (10–20 μM), блокирующего AMPA рецепторы, тетанус-стимуляция ПВ (10 и 25 импульсов с частотой 200 Гц) эффективно вызывала медленные ВПСТ у мышей ДТ во всех исследуемых группах (Рисунок 18А, верхняя часть). В противовес этому, mGluR-обусловленные медленные ВПСТ были значительно уменьшены в КП СЦА1 модельных В05 мышей в возрасте 5 недель (10 импульсов, 0.16 ± 0.03 , нормированные к амплитуде 3 недельных животных дикого типа $p < 0.005$; 25 импульсов, 0.15 ± 0.03 , $p < 0.001$; $n = 11$ КП от 4 животных) и старше (10 импульсов, 0.15 ± 0.03 , нормализованные к тем же показателям, $p < 0.05$; 20 импульсов, 0.13 ± 0.03 , $p < 0.05$; $n = 11$ КП от 4 животных). У молодых СЦА1 модельных В05 животных в возрасте 3 недель амплитуды медленных ВПСТ не отличались от таковых, полученных от животных дикого типа

(Рисунок 18А). Эти находки подтверждают тот факт, что экспрессия TRPC3 подавляется у СЦА1 В05 трансгенных животных с возраста 4 недель (208), так как открытие TRPC3 каналов вызывает появление медленных ВПСТ опосредованно через активацию mGluR (438). Далее мы исследовали синаптически вызванное подавление возбуждения (SSE) у СЦА1 В05 трансгенных животных. У животных дикого типа в возрасте 3, 5 и 12 недель SSE не отличалось. Такие же показатели были достигнуты при исследовании СЦА1 В05 трансгенных животных в возрасте 3 недель (Рисунок 18Б, чёрные и голубые линии, $n = 10$). В более зрелом возрасте (5 и 12 недель) СЦА1 В05 трансгенные мыши показали прогрессирующее нарушение SSE (нормированные амплитуды первых ВПСТ после ПВ стимуляции: в возрасте 5 недель, $47.2 \pm 12.6\%$, $n=10$; 12 недель, $83.2 \pm 11.1\%$, $n = 10$; $p < 0.001$; возрастной эффект, $p < 0.05$; взаимодействие, $p < 0.005$) со значительным сокращением продолжительности депрессии ВПСТ (Рисунок 18Б). Кроме SSE, другая форма синаптической пластичности, LTD, также требует активации mGluR1 рецепторов в КП (439), (440). Поэтому мы исследовали LTD у СЦА1 В05 трансгенных мышей. LTD было вызвано в ПВ-КП синапсах у данных животных в возрасте 3 недель (нормированные амплитуды ПВ ВПСТ после 30 мин после индукции: $71.1 \pm 7.5\%$, $n = 5$ КП от 5 мышей). Данный уровень LTD был замечен у мышей дикого типа (в возрасте 3 недель, $67.7 \pm 3.6\%$, $n = 5$ КП от 5 мышей; 5 недель, $65.9 \pm 2.8\%$, $n = 5$ КП от 5 мышей; 12 недель, $69.4 \pm 6.8\%$, $n = 5$ КП от 5 мышей) (Рисунок 18В). В противовес этому, в возрасте 5- и 12-недель СЦА1 В05 трансгенные мыши показывали нарушение LTD (Рисунок 18В; нормированные амплитуды ПВ ВПСТ после 30 мин после индукции: в возрасте 5 недель, $96.7 \pm 3.0\%$, $n = 5$ КП от 5 мышей; 12 недель, $97.7 \pm 4.0\%$, $n = 8$ КП от 7 мышей; эффект генотипа, $p < 0.0001$; возрастной эффект, $p < 0.05$; взаимодействие, $p < 0.05$). Вместе эти результаты (Рисунок 18А–В) показывают, что СЦА1 В05 трансгенные мыши в возрасте 5 недель (ранняя стадия заболевания) и старше имеют нарушение

mGluR путь передачи сигналов, что вызывают уменьшение амплитуд медленных ВПСТ и подавление SSE и LTD в ПВ-КП синапсах (404).

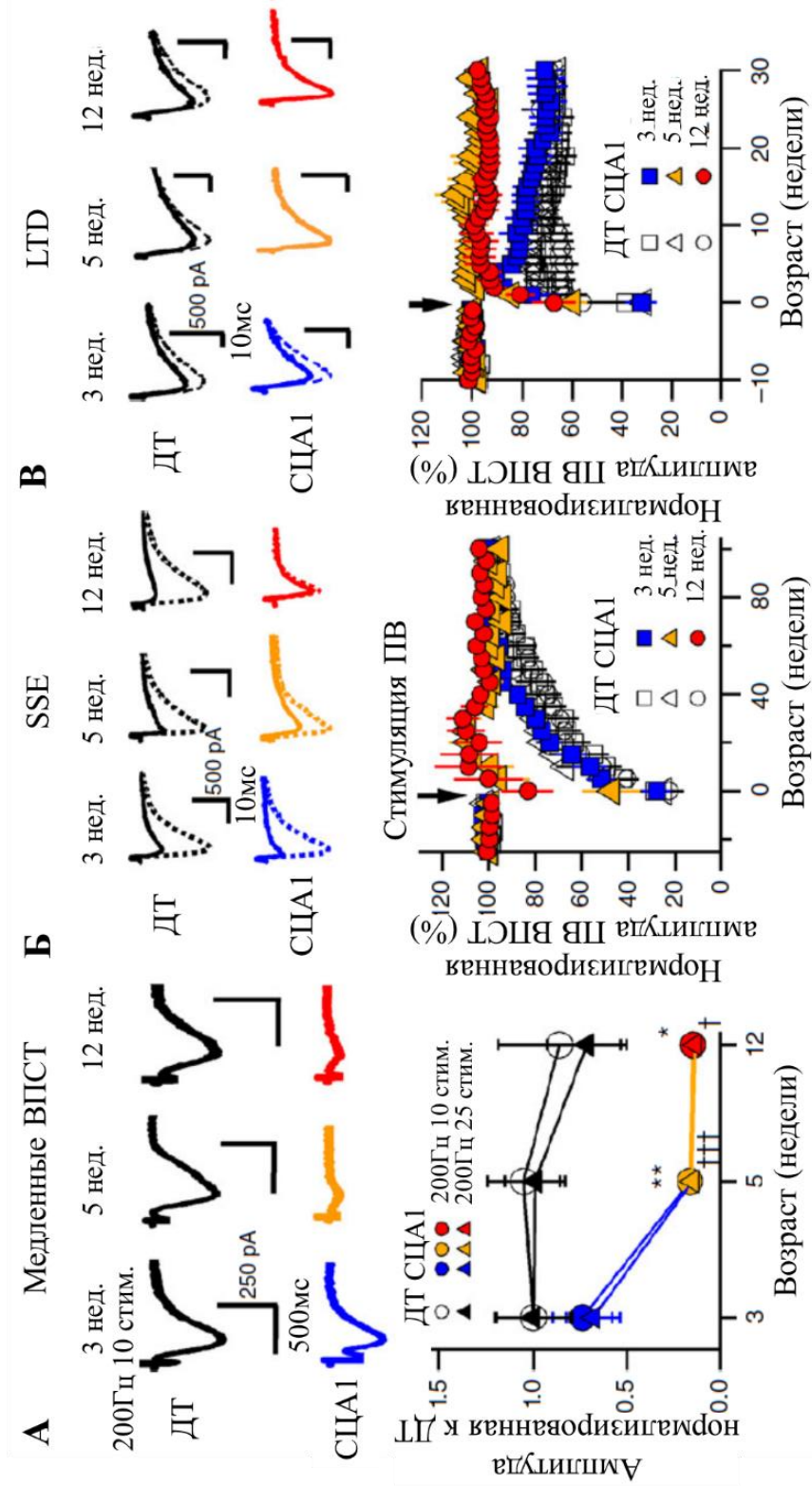


Рисунок 18. Прогрессирующее mGluR1-опосредованное нарушение медленных ВПСТ и синаптической пластичности в ПВ-ВПСТ синапсах у СЦА1 В05 трансгенных мышей. А, кривые mGluR1-опосредованных медленных ВПСТ, записанные с КП дикого типа (верхняя часть) и СЦА1 В05 трансгенных мышей (средняя часть) после добавления блокатора AMPA рецепторов NBQX (20 μ M). Стимуляционные артефакты частично удалены. Внизу представлены усреднённые данные амплитуд медленных ВПСТ, нормированных к показателям мышей дикого типа в возрасте 3 недель после наложения 10 или 25 импульсов с частотой 200 Гц. Двухфакторный дисперсионный анализ для сравнения генотипов (ДТ и СЦА1 В05) в возрасте (3, 5 и 12 недель) выявил значительное влияние, но без взаимодействия (генотип \times возраст) в обеих стимуляционных режимах (200 Гц 10 стим.; генотип $F_{1,64} = 17.16$, $p = 0.0001$; возраст $F_{2,64} = 2.21$, $p = 0.12$; взаимодействие $F_{2,64} = 1.68$, $p = 0.20$; при сравнении мышей ДТ и СЦА1 В05, в возрасте 3 недель $p = 0.28$, 5 недель $**p < 0.005$, 12 недель $*p < 0.05$: 200 Гц 25 стим.; генотип $F_{1,64} = 22.53$, $p < 0.0001$; возраст $F_{2,64} = 4.14$, $p = 0.02$; взаимодействие $F_{2,64} = 1.59$, $p = 0.21$; при сравнении мышей ДТ и СЦА1 В05, в возрасте 3 недель $p = 0.11$, 5 недель $\dagger\dagger\dagger p < 0.001$, в возрасте 12 недель $\dagger p < 0.05$). Б и В, верхняя и средняя часть, кривые быстрых ПВ ВПСТ до (пунктирные линии) и после (непрерывные линии) индукции mGluR1-опосредованной кратковременной (В, SSE; 1я ВПСТ после стимула) и долговременной (В, LTD; ВПСТ 30 мин после стимуляции) синаптической пластичности. Нижние графики показывают изменение нормированных к контролю амплитуд ПВ ВПСТ во времени после индукции (показано стрелкой) синаптической пластичности: SSE (Б) и LTD (В) (404).

Морфология КП и локализация mGluR1 в КП, выявленные с помощью иммуногистохимии были нормальными в возрасте 5 недель у СЦА1 В05 трансгенных мышей на ранней стадии заболевания (Рисунок 19). Это может

говорить о том, что функциональное нарушение mGluR может начинаться в возрасте 5 недель у СЦА1 В05 трансгенных мышей до морфологических изменений (404).

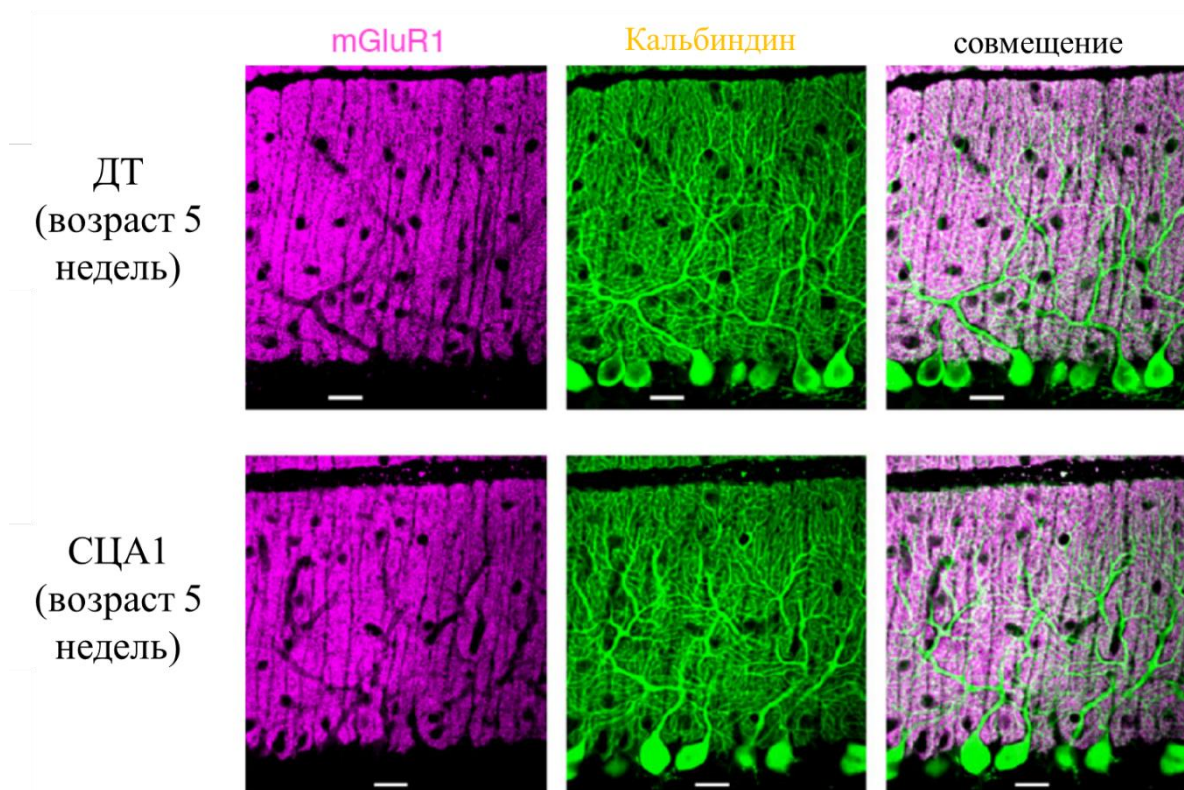


Рисунок 19. Конфокальные изображения срезов мозжечка после двойной окраски на анти-mGluR1 (фиолетовый цвет) и анти-Кальбиндин (зелёный цвет; маркер КП). Мерная шкала = 20 $\mu\text{м}$ (404).

mGluR передача сигналов также вызывает локальные транзиторные Ca^{2+} токи в синапсах ПВ-КП (439), (440), (441), (442). После активации mGluRs, высвобождается вторичный посредник IP3 через $G_{\alpha q/11}$ и фосфолипаза C β путь передачи сигналов. В свою очередь, IP3 вызывает высвобождение Ca^{2+} эндоплазматического ретикулума (ЭПР). Это IP3-опосредованное высвобождение Ca^{2+} играет важнейшую роль в инициации LTD в ПВ-КП синапсах (439). Для понимания процессов, приводящих к нарушению LTD у СЦА1 В05 трансгенных мышей, мы исследовали mGluR- и IP3-

опосредованное локальное высвобождение Ca^{2+} в дендритах КП при помощи анализе конфокальных изображений (443), (444). У трёхнедельных мышей не было выявлено значительной разницы между животными ДТ и СЦА1 В05 трансгенными животными при регистрации mGluR-опосредованных дендритических Ca^{2+} токов при стимуляции ПВ [Рисунок 20А и Б; $\Delta\text{F}/\text{F}_{\text{базового пика}}$; ДТ, 1.00 ± 0.14 , $n = 17$ КП от 7 мышей; СЦА1 В05 животные, 1.27 ± 0.14 , $n = 16$ КП от 6 мышей; $P = 0.25$: Ca^{2+} интеграл ($\Delta\text{F}/\text{F}_{\text{базовый}} \cdot \text{мс}$); ДТ, 1524 ± 283 ; СЦА1 В05, 1617 ± 310 ; $p = 0.83$: Ca^{2+} время спада (мс); ДТ, 1084.0 ± 169.6 ; СЦА1 В05, 909.2 ± 150.5 ; $p = 0.40$]. У мышей более старшего возраста, Однако было выявлено уменьшение пиков дендритических Ca^{2+} токов в КП СЦА1 В05 трансгенных мышей в сравнении с животными ДТ в возрасте 12 недель ($\text{F}/\text{F}_{\text{базовый пик}}$; ДТ, 1.79 ± 0.21 , $n = 11$ КП от 7 мышей; СЦА1 В05, 0.78 ± 0.31 , $n = 9$ КП от 3 мышей, $p < 0.005$) (Рисунок 20А и Б). Более того, интегралы и время спада Ca^{2+} ответов были изменены на более ранних сроках (Рисунок 17Б; Ca^{2+} интегралы; в возрасте 5 недель животные ДТ, 2749 ± 365 , $n = 10$ КП от 4 мышей; СЦА1 В05, 1250 ± 244 , $n = 11$ КП от 5 мышей: $p < 0.05$; В возрасте 12 недель животные ДТ, 2675 ± 532 , $n = 11$ КП от 7 мышей; СЦА1 В05, 829 ± 322 , $n = 9$ КП от 3 мышей: $p < 0.005$. Время спада Ca^{2+} токов в возрасте 5 недель животные ДТ, 1302.2 ± 124.0 мс; СЦА1 В05, 603.7 ± 133.1 мс: $p < 0.05$; В возрасте 12 недель животные ДТ, 1409.3 ± 221.3 мс; СЦА1 В05, 526.1 ± 158.6 мс: $p < 0.005$). Нарушение LTD у СЦА1 В05 трансгенных животных в возрасте 5 недель (Рисунок 20В) может быть объяснено уменьшением интегралов дендритических Ca^{2+} сигналов (Рисунок 20Б), так как индукция LTD критически зависит от общего количества цитоплазматического Ca^{2+} в КП (436). Более того, мы обнаружили, что прогрессирующее уменьшение mGluR-опосредованных Ca^{2+} сигналов у СЦА1 В05 трансгенных мышей линейно коррелирует с прогрессирующим уменьшением ёмкости мембраны КП (Рисунок 20В и Г; в возрасте 3 недель ДТ, 472.6 ± 31.5 pF, $n = 20$ КП от 8 мышей, СЦА1 В05, 431.7 ± 25.9 pF, $n = 16$

КП от 7 мышей; $p = 0.25$: в возрасте 5 недель ДТ, 510.9 ± 23.3 pF, $n = 10$ КП от 4 мышей, СЦА1 В05, 404.5 ± 19.7 pF, $n = 12$ КП от 5 мышей; $p < 0.05$: в возрасте 12 недель ДТ, 536.8 ± 24.0 pF, $n = 15$ КП от 7 мышей, СЦА1 В05, 290.0 ± 28.7 pF, $n = 14$ КП от 4 мышей; $p < 0.0001$), что соотносится с уменьшением площади мембраны КП при их атрофии у СЦА1 В05 трансгенных мышей (266). Это показывает, что атрофия КП сопровождается функциональными нарушениями mGluR пути передачи сигналов при прогрессировании СЦА1, хотя сложность строения дендритов КП ещё сохранена в возрасте 5 недель, на раннем этапе заболевания (445) (Рисунок 20Г) (404).

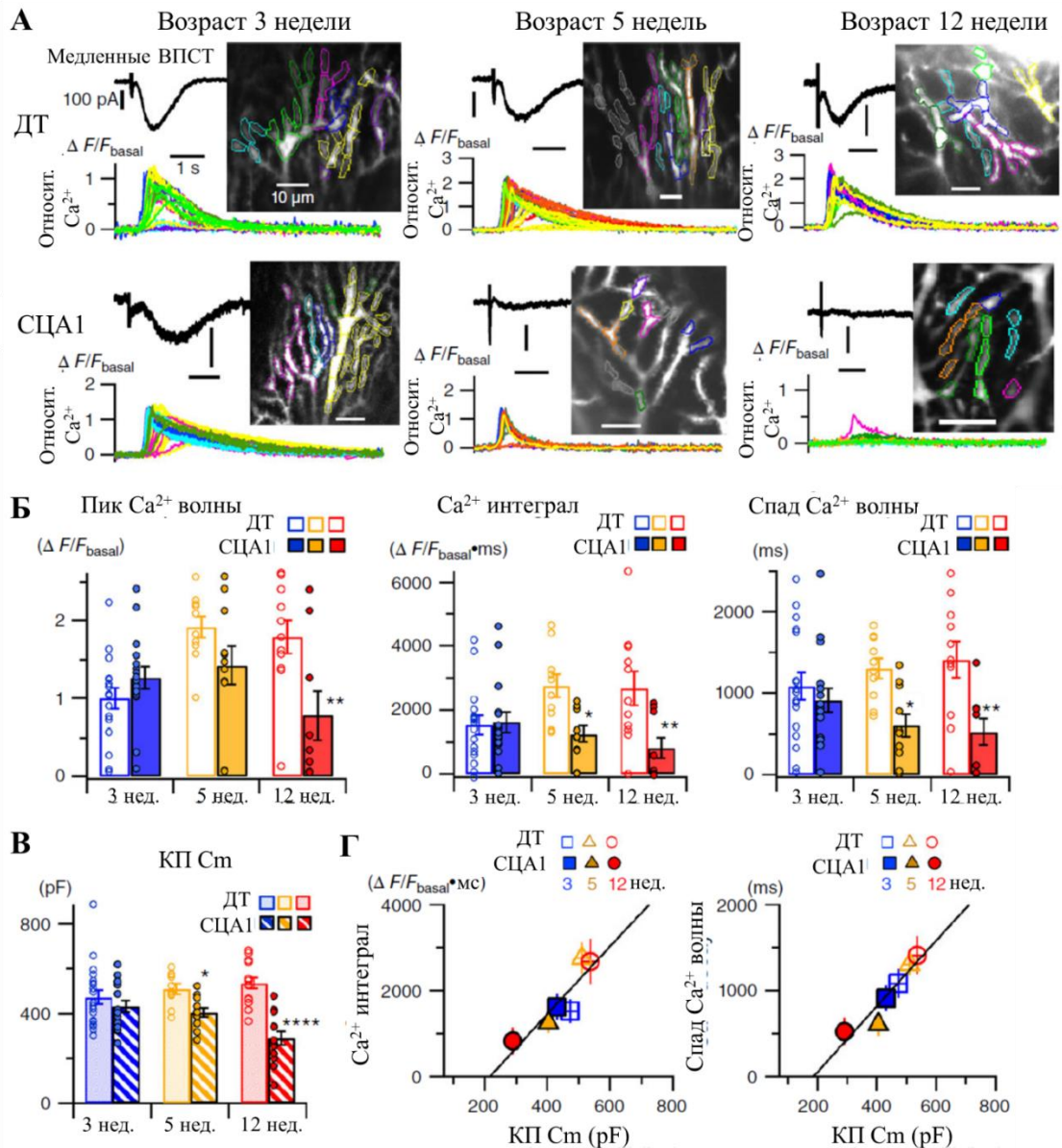


Рисунок 20. Прогрессирующее нарушение локальных дендритических Ca^{2+} токов в ПВ-КП синапсах СЦА1 В05 трансгенных мышей А, кривые mGluR опосредованных ответов КП на короткую тетанус стимуляцию ПВ (10 импульсов с частотой 200 Гц) в присутствии NBQX (10–20 μM) и D-AP5 (50–100 μM). Чёрные и цветные кривые показывают электрические ответы (т.е. медленные ВПСТ) и локальные дендритические токи Ca^{2+} в ответ на стимуляцию, соответственно, в каждом разделе. Изображения во вкладках показывают области (ROIs) дендритов разных цветов в записываемых КП. С соответствующих областей и индивидуальные Ca^{2+} кривые представленные на графике соответствующим цветом. Б и В, усреднённые графики Ca^{2+} токов (Б) и ёмкости мембраны (Cm) (В) КП животных в возрасте 3-, 5- и 12-недель. Кружки и столбики показывают индивидуальные данные и усреднённые значения, соответственно. Множественные сравнения между ДТ и СЦА1 В05 животными соответствующего возраста после двухфакторного дисперсионного анализа показали значительное различие (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0001$). Было найдено различие в эффектах от генотипа при анализе пиков Ca^{2+} токов ($F_{1,68} = 6.58$, $p < 0.05$), Ca^{2+} интеграл ($F_{1,68} = 13.72$, $p < 0.0005$), Ca^{2+} время спада ($F_{1,68} = 17.15$, $p < 0.0001$) и Cm КП ($F_{1,81} = 31.87$, $p < 0.0001$). Г, линейная корреляция между средними значениями Cm и средними интегралами Ca^{2+} (слева, коэффициент корреляции Персона, $r = 0.90$) или Ca^{2+} времени спада (справа, $r = 0.94$) (404).

Таким образом, нами оценён эффект от недостаточности mGluR1 при СЦА1 посредством регистрации и измерения характеристик медленных mGluR1 опосредованных ВПСТ. Этот эффект связан с негативным воздействием мутантного атаксина 1 на развитие СВ1 опосредованной кратковременной и долговременной депрессии в синапсах между параллельными волокнами и клетками Пуркинье.

В трансгенных моделях СЦА1 таких, как B05, экспрессия патологического гена начинается в пренатальном периоде, тогда как для создания модели приближенной к естественному течению полиглутаминовых заболеваний необходимо иметь стабильную экспрессию мутантного атаксина 1 на более поздних сроках. Мы создали такую отсроченную СЦА1 мышиную модель посредством введения в кору мозжечка LVV, кодирующую удлинённую полиглутаминовую последовательность. Так после введения LVV MSCV-ATXN1[Q30]-GFP и LVV MSCV-ATXN1[Q76]-GFP в кору мозжечка не наблюдалось каких-либо различий в морфологии и функции КП с неинъецированными контрольными животными и животными экспрессирующими LVV MSCV-GFP (Рисунки 21-23) (404).

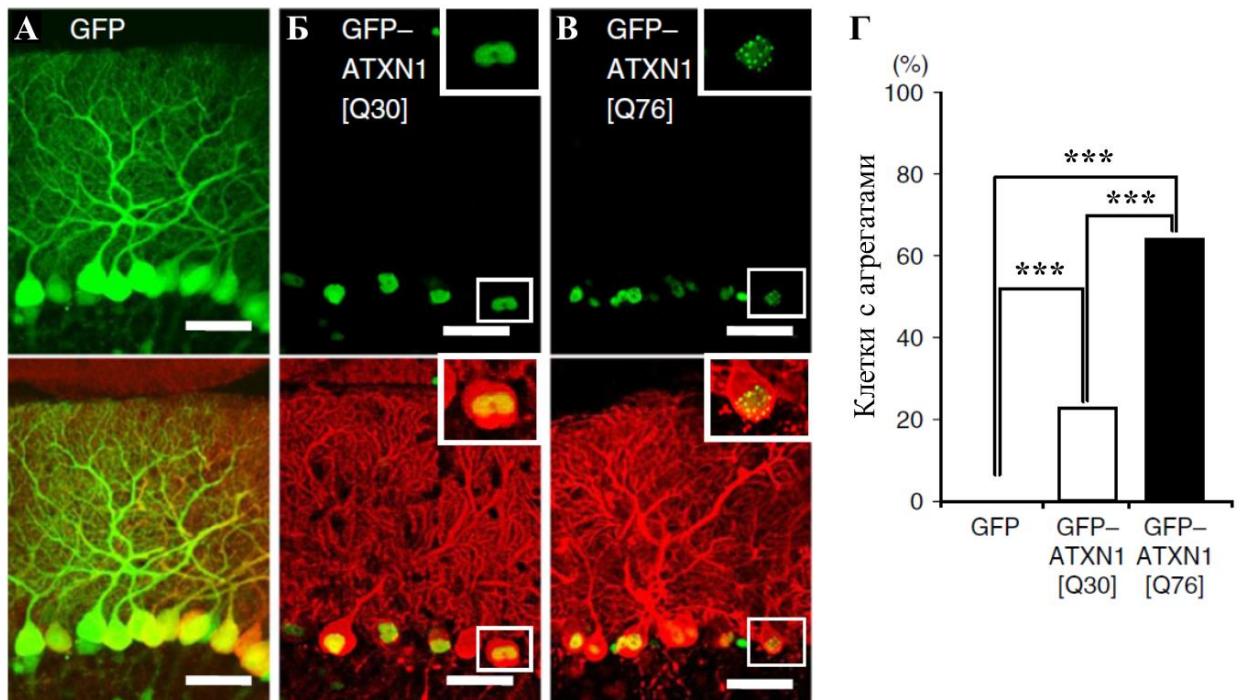


Рисунок 21 Формирование внутриядерных агрегатов в КП, экспрессирующих трансгенный мутантный атаксин 1. А–В, срезы мозжечка от мышей иммуноокрашенные через 8 недель после инфицирования. Верхние и нижние изображения показывают GFP флуоресценцию, наложенную на

иммунофлуоресценцию Кальбиндина, соответственно. Вкладки показывают увеличенные тела КП с полей, ограниченных белыми рамками. Мерная шкала = 50 μm . КП, экспрессирующие трансгенную GFP (А), непатогенный LVV MSCV-GFP - ATXN1[Q30] (Б) и мутантный патогенный LVV MSCV-GFP - ATXN1[Q76] (В). Г, график усреднённых значений показывает процент агрегат-положительных КП. Было исследовано более 400 КП от трёх мышей в каждой группе. *** $P < 0.0001$; Точный тест хи-квадрата после множественной попарной коррекции Холмса (404).

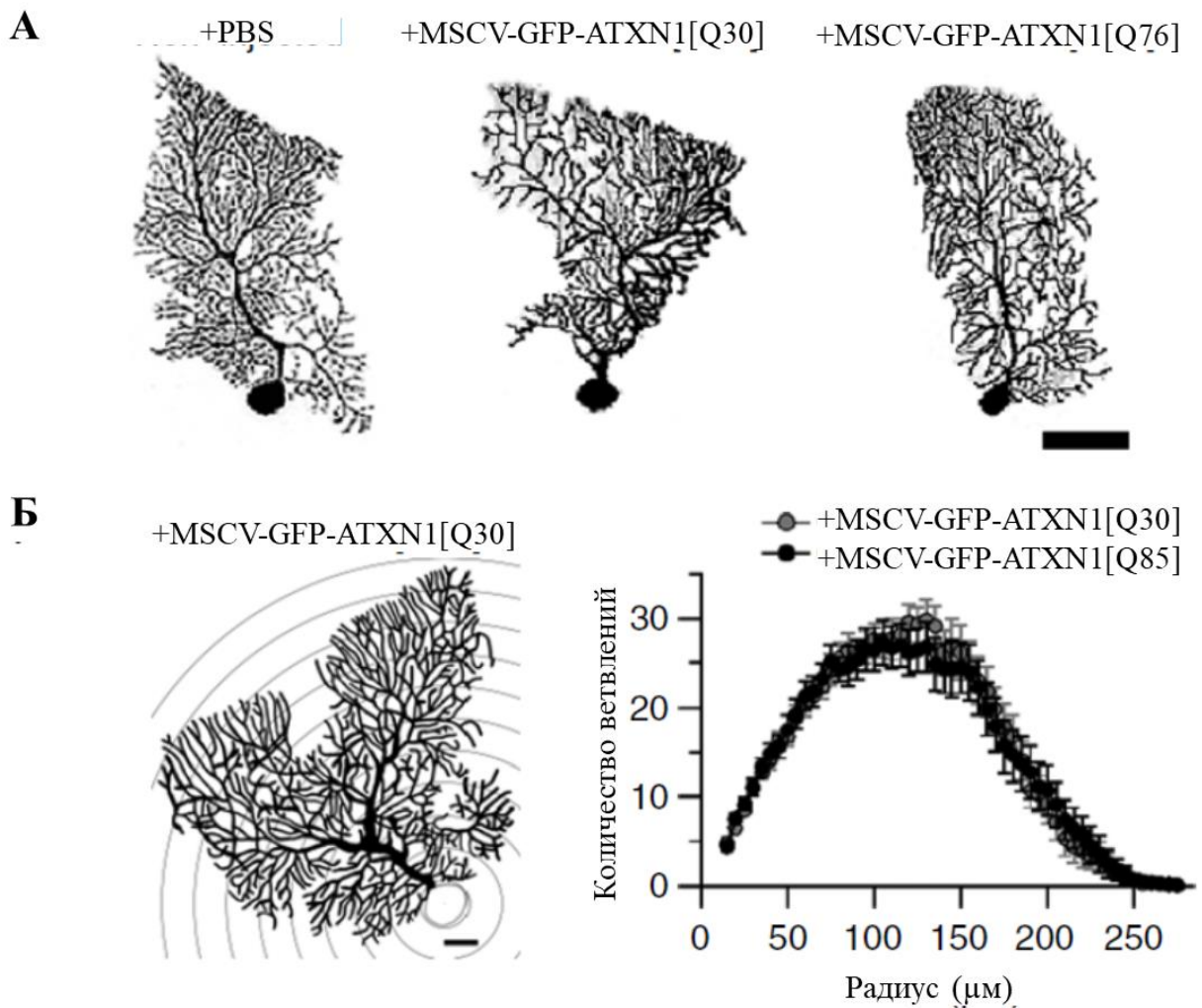


Рисунок 22 Морфология КП, экспрессирующих трансгенный мутантный атаксин 1. А, репрезентативные биоцитин-меченные изображения КП через 8 недель после введения LVV. Мерная шкала = 50 μm . Б, анализ Шоля

показывает сложность морфологии КП. Слева – репрезентативное изображение с концентрическими кругами с шагом в 20 μm . Сомы КП (серый цвет) была исключена из анализа. Мерная шкала = 20 μm . Справа – среднее количество ветвлений дендритов на разном расстоянии от тела клетки. Двухфакторный дисперсионный анализ не показал различия в морфологии дендритов (F справа, влияние генотипа, $F_{1,38} = 0.08$, $P = 0.77$; взаимодействие, $F_{52,1976} = 0.31$, $P > 0.99$) (404).

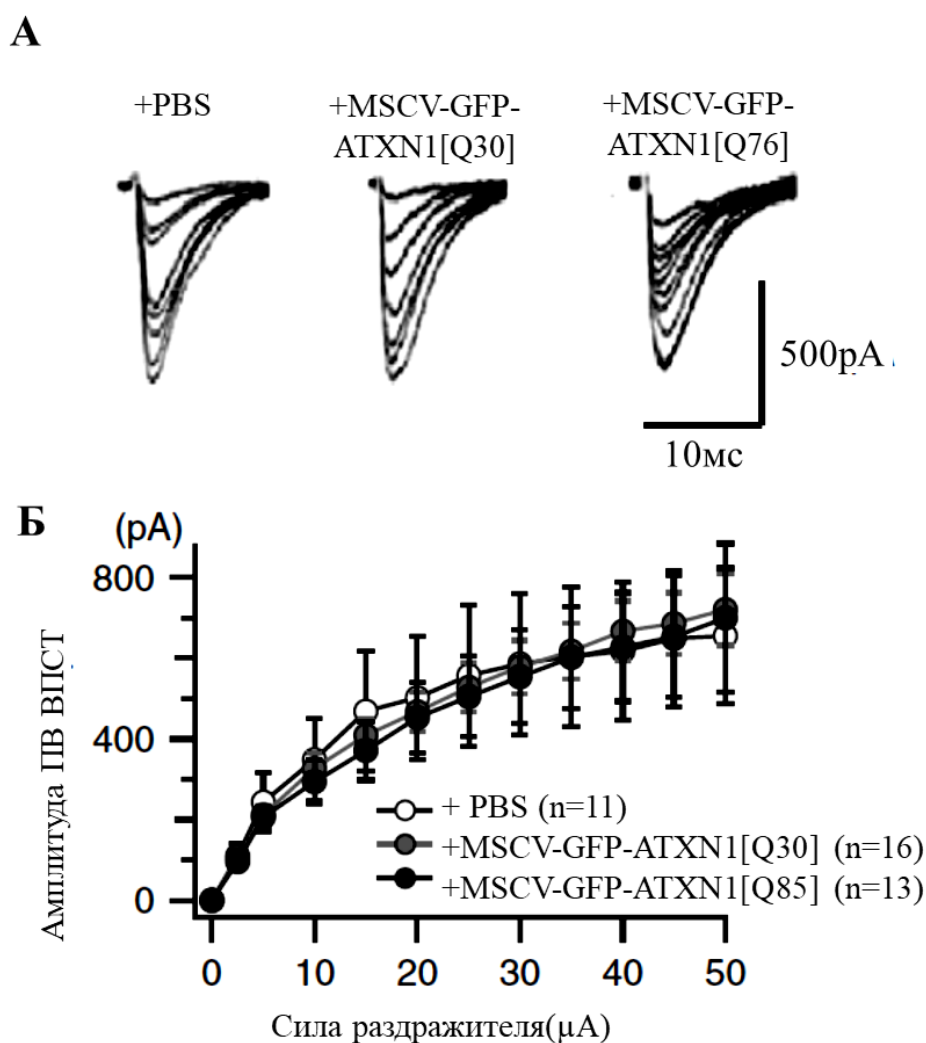


Рисунок 23 Основные свойства ПВ-ВПСТ в КП, экспрессирующих трансгенный мутантный атаксин 1. А репрезентативные кривые ПВ ВПСТ с постепенным возрастанием силы раздражения пресинапса. Б, График зависимости усреднённых амплитуд ВПСТ от силы стимуляции ПВ

контрольных животных и экспрессирующих GFP - ATXN1[Q30] или GFP - ATXN1[Q76]. Количество исследованных КП показано в скобках. Двухфакторный дисперсионный анализ не показал различия ВП ВПСТ амплитуд (влияние генотипа, $F_{2,37} = 0.02$, $P = 0.98$; взаимодействие, $F_{22,407} = 0.16$, $P > 0.99$) (404).

Мутантный атаксин 1, экспрессирующийся в КП, также оказывал негативное влияние, как и в универсальной полиглутаминовой модели с удлинённой полиглутаминовой цепочкой, но иного рода. Так, в КП экспрессирующих LVV MSCV-ATXN1[Q76]-GFP наблюдались агрегаты мутантного белка, преимущественно в ядре клетки (Рисунок 21 В, Г), так как это белок является внутриядерным (445). Базовые электрофизиологические свойства КП, экспрессирующих LVV MSCV-ATXN1[Q76]-GFP, такие, как амплитуда, не отличались от таковых в контрольных группах животных (Рисунок 23). Однако нарушалась синаптическая пластичность, вызванная уменьшением сигнализации по mGluR1 зависимому пути. У данных животных медленные mGluR1 зависимые ВПСТ были значительно уменьшены с 8 недели после введения генетической конструкции по сравнению с контрольной группой животных. Так амплитуда составила $148,4 \pm 12,5 \text{ pA}$ и $387,2 \pm 70,8 \text{ pA}$, соответственно ($p < 0.01$) (Рисунок 24). SSE и LTD также были нарушены у данных животных по сравнению с контрольной группой ($p < 0.005$ и $p < 0.005$, соответственно) (Рисунки 25 и 26) (404).

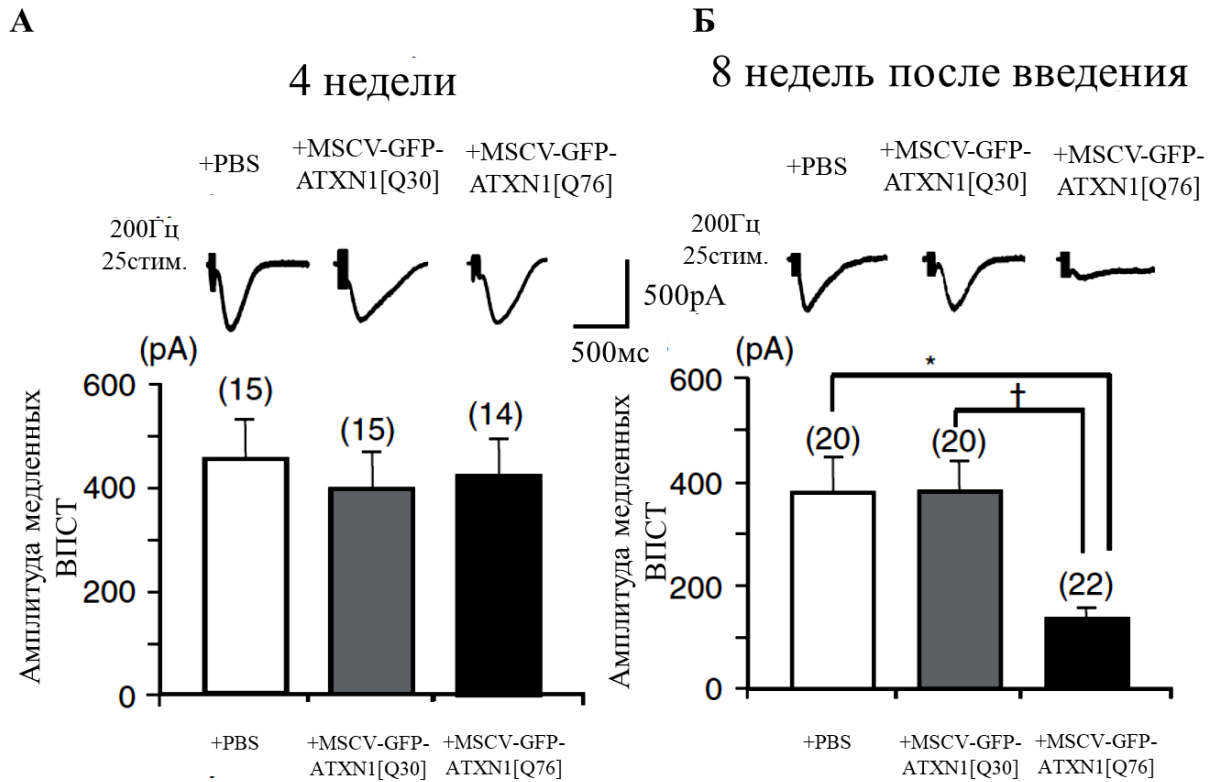


Рисунок 24. Нарушение mGluR-опосредованных процессов – медленных ВПСТ в ВП-КП синапсах мышей экспрессирующих трансгенный патологический атаксин 1. Верхняя часть показывает репрезентативные кривые mGluR-опосредованных медленных ВПСТ, записанных с КП контрольных животных и через 4 недели (А) и 8 недель (Б) после введения LVV MSCV-ATXN1[Q30]-GFP или LVV MSCV-ATXN1[Q76]-GFP. Стимуляционные артефакты частично удалены. Нижняя часть показывает усреднённые данные амплитуд медленных ВПСТ. *P <0.01, †P <0.01; критерий множественного сравнения после однофакторного дисперсионного анализа (404).

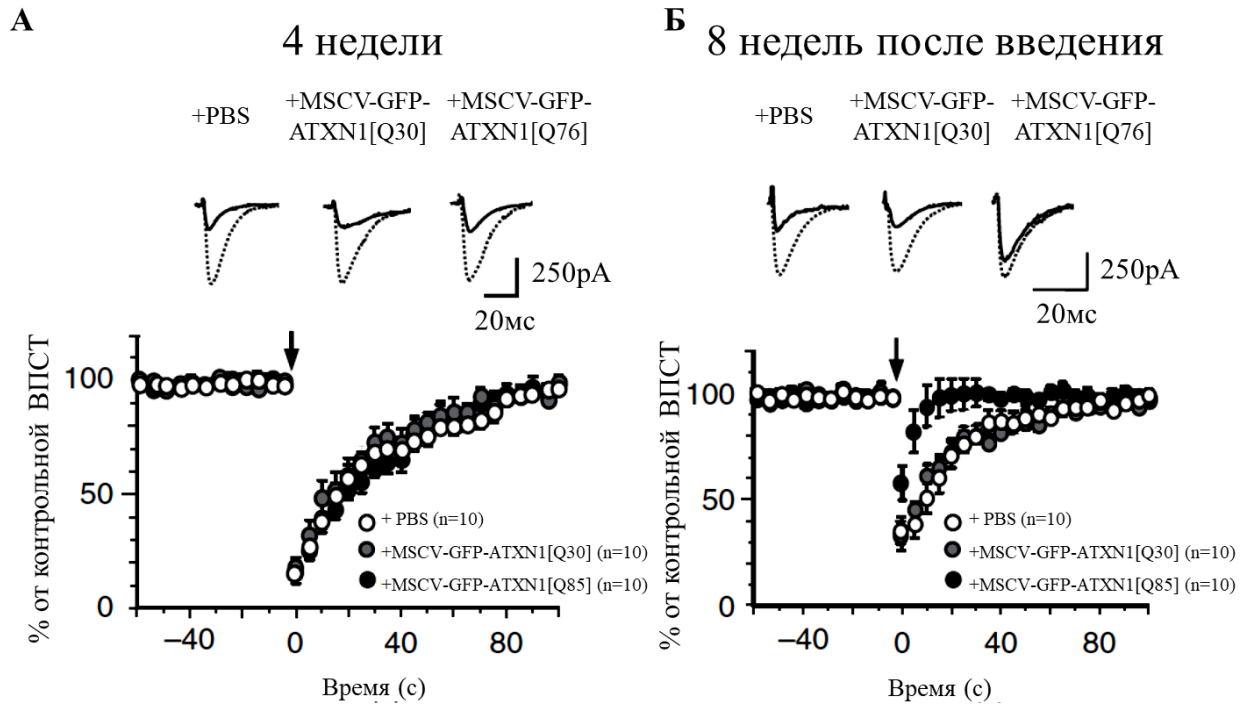


Рисунок 25. Нарушение mGluR-опосредованных процессов – в ВП-КП синапсах мышей экспрессирующих трансгенный патологический атаксин 1. Верхняя часть показывает репрезентативные кривые AMPA опосредованных быстрых ПВ ВПСТ до и после mGluR-опосредованной индукции SSE у животных через 4 недели (А) и 8 недель (Б), после введения LVV MSCV-ATXN1[Q30]-GFP или LVV MSCV-ATXN1[Q76]-GFP. Нижняя часть показывает усреднённые данные быстрых амплитуд ПВ ВПСТ, нормированных к показателям до инициации SSE во время 0 (показано стрелками) (404).

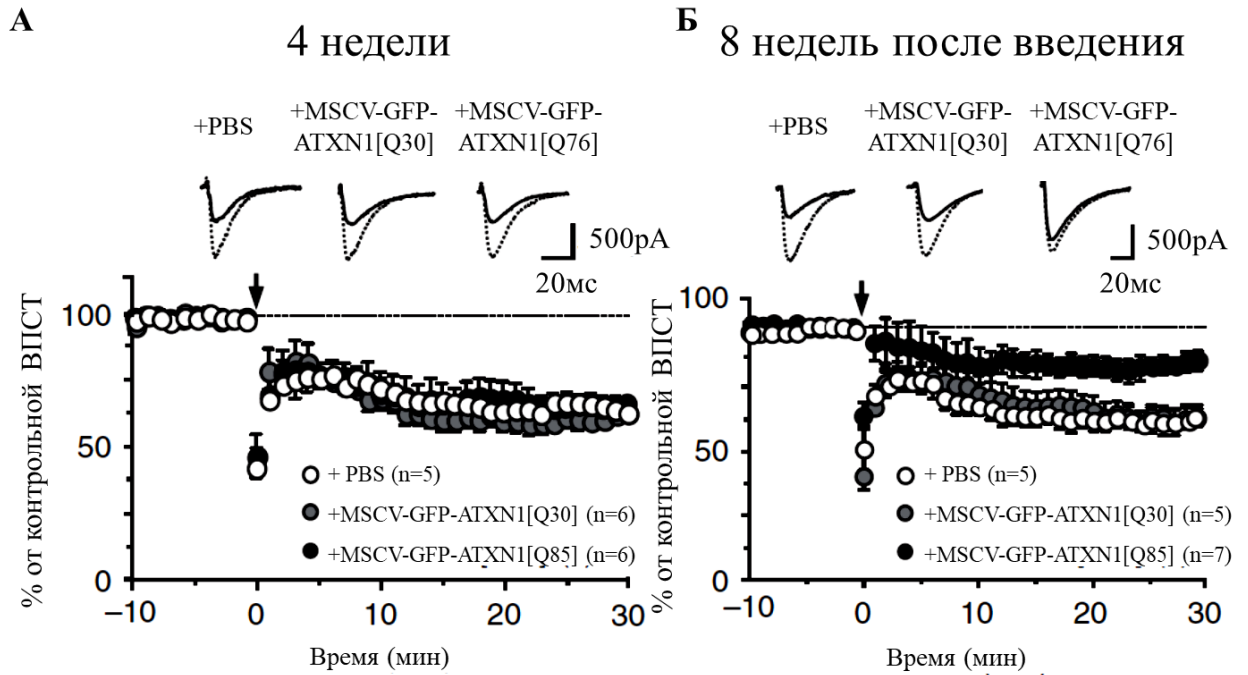


Рисунок 26. Нарушение mGluR-опосредованных процессов – LTD в ВП-КП синапсах мышей экспрессирующих трансгенный патологический атаксин 1. Верхняя часть показывает репрезентативные кривые AMPA опосредованных быстрых ПВ ВПСТ до и после mGluR-опосредованной индукции LTD (ВПСТ спустя 30 минут после инициации) у животных через 4 недели (А) и 8 недель (Б), после введения LVV MSCV-ATXN1[Q30]-GFP или LVV MSCV-ATXN1[Q76]-GFP. Нижняя часть показывает усреднённые данные быстрых амплитуд ПВ ВПСТ, нормированных к изолинии до и после инициации LTD во время 0 (показано стрелками) (404).

Данные функциональные изменения приводят к нарушению координации и моторики СЦА1 модельных животных. Спустя 8 недель после инъекции LVV MSCV-ATXN1[Q76]-GFP в кору мозжечка, животные показывали уменьшение времени нахождения на вращающейся дорожке, по сравнению с контрольной группой (Рисунок 24А, чёрные круги). Интересен тот факт, что экспрессия LVV MSCV-ATXN1[Q30]-GFP также вызывала нарушение координации, но в меньшей степени по сравнению с контрольными

животными (Рисунок 27А, белые круги). Этот факт не был связан с изменением веса животных. Вес был одинаковым во всех исследуемых группах (Рисунок 27Б; $p = 0.74$). Анализ движений задних конечностей выявил изменение траектории пальцев стопы животных экспрессирующих LVV MSCV-ATXN1[Q76]-GFP на 8 неделе после введения конструкции, по сравнению с животными экспрессирующими LVV MSCV-ATXN1[Q30]-GFP. (Рисунок 27В и Г, $p < 0.001$) (404).

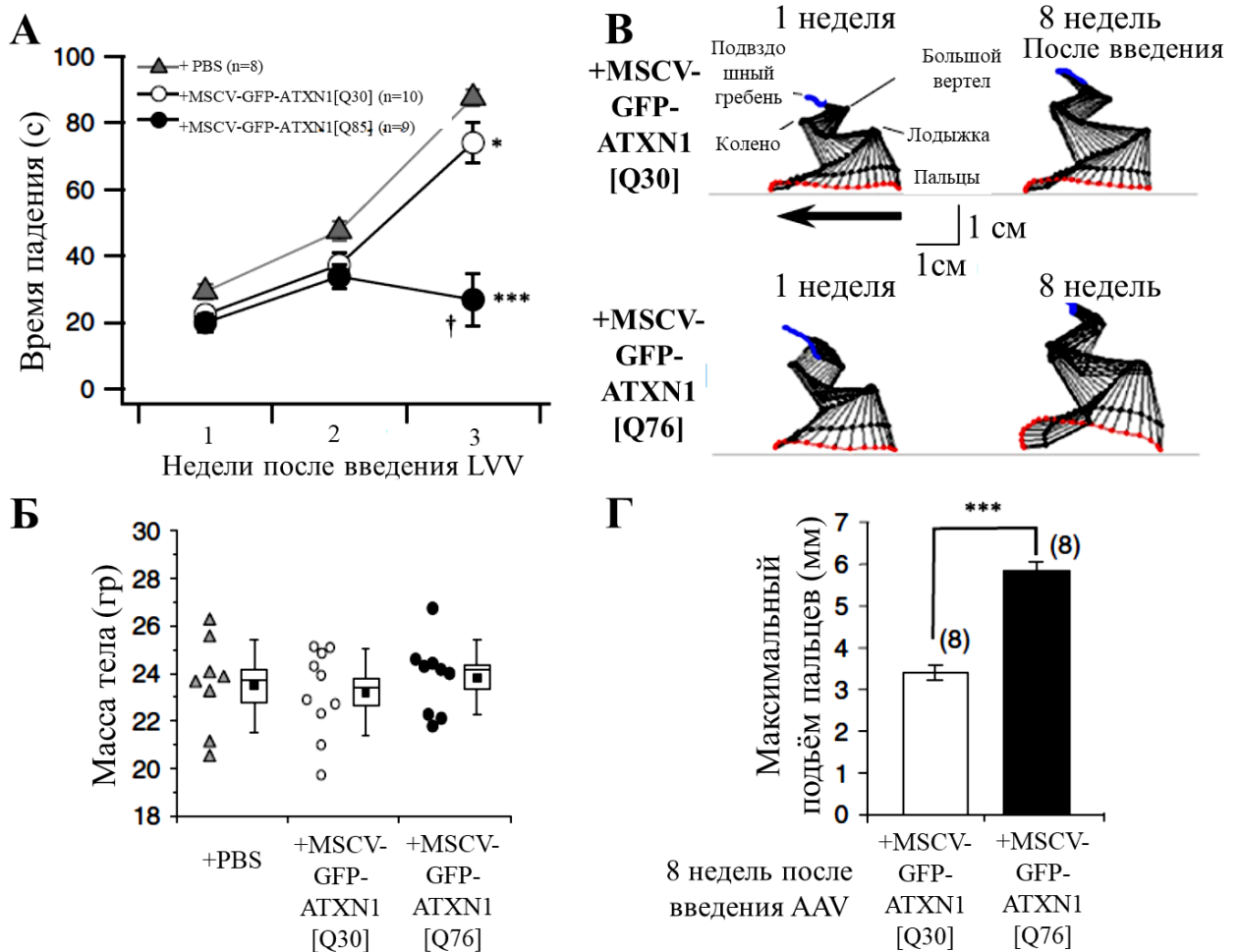


Рисунок 27. Прогрессирующие двигательные нарушения у мышей экспрессирующих атаксин 1. **А**, усреднённые данные исследования на рота роде контрольных мышей (серые треугольники) мышей экспрессирующих LVV MSCV-ATXN1[Q30]-GFP (белые круги) и LVV MSCV-ATXN1[Q76]-GFP (чёрные круги). Количество мышей, протестированных в каждой группе,

показано в скобках. Двухфакторный дисперсионный анализ с повторениями выявил значительные различия между генотипами ($F_{2,24} = 21.5$, $P < 0.0001$), и во времени экспрессии LVV ($F_{2,48} = 78.0$, $P < 0.0001$) и взаимодействии ($F_{2,24} = 21.5$, $P < 0.0001$). Тест множественных сравнений показал значимые различия в генотипах на 8 неделе после введения LVV (* $P < 0.05$, *** $P < 0.0001$ в сравнении с контрольной группой; † $P < 0.05$ в сравнении с мышами экспрессирующими LVV MSCV-ATXN1[Q30]-GFP). **Б**, Вес животных на 8 неделе после введения LVV значительно не отличался среди исследуемых групп животных. **В**, анализ движения задних конечностей мышей экспрессирующих LVV MSCV-ATXN1[Q30]-GFP (верхняя часть) и LVV MSCV-ATXN1[Q76]-GFP (нижняя часть). Палочковые диаграммы показывают движения левой задней конечности у мышей на 1 и 8 неделях после инъекции LVV. Стрелки показывают направление движения конечности. **Г**, гистограмма показывает усреднённую максимальную высоту подъёма левой задней конечности во время движения. *** $P < 0.0001$ (404).

Таким образом, мы создали модель СЦА1 с отсроченным началом заболевания, максимально приближенную по времени к естественному дебюту у больных СЦА1 и характерными патогенетическими нарушениями в виде изменения поведения и кратко- и долговременной синаптической пластичности в синапсах между параллельными волокнами и клетками Пуркинье.

3.1.3. Влияние ГБ на патогенез СЦА1

3.1.3.1. Хроническая активация ГБ приводит к изменению её морфологии.

Изучение патологических изменений в нейронах позволяет предсказать изменения, протекающих у СЦА1 больных. Однако мутантный атаксин 1 у

них экспрессируется, как в нейронах, так и в глии. В свою очередь, было показано, что астроциты также вовлечены в патогенез СЦА1 (13). Мы сравнили две модели неспецифического астроглиоза – оптогенетической и S100 β гиперактивации ГБ с двумя моделями заболеваний СЦА1, векторной направленной экспрессией мутантного атаксина 1 [Q85], селективно в ГБ и СЦА1 нокинных (KI) мышей, которая экспрессирует мутантный атаксин 1 неселективным образом. Это позволило нам найти четкие параллели между всеми четырьмя моделями в виде нарушения морфологии клеток коры мозжечка, нарушения mGluR сигнализации и снижения функции EAAT1. Это позволило не только максимально адекватно описать патогенез заболевания, протекающий у СЦА1 больных, но и выявить общие молекулы мишени, к которым потенциально можно применить уже имеющуюся терапию нейродегенеративных заболеваний.

Чтобы исследовать роль ГБ в патологии мозжечка, мы разработали модель астроглиоза и атрофии мозжечка мыши с использованием хронической оптогенетической активации ГБ с помощью светочувствительного катионного канала родопсина-2 (ChR2); (420), (421). При световой стимуляции этого канала запускается приток Na^+ внутрь клетки, а астроциты, экспрессирующие ChR2, реагируют повышением внутриклеточного Ca^{2+} и высвобождением глиотрансмиттеров (420), (421), (446), (447). Мы пришли к выводу, что хроническая оптогенетическая активация приводит к перегрузке астроцитов Na^+ и уменьшению направленного внутрь градиента Na^+ в ГБ. Поскольку этот градиент имеет решающее значение для работы Na^+ -зависимых транспортёров глутамата, экспрессируемых этими клетками, мы предположили снижение их эффективности, что при хронических состояниях должно ограничивать поглощение глутамата и приводить к эксайтотоксичности за счет гиперактивации глутаматных рецепторов, Ca^{2+} перегрузки и активации путей апоптоза (448).

Через 4 дня после введения AVV-GFAP-mKate-ChR2 флуоресценция mKate была выражена в мозжечковых долях V-VII. В коре мозжечка были обнаружены mKate-положительные тела ГБ (белые стрелки) вдоль слоя КП (Рисунок 28А). mKate-положительная радиальные линии (отростки ГБ) были локализованы вместе с сигналами положительными к GFAP в молекулярном слое (Рисунок 28Б). 4-х дневная стимуляция синим светом (свет +); нижние изображения, Рисунок 28Б) использовалась для специфической активации ГБ, экспрессирующей ChR2. В качестве контроля служили мыши, которым инъецировали AVV-GFAP-mKate-ChR2, но не подвергали фотоактивации (свет-) (Рисунок 28А и Б), или инъецировали PBS с (свет+) и без (свет-) фотостимуляцией (данные не показаны) (408).

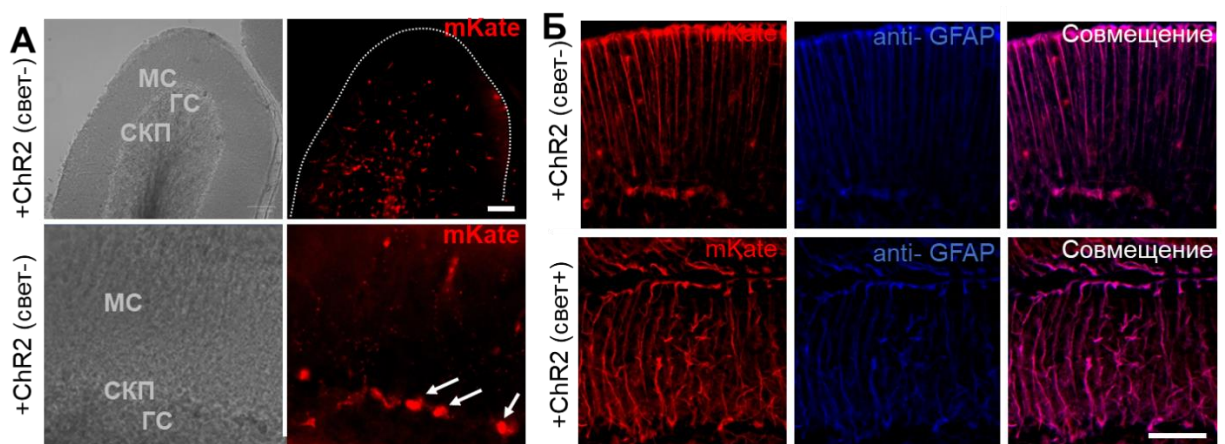


Рисунок 28. Хроническая фотостимуляция ГБ^{Ch2} в течение 4 дней приводит к астроглиозу. А. Репрезентативное фазово-контрастное (слева) и флуоресцентное изображение mKate (справа) срезов мозжечка мышей через 4 дня после инъекции GFAP-ChR2-mKate. Мерная шкала 100 μ m. Нижние изображения – большее увеличение того же изображения. Стрелки показывают тела клеток ГБ. Мерная шкала 25 μ m. MC – молекулярный слой, СКП – слой клеток Пуркинье, ГС – гранулярный слой. Б. Конфокальные изображения отростков ГБ^{ChR2}, меченых mKate (красный) и анти-GFAP

(синий). Хроническая фотостимуляция в течение 4 сут. приводила к утолщению и закручиванию отростков ГБ^{ChR2}. Мерная шкала 100 μm (408).

Введение 2,5 μl 50 μM S100 β в кору мозжечка также вызывало астроглиоз. Двадцать четыре часа спустя широкое распространение S100 β и повышенная экспрессия GFAP в коре мозжечка были выявлены в IV-VII долях мозжечка (Рисунок 29В, Г по сравнению с А и Б; примечательно то, что в мозжечке после инъекции PBS иммунофлуоресценция GFAP была плохо видна) (409).

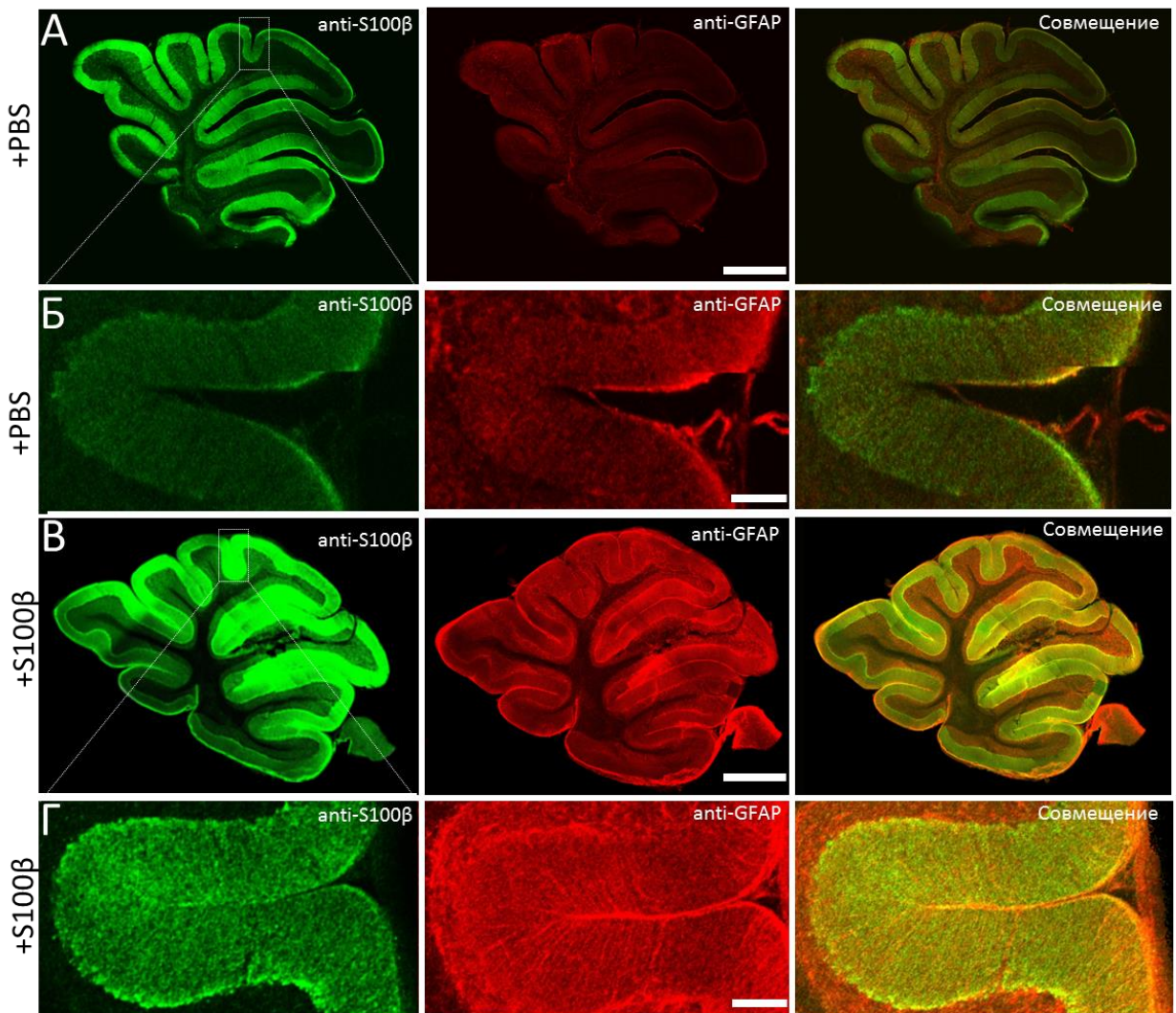


Рисунок 29. S100 β в мозжечке мыши. (А) Конфокальное изображение среза мозжечка, которому вводили PBS. Слева: окраска анти-S100 β . Справа: анти-GFAP. Мерная шкала 1 мм. (Б) Увеличенное конфокальное изображение зоны, указанной на (А). Мерная шкала 100 μ м. (В) и (Г) то же, что и выше, но от мышей, предварительно инъецированных S100 β . Мерная шкала в (В) составляет 1 мм, а в (Г) — 100 μ м (409).

У животных, которым вводили PBS, количество, толщина и длина отростков ГБ не различались независимо от того, использовалась световая стимуляция или нет (Рисунок 30А, Б, В и Таблица 8). Экспрессия ChR2 без световой стимуляции также не влияла на морфологию ГБ. Напротив, хроническая фотостимуляция у мышей, экспрессирующих ChR2-mKate, значительно увеличивала видимое количество иммунопозитивных отростков ГБ (Рисунок 30А) и их толщину (Рисунок 30Б и Таблица 8), что сопровождалось гораздо более сильным окрашиванием/экспрессией GFAP. При этом длина отростков сокращалась (Рисунок 30В), что соответствовало изменениям морфологии ПК (ниже). Эти данные свидетельствуют о том, что хроническая специфическая оптогенетическая стимуляция ГБ приводит к характерным для астроглиоза изменениям (408).

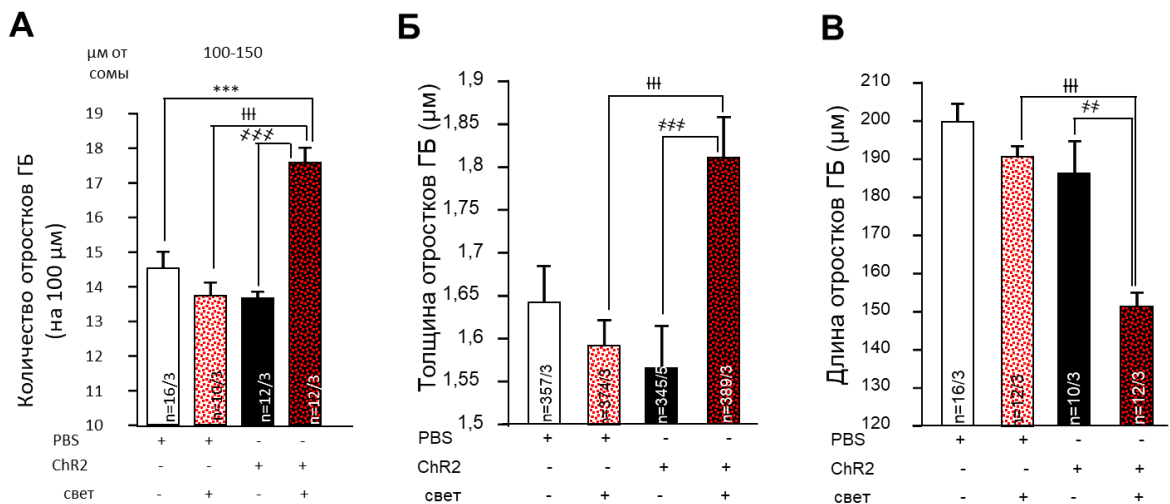


Рисунок 30. Хроническая фотостимуляция ГБ^{Ch2} в течение 4 дней приводит к нарушению её морфологии. А. Количество и Б. толщина отростков ГБ были увеличены при 4-х дневной хронической фотостимуляции, тогда как их длина, наоборот, была уменьшена. Измерения проводились на 100 μ м продольной длины отростков в МС * $p < 0,05$ *** $p < 0,001$ (408).

| Группы | Количество отростков ГБ | Длина отростков ГБ | Толщина отростков ГБ |
|-----------------------------------|-------------------------|--------------------|----------------------|
| +PBS (свет-) (n=14/5) | 14,7 \pm 0,6 | 199,4 \pm 4,6 | 1,6 \pm 0,0 |
| +PBS (свет+) (n = 12/3) | 13,0 \pm 0,6 | 190,0 \pm 2,9 | 1,6 \pm 0,0 |
| +GFAP-ChR2-mKate (свет-) (n=16/7) | 13,9 \pm 0,4 | 186,0 \pm 8,1 | 1,6 \pm 0,1 |
| +GFAP-ChR2-mKate (свет+) (n=15/7) | 18,4 \pm 0,5 | 150,8 \pm 3,6 | 1,8 \pm 0,1 |

Таблица 8. Морфология ГБ. Среднее число отростков ГБ, меченых анти-GFAP; длина и толщина представлены в таблице. Количество отростков ГБ подсчитывали в МС на 100 μ м продольной линии на расстоянии 100-150 мкм от СКП. *** $p < 0,001$; †† $p < 0,01$; † $p < 0,01$ (408).

В модели астроглиоза, вызываемого инъекцией S100 β , толщина отростков ГБ увеличилось (Рисунок 31 А и Б) с $2,8 \pm 0,1 \mu$ м до $3,6 \pm 0,1 \mu$ м, $p = 1,25 \times 10^{-13}$, непарный t-критерий (Рисунок 31В). Количество отростков на 100 μ м продольной длины молекулярного слоя у животных, которым вводили S100 β , было значительно снижено по сравнению с животными, которым вводили PBS с $32,6 \pm 3,3$ до $21,4 \pm 2,0$, $p = 0,013$, t-критерий (Рисунок 31Г). Плотность отростков ГБ также была снижена в местах инъекции S100 β . Мы также измерили долю «GFAP-негативного» пространства в центральной части молекулярного слоя на 100 μ м. В областях, инъецированных S100 β оно увеличилось с $8,1\% \pm 1,6\%$ до $24,0\% \pm 4,5\%$, $p = 0,015$; непарный t-критерий; (Рисунок 31Д). Низкая плотность отростков ГБ в основном является результатом их потери. Это вытекает из того факта, что количество анти-S100 β -меченых клеточных тел на 100 μ м продольной длины СКП у

животных, которым вводили S100 β , было значительно снижено по сравнению с животными, которым вводили PBS, с $10,9 \pm 0,5$ до $9,1 \pm 0,4$, $p = 0,007$, непарный t-тест (рисунок 31E) (409).

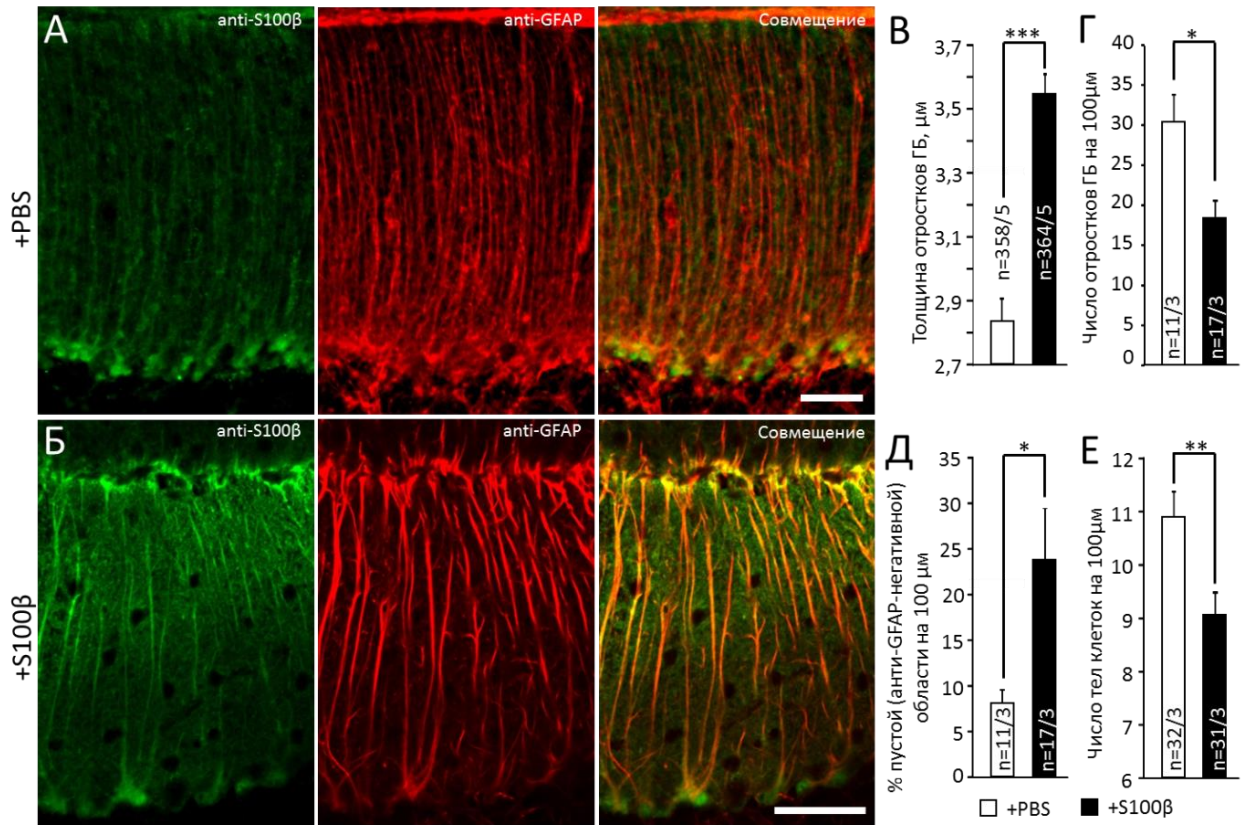


Рисунок 31. S100 β изменяет морфологию ГБ. На микрофотографиях показана иммунореактивный сигнал к S100 β и к GFAP в областях инъекций у мышей, получавших PBS (A) и S100 β (Б). Мерная шкала 50 μ м. (В) Сводный график, показывающий толщину отростков ГБ в μ м; *** $p < 0,001$. (Г) По сравнению с областями, инъецированными PBS, было значительно меньше отростков ГБ на 100 μ м в областях, инъецированных S100 β ; * $p < 0,05$. (Д) отростки ГБ были более редкими в областях введения S100 β ; * $p < 0,05$. (Е) Происходило снижение количества тел клеток ГБ, после инъекции S100 β ; ** $p < 0,01$ (409).

Морфологию отдельных астроцитов в этой модели была изучена с помощью анализа Шолля (449). На изображениях отростков ГБ, прорисованных с помощью компьютерной программы ImageJ (Рисунок 32А), было проанализировано максимальное количество этих отростков на клетку. Это число не изменилось в областях введения S100 β и составило $4,8 \pm 1,7$ и $4,9 \pm 1,2$, соответственно, $p = 0,648$; U-критерий Манна-Уитни (Рисунок 32Б). Анализ по Шоллю выявил увеличение плотности проксимальных отростков в ГБ после введения S100 β . В пределах 10 μm от сомы этот показатель увеличился с $1,8 \pm 0,2$ до $3,3 \pm 0,3$, $p = 0,0002$, метод Манна–Уитни U тест (Рисунок 32В) (409).

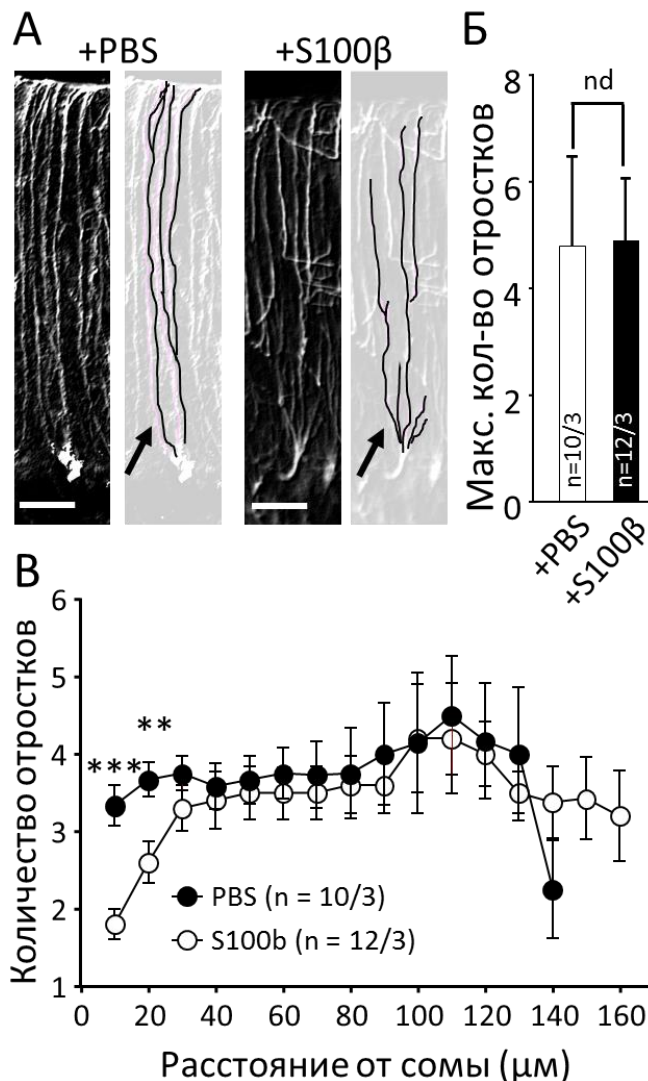


Рисунок 32. Анализ морфологии отростков глии Бергмана у мышей, которым вводили PBS и S100 β . (А) Чёрно-белые микрофотографии областей коры мозжечка, меченых анти-GFAP, которым вводили PBS (изображения слева) и S100 β (изображения справа). Светлые изображения содержат обработанные с помощью программного обеспечения ImageJ, отростки. Стрелками показаны проксимальные отростки, которые чаще встречались в местах инъекций S100 β . Мерная шкала 50 μ m. (В) Максимальное количество отростков на клетку ГБ не отличалось в областях, инъецированных PBS и S100 β . (В) Анализ Шолля клеток ГБ, инъецированных PBS (белые кружки) и S100 β (чёрные кружки) (количество пересечений на 10 μ m длины отростков). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (409).

Мы выборочно экспрессировали мутантный ATXN1 [Q85] в ГБ, чтобы проверить, можем ли вызвать события, напоминающие патологию СЦА1. ATXN1[Q85] также содержал последовательность Flag, и через 9 недель после инъекции 3 μ l LVV в коре мозжечка был обнаружен выраженный анти-Flag сигнал. Окрашивание было локализовано с GFAP в ГБ и в основном было сосредоточено во внутренней части МС (Рисунок 33).

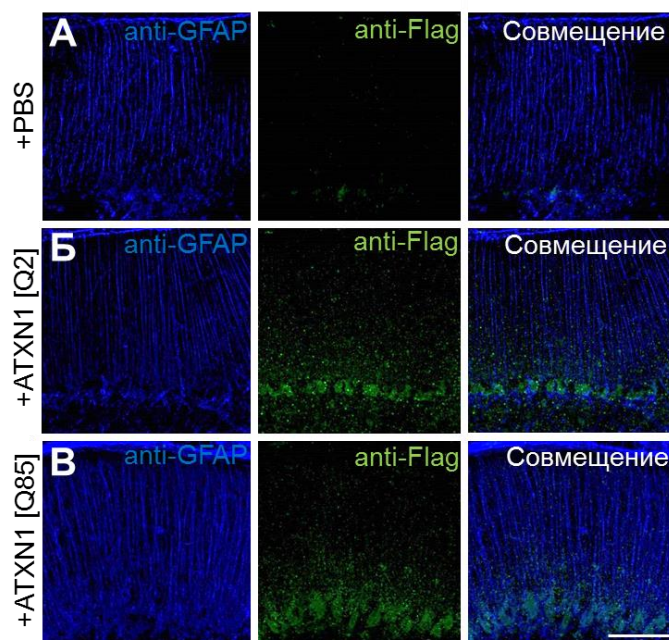


Рисунок 33. Конфокальное изображение ГБ после инъекции в мозжечок PBS (А), а также LVV, несущей ATXN1[Q2] (Б) и ATXN1[Q85] (В). Отростки глии помечены анти-GFAP (голубой) и анти-Flag (зелёный). Мерная шкала 100 μm .

Количество и длина восходящих отростков ГБ у животных, трансдуцированных ATXN1[Q85], не уменьшались (Рисунок 34А, Б и Таблица 9). При этом толщина отростков была увеличена (Рисунок 34В и Таблица 9).

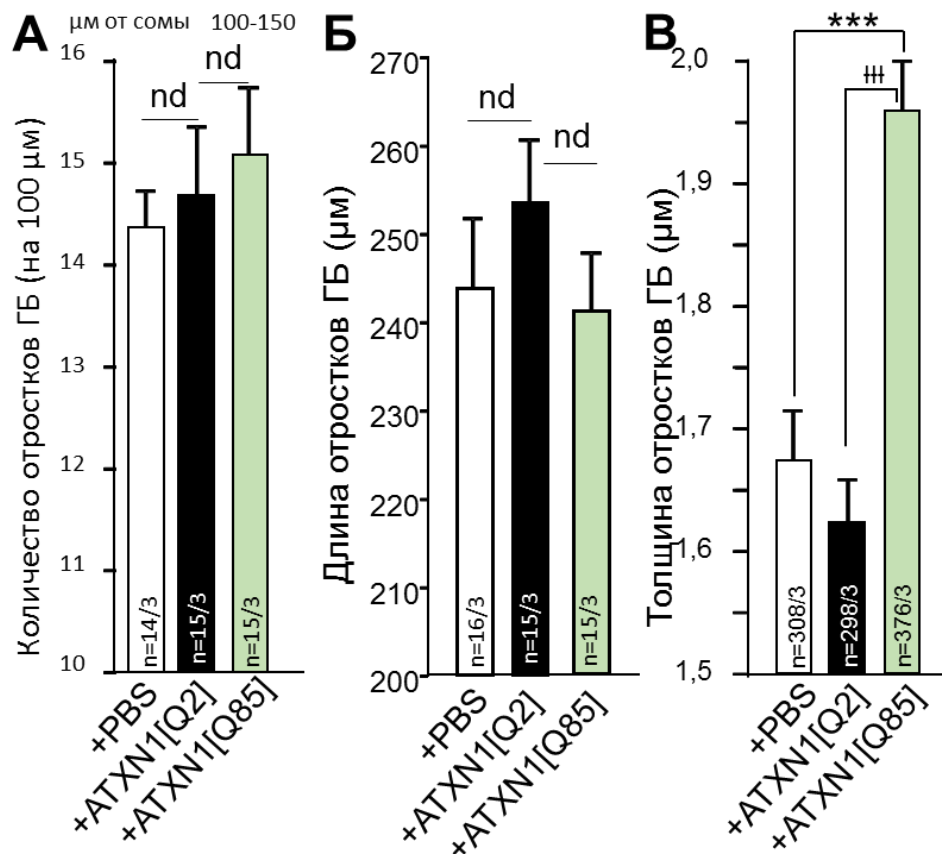


Рисунок 34. Экспрессия мутантного атаксина 1 в ГБ в течение 9 недель приводит к нарушению её морфологии. (А) Количество и (Б) длина отростков ГБ остались неизменными, тогда как наблюдалось их утолщение (В).

Измерения проводились на 100 μm продольной длины отростков в МС *** $p < 0,001$; ††† $p < 0,001$ (408).

| Группы | Количество отростков ГБ | Длина отростков ГБ | Толщина отростков ГБ |
|--------------------------------|-------------------------|--------------------|----------------------|
| +PBS (n=14/3) | 14,3 \pm 0,5 | 244,0 \pm 4,6 | 1,7 \pm 0,0 |
| +GFAP-ATXN1[Q2]-Flag (n=15/3) | 14,7 \pm 0,7 | 253,8 \pm 7,0 | 1,6 \pm 0,0 |
| +GFAP-ATXN1[Q85]-Flag (n=15/3) | 15,1 \pm 0,6 | 241,4 \pm 6,5 | 2,0 \pm 0,1 |

Таблица 9. Среднее количество, длина и толщина анти-GFAP меченых отростков ГБ. Количество отростков ГБ было подсчитано в МС на 100 μm и на расстоянии 100-150 μm от СКП. *** $p < 0,001$; †† $p < 0,001$ (408).

3.1.3.2. Патологическая активация ГБ влияет на морфологию КП

Мы исследовали морфологию КП с помощью ИГХ и их электрофизиологические свойства с помощью пэтч-клэмп. Чтобы оценить длину апикальных дендритов КП, их визуализировали с помощью окрашивания анти-кальбиндином (Рисунок 35А-Г). Толщину молекулярного слоя (МС) измеряли, как описано ранее (409).

МС был значительно тоньше у животных после 4 суточной фотостимуляции ГБ по сравнению с нестимулированной группой $p = 0,005$ (Рисунок 35Д, Таблица 10). Количество КП также было снижено, $p = 0,007$ (Рисунок 35Е, Таблица 10). Никаких различий не было обнаружено в морфологии КП у мышей, получавших PBS со световой стимуляцией или без нее (Рисунок 35Д, Рисунок 35Е, Таблица 10).

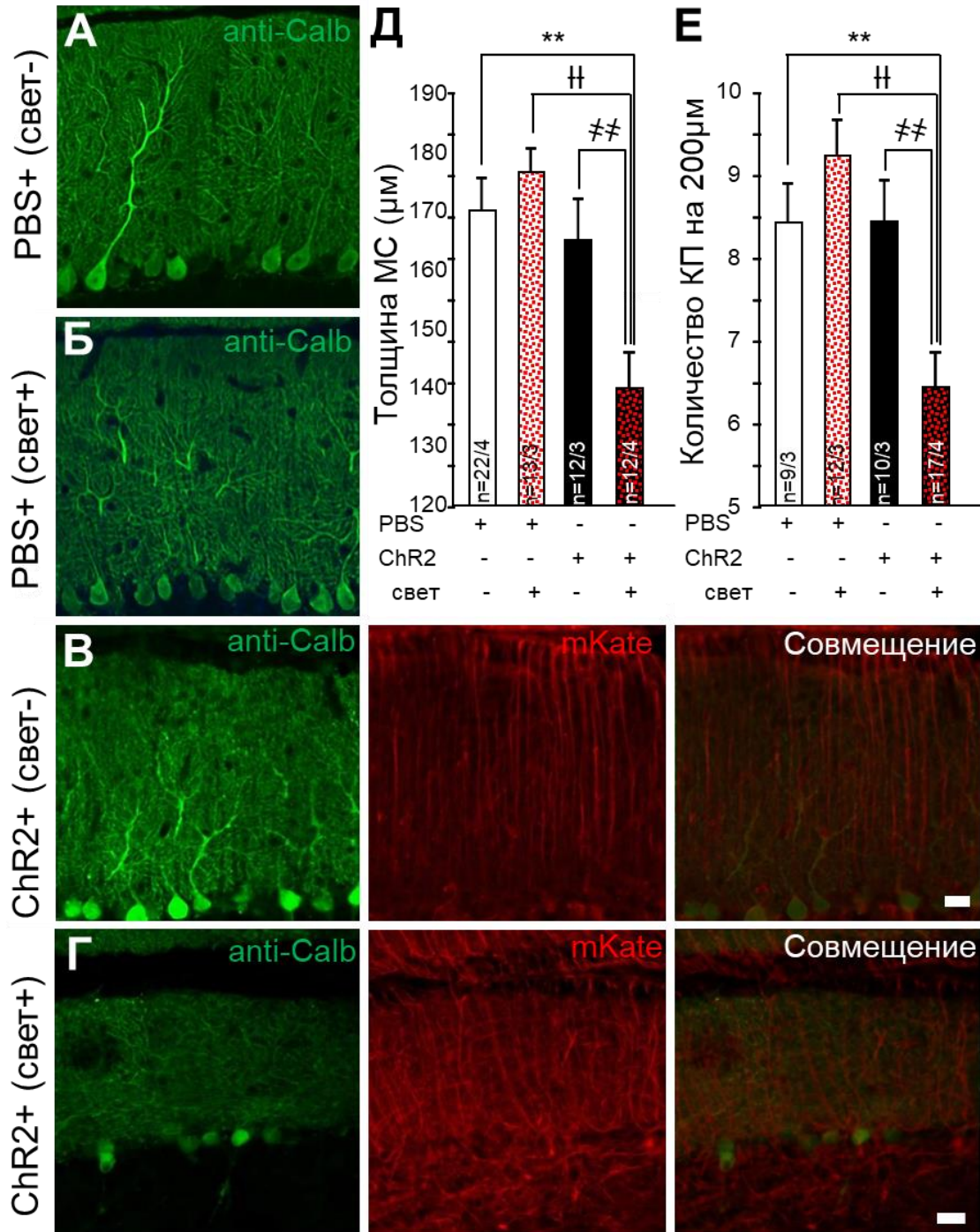


Рисунок 35. Хроническая фотостимуляция ГВ^{Ch2} приводит к нарушению морфологии КП. Конфокальные изображения коры мозжечка, окрашенные антителами к кальбиндину (маркер КП), в областях, инъецированных PBS (А, Б) и mKate, в областях, инъецированных GFAP-ChR2-mKate (В, Г) со стимуляцией светом и без нее. Д и Е – графики усреднённых значений толщины МС (Д) и количества КП на 200μм (Е) ** p < 0,01 (408).

| Группы | Толщина МС | Количество КП |
|-----------------------------------|------------|---------------|
| +PBS (свет-) (n=14/5) | 170,2±5,8 | 8,4±0,5 |
| +PBS (свет+) | 176,9±4,1 | 9,3±0,4 |
| +GFAP-ChR2-mKate (свет-) (n=16/7) | 165,4±6,9 | 8,4±0,5 |
| +GFAP-ChR2-mKate (свет+) (n=15/7) | 139,3±5,0 | 6,4±0,3 |

Таблица 10. Морфология КП. Среднее число КП, меченых кальбиндином, и длина их дендритов (толщина МС) представлены в таблице. Количество КП подсчитывали на 100 μ m продольной линии в СКП. ***p <0,001; ††p <0,01; †††p <0,001; # p <0,01; ## p <0,001 (408).

Емкость клетки является косвенным показателем площади поверхности клеточной мембраны. Как и ожидалось, после хронической фотоактивации емкость КП снизилась с 728,8±27,6 pF (n = 24/9) до 526,2±27,8 pF (n = 15/7), p = 0,00002. (Таблица 11).

| Группы | Ёмкость (pF) | Ra (M Ω) | Rm (M Ω) |
|-----------------------------------|---------------------------|------------------|------------------|
| +PBS (свет-) (n=14/5) | 766,2±49,1 | 13,7±1,1 | 193,0±30,8 |
| +GFAP-ChR2-mKate (свет-) (n=24/9) | 728,8±27,6 ^{***} | 13,8±0,9 | 241,8±58,4 |
| +GFAP-ChR2-mKate (свет+) (n=15/7) | 526,2±27,8 ^{†††} | 13,8±0,7 | 260,5±36,1 |

Таблица 11. Основные пассивные электрофизиологические и быстрые ПВ ВПСТ в КП у мышей, которым вводили PBS и AVV GFAP-ChR2-mKate с хронической фотостимуляцией или без нее. ПВ ВПСТ анализировали в отношении их кинетики (время нарастания 10%-90% и постоянная времени

спада) и амплитуд. Парное импульсное усиление (PPF) анализировали по ответам, вызываемым двумя стимулами с межстимульным интервалом 50 мс. Соотношения PPF измеряли как вторую амплитуду ВПСТ, нормализованную к первой. Двухфакторный дисперсионный анализ указывает на достоверное влияние фотостимуляции только на ёмкость. n – число клеток/количество животных, *** $p < 0,001$; ††† $p < 0,001$ (408).

Мы также исследовали влияние S100 β на морфологию КП с помощью ИГХ и их физиологическое состояние с помощью пэтч-клэмпа. Чтобы оценить приблизительно длину дендритов КП, клетки визуализировали с помощью окрашивания к кальбиндину (Рисунок 36А) и измеряли толщину молекулярного слоя. Инъекция S100 β уменьшали этот показатель с $150,7 \pm 6,3$ μm до $120,0 \pm 5,8$ μm , $p = 0,002$, t -критерий (Рисунок 36Б). Ёмкость дендритов и сомы КП мы оценивали отдельно после вычитания медленной составляющей ёмкости из общей. Медленный компонент преимущественно отражает размер дендритов нейронов, тогда как быстрый – размер тела клетки. Мы обнаружили значительную разницу между двумя исследуемыми группами. Ёмкость дендритов КП у мышей, которым вводили S100 β снижалась с $513,5 \pm 27,1$ pF до $359,4 \pm 37,5$ pF, $p = 0,002$, t -критерий. Ёмкость сомы ПК у мышей, которым вводили S100 β также была снижена с $61,7 \pm 5,6$ pF до $34,6 \pm 4,4$ pF, $p = 0,0003$, t -критерий (Рисунок 36В) (409).

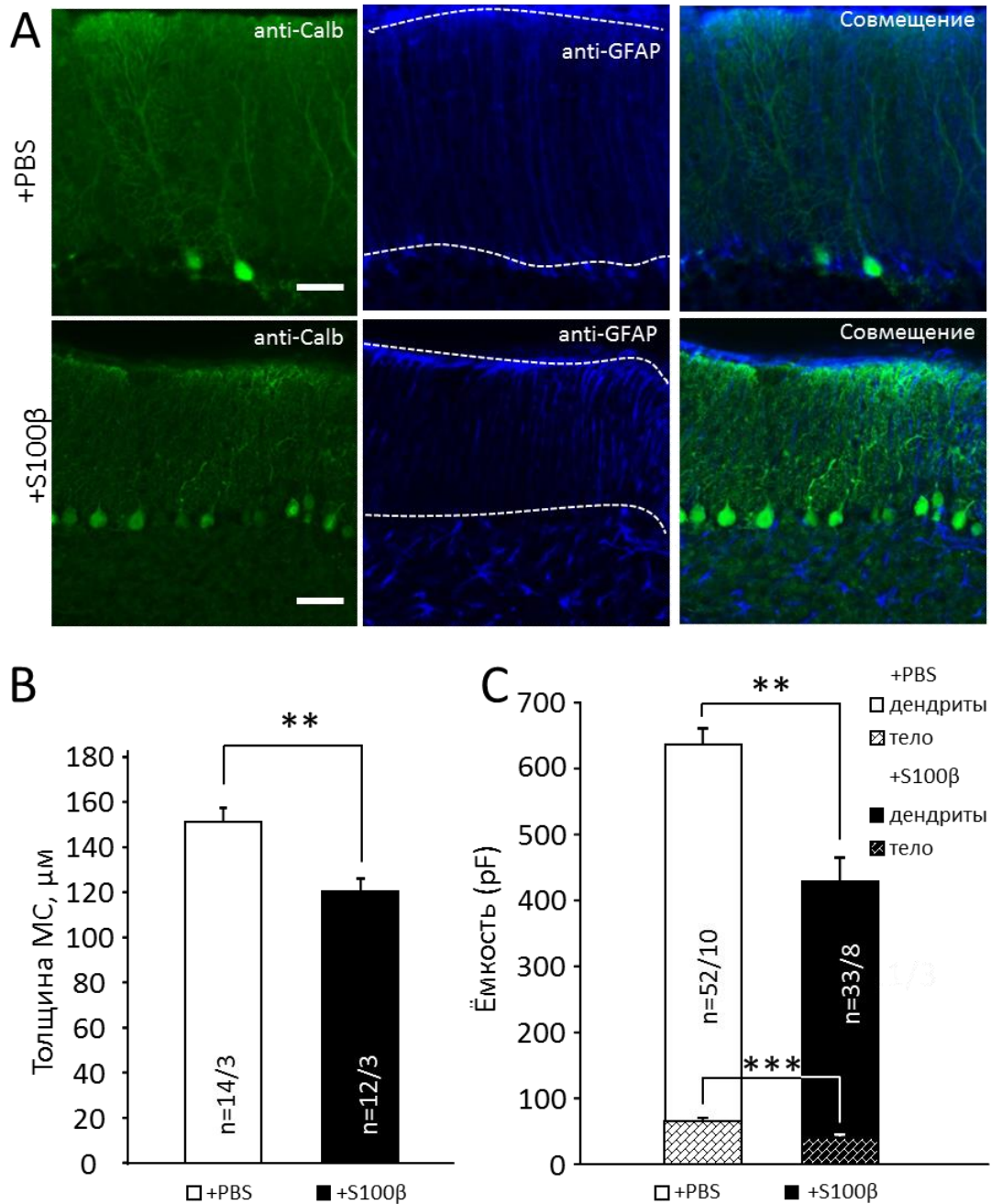


Рисунок 36. Нарушение морфологии КП в мозжечке мыши с моделью S100 β индуцированного астроглиоза. (А) Сравнение иммунореактивности к анти-кальбиндину (маркер КП) и анти-GFAP в областях, где инъекцировали PBS (верхняя часть) и S100 β (нижняя часть). Молекулярный слой выделен белыми пунктирными линиями. Мерная шкала 50 μm . (Б) По сравнению с областями, инъекцированными PBS, молекулярный слой был значительно тоньше (79,6%) в областях, инъекцированных S100 β . (И) По сравнению с областями, инъекцированными PBS, ёмкость дендритов и сомы КП, была

значительно меньше в областях, инъецированных S100 β . ** $p < 0,01$, *** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (409).

Для понимания схожих патоморфологических изменений в КП мы провели окрашивание кальбиндином срезов мозжечка двух моделей животных – векторной с селективной экспрессией мутантного атаксина 1 в ГБ и СЦА1 КИ модели (Рисунок 37А и Б). Опосредованная LVV экспрессия атаксин 1[Q85] избирательно в ГБ уменьшала толщину молекулярного слоя (МС) с $178,4 \pm 3,2$ мкм ($n = 23$ от 4 животных) до $161,7 \pm 2,2$ мкм ($n = 23$ от 4 животных, $p = 0,0001$; Рисунок 37В) за счет коллапса дендритов КП.

У мышей СЦА1 КИ толщина МС уменьшилась со $174,8 \pm 4,5$ мкм ($n=11$ от 3 животных) до $144,0 \pm 2,2$ мкм ($n=14$ от 3 животных) соответственно, $p=2,1 \times 10^{-5}$ (Рисунок 37Д).

Эти морфологические изменения соответствовали падению емкости мембраны, выявленному при измерении емкости мембраны КП (См) в срезах мозжечка с помощью пЭтч-клэмп, которая была значительно снижена как у мышей LVV, так и у мышей СЦА1 КИ ($p = 0,002$ и $p = 0,0012$, соответственно, Рисунок 37Г и Е, Таблица 12) (450).

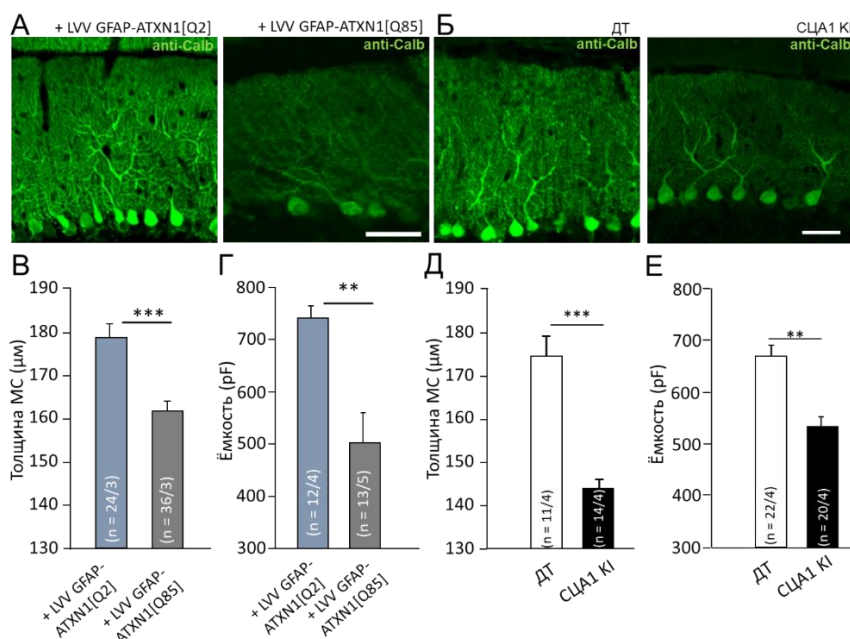


Рисунок 37. Мутантный атаксин 1 вызывает изменения в морфологии КП у модельных СЦА1 мышей. (А-Б) Конфокальные изображения коры мозжечка, меченные анти-Кальбиндином (анти-Calb) (маркер КП), показывают коллапс молекулярного слоя (МС) у мышей, которые избирательно экспрессируют атаксин 1 [Q85] в ГБ (А) и СЦА1 К1 (Б). Мерная шкала 50 μm . Средняя (В) длина МС и (Г) емкость КП снижены у мышей, которые избирательно экспрессируют атаксин 1 [Q85] в ГБ и у СЦА1 К1 мышей (Д и Е). В скобках указано количество (n) исследованных срезов или КП и животных (срезы/животные) или (КП/животные). Звездочки указывают на статистически значимое различие по сравнению с соответствующими контролями (критерий Стьюдента; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Другие пассивные свойства мембраны, такие как сопротивление доступа и сопротивление мембраны, существенно не отличались между генотипами (таблица 12).

| Генотип | C_m (pF) | R_a (m Ω) | R_m (m Ω) |
|---|---------------------------------|---------------------|---------------------|
| ДТ (n = 20/8) | 670.4 \pm 26.7 | 11.6 \pm 0.6 | 239.4 \pm 25.0 |
| СЦА1 К1 (n = 22/8) | 534.1 \pm 27.6 ^{**} | 10.7 \pm 0.8 | 253.0 \pm 30.7 |
| +LVV-GFAP-Атаксин 1-Flag[Q2] (n = 12/3) | 748.4 \pm 22.6 | 11.1 \pm 0.5 | 236.6 \pm 13.2 |
| +LVV-GFAPАтаксин 1[Q85]-Flag (n = 13/3) | 508.6 \pm 57.5 ^{†††} | 11.4 \pm 0.8 | 259.7 \pm 18.0 |

Таблица 12. Пассивные электрофизиологические свойства КП модельных СЦА1 животных. C_m – ёмкость клетки, R_a – сопротивление доступа, R_m – сопротивление мембраны (450).

Эти данные показывают, что хроническая стимуляция ГБ приводит к коллапсу дендритного дерева ПК и резкому уменьшению площади их мембраны.

3.1.3.3. Хроническая активация ГБ изменяет синаптическую передачу в синапсах ПВ КП.

В гранулярных клетках мозжечка формируются синапсы ПВ-КП, а нейроны из нижних олив формируют синапсы ЛВ-КП с КП. В этих синапсах высвобождается глутамат, который активирует AMPA-рецепторы на КП, что приводит к возникновению быстрых ВПСТ (451). Мы обнаружили, что амплитуды и кинетика ВПСТ в СЦА1 моделях, затрагивающих ГБ, не были затронуты (Таблица 13) (450).

| Genotype | ПВ ВПСТ (pA) | Время подъёма (мс) | τ ВПСТ (мс ⁻¹) | ЛВ ВПСТ (pA) | Время подъёма (мс) | τ ВПСТ (мс ⁻¹) |
|--|--------------|--------------------|---------------------------------|--------------|--------------------|---------------------------------|
| WT (n = 13/3) | 844.8±95.5 | 2.7±0.2 | 10.3±0.9 | 855.0±67.7 | 1.3±0.1 | 8.2±0.5 |
| SCA1 KI (n = 15/3) | 743.2±99.3 | 2.5±0.4 | 12.2±1.3 | 877.7±110.1 | 1.2±0.1 | 8.6±0.3 |
| +LVV-GFAP-Атаксин 1[Q2]-Flag (n = 9/3) | 714.6±84.1 | 2.4±0.2 | 10.7±2.0 | 767.9±112.1 | 1.3±0.3 | 11.4±1.1 |
| +LVV-GFAPАтаксин 1[Q85]-Flag (n = 8/3) | 801.9±94.8 | 2.3±0.2 | 13.6±1.2 | 676.0±86.5 | 1.4±0.2 | 10.1±1.0 |

Таблица 13. Быстрые ВПСТ в КП у 12-недельных СЦА1 модельных мышей. Показана кинетика ПВ и ЛВ ВПСТ (время нарастания 10–90% и постоянная времени спада) и их амплитуды. t-тест не показал существенной разницы. n — количество клеток/количество животных, $p > 0,05$ (450).

Однако была найдена тенденция к увеличению τ ВПСТ у СЦА1 KI животных. Поэтому мы детально изучили факторы, которые влияют на этот показатель в оптогенетической модели нейродегенерации и СЦА1 KI животных. По сравнению с мышами, которым вводили PBS, амплитуда ПВ ВПСТ и основные электрофизиологические свойства существенно не изменились у животных, которым вводили AAV-GFAP-ChR2-mKate, независимо от фотостимуляции (Таблица 14).

На константу времени спада ВПСТ, влияют два процесса: один из них — скорость удаления глутамата из синаптической щели, а другой — пассивные свойства мембраны КП, которая действует как конденсатор. Первоначально мы были удивлены, увидев, что, несмотря на тенденцию, константа времени спада ПВ ВПСТ (τ ВПСТ) статистически значимо не изменилась ($p > 0,05$) при хронической оптогенетической стимуляции ГБ (Таблица 14) (408).

| Группы | Амплитуда ПВ ВПСТ (pA) | Плотность ПВ ВПСТ (pA/pF) | PPF | Время подъёма (мс) | Время спада (τ) |
|-----------------------------------|------------------------|---------------------------|---------|--------------------|------------------------|
| +PBS (свет-) (n=14/5) | 279,2±39,1 | 0,4±0,1 | 1,5±0,1 | 2,5±0,3 | 17,0±2,2 |
| +GFAP-ChR2-mKate (свет-) (n=24/9) | 359,3±48,8 | 0,5±0,1 | 1,5±0,1 | 2,1±0,2 | 17,0±1,0 |
| +GFAP-ChR2-mKate (свет+) (n=15/7) | 258,3±29,0 | 0,5±0,1 | 1,6±0,1 | 2,6±0,2 | 19,3±1,3 |

Таблица 14. Быстрые ПВ ВПСТ в КП у мышей, которым вводили PBS и AVV GFAP-ChR2-mKate с хронической фотостимуляцией или без нее. ПВ ВПСТ анализировали в отношении их кинетики (время нарастания 10%-90% и постоянная времени спада) и амплитуд. Парное импульсное усиление (PPF) анализировали по ответам, вызываемым двумя стимулами с межстимульным интервалом 50 мс. Соотношения PPF измеряли как вторую амплитуду ВПСТ, нормализованную к первой. Двухфакторный дисперсионный анализ указывает на достоверное влияние генотипа только на ёмкость. n – число клеток/количество животных, *** $p < 0,001$; ††† $p < 0,001$ (408).

Однако константа времени пассивного спада, измеренная путём инъекции тока (τ пассивный), которая отражает размер клеток КП, была значительно

уменьшена в КП после стимуляции ГБ (Рисунок 38А), что согласуется с морфометрическими данными, подробно описанными выше. По этой причине, мы выбрали из обеих массивов данных клетки, для которых пассивный τ находился в диапазоне от 10 до 20 мс (Рисунок 38Б). Мы обнаружили, что при сравнении ВПСТ между клетками сопоставимой емкости τ ВПСТ значительно увеличилась с $15,5 \pm 0,9$ мс ($n = 16/9$) до $19,3 \pm 1,3$ мс ($n = 12/7$), $p = 0,03$ (Рисунок 38Б) после хронической стимуляции ГБ (408).

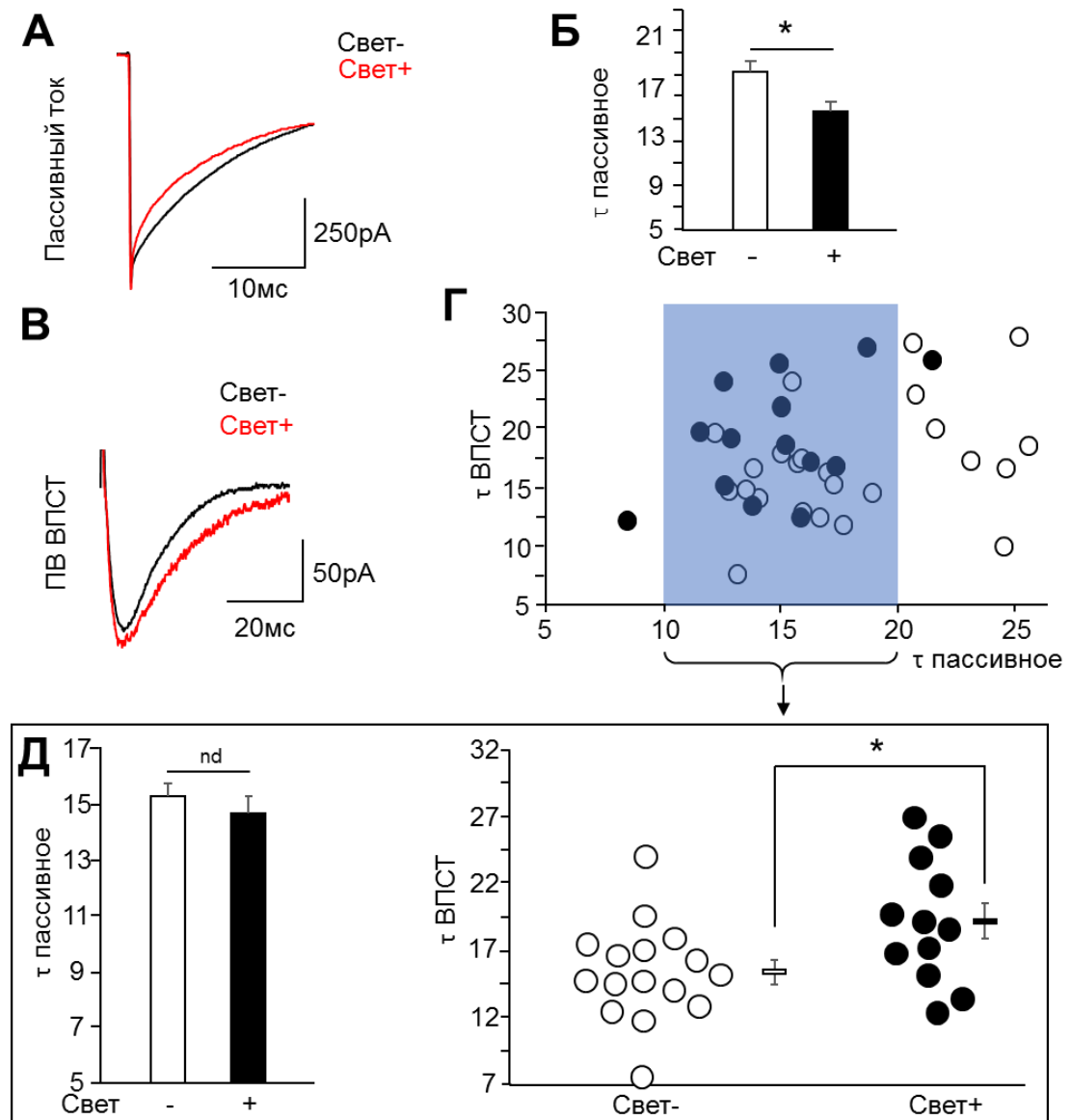


Рисунок 38. Хроническая фотостимуляция ГБ^{ChR2} влияет на синаптическую передачу ПВ-КП. τ используется как параметр, четко отражающий размер мембраны ПК. А. Репрезентативные кривые пассивных токов КП без

(черный) и после 4-дневной световой стимуляции (красный). Б. τ пассивное КП у животных без фотостимуляции была достоверно больше, чем у животных после фотостимуляции. * $p < 0,05$. В. Репрезентативные кривые ПВ ВПСТ без (черный) и после 4-дневной световой стимуляции (красный). Г. Распределение клеток от стимулированных и нестимулированных животных. Чтобы избежать ошибки, вызванной изменениями размера клеток и, следовательно, емкости, мы сравнили клетки, у которых τ пассивное составляло между 10 и 20 мс (синяя область). Д. Удлинение τ ВПСТ в КП происходило у животных, у которых хроническая световая стимуляция вызывала реактивную трансформацию ГБ * $p < 0,05$ (408).

Та же картина была очевидна в объединенных данных по клеткам с сопоставимой плотностью ПВ ВПСТ (pA/pF) (Рисунок 39). Удлинение τ ВПСТ предполагает более длительное присутствие глутамата на постсинаптических рецепторах (408).

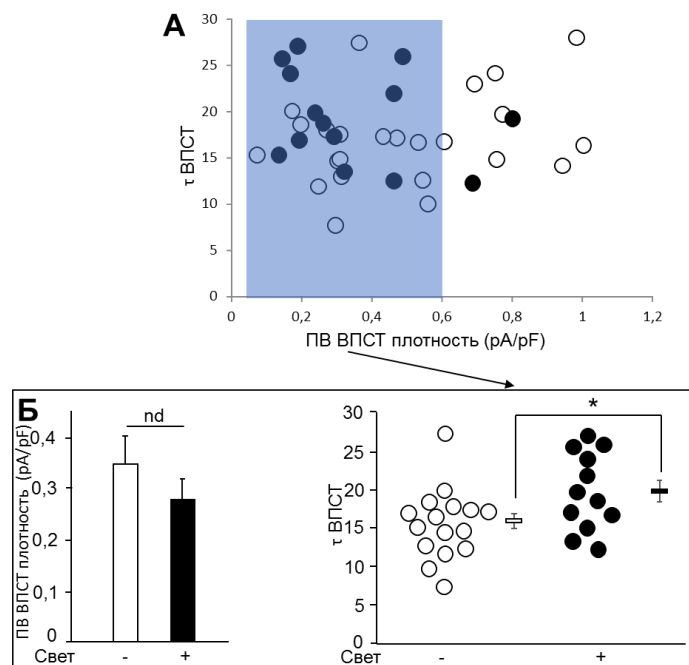


Рисунок 39. Хроническая фотостимуляция $B\Gamma^{Chr2}$ влияет на синаптическую передачу ПВ-КП в объединенных данных клеток с сопоставимой плотностью

ПВ ВПСТ (pA/pF). Репрезентативные кривые КП показаны на Рисунок 35. А. Распределение клеток от стимулированных и нестимулированных животных. Чтобы избежать систематической ошибки, вызванной изменениями размера клеток и, следовательно, емкости, мы сравнили клетки, которые имели синаптическую плотность ПВ ВПСТ (pA/pF) от 0,05 до 0,6 мс (синяя область). Б. Удлинение τ ВПСТ в КП наблюдалось у животных, у которых хроническая световая стимуляция вызывала реактивную трансформацию ГБ * $p < 0,05$ (408).

Мы не выявили влияние внеклеточного S100 β на синаптическую передачу в синапсах ПВ-КП. S100 β не изменял амплитуду ПВ-ВПСТ (Рисунок 40).

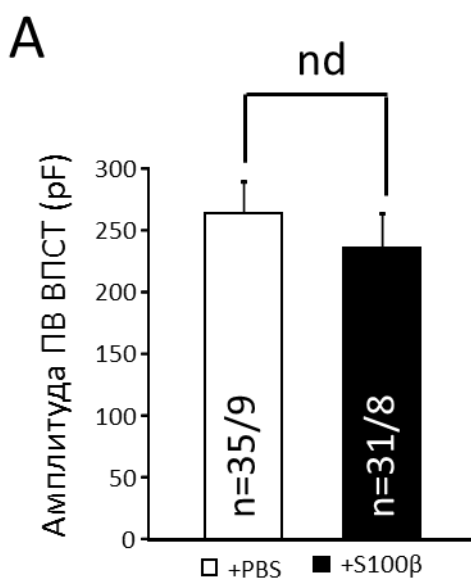


Рисунок 40. На сводном графике показаны средние амплитуды ПВ ВПСТ в КП из областей, куда вводили PBS и S100 β . Существенных различий между двумя группами не было. Количество (n) тестируемых ПК и животных (ПК/животные) указано на графике (409).

Мы подозревали, что S100 β будет влиять на процессы, сильно зависящие от высвобождения Ca^{2+} , такие, как высвобождение глутамата

пресинаптическими окончаниями. Однако мы не увидели существенных различий между коэффициентом парного импульсного облегчения (PPF) в синапсах ПВ-КП мышей S100 β и мышей, которым вводили PBS. Соотношение PPF у мышей, которым инъецировали S100 β , составляло $1,8 \pm 0,4$, $n = 35$ клеток от 8 мышей по сравнению с $1,9 \pm 0,1$, $n = 39$ клеток от 9 мышей у мышей, которым инъецировали PBS ($p = 0,722$, t-критерий; Рисунок 41А). Однако S100 β резко изменял кинетику ПВ ВПСТ. Хотя не было статистически значимой разницы в амплитуде ПВ ВПСТ у мышей, которым вводили S100 β и PBS (Рисунок 40), время нарастания ПВ ВПСТ у мышей, которым вводили S100 β , было увеличено до $2,7 \pm 0,1$ мс ($n = 35$ клеток от 8 мышей) по сравнению с $2,3 \pm 0,1$ мс ($n = 36$ клеток от 9 мышей) у мышей, которым вводили PBS ($p = 0,028$, t-критерий; рисунок 41Б). Кроме того, время спада ПВ ВПСТ у мышей, которым вводили S100 β , уменьшилось до $17,1 \pm 1,5$ мс ($n = 30$ клеток от 8 мышей) по сравнению с контрольным значением $21,6 \pm 1,5$ мс ($n = 37$ клеток от 9 мышей, $p = 0,04$, t-критерий; рисунок 41В) (409).

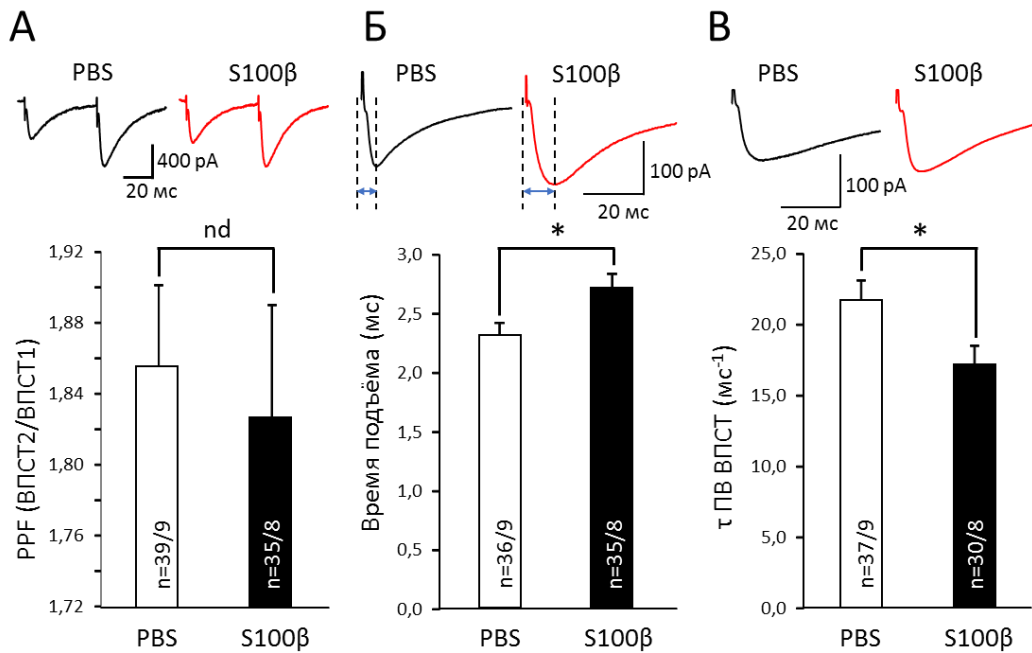


Рисунок 41. Изменения электрофизиологических свойства КП в модели астроглиоза, вызванного введением S100 β . (А) Сводный график показывает

среднее отношение PPF (вторая амплитуда / первая амплитуда ВПСТ) в КП из областей, где вводили PBS и S100 β , существенных различий не обнаружено. Над графиком представлены репрезентативные кривые ПВ ВПСТ. (Б) На сводном графике показано среднее время нарастания ПВ ВПСТ в КП из областей, где вводили PBS и S100 β . По сравнению с областями, инъецированными PBS, время нарастания было значительно больше в областях, инъецированных S100 β . Репрезентативные кривые ПВ ВПСТ показаны выше. (В) По сравнению с областями, инъецированными PBS, время спада было значительно больше в областях, инъецированных S100 β . Репрезентативные кривые ПВ ВПСТ показаны выше. * $p < 0,05$ (409).

Чтобы контролировать потенциальный эффект операции как таковой, мы проанализировали τ ПВ ВПСТ на срезах интактных мышей. Не было обнаружено различий между группой интактных мышей без операции и группой, которой вводили PBS (Рисунок 42).

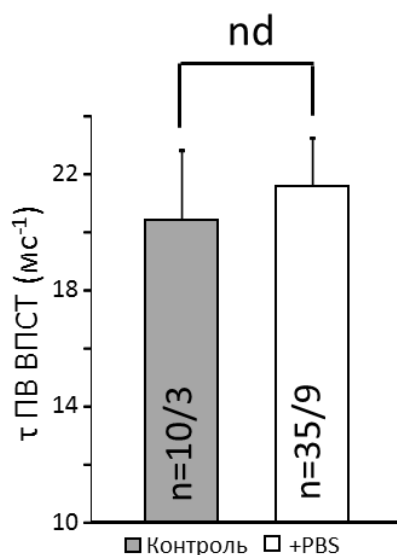


Рисунок 42. Введение PBS в кору мозжечка мыши не изменяет времени спада ПВ-ВПСТ.

3.1.3.4. Экспрессия мутантного атаксина 1 в ГБ мозжечка приводит к увеличению τ ПВ ВПСТ

Амплитуда и время нарастания ПВ ВПСТ не различались у мышей, которым вводили ATXN1 [Q2] и ATXN1 [Q85]. Однако КП были меньше, о чем свидетельствует уменьшение их емкости, оцененной по пассивной τ . Этот показатель уменьшился с $12,1 \pm 0,8$ до $14,2 \pm 1,0$ мс^{-1} ($p = 0,024$; Рисунок 43А и Б). Чтобы учесть это, мы отсортировали клетки по их пассивной τ аналогично анализу данных при хронической фотостимуляции (см. выше). Сравнение пулов КП с пассивным τ в диапазоне от 10 до 20 мс^{-1} (Рисунок 43В и Г) показало, что τ ВПСТ увеличилось у мышей, трансдуцированных ATXN[Q85], до $23,3 \pm 2,7$ мс ($n = 21/9$) по сравнению с $16,7 \pm 1,0$ мс ($n = 13/8$) у мышей, трансдуцированных ATXN[Q2], $p = 0,04$ (Рисунок 43Д) (408).

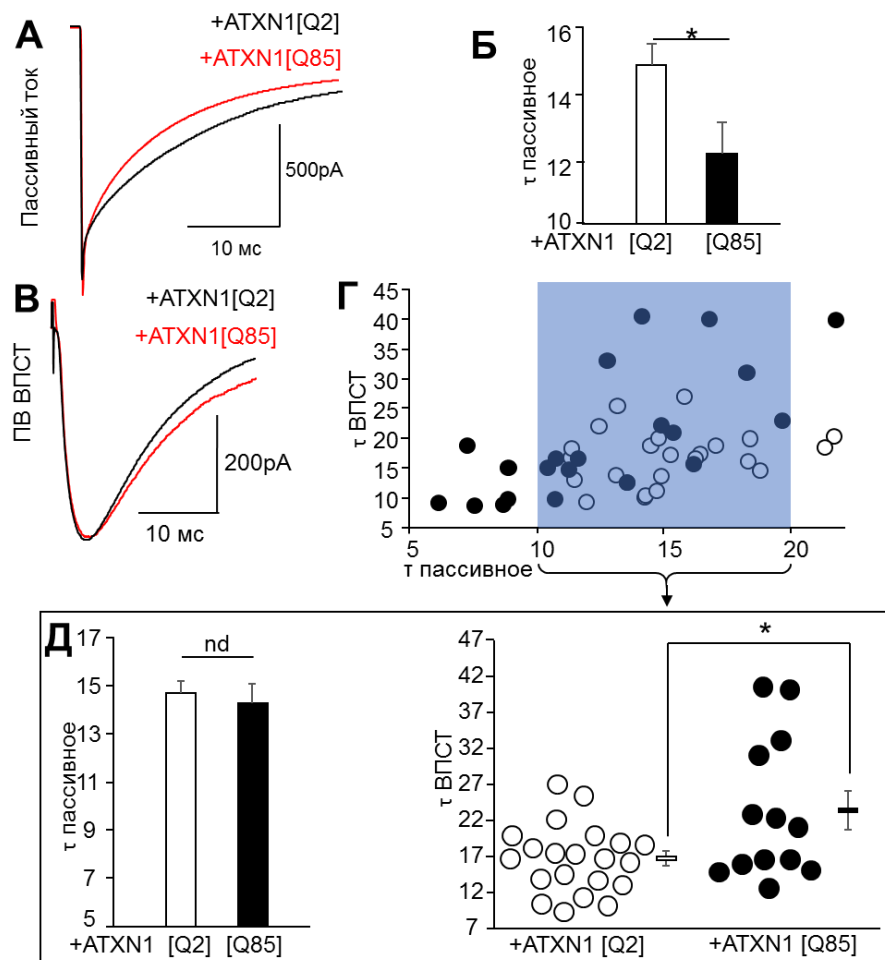


Рисунок 43. Избирательная экспрессия ATNX1[Q85] в ГБ влияет на синаптическую передачу ПВ-КП. А. Репрезентативные кривые пассивных токов КП у животных, экспрессирующих ATXN[Q2] (черный) и ATXN[Q85] (красный). Б. Пассивные τ КП у животных, экспрессирующих ATXN1[Q85] в ГБ, были значительно длиннее, чем у животных, экспрессирующих ATXN1[Q2]. * $p < 0,05$. В. Репрезентативные кривые ПВ ВПСТ у животных, экспрессирующих ATXN[Q2] (черный) и ATXN[Q85] (красный). Г. Распределение клеток животных, трансдуцированных ATXN1[Q2] и ATXN1[Q85]. Чтобы избежать систематической ошибки, вызванной изменениями размера клетки и, следовательно, емкости, мы сравнили клетки, у которых τ пассивное было между 10 и 20 мс (синяя область). Удлинение τ ВПСТ в КП наблюдалось у животных, у которых ATXN[Q85] вызывал реактивную трансформацию ГБ * $p < 0,05$ (408).

Сходный паттерн наблюдается у мышей СЦА1 KI, которые экспрессируют мутантный атаксин 1 [Q154] во всех клетках (308). КП были меньше, о чём свидетельствует снижение их емкости, оцененной по пассивной τ . Этот показатель снизился с $12,1 \pm 0,6$ до $10,4 \pm 0,5$ мс^{-1} , $p = 0,043$ (Рисунок 44А и Б). При сравнении клеток сопоставимого размера (τ пассивное) от 10 до 15 мс^{-1} (Рисунок 44Г) также была выявлена значительная разница в τ ВПСТ. Данный показатель увеличился с $14,7 \pm 1,0$ до $19,3 \pm 1,5$ мс^{-1} , $p = 0,018$ (Рисунок 44 В и Д) (408).

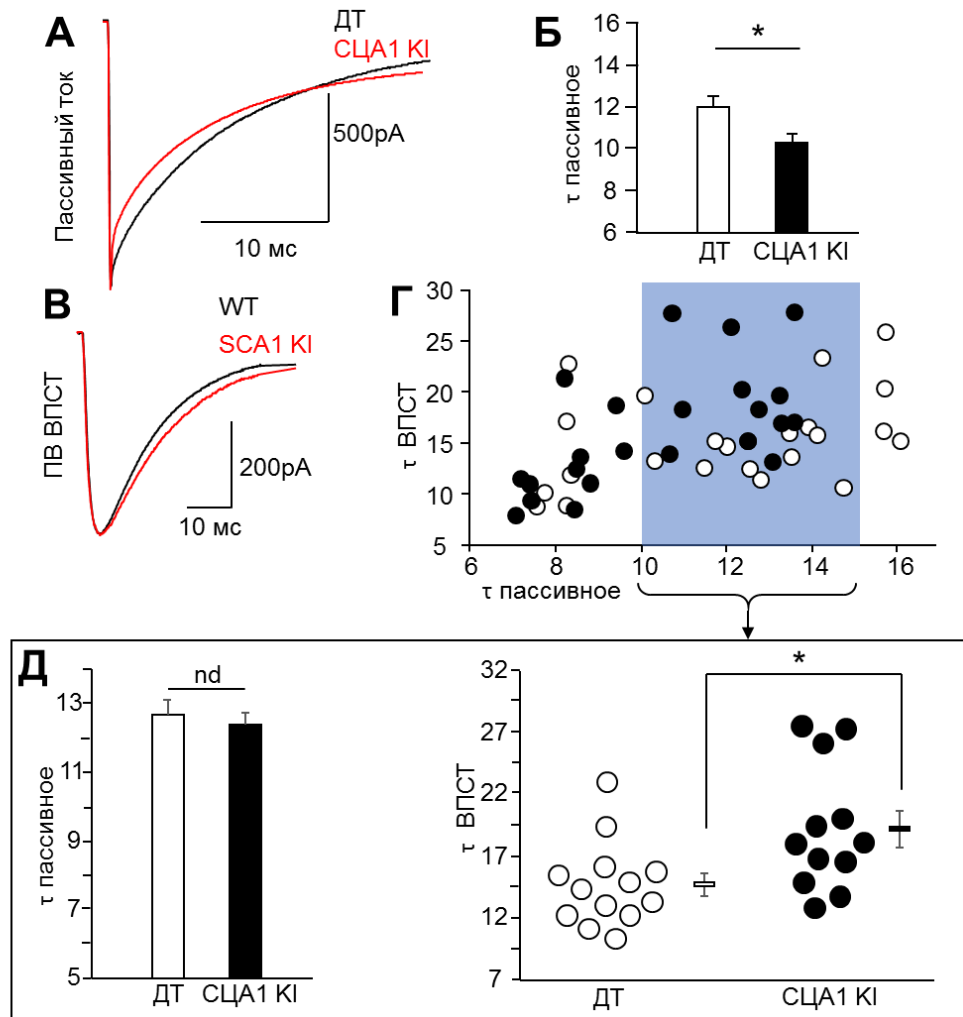


Рисунок 44. Мутантный атаксин 1 в клетках мозжечка мышей СЦА1 КИ влияет на синаптическую передачу ПВ-КП. А. Репрезентативные кривые пассивных токов КП у животных ДТ (черный) и СЦА1 КИ (красный). Б. Пассивные τ КП у животных СЦА1 КИ были значительно длиннее, чем у животных дикого типа. * $p < 0,05$. В. Репрезентативные кривые ПВ ВПСТ у животных ДТ (черный) и СЦА1 КИ (красный). Г. Распределение клеток от животных СЦА1 КИ и ДТ. Чтобы избежать искажения, вызванного изменениями размера клетки и, следовательно, емкости, мы сравнили клетки, у которых τ пассивное было между 10 и 15 мс⁻¹ (синяя область). Удлинение τ ВПСТ в КП наблюдалось у животных, у которых АТХN[Q85] вызывал реактивную трансформацию ГБ * $p < 0,05$ (408).

Полученные результаты демонстрируют, что экспрессия мутантного атаксина 1 в мозжечке приводит к удлинению τ EPSC, и что это может быть вызвано его влиянием только на ГБ.

Чтобы продемонстрировать, что на τ EPSC влияет активность ГБ-опосредованного удаления глутамата, мы использовали ТВОА (500 нМ) и убаин (100 нМ). ТВОА, который является неселективным ингибитором обратного захвата глутамата, в том числе, в самой КП. Использование 100 нМ убаина было мотивировано данными, указывающими на то, что в этой низкой концентрации он оказывает преимущественное влияние на субъединицу $\alpha 2$ Na^+/K^+ -АТФазы, которая поддерживает градиент Na^+/K^+ и стимулирует поглощение глутамата. Эта субъединица преимущественно экспрессируется в астроцитах (452). Следовательно, можно ожидать, что убаин преимущественно влияет на глиальное Na^+ -зависимое поглощение глутамата. Низкие концентрации убаина не влияли на скорость возбуждения КП, зарегистрированных в режиме «current clamp» (Таблица 15), что позволяет предположить, что нейроны не реагировали на добавление убаина (408).

| Группы | Среднее количество спайков | Максимальное количество спайков |
|------------------|----------------------------|---------------------------------|
| Контроль (n=9/4) | 9,9±6,5 | 19,2±10,8 |
| +Убаин (n = 9/4) | 9,2±6,4 | 18,1±10,6 |

Таблица 15. Влияние низкой дозы (10 нМ) Убаина на возбудимость КП. Среднее и максимальное количество спайков КП, записанных в режиме current clamp, показано в таблице, $p > 0.05$ (408).

Эти два блокатора, ТВОА и уабаин, значительно увеличивали τ EPSC с $17,9 \pm 1,9$ до $21,4 \pm 2,9$ мс^{-1} и $10,7 \pm 1,3$ до $12,4 \pm 1,3$ мс^{-1} в синапсах ПВ-КП, $p = 0,02$ в обеих группах (Рисунок 45А и Б) (408).

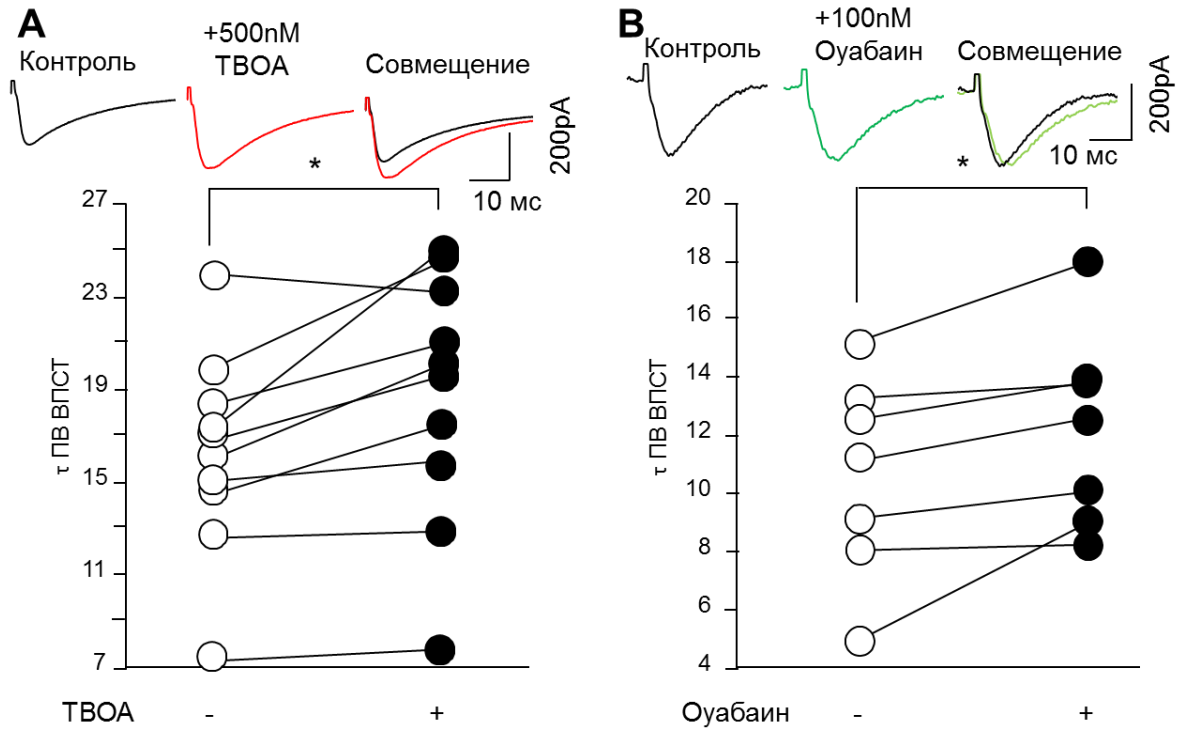


Рисунок 45. τ EPSC чувствителен к блокаторам обратного захвата глутамата. ТВОА является селективным блокатором EAAT, в то время как блокатор Na^+/K^+ -АТФазы Уабаин в дозе 100 нМ преимущественно влияет на ГБ. (А) τ ПВ ВПСТ до и после добавления 500 нМ ТВОА. * $p < 0,05$. Репрезентативные кривые соответствующих цветов до и после применения ТВОА показаны слева. (В) τ ПВ ВПСТ до и после применения 100 нМ уабаина. * $p < 0,05$. Репрезентативные кривые соответствующих цветов до и после применения уабаина показаны справа (408).

3.1.3.5. Активация ГБ вызывает нарушение кратковременной пластичности в ПВ-КП синапсах

Высвобождение глутамата запускается входом Ca^{2+} через потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы (VGCC) на пресинаптических окончаниях. Парная активация вызывает накопление свободного Ca^{2+} в пресинаптических окончаниях гранулярных клеток, таким образом, высвобождается больше нейромедиатора, что приводит к усилению второго ПВ ВПСТ (453). Это известно, как усиление парных импульсов (PPF) и, как полагают, избирательно включает процессы внутри пресинаптических элементов аксонов гранулярных клеток (454).

Для исследования влияния ГБ на PPF мы использовали оптогенетическую модель с хронической активацией ГБ (см. выше).

Исследование электрофизиологических свойств КП при раздражении ПВ выявило значительное увеличение коэффициента PPF в группе животных с хронической 4-х дневной фотостимуляцией по сравнению с контролем ($1,57 \pm 0,01$ и $1,53 \pm 0,02$, соответственно), $p = 0,004$; Рисунок 46А.

Мы применили острое одноминутное 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 PBS инъецированных животных. К 5-й (точка 2) минуте после активации не было 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 ($99,3 \pm 1,2\%$), $p = 0,49$; Рисунок 46Б. В группе животных, экспрессирующих ChR2, без хронической фотостимуляции, к 5-й минуте PPF значительно увеличивался и составлял $104,0 \pm 1,1\%$, $p = 0,002$; Рисунок 1В, левый график. 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 значительно отличался от такового у животных, не подвергшихся хронической фотостимуляции, $p = 0,0013$; Рисунок 46В, правая часть (455).

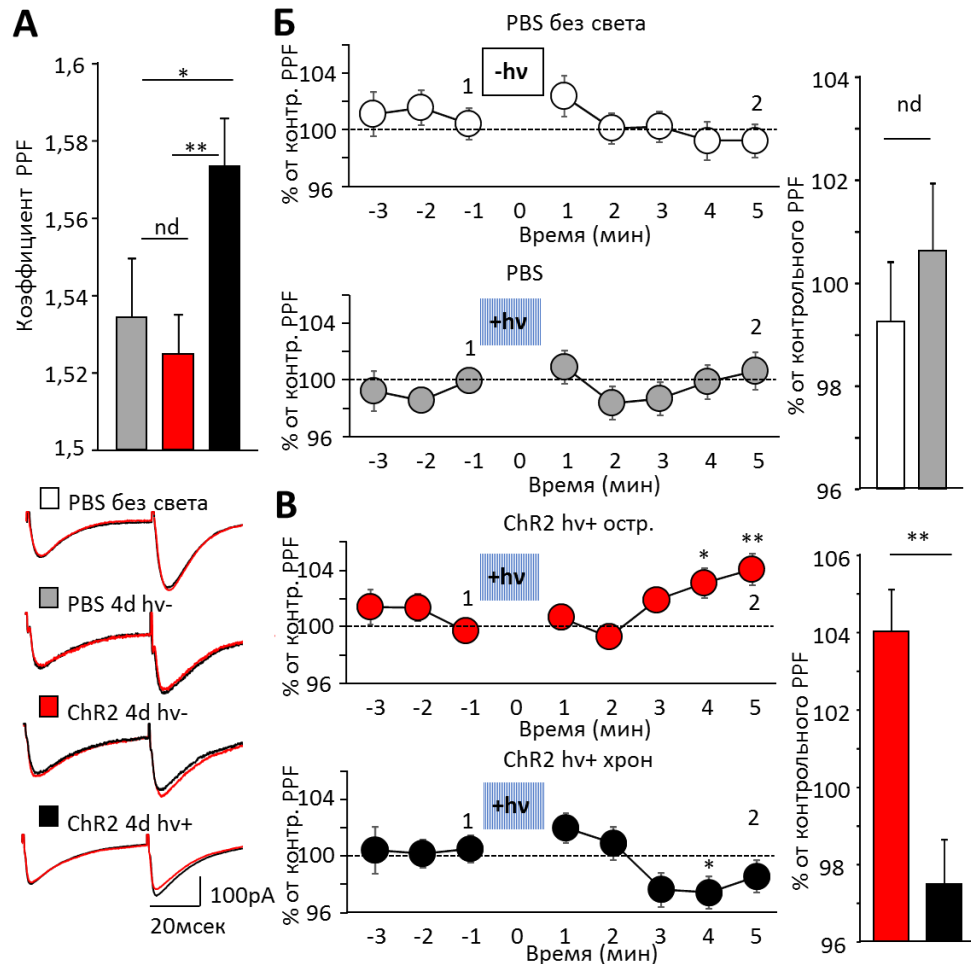


Рисунок 46. Хроническое раздражение ChR2 ГБ вызывает нарушение PPF. А. График усреднённых значений PPF. Репрезентативные кривые ВПСТ показаны справа до (чёрные) и после (красные) острой фотостимуляции. Б. Графики флуктуации PPF у животных, инъецированных PBS в ответ на острую фотостимуляцию (справа) и без фотостимуляции (слева). Усреднённый график нормированных PPF в точке 2 представлен справа. В. Графики флуктуации PPF у животных, инъецированных ChR2 в ответ на острую фотостимуляцию без (слева) и после (справа) хронической фотостимуляции. Усреднённый график нормированных амплитуд в точке 2 представлен справа (455).

Выявленные изменения PPF в оптогенетической модели астроглиоза могут быть связаны, в первую очередь, с нарушением обратного захвата глутамата в синапсе между ПВ и КП. Для моделирования данного состояния мы исследовали динамику PPF у животных, экспрессирующих ChR2, в присутствии 500nM ТВОА (блокатора транспортера возбуждающих аминокислот). В присутствии ТВОА коэффициент PPF был значительно увеличен по сравнению с контролем ($1,85 \pm 0,02$ и $1,53 \pm 0,02$, соответственно), $p = 4,1 \times 10^{-7}$; Рисунок 47А. 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 значительно отличались, $p = 4,1 \times 10^{-6}$; Рисунок 47Б (455).

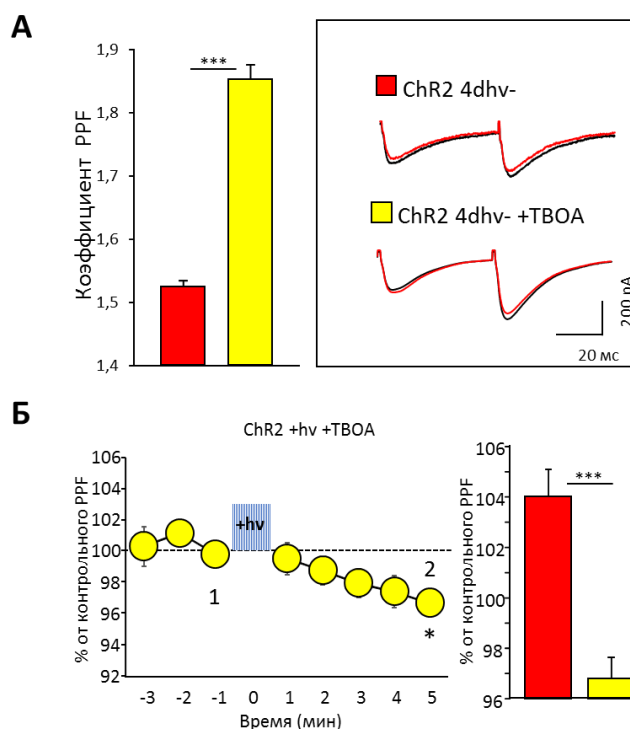


Рисунок 47. Уменьшение обратного захвата глутамата ГВ в присутствии 500nM ТВОА, приводит к нарушению PPF. А. График усреднённых значений PPF до и после добавления ТВОА. Репрезентативные кривые ВПСТ показаны

справа до (чёрные кривые) и после (красные кривые) острой фотостимуляции. В. График флуктуации PPF у животных, инъецированных ChR2 в ответ на острую фотостимуляцию в присутствии 500nM ТВОА. Усреднённый график нормированных амплитуд в точке 2 представлен справа (455).

В модели селективного астроглиоза, вызванного экспрессией мутантного атаксина 1 в ГБ мы обнаружили схожие патогенетические процессы. Для исследования электрофизиологических свойств КП и активации ГБ производилась котрансфекция LVV GFAP-Атаксин 1[Q2]-Flag или LVV GFAP-Атаксин 1[Q85]-Flag совместно с AVV GFAP-ChR2-mKate.

Исследование электрофизиологических свойств КП при раздражении ПВ 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), $p = 0,00013$; Рисунок 48А. Острое одноминутное раздражение светом переживающих срезов, экспрессирующих ATXN1[Q2]/ChR2, вызывало увеличение PPF относительно престоимационного уровня с максимальным эффектом на 2-й минуте ($104,7 \pm 1,4\%$), $p = 0,006$; Рисунок 48Б, левый график. Острая фотостимуляция срезов, экспрессирующих ATXN1[Q85]/ChR2, приводила к уменьшению PPF с минимальным эффектом на 3-й минуте ($95,3 \pm 2,0$), $p = 0,029$. На второй минуте после острой фотоактивации нормированные коэффициенты статистически различались у данных двух групп, $p = 0,0007$; Рисунок 48Б, (правая часть) (455).

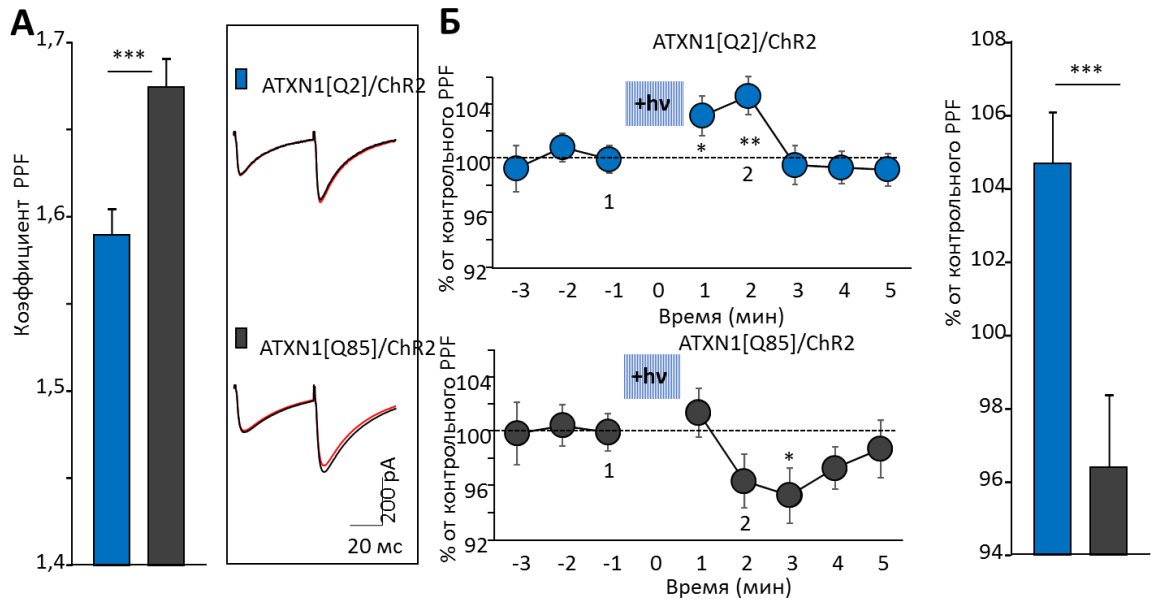


Рисунок 48. Экспрессия мутантного атаксина 1 в ГБ вызывает нарушение PPF. А. График усреднённых значений PPF животных экспрессирующих в ГБ ATXN1/ChR2. Репрезентативные кривые ВПСТ показаны справа до (чёрные кривые) и после (красные кривые) острой фотостимуляции. Б. Графики флуктуации PPF у данных животных в ответ на острую фотостимуляцию. Усреднённый график нормированных амплитуд в точке 2 представлен справа (455).

У животных, у которых мы селективно экспрессировали атаксин 1[Q85] в ГБ с помощью LVV, соотношение PPF в синапсах ПВ-КП не отличалось от контрольной группы, $p = 0,78$ (Рисунок 49А). Однако у мышей СЦА1 К1 мутантный атаксин 1 также экспрессируется в гранулярных клетках, и это влияет на функцию их аксонов. Отношение PPF у этих животных уменьшилось с $1,6 \pm 0,1$ ($n = 11$ от 3 животных) до $1,3 \pm 0,1$ ($n = 11$ от 3 животных, $p = 0,027$, Рисунок 49Б) (450).

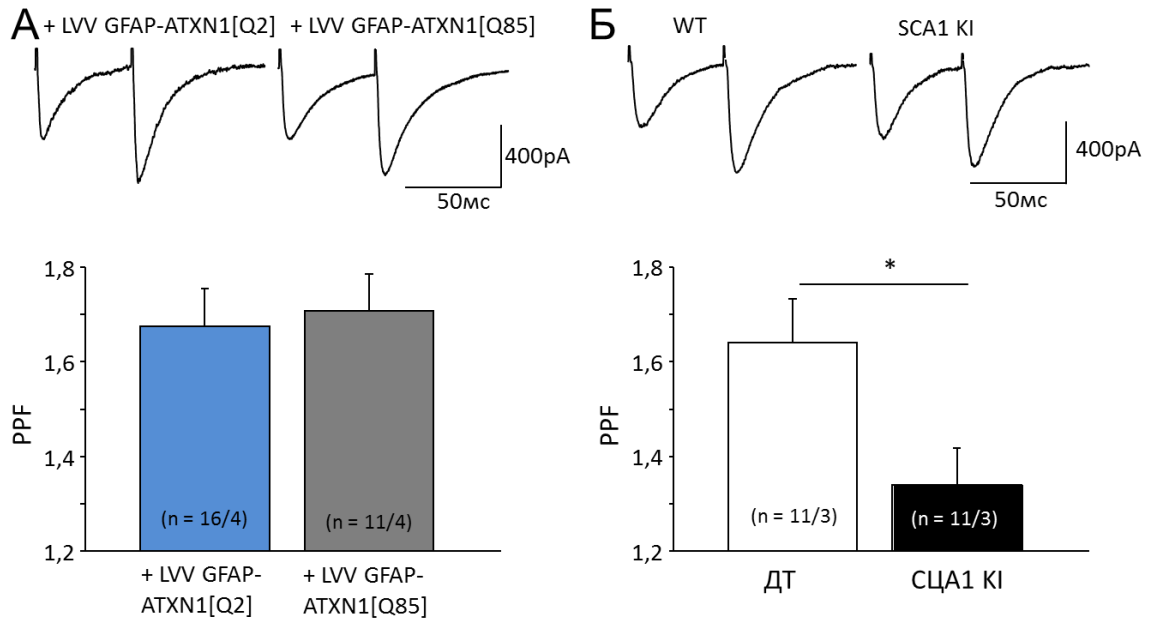


Рисунок 49. Нарушение усиления парных импульсов (PPF) в синапсах ПВ-КП в моделях СЦА1. (А) Усредненная диаграмма коэффициентов PPF не изменяется у мышей, которые избирательно экспрессируют атаксин 1[Q85] в ГБ. (Б) PPF снижается в синапсах ПВ-КП мышей СЦА1 КІ. В скобках указано количество (n) исследованных ПК и животных (ПК/животные). Звездочки указывают на статистически значимое различие по сравнению с соответствующими контролями (критерий Стьюдента; * $p < 0,05$) (450).

С другой стороны, синапсы ЛВ, образованные аксонами нейронов ядер нижних олив с КП, обычно демонстрируют уменьшение второго ответа, известного как парное подавление импульса (PPD). Механизм PPD связан с истощением пресинаптического пула везикул с глутаматом, которое длится десятки миллисекунд (456). У животных, у которых мы селективно экспрессировали атаксин 1[Q85] в ГБ с помощью LVV, соотношение PPD в синапсах ЛВ-КП не отличалось от контрольной группы, $p = 0,46$ (Рисунок 50А). Однако у мышей СЦА1 КІ, у которых мутантный атаксин 1 экспрессируется в нейронах, в том числе в нижней оливе, PPD была повышена, отношение изменялось от $0,64 \pm 0,02$ ($n = 11$ из 3 животных) в

контроле до $0,56 \pm 0,03$ ($n = 10$ от 3 животных, $p = 0,043$) у животных СЦА1 КИ (Рисунок 50Б) (450).

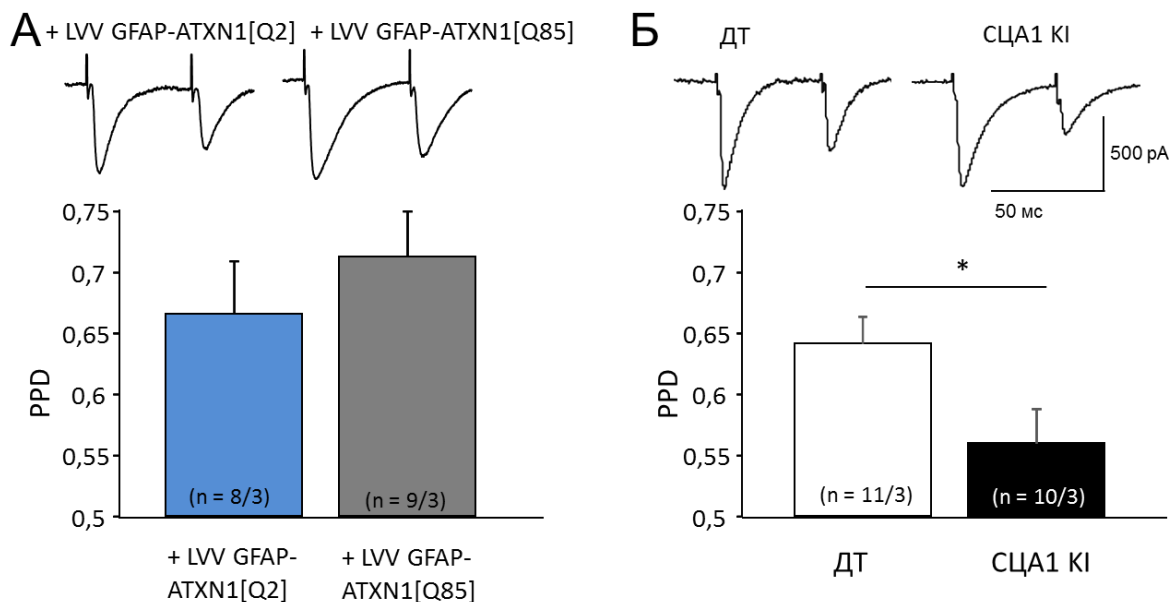


Рисунок 50. Нарушение подавления парных импульсов (PPD) в синапсах ЛВ-КП в моделях СЦА1. (А) Усредненная диаграмма коэффициентов PPD не изменяется у мышей, которые избирательно экспрессируют атаксин 1 [Q85] в ГБ. (Б) PPD снижается в синапсах ЛВ-КП мышей СЦА1 КИ. В скобках указано количество (n) исследованных ПК и животных (ПК/животные). Звездочки указывают на статистически значимое различие по сравнению с соответствующими контролями (критерий Стьюдента; $*p < 0,05$) (450).

Одной из форм ранее пластичности является DSE, которая вызывается деполяризацией мембраны. Деполяризация приводит к открытию потенциалзависимых кальциевых каналов (VGCC) и увеличению внутриклеточного Ca^{2+} . Ca^{2+} вызывает высвобождение эндоканнабиноидов из постсинаптических клеток с последовательной активацией рецепторов CB1 на пресинаптических окончаниях, что приводит к снижению высвобождения глутамата. Мы исследовали динамику амплитуды ПВ-ВПСТ после 5 с

деполяризации от -70 до 0 мВ. Интенсивность стимула регулировали для достижения амплитуды ВПСТ примерно 150 pA до инициации DSE.

Астроциты участвуют в передаче сигналов эндоканнабиноидов (457). В частности, астроциты экспрессируют рецепторы CB1, которые при активации эндоканнабиноидами вызывают повышение внутриклеточного уровня Ca^{2+} и высвобождение глиотрансмиттеров, включая глутамат и, возможно, D-серин и другие глиотрансмиттеры, которые способствуют эффектам, наблюдаемым на постсинаптическом уровне (458), (459). Поэтому мы предположили, что можем увидеть изменения DSE в данных моделях по сравнению с ранее изученной B05 моделью, где мутантный белок селективно экспрессируется в КП.

Изначально считалось, что развитие DSE всецело зависит от активации VGCC и протекает по mGluR независимому каскаду сигналов (460). Мы определили, что данный метаботропный рецептор также вносит свой существенный вклад в DSE. Мы записывали последовательно SSE и DSE после добавления блокатора mGluR1, CPCCOEt. После добавления данного блокатора первая нормированная амплитуда ПВ ВПСТ при индукции SSE увеличилась с $21,4 \pm 4,1$ % до $54,9 \pm 9,8$ % ($n = 6$ от 3 животных), $p = 0,008$ спаренный t-тест (Рисунок 51А и Б). Дальнейшая индукция DSE не вызывала значительного снижения нормированной амплитуды ПВ ВПСТ и составляла $88,7 \pm 5,4$ %. Отмывание среза от CPCCOEt значительно уменьшило амплитуду ПВ ВПСТ до $65,1 \pm 8,1$ % (то же количество клеток), $p = 0,006$, спаренный t-тест (Рисунок 51В и Г).

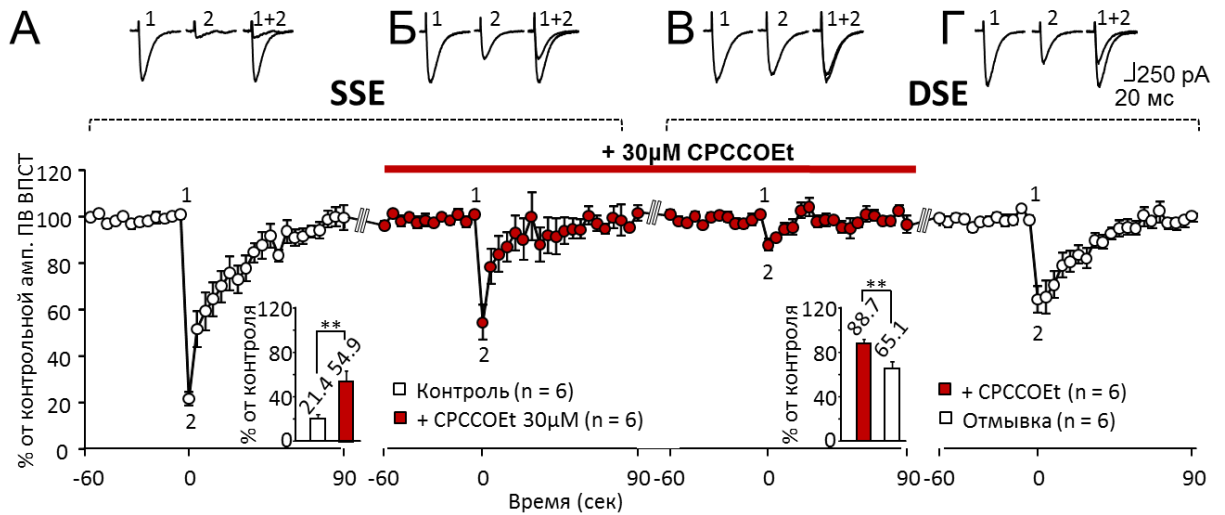


Рисунок 51. Участие mGluR каскада сигналов в эндоканнабиноид-опосредованной кратковременной синаптической пластичности. (А) Усреднённые амплитуды ПВ ВПСТ до (А) и после индукции SSE (Б), а также до (В) и после индукции DSE (Г). Амплитуды ПВ-ВПСТ нормировали к значениям до применения стимула. Данные от КП без влияния CPCCOEt (контроль), представлены синими кружками, а под воздействием CPCCOEt - красными. На графике указано количество (n) исследованных КП и животных (ПК/животные). Репрезентативные кривые ПВ-ВПСТ показаны над диаграммой. Временные точки: 1 – до, 2 – сразу после деполяризации. На вставках показаны средние нормированные амплитуды в момент времени 2. Звездочки указывают на статистически значимое различие по сравнению с контролем (парный t-тест; ** $p < 0,01$).

Сначала мы оценили реактивный фенотип ГБ с использованием окрашивания анти-S100 β и обнаружили, что экспрессия S100 β в обеих наших моделях СЦА1 была увеличена (Рисунок 52А и Б). С нашим протоколом DSE после деполяризации ПВ ВПСТ снизился до уровня 47,5% и 43,3% у контрольных мышей в обеих моделях (Рисунок 52В и Г). Опосредованная LVV экспрессия атаксин 1[Q85] избирательно в ГБ не приводила к значительному снижению пиковых значений DSE (Рис 52В). Однако выход из депрессии происходил

намного быстрее, когда на ГБ воздействовали мутантным атаксин 1, где ПВ ВПСТ возвращался к достимуляционным значениям через 15 секунд, в отличие от контроля, где он длился до 65 секунд ($p = 0,28$ и $p = 0,12$ соответственно, однофакторный дисперсионный анализ). Напротив, у мышей СЦА1 KI DSE была заметно снижена, а амплитуда ПВ ВПСТ упала всего до $84,6 \pm 4,2\%$ ($n = 10$ от 3 мышей в контроле) по сравнению с их однопомётными животными дикого типа (снижение до $42,3 \pm 5,9\%$; $n = 10$ от 4 мышей). Через 15 секунд ПВ ВПСТ уже статистически не отличалась от уровня до стимуляции ($p = 0,11$, однофакторный дисперсионный анализ) (Рисунок 52Г) (450).

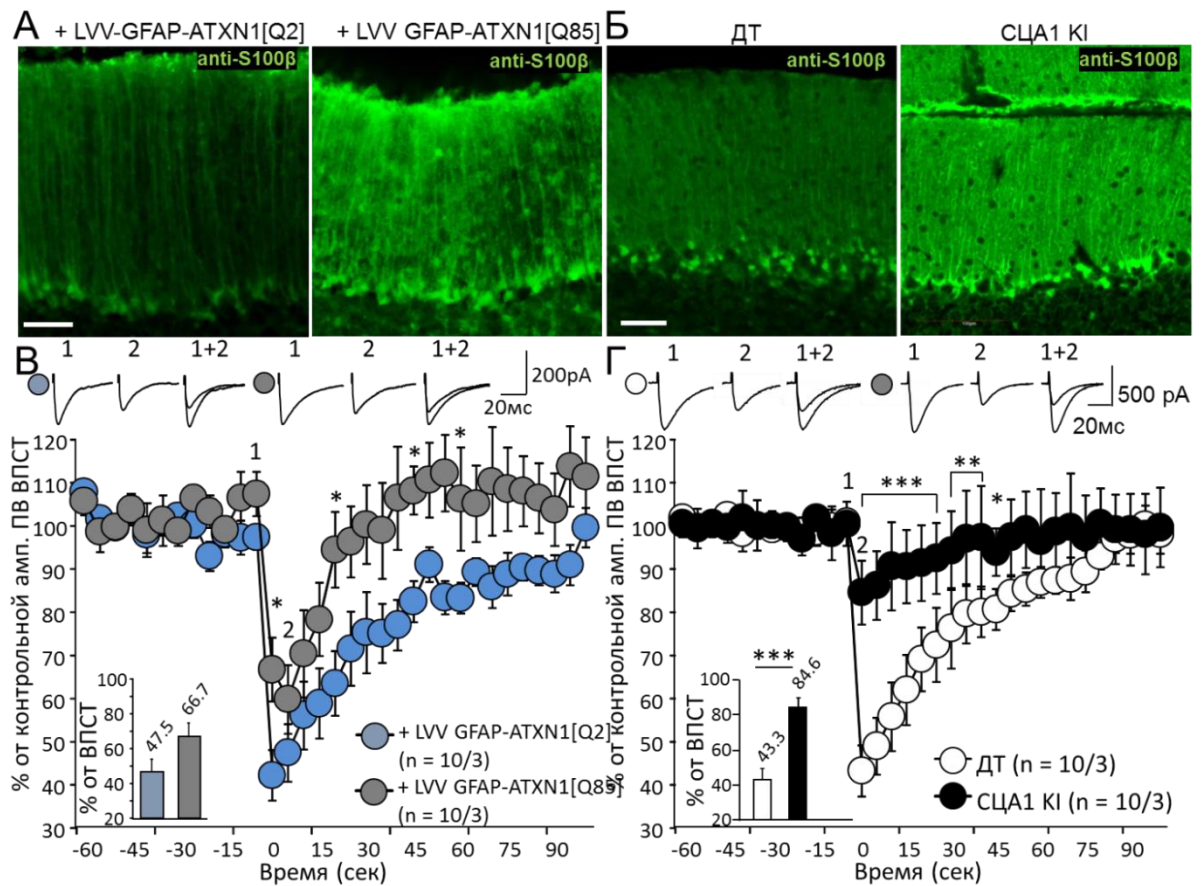


Рисунок 52. Реактивная глия у модельных СЦА1 мышей изменяет морфологию мозжечка и DSE. (А-Б) Конфокальные изображения коры мозжечка показывают повышенную экспрессию S100β у мышей, которые избирательно экспрессируют атаксин 1 [Q85] в ГБ (А) и у СЦА1 KI мышей

(Б). Мерная шкала 50 μm . (В) Усреднённые амплитуды ПВ ВПСТ до и после деполяризации. Амплитуды ПВ-ВПСТ нормировали к значениям до деполяризации. Данные от мышей, селективно экспрессирующих атаксин 1[Q2] в ГБ (контроль), представлены синими кружками, а для мышей, селективно экспрессирующих атаксин 1[Q85] в ГБ, серыми кружками. (Г) Аналогичные данные для мышей СЦА1 К1 и их контрольных однопомётных животных ДТ. Данные от мышей ДТ (контроль) представлены чёрными кружками, от мышей СЦА1 К1 — белыми кружками. На графике указано количество (n) исследованных КП и животных (ПК/животные). Репрезентативные кривые ПВ-ВПСТ показаны над диаграммой. Временные точки: 1 – до, 2 – сразу после деполяризации. На вставках показаны средние нормированные амплитуды в момент времени 2. Звездочки указывают на статистически значимое различие по сравнению с контролем (однофакторный дисперсионный анализ с последующим апостериорным тестом Тьюки; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) (450).

Поскольку мы отметили значительное падение пиковой амплитуды ПВ ВПСТ при развитии DSE в модели СЦА1 К1 (Рисунок 52В и Г), которое было больше, чем в случае селективной экспрессии мутантного атаксина 1 в ГБ, мы хотели дополнительно исследовать механизм этого эффекта. Одна из причин заключается в том, что в модели СЦА1 К1, где мутантный атаксин 1 экспрессируется в КП и ГБ, деполяризация в ответ на введение тока слабее, а высвобождение эндоканнабиноидов критически зависит от притока Ca^{2+} в нейроны через VGCC (461).

У КП мышей линии СЦА1 К1 частота потенциалов действия в ответ на различные количества тока была стабильно ниже по сравнению с КП животных дикого типа. Для оценки возбудимости ПК с учетом различий в емкости мембран, вызванных коллапсом дендритного дерева, мы

нормализовали вводимые токи к ёмкости мембраны (pA/pF) и строили график зависимости частоты возбуждения от этого параметра. При меньших токах ниже 0,2 pA/pF ПК от мышей СЦА1 К1 не генерировали никаких потенциалов действия (Рисунок 53А). Входное сопротивление в этих двух группах не различалось (данные не представлены), но мембранный потенциал покоя ПК у мышей СЦА1 К1 был на ~ 1,5 мВ ниже; $p = 0,018$ (Рисунок 53Б) (450).

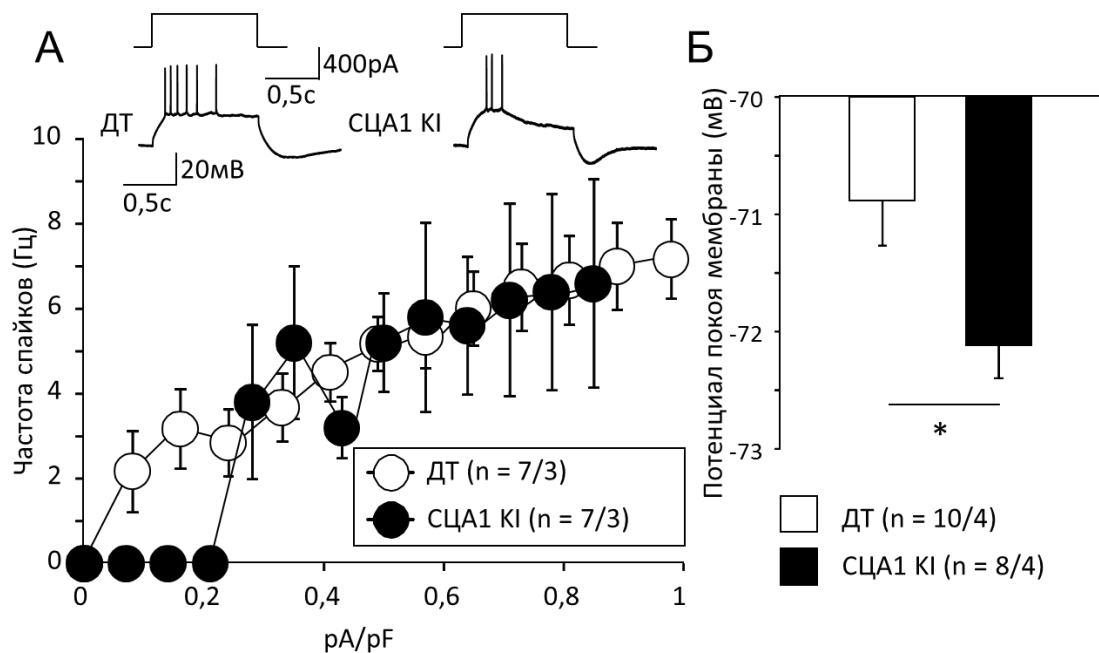


Рисунок 53. КП от мышей СЦА1 К1 менее возбудимы и слегка гиперполяризованы. (А) Частоты спайков (в Гц) нанесены в зависимости от введенных токов с поправкой на ёмкость мембраны (pA/pF). Репрезентативные кривые после подачи того же тока показаны над графиком. (Б) График усреднённых показателей потенциала покоя мембраны КП. В скобках указано количество (n) исследованных КП и животных (КП/животные). Звездочки указывают на статистически значимое различие по сравнению с контрольными мышами дикого типа (t-критерий; * $p < 0,05$) (450).

Данные результаты указывают на более низкую возбудимость СЦА1 КИ КП, что, вероятно, влияет на открытие VGCC и может способствовать более слабому пиковому DSE. С другой стороны, поддержание DSE явно зависит от работоспособности ГБ.

Для более детального исследования влияния ГБ на DSE мы исследовали данную пластичность у животных после введения в кору мозжечка S100β.

У контрольных мышей протокол DSE снижал ВПСТ на $67,3\% \pm 3,5\%$ ($n = 11$ клеток от 4 мышей), что было аналогично таковому у мышей, которым предварительно вводили S100β ($69,7\% \pm 4,7\%$, $n = 12$ клеток от 4 мышей), $p = 0,975$, непарный t-критерий, Рисунок 54А). Однако восстановление амплитуды КП происходило значительно быстрее у мышей, которым вводили S100β. Через пятьдесят секунд после деполяризации амплитуда вернулась к $93,6\% \pm 2,8\%$ от контроля по сравнению с $83,9\% \pm 2,7\%$ у мышей, которым вводили PBS ($p = 0,03$, непарный t-критерий; рисунок 54А и Б). Модели подгонки двойной волны (1) подтвердила замедление кинетики восстановления после инъекции S100β. Снижение амплитуды в протоколе DSE существенно не отличалось у мышей, которым вводили S100β, по сравнению с группой PBS: $45,5\%$ ($30,6\%$, $63,6\%$) против $38,1\%$ ($31,8\%$, $44,6\%$) соответственно. Используя протокол подбора, мы подсчитали, что период полувосстановления параметра (τ_2) значительно меньше у мышей, которым вводили S100β: $29,7$ с ($21,0$ с, $47,2$ с) по сравнению с $64,5$ с ($52,0$ с, $85,1$ с) в группе PBS $p < 0,05$. Эти результаты демонстрируют, что избыток внеклеточного белка S100β негативно влияет на DSE (409).

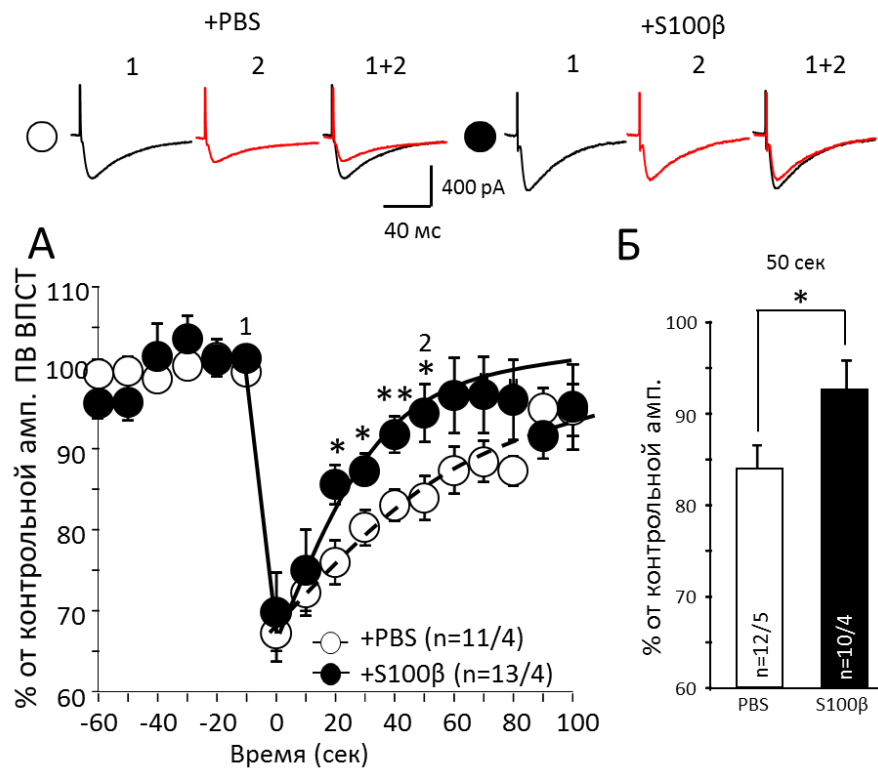


Рисунок 54. Введение S100β в кору мозжечка мыши вызывает нарушение DSE в синапсах ПВ-КП. (А) Средняя временная диаграмма амплитуд ПВВПСТ до и после деполяризации. Амплитуды ПВ-ВПСТ нормировали к значениям до деполяризации. Количество (n) тестируемых КП и животных (ПК/животные) указано на графике. Пунктирные и черные линии указывают на модель двойной волны, подходящую для групп, которым вводили PBS и S100β, соответственно. Репрезентативные кривые ПВВПСТ от КП мышей, которым вводили PBS и S100β, показаны над диаграммой. Временные точки: до (1) и через 50 с после (2) деполяризации. (Б) Амплитуды ПВВПСТ через 50 с после деполяризации. По сравнению с областями, инъецированными PBS, амплитуда ПВВПСТ была значительно выше в областях, инъецированных S100β. * $p < 0,05$ (409).

Флуороцитрат ингибирует астроцитарный метаболизм и лишает эти клетки энергии, что в конечном итоге угнетает функции этих клеток (462).

Применение нами флуороцитрата привело к сильному угнетению возбуждающей передачи ПВ-КП, независимо от того, подвергалась ли ткань воздействию S100 β или нет (Рисунок 55А, Б). После 10-минутного применения флуороцитрата амплитуда ПВ ВПСТ у мышей, которым инъецировали S100 β , снизилась до $57,7\% \pm 9,0\%$ от контроля ($n = 7$ клеток от 4 мышей, $p = 0,006$, парный t-критерий). У мышей, которым инъецировали PBS, до $64,4\% \pm 9,9\%$ от контроля ($n = 7$ клеток от 4 мышей, $p = 0,014$, парный t-критерий) (Рисунок 55А, Б). Через десять минут после применения флуороцитрата усредненные значения ПВ ВПСТ в группах, которым вводили S100 β и PBS, не различались (непарный t-критерий, $p = 0,65$). Время нарастания ПВ ВПСТ у мышей, которым вводили PBS и S100 β , увеличивалось после лечения флуороцитратом. В группе PBS оно увеличилось с $2,3 \pm 0,2$ мс до $2,7 \pm 0,2$ мс ($n = 12$ клеток от 4 мышей, $p = 0,003$, парный t-критерий; Рисунок 55В), а в группе S100 β оно увеличилось с $2,4 \pm 0,3$ мс до $3,5 \pm 0,6$ мс ($n = 10$ клеток от 3 мышей, $p = 0,003$, парный t-критерий; Рисунок 55В). Ранее было показано, что астроциты также содержат СВ1-рецепторы и могут модулировать синаптическую пластичность (462). Рецепторы СВ1 в астроцитах сопряжены с G_{q/11}-белками и запускают активацию ФЛС (463) и высвобождают такие глиотрансмиттеры, как глутамат, АТФ или d-серин (464). Это явление зависит от белков SNARE и очень чувствительно к концентрации АТФ, которую можно снизить с помощью флуороцитрата (465), (466). Однако флуороцитрат не влиял на экспрессию DSE. После применения флуороцитрата у мышей, которым вводили PBS, протокол DSE снижал амплитуду ПВ ВПСТ на $56,8\% \pm 8,7\%$ ($n = 9$ клеток от 4 мышей), что статистически не отличалось от зарегистрированной амплитуды без флуороцитрата у мышей, которым вводили S100 β (Рисунок 55Г, Д) ($p = 0,317$, непарный t-критерий). Тем не менее это сравнение осложнено прямым воздействием флуороцитрата на ПВ ВПСТ, и его следует интерпретировать с осторожностью. Модель двойной

волны соответствует изменениям амплитуд ПВ ВПСТ после импульса деполяризации и инициации DSE. Максимальное снижение амплитуды составило 51,92% (41,67%, 81,41%) и 46,23% (33,28%, 75,49%) для PBS и S100 β соответственно. Однако восстановление амплитуды ПВ ВПСТ было значительно медленнее в КП, обработанных флуороцитратом, в срезах мышечей, получавших PBS (Рисунок 55Е). Через пятьдесят секунд после деполяризации амплитуда ПВ ВПСТ вернулась к 67,5% \pm 5,4% от контроля по сравнению с необработанными срезами, где она восстановилась только до 83,9% \pm 2,7%, $p = 0,025$, непарный t-критерий (Рисунок 55Г-Е). Тем не менее флуороцитрат практически не влиял на протокол DSE у мышечей, которым вводили S100 β , где восстановление амплитуды ПВ ВПСТ составляло 81,4% \pm 7,6% от амплитуды через 50 с после введения флуороцитрата по сравнению с 93,6% \pm 2,8% у животных без флуороцитрата; $p = 0,181$, непарный t-критерий (Рисунок 55Г-Е). Подгонка модели двойной волны также не выявила существенных изменений после обработки срезов флуороцитратом (409).

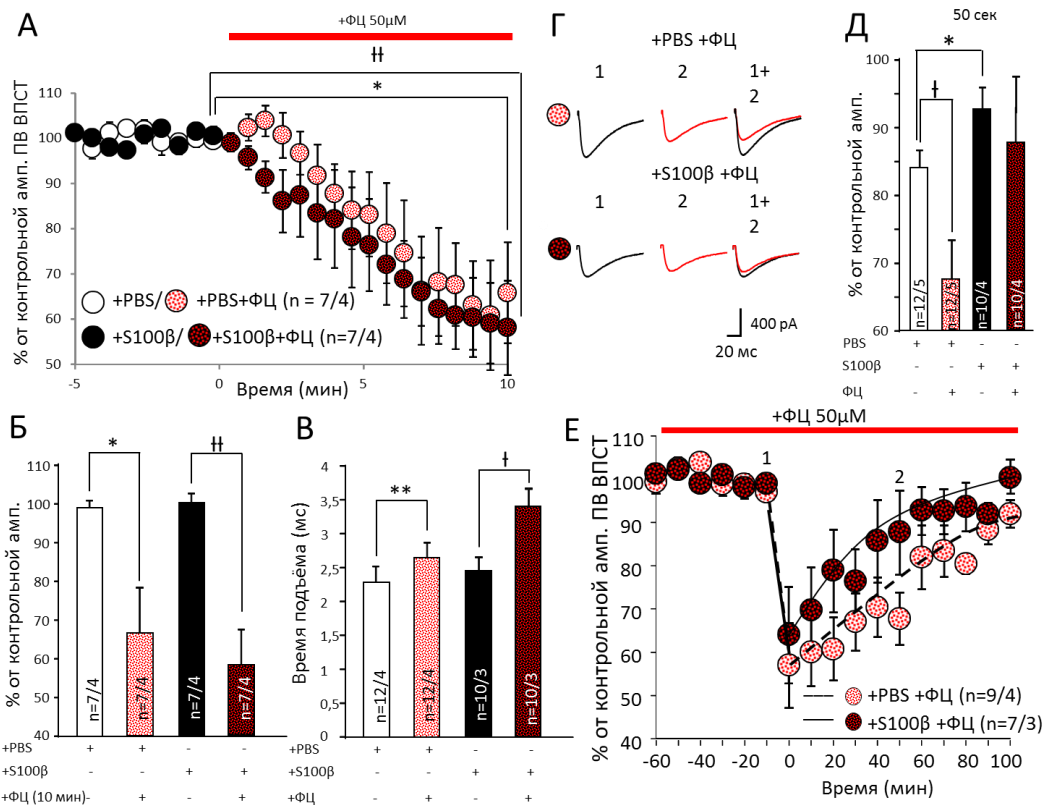


Рисунок 55. Снижение астроцитарной функции флуороцитратом влияет на амплитуду и кинетику ПВ ВПСТ в синапсах ПВ-КП. (А) Динамика амплитуд ПВ ВПСТ до и после применения 50 μM флуороцитрата. (Б) Усредненные амплитуды ПВ ВПСТ через 10 минут после применения флуороцитрата. Эффект флуороцитрата был примерно одинаковым в срезах, инъецированных S100 β и PBS. (В) Флуороцитрат значительно изменил время подъема ПВ ВПСТ у животных, которым вводили PBS, и немного увеличил его после введения S100 β . ** $p < 0,01$, † $p < 0,05$. (Г) Репрезентативные кривые ПВ ВПСТ, полученные в КП от мышей, которым вводили PBS и S100 β . Временные точки: до (1) и через 50 с после (2) деполяризации. (Д) Амплитуды ПВ ВПСТ через 50 с после деполяризации. По сравнению с областями, инъецированными PBS, амплитуда ПВ ВПСТ была значительно выше в областях, инъецированных S100 β . * $p < 0,05$. Подавление функции ГБ с помощью флуороцитрата приводит к значительному увеличению DSE в КП, после инъекции PBS. † $< 0,05$. (Е) Среднее время ПВ ВПСТ до и после деполяризации в срезах, обработанных 50 μM флуороцитратом. Пунктирные и черные линии показывают модель двойной волны, для групп, которым вводили PBS и S100 β , соответственно (409).

Схожие процессы, угнетающие работу астроцитов, мы обнаружили при математическом моделировании Ca^{2+} ответов, имитирующих излишнее накопление нейромедиатора в синаптической щели. Влияние глутамата вызывает дополнительные колебания цитозольного Ca^{2+} с большей частотой, чем спонтанные. Это влияние приводит к прерыванию изначальных спонтанных колебаний (Рис. 56) (467).

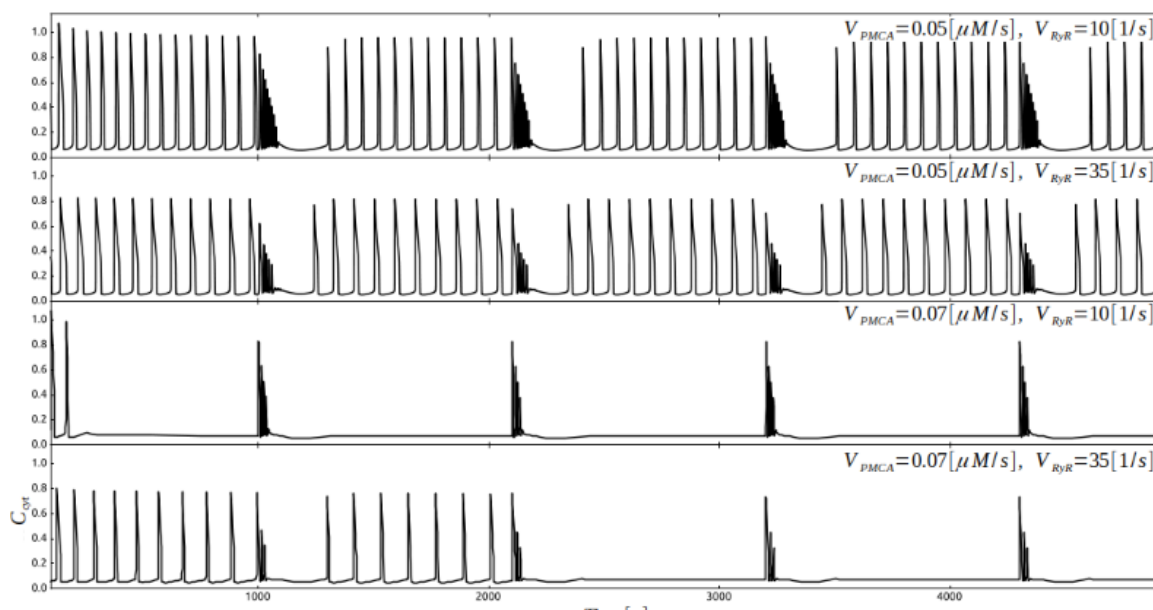


Рисунок 56. Спонтанные колебания в модели ($RyR > 0$, $IP3R > 0$). При большом оттоке Ca^{2+} , спонтанные колебания исчезают. Четыре глутаматных импульса порождают поток через каналы $IP3R$, что приводит к прерыванию спонтанных колебаний. Длительность стимулов 100 секунд (467).

Девяносто процентов глутамата в синапсах ПВ-КП поглощается транспортёрами возбуждающих аминокислот EAAT1 и EAAT2, расположенных на мембранах астроцитов (468). Мы подозревали, что сокращение времени спада ПВ ВПСТ после инъекции S100 β было следствием усиления обратного захвата глутамата через EAAT. Мы обнаружили, что 500 μM DL-трео- β -бензилоксипарагиновой кислоты (ТВОА) значительно увеличивает время спада ПВ ВПСТ у мышей, которым вводили PBS и S100 β . У мышей, которым вводили PBS, константа времени спада (τ) ПВ ВПСТ изменилась с $30,0 \pm 4,4$ до $39,2 \pm 6,3$ ms^{-1} ($n = 16$ клеток от 4 мышей, $p = 0,039$, парный t-критерий, рисунок 57А). Интересно, что до применения ТВОА τ ПВ ВПСТ различались между группами, которым вводили S100 β - и PBS ($p = 0,044$, однофакторный дисперсионный анализ), тогда как после ТВОА они достигли примерно одинаковых значений ($p = 0,64$, однофакторный дисперсионный анализ, Рисунок 57А). У мышей,

которым вводили S100 β , увеличение было еще более значительным, с $19,2 \pm 2,7$ мс до $34,6 \pm 7,1$ мс⁻¹ ($n = 10$ клеток от 3 мышей, $p = 0,031$ парный t-критерий). Применение неселективного блокатора EAAT DL-ТВОА 500 μ М существенно не изменило амплитуды ПВ ВПСТ и время нарастания в КП мозжечка мышей, которым вводили PBS и S100 β (данные не показаны). ТВОА не влиял на PPF у мышей, которым вводили PBS ($1,86 \pm 0,1$ против $1,84 \pm 0,1$; $n = 16$ клеток от 4 мышей, $p = 0,673$ парный t-критерий), в то время как у мышей, которым вводили S100 β , это привело к небольшому, но значительному снижению PPF с $1,9 \pm 0,2$ до $1,76 \pm 0,1$ ($n = 10$ клеток от 3 мышей, $p = 0,049$, парный t-критерий, Рисунок 57Б). Мы исследовали DSE в синапсах ПВ-КП после обработки срезов мозжечка 500 μ М ТВОА. У мышей, которым вводили PBS, ТВОА не влиял на DSE. ПВ ВПСТ уменьшилась на $59,2\% \pm 5,4\%$; ($n = 15$ клеток от 4 мышей), что статистически не отличалось от такового до применения этого блокатора ($56,8\% \pm 5,7\%$, $p = 0,524$, парный t-критерий). Кроме того, ТВОА не влияла на восстановление амплитуды ПВ ВПСТ (Рисунок 57В, Г), и DSE у мышей, которым вводили S100 β , снижение ТВОА на $74,8\% \pm 9,6\%$, ($n = 11$ клеток из 4 мышей) против $73,6\% \pm 8,8\%$ без ТВОА, $p = 0,789$ (парный t-критерий). Кроме того, ТВОА не влияла на восстановление амплитуды ПВ ВПСТ. Модель двойной волны показала снижение амплитуд ПВ ВПСТ во время прохождения DSE на $45,71\%$ ($37,39\%$, $56,75\%$) и $32,11\%$ ($14,73\%$, $75,00\%$) для клеток PBS и S100 β соответственно. Период полувосстановления τ_2 составил $69,28$ с ($53,08$ с, $92,12$ с) для клеток PBS и $46,72$ с ($18,68$ с, $113,44$ с) для клеток S100 β . Эти результаты подтверждают, что ТВОА не повлияла на DSE (Рисунок 57В, Г) (409).

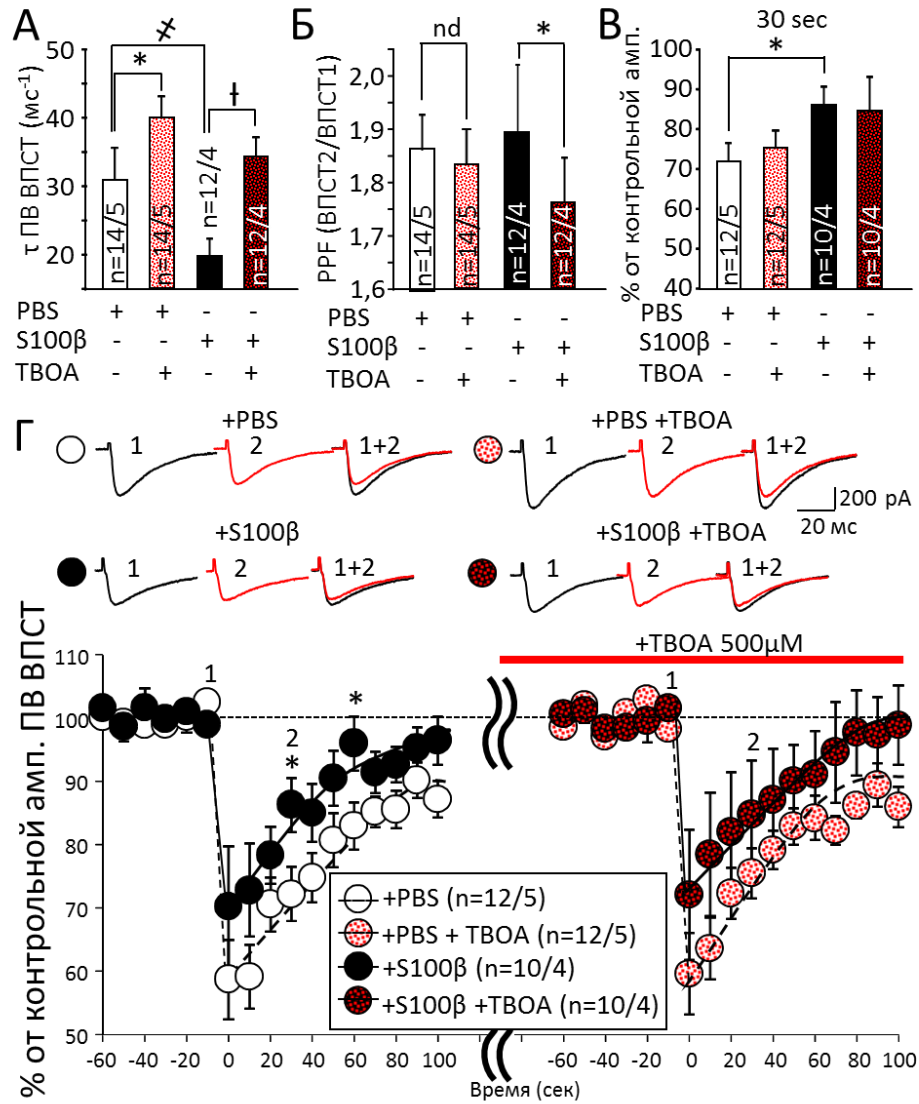


Рисунок 57. Ингибирование поглощения глутамата ТВОА изменяет кинетику ПВ ВПСТ, но не влияет на DSE. (А, Б) ТВОА увеличивает ПВ ВПСТ в коре мозжечка, инъецированных PBS и S100β ($\neq p < 0,05$). Обратите внимание, что исходный уровень τ был снижен после применения S100β, но эффект ТВОА был сравним с контролем. ТВОА оказывал минимальное влияние на PPF только в срезах животных, которым вводили S100β. * $p < 0,05$. (В) Сводный график амплитуд ПВ ВПСТ до и через 30 с после деполяризации. Применение ТВОА отмечено красной линией. Амплитуды ПВ-ВПСТ нормировали к значениям до деполяризации. * $p < 0,05$. (Г) Репрезентативные кривые ПВ ВПСТ, полученные в КП от мышей, которым вводили PBS и S100β, показаны над диаграммой. Временные точки: до (1) и через 30 с после

(2) деполяризации. Среднее время ПВ ВПСТ до и после деполяризации в срезах, обработанных ТВОА. Пунктирные и черные линии указывают на модель двойной волны, для групп, которым вводили PBS и S100 β , соответственно (409).

3.1.3.6. Экспрессия мутантного ATXN1 влияет на долговременную синаптическую пластичность в синапсах ПВ-КП

Долговременная депрессия (LTD) в синапсах ПВ-КП является одной из форм синаптической пластичности мозжечка. Как было описано ранее, этот тип LTD требует постсинаптической передачи сигналов mGluR1 в КП. Мы рассмотрели его на двух наших моделях. После 30 мин индукции LTD нормализованные амплитуды ПВ ВПСТ снижались в КП животных, трансдуцированных LVV GFAP-ATXN1[Q85]-Flag, с $56,2 \pm 5,4\%$ ($n = 5$ из 3 животных) до $80,1 \pm 4,8\%$ ($n = 5$ от 3 животных, $p = 0,026$, Рисунок 58А). У мышей СЦА1 KI нормализованные амплитуды ПВ ВПСТ через 30 мин после индукции LTD также снижались с $67,3 \pm 4,2\%$ ($n = 7$ от 3 мышей) до $88,9 \pm 6,2\%$ ($n = 6$ от 3 мышей, $p = 0,013$; Рисунок 58Б). Таким образом, LTD в ПВ-КП нарушается в обеих моделях в одинаковой степени.

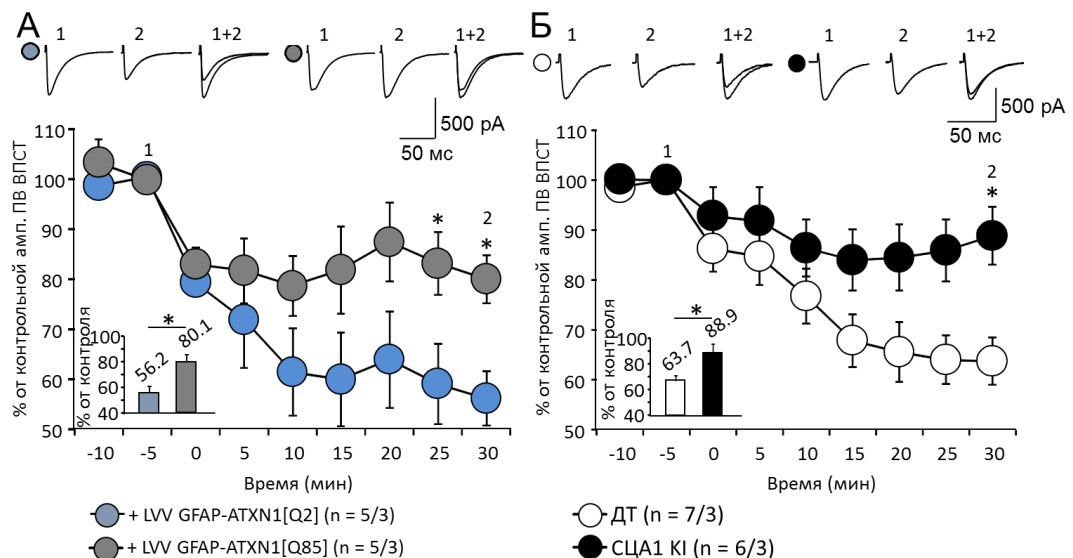


Рисунок 58. Нарушение LTD в синапсах ПВ-КП в моделях СЦА1. (А-Б) Средняя временная диаграмма амплитуд ПВ ВПСТ до и после индукции LTD у мышей, которые избирательно экспрессируют атаксин 1 [Q85] в ГБ (А) и у мышей СЦА1 KI (Б). Амплитуды ПВ-ВПСТ нормировали к значениям до индукции LTD. Количество (n) исследованных КП и животных (КП/животные) указано на графике. Репрезентативные кривые ПВ ВПСТ показаны над диаграммой. Временные точки: до (1) и через 30 мин после (2) индукции LTD. Усреднённые амплитуды ПВ ВПСТ через 30 мин после индукции LTD показаны на вставках. В обеих моделях LTD был уменьшен. Звездочка указывает на статистически значимое различие по сравнению с соответствующими контролями (t-критерий Стьюдента; * p < 0,05).

3.1.3.7. Патологическая активация ГБ снижает экспрессию EAAT1 в коре мозжечка

Нейродегенеративные заболевания, такие как спиноцеребеллярные атаксии, вызывают патологическую трансформацию ГБ, проявляющуюся нарушением поглощения глутамата из синапсов между параллельными волокнами (PF) и клетками Пуркинье (PC), что приводит к перераздражению NMDA рецепторов, избыточному входу Ca^{2+} и запускает апоптоз и гибель КП. EAAT1 (Slc1A3) и EAAT2 (Slc1A2) являются основными переносчиками глутамата в глии. В мозжечке доминирует EAAT1, тогда как экспрессия EAAT2 в коре мозжечка низкая (469), что подтверждается и нашими результатами (Рисунок 59А-Г).

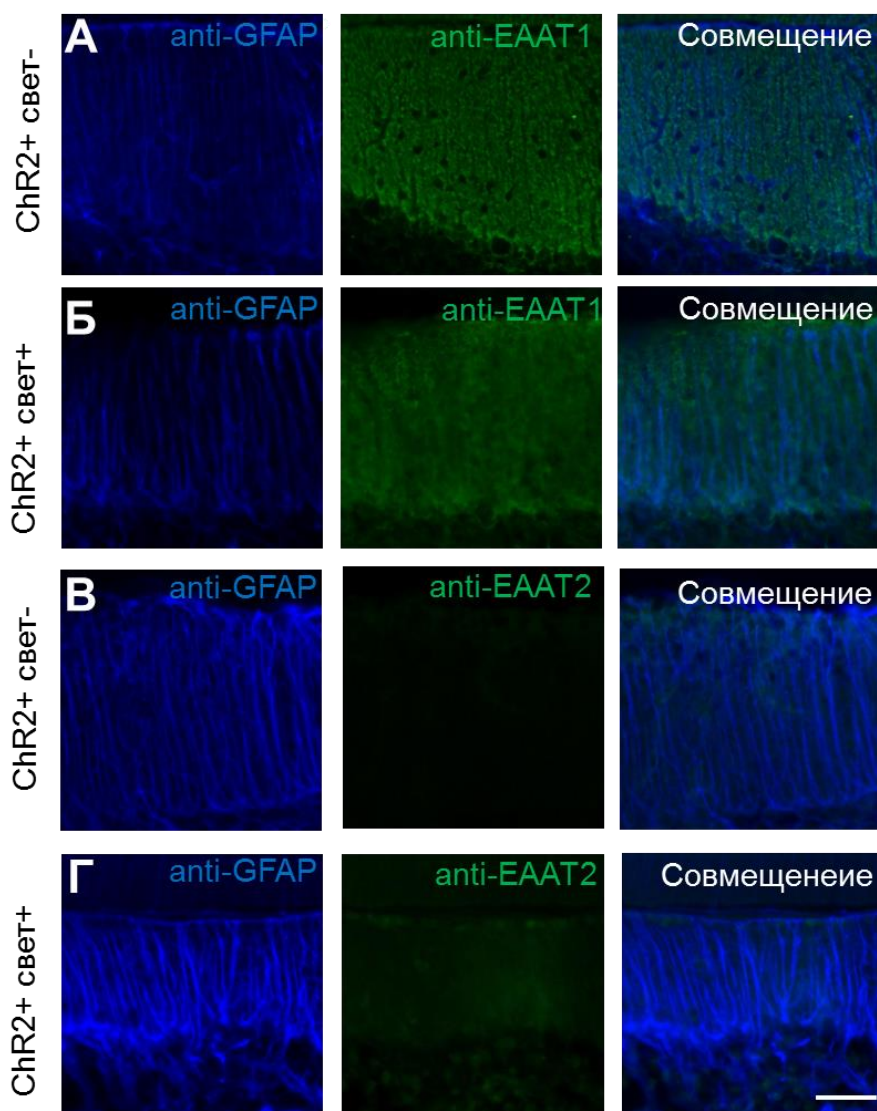


Рисунок. 59. Хроническая фотостимуляция GB^{ChR2} приводит к уменьшению экспрессии EAAT1. А-Б. Конфокальные изображения отростков GB^{ChR2} , меченых анти-GFAP (голубой) и анти-EAAT1 (зелёный). 4-х дневная фотостимуляция уменьшает интенсивность анти-EAAT1 свечения. В-Г. Анти-EAAT2 (зелёный) флуоресцентный сигнал в GB^{ChR2} практически отсутствовал и не увеличивался после фотостимуляции. Мерная шкала – 50 μ м.

Иммунореактивность EAAT1 была резко снижена в GB через 4 дня после фотостимуляции. Количество EAAT1-иммунопозитивных элементов

снижено на всем протяжении отростков ГБ. В дистальной части МС этот показатель снижался с $31,8 \pm 2,3$ до $16,5 \pm 1,8$ на $25 \mu\text{m}^2$ (Рисунок 60 А-Б). Таким образом, длительная фотостимуляция ГБ^{ChR2}, приводит к снижению экспрессии EAAT1.

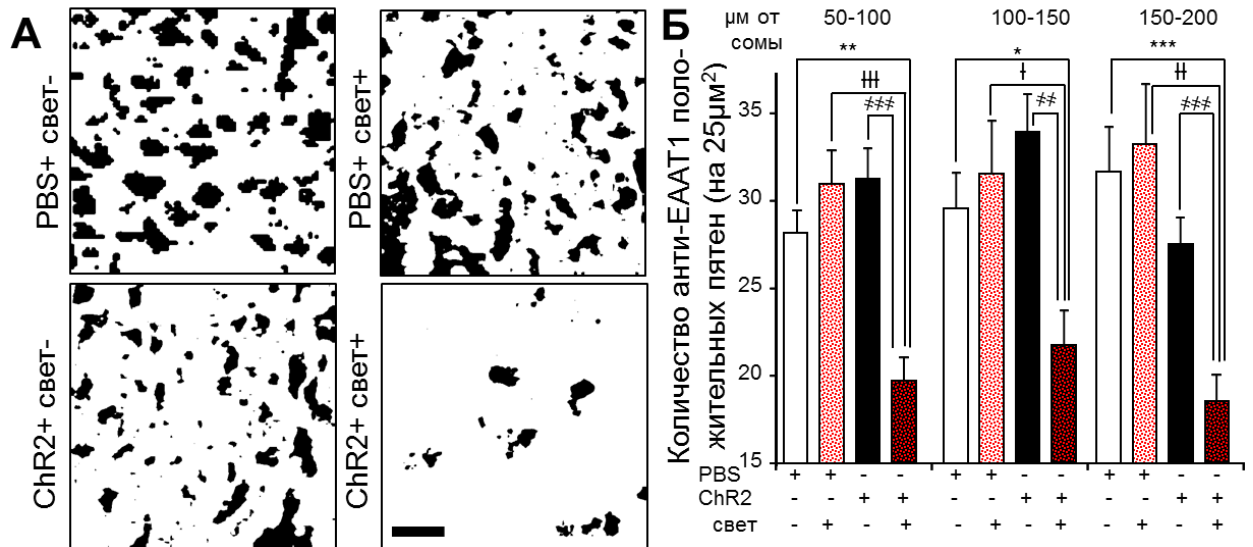


Рисунок. 60. Хроническая фотостимуляция ГБ^{ChR2} приводит к количественному уменьшению экспрессии EAAT1. А. Контрастированные пятна анти-EAAT1-меченых зон. Изображения содержат обработанные программой ImageJ анти-EAAT1 флуоресцентные сигналы. Б. Усреднённые графики показывают количество анти-EAAT1 положительных пятен на $25 \mu\text{m}^2$ МС. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; † $p < 0.05$; †† $p < 0.01$; ††† $p < 0.001$; # $p < 0.01$; ## $p < 0.001$.

Иммунореактивность EAAT1 была снижена в ГБ, трансдуцированной ATXN1 [Q85] по сравнению с трансдуцированными ATXN1 [Q2] животными (Рисунок 61А и Б).

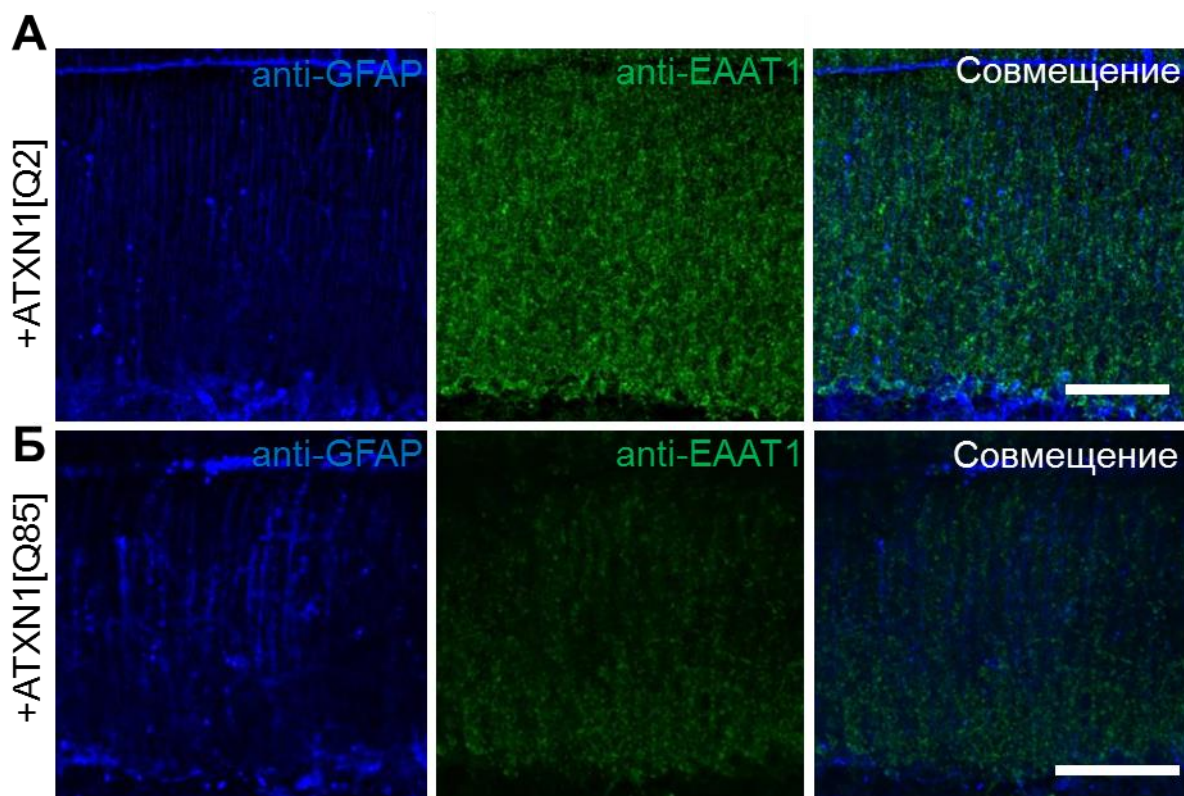


Рисунок 61. ATNX1[Q85] в ГБ приводит к качественному подавлению экспрессии EAAT1. А. Конфокальные изображения отростков ГБ^{ATXN1[Q2]} и Б. ГБ^{ATXN1[Q85]}, помеченных антителами к GFAP (синий) и к EAAT1 (зеленый). Мерная шкала 100 μm .

Общее количество анти-EAAT1-позитивных пятен уменьшилось на всём протяжении МС, более всего в дистальной его части с $26,5 \pm 1,0$ до $17,3 \pm 1,1$ на $25 \mu\text{m}^2$, $p = 0,0008$ (Рисунок 62 А и В).

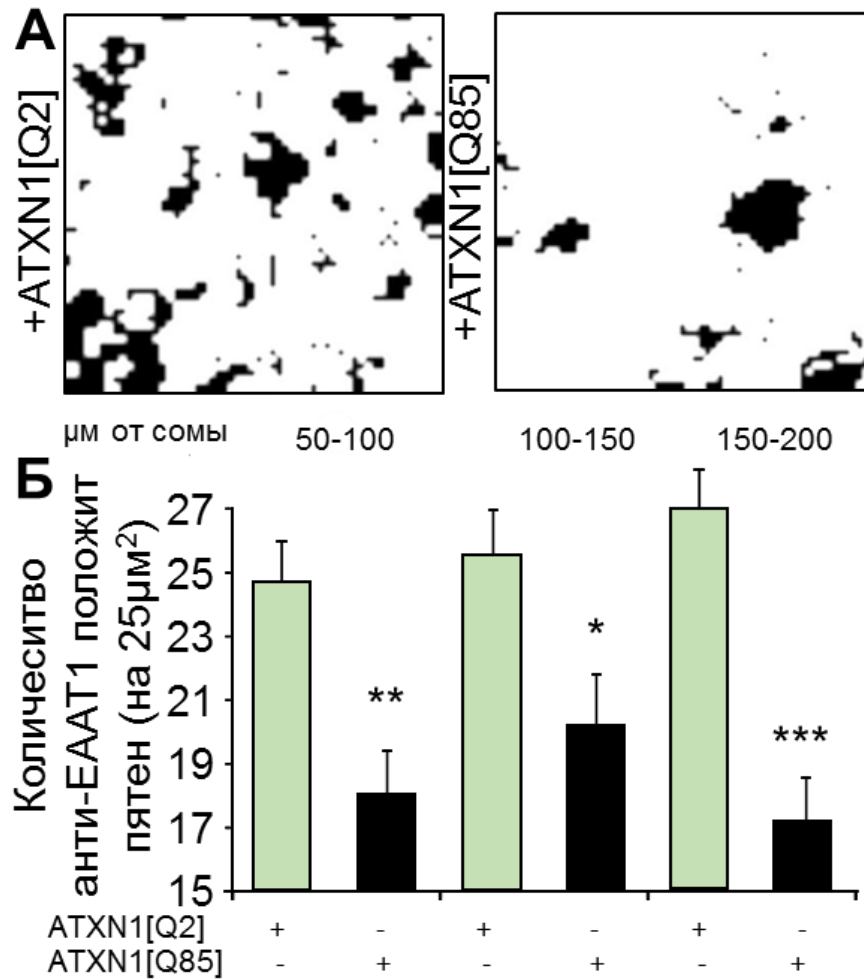


Рисунок 62. Экспрессия ATXN1[Q85] в ГБ приводит к подавлению экспрессии EAAT1. А. Контрастированные пятна анти-EAAT1-меченых зон. Изображения содержат обработанные программой ImageJ анти-EAAT1 флуоресцентные сигналы. Б. Усреднённые графики показывают количество анти-EAAT1 положительных пятен на $25\mu\text{m}^2$ МС. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Эти результаты демонстрируют, что удлинение τ ПВ ВПСТ и снижение экспрессии EAAT1 являются отличительными чертами дегенерации мозжечка в моделях СЦА1, вызванной воздействиями, специально направленными на ГБ, включая экспрессию ATXN[Q85] и оптогенетическую гиперактивацию ГБ.

3.2. Доставка рекомбинантных генов

3.2.1. Обоснованность использования LVV конструкций для экспрессии таргетных генетических последовательностей

Вирусные векторы являются наиболее исследованными и перспективными частицами для генной терапии болезней головного мозга. Лентивирусные векторы (LVV) обладают длительной экспрессией и могут нести относительно длинную генетическую последовательность. Хотя считается, что они обладают незначительным токсическим эффектом, на начальном этапе, мы исследовали влияние LVV MSCV-GFP, генетический вектор, который селективно экспрессируется в КП, на рост и морфологию нейронов в мозжечке модельных животных в сравнении с животными, которым вводился в PBS в кору мозжечка. Конструкция вводилась новорожденным животным (p0).

Для понимания выраженности патологических изменений при полиглутаминовых заболеваниях мы использовали несколько видов LVV для создания модели заболевания. В частности, мы создали универсальную модель полиглутаминовых атаксий при введении LVV MSCV-polyQ-GFP, в кору мозжечка. Данный генетический вектор содержит последовательность, кодирующей удлинённой полиглутаминовой цепочки и экспрессируется селективно в КП. Для понимания состоятельности mGluR пути передачи сигналов были изучены морфология КП и их электрофизиологические свойства. Сохранение морфологии, в частности, дендритов, важно для понимания приблизительного количества белка mGluR1 в этих клетках, которые локализуются на их шипиках (Рисунок 63).

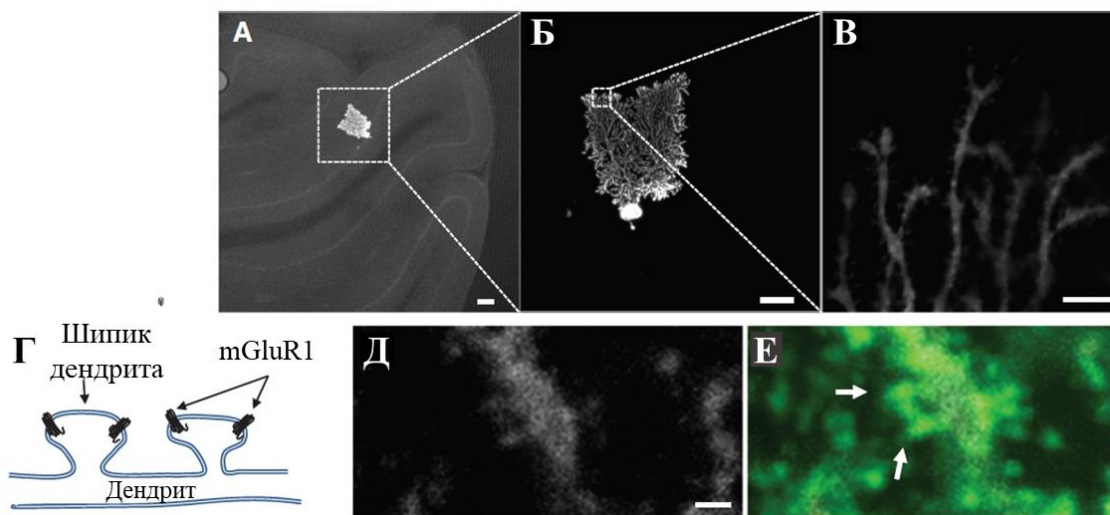


Рисунок 63. Внутриклеточное введение биоцитина с последующей флуоресцентной окраской КП. (А–В) Конфокальные изображения КП, меченные биоцитин-стрептавидином. Мерные шкалы: 100 μm , 50 μm , и 5 μm , соответственно. (Г) Схематическое изображение дистальных отделов дендрита. (Д, Е) Двойное иммуноокрашивание биоцитин/стрептавидином (Д) и анти-mGluR1 (Е). Видна чёткая локализация mGluR1 (белые стрелки). Мерная шкала: 1 μm (470).

Введение LVV MSCV-GFP в КП мозжечка вызывало небольшое снижение общей длины дендритов с $8932 \pm 701 \mu\text{m}$ до $7169 \pm 650 \mu\text{m}$ ($p < 0.05$). Влияние MSCV-polyQ-GFP было более выраженным – снижение общей длины дендритов наблюдалось до $5002 \pm 1426 \mu\text{m}$ ($p < 0.001$) (Рисунок 64А). Анализ Шоля дендритов КП (Рисунок 64Б) показал, что их длина ближе к периферии, начиная со 160 μm от тела клетки, была меньше в группе экспрессирующей LVV MSCV-GFP, чем у PBS инъецированных животных. Плотность дендритов также уменьшалась у данной группы животных начиная с 200 μm от тела клетки ($p < 0.05$). В группе, после введения MSCV-polyQ-GFP, данные явления были выражены более резко ($p < 0.001$) (Рисунок 64В и Г) (406).

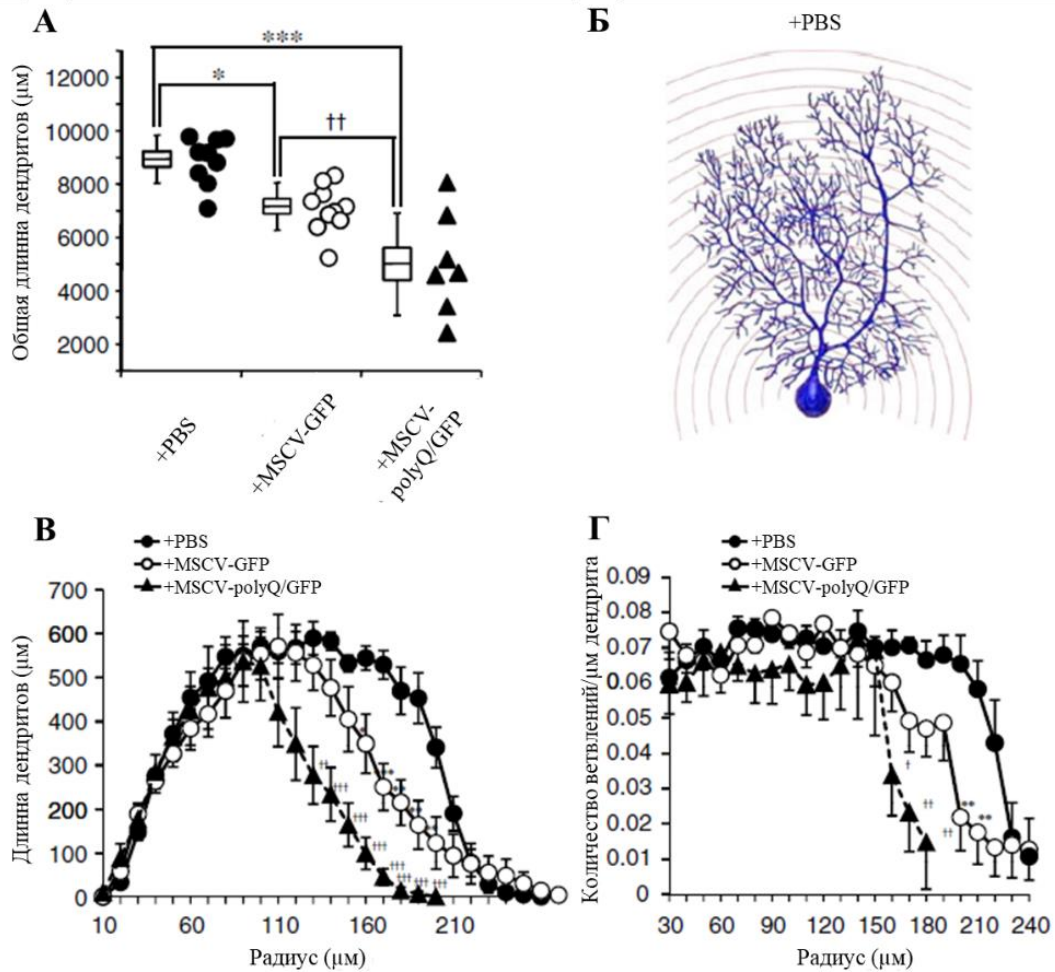


Рисунок 64. Анализ морфологии дендритов КП ложнооперированных животных и животных экспрессирующих LVV векторы. Трансгены экспрессировались под контролем MSCV промотора. (А) Общая длина дендритов КП КП после инъекции PBS (чёрные круги), КП экспрессирующих LVV MSCV-GFP (белые круги) и LVV MSCV-polyQ-GFP (чёрные треугольники). (Б) Схематично представлен анализ Шоля. Видны концентрически сходящиеся к телу клетки линии с промежутками в 10µм. Средние значения длины (В) и плотности (Г) дендритов КП после инъекции PBS (чёрные круги), КП экспрессирующих LVV MSCV-GFP (белые круги) и LVV MSCV-polyQ-GFP (чёрные треугольники). Звёздочки и крестики показывают статистически значимые различия животных экспрессирующих LVV MSCV-GFP и LVV MSCV-polyQ-GFP, соответственно, в сравнении с PBS инъекцированными животными: Апостериорный тест Тьюки после

однофакторного дисперсионного анализа, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, ††† $p < 0.001$ (406).

Данные патологические изменения при экспрессии LVV MSCV-GFP не связаны с явлениями воспаления и активацией микроглии, так как не было замечено значимых различий в экспрессии микроглиального маркера Iba1 (Рисунок 65А-Е) (406).

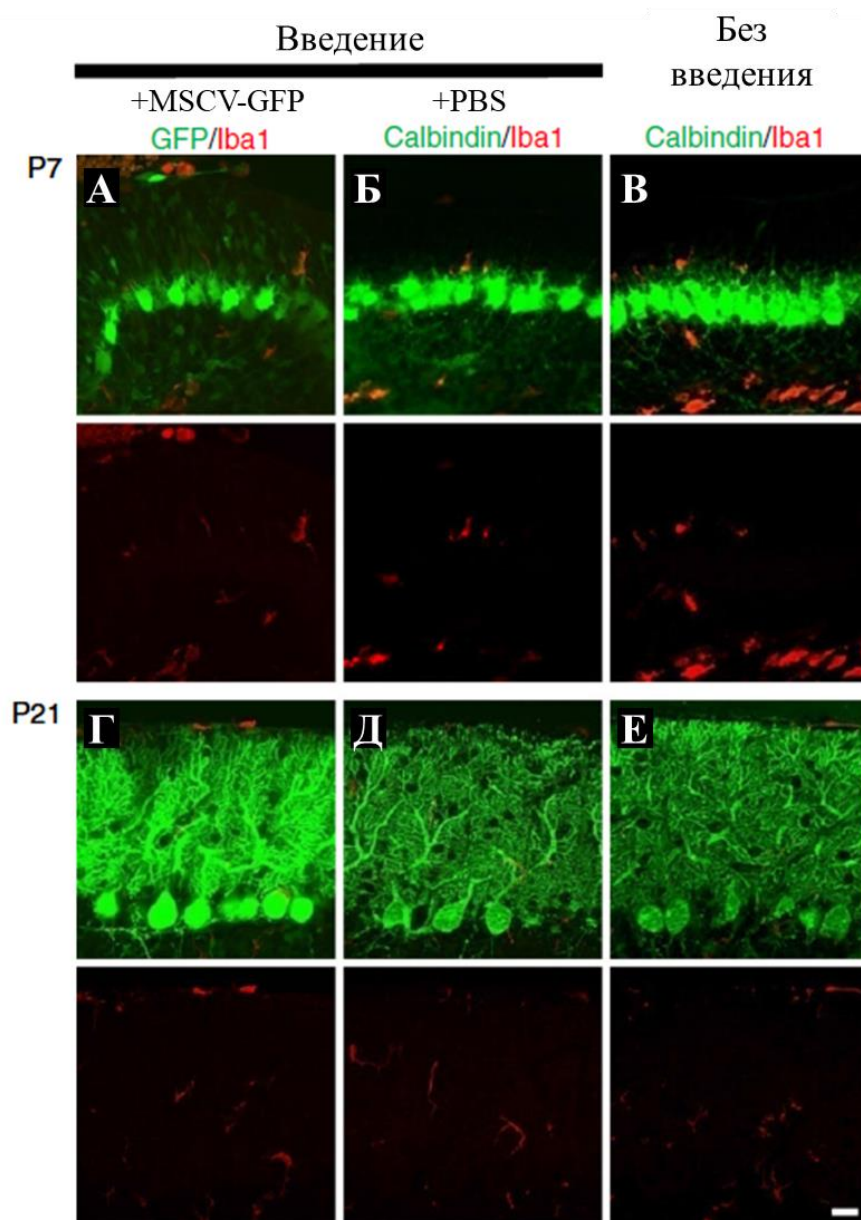


Рисунок 65. Введение лентивирусной конструкции и последующая экспрессия GFP не вызывает патологической реакции микроглии. Экспрессия GFP контролировалась MSCV промотором. Срезы мозжечка животных в возрасте P7 (А-В) и P21 (Г-Е). После введения в неонатальном периоде LVV MSCV-GFP (А, Г) и PBS (Б, Д), а также неоперированных животных (В, Е). Зелёное свечение показывает экспрессию GFP (А, Г) или иммунореактивность к кальбиндину (Б, В, Д, Е), красное свечение показывает иммунореактивность к Iba1. Верхние рисунки в каждой паре показывают наложение зелёного и красного цвета. Не было выявлено разницы в иммунореактивности Iba1 между GFP-экспрессирующими областями (А, Г) и областями контрольных групп (Б, Д) и (В, Е) животных. Мерная шкала 20µм (406).

Исследование КП с помощью метода локальной фиксации потенциала выявило функциональные отклонения, вызванные экспрессией LVV MSCV-GFP. Амплитуда ПВ-ВПСТ не имела значимого отличия в обеих исследуемых группах (Рисунок 66А). Высвобождение нейромедиатора из пресинаптических окончаний (ПВ и ЛВ) было исследовано при повторном однократном раздражении соответствующих волокон с разным интервалом времени и вычислении коэффициента парных импульсов (PPF и PPD, соответственно). PPF было увеличено у животных экспрессирующих MSCV-GFP и достигало максимума в интервале между импульсами в 10 мсек. Повышение наблюдалось с $2,7 \pm 0,0$ до $3,2 \pm 0,1$ ($p < 0.01$) в сравнении с PBS инъецированными животными (Рисунок 66Б). PPD было значительно уменьшено у животных экспрессирующих MSCV-GFP и достигало максимального различия в интервале между импульсами в 20 мсек. Снижение наблюдалось с $0,7 \pm 0,0$ до $0,6 \pm 0,0$ ($p < 0.001$) в сравнении с PBS инъецированными животными (Рисунок 66В) (406).

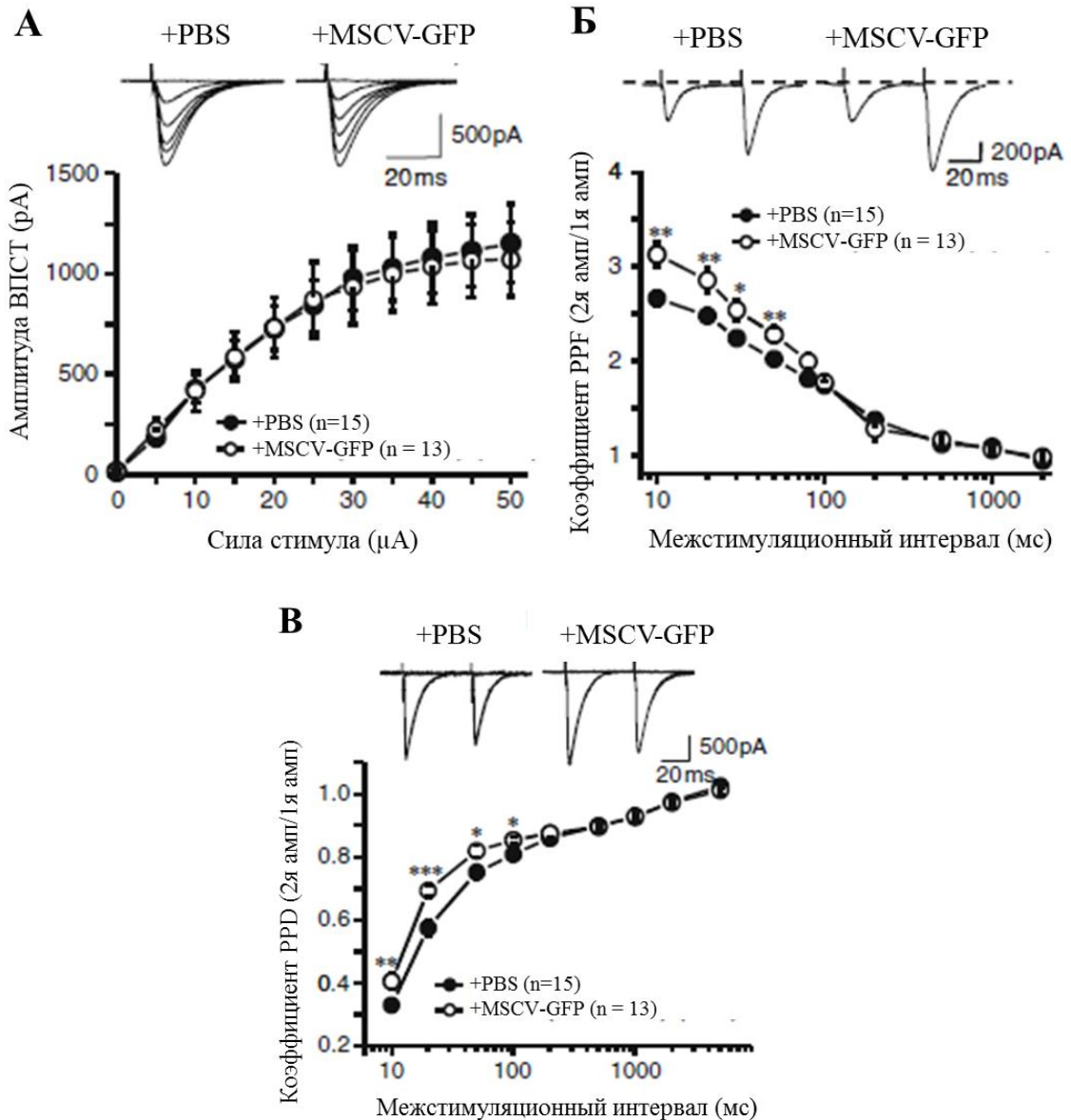


Рисунок 66. Нарушение кратковременной синаптической пластичности в КП, экспрессирующих GFP под контролем промотора MSCV. А График зависимости усреднённых амплитуд ВПСТ от силы стимуляции ПВ. В Увеличение PPF в КП, экспрессирующих LVV MSCV-GFP. С Уменьшение PPD в КП, экспрессирующих LVV MSV-GFP. Во вкладках показаны репрезентативные кривые ПВ-ВПСТ (А, В) и ЛВ-ВПСТ (С). Количество исследованных КП (n) показано на каждом графике. Тест Стьюдента, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (406).

Мы предположили, что данные морфологические и функциональные изменения КП, экспрессирующие LVV MSCV-GFP, могут быть вызваны токсическим эффектом от высокого титра вирусных векторов или постоянной экспрессией большого количества GFP. С этой целью мы создали LVV, экспрессирующий GFP, под контролем укороченного КП специфического промотора tr-L7 (tr-L7-GFP), который является более слабым в отношении экспрессии, чем MSCV промотор (415) и Рисунок 67А. В одних и тех же зонах коры мозжечка (Рисунок 67Б и В) мы не выявили значительного уменьшения общей длины дендритов КП (Рисунок 67Г), но средняя длина (Рисунок 67Д) и количество ветвлений дендритов КП (Рисунок 67Е) было статистически значимо меньше, чем у PBS инъецированных животных. Также в КП, экспрессирующие LVV tr-L7-GFP не было найдено функциональных нарушений (Рисунок 67Ж-И) (406).

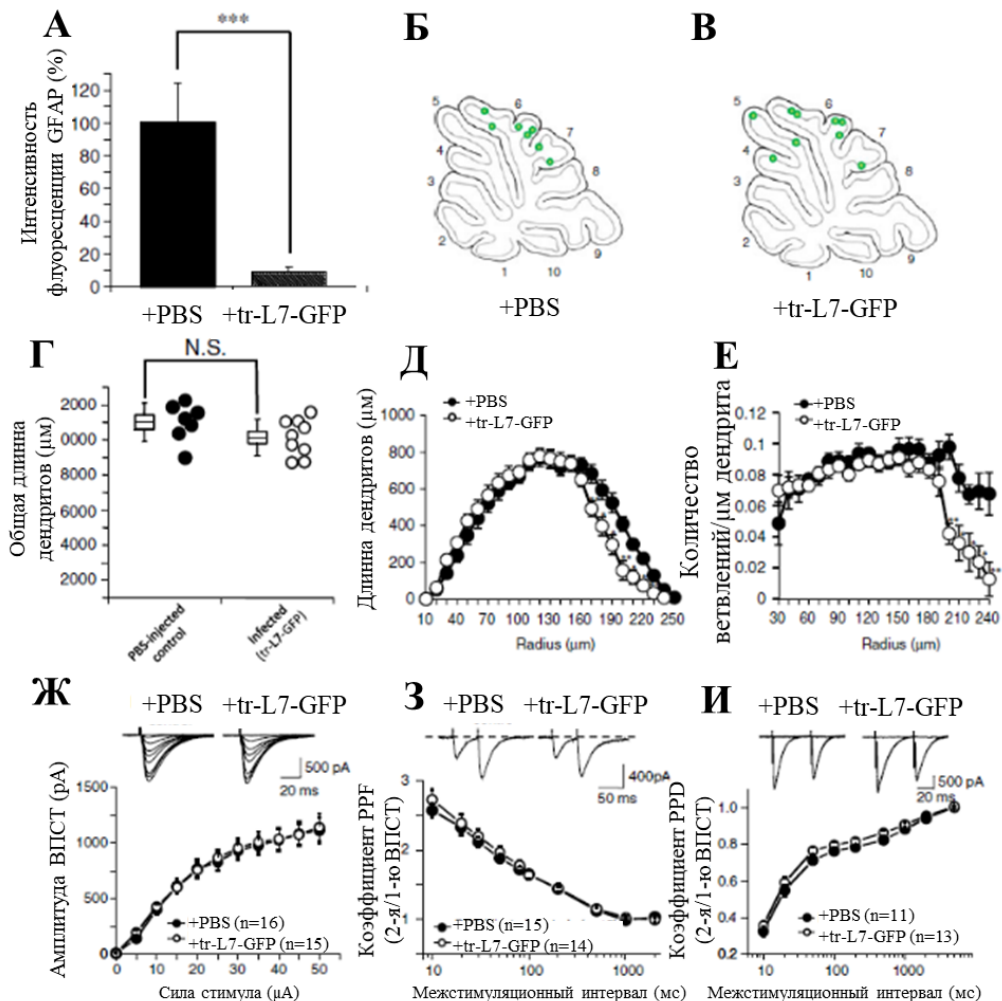


Рисунок 67. Отсутствие существенного влияния LVV L7-GFP экспрессирующего GFP под контролем менее активного промотора tr-L7 на функции. А Интенсивность флуоресценции GFP нормированной к уровню флуоресценции, вызванной экспрессией MSCV-GFP. Б, В Расположение КП, использованных для внутриклеточной окраски с помощью Lucifer Yellow и последующего морфологического анализа. КП от PBS инъецированных животных (Б) и экспрессирующих tr-LVV L7-GFP (В). Г Общая длина дендритов КП от PBS инъецированных животных и экспрессирующих tr-LVV L7-GFP. Не было найдено статистически значимой разницы между двумя исследуемыми группами. Д, Е Средние значения, полученные с помощью анализа Шоля для PBS инъецированных КП (чёрные круги) и КП, экспрессирующие LVV tr-L7-GFP (белые круги). Длина дендритов (Д) и плотность их ветвлений (количество точек ветвления на микрометр длины дендрита) (Е). Ж График зависимости усреднённых амплитуд ВПСТ от силы стимуляции ПВ контрольных животных и экспрессирующих LVV tr-L7-GFP. (З) PPF и (И) PPD в КП, экспрессирующие LVV tr-L7-GFP статистически не отличались от таковых у животных инъецированных PBS. Во вкладках показаны репрезентативные кривые ПВ-ВПСТ (Ж, З) и ЛВ-ВПСТ (И). Количество исследованных КП (n) показано на каждом графике. Тест Стьюдента, N.S. нет статистической значимости, *p < 0.05, **p < 0.01 (406).

3.2.2. Векторная экспрессия mGluR1 в КП

Для достижения высокой экспрессии генетической конструкции без нарушения морфологии КП, возможно введение LVV векторов не новорожденным животным, а после формирования нейронных связей в мозжечке (P21 и позже). Данный подход позволяет не только избежать нежелательных морфологических изменений, но и укладывается в логику лечения СЦА, которые начинаются на 3-4 десятилетиях жизни. LVV является

идеальным вектором для долгосрочной экспрессии генетических конструкций. Однако существуют и другие векторы, которые обеспечивают стабильную экспрессию, такие как AAV. Серотип AAV9 способен проникать из венозной крови через ГЭБ, что представляет интерес для системной доставки генетических конструкций. В наших работах мы сравнили работу LVV и AAV9, несущих одну и ту же генетическую последовательность, кодирующую белок mGluR1.

Выявленные выше нарушения mGluR пути передачи сигналов можно объяснить влиянием атаксина 1 на фактор транскрипции ROR α , который управляет экспрессией гена GRM1, кодирующего mGluR1. Также он активирует экспрессию ряда генов таких, как PCP2 и CALB, которые играют доминирующую роль в развитии КП (471), (472). У СЦА1 модельных мышей мутантный атаксин 1 истощает ROR α , что приводит к уменьшению экспрессии этих генов (7). В качестве модели были использованы трансгенные B05 СЦА1 животные (268).

Учитывая наш предыдущий опыт, мы вводили генетические конструкции в кору мозжечка взрослым 5-недельным животным. Также модификацией вектора стало разделение синтезируемого таргетного белка и флуоресцентной метки посредством P2A вставки. Однако экспрессия mGluR1-GFP под контролем неселективного высокоактивного CMV промотора приводила к уменьшению объёма не только КП СЦА1 B05 модельных мышей (Рисунок 68А-В и Д), но и КП дикого типа (Рисунок 68Г). Уменьшение происходило за счёт ретракции дендритов (Cm2), тогда как размер тела клетки (Cm1) значительно не отличался от PBS инъецированных животных. Так ёмкость Cm2 в КП дикого типа у данных животных составила $548,5 \pm 27,8$ pF и $360,6 \pm 37,1$ pF соответственно ($p < 0.01$). Ёмкость Cm2 в КП СЦА1 B05 животных составила $369,4 \pm 40,3$ pF и $235,1 \pm 35,2$ pF, соответственно ($p > 0.05$). Экспрессия mGluR1-GFP под контролем L7 промотора приводила к более выраженным изменениям в КП модельных

СЦА1 В05 мышей также за счёт уменьшения дендритов. Ёмкость Cm2 в данных КП составила $176,5 \pm 35,6$ pF относительно контрольной группы ($p < 0.01$) (Рисунок 68Д) (473).

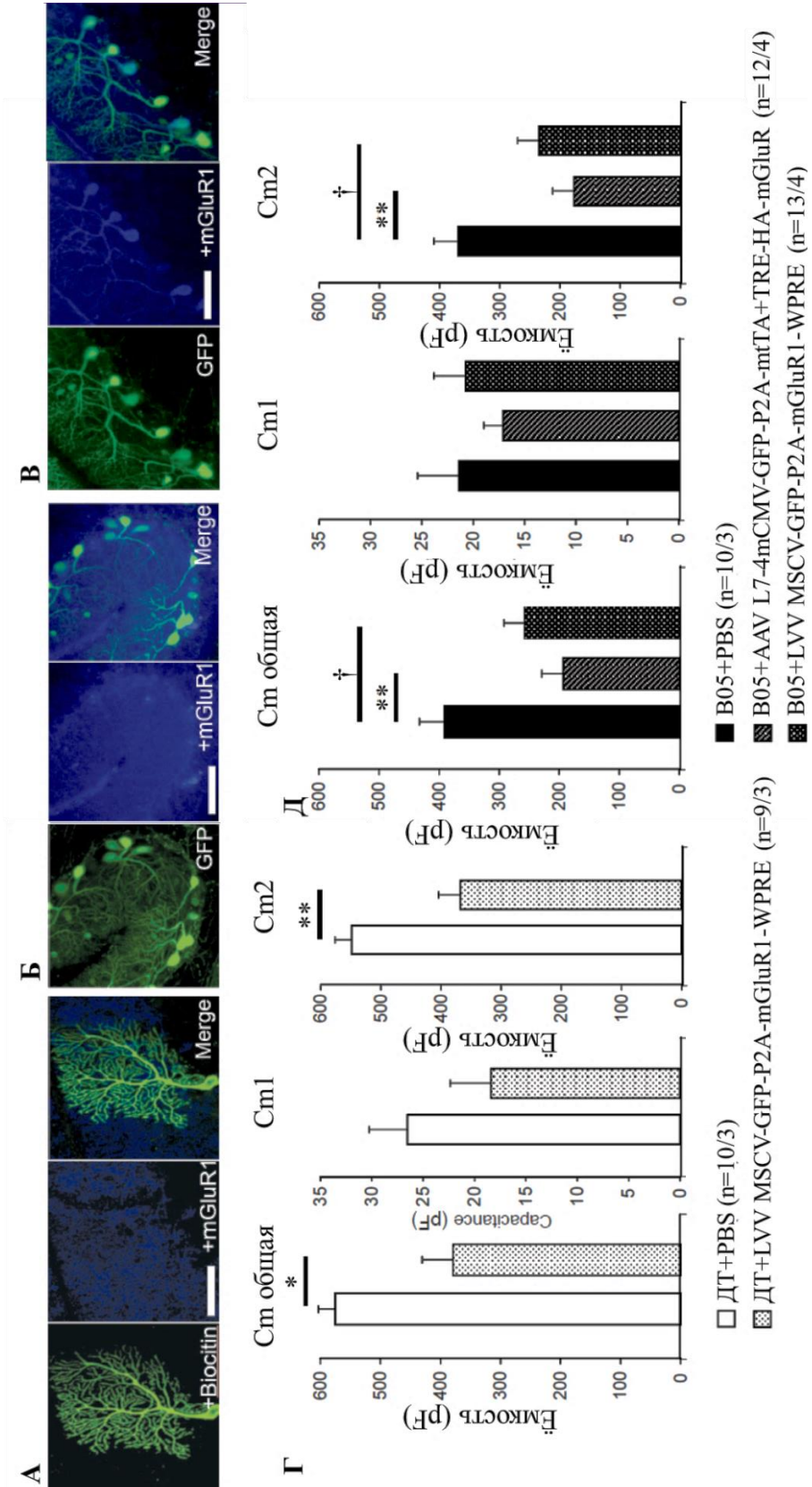


Рисунок 68. Уменьшение размера КП экспрессирующих экзогенные mGluR1 и GFP. (А–В) GFP флуоресцентные изображения СЦА1 нативных КП, окрашенных биоцитином (А), КП, экспрессирующие AAV L7-4mCMV-GFP-P2A-mtTA+TRE-NA-mGluR1 (Б) и LVV MSCV-GFP-P2A-mGluR1-WPRE (В). Все срезы были окрашены с помощью анти-mGluR1 антител. Наложение флуоресцентных сигналов показано в крайнем изображении справа каждой группы; мерная шкала 50 μm . (Г), (Д) Гистограммы показывают средние значения ёмкости мембраны КП животных дикого типа (Г) и СЦА1 трансгенных мышей (Д), которым вводился PBS и AAV или LVV векторные конструкции. Количество исследованных клеток и животных показано в скобках. Звёздочки и кресты показывают статистически значимые отличия в сравнении с контрольной группой, выявленные с помощью однофакторного дисперсионного анализа после апостериорного теста Тьюки; * и † $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (473).

Несмотря на нарушение морфологии КП дикого типа, влияния на их электрофизиологические свойства в присутствии векторных конструкций не было замечено ($p > 0.05$) (Рисунок 69А, В). В группе СЦА1 В05 животных наблюдалось частичное восстановление амплитуды ПВ ВПСТ, но только при экспрессии mGluR1 под контролем L7 промотора. Максимальная амплитуда ПВ ВПСТ составила $752,9 \pm 82,9$ pA и $908,0 \pm 83,8$ pA, соответственно ($p < 0.05$) (Рисунок 69Б). При исследовании PPF у данных животных статистически значимых различий найдено не было (Рисунок 69Г). При исследовании PPD, в интервале наложения стимулов в 50 мсек, также было найдено положительное влияние при экспрессии mGluR1 под контролем L7 промотора. Данный коэффициент составил $0,7 \pm 0,1$ и $0,8 \pm 0,0$, соответственно ($p < 0.05$) (Рисунок 69Д) (473).

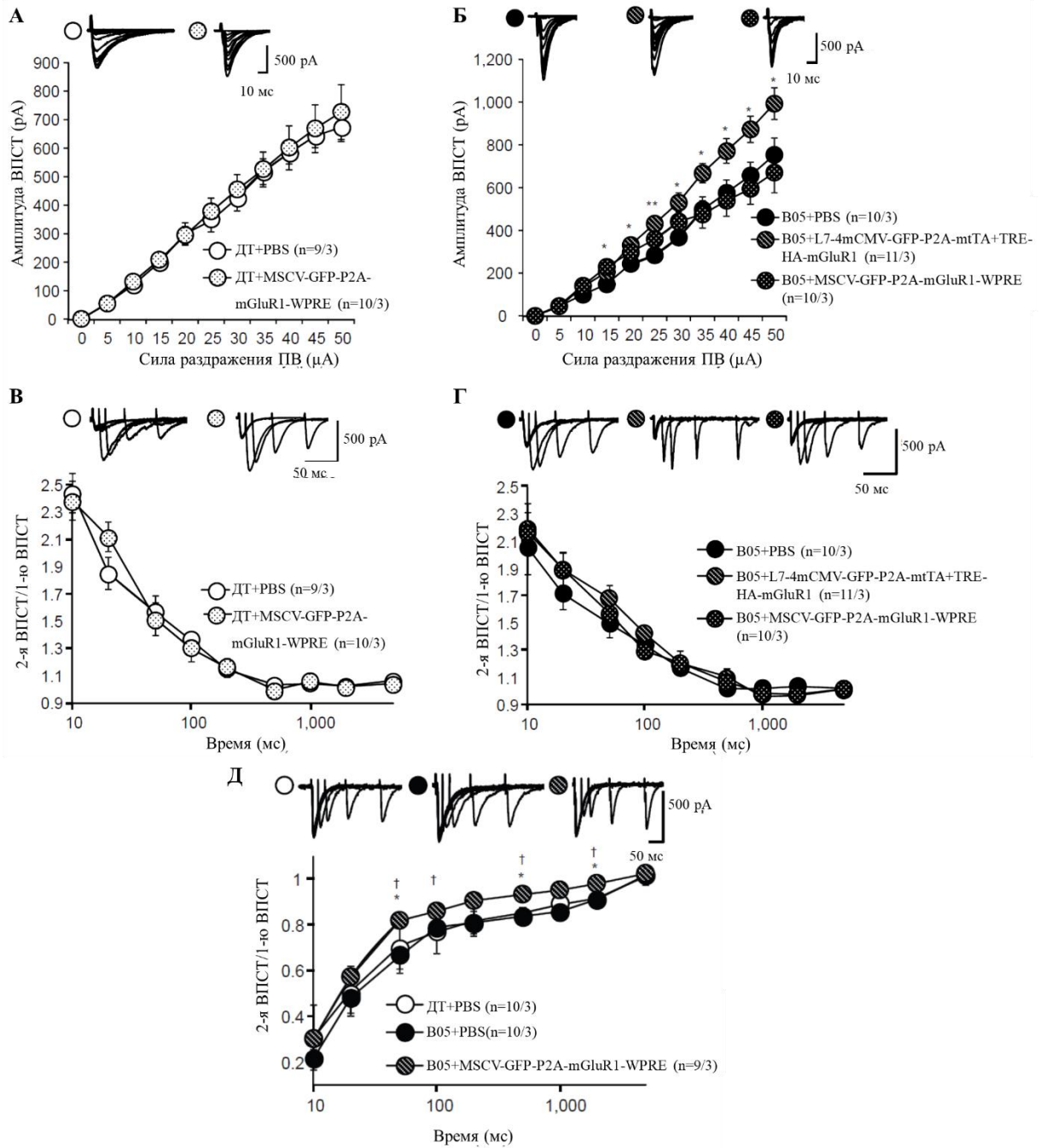


Рисунок 69. Влияние векторной экспрессии mGluR1 на возбуждающую синаптическую передачу и кратковременную синаптическую пластичность в КП СЦА1 В05 трансгенных мышей. (А), (Б) График зависимости усреднённых амплитуд ВПСТ от силы стимуляции ПВ дикого типа (А) и СЦА1 В05 трансгенных животных (Б) экспрессирующих векторную mGluR1. (В), (Г) Усиление парных импульсов ПВ ВПСТ (PPF) у животных дикого типа (В) и СЦА1 В05 трансгенных животных (Г). (Д) Уменьшение парных

импульсов ЛВ ВПСТ у СЦА1 В05 трансгенных животных. Вкладки показывают репрезентативные кривые ПВ ВПСТ (А-Г) и ЛВ ВПСТ (Д). Количество (n) исследованных КП и животных (КП/животные) показано на каждом графике в скобках. Звёздочки и кресты показывают статистически значимые отличия в сравнении с контрольной группой, выявленные с помощью однофакторного дисперсионного анализа после апостериорного теста Тьюки; * и † $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (473).

Активация mGluR1 в КП косвенно вызывает открытие неселективных каналов с транзиторным рецепторным потенциалом 3 типа (TRPC3) (432), которые можно зарегистрировать с помощью электрофизиологических методов как медленные ВПСТ. Таким образом, зависимость функции TRPC3 каналов от mGluR1 сигнального пути может довольно точно показать степень возмещения данного белка при экспрессии его с помощью вирусных векторов. Мы записывали медленные ВПСТ после тетанус-стимуляции ПВ (10 или 25 импульсами с частотой 200 Гц) в присутствии блокатора AMPA рецепторов NBQX (20 μM) (373). У животных дикого типа экспрессия эндогенного mGluR1 была на высоком уровне. По этой причине, добавление экзогенного mGluR с помощью вирусных векторов не приводило к значительному увеличению амплитуды при стимуляции ПВ 10 и 25 импульсами (Рисунок 70А и В). В противовес этому, восстановление mGluR1 зависимых медленных ВПСТ было более выражено в КП СЦА1 В05 трансгенных животных. После стимуляции ПВ 10 импульсами амплитуда медленных ВПСТ составила 39.9 ± 8.6 pA у PBS инъецированных животных, 153.2 ± 44.0 pA у животных экспрессирующих L7-4mCMV-GFP-P2A-mtTA+TRE-NA-mGluR1 и 133.8 ± 55.5 pA у животных экспрессирующих MSCV-GFP-P2A-mGluR1-WPRE ($p < 0.05$) (Рисунок 70Б). Увеличение раздражения ПВ до 25 импульсов приводило к ещё большему увеличению амплитуды медленных ВПСТ. У PBS инъецированных животных она

составила 77.5 ± 18.5 pA, $n=11$, у животных экспрессирующих L7-4mCMV-GFP-P2A-mtTA+TRE-HA-mGluR1, 256.0 ± 71.5 pA и у животных, экспрессирующих MSCV-GFP-P2A-mGluR1-WPRE, 292.9 ± 106.2 pA ($p < 0.05$) (Рисунок 70Г). Эти данные показывают, что увеличение патологически низкого уровня mGluR1 с помощью векторной трансгенной экспрессии в трансгенных животных приводит к улучшению соответствующих путей передачи сигналов и активации, связанных с ними каналов таких, как TRPC3 (473).

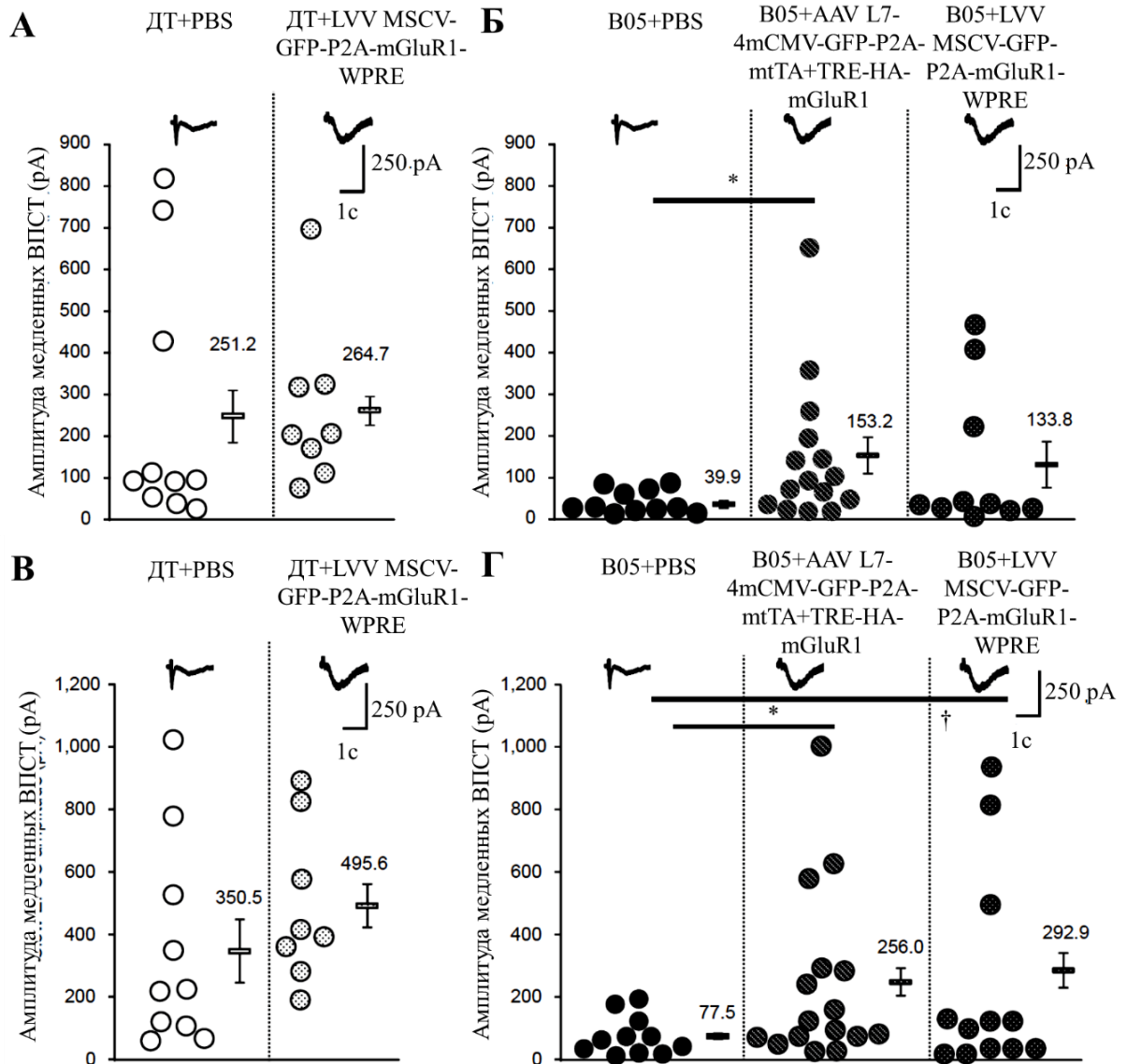


Рисунок 70. Восстановление mGluR1-опосредованных медленных ВПСТ в КП СЦА1 трансгенных животных с помощью вирусных векторных конструкций. Стимуляционные артефакты частично удалены. Репрезентативные кривые показаны во вкладках сверху каждого графика. (А), (Б) Графики показывают средние амплитуды и амплитуду каждого медленного ВПСТ в КП дикого типа (А) и СЦА1 B05 трансгенных мышей (Б) при раздражении ПВ 10 стимулами. (В), (Г) Графики показывают средние амплитуды и амплитуду каждого медленного ВПСТ в КП дикого типа (В) и СЦА1 B05 трансгенных мышей (Г) при раздражении ПВ 25 стимулами. Звёздочки и кресты показывают статистически значимые отличия в сравнении с контрольной группой, выявленные с помощью однофакторного дисперсионного анализа после апостериорного теста Тьюки; * и † $p < 0.05$ (473).

Синаптическая активация mGluR1 вызывает повышение внутриклеточного Ca^{2+} и локальное высвобождение эндоканнабиноидов из КП. Эти эндоканнабиноиды действуют на каннабиноидные рецепторы CB1 на ПВ, что приводит к подавлению высвобождения глутамата из их пресинаптических терминалей в течение десятков мс (439), (474). Мы исследовали этот тип кратковременной синаптической пластичности, называемый SSE, регистрируя AMPA рецептор-опосредованные быстрые ПВ ВПСТ после тетанус-раздражения ПВ (305). SSE в КП дикого типа, инъецированных PBS и MSCV-GFP-P2A-mGluR1-WPRE не отличались между собой (Рисунок 71А), тогда как в КП СЦА1 B05 трансгенных модельных мышей SSE значительно восстанавливалось после AAV и LVV-опосредованной экспрессии mGluR1. (Рисунок 71Б). Для исключения возможности высвобождения эндоканнабиноидов другим путём во время активации SSE, мы исследовали mGluR-независимую эндоканнабиноид-опосредованную пластичность, или DSE. DSE, вызывается высвобождением

эндоканнабиноидов из КП посредством деполяризации и повышением концентрации внутриклеточного Ca^{2+} , и не захватывает mGluR1 путь передачи сигналов (470), (455). DSE наблюдалась и не отличалась во всех исследуемых группах, как у животных дикого типа, так и в СЦА1 В05 трансгенных модельных животных (Рисунок 71В и Г). Эти данные показывают, что сверхэкспрессия экзогенного mGluR1 белка частично восстанавливает нормальное высвобождение эндоканнабиноидов и SSE (473).

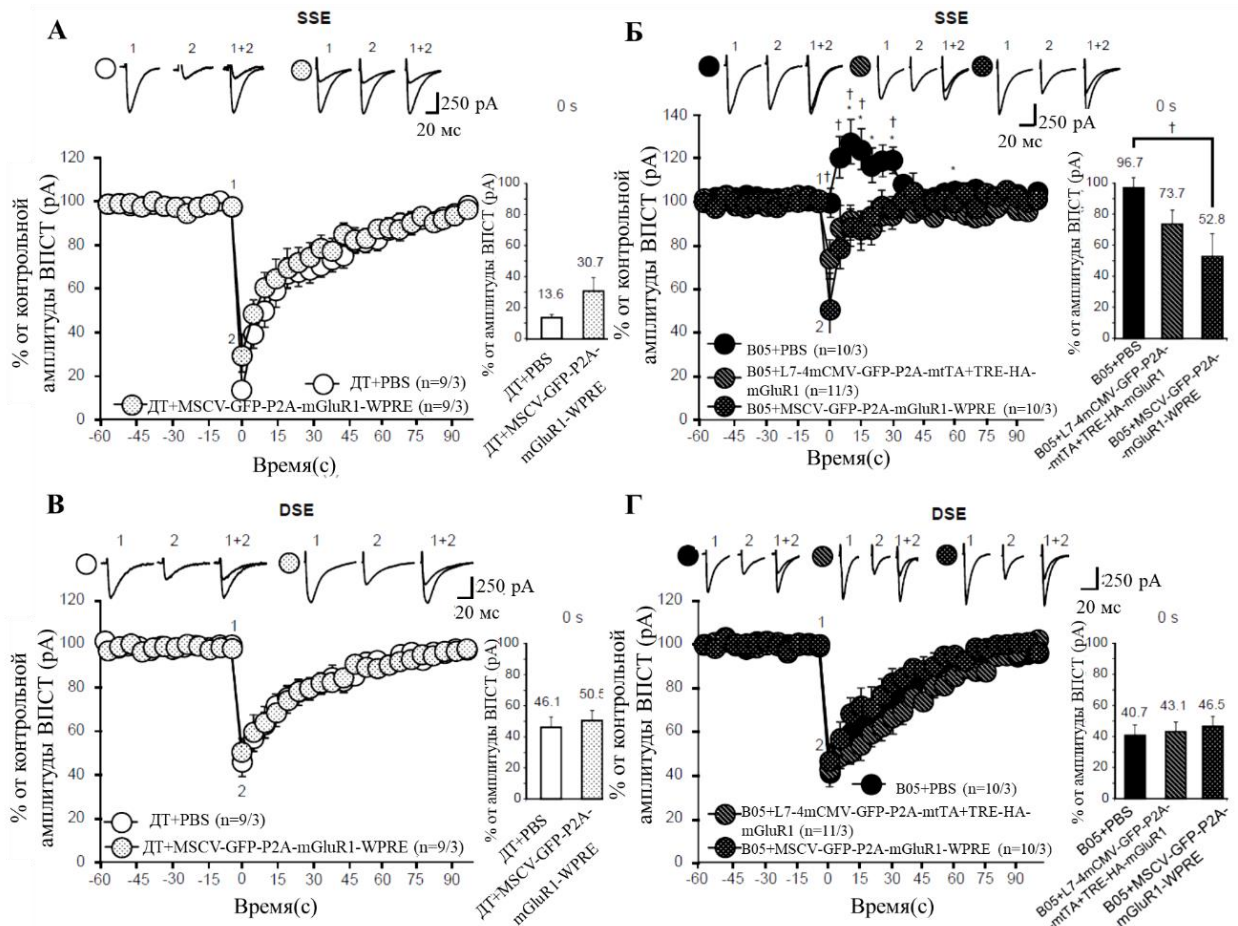


Рисунок 71. Восстановление SSE у СЦА1 В05 трансгенных животных после экспрессии экзогенного mGluR1 с помощью AAV и LVV. Амплитуды ПВ ВПСТ были приблизительно 400 pF до индукции of SSE или DSE. SSE вызывалось тетанус стимуляцией ПВ (50 импульсов с частотой 100 Гц), тогда

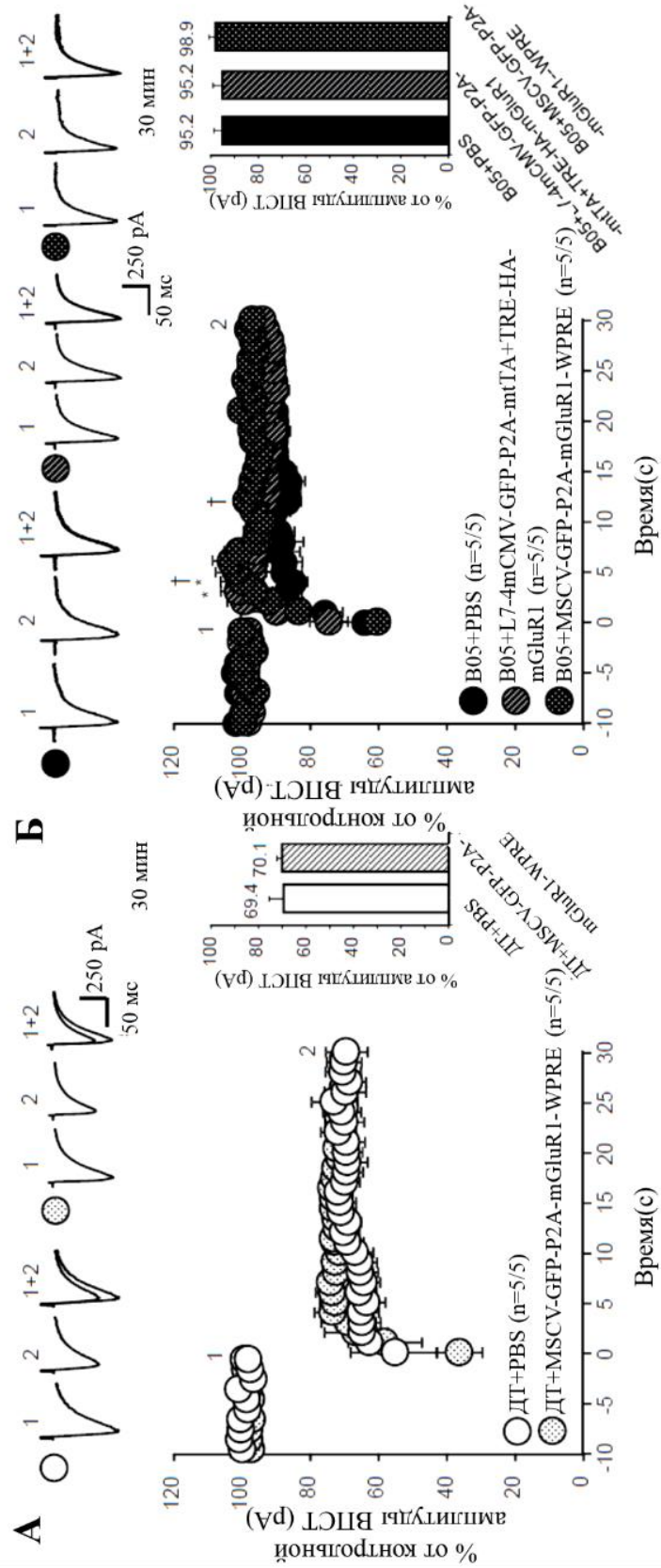
как DSE вызывалось деполяризацией мембраны КП с -70 до 0 мВ в течение 5 сек. (А), (Б) Динамика изменения амплитуд ПВ ВПСТ до и после тетанус стимуляции ПВ животных дикого типа (А) и СЦА1 В05 трансгенных животных (Б) без и после генотерапии AAV или LVV. Графики справа показывают амплитуду ПВ ВПСТ непосредственно после тетанус-стимуляции, нормированные к контрольным показателям ПВ ВПСТ. (В), (Г) Динамика изменения амплитуд ПВ ВПСТ до и после деполяризации КП животных дикого типа (В) и СЦА1 В05 трансгенных животных (Г) без и после генной терапии AAV или LVV. Графики справа показывают амплитуду ПВ ВПСТ непосредственно после деполяризации, нормированные к контрольным показателям ПВ ВПСТ. Во вкладках представлены репрезентативные кривые последних контрольных ПВ ВПСТ перед наложением стимула (временная точка 1) и сразу после раздражения (временная точка 2). Количество (n) исследованных КП и животных (КП/животные) показано на каждом графике в скобках. Звёздочки и кресты показывают статистически значимые отличия в сравнении с контрольной группой СЦА1 В05 трансгенных модельных животных, выявленные с помощью однофакторного дисперсионного анализа после апостериорного теста Тьюки, * и † $p < 0.05$ (473).

Другой вид синаптической пластичности, долговременная депрессия (LTD) быстрых ПВ ВПСТ протекает при активации mGluR1 сигнального пути в КП (439), (440). Поэтому мы исследовали LTD в КП у животных, экспрессирующих экзогенный mGluR1 белок с помощью AAV и LVV. LTD вызывалась и не отличалась в КП животных дикого типа инъецированных PBS и LVV MSCV-GFP-P2A-mGluR1-WPRE (Рисунок 72А). Во всех группах СЦА1 В05 трансгенных животных LTD было нарушено. Через 30 минут после стимуляции нормированный уровень ПВ ВПСТ к достимуляционным значениям составил $95.2 \pm 3.2\%$, у PBS инъецированных животных;

95.2±3.8%, у животных инъецированных AVV L7-4mCMV-GFP-P2A-mtTA+TRE-NA-mGluR1 и 98.9±2.6%, у животных инъецированных LVV MSCV-GFP-P2A-mGluR1-WPRE. Статистически значимых различий обнаружено не было (Рисунок 72Б). Однако в течение первых 15 минут после индукции LTD динамика амплитуд ПВ ВПСТ в КП СЦА1 В05 трансгенных животных экспрессирующих экзогенный mGluR1 белок, была отлична от таковой у животных после введения PBS. Мы нашли очень быстрое возвращение амплитуды ПВ ВПСТ до контрольных значений уже на 4-й минуте в КП, экспрессирующих AVV L7-4mCMV-GFP-P2AmtTA+TRE-NA-mGluR1 и на 5-й минуте в КП экспрессирующих LVV MSCV-GFP-P2A-mGluR1-WPRE. На 5-й минуте этот параметр составил 87.6±5.3%; 97.8±2.0% и 102.9±6.1%, соответственно ($p < 0.05$) (Рисунок 72Б). Эти данные показывают, что одна только экспрессия экзогенного mGluR1 белка недостаточна для развития такого сложного процесса, как LTD (473).

Рисунок 72. Ослабление LTD в КП СЦА1 В05 трансгенных животных после экспрессии экзогенного mGluR1 с помощью AAV и LVV. Сочетанная стимуляция ПВ (1 Гц, 30 сек) с деполяризацией мембраны КП с -70 до +30 мВ была применена во временной точке «0». (А) Динамика изменения амплитуд ПВ ВПСТ до и после сочетанной стимуляции в КП дикого типа после введения PBS и LVV MSCV-GFP-P2A-mGluR1-WPRE. График справа показывает амплитуду ПВ ВПСТ, нормированной к контрольным показателям, через 30 мин после сочетанной стимуляции. (Б) Динамика изменения амплитуд ПВ ВПСТ до и после сочетанной стимуляции в КП СЦА1 В0% трансгенных животных после введения PBS, AVV L7-4mCMV-GFP-P2AmtTA+TRE-NA-mGluR1 и LVV MSCV-GFP-P2A-mGluR1-WPRE. График справа показывает амплитуду ПВ ВПСТ, нормированной к контрольным показателям, через 30 мин после сочетанной стимуляции. Во вкладках представлены репрезентативные кривые последних контрольных

ПВ ВПСТ перед сочетанной стимуляцией (временная точка 1) и через 30 минут после неё (временная точка 2) (473).



Количество (n) исследованных КП и животных (КП/животные) показано на каждом графике в скобках. Звёздочки и кресты показывают статистически значимые отличия в сравнении с контрольной группой животных дикого типа, выявленные с помощью критерия Стьюдента для двух независимых выборок и в сравнении с СЦА1 В05 трансгенных модельных животных, выявленные с помощью однофакторного дисперсионного анализа после апостериорного теста Тьюки, * и † $p < 0.05$.

Суммарный негативный эффект, найденный нами в КП, обуславливал нарушение координации не только у СЦА1 В05 трансгенных мышей, но и у животных дикого типа. Животные были протестированы на вращающейся беговой дорожке «Rota rod». Мыши дикого типа после введения в кору мозжечка PBS и AVV L7-4mCMV-GFP-P2AmtTA+TRE-NA-mGluR1 не показывали признаков атаксии, тогда как после введения LVV MSCV-GFP-P2A-mGluR1-WPRE у данных животных наблюдалось ухудшение с 3 дня тренировки ($p < 0.01$) (Рисунок 73А). В группе СЦА1 В05 трансгенных животных негативный эффект от введения лентивирусной конструкции был более выражен и также регистрировался с 3 дня тренировок ($p < 0.05$ на 3-й день и $p < 0.01$ на 4-й день) (Рисунок 73Б). Эти результаты показывают выраженное негативное влияние генетических конструкций на животных дикого типа и СЦА1 В05 трансгенных животных (473).

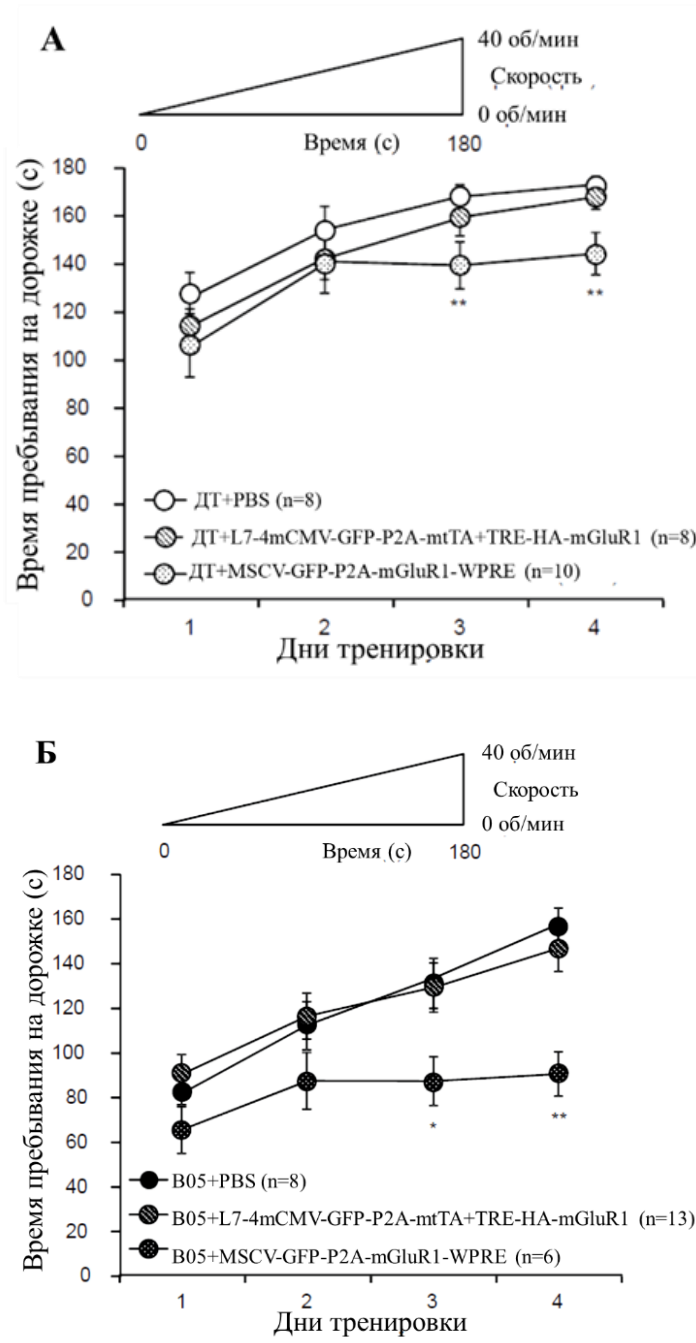


Рисунок 73. Ухудшение двигательной активности животных дикого типа и СЦА1 B05 трансгенных животных после экспрессии экзогенного mGluR1 с помощью AAV и LVV. В верхних вкладках показан протокол исследования – происходило нарастание вращения скорости дорожки с 0 до 40 об/мин в течение 3 мин. Животных тренировали в течение 4 дней по 4 подхода в день. (А) Нарушение координации у животных дикого типа наблюдалось после введения LVV MSCV-GFP-P2A-mGluR1-WPRE, но не AAV L7-4mCMV-GFP-P2AmtTA+TRE-HA-mGluR1. (Б) Такой же эффект наблюдался у СЦА1 B05

трансгенных животных. Количество (n) исследованных КП и животных (КП/животные) показано на каждом графике в скобках. Звёздочки и кресты показывают статистически значимые отличия в сравнении с соответствующей контрольной группой после введения PBS, выявленные с помощью однофакторного дисперсионного анализа после апостериорного теста Тьюки, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (473).

Мы пришли к выводу, что увеличение mGluR1 сигнализации таким способом приводит только к ограниченным положительным и выраженным негативным эффектам, таким как нарушение координации, недоразвитие КП и нарушение долговременной пластичности в КП СЦА1 В05 трансгенных животных.

Эти результаты показывают, что LVV с сильным промотором может влиять на развитие нейронов в силу сверхэкспрессии некоторых трансгенных белков. Поэтому нужно быть осторожным с выбором системы экспрессии конкретного трансгена.

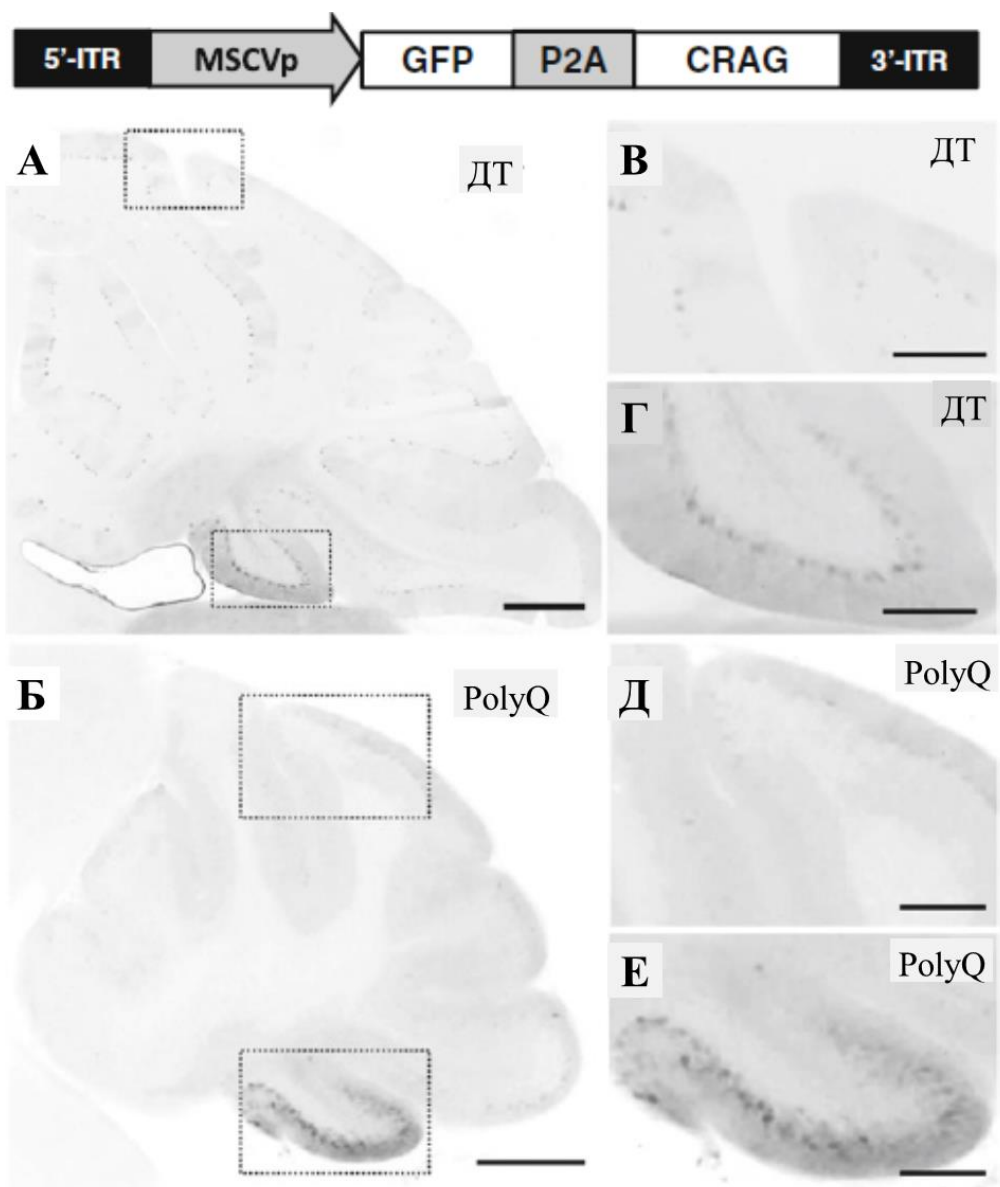
3.2.3. Клиренс мутантных полиглутаминовых белков с помощью LVV конструкций

Учитывая этот опыт, мы использовали генотерапию для влияния на другое звено патогенеза – усиление деградации и клиренса патологического полиглутаминового мутантного белка. Для этого был создан AAV MSCV-GFP-P2A-CRAG экспрессирующий CRAG (collapsin response mediator protein-associated molecule associated guanosine triphosphatase), молекулу, которая усиливает деградацию белков через убиквитин протеасомный путь (396). В этой конструкции был использован AAV 9 типа, который проникает через ГЭБ. Это позволило вводить данную конструкцию в вену новорожденным мышатам и доставлять её в головной мозг.

Мы использовали универсальную модель полиглутаминовых атаксий и трансгенную СЦА1 модель для коррекции общих нарушений mGluR1 сигнализации.

Для подтверждения того, что морфологические и электрофизиологические нарушения PolyQ трансгенных мышей вызываются отложением мутантного полиглутаминового белка, а не специфическими геномными нарушениями, мы попытались уменьшить количество этого мутантного белка в ядрах КП с помощью экспрессии AAV9 вектора, несущего CRAG. AAV9 экспрессировал CRAG вместе с GFP в виде отдельных белков (Рисунок 74 верхняя часть) и вводился животным в возрасте P1 или P2 через яремную вену. Экспрессия данной конструкции в мозжечке исследовалась через 14 недель после введения. GFP диффузно экспрессировался во всех долях мозжечка животных дикого типа с наибольшей экспрессией в доле X (Рисунок 74А, В, Г). Интересен тот факт, что экспрессия была ограничена КП, так как управлялась MSCV промотором (415). В противовес этому, только следы экспрессии GFP наблюдались в большинстве долей мозжечка PolyQ трансгенных животных, за исключением доли X, где GFP экспрессия была выраженной (Рисунок 74Б, Д, Е) (432).

Рисунок 74. Экспрессия GFP и CRAG с помощью AAV9. Срезы мозжечка были иммуноокрашены анти-GFP. А, Б Срезы мозжечка от животных дикого типа (А) и PolyQ трансгенных животных (Б) после введения AAV9. В–Е Увеличенные изображения областей, ограниченных пунктирной линией А (В, Г) и Б (Д, Е). Мерная шкала, 500 μ м (А, Б); 200 μ м (В–Е) (432).



Ранее было показано, что мутантный атаксин 1 с удлинённой полиглутаминовой цепочкой подавляет транскрипцию сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) и вызывает уменьшение плотности и длины микрососудов мозжечка (475). Поэтому, возможной причиной пониженной экспрессии нашей генетической конструкции в большинстве долей мозжечка PolyQ трансгенных животных может быть плохая васкуляризация. Для доказательства этой гипотезы, уровень экспрессии VEGF мРНК и белка были исследованы с помощью RT-ПЦР и вестерн блоттинга. Результаты показали, что уровень VEGF был значительно

уменьшен в мозжечке PolyQ трансгенных животных в сравнении с животными дикого типа (Рисунок 75). Эти данные подтверждают плохую васкуляризацию мозжечка PolyQ трансгенных животных (432).

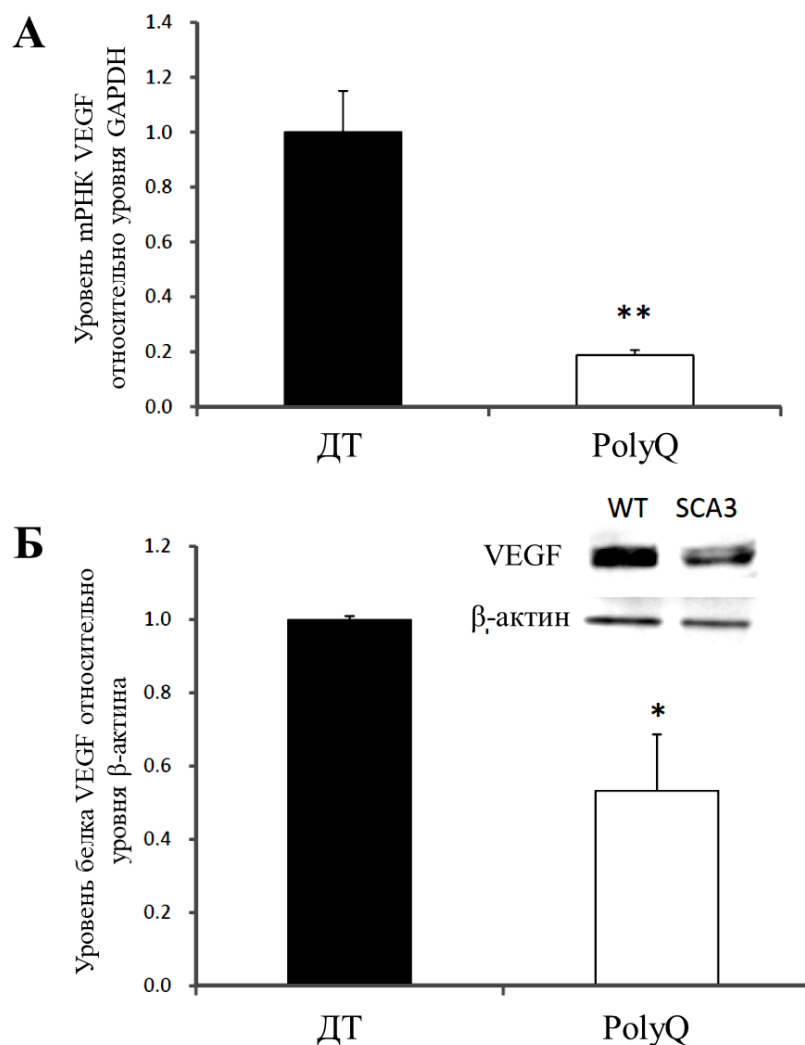


Рисунок 75. Относительный уровень экспрессии VEGF, измеренный с помощью количественного RT-ПЦР (А) и вестерн блоттинга (Б) у мышей дикого типа (ДТ) и PolyQ трансгенных мышей (n=3). Количество VEGF мРНК и белка нормировались к уровню GAPDH и β-актина, соответственно. Звёздочки показывают статистически значимые отличия в сравнении с контрольной группой животных дикого типа, выявленные с помощью

критерия Стьюдента для двух независимых выборок, * $p < 0.05$ и ** $p < 0.01$ (432).

Далее мы исследовали способность CRAG удалять агрегаты патологического полиглутаминового белка. Агрегаты визуализировались с помощью иммуномечения HA в срезах мозжечка PolyQ трансгенных мышей (405). Агрегаты были найдены в большинстве КП мозжечка PolyQ трансгенных мышей не получавших генетические конструкции (Рисунок 76А, нижняя часть). Резко от этой картины отличались микрофотографии X доли мозжечка PolyQ трансгенных мышей, экспрессирующих AAV MSCV-GFP-P2A-CRAG (Рисунок 76А, верхняя часть). В других зонах удаления агрегатов замечено не было. Мы количественно оценили CRAG-опосредованную элиминацию агрегатов сравнивая зоны долей X и IX у инъецированных AAV и неинъецированных животных. Результаты показали значительное уменьшение количества и размеров агрегатов у животных экспрессирующих CRAG в доле X в сравнении с неэкспрессирующей зоной IX (Рисунок 76Б). Более того, CRAG-экспрессирующие КП организовывались в обычный монослой (стрелки на Рисунок 76А, верхняя часть), тогда как у животных без экспрессии CRAG, в доле X организация КП была нарушена (стрелки на Рисунок 76А, нижняя часть) (432).

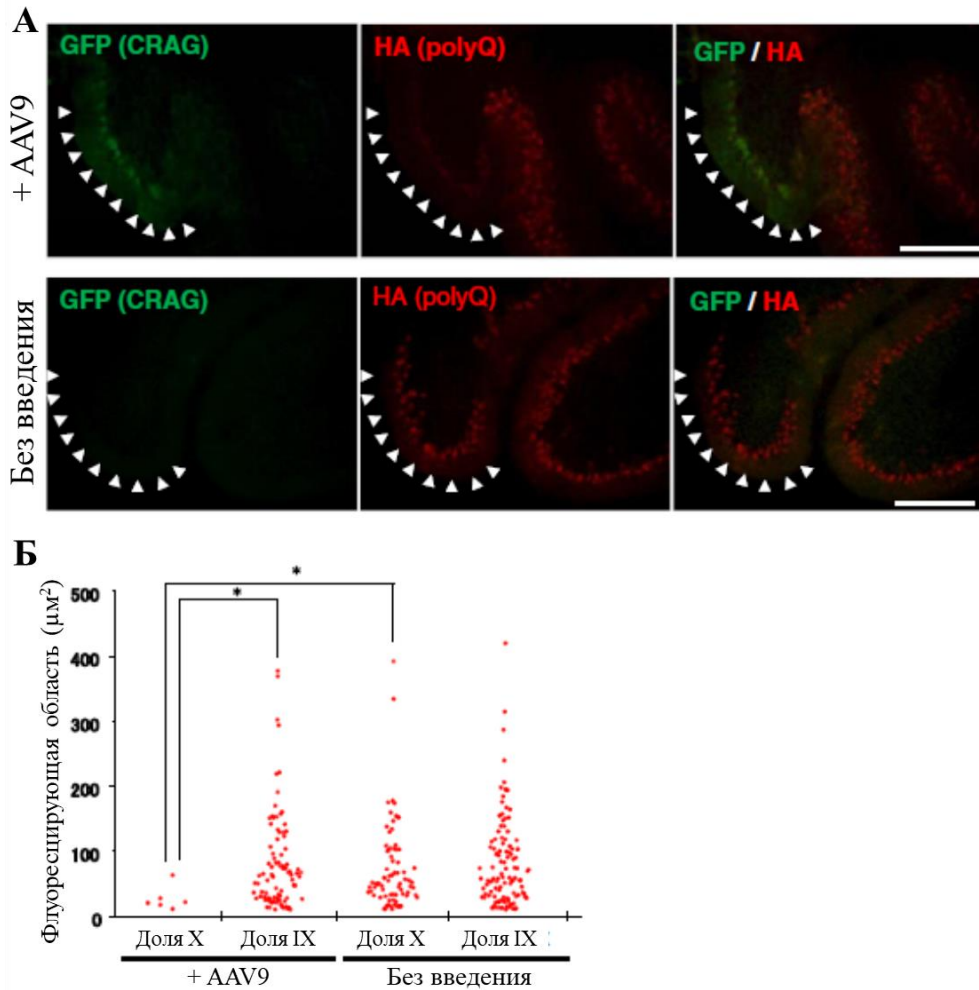


Рисунок 76. Клиренс агрегатов удлинённого мутантного полиглутаминового белка с помощью AAV9-опосредованной экспрессии CRAG. А Срезы мозжечка PolyQ трансгенных животных после введения AAV9(верхняя часть) и без введения (нижняя часть) иммуномеченные анти-GFP анти-НА. GFP экспрессирующие КП одновременно экспрессируют CRAG. Стрелки показывают трансфицированную зону доли X в соответствующих группах животных. Мерная шкала, 200 μm . Б Количественный анализ агрегатов в трансфицированной доле X и нетрансфицированной зоне IX. Зоны с агрегатами иммуномеченные анти-НА указаны на графике. Звёздочки показывают статистически значимые отличия в сравнении с животными не экспрессирующими CRAG, выявленные с помощью U-критерия Манна-Уитни, $*p < 0.05$ (432).

Далее мы исследовали влияние CRAG на морфологию дендритов КП у PolyQ трансгенных животных. AAV9-опосредованная экспрессия CRAG в КП этих мышей значительно увеличивала их ёмкость в 1,5-раза со $174,2 \pm 12,6$ pF ($n = 27$ КП от 4 мышей) до $262,1 \pm 16,0$ pF ($n = 28$ КП от 4 мышей) ($p < 0.01$). В неэкспрессирующих областях тех же животных данный показатель составил $155,7 \pm 9,5$ pF ($n = 7$ клеток от 3 мышей) ($\dagger\dagger p < 0.01$) (Рисунок 77А). В действительности иммуноокрашивание биоцитином КП через фиксирующую пипетку выявило значительное их увеличение и усиление ветвления дендритов в области, экспрессирующей CRAG по сравнению с неэкспрессирующей областью (Рисунок 77Б) (432).

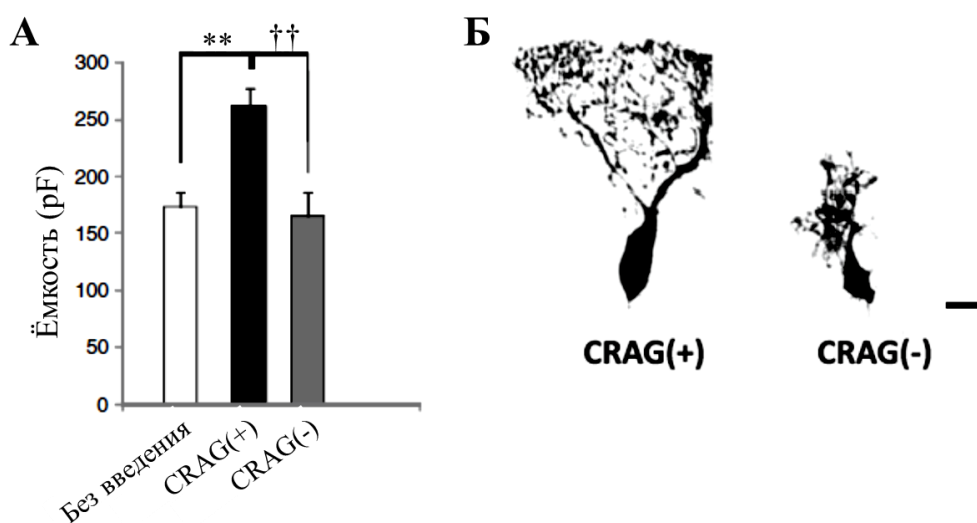


Рисунок 77. Усиление ветвления дендритов у CRAG-экспрессирующих КП PolyQ трансгенных мышей. А График показывает усреднённые показатели ёмкости мембраны КП от мышей без введения генетической конструкции, и после введения AAV MSCV-GFP-P2A-CRAG в зонах, экспрессирующих (CRAG (+)) и не экспрессирующих CRAG (CRAG(-)). Б Репрезентативные изображения меченых биоцитином КП, экспрессирующих (CRAG (+)) и не экспрессирующих CRAG (CRAG (-)). Мерная шкала, 20 μ m. Звёздочки и

кресты показывают статистически значимые отличия, выявленные с помощью однофакторного дисперсионного анализа после апостериорного теста Тьюки, $**p < 0.01$, $††p < 0.01$ (432).

Кроме восстановления морфологии КП CRAG вызывал восстановление возбудимости мембраны. Ранее в экспериментах с использованием искусственной хромосомы дрожжей в СЦА3 трансгенных мышях на ранних стадиях (до морфологических изменений в КП) было показано появление спонтанной электрической активации мембраны КП, такое как появление всплеск активности и повторение повторных всплеск. В противовес этому в КП дикого типа наблюдались тонические и повторные спонтанные активации (476). Также на нашей полиглутаминовой модели трансгенных мышей было показано, что частота потенциалов действия в ответ на различное количество введения тока в клетку было ниже у таких животных, чем у животных дикого типа. Этот показатель был максимален при коэффициенте pA/pF 0,5 составил $40,3 \pm 8,3$ в КП дикого типа и $18,3 \pm 4,4$ в КП PolyQ трансгенных мышей ($p < 0,05$) (Рисунок 78) (432).

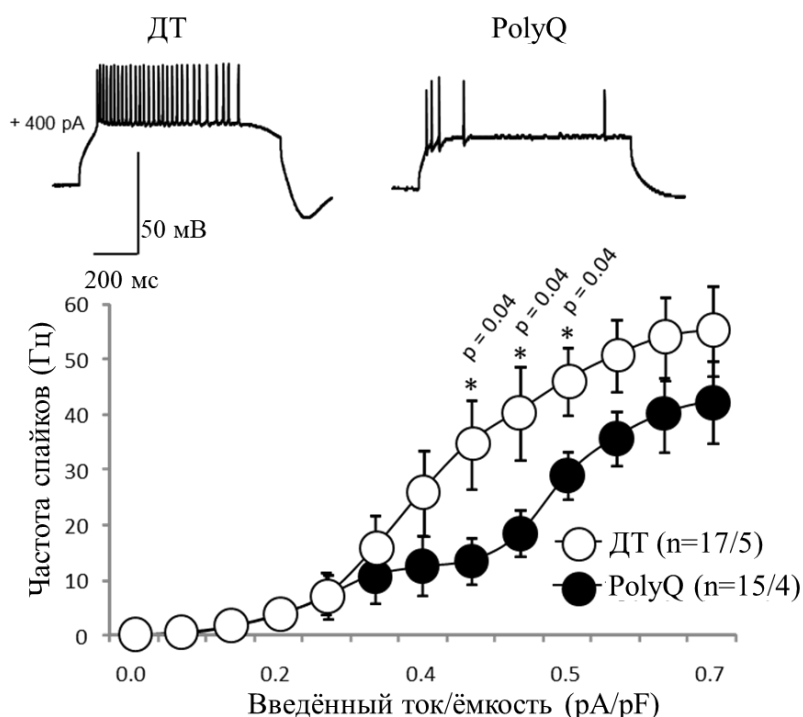


Рисунок 78. Уменьшение частоты потенциалов действия, нормализованной к ёмкости мембраны (C_m) в КП PolyQ трансгенных мышей. Ступенчатая инъекция тока, вызывающая деполяризацию, применялась для возбуждения КП животных дикого типа и КП PolyQ трансгенных животных. Во вкладке сверху показаны репрезентативные кривые повторных потенциалов действия, при одинаковой инъекции тока в 400рА. На основном графике показаны частоты спайков (в герцах) при различных коэффициентах $\mu\text{A}/\text{pF}$. Была выявленная статистически значимая разница с помощью критерия Стьюдента для двух независимых выборок, $*p < 0.05$ (432).

Нарушения возбудимости мембраны КП также были выявлены у СЦА1 KI трансгенных животных, однако паттерн нарушений был другим. У них не наблюдалось потенциалов действия в ответ на введение тока в клетку для достижения коэффициента 0,3 $\mu\text{A}/\text{pF}$. При повышении возбудимости клетки разницы с контрольной группой не отмечалось (Рисунок 79).

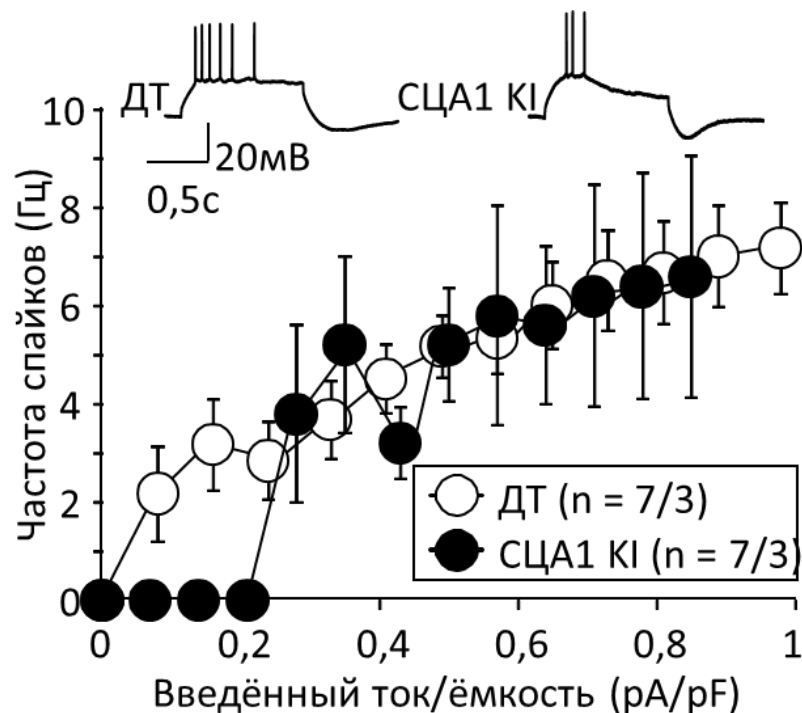


Рисунок 79. Уменьшение частоты потенциалов действия, нормализованной к ёмкости мембраны (C_m) в КП СЦА1 К1 трансгенных мышей. Во вкладке сверху показаны репрезентативные кривые повторных потенциалов действия, при одинаковой при одинаковых коэффициентах pA/pF , в ответ на инъекцию тока. На основном графике показаны частоты спайков (в герцах) при различных коэффициентах pA/pF .

В связи с этим мы исследовали влияние экспрессии CRAG способность возбуждения мембран КП у PolyQ трансгенных животных. В режиме фиксации тока, мы вызывали деполяризацию мембраны посредством инъекции дополнительного тока в клетку (Рисунок 80 кривые во вкладке). Как мы и подразумевали, частота потенциалов действия была значительно выше в CRAG-экспрессирующих КП в сравнении с неинфицированными КП и КП не экспрессирующими CRAG, ($p=0.012$) (Рисунок 80) (432).

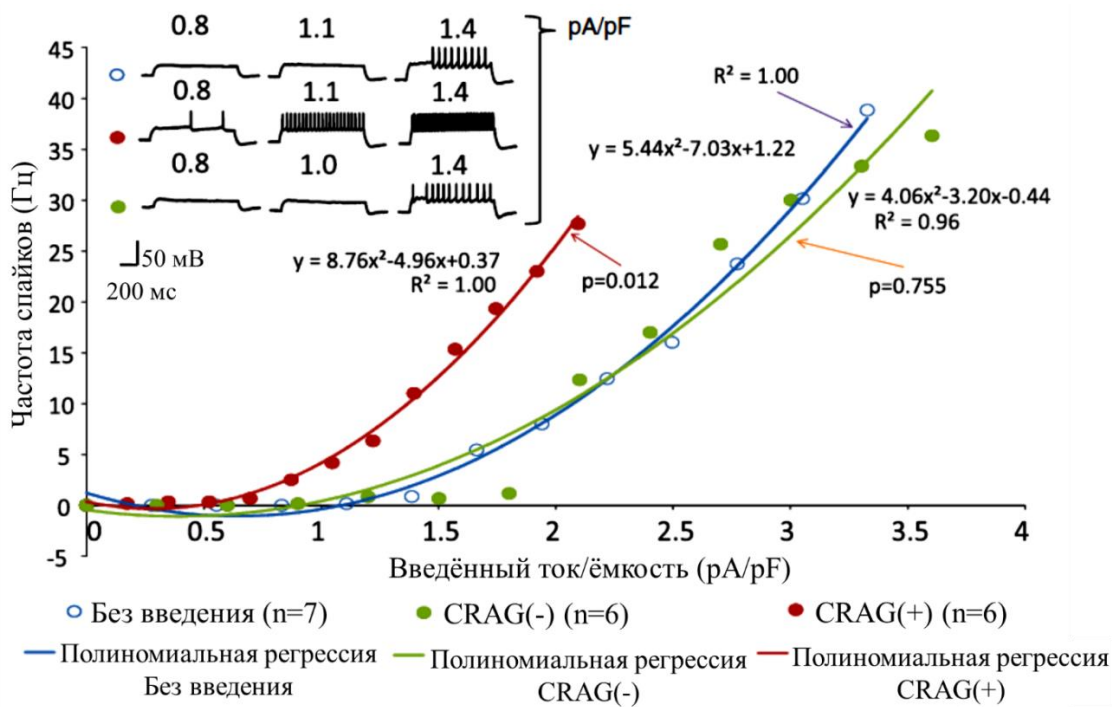


Рисунок 80. Увеличение частоты потенциалов действия, нормализованной к ёмкости мембраны (C_m) в КП PolyQ трансгенных мышей, экспрессирующих CRAG. Ступенчатая инъекция тока, вызывающая деполяризацию, применялась для возбуждения КП без введения генетической конструкции, КП не экспрессирующих (CRAG (-)) и экспрессирующих (CRAG (+)). Частоты (в герцах) потенциалов действия помещены напротив количества инъецированного тока (pA) на единицу ёмкости мембраны C_m (pF). Для сравнения частот потенциалов действия этих групп с различными коэффициентами pA/pF, мы использовали метод полиномиальной регрессии. Квадратичная функция каждой группы наносилась поверх значений, показанных на графике. R – коэффициент регрессии, показывает адекватную точность средних значений. Была выявлена статистически значимая разница с помощью однофакторного дисперсионного анализа после апостериорного теста Тьюки в частотах потенциалов действия между КП, экспрессирующими CRAG и КП без введения генетической конструкции. Вкладки показывают репрезентативные кривые повторных потенциалов действия, при одинаковых коэффициентах pA/pF, в ответ на инъекцию тока (432).

КП PolyQ трансгенных животных, экспрессирующих CRAG, показывали восстановление SSE в ПВ синапсах (Рисунок 81А). Амплитуды ПВ ВПСТ в КП, не экспрессирующих CRAG, повышались до $102,1 \pm 12,7$ % ($n = 10$ клеток от 3 животных) от контрольного уровня через 5с после тетанус-стимуляции, что указывает на выраженное повреждение mGluR сигнального пути, вызываемого SSE. Амплитуды ПВ ВПСТ в КП, экспрессирующих CRAG, уменьшались до $36,9 \pm 8,3$ %, ($n = 5$ клеток от 3 животных) ($p < 0,05$) от контрольного уровня через 5с после тетанус-стимуляции (Рисунок 81А), что показывает восстановление SSE. Однако наблюдалось более быстрое восстановление (примерно за 20с) в сравнении с КП дикого типа (примерно за 60с) (Рисунок 81А) (432).

DSE у данных животных наблюдалась как в CRAG-экспрессирующих, так и не экспрессирующих КП. Уровень снижения амплитуды ПВ ВПСТ значительно не отличался (Рисунок 81Б). Эти результаты показывают, что CRAG может успешно восстановить mGluR-опосредованную кратковременную синаптическую пластичность (432).

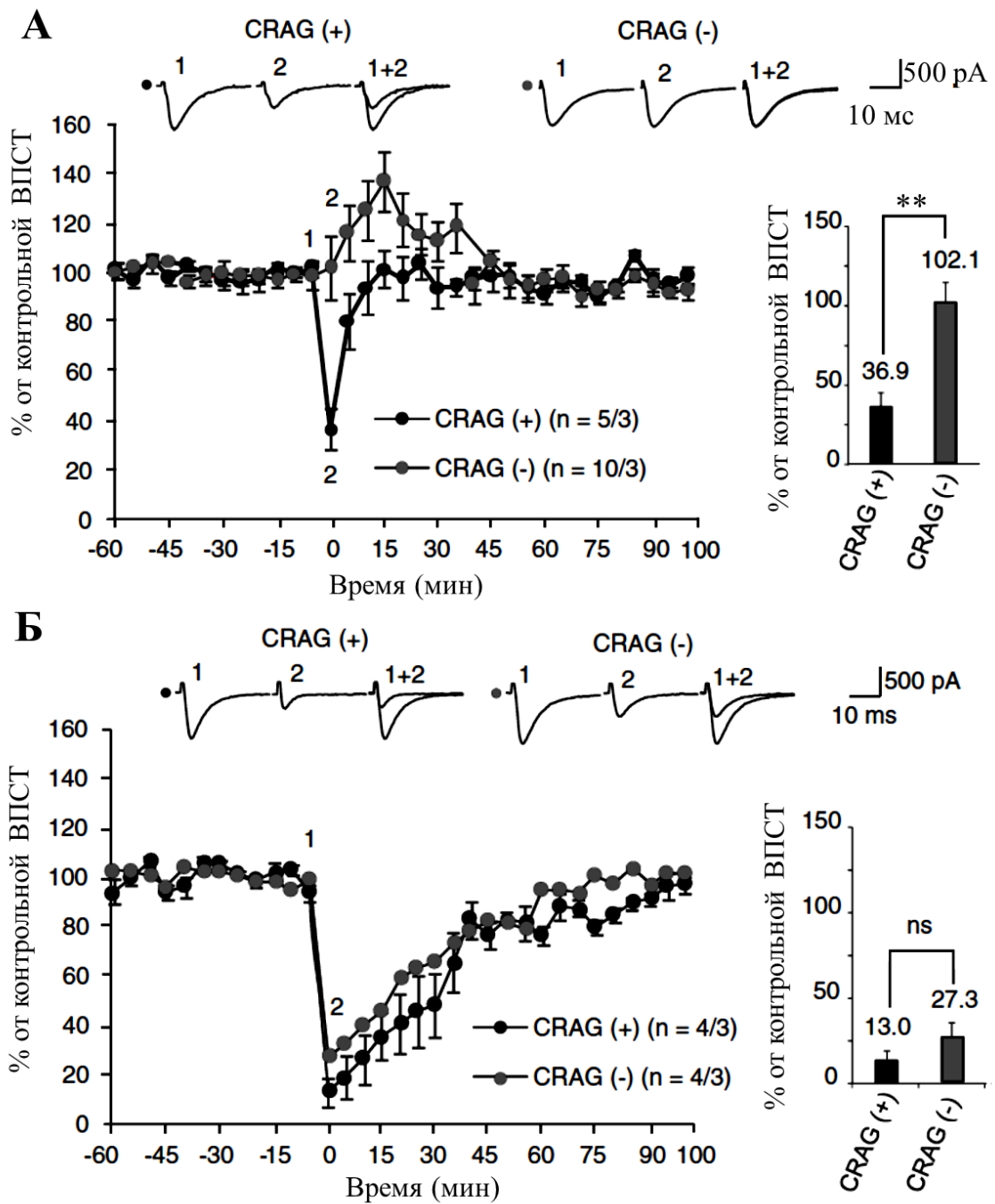


Рисунок 81. Уменьшение количества мутантного полиглутаминового белка в КП PolyQ трансгенных мышей восстанавливает GluR-опосредованную SSE в ПВ-КП синапсах. ПВ ВПСТ записывались от КП экспрессирующих (CRAG (+)) и не экспрессирующих CRAG (CRAG (-)). А Динамика изменения амплитуд ПВ ВПСТ до и после тетанус-стимуляции (слева) и процент уменьшения данной амплитуды сразу после тетанус-стимуляции в сравнении с контрольным уровнем (справа). Б Динамика изменения амплитуд ПВ ВПСТ до и после 5с деполяризации (слева) и процент уменьшения данной амплитуды сразу после деполяризации в сравнении с контрольным уровнем (справа). Во вкладках А и Б показаны репрезентативные кривые последней ПВ ВПСТ контроля до стимуляции (1) и первая ПВ ВПСТ после стимуляции (2). Количество (n) исследованных КП и животных (КП/животные) показано на графиках. Звёздочки показывают статистически значимые отличия в сравнении с контрольной группой CRAG-экспрессирующих животных, выявленные с помощью критерия Стьюдента для двух независимых выборок, $**p < 0.01$ (432).

Мы исследовали влияние CRAG на восстановление mGluR сигнального пути у СЦА1 В05 трансгенных животных. Внутривенное введение AAV MSCV-GFP-P2A-CRAG имело тот же паттерн распределения, что и в мозжечке PolyQ трансгенных мышей. Для сравнения были исследованы CRAG экспрессирующие (CRAG(+)) и CRAG неэкспрессирующие (CRAG(-)) области мозжечка. Нарушения SSE у СЦА1 В05 CRAG(-) трансгенных мышей были менее выражены, чем у PolyQ модельных животных. После тетанус стимуляции амплитуда ПВ ВПСТ снижалась до $72,4 \pm 12,9\%$ относительно контрольных значений и быстро возвращалась до престимуляционных значений уже к 20 секунде записи SSE. В это время данный параметр составлял $98,8 \pm 9,3\%$ относительно контрольных значений. КП экспрессирующие CRAG, показывали восстановление SSE и в этот

временной промежуток амплитуда ПВ ВПСТ составляла $71,9 \pm 8,2\%$ относительно контрольных значений ($p < 0,05$) (Рисунок 82А). DSE у данных животных наблюдалась как в CRAG-экспрессирующих, так и не экспрессирующих КП. Уровень снижения амплитуды ПВ ВПСТ значительно не отличался (Рисунок 82Б). Эти результаты показывают, что CRAG является универсальной молекулой для полиглутаминовых заболеваний и может успешно восстановить mGluR-опосредованную кратковременную синаптическую пластичность (477).

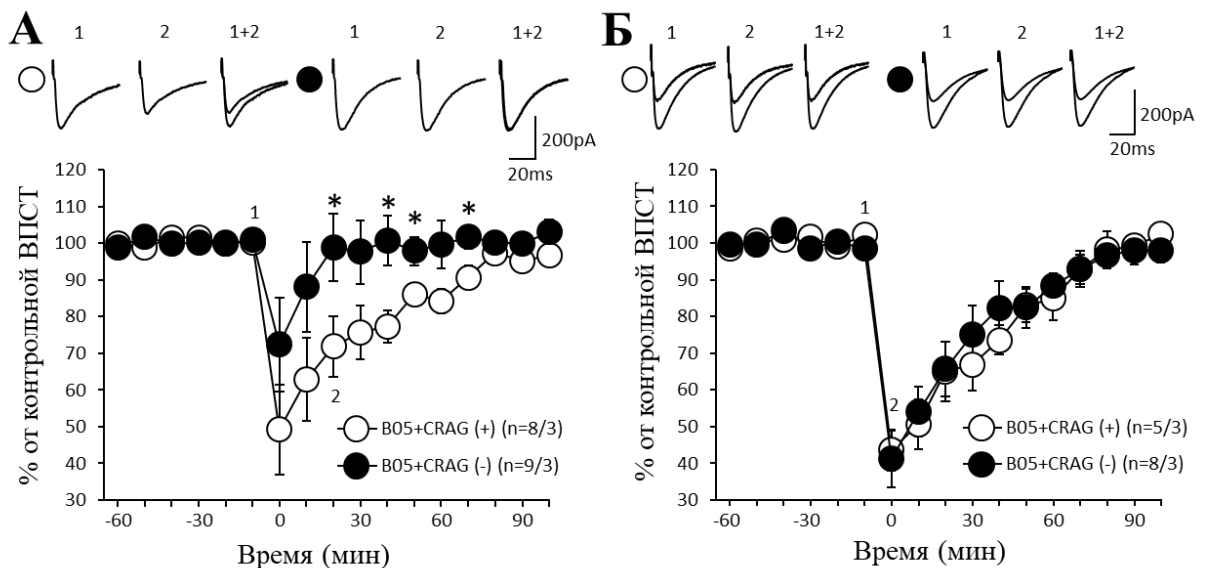


Рисунок 82. Уменьшение количества мутантного атаксина 1 в КП трансгенных СЦА1 B05 мышей восстанавливает GluR-опосредованную SSE в ПВ-КП синапсах. ПВ ВПСТ записывались от КП экспрессирующих (CRAG (+)) и не экспрессирующих CRAG (CRAG (-)). А Динамика изменения амплитуд ПВ ВПСТ до и после тетанус-стимуляции. Б Динамика изменения амплитуд ПВ ВПСТ до и после 5с деполяризации. Во вкладках А и Б показаны репрезентативные кривые последней ПВ ВПСТ контрольная до стимуляции (1) и ПВ ВПСТ через полминуты после стимуляции (SSE) или сразу после деполяризации (DSE) (2). Количество (n) исследованных КП и животных (КП/животные) показано на графиках. Звёздочки показывают

статистически значимые отличия в сравнении с контрольной группой CRAG-экспрессирующих животных, выявленные с помощью критерия Стьюдента для двух независимых выборок, $*p < 0.05$ (477).

Таким образом, мы оценили эффект от введения CRAG на mGluR1-опосредованные процессы в синапсах коры мозжечка у CЦА1 модельных животных. Они заключаются в частичном восстановлении морфологии КП и улучшении СВ1 опосредованной синаптической пластичности у животных с моделями полиглутаминовых атаксий.

Также можно заключить, что доставка рекомбинантных генов является современным высокотехнологичным методом для коррекции патологических состояний клетки на молекулярном уровне. Мы исследовали LVV и AAV генетические конструкции, которые, сами по себе, не являются токсичными для КП. Их применение с минимальной последовательностью, несущей только код флуоресцентной метки, не влияло значительно на морфологию и электрофизиологические свойства клеток. Однако излишняя экспрессия mGluR1 белка с помощью этих конструкций не привело к желаемым результатам. ROR α был «занят» производством mGluR1 в ущерб экспрессии других белков, ответственных за развитие КП. Многообещающим является клиренс мутантных белков с помощью CRAG. Мы успешно восстановили mGluR путь передачи сигналов в КП, экспрессирующих AAV генетическую конструкцию, кодирующую данный белок. Схожие положительные результаты, полученные на PolyQ и CЦА1 B05 трансгенных моделях, доказывают, что CRAG-опосредованный клиренс мутантных белков возможен не только при CЦА1, но и при других полиглутаминовых заболеваниях мозжечка.

3.3. Введение стволовых клеток

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) используются в экспериментах на моделях нейродегенерации в силу их высокой потенциальной пользы в лечении данных состояний (11). МСК – это мультипотентные клетки предшественники, которые дифференцируются в мезенхимальную линию клеток, такие как остеобласты, адипоциты и хондроциты. Но могут дифференцироваться в другие глиальные клетки, такие как глиальные клетки и гепатоциты (478). Они могут быть легко выделены из различных тканей таких, как пуповинная кровь, костный мозг, жировая ткань и пульпа зуба (479), (480). Мы исследовали терапевтический эффект МСК на СЦА1 B05 трансгенных модельных животных. Мы выбрали интратекальное введение, так как этот путь минимально повреждает нервную ткань и может быть легко использован для введения больным. МСК были мечены GFP с помощью LVV MSCV-GFP.

Так как очень сложно идентифицировать МСК со временем после интратекального введения 3,000 МСК, мы применили следующий непрямой метод для доказательства попадания интратекально введённого МСК в мозг. Интратекально введённые МСК должны проникнуть в мозг через субарахноидальное пространство. Мы исследовали, может ли KUM10, линия клеток, выделенная из МСК, введённая в оболочки, проникнуть через мягкую оболочку в мозг. Для этого мы ввели KUM10 клетки в оболочки над верхним двуххолмием немного ростральнее мозжечка мышам дикого типа и посмотрели, определяются ли эти клетки в коре мозжечка. Спустя один час после введения в оболочки KUM10, череп был удалён, без удаления паутинной и мягкой оболочек мозга. Мы наблюдали GFP-меченные МСК на поверхности этих оболочек (Рисунок 83А, Б). Однако клетки не были обнаружены в коре мозжечка после удаления этих оболочек (Рисунок 83В, Г). Эти результаты показывают, что МСК не проникают под оболочки головного мозга в первые часы после инъекции. Во второй группе животных

мы исследовали наличие GFP-меченых KUM10 клеток в коре мозжечка через три дня после инъекции. При таких условиях GFP-меченные МСК были замечены. В мозжечке, GFP метка определялась в долях 3, 4, 5, и 6 и в пространстве между структурами язычка червя (Рисунок 83Д, Е). Поэтому мы заключили, что клетки KUM10, введённые в субарахноидальное пространство, проникают в кору мозжечка (481).

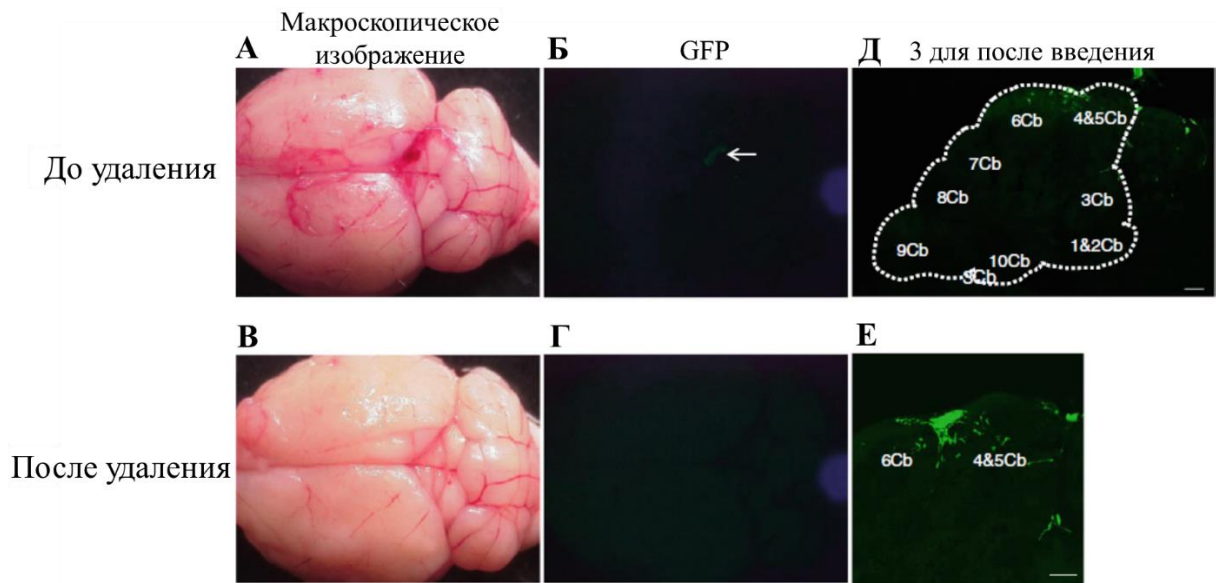


Рисунок 83. МСК, введённые в оболочки, проникают в мозг. GFP-меченные МСКs стереотаксически ввели в оболочки, покрывающие верхнее двухолмие. Один час после инъекции, мозг был исследован макроскопически (А, В) и с помощью флуоресцентной микроскопии (Б, Г) до (А, Б) и после (В, Г) удаления паутинной/мягкой оболочек (А–Г). Примечательно то, что GFP-меченные МСК обнаруживались только до удаления (стрелка). Это показывает, что МСК не проникли под мягкую оболочку. Через 3 дня после введения картина была другая. (Д). GFP-меченные МСК в мозжечке наблюдались в долях мозжечка 3 (3Cb), 4 и 5 (4&5Cb), и в доле 6 (6Cb) (Е). Пунктирная линия показывает область мозжечка. Мерная шкала 300 μm (Д) и 200 μm (Д) (481).

Мы предположили, что введение МСК СЦА1 В05 трансгенным мышам может частично восстановить у них морфологию КП. Мозжечок СЦА1 В05 трансгенных мышей имеет неправильное расположение тел КП, что приводит к нарушению СКП, как это выявлено при окраске антикальбиндином (Рисунок 84А и Б) и (267). Также мы выявили истончение МС у данных животных (Рисунок 84А и Б). Примечательно то, что после введения МСК наблюдалось восстановление СКП и толщины МС (Рисунок 84А и Б). Толщина МС косвенно показывает длину дендритов КП. В действительности, после инъекции биоцитина в тело КП для визуализации его структуры, большинство дендритов КП у СЦА1 В05 трансгенных животных были короче и менее разветвлены, чем у животных ДТ (Рисунок 84В). Эти наблюдения были подтверждены количественным анализом областей, занятых отдельной КП (Рисунок 83Г). КП от животных дикого типа имели площадь $180,4 \pm 12 \text{ м}^2$ ($n = 11$ клеток), тогда как КП СЦА1 В05 трансгенных животных имели площадь $43,2 \pm 7 \text{ м}^2$ ($n = 9$ клеток, $p < 0.001$). После введения МСК, у СЦА1 В05 трансгенных животных наблюдалось значительное восстановление площади дендритов до $105,6 \pm 11$, ($n = 13$ клеток), $p < 0.001$ (Рисунок 84Г). Более детальный морфологический анализ выявил уменьшение количества шипиков дендритов КП у СЦА1 В05 трансгенных животных. На 10 $\mu\text{м}$ длины дендрита у данных животных составило 27.2 ± 0.5 против 36.1 ± 0.6 у животных дикого типа, $p < 0.001$ ($n = 35$ областей). После введения МСК наблюдалось значительное увеличение количества шипиков у СЦА1 В05 трансгенных мышей до 32.1 ± 0.9 , $p < 0.001$; Рисунок 84Д и Е) (481).

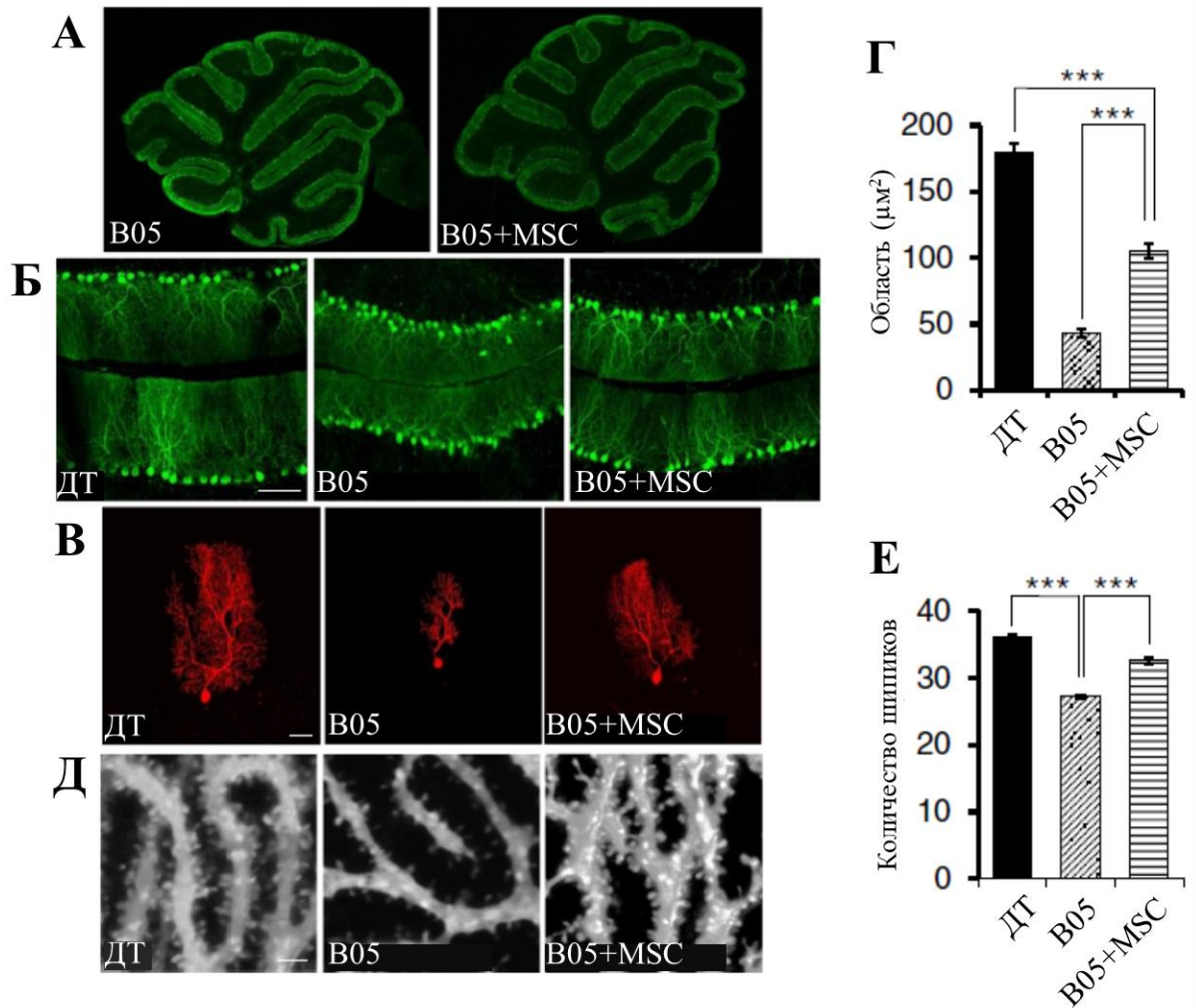


Рисунок 84. Интратекальное введение МСК улучшает морфологию мозжечка у СЦА1 В05 трансгенных мышей. Малое (А) и большое (Б) разрешение конфокальных изображений после окраски анти-кальбиндином, от мышей ДТ и СЦА1 В05 трансгенных мышей без введения и после введения МСК. Морфология индивидуальных КП ДТ СЦА1 В05 трансгенных мышей без введения и после введения МСК (В, Г). В Репрезентативные изображения биоцитин-меченых КП. Г Усреднённая общая область дендритов КП. Д Микрофотографии шипиков дендритов отдельных КП. Е Среднее общее количество шипиков дендритов на 10 μm их длины. Звёздочки показывают статистически значимые различия, выявленные с помощью однофакторного дисперсионного анализа, после коррекции апостериорного теста Тьюки, *** $p < 0.001$. Мерные шкалы 100 μm (Б), 50 μm (В) и 2 μm (Д) (481).

Ёмкость мембраны КП (Cm) у СЦА1 В05 животных без введения стволовых клеток составила 303.1 ± 24.2 pF, n = 13 КП от 3 животных, тогда как после введения МСК она незначительно статистически незначимо возросла до 377.3 ± 40.1 pF, n = 11 КП от 3 животных. У животных дикого типа ёмкость мембраны КП составила 704.9 ± 51.1 pF (n = 15 КП от 3 животных, p < 0.001) (Рисунок 85А). Мы не нашли нарушения амплитуды ПВ ВПСТ при записи вольтамперной зависимости (Рисунок 85Б).

ПВ ВПСТ и ЛВ ВПСТ у СЦА1 В05 трансгенных животных были значительно быстрее по сравнению с КП дикого типа (Рисунок 85В, Г). Так время подъёма ВПСТ составила 1.8 ± 0.2 мсек у СЦА1 В05 трансгенных животных с введением и без введения МСК, n = 10 КП от 3 животных, тогда как у животных дикого типа этот показатель составил 2.6 ± 0.1 мсек, n = 10 КП от 3 животных; p < 0.001 (Рисунок 85Д). Время спада в этих группах животных составило 6.6 ± 0.7 мсек, n = 10 КП от 3 животных; 6.8 ± 0.8 мсек, n = 10 КП от 3 животных и 11.2 ± 0.9 мсек, n = 10 КП от 3 животных, соответственно, p < 0.01 (Рисунок 85Е). Эти показатели связаны с небольшими размерами КП у СЦА1 В05 трансгенных мышей. Поэтому они более компактные в плане проведения электричества (303). Эти данные показывают, что МСК не оказывают значительного влияния на морфологию КП СЦА1 В05 трансгенных мышей (481).

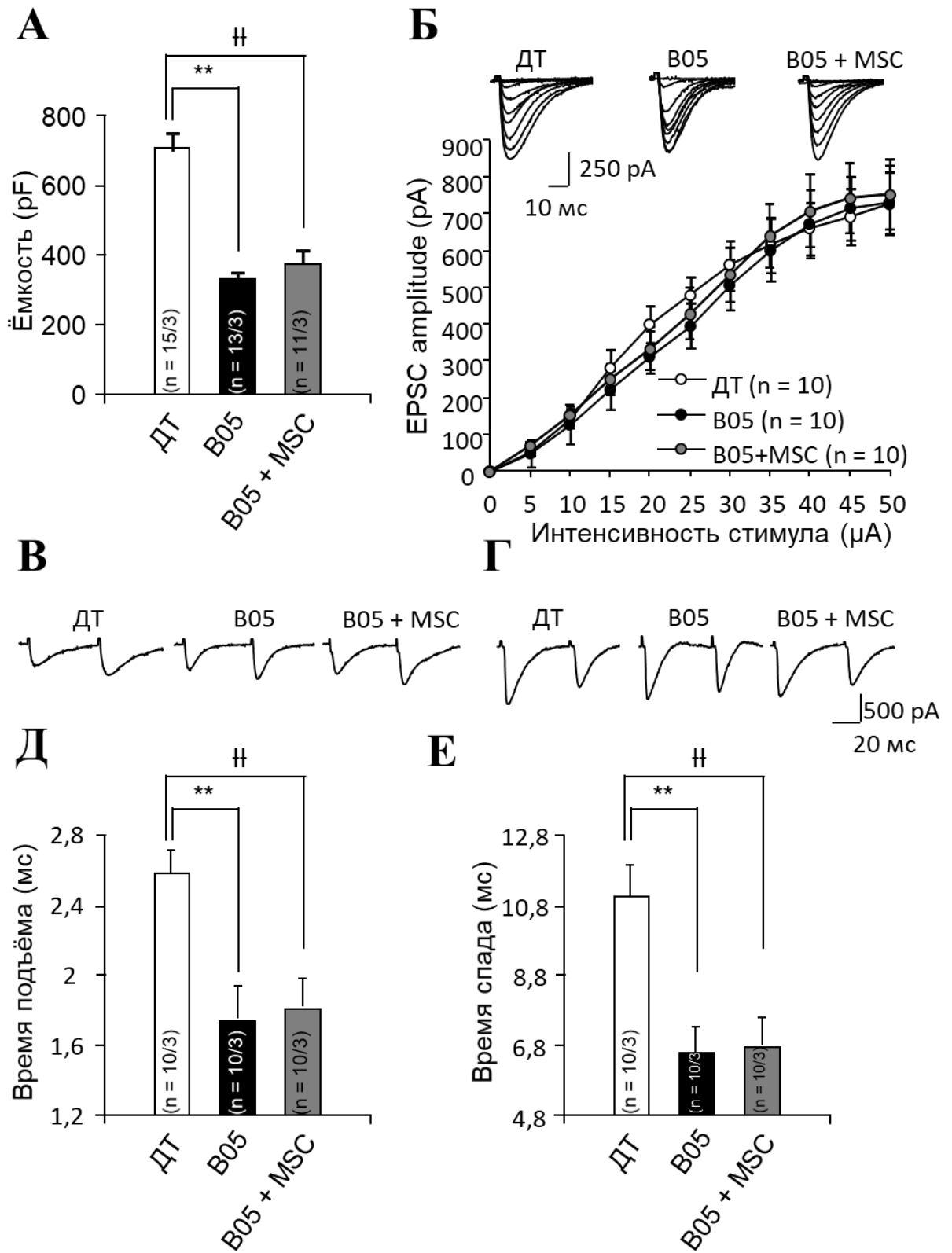


Рисунок 85. Отсутствие восстановления морфологических свойств КП у СЦА1 В05 трансгенных мышей после введения МСКs. (А) Усреднённые графики ёмкости мембраны КП животных ДТ, СЦА1 В05 трансгенных животных без введения и после введения МСК. Звёздочки показывают статистически значимые различия, выявленные с помощью однофакторного дисперсионного анализа, после коррекции апостериорного теста Тьюки, $***p < 0.001$. (Б) Кривая зависимости тока от напряжения (стимуляции пресинапса) у животных ДТ и СЦА1 В05 трансгенных животных без введения и после введения МСК. Во вкладке представлены репрезентативные кривые ПВ ВПСТ в ответ на повышение интенсивности электрической стимуляции. Количество клеток и животных показано в скобках (КП/животные). (В-Г) Репрезентативные кривые (В) ПВ и (Г) ЛВ ВПСТ животных ДТ, В05 без и после введения МСК. ВПСТ вызваны посредством повторного импульса с задержкой в 50 мсек. Стимуляционные артефакты удалены. (Д) Усреднённые графики время подъёма ВП ВПСТ животных ДТ, СЦА1 В05 трансгенных животных без введения и после введения МСК. Звёздочки показывают статистически значимые различия, выявленных с помощью однофакторного дисперсионного анализа, после коррекции апостериорного теста Тьюки, $***p < 0.001$. (Е) Усреднённые графики время спада ВП ВПСТ животных ДТ, СЦА1 В05 трансгенных животных без введения и после введения МСК. Звёздочки показывают статистически значимые различия, выявленных с помощью однофакторного дисперсионного анализа, после коррекции апостериорного теста Тьюки, $***p < 0.001$ (481).

Мы предположили, что положительный эффект от введения МСКs может быть связан с увеличением mGluR1 зависимого молекулярного пути в КП СЦА1 В05 трансгенных животных. Для этого мы исследовали два 2 синаптических события, вызывающиеся активацией mGluR1. Первая – это медленные ВПСТ, молекулярный путь которых описан выше (431).

Амплитуды медленных ВПСТ появлялись в ответ на 10 электрических стимулов с частотой 200 Гц и были более выраженными при 25 стимулах при той же частоте раздражения. При наложении 10 стимулов амплитуда у животных ДТ составила 153.4 ± 35.4 pA, у СЦА1 В05 трансгенных мышей без введения стволовых клеток 47.7 ± 5.0 pA и у СЦА1 В05 животных после введения МСК 73.3 ± 15.5 pA. Статистическая разница наблюдалась только между животными ДТ и СЦА1 В05 трансгенными животными без введения стволовых клеток, $p < 0.01$ (Рисунок 86А). Увеличение стимулов до 25 выявило более значительную разницу в амплитудах медленных ВПСТ. В данных группах она составила 265.4 ± 41.3 pA, 65.2 ± 7.9 pA и 111.4 ± 19.5 pA, соответственно, $p < 0.001$ (Рисунок 86Б). Таким образом, подтвердилась ранее выявленная разница в величине усреднённых амплитуд медленных ВПСТ между животными ДТ и СЦА1 В05 трансгенных животных, однако введение МСК имело явный положительный эффект на восстановление данных токов в КП (481).

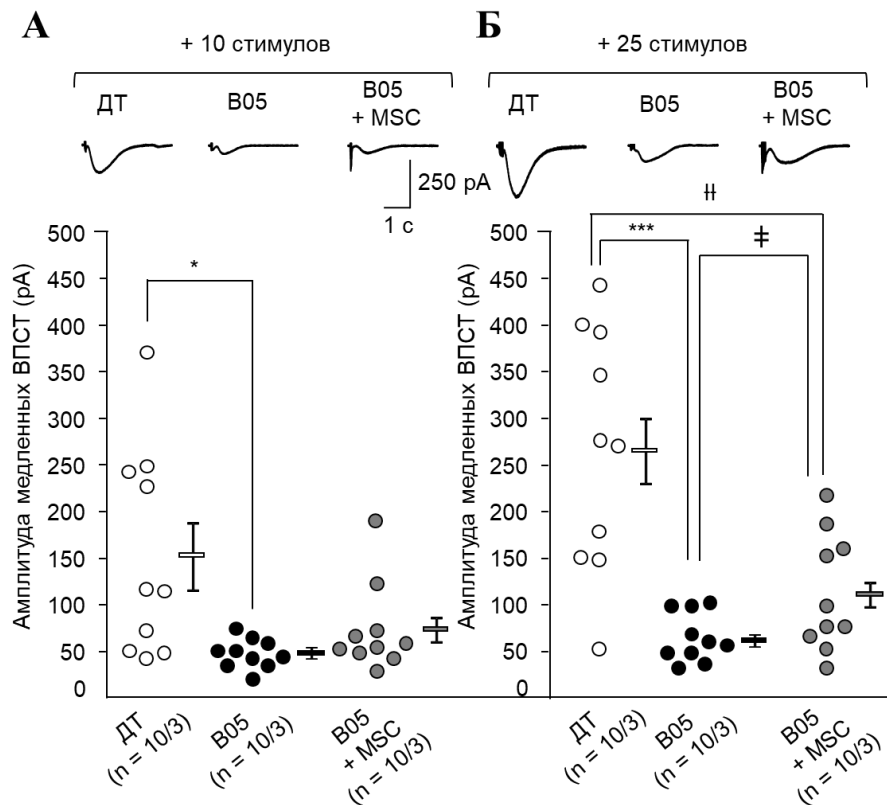


Рисунок 86. Восстановление уменьшенных mGluR1-зависимых медленных амплитуд ВПСТ в КП СЦА1 В05 трансгенных животных после введения им МСК. На графиках показаны усреднённые величины, а также величины отдельных токов с каждой КП животных ДТ, СЦА1 В05 трансгенных животных без введения и после введения им МСК в ответ на 10 электрических стимулов ПВ (А) и 25 стимулов (В) с частотой 200 Гц. В верхних вкладках показаны репрезентативные кривые медленных ВПСТ. Количество клеток и животных показано в скобках (КП/животные). Звёздочки и кресты показывают статистически значимые различия, выявленных с помощью однофакторного дисперсионного анализа, после коррекции апостериорного теста Тьюки, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, †† $p < 0.01$, ‡ $p < 0.05$ (481).

Далее мы исследовали mGluR-опосредованную кратковременную пластичность. Короткая тетанус-стимуляция ПВ вызывает в КП активацию mGluR1 и повышение внутриклеточного Ca^{2+} . Эти эффекты вызывают выделение эндоканнабиноидов и подавление высвобождения глутамата из ПВ (синаптически вызванное подавление возбуждения или SSE) (482), (483). В КП животных дикого типа стимуляция ПВ уменьшала амплитуду ПВ ВПСТ на треть до 32.5 ± 8.8 % от контрольных значений с постепенным восстановлением в течение 55-60 сек. В КП СЦА1 трансгенных В05 животных SSE было значительно нарушено, и амплитуда ПВ ВПСТ после стимуляции уменьшалась лишь до 74.3 ± 10.6 % от контрольных значений с последующим её увеличением в течение 50 сек, $p < 0.01$. Однако в КП СЦА1 В05 трансгенных животных после введения МСК наблюдалось частичное восстановление SSE. После стимуляции амплитуда ПВ ВПСТ уменьшалась до 69.1 ± 8.8 % относительно контрольных значений с последующим медленным восстановлением в течение 60 сек, $p < 0.01$ (Рисунок 87А и Б) (481).

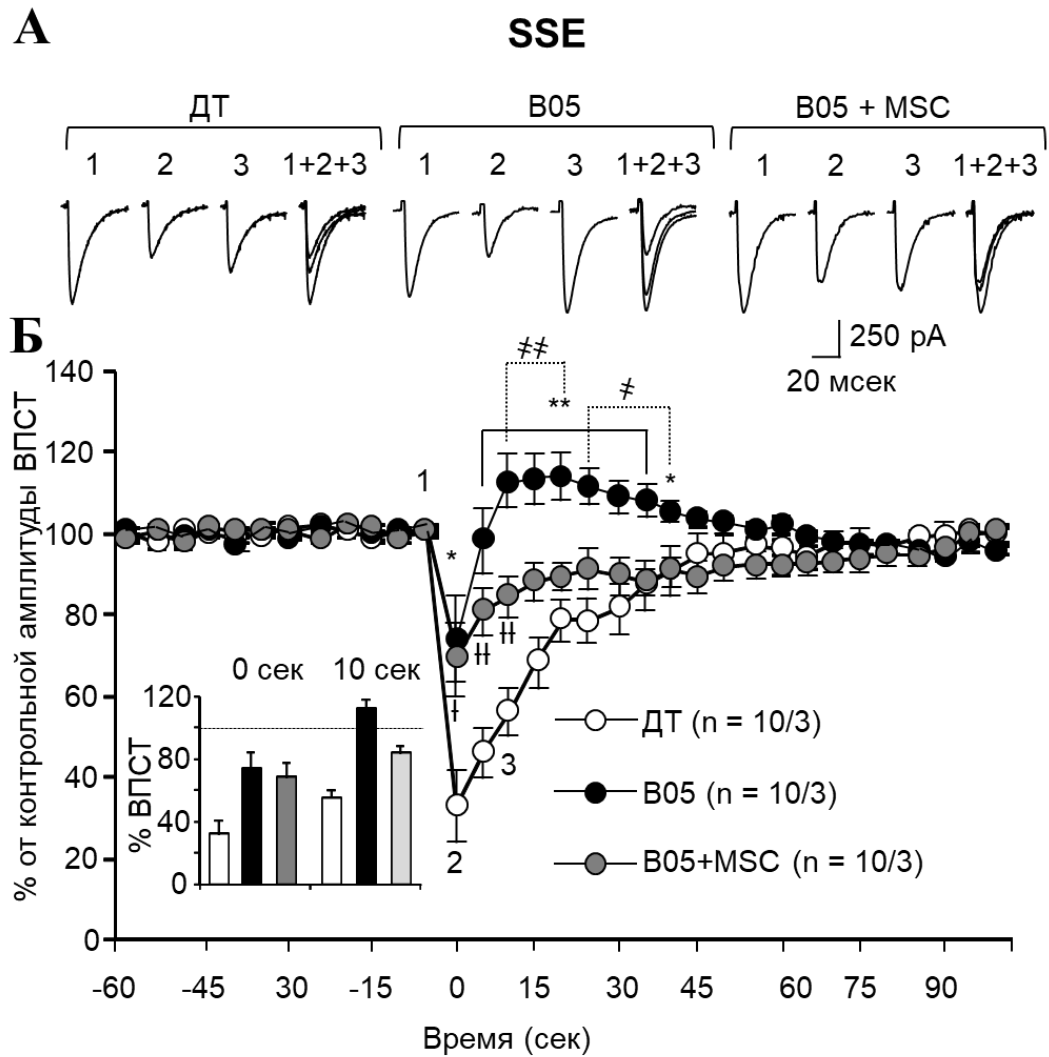


Рисунок 87. Частичное восстановление SSE у СЦА1 B05 трансгенных животных после введения MSC. ПВ ВПСТ записывались каждые 5 сек. (А) Репрезентативные кривые ПВ ВПСТ до стимуляции ПВ (временная точка 1), сразу (временная точка 2) и через 10 сек после стимуляции (временная точка 3) в КП животных дикого типа (ДТ), СЦА1 B05 трансгенных животных без введения и после введения MSC. (Б) Динамика изменения амплитуд ПВ ВПСТ до и после стимуляции ПВ. Во вкладке показаны усреднённые амплитуды ПВ ВПСТ сразу (0 сек) и через 10 сек после стимуляции ПВ, нормированные к достимуляционным значениям. Количество клеток и животных показано в скобках (КП/животные). Звёздочки и кресты показывают статистически значимые различия, выявленных с помощью однофакторного дисперсионного анализа, после коррекции апостериорного

теста Тьюки, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, ‡ $p < 0.05$, ‡‡ $p < 0.05$ (480).

Далее мы исследовали mGluR независимую кратковременную синаптическую пластичность, вызываемую деполяризацией мембраны КП с -70 мВ до 0 мВ в течение 5 сек (DSE). Мы не выявили нарушения DSE у СЦА1 В05 трансгенных животных, а также влияния на этот процесс МСК (Рисунок 88 А и Б) (481).

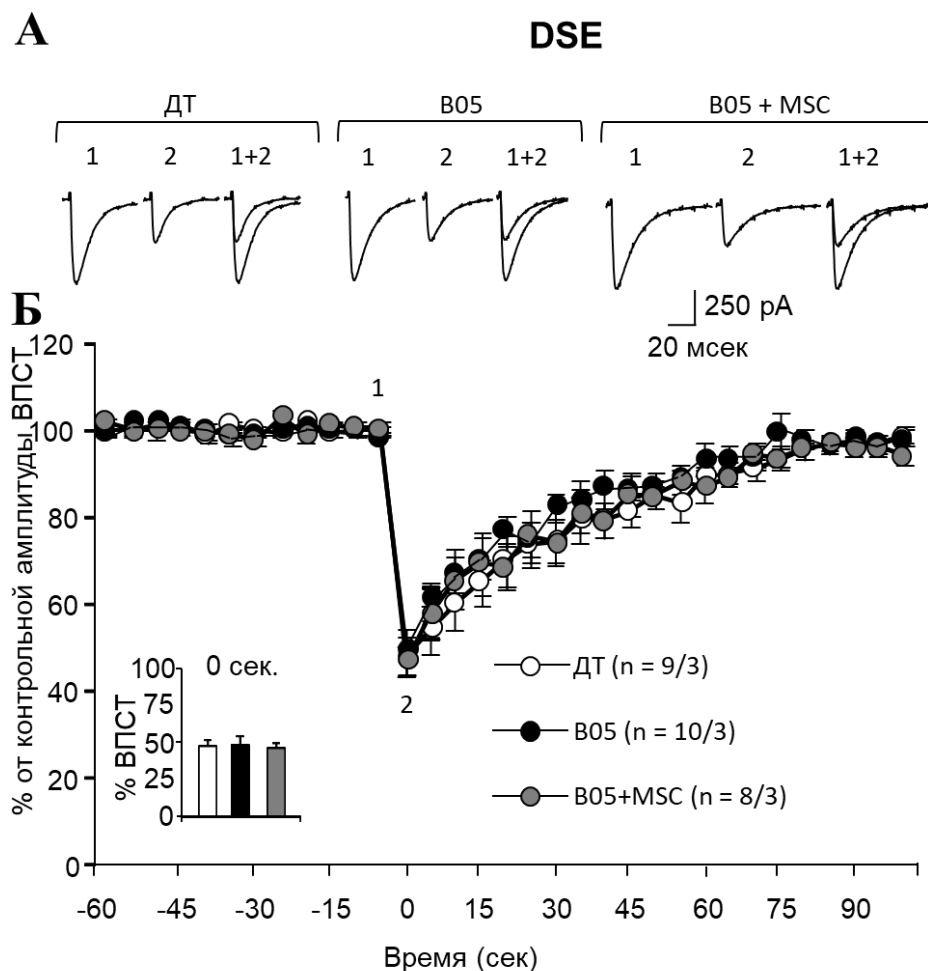


Рисунок 88. Отсутствие нарушения DSE у СЦА1 В05 трансгенных животных после введения МСКs. ПВ ВПСТ записывались каждые 5 сек. (А) Репрезентативные кривые ПВ ВПСТ до деполяризации КП (временная точка

1) и сразу после неё (временная точка 2) животных дикого типа (ДТ), СЦА1 В05 трансгенных животных без введения и после введения МСК. (Б) Динамика изменения амплитуд ПВ ВПСТ до и после деполяризации КП. Во вкладке показаны усреднённые амплитуды ПВ ВПСТ сразу после деполяризации КП (0 сек), нормированные к достимуляционным значениям. Количество клеток и животных показано в скобках (КП/животные). Не было найдено статистически значимых различий, выявленных с помощью однофакторного дисперсионного анализа, после коррекции апостериорного теста Тьюки, $p > 0.05$ (481).

Все вышеописанные положительные эффекты от введения МСК приводили к улучшению двигательных навыков у СЦА1 В05 трансгенных мышей, выявленных с помощью вращающейся дорожки. В режимах ускорения и постоянной скорости данные животные улучшали свои навыки с 11 до 20 недели жизни (Рисунок 89А и Б) и отличались от СЦА1 В05 трансгенных мышей без введения МСК. К примеру, в режиме ускорения они находились на дорожке в течение $208,1 \pm 10,1$ сек, как и животные дикого типа, тогда как последние, только, $120,4 \pm 10,4$ с, $p < 0.01$ (Рисунок 89А) (481).

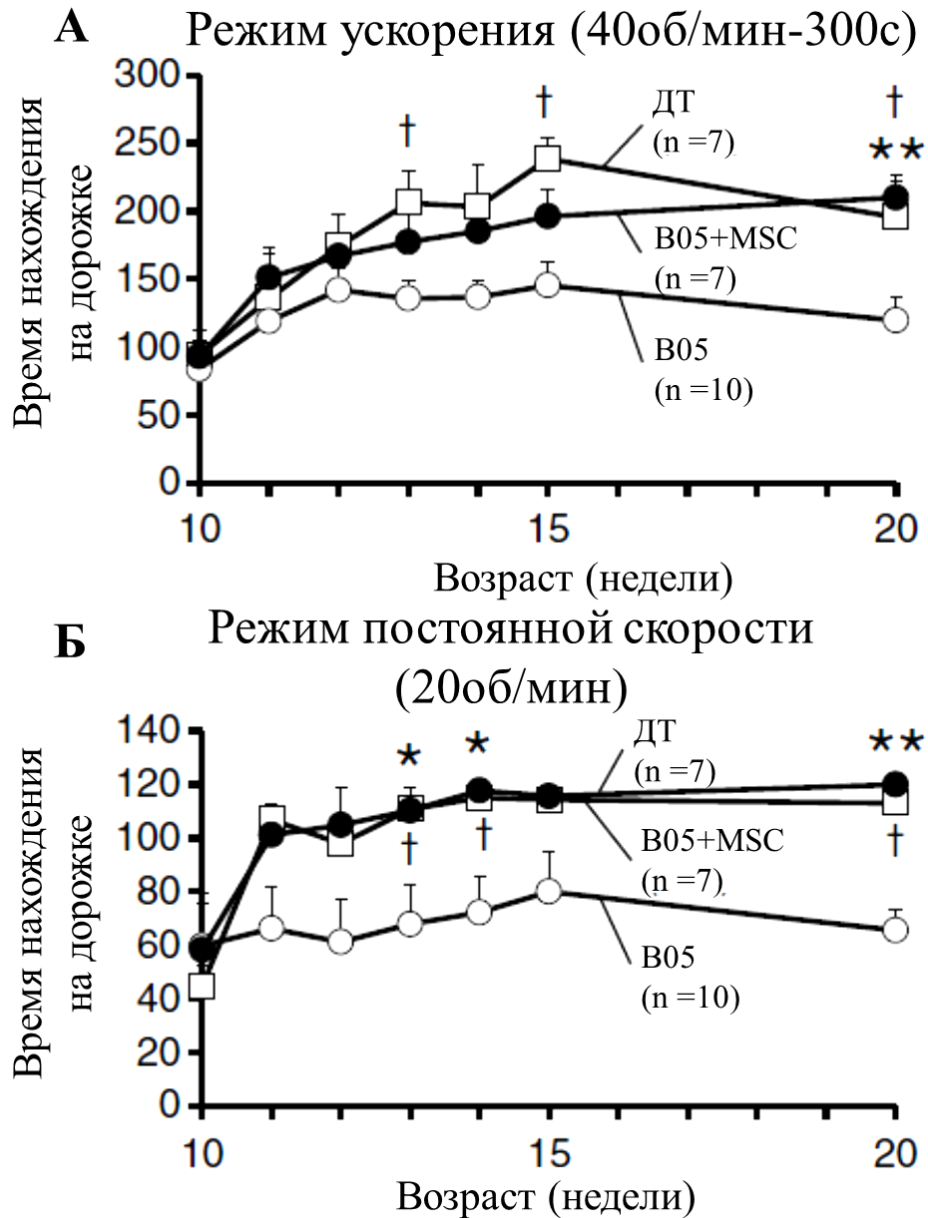


Рисунок 89. Введение МСК улучшает двигательные навыки у СЦА1 В05 трансгенных мышей с помощью вращающейся дорожки. Мыши тренировались в режиме ускорения (4–40 об/мин) (А) и режиме постоянной скорости (20 об/мин) (Б) в возрасте 10, 11, 12, 13, 14, 15 и 20 недель (т.е. через 5, 6, 7, 8, 9, 10 и 15 недель после введения МСК). Количество клеток и животных показано в скобках (КП/животные). Звёздочки и кресты показывают статистически значимые различия, выявленных с помощью однофакторного дисперсионного анализа, после коррекции апостериорного теста Тьюки; * $p < 0.05$ и ** $p < 0.01$ † $p < 0.05$ (481).

Таким образом можно заключить, что мы наблюдали положительный эффект от введения мезенхимальных стволовых клеток непосредственно в мозжечок модельным СЦА1 животным заключается в восстановлении mGluR- пути передачи сигналов в виде восстановления СВ1-опосредованной кратковременной синаптической пластичности. У данных животных значительно уменьшалась атаксия.

3.4. Фармакотерапия

На сегодняшний момент быстрое введение в клиническую практику таких сложных методов лечения, как доставка рекомбинантных генов и введение стволовых клеток, невозможно в силу вышеописанных побочных эффектов. Выбором является введение фармакологических препаратов, которые уже существуют в практике для коррекции других неврологических состояний. Мы исследовали влияние трёх фармакологических препаратов, использующихся в повседневной неврологической практике, на фенотип СЦА1 модельных животных.

3.4.1. Баклофен

Использование модуляторного эффекта баклофена, как агониста ГАМК_В рецепторов, на mGluR1 было описано ранее (484), однако никогда не проверялось в отношении патогенеза СЦА1. Мы предположили, что увеличение mGluR сигнализации в мозжечке посредством баклофена может значительно улучшить двигательную координацию у таких модельных животных.

3.4.1.1. Баклофен улучшает синаптическую передачу и пластичность в КП у СЦА1 модельных животных

В предыдущих исследованиях было показано, что mGluR1 тесно связан с ГАМКв рецепторами в КП и что активация ГАМКв рецепторов баклофеном усиливает mGluR-опосредованные эффекты в клетке, такие как увеличение медленных ВПСТ и высвобождение Ca^{2+} из ЭПР, что приводит к увеличению LTD в КП (485). В действительности, мы подтвердили с помощью электрофизиологических методов, что добавление 5 нМ баклофена во внеклеточную жидкость, омывающую срезы мозжечка, частично увеличивает оставшуюся mGluR1 сигнализацию в КП СЦА1 В05 модельных мышей (Рисунок 90). Происходит полное восстановление медленных ВПСТ (Рисунок 90А) и частичное обратимое восстановление SSE (Рисунок 90Б, дисперсионный анализ, $p < 0.0005$; Контроль vs Баклофен, $p < 0.005$; Баклофен vs Отмытие, $p < 0.005$) (404).

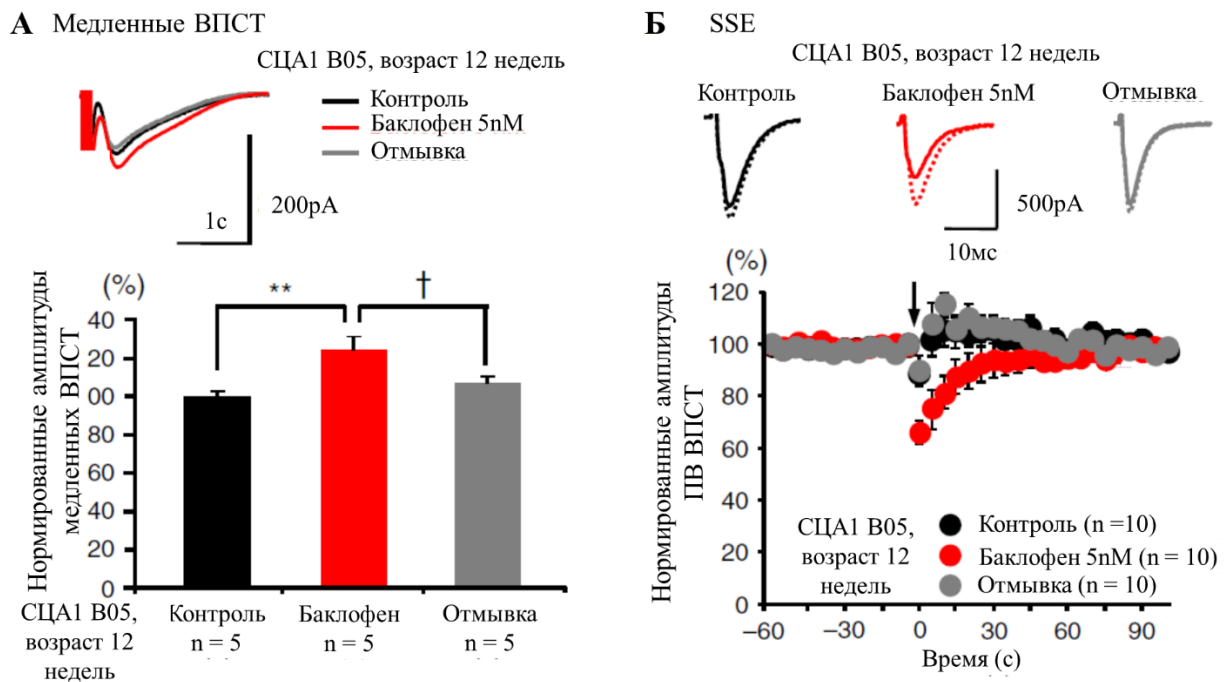


Рисунок 90. Введение на срезы мозжечка 5 нМ баклофена частично увеличивает нарушенный mGluR-опосредованный путь передачи сигналов у СЦА1 В05 трансгенных животных А и Б, в верхней части показаны репрезентативные кривые ВПСТ. А, медленные ВПСТ (вызванные тетанус-

стимуляцией ПВ 25 импульсами с частотой 200 Гц) и В быстрые ПВ ВПСТ при записи SSE (пунктирные линии показывают базовый уровень амплитуд ПВ ВПСТ до индукции SSE, а непрерывные линии показывают первый ПВ ВПСТ после индукции SSE) до введения (Контроль, чёрный), в присутствии (Баклофен, красный) и после отмывки (Отмывка, серый) 5 нМ баклофена. На графике амплитуд А показаны усреднённые данные от 20 амплитуд медленных ВПСТ в каждой КП СЦА1 В05 трансгенных животных (** $p < 0.01$ между контрольной группой и группой, в которой был применён баклофен; † $p < 0.05$ между группой после введения баклофена и после её отмывки; различия выявлены с помощью однофакторного дисперсионного анализа после апостериорного теста Тьюки). В нижней части рисунка В показана динамика изменения амплитуд ПВ ВПСТ до и после стимуляции ПВ (404).

Однако баклофен не влиял значительно на LTD (Рисунок 91А). Нормированные амплитуды ПВ ВПСТ к достимуляционному уровню после 30 минут записи LTD составляли в группе без введения баклофена $97.7 \pm 4.0\%$, $n = 8$ от 7 мышей; после введения баклофена, $86.2 \pm 7.7\%$, $n = 6$ от 6 мышей, $p = 0.18$). После введения баклофена наблюдалась тенденция к увеличению количества КП с уменьшением амплитуды ПВ ВПСТ (<85% от контрольных значений) на 30 минуте после индукции LTD (Рисунок 91Б; точки ниже прямой непрерывной линии) (404).

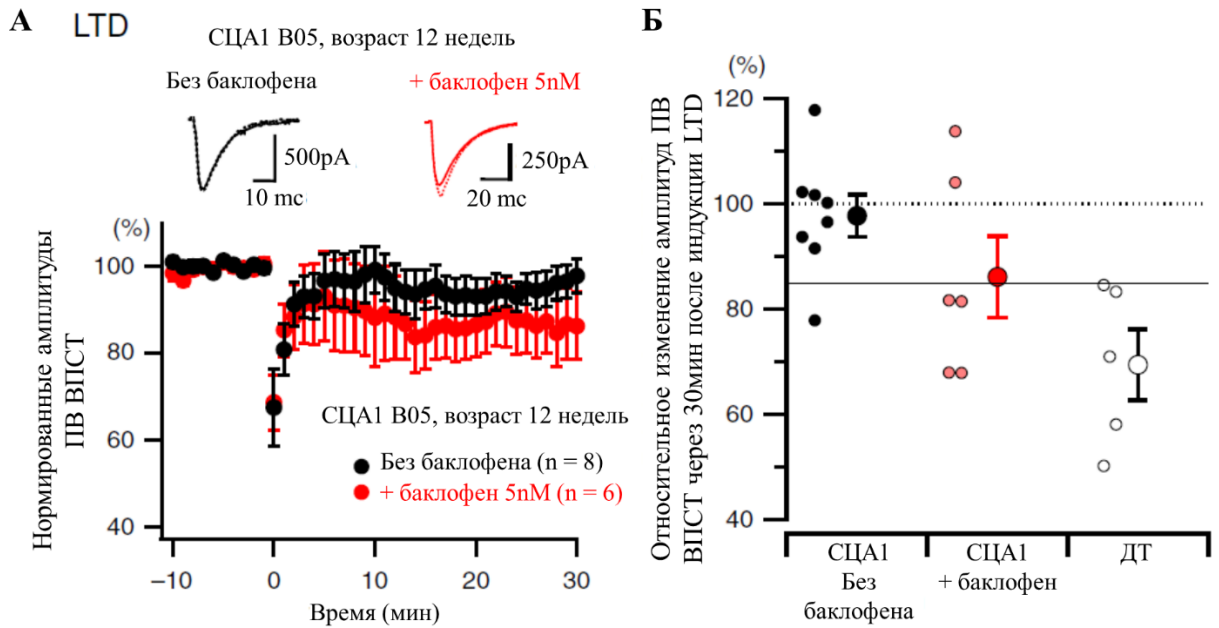


Рисунок 91. Добавление на срезы мозжечка 5 nM баклофена частично увеличивает LTD у СЦА1 В05 трансгенных животных. А, сверху показаны репрезентативные кривые базового уровня ПВ ВПСТ (последняя ВПСТ до индукции LTD, пунктирные линии) и ВПСТ через 30 мин после индукции LTD (непрерывные линии). Слева снизу показана динамика изменения амплитуд ПВ ВПСТ до и после индукции LTD в отсутствии и в присутствии баклофена (5 nM). Баклофен вводился в электрофизиологическую ванночку со срезом мозжечка за 10 мин до индукции LTD. В, относительные изменения амплитуд ПВ ВПСТ через 30 мин после индукции LTD в отсутствии баклофена (чёрные кружки), и в его присутствии (красные кружки) у СЦА1 В05 трансгенных животных и животных ДТ (белые кружки). Символы большего размера показывают средние значения, тогда как символы малого размера показывают индивидуальные данные от каждой КП. Горизонтальная непрерывная линия показывает 85% относительные изменения, которые могут быть использованы как критерии успешного развития LTD, так как все значения у животных ДТ были ниже этой линии (404).

3.4.1.2. Баклофен улучшает координацию у СЦА1 модельных животных

Баклофен давно используется в неврологической практике как центральный миорелаксант (486). Также был замечен его прямой эффект на mGluR путь передачи сигналов (487), (304). Поэтому мы исследовали эффект баклофена в отношении увеличения mGluR сигнализации и улучшения моторных навыков у СЦА1 B05 трансгенных животных в возрасте 12 недель. Баклофен в низкой концентрации (5 nM) мы использовали для исследования моторных навыков у мышей, так как наномолярные концентрации могут усилить mGluR1 ответ в КП с минимальной активацией $G_{i/o}$ белков, которые инициируют GABA_B путь передачи сигналов, который регулирует пресинаптическую потенциал-зависимые Ca^{2+} каналы и G белок-ассоциированные K^+ каналы прямого выпрямления в мозжечке (487). Такая низкая доза баклофена может усилить мозжечок-зависимую адаптацию оптокинетического рефлекса без влияния на сам этот рефлекс (488). В нашем поведенческом тесте рота род, баклофен вводился непосредственно в мозжечок СЦА1 B05 трансгенных мышей, с тем чтобы свести к минимуму его влияние на мышцы или другие ткани. По сравнению с контрольной инъекцией PBS, однократная инъекция 5 nM баклофена значительно улучшала двигательную активность в дни 0, 1 и 7 после введения. На 7 день тренировок нахождение на вращающейся дорожке у таких животных увеличилось с $124,8 \pm 7,4$ с (n = 27) до $143,1 \pm 4,8$ с (n = 28). Эффект исчезал через 2 и 3 недели после инъекции. (Рисунок 92) (404).

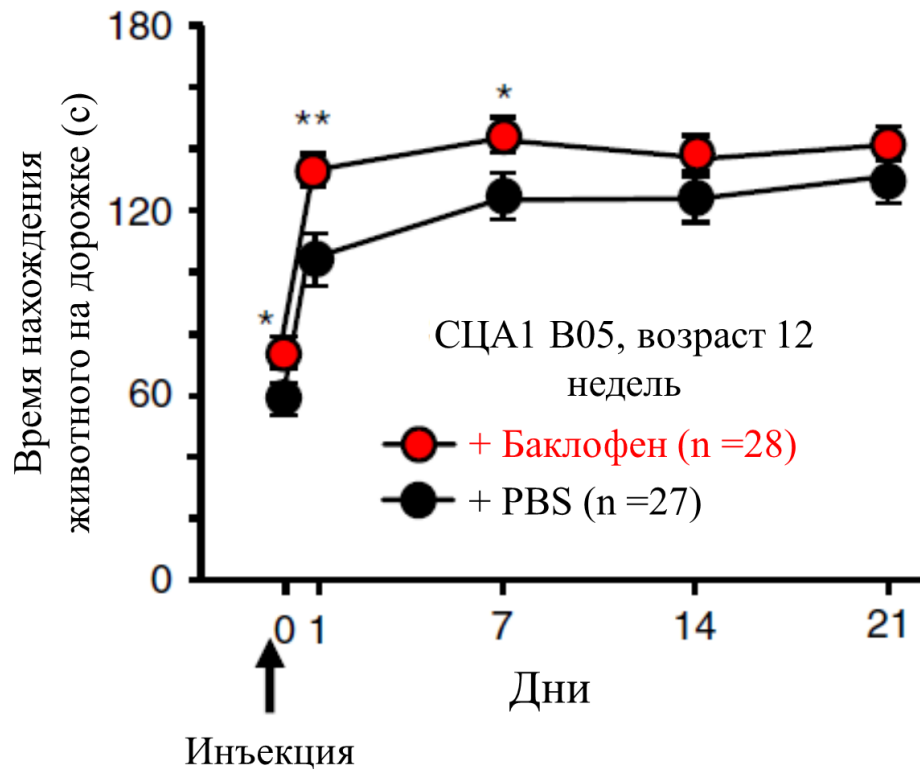


Рисунок 92. Баклофен улучшает двигательную активность СЦА1 В05 трансгенных мышей. Двигательную активность проверяли с помощью ускоряющего теста на вращающейся дорожке. Баклофен (5 нМ) или PBS вводили в мозжечок 12-недельных мышей СЦА1 В05 трансгенных мышей за 3 ч до теста в день 0 (инъекция). А Размер выборки на 14 и 21 день составил 28 и 27 мышей, соответственно (404).

Для понимания механизмов улучшения двигательной функции при применении баклофена и связи его с усилением mGluR1 сигнализации у СЦА1 В05 трансгенных мышей, мы проанализировали медленные ВПСТ, SSE и LTD у данных животных. На 7 день после введения баклофена, СЦА1 В05 трансгенные мыши показывали увеличение амплитуд медленных ВПСТ. После введения PBS амплитуда составила 78.4 ± 19.0 pA (n = 11, 5 мышей), после введения баклофена 218.8 ± 50.6 pA (n = 10, 5 мышей), $P < 0.05$. Данный эффект исчезал через 21 день после введения (Рисунок 93) (404).

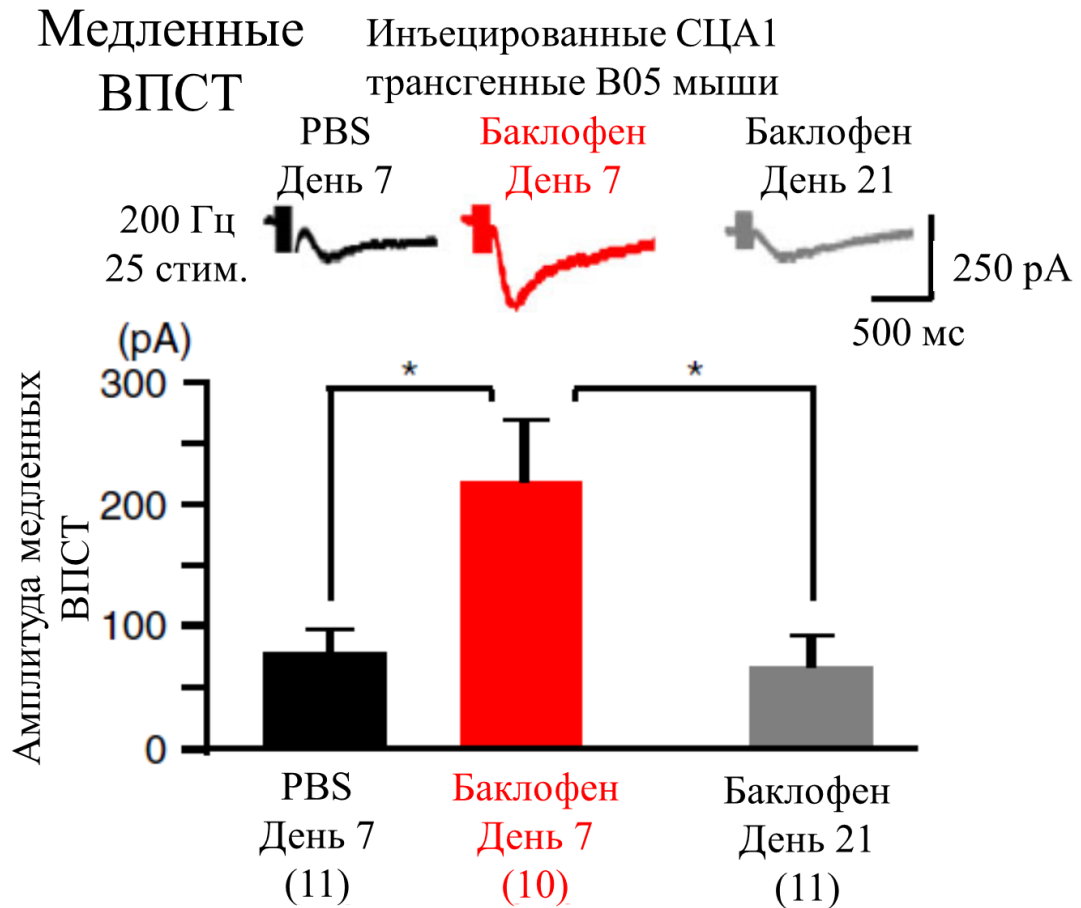


Рисунок 93. Баклофен увеличивает амплитуду медленных ВПСТ в КП СЦА1 B05 трангенных мышей. Показан график усреднённых амплитуд, полученных от животных на 7 день после введения PBS, а также на 7 и 21 дни после введения (5 нМ) баклофена. Различия выявлены с помощью однофакторного дисперсионного анализа, $*p < 0.05$. В верхней части показаны репрезентативные кривые медленных ВПСТ. Каждая группа выделена соответствующим цветом (404).

Изменения были более выраженные при регистрации SSE. Нормированная амплитуда ПВ ВПСТ через 5 сек после индукции SSE, в контрольной группе составила $96.6 \pm 7.2\%$ ($n = 10$, 5 мышей), после введения баклофена $66.9 \pm 8.0\%$ ($n = 10$, 5 мышей), $P < 0.05$. Данный эффект исчезал через 21 день после введения (Рисунок 94) (404).

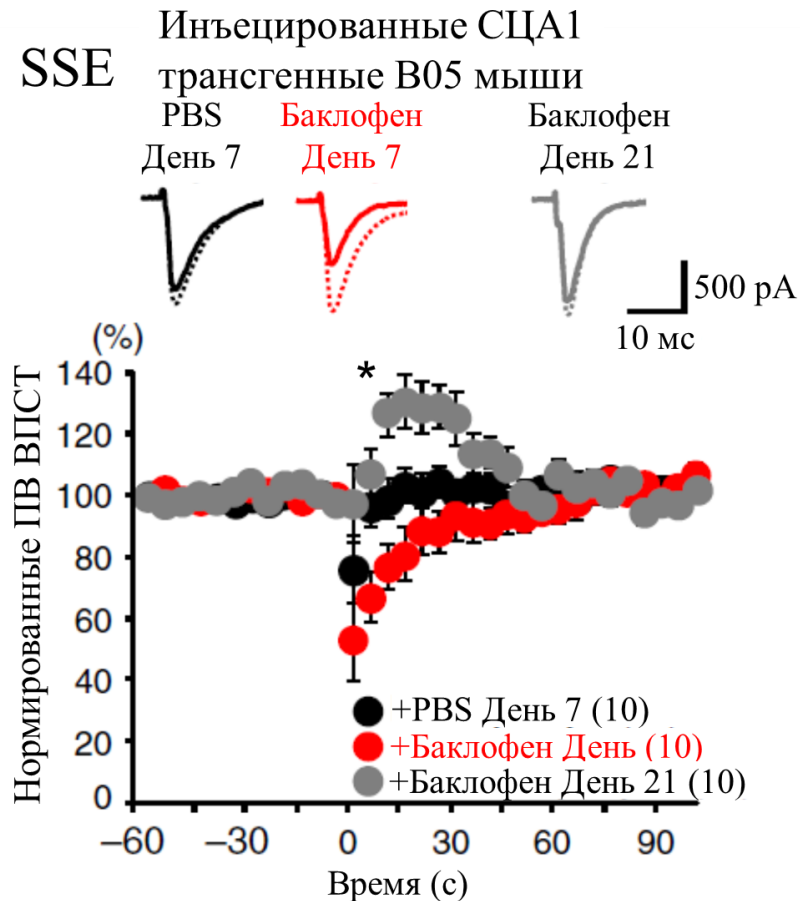


Рисунок 94. Баклофен усиливает SSE в КП СЦА1 B05 трансгенных мышей. Показан график динамики нормированных амплитуд ПВ ВПСТ, полученных от животных на 7 день после введения PBS и (5 nM) баклофена. Различия выявлены с помощью однофакторного дисперсионного анализа, * $p < 0.05$. В верхней части показаны репрезентативные кривые ПВ ВПСТ. Каждая группа выделена соответствующим цветом (404).

Также наблюдалось значительное восстановление LTD. Нормированная амплитуда ПВ ВПСТ через 30 мин после индукции LTD у животных после введения PBS составила $103.0 \pm 4.0\%$ ($n = 10$, 5 мышей), после введения баклофена $71.6 \pm 6.2\%$ ($n = 10$, 5 мышей), $P = 0.005$ (Рисунок 95) (404).

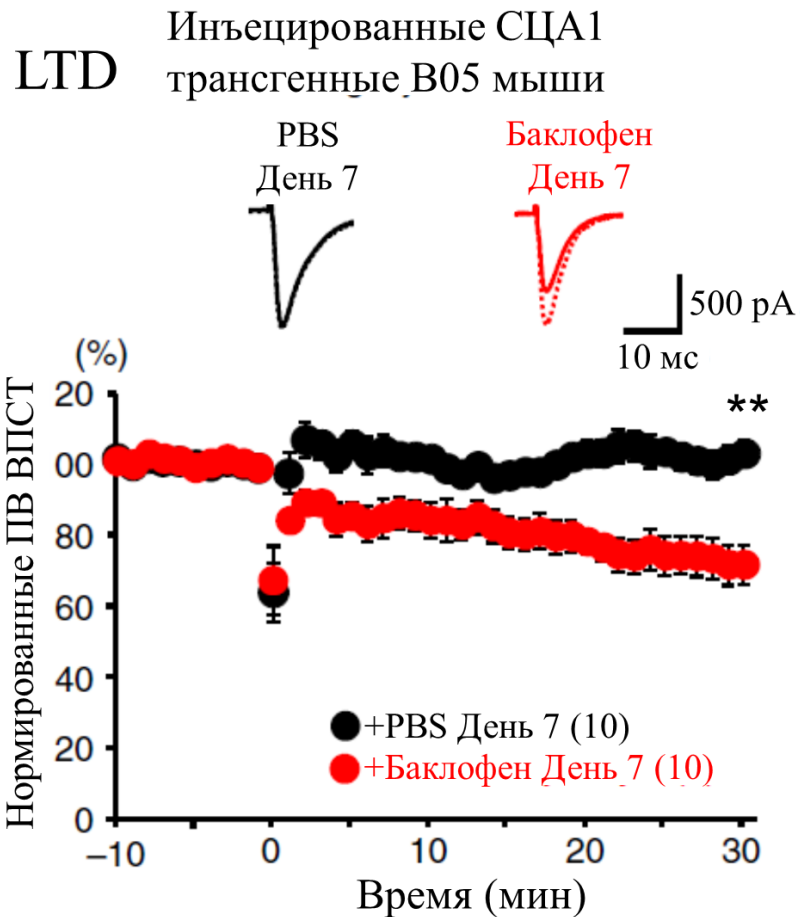


Рисунок 95. Баклофен усиливает LTD в КП СЦА1 В05 трансгенных мышей. Показан график динамики нормированных амплитуд ПВ ВПСТ, полученных от животных на 7 день после введения PBS и (5 нМ) баклофена. Различия выявлены с помощью t-теста, * $p < 0.05$. В верхней части показаны репрезентативные кривые ПВ ВПСТ. Каждая группа выделена соответствующим цветом (404).

Интересен тот факт, что через 21 день после введения эффект исчезал. Вместе эти данные показывают, что баклофен может улучшить двигательную активность у СЦА1 трансгенных мышей, а также восстановить mGluR сигнализацию в ПВ-КП синапсах. Поэтому баклофен может быть полезным фармакологическим средством для улучшения двигательной активности у больных СЦА1.

Таким образом мы показали, что баклофен оказывает положительный эффект на синаптическую передачу и пластичность в синапсах клеток Пуркинье у СЦА1 модельных животных. Однократное пероральное введение баклофена уменьшает атаксические проявления у СЦА1 мышей в течение 7 дней.

3.4.2. Мемантин

Мемантин — низкоаффинный потенциалзависимый неконкурентный антагонист NMDA-рецепторов, одобренный для применения при болезни Альцгеймера (489). Блокируя NMDA рецепторы, он предотвращает излишнее поступление катионов внутрь нейронов и развитие эксайтотоксичности. В мозжечке ГБ играет ключевую роль в поглощении синаптического глутамата через переносчик возбуждающих аминокислот (EAAT1, также известный как GLAST и кодируемый геном Slc1A3) и, следовательно, предотвращает эксайтотоксичность (490), (491). Напротив, в реактивной ГБ функция этого переносчика нарушается, что оказывает негативное влияние на функцию нейронов. Поэтому потенциально мемантин может быть пригоден для лечения полиглутаминовых СЦА, в том числе и СЦА1. Ранее была проведена пилотная работа по исследованию эффектов мемантина на фенотип СЦА1 КИ мышей (492) показывающая, что он потенциально может быть пригоден для лечения СЦА1. Проблема заключается в том, что имеются противоречивые данные об экспрессии субъединиц NMDA рецепторов во взрослых КП: в одних исследованиях мРНК GluN2B, отвечающая за эксайтотоксичность, была обнаружена у крыс (493), (494), тогда как в других работах мРНК GluN2 в КП взрослых грызунов не выявлена (495). Данный факт ставит под сомнение эффективность мемантина в лечении нейродегенеративных состояний мозжечка, так как эта молекула-мишень может попросту отсутствовать в КП. В связи с этим, мы исследовали локализацию NMDA токов на синаптической мембране и за её пределами.

3.4.2.1. Выявление NMDA токов в КП

В режиме whole cell были записаны быстрые ПВ ВПСТ с добавлением различных блокаторов NMDA рецепторов для вычленения этих токов из суммарного постсинаптического тока КП контрольных животных. Мы работали в присутствии 20μM NBQX для блокады АМПА рецепторов. Амплитуда после этой манипуляции уменьшилась с 243,6±26,5 pA до 48,1±7,5 pA (n = 11 от 3 животных), p = 0,0003, парный t-тест. Дальнейшее добавление неселективного блокатора NMDA рецепторов, 25μM AP-5, приводило к уменьшению амплитуды до 31,1±7,7 pA (те же клетки), p = 0,004. Соответственно, это уменьшение и есть чистый NMDA ток, который составил 17,0±4,0 (те же клетки) (Рисунок 96А, верхняя часть). Для понимания, какой субъединичный состав формирует выявленный MDA ток, мы применили селективный блокатор NR2B субъединицы, 0,5μM Ro25-6981. После его применения ПВ ВПСТ значительно не изменился (Рисунок 96Б, верхняя часть), p=0,93. Это указывает, что в синапсах отсутствуют NR2B субъединицы NMDA рецепторов. Мемантин, являясь неселективным блокатором данных рецепторов, значительно снижал быстрые ПВ ВПСТ с 47,9±11,5 pA до 16,2±5,0 pA (n = 7 от 3 животных), p = 0,017, t-тест (Рисунок 96В, верхняя часть).

Учитывая тот факт, что значительный вклад в эксайтотоксичность вносят внесинаптические NMDA рецепторы, как правило, включающие субъединицу NR2B (496), мы исследовали медленные ПВ ВПСТ, которые формируются при вытекании глутамата за пределы синаптической щели и активации внесинаптических рецепторов. После добавления неселективного блокатора NMDA рецепторов, 25μM AP-5, амплитуда медленных ВПСТ снижалась со 175,6±43,5 pA до 81,9±27,1 pA (n = 8 от 3 животных), p = 0,044, парный t-тест (Рисунок 96А, нижняя часть). Селективный блокатор Ro25-

6981 в концентрации $0,5\mu\text{M}$, уменьшал амплитуду медленных ПВ ВПСТ с $96,8\pm 20,1$ pA до $55,4\pm 14,1$ pA ($n = 9$ от 3 животных), $p = 0,016$ (Рисунок 96Б, нижняя часть). Мемантин, являясь неселективным блокатором NMDA рецепторов, в дозе $300\mu\text{M}$, также снижал амплитуду медленных ПВ ВПСТ с $204,5\pm 63,1$ pA до $145,2\pm 56,3$ pA ($n = 9$ от 3 животных), $p = 0,025$ (Рисунок 96В, нижняя часть).

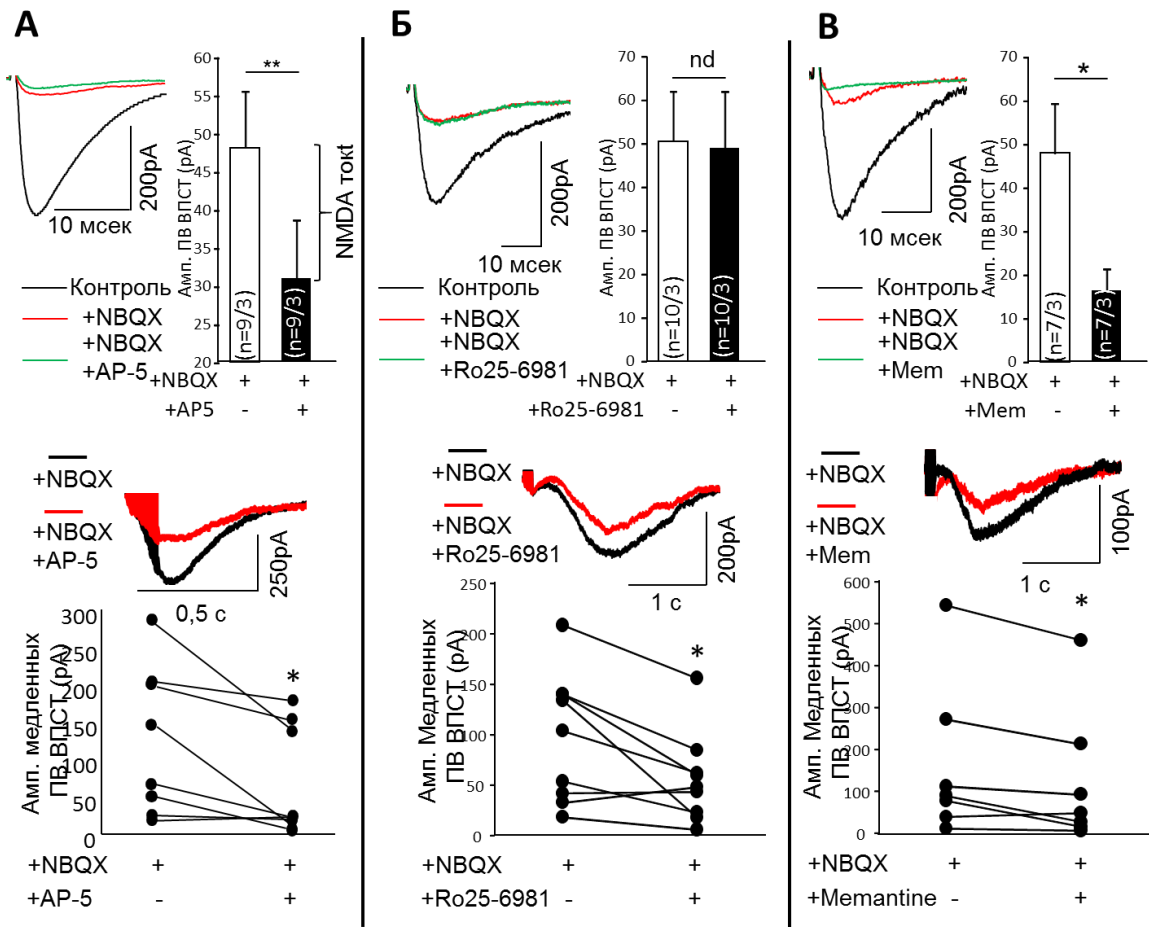


Рисунок 96. NMDA токи в КП. А. Вверху представлены репрезентативные кривые быстрых ПВ ВПСТ без добавления блокаторов (чёрная линия), после добавления $20\mu\text{M}$ NBQX (красная линия) и после добавления $25\mu\text{M}$ AP-5 (зелёная линия). Ниже показан график усреднённых амплитуд быстрых ПВ ВПСТ после добавления соответствующих блокаторов. Амплитуда контрольных токов не показана. В нижней части представлены кривые

медленных ПВ ВПСТ после добавления 20µM NBQX (чёрная линия) и 25µM AP-5 (красная линия). Ниже представлена связанная точечная диаграмма отдельных амплитуд медленных ПВ ВПСТ с добавлением соответствующих блокаторов. Б. Вверху представлены репрезентативные кривые быстрых ПВ ВПСТ без добавления блокаторов (чёрная линия), после добавления 20µM NBQX (красная линия) и после добавления 0,5µM Ro25-6981 (зелёная линия). Ниже показан график усреднённых амплитуд быстрых ПВ ВПСТ после добавления соответствующих блокаторов. Амплитуда контрольных токов не показана. В нижней части представлены кривые медленных ПВ ВПСТ после добавления 20µM NBQX (чёрная линия) и 0,5µM Ro25-6981 (красная линия). Ниже представлена связанная точечная диаграмма отдельных амплитуд медленных ПВ ВПСТ с добавлением соответствующих блокаторов. В. Вверху представлены репрезентативные кривые быстрых ПВ ВПСТ без добавления блокаторов (чёрная линия), после добавления 20µM NBQX (красная линия) и после добавления 300µM мемантин (зелёная линия). Ниже показан график усреднённых амплитуд быстрых ПВ ВПСТ после добавления соответствующих блокаторов. Амплитуда контрольных токов не показана. В нижней части представлены кривые медленных ПВ ВПСТ после добавления 20µM NBQX (чёрная линия) и 300µM AP-5 (красная линия). Ниже представлена связанная точечная диаграмма отдельных амплитуд медленных ПВ ВПСТ с добавлением соответствующих блокаторов. Количество (n) исследованных КП и животных (КП/животные) указано на графике. Звездочка указывает на статистически значимое различие по сравнению с соответствующими контролями (t-критерий Стьюдента; * p < 0,05).

Так как блокаторы мы добавляли непосредственно в раствор, омывающий срез, действие блокаторов могло распространяться на другие компоненты синапса, такие как ПВ и ГБ, и опосредованно влиять на снижение амплитуды ПВ ВПСТ. Для точной регистрации NMDA токов непосредственно в КП мы

записывали NMDA токи с внеклеточным раствором без Mg^{2+} и при различной деполяризации мембраны КП. При получении классического распределения NMDA токов с пиком значений в -20 мВ (497), (498) можно считать, что присутствие их будет доказано. При записи быстрых ПВ ВПСТ чистый NMDA ток, вычисленный после добавления мемантина (Рисунок 97А), имел линейное распределение с пиком амплитуды в $-52,4 \pm 22,9$ пА при деполяризации мембраны в -80 мВ (Рисунок 97Б). Однако NMDA компонент медленных ПВ ВПСТ после их вычитания (Рисунок 97Б), имел классическое U-образное распределение с пиком амплитуды $-94,3 \pm 29,7$ пА при деполяризации мембраны между -40 мВ и -20 мВ (Рисунок 97Б). Для исключения влияния ёмкостных характеристик на возбудимость мембраны КП мы нормировали записанные токи к ёмкости каждой клетки. Нормированные значения представлены на графике.

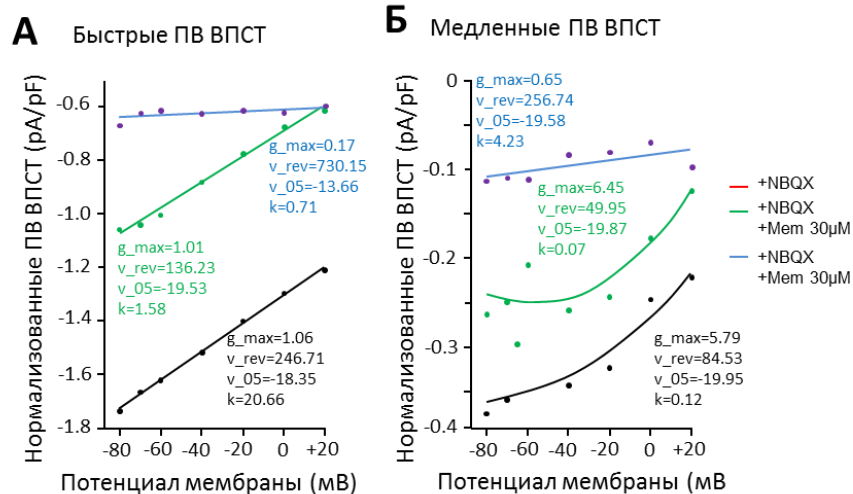


Рисунок 97. Валидация NMDA токов в КП. А. На точечной диаграмме представлена динамика средних амплитуд быстрых ПВ ВПСТ до (чёрные кружки) и после добавления $30\mu\text{М}$ мемантина (синие кружки) в зависимости от деполяризации мембраны. Разность данных токов представлена в виде зелёной точечной диаграммы. Б. На точечной диаграмме представлена динамика средних амплитуд медленных ПВ ВПСТ до (чёрные кружки) и

после добавления 30µM мемантина (синие кружки) в зависимости от деполяризации мембраны. Разность данных токов представлена в виде зелёной точечной диаграммы. Звездочка указывает на статистически значимое различие по сравнению с соответствующими контролями (парный t-критерий Стьюдента; * $p < 0,05$).

Данный факт доказывает, что в КП присутствуют внесинаптические NMDA рецепторы, которые успешно блокируются мемантином.

3.4.2.2. Побочные эффекты мемантина

Однако у данного препарата описаны побочные эффекты. Так ранее было показано, что длительное введение мемантина лабораторным мышам вызывает тревогу, связанную с функциональным замедлением захвата глутамата без влияния на экспрессию NMDA-рецепторов (498). Более того, дозы до 30 мг/кг влияли на вскармливание, передвижение и уход. У некоторых животных появлялась атаксия и стереотипные поведения в дозе мемантина 30 мг/кг и более (499).

Чтобы проверить, может ли длительное лечение мемантином само по себе влиять на двигательную активность, мы давали мышам в поилке мемантин в течение 9 недель и оценивали их координацию с помощью вращающейся дорожки (Рисунок 98А). Как леченные, так и нелеченные мыши улучшали свои показатели при постепенном увеличении скорости (Рисунок 98Б) с 1-го по 2-й день тестирования, но нелеченные мыши затем постепенно улучшали свои показатели до 4-го дня, которые оставались примерно на том же уровне и на 5-й день. Однако мыши, получавшие мемантин, не смогли улучшить время удержания на вращающейся дорожке выше своих показателей 2-го дня, а на 4-й и 5-й дни результаты были значительно хуже, чем у контрольных мышей. Так на 5-й день контрольные мыши оставались на дорожке $233,7 \pm$

11,3 с (16 животных), тогда как мыши, леченные мемантином, только $176,0 \pm 24,1$ с (11 животных; $p = 0,024$, Рисунок 98В) (500).

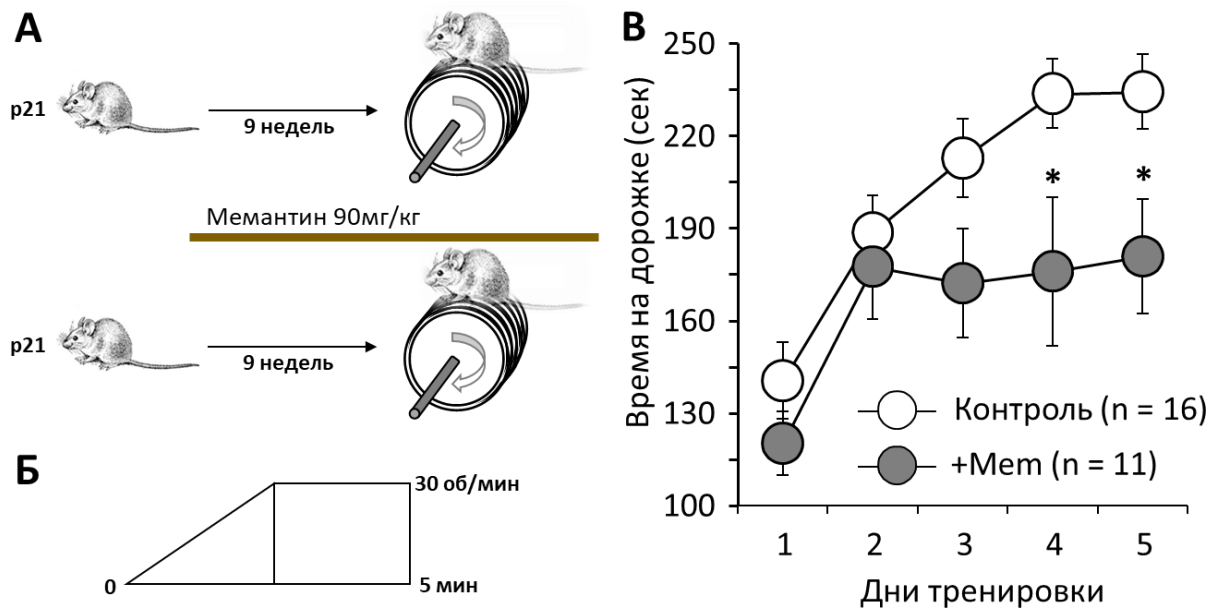


Рисунок 98. Длительное введение мемантина ухудшает двигательное поведение у мышей. (А) Экспериментальные группы: контрольные мыши не получали никаких лекарств, в то время как испытываемая группа потребляла мемантин (примерно до 90 мг/кг в сутки с питьевой водой) с 21-го постнатального дня (р21) в течение 9 недель. (Б) протокол ускоренного режима. Скорость увеличивалась от 0 до 30 об/мин в течение первых 3 мин, а затем оставалась стабильной в течение 2 мин. (В) Усредненные данные времени нахождения на вращающейся дорожке контрольных мышей (белые кружки) и мышей, получавших мемантин (серые кружки) в течение 5 дней тестирования. (* $p < 0,05$; t-критерий с последующим апостериорным критерием HSD Тьюки для р-значений, скорректированных для множественных сравнений; n — количество мышей в каждой группе) (500).

Мы использовали контекстуальное формирование страха (fear conditioning), чтобы исследовать возможные эффекты хронического введения мемантина

на память. Контрольных мышей и мышей, получавших мемантин, обучали протоколу усвоения условного рефлекса в течение 3 дней (Рисунок 99А). Не было статистически значимой разницы в количестве эпизодов замирания между двумя группами в любой из дней; $p = 0,16$ (Рисунок 99Б). Однако мыши, получавшие мемантин, продемонстрировали значительно более короткое время замирания на 3-й день при оценке сохранения памяти ($205,8 \pm 12,6$ с, 24 мыши по сравнению с $248,7 \pm 9,7$ с, 17 мышей; $p = 0,0099$) (Рисунок 99В). Таким образом, хроническое потребление мемантина нарушало запоминание условного сигнала (500).

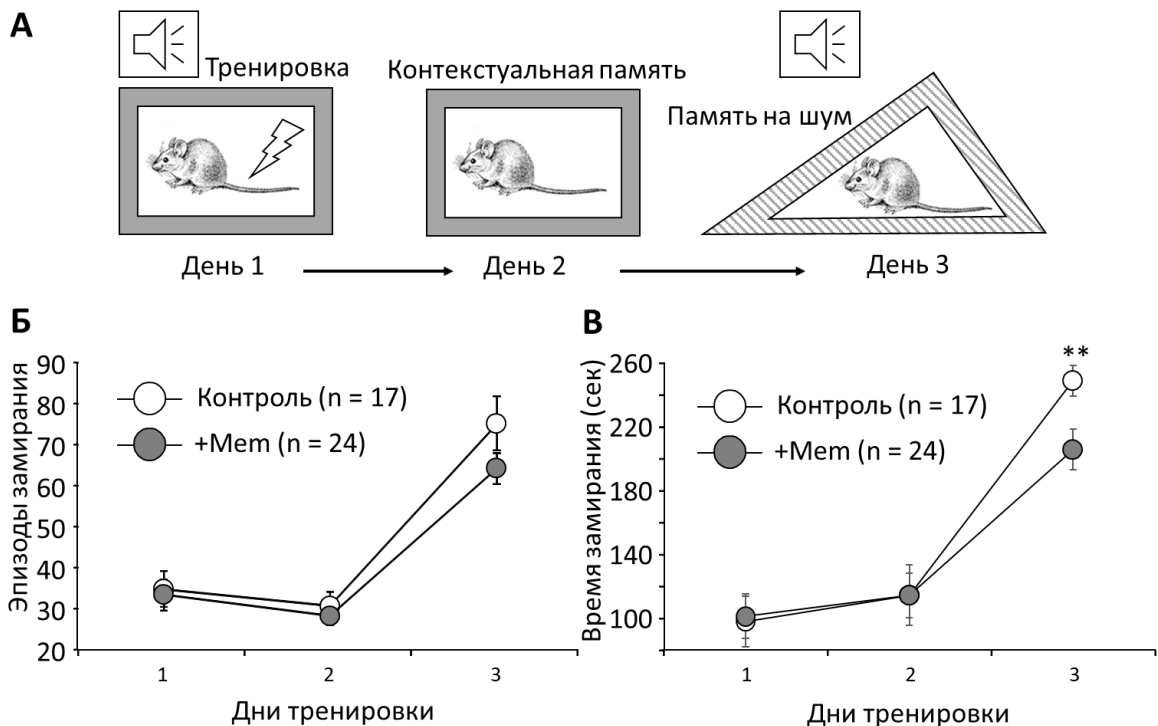


Рисунок 99. Мемантин ухудшает память в парадигме условного рефлекса страха. (А) Схема тренировки условному рефлексу страха. День 1: Тренировка состояла из трех ударов током после воспроизведения белого шума. День 2: Тест на контекстуальную память. День 3: Тест на шумовую память. (Б) Количество эпизодов замирания во время и после тренировки. Количество эпизодов замирания на 3-и сутки после тренировки под

действием мемантина значимо не менялось ($p > 0,05$). (B) Общее время эпизодов замирания, вызванных слуховой стимуляцией на 3-й день, было значительно уменьшено у мышей, получавших мемантин (** $p < 0,001$; t-критерий с последующим апостериорным тестом HSD Тьюки для корректировки p-значений для множественного сравнения; n — количество мышей в каждой группе) (500).

После тщательного анализа данных с вращающейся дорожкой мы пришли к выводу, что подавление приобретения новых двигательных навыков не обязательно было основной причиной плохой координации мышей, получавших мемантин. Во время теста мыши часто прыгали и пытались убежать с дорожки; однако такое поведение у контрольных мышей обычно прекращается после второго дня, когда мыши становятся спокойнее и остаются на дорожке на протяжении всего теста. Однако мыши, получавшие мемантин, демонстрировали этот тип тревожного поведения до последнего дня теста. По этой причине мы проверили их тревожность, используя протокол приподнятого крестообразного лабиринта. Мыши, получавшие мемантин, проводили в закрытых рукавах столько же времени, сколько и контрольные мыши в первый и второй дни обучения (Рисунок 100А). Однако с третьего дня мыши, получавшие мемантин, проводили значительно больше времени в закрытых рукавах, что является общепринятым показателем тревожности (например, на 3-й день $163,9 \pm 20,2$ с против $79,6 \pm 16,3$ с, $p = 0,008$). Разница наблюдалась до 5-го дня ($133,4 \pm 21,0$ с и $61,0 \pm 21,9$ с соответственно, $p = 0,036$; Рисунок 100А, Б). Интересно, что эти различия следовали за изменениями координации, выявленных с помощью вращающейся дорожки (Рисунок 100В) (500).

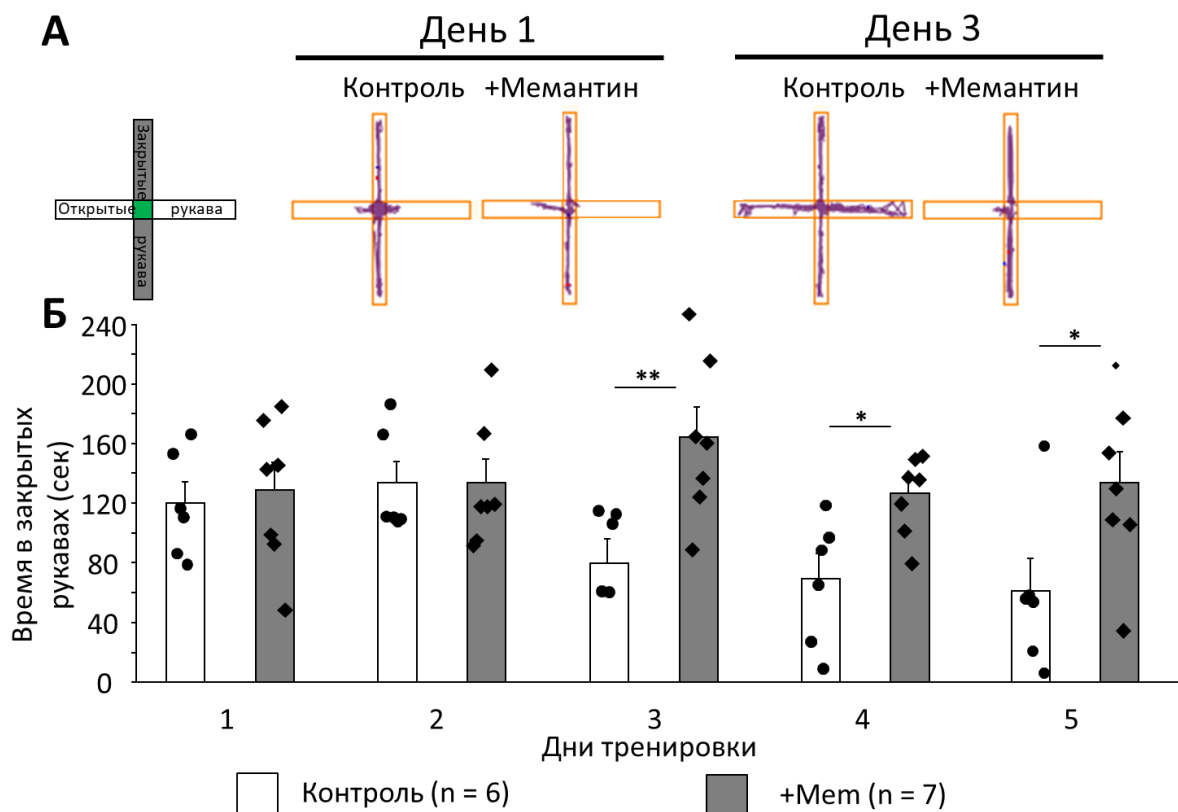


Рисунок 100. Тест приподнятого крестообразного лабиринта выявил стойкое тревожное поведение у мышей после длительного введения мемантина. (А) Совокупные карты движения мышей в рукавах приподнятого крестообразного лабиринта в день 1 (левая панель) и 3 (правая панель) обучения. (В) Время, проведенное в закрытых рукавах. Отдельные точки данных показаны в виде чёрных кружков для контрольных мышей и чёрных ромбов для мышей после хронического потребления мемантина. К 3-му дню контрольные мыши преодолели свое беспокойство и начали исследовать открытые рукава, в то время как мыши, получавшие мемантин, оставались в основном в закрытых рукавах (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; n — количество мышей в каждой группе) (500).

Предыдущие результаты показали, что хронический прием мемантина может усиливать тревожность при некоторых условиях или делать мышей склонными к депрессивному поведению. Поэтому мы использовали тест

подвешивания мышей за хвост (TST) как показатель безысходности, часто используемый в исследованиях антидепрессантов (426). У животных, получавших мемантин, наблюдалось значительно больше эпизодов неподвижности ($14,9 \pm 2,0$, 13 животных против $8,9 \pm 1,4$, 14 животных соответственно, $p = 0,026$; Рисунок 101А). Более того, периоды неподвижности у этих животных были значительно дольше ($102,1 \pm 14,5$ и $43,4 \pm 6,2$ соответственно, $p = 0,0016$; Рисунок 101Б) (500).

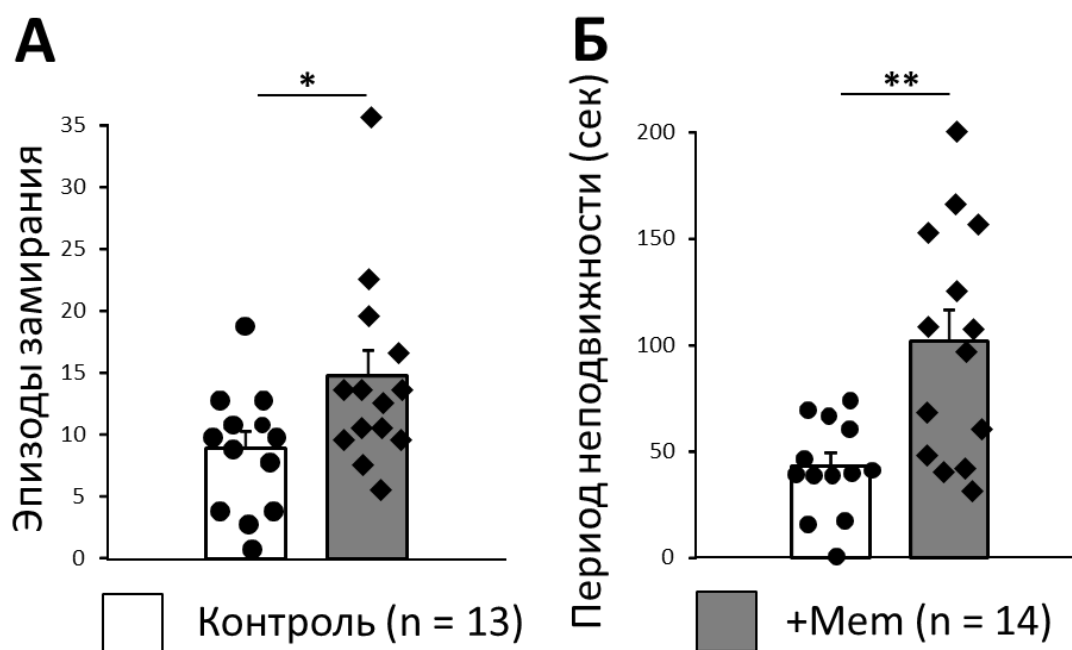


Рисунок 101. Тест подвешивания за хвост демонстрирует повышенное тревожное поведение у мышей, постоянно получавших мемантин. (А) Эпизоды неподвижности и (Б) период неподвижности в течение 360 с общей продолжительности теста. Отдельные точки данных показаны в виде чёрных кружков для контрольных мышей и чёрных ромбов для мышей, получавших мемантин (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) (500).

В совокупности эти результаты показывают, что длительное введение мемантина препятствует адаптации к умеренно стрессовым условиям, таким

как свободное передвижение по рукавам крестообразного лабиринта. TST предполагает, что он вызывает признаки поведенческого отчаяния, которое обычно интерпретируется как элемент депрессивного фенотипа (426).

Ранее было показано, что хроническое подавление NMDA-рецепторов вызывает тревогу у мышей (501). Тревожность представляет собой сложное явление, вовлекающее различные структуры мозга, одним из которых является гиппокамп. Мы регистрировали полевые постсинаптические потенциалы (пВПСП) с вентрального гиппокампа, который в предыдущих исследованиях был связан с тревожным поведением (502), (503), (505). Важно отметить, что гиппокамп брали у мышей, которым хронически вводили мемантин, но во время этих экспериментов мемантин отсутствовал в перфузионной среде. Таким образом, наблюдаемые эффекты должны быть связаны с длительными модификациями либо глутаматергических синапсов, либо систем удаления астроцитарного глутамата. При применении одиночных стимулов в областях CA1 и CA3 вентрального гиппокампа мышей пролеченных мемантином, значительно снижала амплитуды пВПСП. В CA1 средняя амплитуда пВПСП снизились с $0,38 \pm 0,02$ мВ до $0,29 \pm 0,02$ мВ ($p = 0,005$), а в CA3 — с $0,36 \pm 0,04$ мВ до $0,22 \pm 0,03$ мВ ($p = 0,028$; Рисунок 102А, Б, левые графики; Таблица 16 и Таблица 17). τ пВПСП после применения отдельных стимулов существенно не менялось (Таблица 16 и Таблица 17). Чтобы загрузить синапс глутаматом и лучше выявить работу системы поглощения, мы облегчили высвобождение нейротрансмиттера из пресинаптических окончаний, используя серии из 10 электрических стимулов (частота 10 кГц). В таких условиях мы обнаружили удлинение τ с $4,2 \pm 0,3$ мс до $5,9 \pm 0,5$ мс ($p = 0,006$) в области CA1 (Рисунок 102А и таблица 16). В CA3 мы не обнаружили этого эффекта ($p = 0,58$; Рисунок 102Б и Таблица 17) (500).

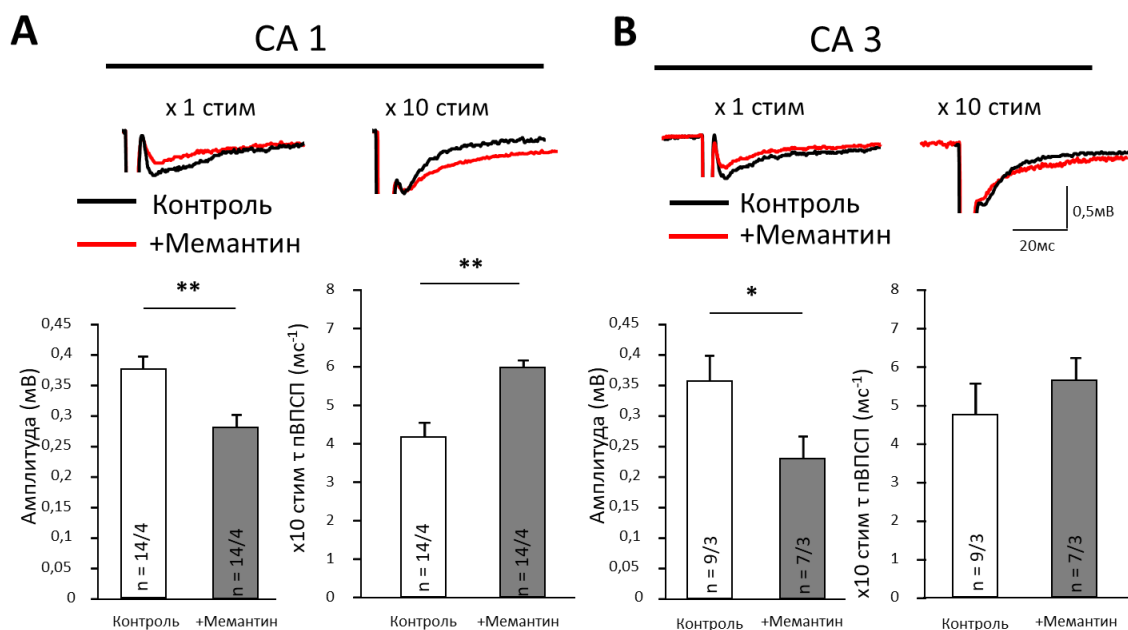


Рисунок 102. Хроническое лечение мемантином влияет на синаптическую передачу в гиппокампе. (А) Записи пВПСП из области СА1. (Б) Записи пВПСП из области СА3. Верхняя часть — репрезентативные кривые пВПСП после одного ($\times 1$) стимула или десяти ($\times 10$) стимулов в срезах от контрольных мышей (черные линии) и срезах от мышей после хронического потребления мемантина (красные линии). Нижняя часть — средние амплитуды пВПСП после $\times 1$ стимула (слева) и средние τ пВПСП после $\times 10$ стимулов (справа). Усреднённые амплитуды пВПСП, вызванные одиночным синаптическим стимулом, достоверно снижены в обеих областях гиппокампа (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Обратите внимание, что во время записи мемантин не присутствовал в ванночке, омывающей срез и был вымыт из ткани в ходе подготовки срезов и предварительной инкубации (500).

| CA1 | Амплитуда (мВ) | Время подъёма (мс) | τ пВПСП ($\times 1$ стим.) | τ пВПСП ($\times 10$ стим.) |
|-----------------------|-------------------|--------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Контроль (n=14/4) | 0.38 \pm 0.02 | 2.8 \pm 0.4 | 7.9 \pm 0.5 | 4.2 \pm 0.3 |
| +Мемантин (n=14/4) | 0.29 \pm 0.02** | 2.2 \pm 0.2 | 7.8 \pm 0.7 | 5.9 \pm 0.5** |

Таблица 16. Амплитуды и кинетика пВПСП в области CA1 гиппокампа. Показаны τ после одного ($\times 1$ стим.) или десяти ($\times 10$ стим.) стимулов. Звездочками отмечены статистически значимые различия (** $p < 0,01$; n — количество тестируемых зон и животных (зон/животных)) (500).

| CA3 | Амплитуда (мВ) | Время подъёма (мс) | τ пВПСП ($\times 1$ стим.) | τ пВПСП ($\times 10$ стим.) |
|----------------------|-------------------|--------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Контроль (n=9/3) | 0.36 \pm 0.04 | 2.1 \pm 0.1 | 5.2 \pm 0.6 | 4.9 \pm 0.9 |
| +Мемантин (n=7/3) | 0.22 \pm 0.03* | 1.7 \pm 0.2 | 4.9 \pm 1.1 | 5.4 \pm 0.5 |

Таблица 17. Амплитуды и кинетика пВПСП вентральной области CA3 гиппокампа. Показаны τ после одного ($\times 1$ стим.) или десяти ($\times 10$ стим.) стимулов. Звездочками отмечены статистически значимые различия (* $p < 0,05$; n — количество тестируемых зон и животных (зон/животных)) (500).

In vivo мемантин остается в плазме до 132 часов после перорального введения (505) и может быть обнаружен в мозге мыши через 100 минут после введения (506). По данным микродиализа период полувыведения мемантина в мозге грызунов составляет примерно 3 ч (507). Такой временной ход подразумевает, что мемантин присутствовал в тканях во время наших тренировок с мышами in vivo. Однако мемантин эффективно вымывается из

ткани во время приготовления срезов и перфузии *in vitro* (508). Следовательно, эффекты, которые мы наблюдали в записях пВПСП, скорее всего, не могут быть объяснены прямым ингибированием NMDA-рецепторов. Скорее, эти данные убедительно свидетельствуют о том, что мемантин вызывает стойкие изменения в глутаматергической синаптической передаче в вентральном гиппокампе.

После подтверждения того, что мемантин вызывает тревожность, мы исследовали влияние мемантина на координацию СЦА1 модельных мышей, экспрессирующих мутантный атаксин 1 селективно в ГБ. У контрольных мышей, экспрессирующих нормальный атаксин 1 [Q2] также было выявлено отсутствие улучшения показателей нахождения на вращающейся дорожке с 3 по 5 день тренировок. В последний 5 день этот показатель снизился с $216,8 \pm 13,7$ сек ($n = 13$) до $165,5 \pm 18,5$ сек ($n = 8$), $p = 0,042$, t-тест (Рисунок 103А). У животных, экспрессирующих мутантный атаксин 1 [Q85] в ГБ данный эффект не был замечен в силу того, что без лечения мемантина координация была изначально нарушена, и мыши, пролеченные мемантином с 3 по 5 день, показывали схожие результаты на вращающейся дорожке. Однако мы заметили, что в первый день тренировок мыши пролеченные мемантином показывали значительно лучшие результаты. Время нахождения на дорожке увеличилось с $86,2 \pm 9,6$ сек ($n = 11$) до $125,6 \pm 15,3$ сек ($n = 12$), $p = 0,042$ (Рисунок 103Б).

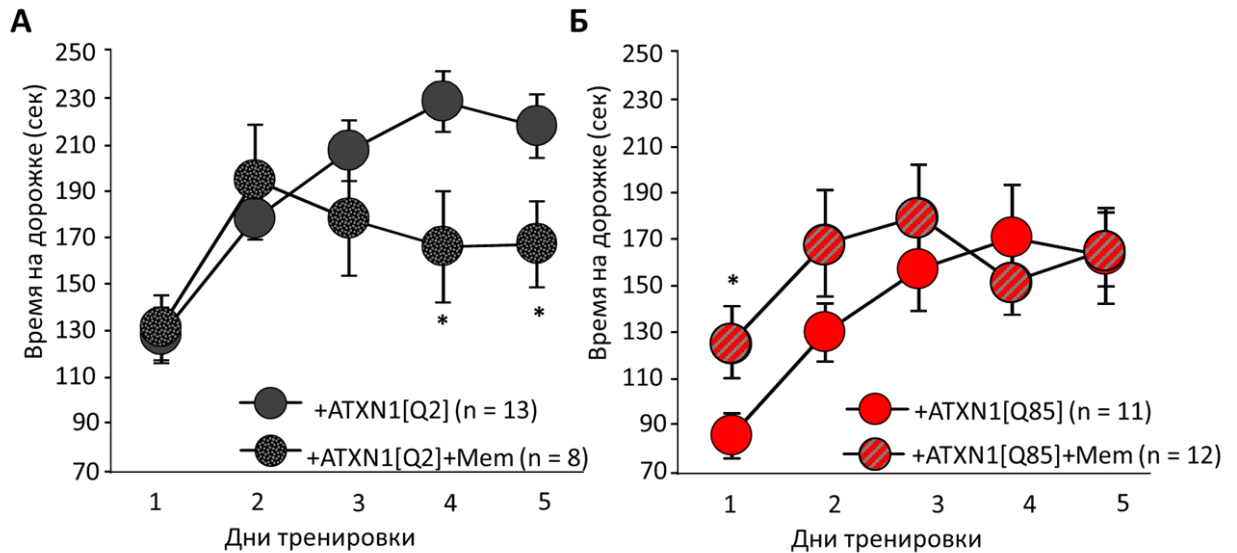


Рисунок 103. Длительное введение мемантина не улучшает двигательное поведение у СЦА1 модельных мышей. Экспериментальные группы: контрольные мыши, экспрессирующие селективно атаксин 1[Q2] и опытные, экспрессирующие атаксин 1 [Q85] в ГБ, потребляли мемантин (примерно до 90 мг/кг в сутки с питьевой водой) с 21-го постнатального дня (р21) в течение 9 недель. (А) Усредненные данные времени нахождения на вращающейся дорожке контрольных мышей без лечения (серые кружки) и после лечения мемантином (чёрные кружки с серыми вкраплениями). (Б) Усредненные данные времени нахождения на вращающейся дорожке опытных мышей без лечения (красные кружки) и после лечения мемантином (красные кружки с серыми линиями). * $p < 0,05$; t-критерий с последующим апостериорным критерием HSD Тьюки для р-значений, скорректированных для множественных сравнений; n — количество мышей в каждой группе).

Это может указывать на то, что мемантин способствует сохранению нейронов и астроцитов в коре мозжечка при нейродегенерации. Для подтверждения данного факта мы исследовали эффекты мемантина на морфологию ГБ и КП в общей оптогенетической модели нейродегенерации мозжечка и наших моделях нейродегенерации мозжечка.

3.4.2.3. Мемантин уменьшает нарушение морфологии ГБ и КП

Мы использовали ранее описанную модель астроглиоза и нейродегенерации мозжечка. Через 4 дня после фотостимуляции экспрессия анти-GFAP (астроцитарный маркер) сильно увеличивалось, в то время как экспрессия анти-Кальбиндина (маркер КП) значительно снижалось по сравнению с животными, которых не подвергали фотостимуляции (Рисунок 104А и Б). Мемантин (~90 мг/кг/день) сильно снижал накопление окрашивания/экспрессии анти-GFAP (Рисунок 104В) (509).

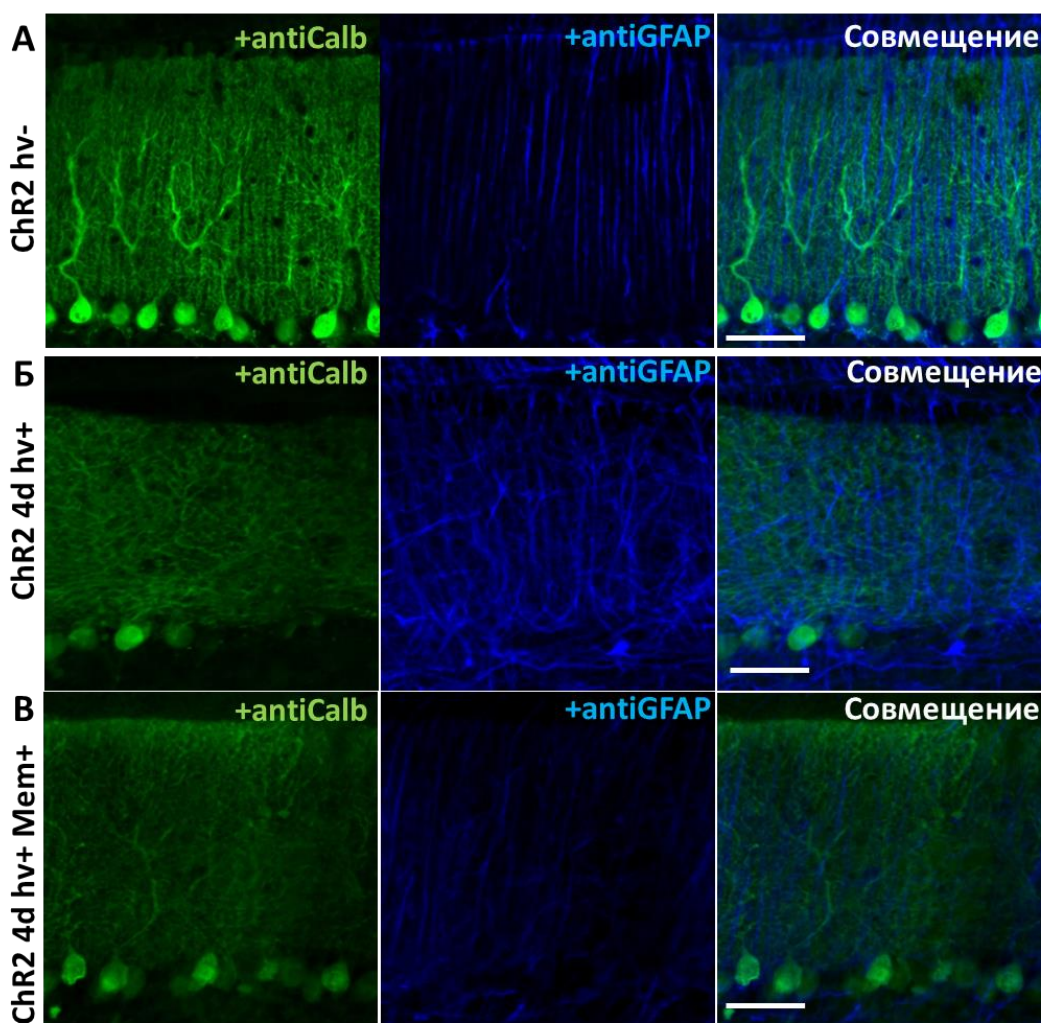


Рисунок 104. Мемантин предотвращает изменения морфологии клеток мозжечка, вызванные хронической фотостимуляцией БГ^{ChR2}. Конфокальные изображения коры мозжечка, меченные антителами к кальбиндину (маркер

КП) и антителами к GFAP (маркер ГБ). А. Животные без фотостимуляции (hv-). Б. Животные с хронической фотостимуляцией, не получавшие лечения (hv+). В. Животные с хронической фотостимуляцией (hv+), получавшие мемантин (Mem+). Лечение мемантином предотвращало потерю КП и снижало экспрессию GFAP. Мерная шкала 50 μm (509).

В СЦА1 модели с селективным поражением ГБ мы выявили схожее влияние мемантина на патогенетический процесс. Для контрольных мышей мы использовали PBS и атаксин 1 с нормальной короткой полиглутаминовой цепочкой (LVV GFAP-ATXN1 [Q2]). В опытной группе мыши экспрессировали мутантный атаксин 1 с длинной полиглутаминовой цепочкой (LVV GFAP-ATXN1 [Q85]). Для предотвращения нейродегенерации мозжечка в нашей модели СЦА1 мы добавляли мемантин в питьевую воду в концентрации 90 мг/кг.

Через 9 недель после инъекции 3 μl LVV в коре мозжечка был обнаружен выраженный анти-Flag-сигнал. Окрашивание было локализовано с GFAP (астроцитарный маркер) в ГБ и было в основном сосредоточено во внутренней части МС (Рисунок 105).

После хронической фотостимуляции толщина отростков ГБ, экспрессирующих ChR2, увеличилась с $1,57 \pm 0,05$ μm до $1,81 \pm 0,05$ μm , $p=0,003$, а их длина уменьшилась с $186,0 \pm 8,1$ μm до $150,8 \pm 3,6$ μm , $p=0,002$ (Рисунок 105А, Б, Г-Е). Мемантин предотвращал реактивность БГ, толщина отростков БГ ($1,62 \pm 0,04$ мкм) $p=0,003$ и их длина ($171,9 \pm 5,4$ мкм), $p=0,005$, (однофакторный дисперсионный анализ с последующим апостериорным критерием Тьюки; Рисунок 105А, Б, Г-Е) (509).

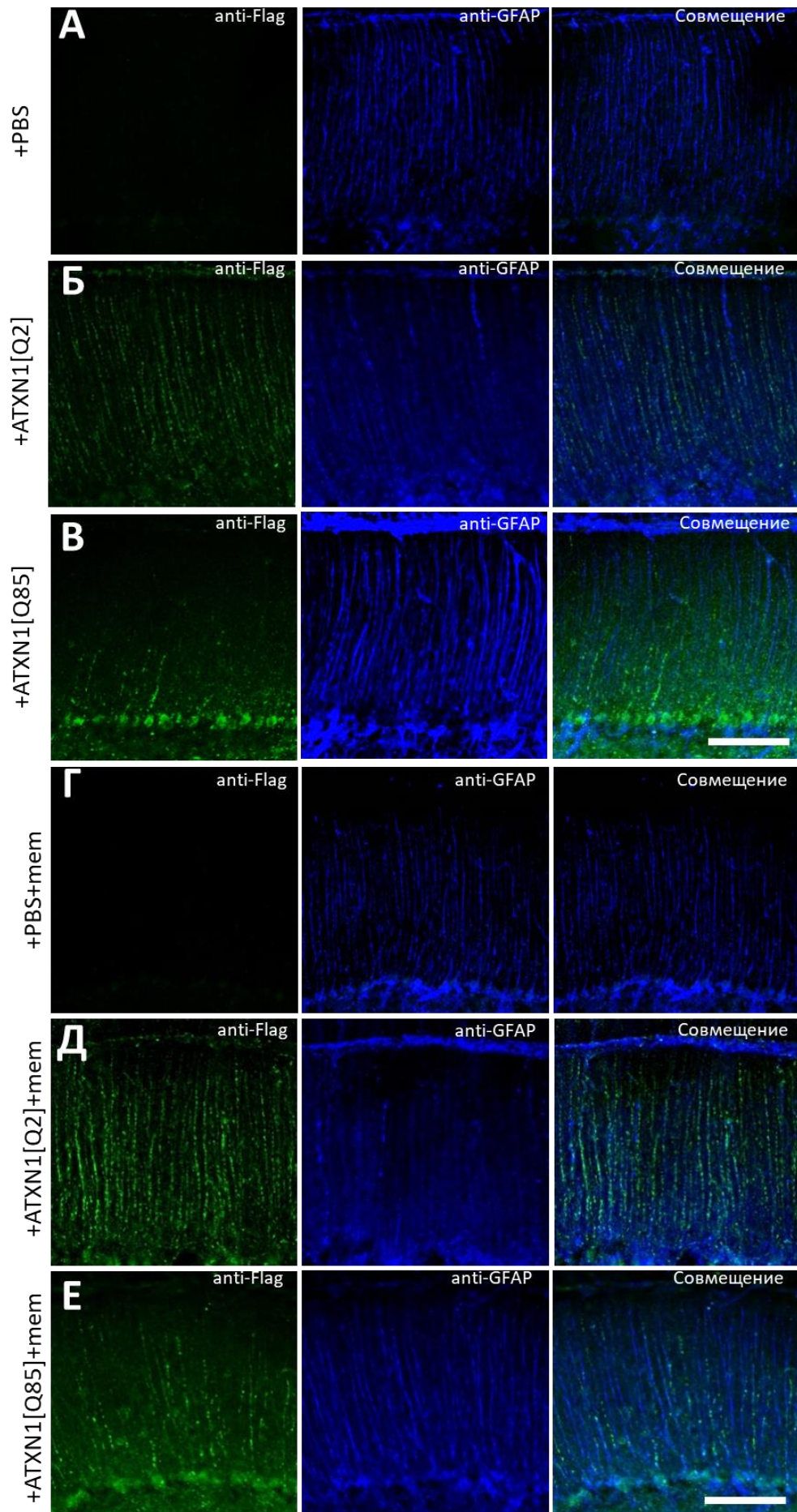


Рисунок 106. Мемантин предотвращает патологическую трансформацию ГБ и КП, вызванную оптогенетической гиперактивацией ГБ. Конфокальные изображения коры мозжечка, помеченной анти-GFAP (глиальный маркер) (А), анти-Кальбиндин (маркер КП) (В). Профиль интенсивности анти-GFAP-сигнала показывает количество пиков, которые маркируют отростки ГБ (вставка А). Такой подход позволяет оценить толщину одного отростка ГБ (Б). Масштабная линейка 1 μm . Количество КП подсчитывали на протяжении 100 μm СКП (В). Отростки ГБ были длиннее толщины МС. Эти данные были измерены отдельно (Г). Мерная шкала 50 μm . (Д) – средняя толщина отростков ГБ. (Е) Средняя длина отростков ГБ. (Ж) – Среднее количество КП на 100 μm СКП. (З) – График показывает толщину МС через 4 дня после фотостимуляции. Отростки ГБ более толстые, короткие и извитые. Мемантин предотвращает патологическую трансформацию отростков ГБ. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; † $p < 0,05$; †† $p < 0,01$ (509).

После инъекции LVV мутантный атаксин 1 индуцировал астроглиоз. Окраска анти-GFAP было сильно увеличено в мозжечке этих мышей. Мемантин сильно снижал накопление анти-GFAP-окраски отростков ГБ, экспрессирующих мутантный атаксин 1 (Рисунок 107А). Количество отростков ГБ, экспрессирующих мутантный атаксин 1, уменьшилось с $19,7 \pm 0,4$ до $17,8 \pm 0,5$, $p = 0,0096$, а их длина уменьшилась с $253,8 \pm 6,1$ мкм до $228,5 \pm 6,7$ мкм, $p = 0,0092$ (Рисунок 107Б и В). Толщина отростков ГБ увеличилась с $1,6 \pm 0,0$ до $2,2 \pm 0,3$ мкм, $p = 0,044$. Мемантин предотвращал реактивность БГ, уменьшая толщину отростков БГ ($1,6 \pm 0,1$ мкм) $p = 0,041$ и не влиял на количество и длину (односторонний дисперсионный анализ с последующим апостериорным тестом Тьюки; рисунок 107Г) (509). Не обнаружено значимого влияния мемантина на морфологию ГБ в контрольных группах мышей (данные не представлены).

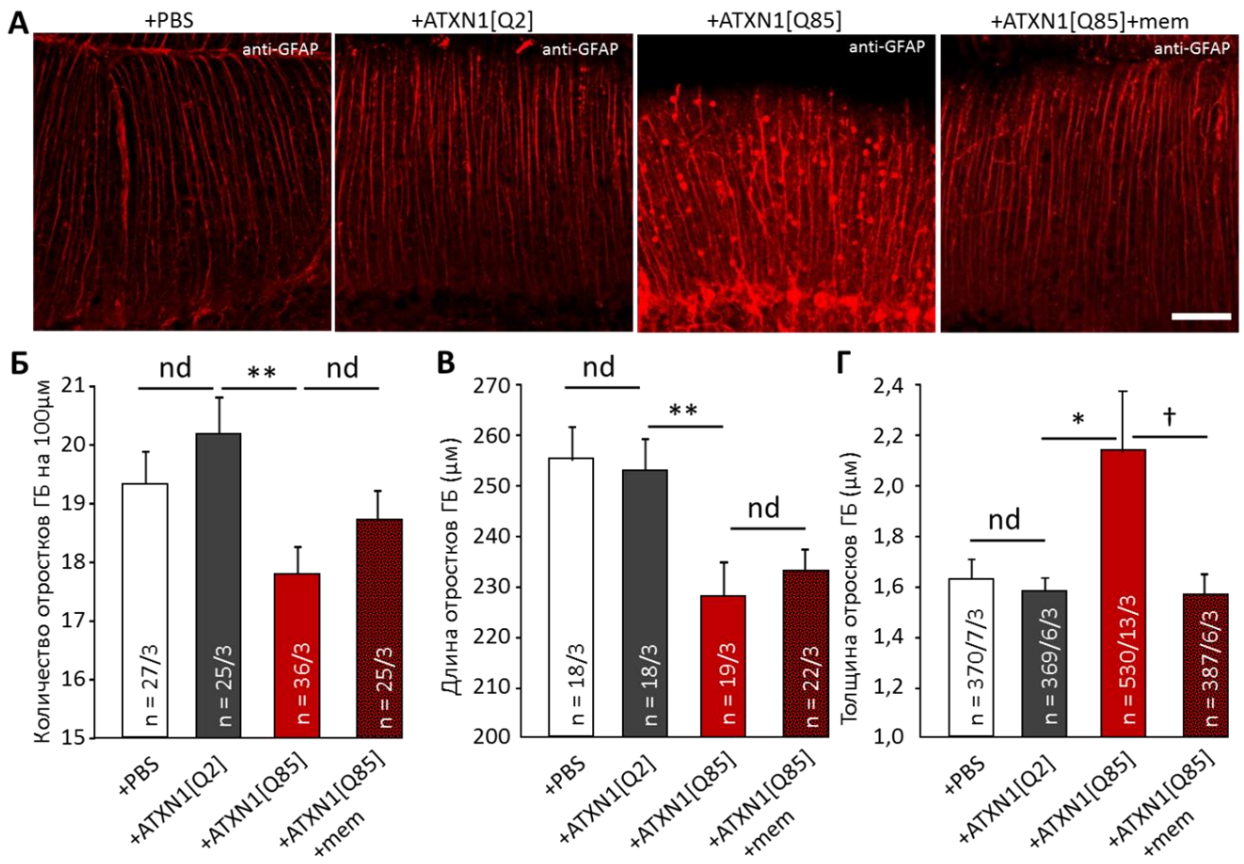


Рисунок 107. Мемантин предотвращает патологическую трансформацию ГБ, вызванную селективной экспрессией мутантного атаксина 1 в этих клетках. (А) Конфокальные изображения коры мозжечка, помеченные анти-GFAP (глиальный маркер). Масштабная шкала 50 μм. (Б) Среднее количество отростков ГБ на 100 μм СКП. (В) Длина (Г) и толщина отростков ГБ. Мемантин предотвращает патологическую трансформацию отростков ГБ, уменьшая их толщину, но не влияя на длину и количество. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; † $p < 0,05$ (509).

Используя метод фиксации потенциала, мы исследовали ёмкость КП, которая напрямую связана с их размером. Средняя ёмкость КП у мышей без фотостимуляции составила $725,1 \pm 39,5$ pF ($n = 8$ клеток от 3 мышей), а фотостимуляция уменьшила её до $494,2 \pm 63,2$ pF ($n = 10$ клеток от 3 мышей;

$p = 0,007$; Таблица 18). Мемантин значительно предотвращал уменьшение ёмкости КП ($682,2 \pm 24,5$ pF, 7 клеток от 3 мышей, $p = 0,0038$ по сравнению с животными без стимуляции; Таблица 18). Эти данные свидетельствуют о том, что мемантин в значительной степени предотвращает патологические изменения в коре мозжечка, вызванные хронической специфической оптогенетической стимуляцией ГБ (509).

| Группа | Ёмкость (pF) | Ra (MΩ) | Rm (MΩ) |
|--|--------------|----------|------------|
| +GFAP-ChR2-mKate (hv-) (n=8/3) | 725,1±39,5 | 12,4±0,6 | 186,3±28,2 |
| +GFAP-ChR2-mKate (+ 4d hv) (n=10/3) | 494,2±63,2 | 13,8±1,4 | 211,5±34,5 |
| +GFAP-ChR2-mKate (+ 4d hv) + Mem (n=7/3) | 682,2±24,5** | 14,3±0,9 | 173,4±33,6 |

Таблица 18. Влияние мемантина на основные пассивные электрофизиологические свойства в КП у мышей, которым вводили AVV GFAP-ChR2-mKate после хронической фотостимуляции. Ra – сопротивление доступа, Rm – сопротивление мембраны. Количество (n) исследованных КП и животных (КП/животные) указано в таблице, * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; † $p < 0,001$ (509).

Мы визуализировали апикальные дендриты КП с помощью окрашивания анти-кальбиндином (Рисунок 108А). МС был значительно тоньше у животных, пораженных мутантным атаксином 1, по сравнению с животными, инфицированными нормальным атаксином 1, от $234,6 \pm 4,3$ μм до $169,4 \pm 2,7$ μм ($p = 2,3 \times 10^{-15}$, односторонний дисперсионный анализ с последующим апостериорным тестом Тьюки; Рисунок 108Б). Мемантин частично восстановил толщину МС после 9 недель приема до $187,7 \pm 4,1$ μм ($p =$

0,0004, однофакторный дисперсионный анализ с последующим апостериорным тестом Тьюки; Рисунок 108Б). Количество ПК также уменьшилось с $3,2 \pm 0,2$ до $1,7 \pm 0,2$ на 100 $\mu\text{м}$ длины МС, $p = 3,02 \times 10^{-6}$, однофакторный дисперсионный анализ с последующим апостериорным критерием Тьюки. Мемантин частично восстановил количество КП до $2,2 \pm 0,1$ ($p = 0,0003$, однофакторный дисперсионный анализ с последующим апостериорным тестом Тьюки), по сравнению с группой, которой вводили нормальный атаксин 1 (Рисунок 108В). Никаких различий не было обнаружено у мышей, получавших PBS с обработкой мемантином или без нее. Таким образом, мемантин частично предотвращает изменения морфологии КП в мозжечке у мышей нашей модели СЦА1 (509).

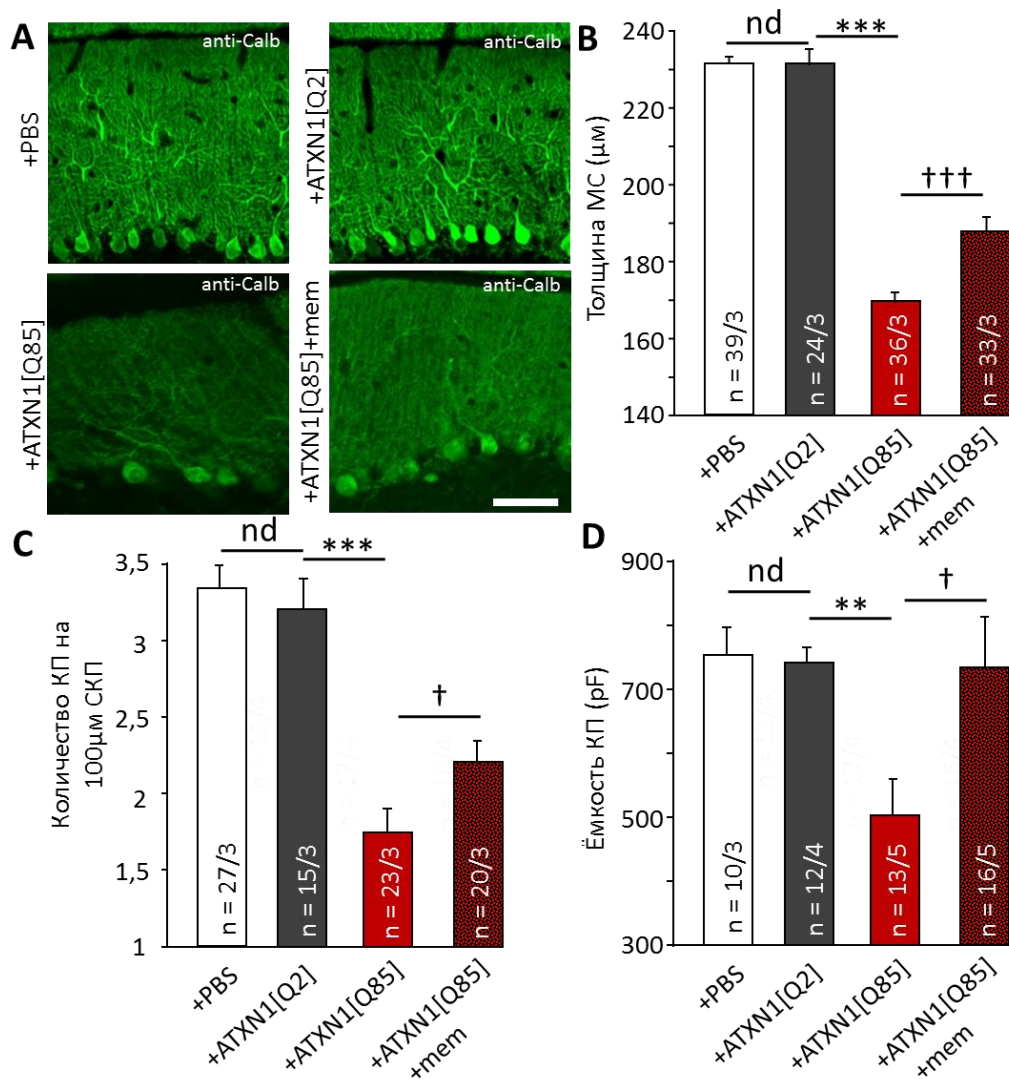


Рисунок 108. Мемантин предотвращает изменения морфологии КП в СЦА1 модели с селективной экспрессией атаксина 1 в ГБ. А. Конфокальные изображения коры мозжечка, меченные антителами к кальбиндину (маркер КП). Мерная шкала 50 μm . Б. Средняя толщина МС. В. Среднее количество КР на 100 μm СКП. Г. Средняя ёмкость КП. Количество (n) исследованных КП и животных (КП/животные) указано на графиках. **p < 0,01; *** p < 0,001; † p < 0,05 (509).

3.4.2.4. Мемантин уменьшает нарушение синаптической передачи

Мы проверили, влияет ли хроническая фотостимуляция на синаптическую передачу в синапсах ПВ-КП. В этих экспериментах амплитуда ПВ ВПСТ снизилась с $298,1 \pm 64,6$ (n=8 клеток от 3 мышей) до $141,0 \pm 23,1$ (n=10 клеток от 3 мышей; p=0,033; Таблица 19).

У мышей, получавших мемантин, амплитуда ПВ ВПСТ составила $195,0 \pm 33,7$ pA (n = 7 клеток от 3 мышей) и достоверно не отличалась от таковой у не стимулированных животных (p = 0,19) (509).

| Группа | Амплитуда ПВ ВПСТ | PPF | Время подъёма (мс) | Пост. спада τ (мс ⁻¹) |
|--|--------------------|---------------|--------------------|--|
| +GFAP-ChR2-mKate (hv-) (n=8/3) | $298,1 \pm 64,6$ | $1,8 \pm 0,1$ | $2,2 \pm 0,3$ | $16,0 \pm 2,1$ |
| +GFAP-ChR2-mKate (+ 4d hv) (n=10/3) | $141,0 \pm 23,1^*$ | $1,8 \pm 0,1$ | $2,4 \pm 0,4$ | $21,0 \pm 3,0$ |
| +GFAP-ChR2-mKate (+ 4d hv) + Mem (n=7/3) | $195,0 \pm 33,7$ | $1,8 \pm 0,1$ | $2,2 \pm 0,2$ | $18,8 \pm 2,0$ |

Таблица 19. Влияние мемантина на основные AMPA-опосредованные ПВ ВПСТ в КП у мышей, которым вводили AVV GFAP-ChR2-mKate после хронической фотостимуляции. Показана кинетика ПВ ВПСТ (время

нарастания 10%-90% и постоянная времени спада) и их амплитуды. Коэффициент PPF анализировали с использованием двух стимулов с межстимульным интервалом 50 мс. Коэффициент PPF измеряли как вторую амплитуду ПВ ВПСТ, нормализованную к первой. Однофакторный дисперсионный анализ с последующим апостериорным критерием Тьюки, показывает значительное влияние на ёмкость и амплитуду ПВ ВПСТ. Количество (n) исследованных КП и животных (КП/животные) указано в таблице, *p < 0,05; **p < 0,001; † p < 0,001 (509).

Чтобы исследовать захват глутамата из синаптической щели, мы регистрировали ПВ ВПСТ после тетанус-стимуляции ПВ из 10 импульсов. Амплитуды ПВ ВПСТ существенно не различались между группами (Рисунок 109А). Однако хроническая фотостимуляция удлиняла τ ВПСТ с $16,0 \pm 2,0 \text{ мс}^{-1}$ (n = 12 клеток от 3 мышей) до $39,1 \pm 5,1 \text{ мс}^{-1}$ (n = 8 клеток от 3 мышей; p = 0,00014). Мемантин предотвращал такое увеличение τ . Данный показатель у таких животных составил $22,2 \pm 3,4 \text{ мс}^{-1}$, 10 клеток от 3 мышей и не отличался от значений у нестимулированных животных (p = 0,36, Рисунок 109Б) (509).

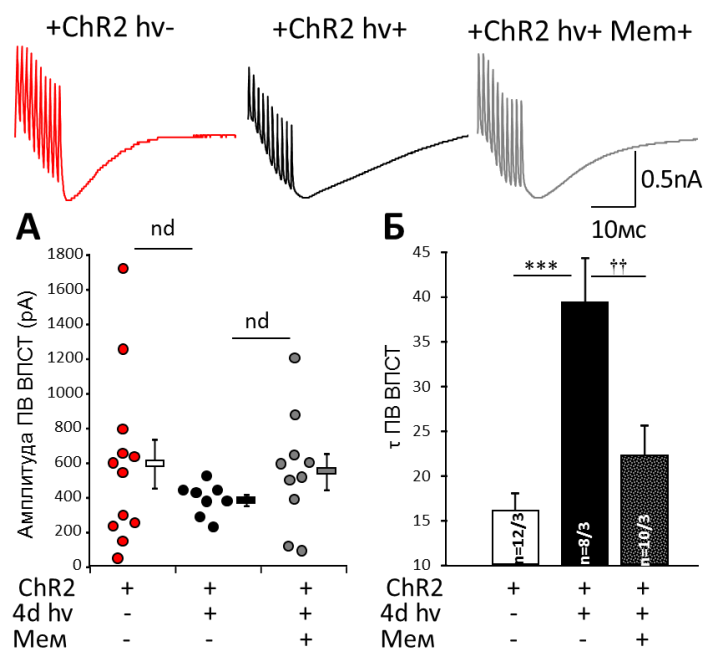


Рисунок 109. Хроническая фотостимуляция ГБ^{ChR2} влияет на синаптическую передачу ПВ-КП. Для оценки эффекта вытекания глутамата и его поглощения ГБ мы использовали тетанус-стимуляцию ПВ из 10 стимулов. Единичные (кружки) и усреднённые (прямоугольники) амплитуды кумулятивного ответа на серию из 10 стимулов показаны на графике. Усредненные данные достоверно не отличались во всех исследуемых группах (А). Удлинение τ ПВ ВПСТ в КП у животных после хронической фотостимуляции была заметной и значительно снижалась у животных, получавших мемантин (Б) *** $p < 0,001$; †† $p < 0,01$. Верхние вставки: репрезентативные кривые ПВ ВПСТ у животных, экспрессирующих ChR2 без (ChR2+ hv-) (красный) и после 4-дневной фотостимуляции (ChR2+ hv+) (черный) с пероральным применением мемантина (ChR2+ hv+ mem+) (серый) (509).

Такое резкое удлинение τ ПВ ВПСТ предполагает более длительное присутствие глутамата на постсинаптических рецепторах, что согласуется с концепцией нарушенного глиального захвата. Мемантин нормализует этот процесс.

3.4.2.5. Мемантин предотвращает потерю EAAT1 после хронической оптогенетической стимуляции ГБ

Основная часть глутамата поглощается EAAT1, которые располагаются на отростках ГБ. Через 4 дня фотостимуляции иммунореактивность EAAT1 снижалась в ГБ, что частично предотвращалось применением мемантина (Рисунок 110А). Площадь EAAT1-позитивных элементов уменьшилась с $66,8 \pm 5,3\%$ (8 зон от 3-х мышей) до $21,3 \pm 3,0\%$ (9 зон от 3-х мышей) ($p=0,001$).

Мемантин частично восстанавливал площадь EAAT1-положительных элементов до $56,1 \pm 5,4$ (6 зон от 3 мышей) (Рисунок 110Б), эти значения не отличались от таковых у нестимулированных мышей ($p=0,29$) (509).

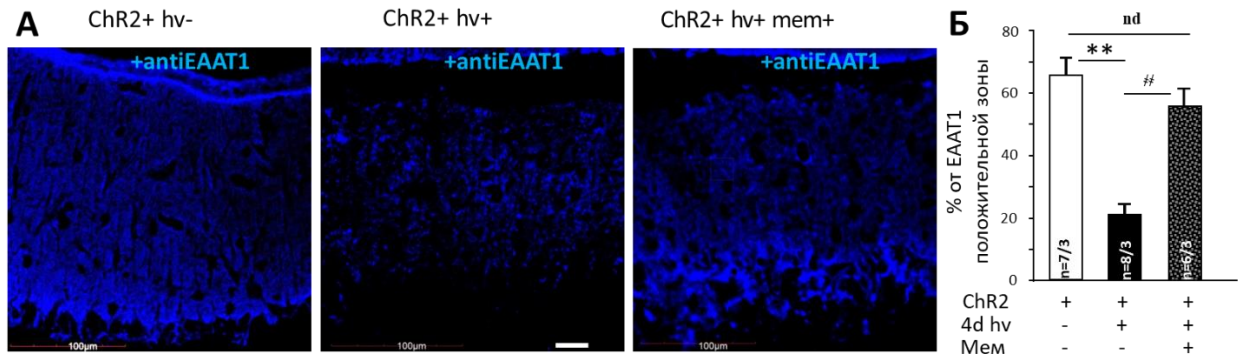


Рисунок 110. Экспрессия EAAT1 в реактивной ГБ^{ChR2+} и влияние мемантина на эту экспрессию. А – конфокальные изображения отростков ГБ^{ChR2+} без (ChR2+ hv-) и через 4 дня фотостимуляции (ChR2+ hv+) в сочетании с пероральным введением мемантина (ChR2+ hv+ mem+). Окраска на анти-EAAT1 отмечена синим цветом. Мерная шкала 20 μ m. (Б) Усредненный график зоны EAAT1-положительных элементов по отношению к общей площади. ** $p < 0,01$; # $p < 0,01$ (509).

Иммунореактивность анти-EAAT1 сильно снижалась в ГБ, экспрессирующем мутантный атаксин 1 (Рисунок 111А). Площадь положительных элементов анти-EAAT1 уменьшилась с $17,1 \pm 0,8$ % до $15,2 \pm 0,5$ % ($p = 0,008$). Мемантин восстанавливал площадь положительных элементов анти-EAAT1 до $17,6 \pm 0,1$ % (Рисунок 111Б-Г), значение, не отличающееся от нестимулированных мышей ($p = 0,12$). Таким образом, мемантин в значительной степени предотвращает изменения морфологии ГБ и экспрессии EAAT1 в мозжечке наших мышей с моделью СЦА1.

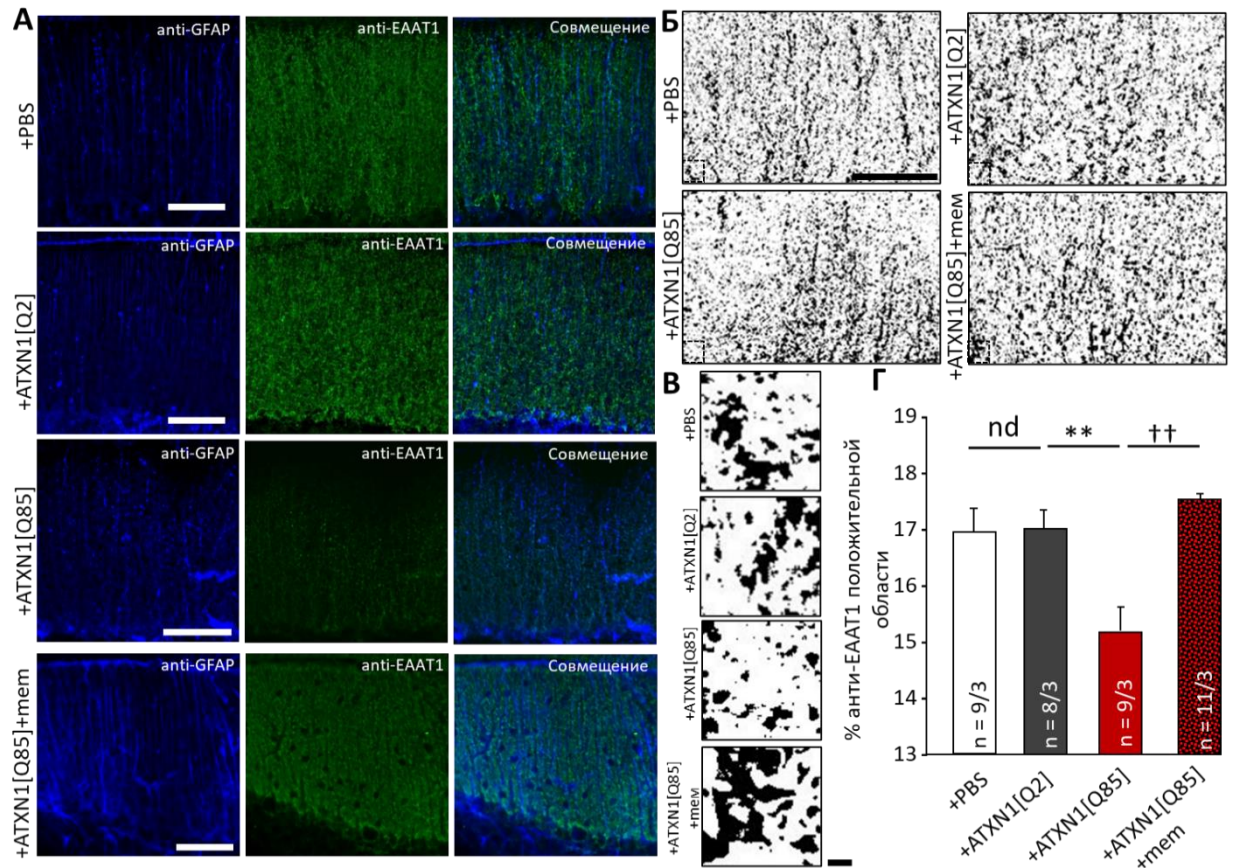


Рисунок 111. Экспрессия EAAT1 в реактивной ГБ^{ATXN1[Q85]} и влияние мемантина на эту экспрессию. А – конфокальные изображения отростков ГБ после инъекции PBS, а также ГБ^{ATXN1[Q2]} и ГБ^{ATXN1[Q85]} без и в сочетании с пероральным введением мемантина (+mem). Окраска на анти-GFAP отмечена синим цветом, на анти-EAAT1 – зелёным цветом. Мерная шкала 50 μ m. (Б) Обработанные программой ImageJ изображения анти-EAAT1 положительных зон коры мозжечка. Мерная шкала 50 μ m. Их увеличенные изображения представлены на панели (В). Мерная шкала 5 μ m. (Г) Усредненный график зоны EAAT1 положительных элементов по отношению к общей площади. ** $p < 0,01$; †† $p < 0,01$.

Таким образом, мемантин положительно влияет не только на нейроны, но и на все составляющие трёхкомпонентного синапса. В значительной степени он предотвращает изменения экспрессии EAAT1 в реактивной ГБ. В

частности, мы обнаружили более широкое представление сайтов поглощения глутамата в отростках ГБ у мышей, получавших мемантин. Это способствует предотвращению эксайтотоксичности и уменьшению нейродегенеративного процесса в коре мозжечка.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Наследственные заболевания нервной системы на сегодняшний день являются одним из самых мало изученных разделов нейронаук. Это обуславливает отсутствие решений в патогенетическом лечении данных заболеваний. Полиглутаминовые спиноцеребеллярные атаксии являются типичными болезнями накопления патологического белка прежде всего в мозжечке и стволе мозга. Поэтому в нашей работе мы попытались найти общие механизмы и подходы лечения этих заболеваний, а СЦА1 взяли, как наиболее часто встречающийся вариант на территории Российской Федерации. Для понимания общности происходящих процессов у этих заболеваний, помимо СЦА1 модельных мышей, мы использовали две универсальные полиглутаминовые модели, модель нокаутную по основному фактору транскрипции для атаксинов, $Ror\alpha$ и две неспецифические модели астроглиоза мозжечка.

Используя данные модели, мы исследовали основные звенья патогенеза полиглутаминовых атаксий для выявления молекул мишеней, на которые возможно терапевтическое воздействие. Однако мы не рассматривали поздние стадии патогенеза, где невозможна инволюция патологических явлений. Напротив, ранняя и средняя стадии заболевания относительно обратимы. Воздействуя на молекулы мишени на данных стадиях возможно частичное восстановление утраченных функций, а также улучшение качества и увеличение продолжительности жизни.

Мы обратили особое внимание на нарушение синаптической пластичности, так как это основной фактор обратимого выпадения функций нейронов на ранней и средней стадиях заболевания (404). Центральным звеном здесь выступает $mGluR$ путь передачи сигналов. Именно поэтому мы тщательно проанализировали нарушение морфологии дендритов КП, так как на их окончаниях содержится большое количество $mGluR$. Уменьшение

дендритов КП является универсальным негативным эффектом во всех трансгенных моделях атаксии, где экспрессия мутантного белка начиналась до созревания структур мозжечка. Использование векторных моделей с отсроченной экспрессией мутантного белка после формирования мозжечка помогло нам доказать, что выраженный мозжечковый неврологический дефицит может быть и при нормальной морфологии КП. У данных животных центральным звеном является нарушение синтеза mGluR и нарушение связанной с ней синаптической пластичности, такой как SSE и LTD.

Вторым глобальным механизмом влияния на патогенез полиглутаминовых атаксий является развитие эксайтотоксичности, которая обусловлена активацией астроглии и уменьшением обратного захвата ими глутамата из синаптической щели. Мы обнаружили, что неселективное повреждение ГБ посредством хронической оптогенетической активации вызывает ГБ-астроглиоз, и в целом его исход напоминает модели СЦА1. Во всех случаях мы наблюдаем нарушение захвата глутамата из-за потери EAAT1, что приводит к эксайтотоксичности и дегенерации КП. В свете ранее предложенных механизмов трансформации астроцитов в нейротоксический фенотип наши результаты показывают, что это может происходить из-за эндогенных процессов внутри ГБ, не обязательно индуцированных нейронами или микроглией (510). Мы предполагаем, что перегрузка Na^+ и снижение активности Na^+/K^+ -АТФазы в ГБ являются важными этапами этого процесса (Рисунок 112).

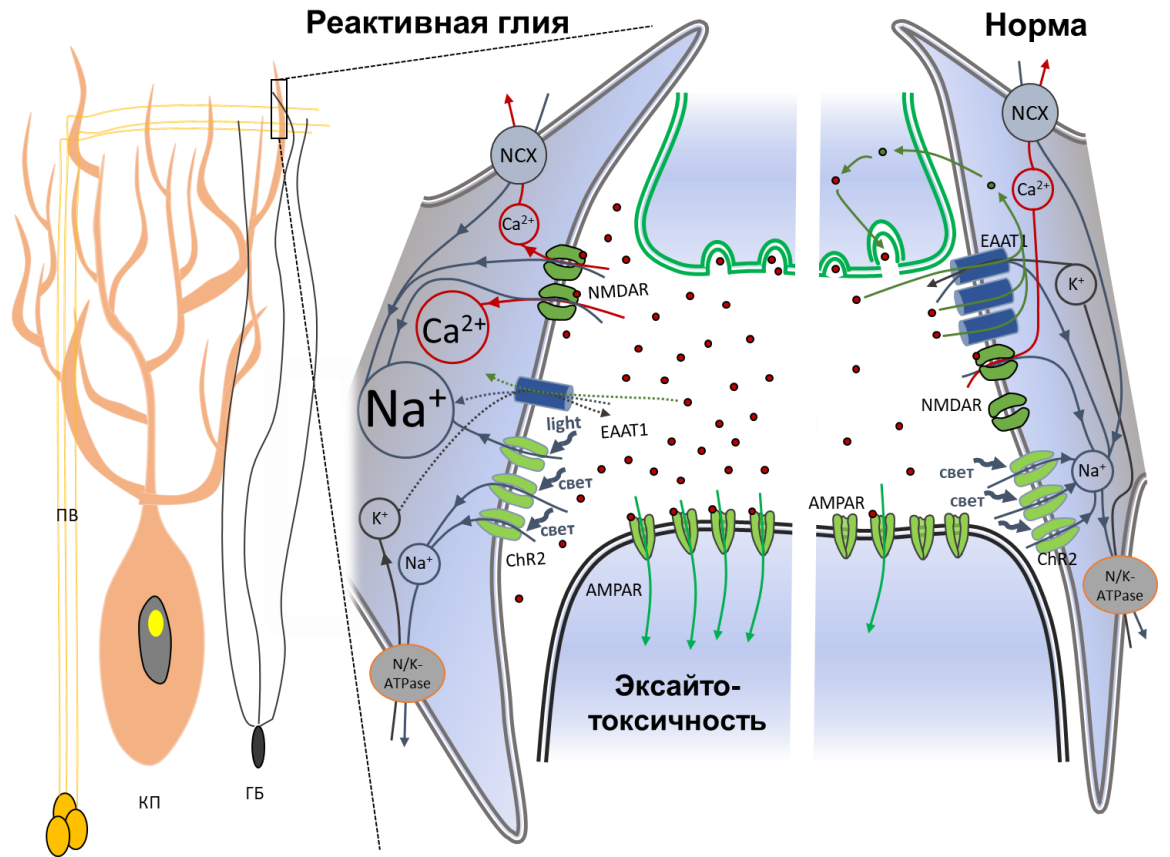


Рисунок 112. Предполагаемые механизмы эксайтотоксичности, вызванной реактивной ГБ. Поглощение глутамата в ГБ происходит через переносчики возбуждающих аминокислот (EAAT), из которых доминирующим является EAAT1. EAAT работают с использованием градиента Na^+ . В физиологических условиях (правая часть) умеренному притоку Na^+ через EAAT1 противодействует активность Na/K-АТФазы, которая удаляет Na^+ из ГБ для поддержания достаточного градиента. Экспрессия и активация проницаемого для Na^+ и Ca^{2+} ChR2 (левая часть) приводит к перегрузке глии Na^+ , который, вероятно, не может быть компенсирован Na/K-АТФазой. Перегрузка Na^+ приводит к замедлению поглощения глутамата. Накопление глутамата приводит к гиперстимуляции NMDA на КП и самой ГБ. В конечном итоге это приводит к подавлению EAAT1 и эксайтотоксичности.

Активация глии приводит не только к нарушению морфологии ГБ и КП, но и влечёт нарушение синаптической пластичности. Наши результаты указывают на специфические механизмы патологии СЦА1 с вовлечением ГБ, которые не обнаруживаются у мышей с исключительным поражением КП, в частности, в модели B05. SCA1 KI демонстрируют нарушение краткосрочной и долгосрочной синаптической пластичности из-за дисфункции как нейронных, так и глиальных механизмов. Реактивная ГБ высвобождает большое количество S100 β , которое может быть нейротоксичным (509). Скомпрометированная ГБ также может не обеспечивать адекватную буферизацию K⁺, поступление глутамата и неадекватное удаление внеклеточного глутамата (Рисунок 113).

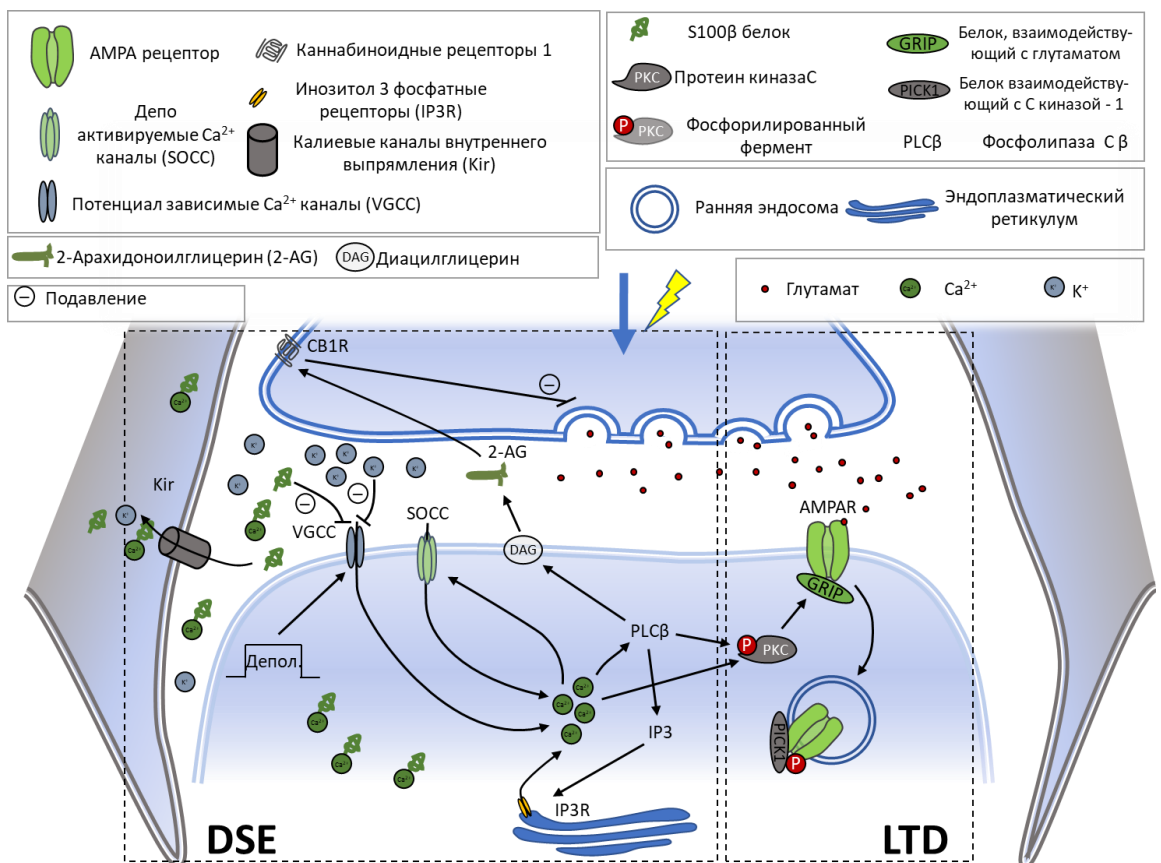


Рисунок 113. Атаксин 1 с удлиненной полиглутаминовой цепочкой влияет на краткосрочную и долгосрочную синаптическую пластичность в мозжечке мышей SCA1 KI: предполагаемые механизмы. Экспрессия

мутантного атаксина 1 в астроцитах мозжечка заставляет их переходить в реактивное состояние и увеличивает экспрессию S100 β . S100 β представляет собой хелатор Ca²⁺, который снижает проницаемость этого катиона через VGCC L-типа. Это приводит к нарушению функции VGCC и IP3-зависимого внутриклеточного высвобождения Ca²⁺. Низкие уровни свободного внутриклеточного Ca²⁺ не могут активировать PLC β , что снижает высвобождение эндоканнабиноидов и влияет на DSE. Кроме того, из-за низкого содержания Ca²⁺ в цитозоле, PKC не может фосфорилироваться и вызывать интернализацию AMPAR для индукции LTD.

В ходе нашей работы мы дополнили патогенез СЦА1 и определили важные молекулы-мишени для проведения патогенетической терапии данного состояния. Данными патогенетическими точками являются: «перегрузка» убиквитин-протеасомной системы, недоразвитие и инволюция КП, уменьшение экспрессии mGluR1 на КП и нарушение функции CB1 рецепторов на пресинапсе (ПВ). Также важной патогенетической точкой является перераздражение NMDA рецепторов ГБ и КП с последующим нарушением ионного градиента и замедлением обратного захвата глутамата через EAAT1 (Рисунок 114).

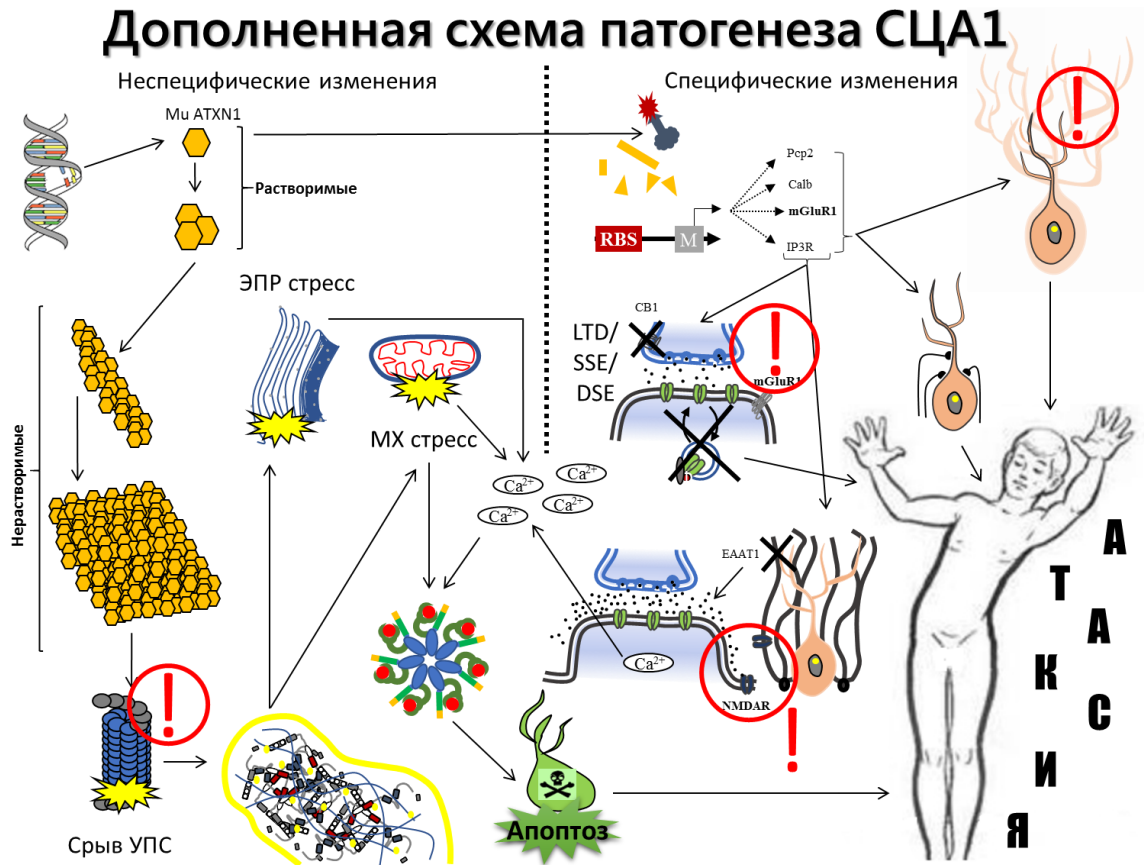


Рисунок 114. Дополненная схема патогенеза СЦА1. Центральными звеньями в данном процессе выступают нарушение mGluR1 сигнализации и развитие эксайтотоксичности. Молекулы-мишени обведены на рисунке красным кружком с восклицательным знаком.

Для преодоления данного патологического состояния мы применили несколько подходов. Их можно разделить на 3 большие группы – доставка рекомбинантных генов, введение стволовых клеток и фармакотерапия. Доставка рекомбинантных генов является высокотехнологичной, перспективной, однако наименее изученной областью терапии. Мы использовали вирусные векторы для экспрессии нужных белков, обладающих терапевтическим эффектом. Ленти- и аденовирусные конструкции обладают длительной экспрессией, что подходит для экспериментального лечения таких хронических состояний, как СЦА. Изначально мы предполагали, что наилучший эффект может быть при

введении данных конструкций новорожденным мышатам, до появления патологических процессов. Однако мы выявили, что это приводит к уменьшению дендритов и их ветвлений в КП у мышей дикого типа. Это влекло за собой ослабление пресинаптического влияния на КП и нарушение PPF и PPD. Поэтому мы модифицировали генетические конструкции, разделив синтезируемый белок на две части посредством вставки P2A. Эту конструкцию на базе LVV и AAV начали вводить мышам в возрасте p21, когда происходило созревание мозжечка. У данных животных дикого типа размер КП также снижался, однако не наблюдалось нарушения кратковременной синаптической пластичности PPF и PPD.

В вышеописанные генетические конструкции мы добавили последовательность, кодирующую белок mGluR1 для компенсации нарушенного его синтеза у СЦА1 модельных мышей в КП. Это позволило компенсировать mGluR опосредованную синаптическую пластичность, такую как SSE и LTD. Однако мы наблюдали выраженное влияние наших генетических конструкций на морфологию КП в виде резкого уменьшения их ёмкости. Также наблюдалось ухудшение координации у СЦА1 модельных животных после введения данных конструкций. Объяснение обнаруженного явления может заключаться в поле транскрипции жизненно важных для ПК белков таких, как mGluR1, PсP2, кальбиндин, IP3 и др. Транскрипция генов, которые кодируются этими белками, сильно зависит от фактора транскрипции ROR α (7). Экзогенная последовательность, которую мы привнесли в КП, конкурентно занимала ROR α и не позволяла, в полной мере, потенцировать экспрессию других жизненно важных генов (Рисунок 115).

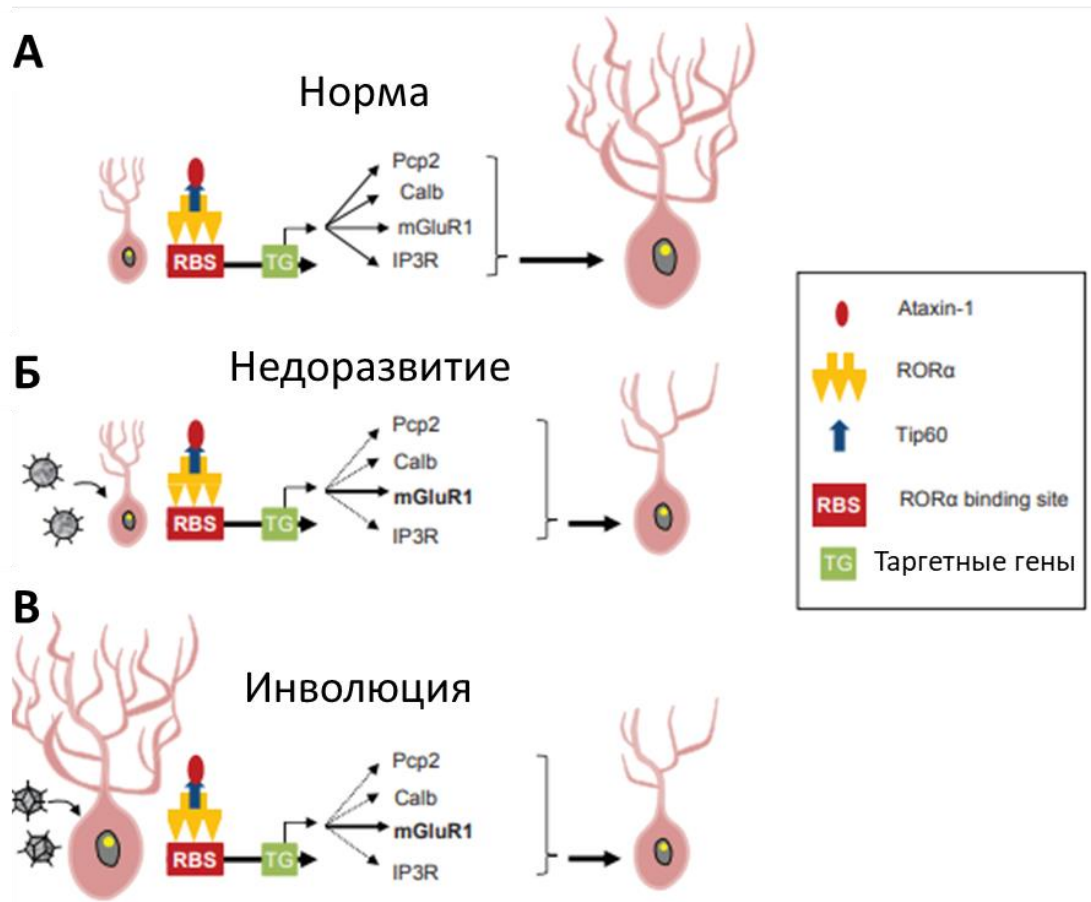


Рисунок 115. Возможный механизм побочного эффекта от введения экзогенных аденовирусных и лентивирусных векторов, кодирующих mGluR1. Транскрипционный комплекс, который содержит атаксин 1, ROR α и другие белки, такие как Tip 60, связываются со специфическим сайтом на цепочке ДНК (ROR α сайт связывания) и способствуют транскрипции определенных генов. (А) В нормальных условиях ROR α способен стимулировать экспрессию многочисленных генов. В присутствии экзогенного белка mGluR1 ROR α начинает запускать большее количество транскрипции mGluR1 и не в состоянии продуцировать достаточное количество белков, необходимых для роста клеток. В незрелых КП (Б) он предотвращает правильное развитие ПК. В зрелых КП (В) это приводит к инволюции основных структур КП таких, как сома и дендриты.

Для компенсации атаксического фенотипа при полиглутаминовых СЦА, возможно влияние на другие звенья патогенеза. Сам

полиглутаминовый белок при увеличении его длины, становится нерастворимым, впадает в виде агрегатов в осадок и проявляет токсические свойства (512). Мы использовали AAV для доставки экзогенного белка CRAG, который способствует более активному вовлечению белков в путь деградации с помощью УПС (513). Данный путь является универсальным и может быть использован для терапии других болезней накопления.

Мы использовали AAV9, потому что его внутривенное введение позволяет доставить трансген в ЦНС, по крайней мере у мышей (514). Через четырнадцать недель после инъекции AAV9 CRAG диффузно экспрессировался во всех мозжечковых долях животных дикого типа, тогда как экспрессия в мозжечке полиглутаминовых мышей значительной степени ограничивалась долями IX и X. Отсутствие экспрессии трансгена в других долях обусловлено плохой васкуляризацией в коре мозжечка полиглутаминовых мышей, поскольку в предыдущих исследованиях было показано, что атаксин 1 с аномально расширенным полиглутаминовым трактом подавлял транскрипцию VEGF и вызывал снижение плотности микрососудов мозжечка и общей длины сосудов (473). Количественная РТ-ПЦР и вестерн блот-анализ подтвердили значительное снижение экспрессии уровня VEGF в мозжечке наших полиглутаминовых мышей, что потенциально может приводить к плохой васкуляризации. Высокий уровень экспрессии трансгена в долях IX и X был обусловлен предположительно просачиванием спинномозговой жидкости, содержащей AAV9 из сосудистого сплетения четвертого желудочка. X доля расположена близко к сосудистому сплетению и на пути потока спинномозговой жидкости, что позволяет секретлируемым частицам AAV9 легко достигать КП в этой зоне. Хотя внутривенное введение новорожденным AAV9 трансдуцировало только ограниченную область в мозжечке, эффективная трансдукция КП в IX и X долях предполагает, что AAV доставка через ликвор, т. е. интратекальное введение AAV9 может быть лучшей альтернативой для трансдукции тканей.

Опосредованная AAV9 экспрессия CRAG в КП у полиглутаминовых мышей достоверно предотвращала накопление мутантных агрегатов и приводила к улучшению дендритной дифференцировки, нормализации SSE при активации mGluR1, и более эффективной генерации спайков в ответ на инъецированный ток. Эти результаты подтверждают, что постнатальная экспрессия атаксина с аномально удлинённым полиглутаминовым трактом в КП *in vivo* нарушает развитие дендритов и передачу сигналов mGluR в синапсах ПВ-КП.

Те же положительные изменения мы выявили после внутривенного введения AAV и индуцированной этой экспрессии CRAG в мозжечке трансгенных B05 СЦА1 мышей. Данный факт показывает, что успешная доставка рекомбинантных генов для лечения больных с полиглутаминовыми СЦА возможна и должна быть транслирована в клинику.

Вторым подходом к лечению хронических неизлечимых ныне состояний является введение стволовых клеток. Мы использовали МСК, так как они могут быть легко выделены из различных тканей таких, как пуповинная кровь, костный мозг, жировая ткань и пульпа зуба, а также потому что они легко дифференцируются в зрелые клетки, в том числе и нейроны. Интратекальное введение обеспечило максимально большой охват зон головного мозга и не повреждало его ткани. В нашем исследовании мы вводили только 3×10^3 МСК в мозжечок трансгенных B05 СЦА1 мышей и наблюдали явные двигательные и морфологические улучшения; эти данные свидетельствуют о том, что такое небольшое количество МСК было высокоэффективным. Мы наблюдали улучшение синаптической пластичности, а также координационной активности, которое сохранялось до 15 недель после введения МСК. Известно, что МСК человека секретируют различные ростовые факторы, обладающие как паракриной, так и аутокринной активностью в поврежденном мозге (473). МСК нацелены на

поврежденные участки и высвобождают трофические факторы, способные подавлять местное воспаление, усиливать ангиогенез, снижать уровень свободных радикалов, подавлять фиброз и апоптоз и стимулировать рекрутирование, удержание, пролиферацию и дифференцировку стволовых клеток (475). Таким образом, наиболее вероятный сценарий заключается в том, что интратекально вводимые МСК мигрируют к дегенерирующим КП, устанавливая с ними контакт и секретируют нейротрофические факторы КП, предотвращая повреждение. Мы пытались это доказать прямо, но обнаружили, что чрезвычайно трудно идентифицировать интратекально введенные 3000 МСК через несколько месяцев после инъекции. Вместо этого в нашем предварительном эксперименте мы вводили меченые GFP МСК непосредственно в кору мозжечка и обнаружили GFP-положительные МСК в непосредственной близости от сомы КП, что подтверждает возможность трофического влияния МСК на соседние КП. Таким образом, МСК являются потенциальным средством лечения пациентов со СЦА1. Однако оптимальное количество интратекально инъецированных МСК, оказывающих значимое терапевтическое воздействие без побочных явлений, еще предстоит определить.

Как видно из наших исследований, перспективные сложные методы терапии могут иметь значительные побочные эффекты и должны проходить тщательную проверку перед внедрением в клинику. Поэтому мы обратили внимание на препараты, которые уже давно применяются в клинике для лечения различных заболеваний и которые, потенциально, могут влиять на патогенез полиглутаминовых атаксий.

Нейроны экспрессируют множество GPCR (515). Так функциональные перекрестные GPCR взаимодействия наблюдаются между mGluR1 и GABA_B рецепторами, оба из которых сильно колокализованы в КП. Активация ГАМК_B-рецепторов баклофеном вызывает усиление передачи сигналов mGluR (484); (485). Эта стратегия выгодна для будущего клинического

применения, поскольку баклофен уже очень давно используется в клинике при мышечных спазмах (486). В низкой дозе баклофен может инициировать вышеупомянутые перекрестные GPCR взаимодействия (487), без заметного расслабления мышц. Точный механизм этого перекрестного влияния еще не выяснен. Было высказано предположение, что ГАМК_B-рецептор образует комплекс с mGluR1, но без прямого взаимодействия (516). В дополнение к mGluR1 перекрестные взаимодействия между рецепторами ГАМК_B и mGluR1, активация ГАМК_B-рецепторов запускает секрецию нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) и последующая активация TrkB сигнального пути. ГАМК_B-рецепторы могут также трансактивировать другой тип рецептора тирозина киназы, рецептор инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1) (516). Эти сигнальные пути, отличные от mGluR1 также могут быть вовлечены в улучшение, двигательной активности у модельных СЦА1 мышей, вызванное баклофеном. Примечательно, что одна инъекция баклофена вызвала длительное (до 1 недели) улучшение синаптической пластичности и двигательной активности у СЦА1 модельных мышей, хотя эффекты баклофена на передачу сигналов mGluR исчезают после вымывания баклофена в течение 24 часов (517). В КП индукция mGluR-опосредованного LTD приводит к экспрессии непосредственно раннего гена Arc, который поддерживает позднюю фазу (> 1 ч после индукции) LTD (518). Таким образом, относительно кратковременное (24 часа) усиление передачи сигналов mGluR баклофеном у СЦА1 трансгенных мышей во время задач на вращающейся дорожке может инициировать зависимую от активности экспрессию генов (возможно, включая mGluR и/или связанные с mGluR молекулы), которые могут индуцировать долгоживущие и/или отсроченные пластические изменения в мозжечке (1 нед), такие как восстановление передачи сигналов mGluR и улучшение моторики. Поэтому клинически доступный баклофен может быть применён для симптоматической терапии

как СЦА1, так и других полиглутаминовых атаксий, у которых имеет место нарушение mGluR пути передачи сигналов. (519), (520), (521).

Вторым препаратом, который мы использовали для экспериментального лечения нейродегенеративных состояний мозжечка, является конкурентный антагонист NMDA рецепторов, мемантин. Он хорошо зарекомендовал себя в лечении пациентов с болезнью Альцгеймера. Универсальным механизмом развития болезни Альцгеймера и рассматриваемых полиглутаминовых СЦА является эксайтотоксичность — повреждение и гибель нейронов в результате избыточной активации постсинаптических NMDA-рецепторов (522). Активация NMDAR сопровождается избыточным поступлением ионов Ca^{2+} внутрь нейронов и последующим каскадом патологических биохимических реакций, которые в итоге запускают апоптоз нейронов и их фагоцитоз макрофагами (523). Мемантин — это блокатор открытых каналов, его неконкурентный характер приводит к эффективной блокаде хронической экстрасинаптической активности NMDAR, которая вызывается повышенным уровнем глутамата. Наш подход к изучению эффектов мемантина на эксайтотоксичность является нестандартным, так как мы уделили особое внимание функции ГБ, которая обеспечивает обратный захват нейромедиатора в ПВ-КП синапсах. Мы показали, что мемантин достоверно способствует сохранению нормальной морфологии ГБ, а также КП. Более того, под его влиянием, восстанавливается уровень экспрессии EAAT1 — основного транспортёра возбуждающих аминокислот коры мозжечка, который отвечает за обратный захват нейромедиатора. Мы показали восстановление не только в оптогенетической, но и специфической модели, астроглиоза, где поражение ГБ обусловлено селективной экспрессией в ней мутантного атаксина 1. Как мемантин может влиять на наши модели? На данный момент неясно, может ли мемантин оказывать прямое влияние на ГБ. Доказательств присутствия

функциональных рецепторов NMDA на ГБ недостаточно. По-видимому, ГБ может экспрессировать небольшое количество субъединиц NR1, NR2A, NR2C и NR3B (524), (525). Неясно, образуют ли они функциональные рецепторы NMDA; но исследование кортикальных астроцитов мышей показало, что в этих клетках NMDA может вызывать токи и что рецепторы NMDA на этих астроцитах имеют низкую проницаемость для Ca^{2+} (526). Наиболее вероятным сценарием является то, что мемантин действует на КП, снижая их реакцию на избыток внеклеточного глутамата при нарушении функции ГБ. Вопрос с наличием NMDA рецепторов в зрелых КП также активно обсуждается в литературе. В наших исследованиях мы доказали, что активные NMDA рецепторы присутствуют вне синапса, тогда как в синапсах КП NMDA рецепторов нет. Нейродегенерация явно является двунаправленным процессом, и апоптотические события, которые, очевидно, имеют место в КП (о чем свидетельствует их выраженная потеря), могут вызывать вторичную реактивность в ГБ. Ранее было показано, что потеря КП в трансгенной СЦА1 B05 модели, где мутантный атаксин 1 селективно экспрессируется в КП, может вызывать реактивное снижение экспрессии EAAT1 в ГБ (12). Более того, активация микроглии, которая нами здесь не изучалась, скорее всего, способствует патологическому исходу в этой модели. Наконец, нельзя исключить, что некоторые эффекты мемантина не связаны с функцией NMDA-рецептора. Таким образом, наши данные впервые демонстрируют механизм потенциального терапевтического действия мемантина на общей модели нейродегенерации в мозжечке, которая имеет черты, сходные со СЦА1 (494). Пероральное введение клинически одобренного препарата, такого как мемантин, при новых формах нейродегенерации может быть быстро переведено в клинику. Мемантин обычно хорошо переносится, хотя может вызывать некоторые побочные эффекты (527), которые также были упомянуты в этой работе. Так мы выявили усиление тревожности при длительном потреблении мемантина у

мышей дикого типа. Данная тревожность оказывает значительное влияние на координацию движений при выполнении заданий животными на вращающейся дорожке. Однако данные изменения являются функциональными и необязательно должны проявляться схожим образом у больных. Более важно то, что мемантин восстанавливает морфологию и нормальную функцию клеток коры мозжечка, уменьшая эксайтотоксичность. Таким образом, этот препарат может, потенциально увеличить продолжительность жизни больных с полиглутаминовыми СЦА.

Заключение

Центральным направлением исследования в диссертационной работе было выявить общие звенья патогенеза при полиглутаминовых СЦА, а также повлиять на них с помощью различных терапевтических подходов. Так мы показали, что имеет место нарушение mGluR сигнализации в КП, которое обуславливает нарушение кратковременной и долговременной синаптической пластичности во всех исследуемых моделях нейродегенерации мозжечка. Вторым центральным аспектом патогенеза является эксайтотоксичность, которая тесно связана с функцией ГБ. Использование нами вирусных векторов не дало однозначного положительного влияния. Сами по себе вектора оказывают лёгкое негативное влияние на морфологию дендритов КП. Более того, экзогенная экспрессия mGluR с помощью векторов оказало резкое негативное влияние на поведение животных и морфологию КП. Однако элиминация агрегатов мутантных белков с помощью аденовирусной экспрессии CRAG значительно улучшала атаксический фенотип и может рассматриваться как потенциальная терапия полиглутаминовых СЦА. Второй терапевтический подход – введение МСК также показал хорошие результаты в виде улучшения координации движений и восстановления функции и морфологии КП.

Третий подход – использование фармакологических средств, которые используются уже в неврологической практике. Эти фармакологические агенты также влияют на ключевые аспекты патогенеза полиглутаминовых СЦА, но ранее не исследовались. Одним из таких препаратов является агонист ГАМКв рецепторов, баклофен, который потенцирует mGluR1 рецепторы на постсинаптических окончаниях КП и восстанавливает синаптическую пластичность в этих клетках. Малая доза вводимого вещества позволила избежать миорелаксирующего эффекта. После однократного введения баклофена наблюдалось значительное улучшение координационной функции у модельных B05 СЦА1 мышей. Мы вводили данное средство *per os*, что очень удобно, если лечение будет применяться у больных полиглутаминовыми СЦА.

Наиболее значимые результаты мы получили в ходе применения антагониста NMDA рецепторов, которые тесно связаны с развитием эксайтотоксичности. Мемантин вводился также «*per os*», но не однократно, а в течение 9 недель, но приводило к восстановлению морфологии клеток коры мозжечка, синаптической пластичности и утраченных моторных функций. Мы исследовали эффекты мемантина не только на СЦА1 модели, но и на оптогенетической модели нейродегенерации мозжечка, при которой поражение ГБ и КП происходит неспецифическим образом. Поэтому мемантин может быть рекомендован для клинических исследований и последующего внедрения при различных СЦА.

Итогом данной работы является 4 подхода к лечению некурабельных полиглутаминовых СЦА. Данные доклинические исследования позволяют транслировать их на следующую стадию – клинических исследований и получить с высокой степенью вероятности, результаты в виде значительного повышения качества и увеличения продолжительности жизни больных с как полиглутаминовыми СЦА, в том числе и СЦА1.

Выводы

1. Разработаны: модель отсроченной лентивирусной экспрессии мутантного атаксина 1 селективно в клетках Пуркинье, модели астроглиоза со специфическим раздражителем: экспрессией мутантного атаксина 1 и с использованием протоколов оптогенетики – модель с неспецифическим раздражителем (хроническая фотоактивация глии Бергмана, экспрессирующей каналородопсин 2 типа).

2. Молекулярной основой уменьшения размеров клеток Пуркинье во время формирования мозжечка является подавление экспрессии и нарушение функции мутантными белками ядерного рецептора регуляции транскрипции RoR α , как это было показано в полиглутаминовой модели и при конкурентном замещении субстратов RoR α при векторной экспрессии экзогенного mGluR1 в модели спиноцеребеллярной атаксии 1 типа. Данные изменения наблюдаются у животных, где мутантные белки экспрессируются в клетках Пуркинье, начиная с внутриутробного развития (трансгенные модели). Нарушение mGluR1-опосредованных процессов, таких как кратко- и долговременная синаптическая пластичности, протекает параллельно с уменьшением дендритов клеток Пуркинье. Отсроченная экспрессия мутантного атаксина 1 после созревания мозжечка (векторная модель) не приводит к уменьшению размеров клеток Пуркинье, но вызывает схожие нарушения mGluR-опосредованной синаптической пластичности, доказывая специфические эффекты RoR α именно на mGluR1-опосредованный путь передачи сигналов. Схожие изменения в исследуемых моделях указывают на нарушение mGluR1-опосредованного пути передачи сигналов как общее звено патогенеза при полиглутаминовых спиноцеребеллярных атаксиях.

3. Астроглиоз вызывает уменьшение уровня транспортёра глутамата EAAT1 в астроцитах коры мозжечка животных с оптогенетической моделью нейродегенерации и с селективной экспрессией мутантного атаксина 1 в глии Бергмана. Это приводит к более долгому присутствию

глутамата в синаптической щели и развитию эксайтотоксичности, что регистрируется в виде увеличения времени спада возбуждающих постсинаптических токов в синапсах клеток Пуркинье с параллельными волокнами в описанных двух моделях астроглиоза. Эксайтотоксичность вызывает нейродегенеративные изменения в виде уменьшения размеров клеток Пуркинье с последующей их гибелью. Схожие изменения в двух описанных моделях указывают на эксайтотоксичность как общее звено патогенеза в нейродегенеративных заболеваниях мозжечка, в том числе и полиглутаминовых спиноцереbellарных атаках.

4. Экспрессия в клетках Пуркинье сигнальной ГТФазы CRAG достигается после внутривенного введения соответствующего аденоассоциированного вирусного рекомбинантного гена новорожденным мышатам с полиглутаминовой моделью (до формирования ГЭБ). Эффект связан с увеличением длины, ветвления дендритов, а также ёмкости клеток Пуркинье. Восстановление кратковременной mGluR-зависимой синаптической пластичности происходило до уровня амплитуд контрольных животных, не экспрессирующих мутантный белок. Восстановление синаптической пластичности отмечалась как у животных с полиглутаминовой моделью, так и с моделью с селективной экспрессией мутантного атаксина 1 в клетках Пуркинье.

5. Введение мезенхимальных стволовых клеток трансгенным модельным полиглутаминовым животным является целесообразным, так как приводит к появлению данных клеток в коре мозжечка через 3 дня после инъекции. Появление стволовых клеток в мозжечке вызывает частичное восстановление морфологии клеток Пуркинье в виде увеличения площади дендритов, а также улучшает mGluR1-опосредованную синаптическую пластичность в виде замедления восстановления нормированной амплитуды возбуждающих постсинаптических токов. На фоне выявленного уменьшения патогенетических изменений наблюдается улучшение координации

движений в виде увеличения времени нахождения на вращающейся дорожке при обучении модельных животных.

6. Однократная инъекция низких доз баклофена в кору мозжечка трансгенных животных с селективной экспрессией мутантного атаксина 1 в клетках Пуркинье уменьшает клеточные патогенетические изменения, посредством активации комплекс-образующих с mGluR1 рецепторов ГАМКв и усиления mGluR1-опосредованного пути передачи сигналов. Данный эффект показан в виде увеличения амплитуды медленных mGluR1-зависимых возбуждающих постсинаптических токов и улучшения кратко- и долговременной синаптической пластичности. Это положительно влияет на координацию данных животных. Эффект от однократного введения наблюдается в течение 1 недели.

7. Длительное пероральное введение мемантина животным с оптогенетической неспецифической моделью астроглиоза мозжечка, являющееся наиболее общей моделью для всех полиглутаминовых атаксий, значительно снижает эксайтотоксичность за счёт восстановления экспрессии EAAT1 в глии Бергмана. Это приводит к уменьшению времени нахождения нейромедиатора в синаптической щели в виде частичного восстановления времени спада возбуждающих постсинаптических токов. Данное состояние оказывает положительное влияние на морфологию клеток Пуркинье и глии Бергмана в виде увеличения их отростков и уменьшения их толщины. Побочными эффектами, в виде появления тревожности при хроническом потреблении мемантина, можно пренебречь, в силу выраженного его положительного влияния на структуры коры мозжечка в модели оптогенетической нейродегенерации.

Практические рекомендации

Не все используемые в работе подходы к лечению полиглутаминовых СЦА могут быть использованы в клинических исследованиях и неврологической

практике, однако важным достижением выполненной работы является создание научной основы для проведения в будущем клинических испытаний. Созданные нами модели отсроченной экспрессии мутантного атаксина 1 и модели селективного и неселективного астроглиоза мозжечка могут использоваться для поиска новых механизмов развития атаксии и эффективных препаратов для ее коррекции.

Высокой степенью готовности к клиническим испытаниям обладают фармакологические препараты. Использованные нами баклофен и мемантин уже применяются для лечения других неврологических расстройств и не нуждаются в дополнительных исследованиях на цитотоксичность и переносимость. Низкие дозы баклофена, которые мы использовали в работе (5nM), не оказывают миорелаксирующего действия, свойственного этому препарату и не оказывает негативного влияния на координацию модельных СЦА1 животных. Отталкиваясь от рабочей концентрации баклофена в тканях мозжечка СЦА1 модельных мышей, возможен подбор дозы препарата пациентам с полиглутаминовыми СЦА, при которой будут фиксироваться улучшения координации. Поэтому баклофен можно рекомендовать для клинических исследований. Он может улучшить качество жизни таких больных.

Рекомендации в отношении мемантина неоднозначные и требуют пояснений. Мы выявили усиление тревоги у животных, принимавших мемантин. Это негативно повлияло на их координацию. В связи с этим, в клинических исследованиях мемантина у больных полиглутаминовыми СЦА может наблюдаться ухудшение координации (баллов по шкале SARA). В таком случае, использование анксиолитиков может уменьшить тревожность и улучшить координацию. В защиту данного препарата нужно сказать, что мемантин значительно уменьшает явления нейродегенерации и восстанавливает синаптическую пластичность в клетках Пуркинье СЦА1 модельных животных. В связи с этим, возможные клинические исследования должны быть направлены на замедление скорости утраты функций мозжечка и ствола мозга, что напрямую связано с увеличением продолжительности жизни у таких больных.

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ, ПРИНЯТЫХ В РАБОТЕ

- СЦА – спиноцеребеллярная атаксия
GFP – зелёный флуоресцентный белок
ЛВ – лазающие волокна
ПВ – параллельные волокна
LTD – долговременная депрессия
mGluR1 – метаботропный глутаматный рецептор 1-го типа
Р – постнатальный день
ЭПР – эндоплазматический ретикулум
ФЛСβ – фосфолипаза Сβ
AMPA-рецептор – рецептор α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты
NMDA-рецептор – рецептор N-метил-D-аспартат
ChR2 – каналородопсин-2
GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок
mKate – дальне-красный флуоресцентный белок
ТВОА – трео-бета-бензилоксиаспартат
ВПСТ – возбуждающие постсинаптические токи
ГС – гранулярный слой
ИГХ – иммуногистохимия
КП – клетки Пуркинье
МС – молекулярный слой
СКП – слой клеток Пуркинье
PPF – усиление парных импульсов
ЕААТ – транспортёр возбуждающих аминокислот
Ca²⁺ - ионы кальция
RT-ПЦР – полимеразная цепная реакция в реальном времени
ГБ – глия Бергмана
УПС – убиквитин-протеасомная система

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sułek-Piątkowska, A. The occurrence of spinocerebellar ataxias caused by dynamic mutations in Polish patients / A. Sułek-Piątkowska, E. Zdzienicka, M. Rakowicz, W. Krysa, M. Rajkiewicz, W. Szirkowiec, J. Zaremba // *Neurol Neurochir Pol.* – 2010. № 44(3). – P. 238–245.
2. Illarioshkin, S.N. Spinocerebellar ataxia type 1 in Russia / S.N. Illarioshkin, P.A. Slominsky, I.M. Ovchinnikov, E.D. Markova, N.I. Miklina, S.A. Klyushnikov, M. Shadrina, N.V. Vereshchagin, S.A. Limborskaya, I.A. Ivanova-Smolenskaya // *J. Neurol.* – 1996. № 243(7). – P. 506–510.
3. Koneva L.A., Simulation of the distribution of spinocerebellar ataxia type 1 in Yakut populations: model parameters and results of simulation / L.A. Koneva, A.V. Konev, A.N. Kucher // *Genetika.* – 2010. № 46(7). – P. 990–999.
4. Moseley, M.L. Incidence of dominant spinocerebellar and Friedreich triplet repeats among 361 ataxia families / M.L. Moseley, K.A. Benzow, L.J. Schut, T.D. Bird, C.M. Gomez, P.E. Barkhaus, K.A. Blindauer, M. Labuda, M. Pandolfo, M.D. Koob, L.P. Ranum // *Neurology.* – 1998. № 51(6). – P. 1666–1671.
5. Lasagna-Reeves, C.A. A native interactor scaffolds and stabilizes toxic ATAXIN-1 oligomers in SCA / C.A. Lasagna-Reeves, M.W. Rousseaux, M.J. Guerrero-Muñoz, J. Park, P. Jafar-Nejad, R. Richman, N. Lu, U. Sengupta, A. Litvinchuk, H.T. Orr, R. Kayed, H.Y. Zoghbi // *Elife.* – 2015. № 4. – P. e07558.
6. Perlman, S.L. Spinocerebellar degenerations / S.L. Perlman // *Handb Clin Neurol.* – 2011. № 100. – P. 113–140.
7. Serra, H.G. ROR α -Mediated Purkinje Cell Development Determines Disease Severity in Adult SCA1 Mice / H.G. Serra, L. Duvick, T. Zu, K. Carlson, S. Stevens, N. Jorgensen, A. Lysholm, E. Burreight, H.Y. Zoghbi, H.B. Clark, J.M. Andresen, H.T. Orr // *Cell.* – 2006. № 127(4). P. – 697–708.
8. Yamasaki, M. mGluR1 signaling in cerebellar Purkinje cells: Subcellular organization and involvement in cerebellar function and disease / M. Yamasaki, A. Aiba, M. Kano, M. Watanabe // *Neuropharmacology.* – 2021. № 194. – P. 108629.
9. Matilla, T. Presymptomatic analysis of spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) via the expansion of the SCA1 CAG-repeat in a large pedigree displaying anticipation and parental male bias / T. Matilla, V. Volpinl, D. Genis, J. Rosell, J. Corral, A. Davalos, A. Molins, X. Estivill // *Hum Mol Genet.* – 1993. № 2(12). – P. 2123-2128.

10. Vagiona, A.C. Dynamics of a Protein Interaction Network Associated to the Aggregation of polyQ-Expanded Ataxin-1 / A.C. Vagiona, M.A. Andrade-Navarro, F. Psomopoulos, S. Petrakis // *Genes (Basel)*. – 2020. № 11(10). – P. 1129.
11. Jones, J. Mesenchymal stem cells rescue Purkinje cells and improve motor functions in a mouse model of cerebellar ataxia / J. Jones, J. Jaramillo-Merchán, C. Bueno, D. Pastor, M. Viso-León, S. Martínez // *Neurobiol Dis.* – 2010. № 40(2). – P. 415–423.
12. Mazzini, L. Mesenchymal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: A Phase I clinical trial / L. Mazzini, I. Ferrero, V. Luparello, D. Rustichelli, M. Gunetti, K. Mareschi, L. Testa, A. Stecco, R. Tarletti, M. Miglioretti, E. Fava, N. Nasuelli, C. Cisari, M. Massara, R. Vercelli, G.D. Oggioni, A. Carriero, R. Cantello, F. Monaco, F. Fagioli // *Exp Neurol.* – 2010. № 223(1). – P. 229–237.
13. Cvetanovic, M. Decreased Expression of Glutamate Transporter GLAST in Bergmann Glia Is Associated with the Loss of Purkinje Neurons in the Spinocerebellar Ataxia Type 1 / M. Cvetanovic // *The Cerebellum*. – 2015. № 14(1). – P. 8–11.
14. Kremer, E.J. Mapping of DNA Instability at the Fragile X to a Trinucleotide Repeat Sequence P(CCG)*n* / E.J. Kremer, M. Pritchard, M. Lynch, S. Yu, K. Holman, E. Baker, S.T. Warren, D. Schlessinger, G.R. Sutherland, R.I. Richards // *Science*. – 1991. № 252(5013). – P. 1711–1714.
15. Babovic-Vuksanovic, D. Spinocerebellar ataxia type 2 (SCA 2) in an infant with extreme CAG repeat expansion / D. Babovic-Vuksanovic, K. Snow, M.C. Patterson, V.V. Michels // *Am J Med Genet.* – 1998. № 79(5). – P. 383–387.
16. Kawaguchi, Y. CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1 / Y. Kawaguchi, T. Okamoto, M. Taniwaki, M. Aizawa, M. Inoue, S. Katayama, H. Kawakami, S. Nakamura, M. Nishimura, I. Akiguchi // *Nat Genet.* – 1994. № 8(3). – P. 221–228.
17. Zhuchenko, O. Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the $\alpha 1A$ -voltage-dependent calcium channel / O. Zhuchenko, J. Bailey, P. Bonnen, T. Ashizawa, D.W. Stockton, C. Amos, W.B. Dobyns, S.H. Subramony, H.Y. Zoghbi, C.C. Lee // *Nat Genet.* – 1997. № 15(1). – P. 62–69.
18. David, G. Cloning of the SCA7 gene reveals a highly unstable CAG repeat expansion / G. David, N. Abbas, G. Stevanin, A. Dürr, G. Yvert, G. Cancel, C. Weber, G. Imbert, F. Saudou, E. Antoniou, H. Drabkin, R. Gemmill, P. Giunti, A. Benomar, N. Wood, M. Ruberg, Y. Agid, J.L. Mandel, A. Brice // *Nat Genet.* – 1997. № 17(1). – P. 65–70.

19. Xiang, F. A Huntington Disease–Like Neurodegenerative Disorder Maps to Chromosome 20p / F. Xiang, E.W. Almquist, M. Huq, A. Lundin, M.R. Hayden, L. Edström, M. Anvret, Z. Zhang // *The American Journal of Human Genetics*. – 1998. № 63(5). P. 1431–1438.
20. Macdonald, M. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes / M. Macdonald // *Cell*. – 1993. № 72(6). – P. 971–983.
21. Koide, R. Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral–pallidolusian atrophy (DRPLA) / R. Koide, T. Ikeuchi, O. Onodera, H. Tanaka, S. Igarashi, K. Endo, H. Takahashi, R. Kondo, A. Ishikawa, T. Hayashi // *Nat Genet*. – 1994. № 6(1). P. 9–13.
22. Brais, B. Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy / B. Brais, J.P. Bouchard, Y.G. Xie, D.L. Rochefort, N. Chrétien, F.M.S. Tomé, R.G. Lafrenière, J.M. Rommens, E. Uyama, O. Nohira, S. Blumen, A.D. Korczyn, P. Heutink, J. Mathieu, A. Duranceau, F. Codère, M. Fardeau, G.A. Rouleau // *Nat Genet*. – 1998. № 18(2). – P. 164–167.
23. Verkerk, A.J.M.H. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome / A.J.M.H. Verkerk, M. Pieretti, J.S. Sutcliffe, Y.H. Fu, D.P.A. Kuhl, A. Pizzuti, O. Reiner, S. Richards, M.F. Victoria, F.P. Zhang // *Cell*. – 1991. № 65(5). – P. 905–914.
24. Gedeon, A.K. Overlapping submicroscopic deletions in Xq28 in two unrelated boys with developmental disorders: identification of a gene near FRAXE / A.K. Gedeon, M. Meinänen, L.C. Adès, H. Kääriäinen, J. Gécz, E. Baker, G.R. Sutherland, J.C. Mulley // *Am J Hum Genet*. – 1995. № 56(4). – P. 907–914.
25. Campuzano, V. Friedreich's Ataxia: Autosomal Recessive Disease Caused by an Intronic GAA Triplet Repeat Expansion / V. Campuzano, L. Montermini, M.D. Moltò, L. Pianese, M. Cossée, F. Cavalcanti, E. Monros, F. Rodius, F. Duclos, A. Monticelli, F. Zara, J. Cañizares, H. Koutnikova, S.I. Bidichandani, C. Gellera, A. Brice, P. Trouillas, G. De Michele, A. Filla, R. De Frutos, F. Palau, P.I. Patel, S. Di Donato, J.L. Mandel, S. Cocozza, M. Koenig, M. Pandolfo // *Science*. – 1996. № 271(5254). – P. 1423–1427.
26. Brook, J.D. Molecular basis of myotonic dystrophy: Expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member / J.D. Brook, M.E. McCurrach, H.G. Harley, A.J. Buckler, D. Church, H. Aburatani, K. Hunter, V.P. Stanton, J.P. Thirion, T. Hudson // *Cell*. – 1992. № 68(4). – P. 799–808.

27. Vincent, J.B. An Unstable Trinucleotide-Repeat Region on Chromosome 13 Implicated in Spinocerebellar Ataxia: A Common Expansion Locus / J.B. Vincent, M.L. Neves-Pereira, A.D. Paterson, E. Yamamoto, S.V. Parikh, F. Macciardi, H.M. Gurling, S.G. Potkin, C.N. Pato, A. Macedo, M. Kovacs, M. Davies, J.A. Lieberman, H.Y. Meltzer, A. Petronis, J.L. Kennedy // *The American Journal of Human Genetics*. – 2000. № 66(3). – P. 819–829.
28. O’Hearn, E. SCA-12: Tremor with cerebellar and cortical atrophy is associated with a CAG repeat expansion / E. O’Hearn, S.E. Holmes, P.C. Calvert, C.A. Ross, R.L. Margolis // *Neurology*. – 2001. № 56(3). – P. 299–303.
29. Liquori, C.L. Myotonic Dystrophy Type 2 Caused by a CCTG Expansion in Intron 1 of *ZNF9* / C.L. Liquori, K. Ricker, M.L. Moseley, J.F. Jacobsen, W. Kress, S.L. Naylor, J.W. Day, L.P. Ranum // *Science*. – 2001. № 293(5531). – P. 864–867.
30. Potaman, V.N. Unpaired Structures in SCA10 (ATTCT)_n·(AGAAT)_n Repeats / V.N. Potaman, J.J. Bissler, V.I. Hashem, E.A. Oussatcheva, L. Lu, L.S. Shlyakhtenko, Y.L. Lyubchenko, T. Matsuura, T. Ashizawa, M. Leffak, C.J. Benham, R.R. Sinden // *J Mol Biol*. – 2003. № 326(4). – P. 1095–1111.
31. Lalioti, M.D. What is expanded in progressive myoclonus epilepsy? / M.D. Lalioti, H.S. Scott, S.E. Antonarakis // *Nat Genet*. – 1997. № 17(1). – P. 17–18.
32. Zoghbi, H.Y. Polyglutamine diseases: protein cleavage and aggregation / H.Y. Zoghbi, H.T. Orr // *Curr Opin Neurobiol*. – 1999. № 9(5). – P. 566–570.
33. la Spada, A.R. Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy / A.R. la Spada, E.M. Wilson, D.B. Lubahn, A.E. Harding, K.H. Fischbeck // *Nature*. – 1991. № 352(6330). – P. 77–79.
34. Gardian, G. Neuroprotective Effects of Phenylbutyrate in the N171-82Q Transgenic Mouse Model of Huntington’s Disease / G. Gardian, S.E. Browne, D.K. Choi, P. Klivenyi, J. Gregorio, J.K. Kubilus, H. Ryu, B. Langley, R.R. Ratan, R.J. Ferrante, M.F. Beal // *Journal of Biological Chemistry*. – 2005. № 280(1). – P. 556–563.
35. Manto, M.U. The wide spectrum of spinocerebellar ataxias (SCAs) / M.U. Manto // *The Cerebellum*. – 2005. №4(1). – P. 2–6.
36. Geschwind, D.H. The prevalence and wide clinical spectrum of the spinocerebellar ataxia type 2 trinucleotide repeat in patients with autosomal dominant cerebellar ataxia / D.H. Geschwind, S. Perlman, C.P. Figueroa, L.J. Treiman, S.M. Pulst // *Am J Hum Genet*. – 1997. № 60(4). – P. 842–850.
37. Riess, O. SCA2 trinucleotide expansion in German SCA patients / O. Riess, F.A. Laccone, S. Gispert, L. Schöls, C. Zühlke, A.M.M. Vieira-Saecker, S. Herlt, K. Wessel, J.

- T. Epplen, B.H. Weber, F. Kreuz, S. Chahrokh-Zadeh, A. Meindl, A. Lunkes, J. Aguiar, M. Macek Jr, A. Krebsová, M.M. Sr, K. Bürk, S. Tinschert, I. Schreyer, S.M. Pulst, G. Auburger // *Neurogenetics*. – 1997. № 1(1). – P. 59–64.
38. Cancel, G. Molecular and clinical correlations in spinocerebellar ataxia 2: a study of 32 families / G. Cancel, A. Dürr, O. Didierjean, G. Imbert, K. Bürk, A. Lezin, S. Belal, A. Benomar, M. Abada-Bendib, C. Vial, J Guimarães, H. Chneiweiss, G. Stevanin, G. Yvert, N. Abbas, F. Saudou, A.S. Lebre, M. Yahyaoui, F. Hentati, J.C. Vernant, T. Klockgether, J.L. Mandel, Y. Agid, A. Brice // *Hum Mol Genet*. – 1997. № 6(5). - 709–715.
39. Schöls, L. Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis / L. Schöls, P. Bauer, T. Schmidt, T. Schulte, O. Riess // *Lancet Neurol*. – 2004. № 3(5). – P. 291–304.
40. Bauer, P.O. Absence of spinocerebellar ataxia type 3/Machado-Joseph disease within ataxic patients in the Czech population / P.O. Bauer, A. Zumrova, V. Matoska, T. Marikova, S. Krilova, A. Boday, B. Singh, P. // *Goetz Eur J Neurol*. – 2005. № 12(11). – P. 851–857.
41. van de Warrenburg, B.P.C. Spinocerebellar ataxias in the Netherlands: Prevalence and age at onset variance analysis / B.P.C. van de Warrenburg, R.J. Sinke, C.C. Verschuuren-Bemelmans, H. Scheffer, E.R. Brunt, P.F. Ippel, J.A. Maat-Kievit, D. Dooijes, N.C. Notermans, D. Lindhout, N.V.A.M. Knoers, H.P.H. Kremer // *Neurology*. – 2002. № 58(5). – P. 702–708.
42. Geschwind, D.H. Spinocerebellar ataxia type 6 / D.H. Geschwind, S. Perlman, K.P. Figueroa, J. Karrim, R.W. Baloh, S.M. Pulst // *Neurology*. – 1997. № 49(5). – P. 1247–1251.
43. Ikeuchi, T. Spinocerebellar ataxia type 6: CAG repeat expansion in alpha1a voltage-dependent calcium channel gene and clinical variations in japanese population / T. Ikeuchi, H. Takano, R. Koide, S. Igarashi, H. Tanaka, S. Tsuji // *Ann Neurol*. – 1997. № 42(6). – P. 879–884.
44. Matsumura, R. Spinocerebellar ataxia type 6. Molecular and clinical features of 35 Japanese patients including one homozygous for the CAG repeat expansion / R. Matsumura, N. Futamura, Y. Fujimoto, S. Yanagimoto, H. Horikawa, A. Suzumura, T. Takayanagi // *Neurology*. – 1997. № 49(5). – P. 1238–1243.
45. Matsuyama, Z. Molecular features of the CAG repeats of spinocerebellar ataxia 6 (SCA6) / Z. Matsuyama // *Hum Mol Genet*. – 1997. № 6(8). – P. 1283–1287.

46. Stevanin, G. Multiple origins of the spinocerebellar ataxia 7 (SCA7) mutation revealed by linkage disequilibrium studies with closely flanking markers, including an intragenic polymorphism (G3145TG/A3145TG) / G. Stevanin, G. David, A. Dürr, P. Giunti, A. Benomar, M. Abada-Bendib, M.S. Lee, Y. Agid, A. Brice // *European Journal of Human Genetics*. – 1999. № 7(8). – P. 889–896.
47. Schols, L. Spinocerebellar ataxia type 6: genotype and phenotype in German kindreds / L. Schols, R. Kruger, G. Amoiridis, H. Przuntek, J.T. Epplen, O. Riess. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. – 1998. № 64(1). – P. 67–73.
48. Pujana, M.A. Spinocerebellar ataxias in Spanish patients: genetic analysis of familial and sporadic cases / M.A. Pujana, J. Corral, M. Gratacòs, O. Combarros, J. Berciano, D. Genís, I. Banchs, X. Estivill, V. Volpini // *Hum Genet*. – 1999. №104(6). – P. 516–522.
49. Jiang, H. Spinocerebellar ataxia type 6 in Mainland China: Molecular and clinical features in four families / H. Jiang, B. Tang, K. Xia, Y. Zhou, B. Xu, G. Zhao, H. Li, L. Shen, Q. Pan, F. Cai // *J Neurol Sci*. – 2005. № 236(1–2). – P. 25–29.
50. Filla, A. Relative Frequencies of CAG Expansions in Spinocerebellar Ataxia and Dentatorubropallidoluysian Atrophy in 116 Italian Families / A. Filla, C. Mariotti, G. Caruso, G. Coppola, S. Coccozza, I. Castaldo, O. Calabrese, E. Salvatore, G. De Michele, M.C. Riggio, D. Pareyson, C. Gellera, S. Di Donato // *Eur Neurol*. – 2000. № 44(1). – P. 31–36.
51. Storey, E. Frequency of spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, 6, and 7 in Australian patients with spinocerebellar ataxia / E. Storey, D. du Sart, J.H. Shaw, P. Lorentzos, L. Kelly, R.J. McKinley Gardner, S.M. Forrest, I. Biro, G.A. Nicholson // *Am J Med Genet*. – 2000. № 95(4). – P. 351–358.
52. Maruyama, H. Difference in disease-free survival curve and regional distribution according to subtype of spinocerebellar ataxia: A study of 1,286 Japanese patients / H. Maruyama, Y. Izumi, H. Morino, M. Oda, H. Toji, S. Nakamura, H. Kawakami // *Am J Med Genet*. – 2002. № 114(5). – P. 578–583.
53. Craig, K. Minimum prevalence of spinocerebellar ataxia 17 in the north east of England / K. Craig, S.M. Keers, T.J. Walls, A. Curtis, P.F. Chinnery // *J Neurol Sci*. – 2005. № 239(1). – P. 105–109.
54. Alendar, A. Spinocerebellar ataxia type 17 in the Yugoslav population / A. Alendar, B. Čuljković, D. Savić, A. Djarmati, M. Keckarević, A. Ristić, N. Dragasević, V. Kosić, S. Romac // *Acta Neurol Scand*. – 2004. № 109(3). – P. 185–187.

55. Jayadev, S. Hereditary ataxias: overview / S. Jayadev, T.D. Bird // *Genetics in Medicine*. – 2013. № 15(9). – P. 673–683.
56. Bettencourt, C. Machado-Joseph Disease: from first descriptions to new perspectives / C. Bettencourt, M. Lima // *Orphanet J Rare Dis*. – 2011. № 6(1). – P. 35.
57. Lund, A. Multiple founder effects in spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA, Kennedy disease) around the world / A. Lund, B. Udd, V. Juvonen, P.M. Andersen, K. Cederquist, M. Davis, C. Gellera, C. Kölmel, L.O. Ronnevi, A.D. Sperfeld, S.A. Sörensen, L. Tranebjaerg, L. Van Maldergem, M. Watanabe, M. Weber, L. Yeung, M.L. Savontaus // *European Journal of Human Genetics*. - 2001. № 9(6). – P. 431–436.
58. Lund, A. Founder effect in spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA) in Scandinavia. / A. Lund, B. Udd, V. Juvonen, P.M. Andersen, K. Cederquist, L.O. Ronnevi, P. Sistonen, S.A. Sörensen, L. Tranebjaerg, C. Wallgren-Pettersson, M.L. Savontaus // *European Journal of Human Genetics*. – 2000. № 8(8). – P. 631–636.
59. Gaspar, C. Ancestral Origins of the Machado-Joseph Disease Mutation: A Worldwide Haplotype Study / C. Gaspar, I. Lopes-Cendes, S. Hayes, J. Goto, K. Arvidsson, A. Dias, I. Silveira, P. Maciel, P. Coutinho, M. Lima, Y.X. Zhou, B.W. Soong, M. Watanabe, P. Giunti, G. Stevanin, O. Riess, H. Sasaki, M. Hsieh, G.A. Nicholson, E. Brunt, J.J. Higgins, M. Lauritzen, L. Tranebjaerg, V. Volpini, N. Wood, L. Ranum, S. Tsuji, A. Brice, J. Sequeiros, G.A. Rouleau // *The American Journal of Human Genetics*. – 2001. № 68(2). – P. 523–528.
60. Verbeek, D.S. Haplotype study in Dutch SCA3 and SCA6 families: evidence for common founder mutations / D.S. Verbeek, S.J. Piersma, E.F.A.M. Hennekam, E.F. Ippel, P.L. Pearson, R.J. Sinke // *European Journal of Human Genetics*. – 2004. № 12(6). – P. 441–446.
61. Martins, S. Mutational Origin of Machado-Joseph Disease in the Australian Aboriginal Communities of Groote Eylandt and Yirrkala / S. Martins, B.W. Soong, V.C.N. Wong, P. Giunti, G. Stevanin, L.P.W. Ranum, H. Sasaki, O. Riess, S. Tsuji, P. Coutinho, A. Amorim, J. Sequeiros, G.A. Nicholson // *Arch Neurol*. – 2012. № 69(6). – P. 746-751.
62. Craig, K. Pathogenic expansions of the SCA6 locus are associated with a common CACNA1A haplotype across the globe: founder effect or predisposing chromosome? / K. Craig, Y. Takiyama, B.W. Soong, L.B. Jardim, M.L. Saraiva-Pereira, K. Lythgow, H. Morino, H. Maruyama, H. Kawakami, P.F. Chinnery // *European Journal of Human Genetics*. – 2008. № 16(7). – P. 841–847.

63. Dichgans, M. Spinocerebellar ataxia type 6: Evidence for a strong founder effect among German families / M. Dichgans, L. Schöls, J. Herzog, G. Stevanin, H. Weirich-Schwaiger, G. Rouleau, K. Bürk, T. Klockgether, C. Zühlke, F. Laccone, O. Riess, T. Gasser // *Neurology*. – 1999. № 52(4). – P. 849–849.
64. Mori, M. A genetic epidemiological study of spinocerebellar ataxias in Tottori prefecture, Japan / M. Mori, Y. Adachi, M. Kusumi, K. Nakashima // *Neuroepidemiology*. – 2001. № 20(2). – P. 144–149.
65. Wakisaka, A. Spinocerebellar ataxia 1 (SCA1) in the Japanese in Hokkaido may derive from a single common ancestry / Wakisaka A, Sasaki H, Takada A, Fukazawa T, Suzuki Y, Hamada T, K. Iwabuchi, K. Tashiro, T. Yoshiki // *J Med Genet*. – 1995. № 32(8). – P. 590–592.
66. Осаковский, В.Л. Оценка возраста мутантной хромосомы по гену SCA1 в якутской популяции / ВЛ Осаковский, А.Ю. Шатунов, Л.Г. Голдфарб, Ф.А. Платонов // *Якутский медицинский журнал*. – 2004. № 2. – С. 63–63.
67. Гурьев, И.П. К вопросу о происхождении якутов с точки зрения генетической археологии / И.П. Гурьев // *Генетика*. – 2004. № 40(4). – С. 560–564.
68. Конева, Л.А. Имитационное моделирование распространения спиноцеребеллярной атаксии I типа в якутских популяциях: описание модели / Л.А. Конева, А.В. Конев, А.Н. Кучер // *Генетика*. – 2010. № 46(3). – С. 417–424.
69. Zhou, Y.X. Spinocerebellar Ataxia Type 1 in China / Y.X. Zhou, W.H. Qiao, W.H. Gu, H. Xie, B.S. Tang, L.S. Zhou, B.X. Yang, Y. Takiyama, S. Tsuji, H.Y. He, C.X. Deng, L.G. Goldfarb, G.X. Wang // *Arch Neurol*. – 2001. № 58(5). – P. 789-794.
70. Wadia, N. A clinicogenetic analysis of six Indian spinocerebellar ataxia (SCA2) pedigrees. The significance of slow saccades in diagnosis / N. Wadia // *Brain*. – 1998. № 121(12). – P. 2341–2355.
71. Mittal, U. Insights into the mutational history and prevalence of SCA1 in the Indian population through anchored polymorphisms / U. Mittal, S. Sharma, R. Chopra, K. Dheeraj, P.Kr. Pal, A.K. Srivastava, M. Mukerji // *Hum Genet*. – 2005. № 118(1). – P. 107–114.
72. Sinha, K.K. Autosomal dominant cerebellar ataxia: SCA2 is the most frequent mutation in eastern India / K.K. Sinha. // *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. – 2004. № 75(3). – P. 448–452.

73. Dhanaraj, M. High prevalence of spinocerebellar ataxia type 1 in an ethnic Tamil community in India / M. Dhanaraj, T. Arulmozhi, B. Chattopadhyay, N. Battacharyya, R. Rengaraj // *Neurol India*. – 2005. № 53(3). – P. 308-310.
74. Didierjean, O. Linkage disequilibrium at the SCA2 locus / O. Didierjean, G. Cancel, G. Stevanin, A. Dürr, K. Bürk, A. Benomar, A. Lezin, S. Belal, M. Abada-Bendid, T. Klockgether, A. Brice // *J Med Genet*. – 1999. № 36(5). – P. 415–417.
75. Choudhry, S. CAG repeat instability at SCA2 locus: anchoring CAA interruptions and linked single nucleotide polymorphisms / S. Choudhry // *Hum Mol Genet*. – 2001. № 10(21). – P. 2437–2446.
76. Anttinen, A. Familial olivopontocerebellar atrophy with macular degeneration: a separate entity among the olivopontocerebellar atrophies / A. Anttinen, E. Nikoskelainen, R.J. Marttila, R. Grenman, B. Falck, E. Aarnisalo, H. Kalimo // *Acta Neurol Scand*. – 2009. № 73(2). – P. 180–190.
77. David, G. The gene for autosomal dominant cerebellar ataxia type II is located in a 5-cM region in 3p12-p13: genetic and physical mapping of the SCA7 locus / G. David, P. Giunti, N. Abbas, P. Coullin, G. Stevanin, W. Horta, R. Gemmill, J. Weissenbach, N. Wood, S. Cunha, H. Drabkin, A.E. Harding, Y. Agid, A. Brice // *Am J Hum Genet*. – 1996. № 59(6). – P. 1328–1336.
78. Enevoldson, T.P. Autosomal dominant cerebellar ataxia with pigmentary macular dystrophy. A clinical and genetic study of eight families / T.P. Enevoldson, M.D. Sanders, A.E. Harding // *Brain*. – 1994. № 117(3). – P. 445–460.
79. Gouw, L.G. Autosomal dominant cerebellar ataxia with retinal degeneration / L.G. Gouw, K.B. Digre, C.P. Harris, J.H. Haines, L.J. Ptacek // *Neurology*. – 1994. № 44(8). – P. 1441–1441.
80. Holmberg, M. Localization of autosomal dominant cerebellar ataxia associated with retinal degeneration and anticipation to chromosome 3p12-p21.1 / M. Holmberg, J. Johansson, L. Forsgren, J. Heijbel, O. Sandgren, G. Holmgren // *Hum Mol Genet*. – 1995. № 4(8). – P. 1441–1445.
81. Krols, L. Refinement of the locus for autosomal dominant cerebellar ataxia type II to chromosome 3p21.1-14.1 / L. Krols, J.J. Martin, G. David, N. van Regemorter, A. Benomar, A. Löfgren, G. Stevanin, A. Dürr, A. Brice, C. Van Broeckhoven // *Hum Genet*. – 1997. № 99(2). – P. 225–232.
82. Raitta, C. Progressive retino-choroidal atrophy with spinocerebellar ataxia / C. Raitta, L. Koskinen, O. Simell // *Neuro-Ophthalmology*. – 1984. № 4(1). – P. 1–13.

83. Jonasson, J. Evidence for a common Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) founder mutation in Scandinavia / J. Jonasson, V. Juvonen, P. Sistonen, J. Ignatius, D. Johansson, E.J. Björck, J. Wahlström, A. Melberg, G. Holmgren, L. Forsgren, M. Holmberg // *European Journal of Human Genetics*. – 2000. № 8(12). – P. 918–922.
84. Koide, R. A neurological disease caused by an expanded CAG trinucleotide repeat in the TATA-binding protein gene: a new polyglutamine disease? / R. Koide // *Hum Mol Genet*. – 1999. № 8(11). – P. 2047–2053.
85. Zühlke, C. Spinocerebellar ataxia type 17: Report of a family with reduced penetrance of an unstable Gln49TBP allele, haplotype analysis supporting a founder effect for unstable alleles and comparative analysis of SCA17 genotypes / C. Zühlke, A. Dalski, E. Schwinger, U. Finckh // *BMC Med Genet*. – 2005. № 6(1). – P. 27-27.
86. de Michele, G. Dementia, ataxia, extrapyramidal features, and epilepsy: phenotype spectrum in two Italian families with spinocerebellar ataxia type 17 / G. de Michele, F. Maltecca, M. Carella, G. Volpe, M. Orio, A. de Falco, S. Gombia, A. Servadio, G. Casari, A. Filla, A. Bruni // *Neurological Sciences*. – 2003. № 24(3). – P. 166–167.
87. Zühlke, C. Phenotypical variability of expanded alleles in the TATA-binding protein gene / C. Zühlke, U. Gehlken, Y. Hellenbroich, E. Schwinger, K. Bürk // *J Neurol*. – 2003. № 250(2). – P. 161–163.
88. Ключников, С.А. Молекулярный анализ полиглутаминовых заболеваний в России / С.А. Ключников, С.Н. Иллариошкин, И.А. Иванова-Смоленская // «Диалог». – 2008. – С. 69–75.
89. Дедов, И.И. Молекулярный анализ гена CYP21 у пациентов с врожденной дисфункцией коры надпочечников, обусловленной дефицитом 21-гидроксилазы / И.И. Дедов, Н.Ю. Калинин, Т.В. Семичева // *Проблемы эндокринологии*. – 2004. №4. – С. 1–3.
90. Максимова, Н.Р. Этнотипические наследственные болезни у якутов / Н.Р. Максимова, В.П. Пузырев // *Межрегиональная научно-практическая конференция «Здоровье детей Севера»*. Якутск. – 2008. – С. 91–94.
91. Lima, M. Origins of a mutation: population genetics of Machado-Joseph disease in the Azores (Portugal) / M. Lima, F.M. Mayer, P. Coutinho, A. Abade // *Hum Biol*. – 1998. № 70(6). – P. 1011–1023.
92. Платонов, Ф.А. Наследственная мозжечковая атаксия в Якутии / Ф.А. Платонов // *Науч.-исслед. ин-т неврологии РАМН*. – Москва. – 2003. – С. 1-49.

93. Shuvaev, A.N. Population genetics of spinocerebellar ataxias caused by polyglutamine expansions / A.N. Shuvaev, O.S. Belozor, M.V. Smolnikova, D.A. Yakovleva, A.N. Shuvaev, O.M. Kazantseva, E.A. Pozhilenkova, O.I. Mozhei, S. Kasparov // *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. – 2019. № 23(4). – P. 473–481.
94. Langbehn, D. A new model for prediction of the age of onset and penetrance for Huntington's disease based on CAG length / D. Langbehn, R. Brinkman, D. Falush, J. Paulsen, M. Hayden // *Clin Genet*. – 2004. № 65(4). – P. 267–277.
95. Langbehn, D.R. CAG-repeat length and the age of onset in Huntington disease (HD): A review and validation study of statistical approaches / D.R. Langbehn, M.R. Hayden, J.S. Paulsen // *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. – 2010. № 153B(2). – P. 397–408.
96. Jodice, C. Effect of trinucleotide repeat length and parental sex on phenotypic variation in spinocerebellar ataxia / C. Jodice, P. Malaspina, F. Persichetti, A. Novelletto, M. Spadaro, P. Giunti, C. Morocutti, L. Terrenato, A. E. Harding, M. Frontali // *I. Am J Hum Genet*. – 1994. № 54(6). – P 959–965.
97. Ranum, L.P. Molecular and clinical correlations in spinocerebellar ataxia type I: evidence for familial effects on the age at onset / L.P. Ranum, M.Y. Chung, S. Banfi, A. Bryer, L.J. Schut, R. Ramesar, L.A. Duvick, A. McCall, S.H. Subramony, L. Goldfarb, C. Gomez, L.A. Sandkuijl, H.T. Orr, H.Y. Zoghbi // *Am J Hum Genet*. – 1994. № 55(2). – P. 244–252.
98. Benton, C.S. Molecular and clinical studies in SCA-7 define a broad clinical spectrum and the infantile phenotype / C.S. Benton, R. de Silva, S.L. Rutledge, S. Bohlega, T. Ashizawa, H.Y. Zoghbi // *Neurology*. – 1998. № 51(4). – P. 1081–1086.
99. Futamura, N. An apparently sporadic case with spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1)/ N. Futamura, R. Matsumura, K. Murata, A. Suzumura, T.T akayanagi // *Rinsho Shinkeigaku* – 1997. № 37(8). – P. 708–710.
100. Genis, D. Clinical, neuropathologic, and genetic studies of a large spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) kindred / D. Genis, T. Matilla, V. Volpini, J. Rosell, A. Davalos, I. Ferrer, A. Molins, X. Estivill // *Neurology*. – 1995. № 45(1). – P. 24–30.
101. Gambardella, A. CAG repeat length and clinical features in three Italian families with spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2): early impairment of Wisconsin Card Sorting Test and saccade velocity / A. Gambardella, G. Annesi, F. Bono, P. Spadafora, P. Valentino, A.A. Pasqua, R. Mazzei, R. Montesanti, F.L. Conforti, R.L. Oliveri, M. Zappia, U. Aguglia, A. Quattrone // *J Neurol*. – 1998. № 245(10). – P. 647–652.

102. Schols, L. Relations between genotype and phenotype in German patients with the Machado-Joseph disease mutation / L. Schols, G. Amoiridis, J.T. Epplen, M. Langkafel, H. Przuntek, O. Riess // *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. – 1996. № 61(5). – P. 466–470.
103. Sequeiros, J. Epidemiology and clinical aspects of Machado-Joseph disease / J. Sequeiros, P. Coutinho // *Adv Neurol*. – 1993. №61. – P. 139–153.
104. Nakamura, K. SCA17, a novel autosomal dominant cerebellar ataxia caused by an expanded polyglutamine in TATA-binding protein / K. Nakamura, S.Y. Jeong, T. Uchihara // *Hum Mol Genet*. – 2001. №10(14). – P. 1441–1448.
105. Orr, H.T. Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1 / H.T. Orr, M. Yi Chung, S. Banfi, T.J. Kwiatkowski, A. Servadio, A.L. Beaudet, A.E. McCall, L.A. Duvick, L.P. Ranum, H.Y. Zoghbi // *Nat Genet*. – 1993. № 4(3). – P. 221–226.
106. Imbert, G. Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats / G. Imbert, F. Saudou, G. Yvert, D. Devys, Y. Trottier, J.M. Garnier, C. Weber, J.L. Mandel, G. Cancel, N. Abbas, A. Dürr, O. Didierjean, G. Stevanin, Y. Agid, A. Brice // *Nat Genet*. – 1996. № 14(3). – P. 285–291.
107. Dürr, A. Autosomal dominant cerebellar ataxias: polyglutamine expansions and beyond / A. Dürr // *Lancet Neurol*. – 2010. № 9(9). – P. 885–894.
108. Currier, R.D. Spinocerebellar ataxia: Study of a large kindred: I. General information and genetics / R.D. Currier, G. Glover, J.F. Jackson, A.C. Tipton // *Neurology*. – 1972. № 22(9). – P. 1040–1040.
109. Zoghbi, H.Y. Spinocerebellar ataxia: Variable age of onset and linkage to human leukocyte antigen in a large kindred / H.Y. Zoghbi, M.S. Pollack, L.A. Lyons, R.E. Ferrell, S.P. Daiger, A.L. Beaudet // *Ann Neurol*. – 1988. № 23(6). – P. 580–584.
110. Sasaki, H. Clinical features and natural history of spinocerebellar ataxia type 1 / H. Sasaki, T. Fukazawa, T. Yanagihara, T. Hamada, K. Shima, A. Matsumoto, K. Hashimoto, N. Ito, A. Wakisaka, K. Tashiro // *Acta Neurol Scand*. – 2009. № 93(1). – P. 64–71.
111. Bürk, K. Cognitive deficits in spinocerebellar ataxia type 1, 2, and 3 / K. Bürk, C. Globas, S. Bösch, T. Klockgether, C. Zühlke, I. Daum, J. Dichgans // *J Neurol*. – 2003. № 250(2). – P. 207–211.

112. Schöls, L. Autosomal dominant cerebellar ataxia: Phenotypic differences in genetically defined subtypes? / L. Schöls, G. Amoiridis, T. Büttner, H. Przuntek, J.T. Epplen, O. Riess // *Ann Neurol.* – 1997. № 42(6). – P. 924–932.
113. Paulson, H. Spinocerebellar Ataxia Type 3 / H. Paulson, V. Shakkottai // *GeneReviews*. University of Washington, Seattle. – 2020.
114. Tuite, P.J. Dopa-responsive parkinsonism phenotype of Machado-Joseph disease: Confirmation of 14q CAG expansion / P.J. Tuite, E.A. Rogaeva, P.H. St George-Hyslop, A.E. Lang // *Ann Neurol.* – 1995. № 38(4). – P. 684–687.
115. Schols, L. Sleep disturbance in spinocerebellar ataxias: Is the SCA3 mutation a cause of restless legs syndrome? / L. Schols, J. Haan, O. Riess, G. Amoiridis, H. Przuntek // *Neurology.* – 1998. № 51(6). – P. 1603–1607.
116. Lima, L. Clinical criteria for diagnosis of Machado-Joseph disease: Report of a non-Azorean Portuguese family / L. Lima, P. Coutinho // *Neurology.* – 1980. № 30(3). – P. 319–319.
117. Isono, C. Differences in Dysphagia Between Spinocerebellar Ataxia Type 3 and Type 6 / C. Isono, M. Hirano, H. Sakamoto, S. Ueno, S. Kusunoki, Y. Nakamura // *Dysphagia.* – 2013. № 28(3). – P. 413–418.
118. Mabuchi, K. Pseudo-Argyll Robertson pupil of patients with spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) / K. Mabuchi, H. Yoshikawa, M. Takamori, H. Yokoji, M. Takahira // *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* – 1998. № 65(4). – P. 612–613.
119. Potter, N.T. Technical Standards and Guidelines for Huntington Disease Testing / N.T. Potter, E.B. Spector, T.W. Prior // *Genetics in Medicine.* – 2004. № 6(1). – P. 61–65.
120. Levin, B.C. Advances in Huntington's disease diagnostics: development of a standard reference material / B.C. Levin, K.L. Richie, J.P. Jakupciak // *Expert Rev Mol Diagn.* – 2006. № 6(4). – P. 587–596.
121. Mestre, T. Therapeutic interventions for symptomatic treatment in Huntington's disease / T. Mestre, J. Ferreira, M.M. Coelho, M. Rosa, C. Sampaio // *Cochrane Database of Systematic Reviews.* – 2009. №3. – P. CD006456.
122. Anderson, K.E. Behavioral symptoms associated with Huntington's disease / K.E. Anderson, F.J. Marshall // *Adv Neurol.* – 2005. № 96. – P. 197–208.
123. Skirton, H. Huntington disease: a nursing perspective / H. Skirton // *Medsurg Nurs.* – 2005. № 14(3). – P. 167–172.
124. Levine, J. Fatigue in Parkinson Disease, Stroke, and Traumatic Brain Injury / J. Levine, B.D. Greenwald // *Phys Med Rehabil Clin N Am.* – 2009. № 20(2). P. – 347–361.

125. Williams, J.K. The emotional experiences of family carers in Huntington disease / J.K. Williams, H. Skirton, J.S. Paulsen, T. Tripp-Reimer, L. Jarmon, M.K. McGonigal, E. Birrer, B.L. Hennig, J. Honeyford // *J Adv Nurs.* – 2009. № 65(4). – P. 789–798.
126. Watase, K. Lithium Therapy Improves Neurological Function and Hippocampal Dendritic Arborization in a Spinocerebellar Ataxia Type 1 Mouse Model / K. Watase, J.R. Gatchel, Y. Sun, E. Emamian, R. Atkinson, R. Richman, H. Mizusawa, H.T. Orr, C. Shaw, H. Y Zoghbi // *PLoS Med.* – 2007. № 4(5). – P. e182.
127. Trail № NCT00683943 / Lithium Treatment for Patients With Spinocerebellar Ataxia Type I. – 2022.
128. Sanz-Gallego, I. IGF-1 in autosomal dominant cerebellar ataxia - open-label trial. *Cerebellum Ataxias* / I. Sanz-Gallego, F.J. Rodriguez-de-Rivera, I. Pulido, I. Torres-Aleman, J. Arpa // *Cerebellum Ataxias* – 2014. № 1(1). – P. 13.
129. de Tommaso, M. Efficacy of levetiracetam in Huntington disease / M. de Tommaso, di O. Fruscolo, V. Sciruicchio, N. Specchio, C. Cormio, M.F. de Caro, P. Livrea // *Clin Neuropharmacol.* – 2005. № 28(6). – P. 280–284.
130. Bonelli, R.M. Huntington`s disease: present treatments and future therapeutic modalities / R.M. Bonelli, G.K. Wenning, H.P. Kapfhammer // *Int Clin Psychopharmacol.* – 2004. № 19(2). – P. 51–62.
131. Huntington Study Group. Tetrabenazine as antichorea therapy in Huntington disease: A randomized controlled trial / Huntington Study Group // *Neurology.* – 2006. № 66(3). – P. 366–372.
132. Paulsen, J.S. Depression and Stages of Huntington`s Disease / J.S. Paulsen, C. Nehl, K.F. Hoth, J.E. Kanz, M. Benjamin, R. Conybeare, B. McDowell, B. Turner // *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* – 2005. № 17(4). – P. 496–502.
133. Phillips, W. The current clinical management of Huntington`s disease / W. Phillips, K.M. Shannon, R.A. Barker // *Movement Disorders.* – 2008. № 23(11). – P. 1491–1504.
134. Ferini-Strambi, L. Treatment options for restless legs syndrome / L. Ferini-Strambi // *Expert Opin Pharmacother.* – 2009. № 10(4). – P. 545–554.
135. França, M.C. Chronic Pain in Machado-Joseph Disease / M.C. França, A. D`Abreu, J.H. Friedman, A. Nucci, I. Lopes-Cendes // *Arch Neurol.* – 2007. № 64(12). P – 1767.
136. França, M.C. Muscle Excitability Abnormalities in Machado-Joseph Disease / M.C. França, A. D`Abreu, A. Nucci, I. Lopes-Cendes. *Arch Neurol.* – 2008. № 65(4). – P. 525.

137. Correia, M. Evaluation of the effect of sulphamethoxazole and trimethoprim in patients with Machado-Joseph disease / M. Correia, P. Coutinho, M.C. Silva, J. Guimarães, J. Amado, E. Matos // *Rev Neurol.* – 1995. № 23(121). – P. 632–634.
138. Sakai, T. Tetrahydrobiopterin double-blind, crossover trial in Machado-Joseph disease / T. Sakai, Y. Antoku, T. Matsuishi, H. Iwashita // *J Neurol Sci.* – 1996. № 136(1–2). – P. 71–72.
139. Shirasaki, H. A quantitative evaluation of spinocerebellar degeneration by an acoustic analysis--the effect of taltirelin hydrate on patients with Machado-Joseph disease / H. Shirasaki, C. Ishida, T. Nakajima, H. Kamei, T. Koide, N. Fukuhara // *Rinsho Shinkeigaku.* – 2003. № 43(4). – P. 143–148.
140. Takei, A. Effects of Tansospirone on “5-HT_{1A} Receptor-Associated Symptoms” in Patients with Machado-Joseph Disease / A. Takei, T. Fukazawa, T. Hamada, H. Sohma, I. Yabe, H. Sasaki, K. Tashiro // *Clin Neuropharmacol.* – 2004. № 27(1). – P. 9–13.
141. Liu, C.S. Clinical and molecular events in patients with Machado-Joseph disease under lamotrigine therapy / C.S. Liu, H.M. Hsu, W.L. Cheng, M. Hsieh // *Acta Neurol Scand.* – 2005. № 111(6). – P. 385–390.
142. Yabe, I. Clinical trial of acetazolamide in SCA6, with assessment using the Ataxia Rating Scale and body stabilometry / I. Yabe, H. Sasaki, I. Yamashita, A. Takei, K. Tashiro // *Acta Neurol Scand.* – 2001. № 104(1). – P. 44–47.
143. Rönnefarth, M. Dysphagia Affecting Quality of Life in Cerebellar Ataxia—a Large Survey / M. Rönnefarth, N. Hanisch, A.U. Brandt, A. Mähler, M. Endres, F. Paul, S. Doss // *The Cerebellum.* – 2020. № 19(3). – P. 437–445.
144. Gold, M.A. Restarted replication forks are error-prone and cause CAG repeat expansions and contractions / M.A. Gold, J.M. Whalen, K. Freon, Z. Hong, I. Iraqui, S.A.E. Lambert, Freudenreich C.H. // *PLoS Genet.* – 2021. № 17(10). – P. e1009863.
145. Massey, T.H. The central role of DNA damage and repair in CAG repeat diseases / T.H. Massey, L. Jones // *Dis Model Mech.* – 2018. № 11(1). – P. dmm031930.
146. Goula, A.V. Transcription Elongation and Tissue-Specific Somatic CAG Instability / A.V. Goula, A. Stys, J.P.K. Chan, Y. Trottier, R. Festenstein, K. Merienne // *PLoS Genet.* – 2012. № 8(11). – P. e1003051.
147. Richard, G.F. Recombination-induced CAG trinucleotide repeat expansions in yeast involve the MRE11–RAD50–XRS2 complex / G.F. Richard, G.M. Goellner, C.T. McMurray, J.E. Haber // *EMBO J.* – 2000. № 19(10). – P. 2381–2390.

148. Kovtun, I.V. Trinucleotide expansion in haploid germ cells by gap repair / I.V. Kovtun, C.T. McMurray // *Nat Genet.* – 2001. № 27(4). – P. 407–411.
149. Marquis, G.A. Trinucleotide repeats that expand in human disease form hairpin structures in vitro / G.A. Marquis, G. Goellner, N. Juranić, S. Macura, C.T. McMurray // *Cell.* – 1995. № 81(4). – P. 533–540.
150. Chen, X. Hairpins are formed by the single DNA strands of the fragile X triplet repeats: structure and biological implications / X. Chen, S.V. Mariappan, P. Catasti, R. Ratliff, R.K. Moyzis, A. Laayoun, S.S. Smith, E.M. Bradbury, G. Gupta // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 1995. № 92(11). – P. 5199–5203.
151. Catasti, P. Cytosine-rich strands of the insulin minisatellite adopt hairpins with intercalated Cytosine + ·Cytosine pairs 1 / P. Catasti, X. Chen, L.L. Deaven, R.K. Moyzis, E.M. Bradbury, G. Gupta // *J Mol Biol.* – 1997. № 272(3). – P. 369–382.
152. Shafer, R.H. Biological aspects of DNA/RNA quadruplexes / R.H. Shafer, I. Smirnov // *Biopolymers.* – 2000. № 56(3). – P. 209–227.
153. Chalikian, T.V. A more unified picture for the thermodynamics of nucleic acid duplex melting: A characterization by calorimetric and volumetric techniques / T.V. Chalikian, J. Völker, G.E. Plum, K.J. Breslauer // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 1999. № 96(14). – P. 7853–7858.
154. Moore, H. Triplet repeats form secondary structures that escape DNA repair in yeast / H. Moore, P.W. Greenwell, C.P. Liu, N. Arnheim, T.D. Petes // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 1999. № 96(4). – P. 1504–1509.
155. McMurray, C.T. Hijacking of the mismatch repair system to cause CAG expansion and cell death in neurodegenerative disease / C.T. McMurray // *DNA Repair (Amst).* – 2008. № 7(7). – P. 1121–1134.
156. Kovtun, I.V. Features of trinucleotide repeat instability in vivo / I.V. Kovtun, C.T. McMurray // *Cell Res.* – 2008. № 18(1). – P. 198–213.
157. Goula, A.V. Abnormal Base Excision Repair at Trinucleotide Repeats Associated with Diseases: A Tissue-Selective Mechanism / A.V. Goula, K. Merienne // *Genes (Basel).* – 2013. № 4(3). – P. 375–387.
158. Veaute, X. UV lesions located on the leading strand inhibit DNA replication but do not inhibit SV40 T-antigen helicase activity / X. Veaute, G. Mari-Giglia, C.W. Lawrence, A. Sarasin // *Mutation Research/DNA Repair.* – 2000. № 459(1). – P. 19–28.

159. Lieber, M.R. The FEN-1 family of structure-specific nucleases in eukaryotic dna replication, recombination and repair / M.R. Lieber / *BioEssays*. – 1997. № 19(3). – P. 233–240.
160. Назаркина, Ж.К. Флэпэндонуклеаза-1 и её роль в процессах метаболизма ДНК в клетках эукариот / Ж.К. Назаркина, О.И. Лаврик, С.Н. Ходырева // *Молекулярная биология*. – 2008. № 42(3). – С. 405–421.
161. Balakumaran, B.S. CGG/CCG repeats exhibit orientation-dependent instability and orientation-independent fragility in *Saccharomyces cerevisiae* / B.S. Balakumaran // *Hum Mol Genet*. – 2000. № 9(1). – P. 93–100.
162. Callahan, J.L. Mutations in Yeast Replication Proteins That Increase CAG/CTG Expansions Also Increase Repeat Fragility / J.L. Callahan, K.J. Andrews, V.A. Zakian, C.H. Freudenreich // *Mol Cell Biol*. – 2003. № 23(21). – P. 7849–7860.
163. Richards R.I., Fragile and unstable chromosomes in cancer: causes and consequences / R.I. Richards // *Trends in Genetics*. – 2001. № 17(6). – P. 339–345.
164. Lemoine, F.J. Chromosomal Translocations in Yeast Induced by Low Levels of DNA Polymerase / F.J. Lemoine, N.P. Degtyareva, K. Lobachev, T.D. Petes // *Cell*. – 2005. № 120(5). – P. 587–598.
165. Raveendranathan, M. Genome-wide replication profiles of S-phase checkpoint mutants reveal fragile sites in yeast / M. Raveendranathan, S. Chattopadhyay, Y.T. Bolon, J. Haworth, D.J. Clarke, A.K. Bielinsky // *EMBO J*. – 2006. № 25(15). – P. 3627–3639.
166. Bielinsky, A.K. Scarce but scary / A.K. Bielinsky // *Nat Genet*. – 2007. № 39(6). – P. 707–708.
167. Admire, A. Cycles of chromosome instability are associated with a fragile site and are increased by defects in DNA replication and checkpoint controls in yeast / A. Admire, L. Shanks, N. Danzl, M. Wang, U. Weier, W. Stevens, E. Hunt, T. Weinert // *Genes Dev*. – 2006. № 20(2). – P. 159–173.
168. Glover, T.W. DNA polymerase α inhibition by aphidicolin induces gaps and breaks at common fragile sites in human chromosomes / T.W. Glover, C. Berger, J. Coyle, B. Echo // *Hum Genet*. – 1984. № 67(2). – P. 136–142.
169. Casper, A.M. ATR Regulates Fragile Site Stability / A.M. Casper, P. Nghiem, M.F. Arlt, T.W. Glover // *Cell*. – 2002. № 111(6). – P. 779–789.
170. Rodriguez, R. Chk1 and p21 Cooperate to Prevent Apoptosis during DNA Replication Fork Stress / R. Rodriguez, M. Meuth // *Mol Biol Cell*. – 2006. № 17(1). – P. 402–412.

171. Arlt, M.F. Common fragile sites / M.F. Arlt, A.M. Casper, T.W. Glover // *Cytogenet Genome Res.* – 2003. № 100(1–4). – P. 92–100.
172. Cha, R.S. ATR Homolog Mec1 Promotes Fork Progression, Thus Averting Breaks in Replication Slow Zones / R.S. Cha, N. Kleckner // *Science.* – 2002. № 297(5581). – P. 602–606.
173. Cobb, J.A. Replisome instability, fork collapse, and gross chromosomal rearrangements arise synergistically from Mec1 kinase and RecQ helicase mutations / J.A. Cobb, T. Schleker, V. Rojas, L. Bjergbaek, J.A. Tercero, S.M. Gasser // *Genes Dev.* – 2005. № 19(24). – P. 3055–3069.
174. Lahiri M, Gustafson TL, Majors ER, Freudenreich CH. Expanded CAG Repeats Activate the DNA Damage Checkpoint Pathway. *Mol Cell.* 2004 Jul;15(2):287–93.
175. Manley K, Shirley TL, Flaherty L, Messer A. Msh2 deficiency prevents in vivo somatic instability of the CAG repeat in Huntington disease transgenic mice. *Nat Genet.* 1999 Dec;23(4):471–3.
176. van den Broek, W.J.A.A. Somatic expansion behaviour of the (CTG)_n repeat in myotonic dystrophy knock-in mice is differentially affected by Msh3 and Msh6 mismatch-repair proteins / W.J.A.A. van den Broek // *Hum Mol Genet.* – 2002. № 11(2). – P. 191–198.
177. Savouret, C. CTG repeat instability and size variation timing in DNA repair-deficient mice / C. Savouret // *EMBO J.* – 2003. № 22(9). – P. 2264–2273.
178. Kovtun, I.V. OGG1 initiates age-dependent CAG trinucleotide expansion in somatic cells / I.V. Kovtun, Y. Liu, M. Bjoras, A. Klungland, S.H. Wilson, C.T. McMurray // *Nature.* – 2007. № 447(7143). – P. 447–4452.
179. Savouret, C. MSH2-Dependent Germinal CTG Repeat Expansions Are Produced Continuously in Spermatogonia from DM1 Transgenic Mice / C. Savouret, C. Garcia-Cordier, J. Megret, H. te Riele, C. Junien, G. Gourdon // *Mol Cell Biol.* – 2004. № 24(2). – P. 629–637.
180. Stevanin, G. Clinical and molecular features of spinocerebellar ataxia type 6 / G. Stevanin, A. Dürr, G. David, O. Didierjean, G. Cancel, S. Rivaud, A. Tourbah, J.M. Warter, Y. Agid, A. Brice // *Neurology.* – 1997. № 49(5). – P. 1243–1246.
181. Pearson, C.E. Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations / C.E. Pearson, K.N. Edamura, J.D. Cleary // *Nat Rev Genet.* – 2005. № 6(10). – P. 729–742.
182. Zoghbi, H.Y. Spinocerebellar ataxia: Variable age of onset and linkage to human leukocyte antigen in a large kindred / H.Y. Zoghbi, M.S. Pollack, L.A. Lyons, R.E. Ferrell, S.P. Daiger, A.L. Beaudet // *Ann Neurol.* – 1988. № 23(6). – P. 580–584.

183. Maruyama, H. Molecular features of the CAG repeats and clinical manifestation of Machado--Joseph disease / H. Maruyama, S. Nakamura, Z. Matsuyama, T. Sakai, M. Doyu, G. Sobue, G. Sobue, M. Seto, M. Tsujihata, T. Oh-i, T. Nishio // *Hum Mol Genet.* – 1995. № 4(5). – P. 807–812.
184. Park, J.Y. Ophthalmic Manifestations and Genetics of the Polyglutamine Autosomal Dominant Spinocerebellar Ataxias: A Review / J.Y. Park, K. Joo, S.J. Woo // *Front Neurosci.* – 2020. № 14. – P. 892.
185. Orr, H.T. Trinucleotide Repeat Disorders / H.T. Orr, H.Y. Zoghbi // *Annu Rev Neurosci.* – 2007. № 30(1). – P. 575–621.
186. Padiath, Q.S. Identification of a novel 45 repeat unstable allele associated with a disease phenotype at the MJD1/SCA3 locus / Q.S. Padiath, A.K. Srivastava, S. Roy, S. Jain, S.K. Brahmachari // *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics.* – 2005. № 133B(1). – P. 124–126.
187. Quan, F. A novel CAG repeat configuration in the *SCA1* gene: implications for the molecular diagnostics of spinocerebellar ataxia type 1 / F. Quan, J. Janas, B.W. Popovich // *Hum Mol Genet.* – 1995. № 4(12). – P. 2411–2413.
188. Servadio, A. Expression analysis of the ataxin-1 protein in tissues from normal and spinocerebellar ataxia type 1 individuals / A. Servadio, B. Koshy, D. Armstrong, B. Antalffy, H.T. Orr, H.Y. Zoghbi // *Nat Genet.* – 1995. № 10(1). – P. 94–98.
189. Goldfarb, L.G. Unstable triplet repeat and phenotypic variability of spinocerebellar ataxia type 1 / L.G. Goldfarb, O. Vasconcelos, F.A. Platonov, A. Lunkes, V. Kipnis, S. Kononova, T. Chabrashvili, V.A. Vladimirtsev, V.P. Alexeev, D.C. Gajdusek // *Ann Neurol.* – 1996. № 39(4). – P. 500–506.
190. yi Chung, M. Evidence for a mechanism predisposing to intergenerational CAG repeat instability in spinocerebellar ataxia type I / M. yi Chung, L.P.W. Ranum, L.A. Duvick, A. Servadio, H.Y. Zoghbi, H.T. Orr // *Nat Genet.* – 1993. № 5(3). – P. 254–258.
191. Chong, S.S. Gametic and somatic tissue-specific heterogeneity of the expanded SCA1 CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1 / S.S. Chong, A.E. McCall, J. Cota, S.H. Subramony, H.T. Orr, M.R. Hughes, H.Y. Zoghbi // *Nat Genet.* – 1995. № 10(3). – P. 344–350.
192. Kawaguchi, Y. CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1 / Y. Kawaguchi, T. Okamoto, M. Taniwaki, M. Aizawa, M. Inoue, S. Katayama, H. Kawakami, S. Nakamura, M. Nishimura, I. Akiguchi // *Nat Genet.* – 1994. № 8(3). – P. 221–228.

193. Ichikawa, Y. The genomic structure and expression of MJD, the Machado-Joseph disease gene / Y. Ichikawa, J. Goto, M. Hattori, A. Toyoda, K. Ishii, S.Y. Jeong, H. Hashida, N. Masuda, K. Ogata, F. Kasai, M. Hirai, P. Maciel, G.A. Rouleau, Y. Sakaki, I. Kanazawa // *J Hum Genet.* – 2001. № 46(7). – P. 413–422.
194. Kraus-Perrotta, C. Expansion, mosaicism and interruption: mechanisms of the CAG repeat mutation in spinocerebellar ataxia type 1 / C. Kraus-Perrotta, S. Lagalwar // *Cerebellum Ataxias.* – 2016. № 3(1). – P. 20.
195. Gu, W. The Shortest Expanded Allele of the MJD1 Gene in a Chinese MJD Kindred with Autonomic Dysfunction / W. Gu, H. Ma, K. Wang, M. Jin, Y. Zhou, X. Liu, G. Wang, Y. Shen // *Eur Neurol.* – 2004. № 52(2). – P. 107–111.
196. Zühlke, C. Spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1): Phenotype-genotype correlation studies in intermediate alleles / C. Zühlke, A. Dalski, Y. Hellenbroich, S. Bubel, E. Schwinger, K. Bürk // *European Journal of Human Genetics.* – 2002. № 10(3). – P. 204–209.
197. Du, X. Second Cistron in CACNA1A Gene Encodes a Transcription Factor Mediating Cerebellar Development and SCA6 / X. Du, J. Wang, H. Zhu, L. Rinaldo, K.M. Lamar, A.C. Palmenberg, C. Hansel, C.M. Gomez // *Cell.* – 2013. № 154(1). – P. 118–133.
198. Chen, J.M. Identification of the ataxin-1 interaction network and its impact on spinocerebellar ataxia type 1 / J.M. Chen, S.K. Chen, P.P. Jin, S.C. Sun // *Hum Genomics.* – 2022. № 16(1). – P. 29.
199. Tong, X. Ataxin - 1 and Brother of ataxin - 1 are components of the Notch signalling pathway / X. Tong, H. Gui, F. Jin, B.W. Heck, P. Lin, J. Ma, J.D. Fondell, C. Tsai // *EMBO Rep.* 2011 May 8;12(5):428–35.
200. Inagaki, H. Direct evidence that Ataxin-2 is a translational activator mediating cytoplasmic polyadenylation. *Journal of Biological Chemistry* / H. Inagaki, N. Hosoda, H. Tsuiji, Hoshino S. // *J Biol. Chem.* – 2020. № 295(47). – P. 15810–15825.
201. Zeng, L. Loss of the Spinocerebellar Ataxia type 3 disease protein ATXN3 alters transcription of multiple signal transduction pathways / L. Zeng, D. Zhang, H.S. McLoughlin, A.J. Zalon, L. Aravind, H.L. Paulson // *PLoS One.* – 2018. № 13(9). – P. e0204438.
202. Mohan, R.D. Loss of *Drosophila* Ataxin-7, a SAGA subunit, reduces H2B ubiquitination and leads to neural and retinal degeneration / R.D. Mohan, G. Dialynas, V.M. Weake, J. Liu, S. Martin-Brown, L. Florens, M.P. Washburn, J.L. Workman, S.M. Abmayr // *Genes Dev.* – 2014. № 28(3). – P. 259–272.

203. Yang, S. Molecular mechanisms underlying Spinocerebellar Ataxia 17 (SCA17) pathogenesis / S. Yang, X.J. Li, S. Li // *Rare Diseases*. – 2016. № 4(1). – P. e1223580.
204. Weber, J.J. Calpains as novel players in the molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 17 / J.J. Weber, S.C. Anger, P.S. Pereira, E.R.D. Incebacak, C. Huridou, F. Fath, C. Gross, N. Casadei, O. Riess, H.P. Nguyen // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2022. № 79(5). – P. 262.
205. Klement, I.A. Ataxin-1 Nuclear Localization and Aggregation / I.A. Klement, P.J. Skinner, M.D. Kaytor, H. Yi, S.M. Hersch, H.B. Clark, H.Y. Zoghbi, H.T. Orr // *Cell*. – 1998. № 95(1). – P. 41–53.
206. de Chiara, C. The AXH module: an independently folded domain common to ataxin-1 and HBP1 / C. de Chiara, C. Giannini, S. Adinolfi, J. de Boer, S. Guida, A. Ramos, C. Jodice, D. Kioussis, A. Pastore // *FEBS Lett*. – 2003. № 551(1–3). – P. 107–112.
207. de Chiara, C. The AXH Domain Adopts Alternative Folds / de Chiara C, Menon RP, Adinolfi S, de Boer J, Ktistaki E, Kelly G, L. Calder, D. Kioussis, A. Pastore // *Structure*. – 2005. № 13(5). – P. 743–753.
208. Chen, Y.W. The Structure of the AXH Domain of Spinocerebellar Ataxin-1 / Y.W. Chen, M.D. Allen, D.B. Veprintsev, J. Löwe, M. Bycroft // *Journal of Biological Chemistry* – 2004. № 279(5). – P. 3758–3765.
209. Irwin, S. RNA association and nucleocytoplasmic shuttling by ataxin-1 / S. Irwin, M. Vandelft, D. Pinchev, J.L. Howell, J. Graczyk, H.T. Orr, R. Truant // *J Cell Sci*. – 2005. № 118(1). – P. 233–242.
210. Lin, X. Polyglutamine expansion down-regulates specific neuronal genes before pathologic changes in SCA1 / X. Lin, B. Antalffy, D. Kang, H.T. Orr, H.Y. Zoghbi // *Nat Neurosci*. – 2000. № 3(2). – P. 157–163.
211. Mizutani, A. Boat, an AXH domain protein, suppresses the cytotoxicity of mutant ataxin-1 / A. Mizutani, L. Wang, H. Rajan, P.J.S. Vig, W.A. Alaynick, J.P. Thaler, C. Tsai // *EMBO J*. – 2005. № 24(18). – P. 3339–3351.
212. Tsuda, H. The AXH Domain of Ataxin-1 Mediates Neurodegeneration through Its Interaction with Gfi-1 Senseless Proteins / H. Tsuda, H. Jafar-Nejad, A.J. Patel, Y. Sun, H.K. Chen, M.F. Rose, K.J.T. Venken, J. Botas, H. T Orr, H.J. Bellen, H.Y. Zoghbi // *Cell*. – 2005. № 122(4). – P. 633–644.
213. Lam, Y.C. ATAXIN-1 Interacts with the Repressor Capicua in Its Native Complex to Cause SCA1 Neuropathology / Y.C. Lam, A.B. Bowman, P. Jafar-Nejad, J. Lim, R.

- Richman, J.D. Fryer, E.D. Hyun, L.A. Duvick, H.T. Orr, J. Botas, H.Y. Zoghbi // *Cell*. – 2006. № 127(7). – P. 1335–1347.
214. Albrecht, M. Structural modeling of ataxin-3 reveals distant homology to adaptins / M. Albrecht, D. Hoffmann, B.O. Evert, I. Schmitt, U. Wüllner, T. Lengauer // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. – 2002. № 50(2). – P. 355–370.
215. Johnson, S.L. Ubiquitin-interacting motifs of ataxin-3 regulate its polyglutamine toxicity through Hsc70-4-dependent aggregation / S.L. Johnson, B. Ranxhi, K. Libohova, W.L. Tsou, S.V. Todi // *Elife*. – 2020. № 9. – P. e60742.
216. Doss-Pepe, E.W. Ataxin-3 interactions with rad23 and valosin-containing protein and its associations with ubiquitin chains and the proteasome are consistent with a role in ubiquitin-mediated proteolysis / E.W. Doss-Pepe, E.S. Stenroos, W.G. Johnson, K. Madura // *Mol Cell Biol*. – 2003. № 23(18). – P. 6469–6483.
217. Upadhyaya, S.C. A potential proteasome-interacting motif within the ubiquitin-like domain of parkin and other proteins / S.C. Upadhyaya, A.N. Hegde // *Trends Biochem Sci*. – 2003. № 28(6). – P. 280–283.
218. Walters, K.J. DNA-repair protein hHR23a alters its protein structure upon binding proteasomal subunit S5a / K.J. Walters, P.J. Lech, A.M. Goh, Q. Wang, P.M. Howley // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2003. № 100(22). – P. 12694–12699.
219. Sweder, K. Regulation of repair by the 26 S proteasome / K. Sweder, K. Madura // *J Biomed Biotechnol*. – 2002. № 2(2). – P. 94–105.
220. Elfgang, C. Evidence for specific nucleocytoplasmic transport pathways used by leucine-rich nuclear export signals / C. Elfgang, O. Rosorius, L. Hofer, H. Jaksche, J. Hauber, D. Bevec // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1999. № 96(11). – P. 6229–6234.
221. Görlich, D. Transport Between the Cell Nucleus and the Cytoplasm / D. Görlich, U. Kutay // *Annu Rev Cell Dev Biol*. – 1999. № 15(1). – P. 607–660.
222. Costa, M. do C. Unbiased screen identifies aripiprazole as a modulator of abundance of the polyglutamine disease protein, ataxin-3 / M. do C. N.S. Costa, N.S. Ashraf, S. Fischer, Y. Yang, E. Schapka, G. Joshi, T.J. McQuade, R.M. Dharia, M. Dulchavsky, M. Ouyang, D. Cook, D. Sun, M.J. Larsen, J.E. Gestwicki, S.V. Todi, M.I. Ivanova, H.L. Paulson // *Brain*. – 2016. № 139(11). – P. 2891–2908.
223. Burnett, B. The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin-3 binds polyubiquitylated proteins and has ubiquitin protease activity / B. Burnett // *Hum Mol Genet*. – 2003. № 12(23). – P. 3195–3205.

224. Rumpf, S. Functional Division of Substrate Processing Cofactors of the Ubiquitin-Selective Cdc48 Chaperone / S. Rumpf, S. Jentsch // *Mol Cell*. – 2006. № 21(2). – P. 261–269.
225. Aguilar, R.C. Ubiquitin: not just for proteasomes anymore / R.C. Aguilar, B. Wendland // *Curr Opin Cell Biol*. – 2003. № 15(2). – P. 184–190.
226. Burnett, B. The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin-3 binds polyubiquitylated proteins and has ubiquitin protease activity / B. Burnett // *Hum Mol Genet*. – 2003. № 12(23). – P. 3195–3205.
227. Seki, T. JosD1, a Membrane-targeted Deubiquitinating Enzyme, Is Activated by Ubiquitination and Regulates Membrane Dynamics, Cell Motility, and Endocytosis / T. Seki, L. Gong, A.J. Williams, N. Sakai, S.V. Todi, H.L. Paulson // *Journal of Biological Chemistry*. – 2013. № 288(24). – P. 17145–17155.
228. Scheel, H. Elucidation of ataxin-3 and ataxin-7 function by integrative bioinformatics / H. Scheel // *Hum Mol Genet*. – 2003. № 12(21). – P. 2845–2852.
229. Confalonieri, S. The Eps15 homology (EH) domain / S. Confalonieri, P.P. di Fiore // *FEBS Lett*. – 2002. № 513(1). – P. 24–29.
230. de Chiara, C. The AXH module: an independently folded domain common to ataxin-1 and HBP1 / C. de Chiara, C. Giannini, S. Adinolfi, J. de Boer, S. Guida, A. Ramos, C. Jodice, D. Kioussis, A. Pastore // *FEBS Lett*. – 2003. № 551(1–3). – P. 107–112.
231. Matilla, A. The cerebellar leucine-rich acidic nuclear protein interacts with ataxin-1 / A. Matilla, B.T. Koshy, C.J. Cummings, T. Isobe, H.T. Orr, H.Y. Zoghbi // *Nature*. № 389(6654). – P. 974–978.
232. Lim, J. A Protein–Protein Interaction Network for Human Inherited Ataxias and Disorders of Purkinje Cell Degeneration / J. Lim, T. Hao, C. Shaw, A.J. Patel, G. Szabó, J.F. Rual, C.J. Fisk, N. Li, A. Smolyar, D.E. Hill, A-L. Barabási, M. Vidal, H.Y. Zoghbi // *Cell*. – 2006. № 125(4). – P. 801–814.
233. Tsai, C.C. Ataxin 1, a *SCA1* neurodegenerative disorder protein, is functionally linked to the silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors / C.C. Tsai, H.Y. Kao, A. Mizutani, E. Banayo, H. Rajan, M. McKeown, R.M. Evans // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2004. № 101(12). – P. 4047–4052.
234. Venkatraman, A. The histone deacetylase HDAC3 is essential for Purkinje cell function, potentially complicating the use of HDAC inhibitors in *SCA1* / A. Venkatraman, Y.S. Hu, A. Didonna, M. Cvetanovic, A. Krbanjevic, P. Bilesimo, P. Opal // *Hum Mol Genet*. – 2014. № 23(14). – P. 3733–3745.

235. Okuda, T. PQBP-1 transgenic mice show a late-onset motor neuron disease-like phenotype / T. Okuda // *Hum Mol Genet.* – 2003. № 12(7). – P. 711–725.
236. Hong, S. p80 coilin, a coiled body-specific protein, interacts with ataxin-1, the SCA1 gene product / S. Hong, S. Ka, S. Kim, Y. Park, S. Kang // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease.* – 2003. № 1638(1). – P. 35–42.
237. Kang, X. SUMO-Specific Protease 2 Is Essential for Suppression of Polycomb Group Protein-Mediated Gene Silencing during Embryonic Development / X. Kang, Y. Qi, Y. Zuo, Q. Wang, Y. Zou, R.J. Schwartz, J. Cheng, E.T.H. Yeh // *Mol Cell.* – 2010. № 38(2). – P. 191–201.
238. Dhar, N. “Trim”ming PolyQ proteins with engineered PML / N. Dhar, A. Arsiwala, S. Murali, R.S. Kane // *Biotechnol Bioeng.* – 2020. № 117(2). – P. 362–371.
239. Choi, J.Y. Co-chaperone CHIP promotes aggregation of ataxin-1 / J.Y. Choi, J.H. Ryu, H.S. Kim, S.G. Park, K.H. Bae, S. Kang, P.K. Myung, S. Cho, B.C. Park, D.H. Lee // *Molecular and Cellular Neuroscience.* – 2007. № 34(1). – P. 69–79.
240. Hong, S. UbcH6 interacts with and ubiquitinates the SCA1 gene product ataxin-1 / S. Hong, S. Lee, S.G. Cho, S. Kang // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2008. № 371(2). – P. 256–260.
241. Al-Ramahi, I. CHIP Protects from the Neurotoxicity of Expanded and Wild-type Ataxin-1 and Promotes Their Ubiquitination and Degradation / I. Al-Ramahi, Y.C. Lam, H.K. Chen, B. de Gouyon, M. Zhang, A.M. Pérez, J. Branco, M. de Haro, C. Patterson, H.Y. Zoghbi, J. Botas // *Journal of Biological Chemistry.* – 2006. № 281(36). – P. 26714–26724.
242. Davidson, J.D. Identification and characterization of an ataxin-1-interacting protein: A1Up, a ubiquitin-like nuclear protein / J.D. Davidson, B. Riley, E.N. Burrell, L.A. Duvick, H.Y. Zoghbi, H.T. Orr // *Hum Mol Genet.* – 2000. № 9(15). – P. 2305–2312.
243. Hong, S. USP7, a Ubiquitin-Specific Protease, Interacts with Ataxin-1, the SCA1 Gene Product / S. Hong, S.J. Kim, S. Ka, I. Choi, S. Kang // *Molecular and Cellular Neuroscience.* – 2002. № 20(2). – P. 298–306.
244. Jorgensen, N.D. Phosphorylation of ATXN1 at Ser776 in the cerebellum / N.D. Jorgensen, J.M. Andresen, S. Lagalwar, B. Armstrong, S. Stevens, C.E. Byam, L.A. Duvick, S. Lai, P. Jafar-Nejad, H.Y. Zoghbi, H.B. Clark, H.T. Orr // *J Neurochem.* – 2009. № 110(2). – P. 675–686.
245. Gatchel, J.R. The insulin-like growth factor pathway is altered in spinocerebellar ataxia type 1 and type 7 / J.R. Gatchel, K. Watase, C. Thaller, J.P. Carson, P. Jafar-Nejad, C.

- Shaw, T. Zu, H. T Orr, H.Y. Zoghbi // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008. № 105(4). – P. 1291–1296.
246. Goold, R. Down-regulation of the dopamine receptor D2 in mice lacking ataxin 1 / R. Goold, M. Hubank, A. Hunt, J. Holton, R.P. Menon, T. Revesz, M. Pandolfo, A. Matilla-Dueñas // *Hum Mol Genet*. – 2007. № 16(17). – P. 2122–2134.
247. Burreight, E. Identification of a self-association region within the SCA1 gene product, ataxin-1 / E. Burreight // *Hum Mol Genet*. – 1997. № 6(4). – P. 513–518.
248. Karlin, S. Trinucleotide repeats and long homopeptides in genes and proteins associated with nervous system disease and development / S. Karlin, C. Burge // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1996. № 93(4). – P. 1560–1565.
249. Huntley, M. Evolution of Simple Sequence in Proteins / M. Huntley, G.B. Golding // *J Mol Evol*. – 2000. № 51(2). – P. 131–140.
250. Faux, N.G. Functional insights from the distribution and role of homopeptide repeat-containing proteins / N.G. Faux, S.P. Bottomley, A.M. Lesk, J.A. Irving, J.R. Morrison, M.G. de la Banda, J.C. Whisstock // *Genome Res*. – 2005. № 15(4). – P. 537–551.
251. Schaefer, C. Predict impact of single amino acid change upon protein structure / C. Schaefer, B. Rost // *BMC Genomics*. – 2012. № 13(Suppl 4). – P. S4.
252. Tao, R.S. Casein kinase 2 interacts with and phosphorylates ataxin-3 / R.S. Tao, E.K. Fei, Z. Ying, H.F. Wang, G.H. Wang // *Neurosci Bull*. – 2008. № 24(5). – P. 271–277.
253. Fei, E. Phosphorylation of ataxin-3 by glycogen synthase kinase 3 β at serine 256 regulates the aggregation of ataxin-3 / E. Fei, N. Jia, T. Zhang, X. Ma, H. Wang, C. Liu, W. Zhang, L. Ding, N. Nukina, G. Wang // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2007. № 357(2). – P. 487–492.
254. Lim, J. Opposing effects of polyglutamine expansion on native protein complexes contribute to SCA1 / J. Lim, J. Crespo-Barreto, P. A.B. Jafar-Nejad, Bowman, R. Richman, D.E. Hill, H.T. Orr, H.Y. Zoghbi // *Nature*. – 2008. № 452(7188). – P. 713–718.
255. Emamian, E.S. Serine 776 of Ataxin-1 Is Critical for Polyglutamine-Induced Disease in SCA1 Transgenic Mice / E.S. Emamian, M.D. Kaytor, L.A. Duvick, T. Zu, S.K. Tousey, H.Y. Zoghbi, H.B. Clark, H.T. Orr // *Neuron*. – 2003. № 38(3). – P. 375–387.
256. Crespo-Barreto, J. Partial Loss of Ataxin-1 Function Contributes to Transcriptional Dysregulation in Spinocerebellar Ataxia Type 1 Pathogenesis / J. Crespo-Barreto, J.D. Fryer, C.A. Shaw, H.T. Orr, H.Y. Zoghbi // *PLoS Genet*. – 2010. № 6(7). – P. e1001021.

257. Rodrigues, A.J. Absence of Ataxin-3 Leads to Enhanced Stress Response in *C. elegans* / A.J. Rodrigues, A. Neves-Carvalho, A. Teixeira-Castro, A. Rokka, G. Corthals, E. Logarinho, P. Maciel // *PLoS One*. – 2011. № 6(4). – P. e18512.
258. Schmitt, I. Inactivation of the mouse *Atxn3* (ataxin-3) gene increases protein ubiquitination / I. Schmitt, M. Linden, H. Khazneh, B.O. Evert, P. Breuer, T. Klockgether, U. Wuellner // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2007. № 362(3). – P. 734–739.
259. Yu, J. C-terminal deletion of the atrophin-1 protein results in growth retardation but not neurodegeneration in mice / J. Yu, M. Ying, Y. Zhuang, T. Xu, M. Han, X. Wu, R. Xu // *Developmental Dynamics*. – 2009. № 238(10). – P. 2471–2478.
260. Matilla, A. Mice Lacking Ataxin-1 Display Learning Deficits and Decreased Hippocampal Paired-Pulse Facilitation / A. Matilla, E.D. Roberson, S. Banfi, J. Morales, D.L. Armstrong, E.N. Burright, H.T. Orr, J.D. Sweatt, H.Y. Zoghbi, M.M. Matzuk // *The Journal of Neuroscience*. – 1998. № 18(14). – P. 5508–5516.
261. Neve, K.A. Dopamine Receptor Signaling / K.A. Neve, J.K. Seamans, H. Trantham-Davidson // *Journal of Receptors and Signal Transduction*. – 2004. № 24(3). – P. 165–205.
262. Luttik, K. Differential effects of Wnt- β -catenin signaling in Purkinje cells and Bergmann glia in spinocerebellar ataxia type 1 / K. Luttik, L. Tejwani, H. Ju, T. Driessen, C.J.L.M. Smeets, C.R. Edamakanti, A. Khan, J. Yun, P. Opal, J. Lim // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2022. № 119(34). – P. e2208513119.
263. Ciani, L. WNTS in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity / L. Ciani, P.C. Salinas // *Nat Rev Neurosci*. – 2005. № 6(5). – P. 351–362.
264. Hübener, J. N-terminal ataxin-3 causes neurological symptoms with inclusions, endoplasmic reticulum stress and ribosomal dislocation / J. Hübener, F. Vauti, C. Funke, H. Wolburg, Y. Ye, T. Schmidt, K. Wolburg-Buchholz, I. Schmitt, A. Gardyan, S. Driessen, H. Arnold, H.P. Nguyen, O.R. // *Brain*. – 2011. № 134(7). – P. 1925–1942.
265. Burright, E.N. SCA1 transgenic mice: A model for neurodegeneration caused by an expanded CAG trinucleotide repeat / E.N. Burright, C.H. S.A. Brent, T. Matilla, R.M. Feddersen, W.S. Yunis, L.A. Duvick, H.Y. Zoghbi, H.T. Orr // *Cell*. – 1995. № 82(6). – P. 937–948.
266. Clark, H.B. Purkinje Cell Expression of a Mutant Allele of *SCA1* in Transgenic Mice Leads to Disparate Effects on Motor Behaviors, Followed by a Progressive Cerebellar Dysfunction and Histological Alterations / H.B. Clark, E.N. Burright, W.S. Yunis, S.

- Larson, C. Wilcox, B. Hartman, A. Matilla, H.Y. Zoghbi, H.T. Orr // *The Journal of Neuroscience*. – 1997. № 17(19). – P. 7385–7395.
267. Irvine, G.B. Protein Aggregation in the Brain: The Molecular Basis for Alzheimer's and Parkinson's Diseases / G.B. Irvine, O.M. El-Agnaf, G.M. Shankar, D.M. Walsh // *Molecular Medicine*. – 2008. № 14(7–8). – P. 451–464.
268. Kepchia, D. Diverse proteins aggregate in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease brain / D. Kepchia, L. Huang, R. Dargusch, R.A. Rissman, M.N. Shokhirev, W. Fischer, D. Schubert // *Alzheimers Res Ther*. – 2020. № 12(1). – P. 75.
269. Perutz, M.F. Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases / M.F. Perutz, T. Johnson, M. Suzuki, J.T. Finch // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1994. № 91(12). – P. 5355–5358.
270. Scherzinger, E. Huntingtin-Encoded Polyglutamine Expansions Form Amyloid-like Protein Aggregates In Vitro and In Vivo / E. Scherzinger, R. Lurz, M. Turmaine, L. Mangiarini, B. Hollenbach, R. Hasenbank, G.P. Bates, S.W. Davies, H. Lehrach, E.E. Wanker // *Cell*. – 1997. № 90(3). – P. 549–558.
271. Chen, S. Amyloid-like Features of Polyglutamine Aggregates and Their Assembly Kinetics / S. Chen, V. Berthelie, J.B. Hamilton, B. O'Nuallai, R. Wetzel // *Biochemistry*. – 2002. № 41(23). – P. 7391–7399.
272. Scherzinger, E. Self-assembly of polyglutamine-containing huntingtin fragments into amyloid-like fibrils: Implications for Huntington's disease pathology / E. Scherzinger, A. Sittler, K. Schweiger, V. Heiser, R. Lurz, R. Hasenbank, G.P. Bates, H. Lehrach, E.E. Wanker // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1999. № 96(8). – P. 4604–4609.
273. Lajoie, P. Formation and Toxicity of Soluble Polyglutamine Oligomers in Living Cells / P. Lajoie, E.L. Snapp // *PLoS One*. – 2010. № 5(12). – P. e15245.
274. Saudou, F. Huntingtin Acts in the Nucleus to Induce Apoptosis but Death Does Not Correlate with the Formation of Intranuclear Inclusions / F. Saudou, S. Finkbeiner, D. Devys, M.E. Greenberg // *Cell*. – 1998. № 95(1). – P. 55–66.
275. Cummings, C.J. Mutation of the E6-AP Ubiquitin Ligase Reduces Nuclear Inclusion Frequency While Accelerating Polyglutamine-Induced Pathology in SCA1 Mice / C.J. Cummings, E. Reinstein, Y. Sun, B. Antalffy, Y. hui Jiang, A. Ciechanover, H.T. Orr, A.L. Beaudet, H.Y. Zoghbi // *Neuron*. – 1999. № 24(4). – P. 879–892.
276. Durcan, T.M. The Machado–Joseph disease-associated mutant form of ataxin-3 regulates parkin ubiquitination and stability / T.M. Durcan, M. Kontogiannea, T. Thorarinsdottir, L.

- Fallon, A.J. Williams, A. Djarmati, T. Fantaneanu, H.L. Paulson, E.A. Fon // *Hum Mol Genet.* – 2011. № 20(1). – P. 141–154.
277. Mookherjee, D. Cytosolic aggregates in presence of non - translocated proteins perturb endoplasmic reticulum structure and dynamics / D. Mookherjee, P. Majumder, R. Mukherjee, D. Chatterjee, Z. Kaul, S. Das, R. Sougrat, S. Chakrabarti, O. Chakrabarti // *Traffic.* – 2019. № 20(12). – P. 943–960.
278. Cummings, C.J. Chaperone suppression of aggregation and altered subcellular proteasome localization imply protein misfolding in SCA1 / C.J. Cummings, M.A. Mancini, B. Antalfy, D.B. DeFranco, H.T. Orr, H.Y. Zoghbi // *Nat Genet.* – 1998. № 19(2). – P. 148–154.
279. Chai, Y. The Role of Protein Composition in Specifying Nuclear Inclusion Formation in Polyglutamine Disease / Y. Chai, L. Wu, J.D. Griffin, H.L. Paulson // *Journal of Biological Chemistry.* – 2001. № 276(48). – P. 44889–44897.
280. la Spada, A.R. Polyglutamine-Expanded Ataxin-7 Antagonizes CRX Function and Induces Cone-Rod Dystrophy in a Mouse Model of SCA7 / A.R. la Spada, Y.H. Fu, B.L. Sopher, R.T. Libby, X. Wang, L.Y. Li, D.D. Einum, J. Huang, D. E. Possin, A.C. Smith, R.A. Martinez, K.L. Koszdin, P.M. Treuting, C.B. Ware, J.B. Hurley, L.J. Ptáček, S. Chen // *Neuron.* – 2001. № 31(6). – P. 913–927.
281. McCampbell, A. CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine / A. McCampbell // *Hum Mol Genet.* – 2000. № 9(14). – P. 2197–2202.
282. Nucifora, F.C. Interference by Huntingtin and Atrophin-1 with CBP-Mediated Transcription Leading to Cellular Toxicity / F.C. Nucifora, M. Sasaki, M.F. Peters, H. Huang, J.K. Cooper, M. Yamada, H. Takahashi, S. Tsuji, J. Troncoso, V.L. Dawson, T.M. Dawson, C.A. Ross // *Science.* – 2001. № 291(5512). – P. 2423–2428.
283. Steffan, J.S. The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription / J.S. Steffan, A. Kazantsev, O. Spasic-Boskovic, M. Greenwald, Y.Z. Zhu, H. Gohler, E.E. Wanker, G.P. Bates, D.E. Housman, L.M. Thompson // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2000. № 97(12). – P. 6763–6768.
284. Steffan, J.S. Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila* / J.S. Steffan, L. Bodai, J. Pallos, M. Poelman, A. McCampbell, B.L. Apostol, A. Kazantsev, E. Schmidt, Y.Z. Zhu, M. Greenwald, R. Kurokawa, D.E. Housman, G.R. Jackson, J.L. Marsh, L.M. Thompson // *Nature.* – 2001. № 413(6857). – P. 739–743.

285. Wood, J.D. Atrophin-1, the Dentato-Rubral and Pallido-Luysian Atrophy Gene Product, Interacts with Eto/Mtg8 in the Nuclear Matrix and Represses Transcription / J.D. Wood, F.C. Nucifora, K. Duan, C. Zhang, J. Wang, Y. Kim, G. Schilling, N. Sacchi, J.M. Liu, C.A. Ross // *Journal of Cell Biology*. – 2000. № 150(5). – P. 939–948.
286. Zhang, S. Drosophila Atrophin Homolog Functions as a Transcriptional Corepressor in Multiple Developmental Processes / S. Zhang, L. Xu, J. Lee, T. Xu // *Cell*. – 2002. № 108(1). – P. 45–56.
287. Waragai, M. PQBP-1, a novel polyglutamine tract-binding protein, inhibits transcription activation by Brn-2 and affects cell survival / M. Waragai, C.H. Lammers, S. Takeuchi, I. Imafuku, Y. Udagawa, I. Kanazawa, M. Kawabata, M.M. Mouradian, H. Okazawa // *Hum Mol Genet*. – 1999. № 8(6). – P. 977–987.
288. la Spada, A.R. Neurodegeneration: A Case of Arrested Development? / A.R. la Spada // *Cell*. – 2006. № 127(4). – P. 669–671.
289. Gehrking, K.M. Partial loss of Tip60 slows mid-stage neurodegeneration in a spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) mouse model / K.M. Gehrking, J.M. Andresen, L. Duvick, J. Lough, H.Y. Zoghbi, H.T. Orr // *Hum Mol Genet*. – 2011. № 20(11). – P. 2204–2212.
290. Fujita, K. Developmental YAPdeltaC determines adult pathology in a model of spinocerebellar ataxia type 1 / K. Fujita, Y. Mao, S. Uchida, X. Chen, H. Shiwaku, T. Tamura, H. Ito, K. Watase, H. Homma, K. Tagawa, M. Sudol, H. Okazawa // *Nat Commun*. – 2017. № 8(1). – P. 1864.
291. Landis, D.M.D. Electron microscopic analysis of postnatal histogenesis in the cerebellar cortex of staggerer mutant mice / D.M.D. Landis, R.L. Sidman // *J Comp Neurol*. – 1978. № 179(4). – P. 831–863.
292. Sotelo, C. Transsynaptic degeneration ‘en cascade’ in the cerebellar cortex of staggerer mutant mice / C. Sotelo, J.P. Changeux // *Brain Res*. – 1974. № 67(3). – P. 519–526.
293. Crepel, F. Multiple innervation of cerebellar Purkinje cells by climbing fibres in staggerer mutant mouse / F. Crepel, N. Delhay-Bouchaud, J.M. Guastavino, I. Sampaio // *Nature*. – 1980. № 283(5746). – P. 483–484.
294. Doulazmi, M. Cerebellar purkinje cell loss during life span of the heterozygous Staggerer mouse (Rora+/Rorasg) is gender-related / F. Frédéric, Y. Lemaigre-Dubreuil, N. Hadj-Sahraoui, N. Delhay-Bouchaud, J. Mariani // *J. Comp Neurol*. – 1999. № 411(2). – P. 267–273.

295. Bowman, A.B. Duplication of *Atxn11* suppresses SCA1 neuropathology by decreasing incorporation of polyglutamine-expanded ataxin-1 into native complexes / A.B. Bowman, Y.C. Lam, P. Jafar-Nejad, H.K. Chen, R. Richman, R.C. Samaco, J.D. Fryer, J.J. Kahle, H.T. Orr, H.Y. Zoghbi // *Nat Genet.* – 2007. № 39(3). – P. 373–379.
296. Ruegsegger, C. Impaired mTORC1-Dependent Expression of Homer-3 Influences SCA1 Pathophysiology / C. Ruegsegger, D.M. Stucki, S. Steiner, N. Angliker, J. Radecke, E. Keller, B. Zuber, M.A. Rüegg, S. Saxena // *Neuron.* – 2016. № 89(1). – P. 129–146.
297. Saute, J.A.M. Serum insulin-like system alterations in patients with spinocerebellar ataxia type 3 / J.A.M. Saute, A.C.F. da Silva, A.P. Muller, G. Hansel, A.S. de Mello, F. Maeda, L. Vedolin, M.L. Saraiva-Pereira, D.O. Souza, J. Arpa, I. Torres-Aleman, L.V.C. Portela, L.B. Jardim // *Movement Disorders.* – 2011. № 26(4). – P. 731–735.
298. Park, J. RAS–MAPK–MSK1 pathway modulates ataxin 1 protein levels and toxicity in SCA1 / J. Park, I. Al-Ramahi, Q. Tan, N. Mollema, J.R. Diaz-Garcia, T. Gallego-Flores, H. Lu, S. Lagalwar, L. Duvick, H. Kang, Y. Lee, P. Jafar-Nejad, L.S. Sayegh, R. Richman, X. Liu, Y. Gao, C.A. Shaw, J.S.C. Arthur, H.T. Orr, T.F. Westbrook, J. Botas, H.Y. Zoghbi // *Nature.* – 2013. № 498(7454). – P. 325–331.
299. Singh, M.D. *Drosophila Myc*, a novel modifier suppresses the poly(Q) toxicity by modulating the level of CREB binding protein and histone acetylation / M.D. Singh, K. Raj, S. Sarkar // *Neurobiol Dis.* – 2014. № 63. – P. 48–61.
300. Ichise, T. mGluR1 in Cerebellar Purkinje Cells Essential for Long-Term Depression, Synapse Elimination, and Motor Coordination / T. Ichise, M. Kano, K. Hashimoto, D. Yanagihara, K. Nakao, R. Shigemoto, M. Katsuki, A. Aiba // *Science.* – 2000. № 288(5472). – P. 1832–1835.
301. Levenes, C. Incomplete regression of multiple climbing fibre innervation of cerebellar Purkinje cells in mGluR1 mutant mice / C. Levenes, H. Daniel, D. Jaillard, F. Conquet, F. Crépel // *Neuroreport.* – 1997. № 8(2). – P. 571–574.
302. Aiba, A. Deficient cerebellar long-term depression and impaired motor learning in mGluR1 mutant mice / A. Aiba, M. Kano, C. Chen, M.E. Stanton, G.D. Fox, K. Herrup, T.A. Zwingman, S. Tonegawa // *Cell.* – 1994. № 79(2). – P. 377–388.
303. Conquet, F. Motor deficit and impairment of synaptic plasticity in mice lacking mGluR1 / F. Conquet, Z.I. Bashir, C.H. Davies, H. Daniel, F. Ferraguti, F. Bordi, K. Franz-Bacon, A. Reggiani, V. Matarese, F. Condé // *Nature.* – 1994. № 372(6503). – P. 237–243.

304. Hartmann, J. Mechanisms of metabotropic glutamate receptor-mediated synaptic signalling in cerebellar Purkinje cells / J. Hartmann, A. Konnerth // *Acta Physiologica*. – 2009. № 195(1). – P. 79–90.
305. Lopatina, O.L. Excitation/inhibition imbalance and impaired neurogenesis in neurodevelopmental and neurodegenerative disorders / O.L. Lopatina, N.A. Malinovskaya, Y.K. Komleva, Y.V. Gorina, A.N. Shuvaev, R.Y. Olovyannikova, O.S. Belozor, O.A. Belova, H. Higashida and A.B. Salmina // *Reviews in the Neurosciences*. – 2019. №8(30). – P. 807-820.
306. Mitsumura, K. Disruption of metabotropic glutamate receptor signalling is a major defect at cerebellar parallel fibre-Purkinje cell synapses in “staggerer” mutant mice / K. Mitsumura, N. Hosoi, N. Furuya, H. Hirai // *J Physiol*. – 2011. № 589(13). – P. 3191–3209.
307. Notartomaso, S. Pharmacological enhancement of mGlu1 metabotropic glutamate receptors causes a prolonged symptomatic benefit in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 1 / S. Notartomaso, C. Zappulla, F. Biagioni, M. Cannella, D. Bucci, G. Mascio, P. Scarselli, F. Fazio, F. Weisz, L. Lionetto, M. Simmaco, R. Gradini, G. Battaglia, M. Signore, A. Puliti, F. Nicoletti // *Mol Brain*. – 2013. № 6(1). – P. 48.
308. Ribeiro, F.M. Metabotropic Glutamate Receptor-Mediated Cell Signaling Pathways Are Altered in a Mouse Model of Huntington’s Disease / F.M. Ribeiro, M. Paquet, L.T. Ferreira, T. Cregan, P. Swan, S.P. Cregan, P. Swan, S.P. Cregan, S.S.G. Ferguson // *Journal of Neuroscience*. – 2010. № 30(1). – P. 316–324.
309. Skinner, P.J. Altered Trafficking of Membrane Proteins in Purkinje Cells of SCA1 Transgenic Mice / P.J. Skinner, C.A. Vierra-Green, H.B. Clark, H.Y. Zoghbi, H.T. Orr // *Am J Pathol*. – 2001. № 159(3). – P. 905–913.
310. Inoue, T. Calcium dynamics and electrophysiological properties of cerebellar Purkinje cells in SCA1 transgenic mice / T. Inoue // *Neurosci Res*. – 2000. № 38. – P. S83.
311. Watase, K. A Long CAG Repeat in the Mouse Sca1 Locus Replicates SCA1 Features and Reveals the Impact of Protein Solubility on Selective Neurodegeneration / K. Watase, E.J. Weeber, B. Xu, B. Antalffy, L. Yuva-Paylor, K. Hashimoto, M. Kano, R. Atkinson, Y. Sun, D.L. Armstrong, J.D. Sweatt, H.T. Orr, R. Paylor, H.Y. Zoghbi // *Neuron*. – 2002. № 34(6). – P. 905–919.
312. Torashima, T. Lentivector -mediated rescue from cerebellar ataxia in a mouse model of spinocerebellar ataxia / T. Torashima, C. Koyama, A. Iizuka, K. Mitsumura, K.

- Takayama, S. Yanagi, M. Oue, H. Yamaguchi, H. Hirai // *EMBO Rep.* – 2008. № 9(4). – P. 393–399.
313. Liddelov, S. SnapShot: Astrocytes in Health and Disease / S. Liddelov, B. Barres // *Cell.* – 2015. № 162(5) – P. 1170-1170.e1.
314. Taniguchi, J.B. RpA1 ameliorates symptoms of mutant ataxin-1 knock-in mice and enhances DNA damage repair / J.B. Taniguchi, K. Kondo, K. Fujita, X. Chen, H. Homma, T. Sudo, Y. Mao, K. Watase, T. Tanaka, K. Tagawa, T. Tamura, S. Muramatsu, H. Okazawa // *Hum Mol Genet.* – 2016. № 25(20). – P. 4432-4447.
315. Rothermundt, M. S100B in brain damage and neurodegeneration / M. Rothermundt, M. Peters, J.H.M. Prehn, V. Arolt // *Microsc Res Tech.* – 2003. № 60(6). – P. 614–632.
316. Rodgers, K.R. Innate Immune Functions of Astrocytes are Dependent Upon Tumor Necrosis Factor-Alpha / K.R. Rodgers, Y. Lin, T.J. Langan, Y. Iwakura, R.C. Chou // *Sci Rep.* – 2020. № 10(1). – P. 7047.
317. Cvetanovic, M. Early activation of microglia and astrocytes in mouse models of spinocerebellar ataxia type 1 / M. Cvetanovic, M. Ingram, H. Orr, P. Opal // *Neuroscience.* – 2015. № 289. – P. 289–299.
318. Custer, S.K. Bergmann glia expression of polyglutamine-expanded ataxin-7 produces neurodegeneration by impairing glutamate transport / S.K. Custer, G.A. Garden, N. Gill, U. Rueb, R.T. Libby, C. Schultz, S.J. Guyenet, T. Deller, L.E. Westrum, B.L. Sopher, A.R. La Spada // *Nat Neurosci.* – 2006. № 9(10). – P. 1302–1311.
319. Furrer, S.A. Spinocerebellar Ataxia Type 7 Cerebellar Disease Requires the Coordinated Action of Mutant Ataxin-7 in Neurons and Glia, and Displays Non-Cell-Autonomous Bergmann Glia Degeneration / S.A. Furrer, M.S. Mohanachandran, S.M. Waldherr, C. Chang, V.A. Damian, B.L. Sopher, G.A. Garden, A.R. La Spada // *Journal of Neuroscience.* – 2011. № 31(45). – P. 16269–16278.
320. Garden, G.A. Polyglutamine-Expanded Ataxin-7 Promotes Non-Cell-Autonomous Purkinje Cell Degeneration and Displays Proteolytic Cleavage in Ataxic Transgenic Mice / G.A. Garden, R.T. Libby, Y.H. Fu, Y. Kinoshita, J. Huang, D.E. Possin, A.C. Smith, R.A. Martinez, G.C. Fine, S.K. Grote, C.B. Ware, D.D. Einum, R.S. Morrison, L.J. Ptacek, B.L. Sopher, A.R. La Spada // *The Journal of Neuroscience.* – 2002. № 22(12). – P. 4897–4905.
321. Adams, S.M. Pronounced Cell Death in the Absence of NMDA Receptors in the Developing Somatosensory Thalamus / S.M. Adams // *Journal of Neuroscience.* – 2004. № 24(42) – P. 9441–9450.

322. Beal, M.F. Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases / M.F. Beal // *FASEB J.* – 1992. № 6(15). – P. 3338–3344.
323. Иллариошкин, С.Н. Превентивная нейропротекция при нейродегенеративных заболеваниях: использование антагонистов глутаматных рецепторов (обзор литературы и собственный опыт) / С.Н. Иллариошкин, С.А. Ключников, Л.В. Брылёв, П.А. Федин, Е.Д. Макарова, И.А. Иванова-Смоленская // *Неврологический журнал.* – 2006. № 11. – P. 47–54.
324. Lewerenz, J. Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases—What is the Evidence? / J. Lewerenz, P. Maher // *Front Neurosci.* – 2015. № 9. – P. 469.
325. Arundine, M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity / M. Arundine, M. Tymianski // *Cell Calcium.* – 2003. № 34(4–5). – P. 325–337.
326. Пономарев, В.В. Нейродегенеративные заболевания / В.В. Пономарев // *Руководство для врачей. Фолиант. СПб.* – 2013. С. – 1–200.
327. Chitnis, T. CNS inflammation and neurodegeneration / T. Chitnis, H.L. // *Weiner Journal of Clinical Investigation.* – 2017. № 127(10). – P. 3577–3587.
328. Gundersen, V. Protein aggregation in Parkinson’s disease / V. Gundersen // *Acta Neurol Scand.* – 2010. № 122. – P. 82–87.
329. Chisholm, C.G. Protein Aggregation in Amyotrophic Lateral Sclerosis / C.G. Chisholm, J.J. Yerbury, L. McAlary // *Spectrums of Amyotrophic Lateral Sclerosis.* – 2021. – P. 105–121.
330. Kreiser, R.P. Therapeutic Strategies to Reduce the Toxicity of Misfolded Protein Oligomers / R.P. Kreiser, A.K. Wright, N.R. Block, J.E. Hollows, L.T. Nguyen, K. LeForte, B. Mannini, M. Vendruscolo, R. Limbocker // *Int J Mol Sci.* – 2020. № 21(22). – P. 8651.
331. Frieden, C. Protein oligomerization as a metabolic control mechanism: Application to apoE / C. Frieden // *Protein Science.* – 2019. № 28(4). – P. 837–842.
332. Shao, J. Diamond MI. Polyglutamine diseases: emerging concepts in pathogenesis and therapy / J. Shao // *Hum Mol Genet.* – 2007. № 16. – P. 115–123.
333. Ishikawa, K. Abundant expression and cytoplasmic aggregations of alpha1A voltage-dependent calcium channel protein associated with neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 6 / K. Ishikawa // *Hum Mol Genet.* – 1999. № 8(7). – P. 1185–1193.

334. Cummings, C.J. Trinucleotide Repeats: Mechanisms and Pathophysiology / C.J. Cummings, H.Y. Zoghbi // *Annu Rev Genomics Hum Genet.* – 2000. № 1(1). – P. 281–328.
335. Hershko, A. The ubiquitin system / A. Hershko, A. Ciechanover // *Annu Rev Biochem.* – 1998. № 67(1). – P. 425–479.
336. Сорокин, А.В. Протеасомная система деградации и процессинга белков / А.В. Сорокин, Е.Р. Ким, Л.П. Овчинников // *Успехи биологической химии.* – 2009. № 49. – P. 3–76.
337. Yvert, G. Expanded polyglutamines induce neurodegeneration and trans-neuronal alterations in cerebellum and retina of SCA7 transgenic mice / G. Yvert, K.S. Lindenberg, S. Picaud, G.B. Landwehrmeyer, J.A. Sahel, J.L. Mandel // *Hum Mol Genet.* – 2000. № 9(17). – P. 2491–2506.
338. Nishitoh, H. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats / H. Nishitoh, A. Matsuzawa, K. Tobiume, K. Saegusa, K. Takeda, K. Inoue, S. Hori, A. Kakizuka, H. Ichijo // *Genes Dev.* – 2002. № 16(11). – P. 1345–1355.
339. Tobisawa, S. Mutant SOD1 linked to familial amyotrophic lateral sclerosis, but not wild-type SOD1, induces ER stress in COS7 cells and transgenic mice / S. Tobisawa, Y. Hozumi, S. Arawaka, S. Koyama, M. Wada, M. Nagai, M. Aoki, Y. Itoyama, K. Goto, T. Kato // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2003. № 303(2). – P. 496–503.
340. Меситов, М.В. Индукция стресса эндоплазматического ретикулума в условиях окислительно-восстановительного дисбаланса в клетках Т-лимфобластной лейкемии человека / М.В. Меситов, Т.И. Игнашкова // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* – 2012. №3. – P. 87–93.
341. van de Loo, S. Ataxin-2 associates with rough endoplasmic reticulum / S. van de Loo, F. Eich, D. Nonis, G. Auburger, J. Nowock // *Exp Neurol.* – 2009. № 215(1). – P. 110–118.
342. Schmidt, C. Amyloid precursor protein and amyloid β -peptide bind to ATP synthase and regulate its activity at the surface of neural cells / C. Schmidt, E. Lepsverdize, S.L. Chi, A.M. Das, S.V. Pizzo, A. Dityatev, M. Schachner // *Mol Psychiatry.* – 2008. № 13(10). – P. 953–969.
343. Chou, A.H. Polyglutamine-expanded ataxin-3 activates mitochondrial apoptotic pathway by upregulating Bax and downregulating Bcl-xL / A.H. Chou, T.H. Yeh, Y.L. Kuo, Y.C. Kao, M.J. Jou, C.Y. Hsu, S. Tsai, A. Kakizuka, H. Wang // *Neurobiol Dis.* – 2006. № 21(2). – P. 333–345.

344. Wang, H.L. Polyglutamine-expanded ataxin-7 activates mitochondrial apoptotic pathway of cerebellar neurons by upregulating Bax and downregulating Bcl-xL / H.L. Wang, T.H. Yeh, A.H. Chou, Y.L. Kuo, L.J. Luo, C.Y. He, C. He, P. Huang, A.H. Li // *Cell Signal.* – 2006. № 18(4). – P. 541–552.
345. Perlmutter, D.H. Liver injury in $\alpha 1$ -antitrypsin deficiency: an aggregated protein induces mitochondrial injury / D.H. Perlmutter // *Journal of Clinical Investigation.* – 2002. № 110(11). – P. 1579–1583.
346. Судаков, Н.П. Дисфункция митохондрий при нейродегенеративных заболеваниях / Н.П. Судаков, В.А. Бывальцев, С.Б. Никифоров, В.А. Сороковиков, И.В. Клименков, Ю.М. Константинов // *Журнал Неврологии и Психиатрии им СС Корсакова.* – 2010. №9. – P. 87–91.
347. Igarashi, S. Suppression of aggregate formation and apoptosis by transglutaminase inhibitors in cells expressing truncated DRPLA protein with an expanded polyglutamine stretch / S. Igarashi, R. Koide, T. Shimohata, M. Yamada, Y. Hayashi, H. Takano, H. Date, M. Oyake, T. Sato, A. Sato, S. Egawa, T. Ikeuchi, H. Tanaka, R. Nakano, K. Tanaka, I. Hozumi, T. Inuzuka, H. Takahashi, S. Tsuji // *Nat Genet.* – 1998. № 18(2). – P. 111–117.
348. Li, L.B. Suppression of Polyglutamine Toxicity by the Yeast Sup35 Prion Domain in *Drosophila* / L.B. Li, K. Xu, N.M. Bonini // *Journal of Biological Chemistry.* – 2007. № 282(52). – P. 37694–37701.
349. Berke, S.J.S. Caspase-mediated proteolysis of the polyglutamine disease protein ataxin-3 / S.J.S. Berke, F.A.F. Schmied, E.R. Brunt, L.M. Ellerby, H.L. Paulson // *J Neurochem.* – 2004. № 89(4). – P. 908–918.
350. Hart, M.P. ALS-Associated Ataxin 2 PolyQ Expansions Enhance Stress-Induced Caspase 3 Activation and Increase TDP-43 Pathological Modifications / M.P. Hart, A.D. Gitler // *Journal of Neuroscience.* – 2012. № 32(27). – P. 9133–9142.
351. Nakagawa, T. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β / T. Nakagawa, H. Zhu, N. Morishima, E. Li, J. Xu, B.A. Yankner, J. Yuan // *Nature.* – 2000. № 403(6765). – P. 98–103.
352. Mehmet, H. Caspases find a new place to hide / H. Mehmet // *Nature.* – 2000. № 403(6765). – P. 29–30.
353. Strick, P.L.I.M. The Cerebellum: The Cerebellum and Neural Control / P.L.I.M. Strick, I. Masao // *Science.* – 1985. № 229(4713). – P. 547–547.

354. Thach, W.T. The Cerebellum and the Adaptive Coordination of Movement / W.T. Thach, H.P. Goodkin, J.G. Keating // *Annu Rev Neurosci.* – 1992. № 15(1). – P. 403–442.
355. Allen, G.I. Cerebrocerebellar communication systems / G.I. Allen, N. Tsukahara // *Physiol Rev.* – 1974. № 54(4) – P. 957–1006.
356. Pribram, K.H. Experimental paradoxes and principles in neuropsychology. First Edition K.H. Pribram // Cambridge University Press. – 1971. – P. 1–432.
357. Barmack, N.H. Turvy: Functions of Climbing and Mossy Fibers in the Vestibulo-Cerebellum / N.H. Barmack, V.T. Yakhnitsa // *The Neuroscientist.* – 2011. № 17(2). – P. 221–236.
358. Oscarsson, O. Functional units of the cerebellum - sagittal zones and microzones / O. Oscarsson // *Trends Neurosci.* – 1979. № 2. – P. 143–145.
359. Llinás, R. Properties and distribution of ionic conductances generating electroresponsiveness of mammalian inferior olivary neurones in vitro / R. Llinás, Y. Yarom // *J Physiol.* – 1981. № 315(1). – P. 569–584.
360. Llinás, R. Oscillatory properties of guinea-pig inferior olivary neurones and their pharmacological modulation: an in vitro study / R. Llinás, Y. Yarom // *J Physiol.* – 1986. № 376(1). – P. 163–182.
361. Llinás, R. On the cerebellum and motor learning / R. Llinás, J.P. Welsh // *Curr Opin Neurobiol.* – 1993. № 3(6). – P. 958–965.
362. Welsh, J.P. Dynamic organization of motor control within the olivocerebellar system / J.P. Welsh, E.J. Lang, I. Suglhara, R. Llinás // *Nature.* – 1995. № 374(6521). – P. 453–457.
363. Watanabe, M. Climbing fiber synapse elimination in cerebellar Purkinje cells / M. Watanabe, M. Kano // *European Journal of Neuroscience.* – 2011. № 34(10). – P. 1697–1710.
364. Гелашвили, О.А. Вариант периодизации биологически исходных стадий онтогенеза человека и крысы / О.А. Гелашвили // *Саратовский научно-медицинский журнал.* – 2008. № 4(22). – P. 125–126.
365. Marr, D. A theory of cerebellar cortex / D. Marr // *J Physiol.* – 1969. № 202(2). – P. 437–470.
366. Albus, J.S. A theory of cerebellar function / J.S. Albus // *Math Biosci.* – 1971. № 10(1–2). – P. 25–61.
367. Ito, M. Long-Term Depression / M. Ito // *Annu Rev Neurosci.* – 1989. № 12(1). – P. 85–102.

368. Ito, M. Cerebellar Long-Term Depression: Characterization, Signal Transduction, and Functional Roles / M. Ito // *Physiol Rev.* – 2001. № 81(3). – P. 1143–1195.
369. Ito, M. The cerebellum and neural control / M. Ito // Raven Press. – 1984. – P. 1–580.
370. Dow, R.S. The physiology and pathology of the cerebellum / R.S. Dow, G. Moruzzi // Minnesota archive editions. 1958. – P. 1–692.
371. Tanimura, A. The Endocannabinoid 2-Arachidonoylglycerol Produced by Diacylglycerol Lipase α Mediates Retrograde Suppression of Synaptic Transmission / A. Tanimura, M. Yamazaki, Y. Hashimoto, M. Uchigashima, S. Kawata, M. Abe, Y. Kita, K. Hashimoto, T. Shimizu, M. Watanabe, K. Sakimura, M. Kano // *Neuron.* – 2010. № 65(3). – P. 320–327.
372. Yoo, S.Y. SCA7 Knockin Mice Model Human SCA7 and Reveal Gradual Accumulation of Mutant Ataxin-7 in Neurons and Abnormalities in Short-Term Plasticity / S.Y. Yoo, M.E. Pennesi, E.J. Weeber, B. Xu, R. Atkinson, S. Chen, D.L. Armstrong, S.M. Wu, J.D. Sweatt, H.Y. Zoghbi // *Neuron.* – 2003. № 37(3). – P. 383–401.
373. Shuvaev, A.N. Mutant PKC γ in Spinocerebellar Ataxia Type 14 Disrupts Synapse Elimination and Long-Term Depression in Purkinje Cells In Vivo / A.N. Shuvaev, H. Horiuchi, T. Seki, H. Goenawan, T. Irie, A. Iizuka, N. Sakai, H. Hirai // *Journal of Neuroscience.* – 2011. № 31(40). – P. 14324–14334.
374. Sakai, T. Effects of tetrahydrobiopterin on ataxia in Machado-Joseph disease may be based upon the theory of ‘cerebellar long-term depression / T. Sakai // *Med Hypotheses.* – 2001. № 57(2). – P. 180–182.
375. Schonewille, M. Reevaluating the Role of LTD in Cerebellar Motor Learning / M. Schonewille, Z. Gao, H.J. Boele, M.F.V. Veloz, W.E. Amerika, A.A.M. Šimek, M.T. De Jeu, J.P. Steinberg, K. Takamiya, F.E. Hoebeek, D.J. Linden, R.L. Huganir, C.I. De Zeeuw // *Neuron.* – 2011. № 70(1). – P. 43–50.
376. Wang, J.H. Associative Memory Cells are Recruited to Encode Triple Sensory Signals via Synapse Formation / J.H. Wang, J. Feng, W. Lu // *Biophys J.* – 2017. № 112(3). – P. 443a–444a.
377. Xia, H. RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia / H. Xia, Q. Mao, S.L. Eliason, S.Q. Harper, I.H. Martins, H.T. Orr, H.L. Paulson, L.Y. Robert, M. Kotin, B.L. Davidson // *Nat Med.* – 2004. № 10(8). – P. 816–820.

378. Keiser, M.S. RNAi or overexpression: Alternative therapies for Spinocerebellar Ataxia Type 1 / M.S. Keiser, J.C. Geoghegan, R.L. Boudreau, K.A. Lennox, B.L. Davidson // *Neurobiol Dis.* – 2013. № 56. – P. 6–13.
379. Nóbrega, C. Silencing Mutant Ataxin-3 Rescues Motor Deficits and Neuropathology in Machado-Joseph Disease Transgenic Mice / C. Nóbrega, I. Nascimento-Ferreira, I. Onofre, D. Albuquerque, H. Hirai, N. Déglon, L.P. de Almeida // *PLoS One.* – 2013. № 8(1). – P. e52396.
380. Scholefield, J. Allele-specific silencing of mutant Ataxin-7 in SCA7 patient-derived fibroblasts / J. Scholefield, L. Watson, D. Smith, J. Greenberg, M.J. Wood // *European Journal of Human Genetics.* – 2014. № 22(12). – P. 1369–1375.
381. Grimm, D. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways / D. Grimm, K.L. Streetz, C.L. Jopling, T.A. Storm, K. Pandey, C.R. Davis, C.R. Davis, P. Marion, F. Salazar, M.A. Kay // *Nature.* – 2006. № 441(7092). – P. 537–541.
382. Cvetanovic, M. LANP mediates neuritic pathology in Spinocerebellar ataxia type 1 / M. Cvetanovic, R.K. Kular, P. Opal // *Neurobiol Dis.* – 2012. № 48(3). – P. 526–532.
383. Lagalwar, S. Regulation of Ataxin-1 Phosphorylation and Its Impact on Biology / S. Lagalwar, H.T. Orr // *Methods Mol Biol.* – 2013. № 1010. – P. 201–209.
384. Fernandez-Funez, P. Identification of genes that modify ataxin-1-induced neurodegeneration / P. Fernandez-Funez, M.L. Nino-Rosales, B. de Gouyon, W.C. She, J.M. Luchak, P. Martinez, E. Turiegano, J. Benito, M. Capovilla, P.J. Skinner, A. McCall, I. Canal, H.T. Orr, H.Y. Zoghbi, J. Botas // *Nature.* – 2000. № 408(6808). – P. 101–106.
385. Kazemi-Esfarjani, P. Genetic Suppression of Polyglutamine Toxicity in *Drosophila* / P. Kazemi-Esfarjani, S. Benzer // *Science.* – 2000. № 287(5459). – P. 1837–1840.
386. Muchowski, P.J. Hsp70 and Hsp40 chaperones can inhibit self-assembly of polyglutamine proteins into amyloid-like fibrils / P.J. Muchowski, G. Schaffar, A. Sittler, E.E. Wanker, M.K. Hayer-Hartl, F.U. Hartl // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2000. № 97(14). – P. 7841–7846.
387. Reina, C.P. Basal and stress-induced Hsp70 are modulated by ataxin-3 / C.P. Reina, B.Y. Nabet, P.D. Young, R.N. Pittman // *Cell Stress Chaperones.* – 2012. № 17(6). – P. 729–742.
388. Cushman-Nick, M. Hsp104 Suppresses Polyglutamine-Induced Degeneration Post Onset in a *Drosophila* MJD/SCA3 Model / M. Cushman-Nick, N.M. Bonini, J. Shorter // *PLoS Genet.* – 2013. № 9(9). – P. e1003781.

389. Lindstedt, P.R. Enhancement of the Anti-Aggregation Activity of a Molecular Chaperone Using a Rationally Designed Post-Translational Modification / P.R. Lindstedt, F.A. Aprile, M.J. Matos, M. Perni, J.B. Bertoldo, B. Bernardim, Q. Peter, G. Jiménez-Osés, T.P.J. Knowles, C.M. Dobson, F. Corzana, M. Vendruscolo, G.J.L. Bernardes // *ACS Cent Sci.* – 2019. № 5(8). – P. 1417–1424.
390. Nagai Y, Tucker T, Ren H, Kenan DJ, Henderson BS, Keene JD, et al. Inhibition of Polyglutamine Protein Aggregation and Cell Death by Novel Peptides Identified by Phage Display Screening. *Journal of Biological Chemistry.* – 2000. № 275(14). – P. 10437–10442.
391. Kazantsev, A. A bivalent Huntingtin binding peptide suppresses polyglutamine aggregation and pathogenesis in *Drosophila* / A. Kazantsev, H.A. Walker, N. Slepko, J.E. Bear, E. Preisinger, J.S. Steffan, Y. Zhu, F.B. Gertler, D.E. Housman, J.L. Marsh, L.M. Thompson // *Nat Genet.* – 2002. № 30(4). – P. 367–376.
392. Heiser, V. Identification of benzothiazoles as potential polyglutamine aggregation inhibitors of Huntington's disease by using an automated filter retardation assay / V. Heiser, S. Engemann, W. Bröcker, I. Dunkel, A. Boeddrich, S. Waelter, E. Nordhoff, R. Lurz, N. Schugardt, S. Rautenberg, C. Herhaus, G. Barnickel, H. Böttcher, H. Lehrach, E.E. Wanker // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2002. № 99(suppl_4). – P. 16400–16406.
393. Chen, X. Expanded Polyglutamine-Binding Peptoid as a Novel Therapeutic Agent for Treatment of Huntington's Disease / X. Chen, J. Wu, Y. Luo, X. Liang, C. Supnet, M.W. Kim, G.P. Lotz, G. Yang, P.J. Muchowski, T. Kodadek, I. Bezprozvanny // *Chem Biol.* – 2011. № 18(9). – P. 1113–1125.
394. McCampbell, A. Histone deacetylase inhibitors reduce polyglutamine toxicity / A. McCampbell, A.A. Taye, L. Whitty, E. Penney, J.S. Steffan, K.H. Fischbeck // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2001. № 98(26). – P. 15179–15184.
395. Steffan, J.S. Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila* / J.S. Steffan, L. Bodai, J. Pallos, M. Poelman, A. McCampbell, B.L. Apostol, A. Kazantsev, E. Schmidt, Y.Z. Zhu, M. Greenwald, R. Kurokawa, D.E. Housman, G.R. Jackson, J.L. Marsh, L.M. Thompson // *Nature.* – 2001. № 413(6857). – P. 739–743.
396. Qin, Q. A novel GTPase, CRAG, mediates promyelocytic leukemia protein-associated nuclear body formation and degradation of expanded polyglutamine protein / Q. Qin, R.

- Inatome, A. Hotta, M. Kojima, H. Yamamura, H. Hirai, T. Yoshizawa, H. Tanaka, K. Fukami, S. Yanagi // *Journal of Cell Biology*. – 2006. № 172(4). – P. 497–504.
397. Orr, H.T. Beyond the Qs in the polyglutamine diseases / H.T. Orr // *Genes Dev*. – 2001. № 15(8). – P. 925–932.
398. Nagashima, S. CRMP5-associated GTPase (CRAG) Protein Protects Neuronal Cells against Cytotoxicity of Expanded Polyglutamine Protein Partially via c-Fos-dependent Activator Protein-1 Activation / S. Nagashima, T. Fukuda, Y. Kubota, A. Sugiura, M. Nakao, R. Inatome, S. Yanagi // *Journal of Biological Chemistry*. – 2011. № 286(39). – P. 33879–3389.
399. Parekkadan, B. Mesenchymal Stem Cells as Therapeutics / B. Parekkadan, J.M. Milwid // *Annu Rev Biomed Eng*. – 2010. № 12(1). – P. 87–117.
400. Jin, H. Comparative Analysis of Human Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Adipose Tissue, and Umbilical Cord Blood as Sources of Cell Therapy // H. Jin, Y. Bae, M. Kim, S.J. Kwon, H. Jeon, S. Choi, S.W. Kim, Y.S. Yang, W. Oh, J.W. Chang // *Int J Mol Sci*. – 2013. № 14(9). – P. 17986–18001.
401. Su, H.L. Generation of cerebellar neuron precursors from embryonic stem cells / H.L. Su, K. Muguruma, M. Matsuo-Takasaki, M. Kengaku, K. Watanabe, Y. Sasai // *Dev Biol*. – 2006. № 290(2). – P. 287–296.
402. Takada, K. The effect of BMP4, FGF8 and WNT3a on mouse iPS cells differentiating to odontoblast-like cells / K. Takada, A. Odashima, S. Onodera, A. Saito, N. Aida, M. Furusawa, T. Azuma // *Med Mol Morphol*. – 2022. № 55(3). – P. 199–209.
403. D'Amour, K.A. Are somatic stem cells pluripotent or lineage-restricted? / K.A. D'Amour, F.H. Gage // *Nat Med*. – 2002. № 8(3). – P. 213–214.
404. Shuvaev, A.N. Progressive impairment of cerebellar mGluR signalling and its therapeutic potential for cerebellar ataxia in spinocerebellar ataxia type 1 model mice / A.N. Shuvaev, N. Hosoi, Y. Sato, D. Yanagihara, H. Hirai // *J Physiol*. – 2017. № 595(1). – P. 141–164.
405. Oue, M. Characterization of mutant mice that express polyglutamine in cerebellar Purkinje cells / M. Oue, K. Mitsumura, T. Torashima, C. Koyama, H. Yamaguchi, N. Furuya, H. Hirai // *Brain Res*. – 2009. № 1255. – P. 9–17.
406. Sawada, Y. High Transgene Expression by Lentiviral Vectors Causes Maldevelopment of Purkinje Cells In Vivo / Y. Sawada, G. Kajiwara, A. Iizuka, K. Takayama, A.N. Shuvaev, C. Koyama, H. Hirai // *The Cerebellum*. – 2010. № 9(3). – P. 291–302.

407. Hamilton, B.A. Disruption of the nuclear hormone receptor ROR α in staggerer mice / B.A. Hamilton, W.N. Frankel, A.W. Kerrebrock, T.L. Hawkins, W. FitzHugh, K. Kusumi, L.B. Russell, K.L. Mueller, V. van Berkel, B.W. Birren, L. Kruglyak, E.S. Lander // *Nature*. – 1996. № 379(6567). – P. 736–739.
408. Shuvaev, A.N. Chronic optogenetic stimulation of Bergman glia leads to dysfunction of EAAT1 and Purkinje cell death, mimicking the events caused by expression of pathogenic ataxin-1 / A.N. Shuvaev, O.S. Belozor, O. Mozhei, D.A. Yakovleva, I.V. Potapenko, A.N. Shuvaev, M.V. Smolnikova, V.V. Salmin, A.B. Salmina, H. Hirai, A.G. Teschemacher, S. Kasparov // *Neurobiol Dis*. – 2021. № 154. – P. 105340.
409. Belozor, O.S. Extracellular S100 β Disrupts Bergman Glia Morphology and Synaptic Transmission in Cerebellar Purkinje Cells / O.S. Belozor, D.A. Yakovleva, I.V. Potapenko, A.N. Shuvaev, M.V. Smolnikova, A. Vasilev, E.A. Pozhilenkova, A.N. Shuvaev // *Brain Sci*. – 2019. № 9(4). – P. 80.
410. Hitoshi, N. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector / N. Hitoshi, Y. Ken-ichi, M. Jun-ichi // *Gene*. – 1991. № 108(2). – P. 193–199.
411. Hawley, R.G. Versatile retroviral vectors for potential use in gene therapy / R.G. Hawley, F.H. Lieu, A.Z. Fong, T.S. Hawley // *Gene Ther*. – 1994. № 1(2). – P. 136–138.
412. Oberdick, J. A Promoter That Drives Transgene Expression in Cerebellar Purkinje and Retinal Bipolar Neurons / J. Oberdick, R.J. Smeyne, J.R. Mann, S. Zackson, J.I. Morgan // *Science*. – 1990. № 248(4952). – P. 223–226.
413. Iizuka, A. Lentiviral vector-mediated rescue of motor behavior in spontaneously occurring hereditary ataxic mice / A. Iizuka, K. Takayama, T. Torashima, M. Yamasaki, C. Koyama, K. Mitsumura, M. Watanabe, H. Hirai // *Neurobiol Dis*. – 2009. № 35(3). – P. 457–465.
414. Torashima, T. Exposure of lentiviral vectors to subneutral pH shifts the tropism from Purkinje cell to Bergmann glia / T. Torashima, N. Yamada, M. Itoh, A. Yamamoto, H. Hirai // *European Journal of Neuroscience*. – 2006. № 24(2). – P. 371–380.
415. Takayama, K. Purkinje-cell-preferential transduction by lentiviral vectors with the murine stem cell virus promoter / K. Takayama, T. Torashima, H. Horiuchi, H. Hirai // *Neurosci Lett*. – 2008. № 443(1). – P. 7–11.
416. Tamayose, K. A New Strategy for Large-Scale Preparation of High-Titer Recombinant Adeno-Associated Virus Vectors by Using Packaging Cell Lines and Sulfonated Cellulose Column Chromatography / K. Tamayose, Y. Hirai, T. Shimada // *Hum Gene Ther*. – 1996. № 7(4). – P. 507–513.

417. Torashima, T. Lentivector - mediated rescue from cerebellar ataxia in a mouse model of spinocerebellar ataxia / T. Torashima, C. Koyama, A. Iizuka, K. Mitsumura, K. Takayama, S. Yanagi, M. Oue, H. Yamaguchi, H. Hirai // *EMBO Rep.* – 2008. № 9(4). – P. 393–399.
418. Miyake, K. Serotype-independent Method of Recombinant Adeno-associated Virus (AAV) Vector Production and Purification / K. Miyake, N. Miyake, Y. Yamazaki, T. Shimada, Y. Hirai // *Journal of Nippon Medical School.* – 2012. № 79(6). – P. 394–402.
419. Liu, B. Viral vectors based on bidirectional cell-specific mammalian promoters and transcriptional amplification strategy for use in vitro and in vivo / B. Liu, J.F. Paton, S. Kasparov // *BMC Biotechnol.* – 2008. № 8(1). – P. 49.
420. Gourine, A.V. Astrocytes Control Breathing Through pH-Dependent Release of ATP / A.V. Gourine, V. Kasymov, N. Marina, F. Tang, M.F. Figueiredo, S. Lane, A.G. Teschemacher, K.M. Spyer, K. Deisseroth, S. Kasparov // *Science.* – 2010. № 329(5991). – P. 571–575.
421. Figueiredo, M. Comparative analysis of optogenetic actuators in cultured astrocytes / M. Figueiredo, S. Lane, R.F. Stout, B. Liu, V. Parpura, A.G. Teschemacher, S. Kasparov // *Cell Calcium.* – 2014. № 56(3). – P. 208–214.
422. Endo, S. Dual involvement of G-substrate in motor learning revealed by gene deletion / S. Endo, F. Shutoh, T. le Dinh, T. Okamoto, T. Ikeda, M. Suzuki, S. Kawahara, D. Yanagihara, Y. Sato, K. Yamada, T. Sakamoto, Y. Kirino, N.A. Hartell, K. Yamaguchi, S. Ito, A.C. Nairn, P. Greengard, S. Nagao, M. Ito // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2009. № 106(9). – P. 3525–3530.
423. Shoji, H. Contextual and Cued Fear Conditioning Test Using a Video Analyzing System in Mice / H. Shoji, K. Takao, S. Hattori, T. Miyakawa // *Journal of Visualized Experiments.* – 2014. № 85. – P. 50871.
424. Walf, A.A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents / A.A. Walf, C.A. Frye // *Nat Protoc.* – 2007. № 2(2). – P. 322–328.
425. Asher, M. Mood alterations in mouse models of Spinocerebellar Ataxia type 1 / M. Asher, J.G. Rosa, M. Cvetanovic // *Sci Rep.* – 2021. № 11(1). – P. 713.
426. Krishnan, V. Animal Models of Depression: Molecular Perspectives / V. Krishnan, E.J. Nestler // *Curr Top Behav Neurosci.* – 2011. №7. – P. 121–147.
427. Cryan, J.F. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice / J.F. Cryan, C. Mombereau, A. Vassout // *Neurosci Biobehav Rev.* – 2005. № 29(4–5). – P. 571–625.

428. Шуваев А.Н., Современные тенденции в развитии метода локальной фиксации потенциала: новые возможности для нейрофармакологии и нейробиологии / А.Н. Шуваев, В.В. Салмин, Н.В. Кувачева, Е.А. Пожиленкова, А.Б. Салмина // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. – 2015. №4. – С.54-57.
429. Ishikawa, D. Fluorescent pipettes for optically targeted patch-clamp recordings / D. Ishikawa, N. Takahashi, T. Sasaki, A. Usami, N. Matsuki, Y. Ikegaya // *Neural Networks*. – 2010. № 23(6). – P. 669–672.
430. Major, G. Solutions for transients in arbitrarily branching cables / G. Major, J.D. Evans, J.J.B. Jack // *Biophys J*. – 1993. № 65(1). – P. 450–468.
431. Sterratt, D. Principles of Computational Modelling in Neuroscience / D. Sterratt, B. Graham, D. Gillies, D. Willshaw // Cambridge University Press. – 2011. – P. 1–404.
432. Konno, A. Mutant Ataxin-3 with an Abnormally Expanded Polyglutamine Chain Disrupts Dendritic Development and Metabotropic Glutamate Receptor Signaling in Mouse Cerebellar Purkinje Cells / A. Konno, A. N. Shuvaev, N. Miyake, K. Miyake, A. Iizuka, S. Matsuura, F. Huda, K. Nakamura, S. Yanagi, T. Shimada, H. Hirai // *Cerebellum*. – 2014. № 13(1). – P. 29–41.
433. Baude, A. The metabotropic glutamate receptor (mGluR1 α) is concentrated at perisynaptic membrane of neuronal subpopulations as detected by immunogold reaction / A. Baude, Z Nusser, J.D. Roberts, E. Mulvihill, R.A. McIlhinney, P. Somogyi // *Neuron*. - 1993. № 11(4). – P. 771–787.
434. Kano, M. Persistent multiple climbing fiber innervation of cerebellar Purkinje cells in mice lacking mGluR1 / M. Kano, K. Hashimoto, H. Kurihara, M. Watanabe, Y. Inoue, A. Aiba, S. Tonegawa // *Neuron*. – 1997. № 18(1). – P. 71–79.
435. Adachi, N. Enzymological analysis of mutant protein kinase C γ causing spinocerebellar ataxia type 14 and dysfunction in Ca²⁺ homeostasis / N. Adachi, T. Kobayashi, H. Takahashi, T. Kawasaki, Y. Shirai, T. Ueyama, T. Matsuda, T. Seki, N. Sakai, N. Saito // *J. Biol. Chem*. – 2008. № 283. – P. 19854–19863.
436. Takahashi, H. Identification and characterization of PKC γ , a kinase associated with SCA14, as an amyloidogenic protein / H. Takahashi, N. Adachi, T. Shirafuji, S. Danno, T. Ueyama, M. Vendruscolo, A.N. Shuvaev, T. Sugimoto, T. Seki, D. Hamada, K. Irie, H. Hirai, N. Sakai, N. Saito // *Hum Mol Genet*. – 2015. №24(2). – P. 525-539.
437. Takahashi, N. Regulatory connection between the expression level of classical protein kinase C and pruning of climbing fibers from cerebellar Purkinje cells / N. Takahashi,

- A.N. Shuvaev, A. Konno, Y. Matsuzaki, M. Watanave, H. Hirai // *Journal of neurochemistry*. – 2017. №143(6). – P. 660–670.
438. Hartmann, J. TRPC3 Channels Are Required for Synaptic Transmission and Motor Coordination / J. Hartmann, E. Dragicevic, H. Adelsberger, H.A. Henning, M. Sumser, J. Abramowitz, R. Blum, A. Dietrich, M. Freichel, V. Flockerzi, L. Birnbaumer, A. Konnerth // *Neuron*. – 2008. № 59(3). – P. 392–398.
439. Kano, M. Type-1 metabotropic glutamate receptor in cerebellar Purkinje cells: a key molecule responsible for long-term depression, endocannabinoid signalling and synapse elimination / M. Kano, K. Hashimoto, T. Tabata // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. – 2008. № 363(1500). – P. 2173–2186.
440. Gao, Z. Distributed synergistic plasticity and cerebellar learning / Z. Gao, B.J. van Beugen, C.I. de Zeeuw // *Nat Rev Neurosci*. – 2012. № 13(9). – P. 619–635.
441. Hartmann, J. mGluR1/TRPC3-mediated Synaptic Transmission and Calcium Signaling in Mammalian Central Neurons / J. Hartmann, H.A. Henning, A. Konnerth // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. – 2011. № 3(4). – P. a006726–a006726.
442. Finch, E.A. Calcium as a Trigger for Cerebellar Long-Term Synaptic Depression / E.A. Finch, K. Tanaka, G.J. Augustine // *The Cerebellum*. – 2012. № 11(3). – P. 706–717.
443. Finch, E.A. Local calcium signalling by inositol-1,4,5-trisphosphate in Purkinje cell dendrites / E.A. Finch, G.J. Augustine *Nature*. – 1998. № 396(6713). – P. 753–756.
444. Takechi, H. A new class of synaptic response involving calcium release in dendritic spines / H. Takechi, J. Eilers, A. Konnerth // *Nature*. – 1998. № 396(6713). – P. 757–760.
445. Orr, H.T. SCA1—Phosphorylation, a regulator of Ataxin-1 function and pathogenesis / H.T. Orr // *Prog Neurobiol*. – 2012. № 99(3). – P. 179–185.
446. Shen, W. An autocrine purinergic signaling controls astrocyte-induced neuronal excitation / W. Shen, L. Nikolic, C. Meunier, F. Pfrieger, E. Audinat // *Sci Rep*. – 2017. № 7(1). – P. 11280.
447. Perea, G. Optogenetic astrocyte activation modulates response selectivity of visual cortex neurons in vivo / G. Perea, A. Yang, E.S. Boyden, M. Sur // *Nat Commun*. – 2014. № 5(1). – P. 3262.
448. Hardingham, G.E. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders / G.E. Hardingham, H. Bading // *Nat Rev Neurosci*. – 2010. № 11(10). – P. 682–696.
449. Sholl, D.A. Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat / D.A. Sholl // *J Anat*. – 1953. № 87(4). – P. 387–406.

450. Shuvaev, A.N. Indirect Negative Effect of Mutant Ataxin-1 on Short- and Long-Term Synaptic Plasticity in Mouse Models of Spinocerebellar Ataxia Type 1. / A.N. Shuvaev, O.S. Belozor, I.O. Mozhei, A.N. Shuvaev, Y.V. Fritsler, E.D. Khilazheva, A.I. Mosyagina, H. Hirai, A.G. Teschemacher, S. Kasparov // *Cells*. – 2022. №11. – P. 1-14.
451. Takahashi, M. Pre- and postsynaptic determinants of EPSC waveform at cerebellar climbing fiber and parallel fiber to Purkinje cell synapses / M. Takahashi, Y. Kovalchuk, D. Attwell // *The Journal of Neuroscience*. – 1995. № 15(8). – P. 5693–5702.
452. Illarionava, N.B. Role of Na,K-ATPase $\alpha 1$ and $\alpha 2$ Isoforms in the Support of Astrocyte Glutamate Uptake / N.B. Illarionava, H. Brismar, A. Aperia, E. Gunnarson // *PLoS One*. – 2014. № 9(6). – P. e98469.
453. Díaz-Rojas, F. Ca^{2+} current facilitation determines short-term facilitation at inhibitory synapses between cerebellar Purkinje cells / F. Díaz-Rojas, T. Sakaba, S. Kawaguchi // *J Physiol*. – 2015. № 593(22). – P. 4889–4904.
454. Zucker, R.S. Short-Term Synaptic Plasticity / R.S. Zucker, W.G. Regehr // *Annu Rev Physiol*. – 2002. № 64(1). – P. 355–405.
455. Шуваев, А.Н. Влияние реактивной глии Бергмана на кратковременную синаптическую пластичность в моделях мозжечковой нейродегенерации, вызванной хронической активацией ChR2 и экспрессией мутантного атаксина1 / А.Н. Шуваев, О.С. Белозор, О.И. Можей, Д.А. Яковлева, А.Н. Шуваев, М.В. Смольникова, Е.А. Пожиленкова, С. Каспаров, В.В. Салмин, А.Б. Салмина // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. – 2021. № 15(1). – С. 51–58.
456. Tani, H. A Local Glutamate-Glutamine Cycle Sustains Synaptic Excitatory Transmitter Release / H. Tani, C.G. Dulla, Z. Farzampour, A. Taylor-Weiner, J.R. Huguenard, R.J. Reimer *Neuron*. – 2014. № 81(4). – P. 888–900.
457. Navarrete, M. Astrocytes in endocannabinoid signalling / M. Navarrete, A. Díez, A. Araque // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. – 2014. № 369(1654). – P. 20130599.
458. Gutiérrez-Rodríguez, A. Localization of the cannabinoid type-1 receptor in subcellular astrocyte compartments of mutant mouse hippocampus / A. Gutiérrez-Rodríguez, I. Bonilla-Del Río, N. Puente, S.M. Gómez-Urquijo, C.J. Fontaine, J. Egaña-Huguet, I. Elezgarai, S. Ruehle, B. Lutz, L.M. Robin, E. Soria-Gómez, L. Bellocchio, J.D. Padwal, M. van der Stelt, J. Mendizabal-Zubiaga, L. Reguero, A. Ramos, I. Gerrikagoitia, G. Marsicano, P.G. *Glia*. – 2018. № 66(7). – P. 1417–1431.

459. Robin, L.M. Astroglial CB1 Receptors Determine Synaptic D-Serine Availability to Enable Recognition Memory / L.M. Robin, J.F. Oliveira da Cruz, V.C. Langlais, M. Martin-Fernandez, M. Metna-Laurent, A. Busquets-Garcia, L. Bellocchio, E. Soria-Gomez, T. Papouin, M. Varilh, M.W. Sherwood, I. Belluomo, G. Balcells, I. Matias, B. Bosier, F. Drago, A.V. Eeckhaut, I. Smolders, F. Georges, A. Araque, A. Panatier, S.H.R. Oliet, G. Marsicano // *Neuron*. – 2018. № 98(5). – P. 935-944.e5.
460. Kano, M. Endocannabinoid-Mediated Control of Synaptic Transmission / M. Kano, T. Ohno-Shosaku, Y. Hashimotodani, M. Uchigashima, M. Watanabe // *Physiol Rev*. – 2009. № 89(1). – P. 309–380.
461. Han, J. Acute Cannabinoids Impair Working Memory through Astroglial CB1 Receptor Modulation of Hippocampal LTD / J. Han, P. Kesner, M. Metna-Laurent, T. Duan, L. Xu, F. Georges, M. Koehl, D.N. Abrous, J. Mendizabal-Zubiaga, P. Grandes, Q. Liu, G. Bai, W. Wang, L. Xiong, W. Ren, G. Marsicano, X. Zhang // *Cell*. – 2012. № 148(5). – P. 1039–1050.
462. Swanson, R.A. Fluorocitrate and fluoroacetate effects on astrocyte metabolism in vitro / R.A. Swanson, S.H. Graham // *Brain Res*. – 1994. № 664(1–2). – P. 94–100.
463. Navarrete, M. Endocannabinoids Potentiate Synaptic Transmission through Stimulation of Astrocytes / M. Navarrete, A. Araque // *Neuron*. – 2010. № 68(1). – P. 113–126.
464. Halassa, M.M. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease / M.M. Halassa, T. Fellin, P.G. Haydon // *Trends Mol Med*. – 2007. № 13(2). – P. 54–63.
465. Rasooli-Nejad, S. Cannabinoid receptors contribute to astroglial Ca²⁺-signalling and control of synaptic plasticity in the neocortex / S. Rasooli-Nejad, O. Palygin, U. Lalo, Y. Pankratov // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. – 2014. № 369(1654). – P. 20140077.
466. Araque, A. SNARE Protein-Dependent Glutamate Release from Astrocytes / A. Araque, N. Li, R.T. Doyle, P.G. Haydon // *The Journal of Neuroscience*. – 2000. № 20(2). – P. 666–673.
467. Фрицлер, Я.В. Модификация моделей динамики кальция в астроцитах рианодиновым путём высвобождения / Я.В. Фрицлер, С.И. Барцев, О.С. Белозор, А.Н. Шуваев, А.Н. Шуваев // *Математическая биология и биоинформатика*. – 2021. №16(1). – С. 86–100.
468. Cisneros, I.E. Methamphetamine and HIV-1-induced neurotoxicity: Role of trace amine associated receptor 1 cAMP signaling in astrocytes / I.E. Cisneros, A. Ghorpade // *Neuropharmacology*. – 2014. № 85. – P. 499–507.

469. Lee, M. Decreased EAAT2 protein expression in the essential tremor cerebellar cortex / M. Lee, M.M. Cheng, C.Y. Lin, E.D. Louis, P.L. Faust, S.H. Kuo // *Acta Neuropathol Commun.* – 2014. № 2(1). – P. 157.
470. Shuvaev, A.N. Current advances in cell electrophysiology: applications for the analysis of intercellular communications within the neurovascular unit / A.N. Shuvaev, V.V. Salmin, N.V. Kuvacheva, E.A. Pozhilenkova, A.V. Morgun, O.L. Lopatina, A.B. Salmina, S.N. Illarioshkin // *Reviews in the Neurosciences.* – 2016. № 27(4). – P. 365-376.
471. Vassileva, G. Absence of neuroanatomical and behavioral deficits in L7/pcp-2-null mice / G. Vassileva, R.J. Smeyne, J.I. Morgan // *Molecular Brain Research.* – 1997. № 46(1–2). – P. 333–337.
472. Barski, J.J. Calbindin in Cerebellar Purkinje Cells Is a Critical Determinant of the Precision of Motor Coordination / J.J. Barski, J. Hartmann, C.R. Rose, F. Hoebeek, K. Mörl, M. Noll-Hussong, C.I. De Zeeuw, A. Konnerth, M. Meyer // *The Journal of Neuroscience.* – 2003. № 23(8). – P. 3469–3477.
473. Shuvaev, A.N. Experience of mGluR1 gene therapy in transgenic models of SCA1 mice. / A.N. Shuvaev, H. Hirai // *Современные технологии в медицине = Sovremennye Tehnologii v Medicine=Modern Technologies in Medicine.* – 2016. №8(4). – P. 141-154.
474. Hashimoto-dani, Y. Ca²⁺-assisted receptor-driven endocannabinoid release: mechanisms that associate presynaptic and postsynaptic activities / Y. Hashimoto-dani, T. Ohno-Shosaku, M. Kano // *Curr Opin Neurobiol.* – 2007. № 17(3). – P. 360–365.
475. Cvetanovic, M. Vascular endothelial growth factor ameliorates the ataxic phenotype in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 1 / M. Cvetanovic, J.M. Patel, H.H. Marti, A.R. Kini, P. Opal // *Nat Med.* – 2011. № 17(11). – P. 1445–1447.
476. Shakkottai, V.G. Early Changes in Cerebellar Physiology Accompany Motor Dysfunction in the Polyglutamine Disease Spinocerebellar Ataxia Type 3 / V.G. Shakkottai, M. do C. Costa, J.M. Dell’Orco, A. Sankaranarayanan, H. Wulff, H.L. Paulson // *Journal of Neuroscience.* – 2011. № 31(36). – P. 13002–13014.
477. Белозор, О.С. Мутантный атаксин-1 с патологически удлинённой полиглутаминовой цепочкой нарушает морфологию и эндоканнабиноид-опосредованную синаптическую пластичность в клетках пуркинье СЦА1 модельных мышей / О.С. Белозор, А.Н. Шуваев, Я.В. Фрицлер, А.Н. Шуваев // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* – 2022. №66(4). – С.13-19

478. Lagasse, E. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo / E. Lagasse, H. Connors, M. Al-Dhalimy, M. Reitsma, M. Dohse, L. Osborne, X. Wang, M. Finegold, I.L. Weissman, M. Grompe // *Nat Med.* – 2000. № 6(11). – P. 1229–1234.
479. Lee, O.K. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood / O.K. Lee, T.K. Kuo, W.M. Chen, K.D. Lee, S.L. Hsieh, T.H. Chen // *Blood.* – 2004. № 103(5). – P. 1669–1675.
480. Baddoo, M. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection / M. Baddoo, K. Hill, R. Wilkinson, D. Gaupp, C. Hughes, G.C. Kopen, D.G. Phinney // *J Cell Biochem.* – 2003. № 89(6). – P. 1235–1249.
481. Matsuura, S. Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Cerebellar Pathology in a Mouse Model of Spinocerebellar Ataxia Type 1. / S. Matsuura, A. N. Shuvaev, A. Iizuka, K. Nakamura, H. Hirai, / *Cerebellum.* – 2014. №13(3). – 323–330.
482. Marcaggi, P. Endocannabinoid signaling depends on the spatial pattern of synapse activation / P. Marcaggi, D. Attwell // *Nat Neurosci.* – 2005. № 8(6). – P. 776–781.
483. Marcaggi, P. Short- and long-term depression of rat cerebellar parallel fibre synaptic transmission mediated by synaptic crosstalk / P. Marcaggi, D. Attwell // *J Physiol.* – 2007. № 578(2). – P. 545–550.
484. Tabata, T. Gabab receptor-mediated modulation of glutamate signaling in cerebellar Purkinje cells / T. Tabata, M. Kano // *The Cerebellum.* – 2006. № 5(2). – P. 127.
485. Kamikubo, Y. Postsynaptic GABA “B” receptor signalling enhances LTD in mouse cerebellar Purkinje cells / Y. Kamikubo, T. Tabata, S. Kakizawa, D. Kawakami, M. Watanabe, A. Ogura, M. Iino, M. Kano // *J Physiol.* – 2007. № 585(2). – P. 549–563.
486. Froestl, W. Chemistry and Pharmacology of GABAB Receptor Ligands / W. Froestl // *Adv Pharmacol.* – 2010. № 58. – P. 19–62.
487. Ferraguti, F. Metabotropic Glutamate 1 Receptor: Current Concepts and Perspectives / F. Ferraguti, L. Crepaldi, F. Nicoletti // *Pharmacol Rev.* – 2008. № 60(4). – P. 536–581.
488. Shirai, Y. Activation of Cerebellar B-type γ -aminobutyric Acid Receptor Modulates Optokinetic Reflex Adaptation / Y. Shirai, T. Sasajima, S. Uchiyama, Y. Takegoshi, E. Tsushima, T. Tabata // *Yakugaku Zasshi.* – 2014. № 134(3). – P. 439–445.
489. Robinson, D.M. Memantine / D.M. Robinson, G.M. Keating // *Drugs.* – 2006. № 66(11). – P. 1515–1534.
490. Untiet, V. Glutamate transporter-associated anion channels adjust intracellular chloride concentrations during glial maturation / V. Untiet, P. Kovermann, N.J. Gerkau, T. Gensch, C.R. Rose, C. Fahlke // *Glia.* – 2017. № 65(2). – P. 388–400.

491. Белозор, О.С. Антагонисты NMDA-рецепторов как потенциальные средства для лечения нейродегенеративных заболеваний мозжечка / О.С. Белозор, А.Н. Шуваев, Я.В. Фрицлер, А.Н. Шуваев // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии = Annals of Clinical and Experimental Neurology*. – 2022. №16(2). – P.58-69.
492. Iizuka, A. Long-term oral administration of the NMDA receptor antagonist memantine extends life span in spinocerebellar ataxia type 1 knock-in mice / A. Iizuka, K. Nakamura, H. Hirai // *Neurosci Lett*. – 2015. № 592. – P. 37–41.
493. Sibarov, D.A. Developmental Changes of Synaptic and Extrasynaptic NMDA Receptor Expression in Rat Cerebellar Neurons In Vitro. / D.A. Sibarov, Y.D. Stepanenko, I.V. Silantiev, P.A. Abushik, T.V. Karelina, S.M. Antonov // *Journal of Molecular Neuroscience*. – 2018. № 64(2). – P. 300–311.
494. Piochon, C. Purkinje Cell NMDA Receptors Assume a Key Role in Synaptic Gain Control in the Mature Cerebellum / C. Piochon, C. Levenes, G. Ohtsuki, C. Hansel // *Journal of Neuroscience*. – 2010. № 30(45). – P. 15330–15335.
495. Llano, I. Synaptic- and agonist-induced excitatory currents of Purkinje cells in rat cerebellar slices / I. Llano, A. Marty, C.M. Armstrong, A. Konnerth // *J Physiol*. – 1991. № 434(1). – P. 183–213.
496. Shu, S. Promising targets of cell death signaling of NR2B receptor subunit in stroke pathogenesis / S. Shu, L. Pei, Y. Lu // *Regen Med Res*. – 2014. № 2(1). – P. 8.
497. Buldyrev, I. Synaptic pathways that shape the excitatory drive in an OFF retinal ganglion cell / I. Buldyrev, T. Puthussery, W.R. Taylor // *J Neurophysiol*. – 2012. № 107(7). – P. 1795–1807.
498. Zimmer, E.R. Long-term NMDAR antagonism correlates reduced astrocytic glutamate uptake with anxiety-like phenotype / E.R. Zimmer, V.R. Torrez, E. Kalinine, M.C. Augustin, K.C. Zenki, R.F. Almeida, G. Hansel, A.P. Muller, D.O. Souza, R. Machado-Vieira, L.V. Portela // *Front Cell Neurosci*. – 2015. № 9. – P. 219.
499. Kos, T. A comparison of the predictive therapeutic and undesired side-effects of the NMDA receptor antagonist, memantine, in mice / T. Kos, P. Popik // *Behavioural Pharmacology*. – 2005. № 16(3). – P. 155–61.
500. Shuvaev, A.N. Memantine Disrupts Motor Coordination through Anxiety-like Behavior in CD1 Mice / A.N. Shuvaev, O.S. Belozor, O.I. Mozhei, A.G. Mileiko, L.D. Mosina, I.V. Laletina, I.G. Mikhailov, Y.V. Fritslet, A.N. Shuvaev, A.G. Teschemacher, S. Kasparov // *Brain Sciences*. – 2022. №4. – P. 1-11

501. Hanson, J.E. Chronic GluN2B Antagonism Disrupts Behavior in Wild-Type Mice Without Protecting Against Synapse Loss or Memory Impairment in Alzheimer's Disease Mouse Models / J.E. Hanson, W.J. Meilandt, A. Gogineni, P. Reynen, J. Herrington, R.M. Weimer, K. Searce-Levie, Q. Zhou // *Journal of Neuroscience*. - 2014. № 34(24). – P. 8277–8288.
502. McHugh, S.B. Amygdala and Ventral Hippocampus Contribute Differentially to Mechanisms of Fear and Anxiety / S.B. McHugh, R.M.J. Deacon, J.N.P. Rawlins, D.M. Bannerman // *Behavioral Neuroscience*. - 2004. № 118(1). – P. 63–78.
503. Wang, C. Ventral Hippocampus Modulates Anxiety-Like Behavior in Male But Not Female C57BL/6 J Mice / C. Wang, Y. Zhang, S. Shao, S. Cui, Y. Wan, M. Yi // *Neuroscience*. - 2019. № 418. – P. 50–58.
504. Duan, K. Mitophagy in the basolateral amygdala mediates increased anxiety induced by aversive social experience / K. Duan, Q. Gu, R.S. Petralia, Y.X. Wang, D. Panja, X. Liu, M.L. Lehmann, H. Zhu, J. Zhu, Z. Li // *Neuron*. - 2021. № 109(23). – P. 3793-3809.
505. Lee, S.H. Pharmacokinetics of Memantine after a Single and Multiple Dose of Oral and Patch Administration in Rats / S.H. Lee, S.H. Kim, Y.H. Noh, B.M. Choi, G.J. Noh, W.D. Park, E. Kim, I. Cho, C. Bae // *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. - 2016. № 118(2). – P. 122–127.
506. Saab, B.J. Acute Pharmacokinetics of Memantine in the Mouse / B.J. Saab, J.C. Roder // *Pharmacology*. - 2011. № 88(5–6). – P. 284–287.
507. Spanagel, R. Memantine-induced dopamine release in the prefrontal cortex and striatum of the rat — a pharmacokinetic microdialysis study / R. Spanagel, B. Eilbacher, R. Wilke // *Eur J Pharmacol*. - 1994. № 262(1–2). – P. 21–26.
508. Kotermanski, S.E. Memantine binding to a superficial site on NMDA receptors contributes to partial trapping / S.E. Kotermanski, J.T. Wood, J.W. Johnson // *J Physiol*. - 2009. № 587(19). – P. 4589–4604.
509. Shuvaev, A.N. Protective Effect of Memantine on Bergmann Glia and Purkinje Cells Morphology in Optogenetic Model of Neurodegeneration in Mice / A.N. Shuvaev, O.S. Belozor, O.I. Mozhei, E.D. Khilazheva, A.N. Shuvaev, Y.V. Fritsler, S. Kasparov // *Int. J. Mol. Sci*. – 2021. №22. – P. 7822.
510. Liddelov, S.A. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia / S.A. Liddelov, K.A. Guttenplan, L.E. Clarke, F.C. Bennett, C.J. Bohlen, L. Schirmer, M.L. Bennett, A.E. Münch, W.S. Chung, T.C. Peterson, D.K. Wilton, A. Frouin, B.A. Napier,

- N. Panicker, M. Kumar, M.S. Buckwalter, D.H. Rowitch, V.L. Dawson, T.M. Dawson, B. Stevens, B.A. Barres / *Nature*. - 2017. № 541(7638). – P. 481–487.
511. Cirillo, C. S100B Inhibitor Pentamidine Attenuates Reactive Gliosis and Reduces Neuronal Loss in a Mouse Model of Alzheimer's Disease / C. Cirillo, E. Capoccia, T. Iuvone, R. Cuomo, G. Sarnelli, L. Steardo, G. Esposito // *Biomed Res Int*. - 2015. № 2015. – P. 1–11.
512. Mapelli, L. Toxic effects of expanded ataxin-1 involve mechanical instability of the nuclear membrane / L. Mapelli, C. Canale, D. Pesci, S. Averaimo, F. Guizzardi, V. Fortunati, L. Falasca, M. Piacentini, A. Gliozzi, A. Relini, M. Mazzanti, C. Jodice // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. - 2012. № 1822(6). – P. 906–917.
513. Gong, B. The Ubiquitin-Proteasome System: Potential Therapeutic Targets for Alzheimer's Disease and Spinal Cord Injury / B. Gong, M. Radulovic, M.E. Figueiredo-Pereira, C. Cardozo // *Front Mol Neurosci*. – 2016. № 9. - P. 4.
514. Gessler, D.J. Intravenous Infusion of AAV for Widespread Gene Delivery to the Nervous System / D.J. Gessler, P.W.L. Tai, J. Li, G. Gao // *Methods Mol Biol*. - 2019. № 1950. – P. 143–163.
515. Prezeau, L. Functional crosstalk between GPCRs: with or without oligomerization / L. Prezeau, M.L. Rives, L. Comps-Agrar, D. Maurel, J. Kniazeff, J.P. Pin // *Curr Opin Pharmacol*. - 2010. № 10(1). – P. 6–13.
516. Xu, C. Complex GABA_B receptor complexes: how to generate multiple functionally distinct units from a single receptor / C. Xu, W. Zhang, P. Rondard, J.P. Pin, J. Liu // *Front Pharmacol*. - 2014. № 5. – P. 12.
517. Faigle, J.W. The chemistry and kinetics of Lioresal / J.W. Faigle, H. Keberle // *Postgrad Med J*. - 1972. № 48(5). – P. 9-13.
518. Smith-Hicks, C. SRF binding to SRE 6.9 in the Arc promoter is essential for LTD in cultured Purkinje cells / C. Smith-Hicks, B. Xiao, R. Deng, Y. Ji, X. Zhao, J.D. Shepherd, G. Posern, D. Kuhl, R.L. Huganir, D.D. Ginty, P.F. Worley, D.J. Linden // *Nat Neurosci*. - 2010. № 13(9). – P. 1082–1089.
519. Schorge, S. Human ataxias: a genetic dissection of inositol triphosphate receptor (ITPR1)-dependent signaling / S. Schorge, J. van de Leemput, A. Singleton, H. Houlden, J. Hardy // *Trends Neurosci*. - 2010. № 33(5). – P. 211–219.

520. Bezprozvanny, I. Role of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors in Pathogenesis of Huntington's Disease and Spinocerebellar Ataxias / I. Bezprozvanny // *Neurochem Res.* - 2011. № 36(7). – P. 1186–1197.
521. Becker, E.B.E. The Moonwalker Mouse: New Insights into TRPC3 Function, Cerebellar Development, and Ataxia / E.B.E. Becker // *The Cerebellum.* - 2014. № 13(5). – P. 628–636.
522. Wang, R. Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* / R. Wang, P.H. Reddy. - 2017. № 57(4). – P. 1041–1048.
523. Dong, X. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases / X. Dong, Y. Wang, Z. Qin // *Acta Pharmacol Sin.* - 2009. № 30(4). – P. 379–387.
524. Verkhratsky, A. NMDA Receptors in Glia / A. Verkhratsky, F. Kirchhoff // *The Neuroscientist.* - 2007. № 13(1). – P. 28–37.
525. López, T. NMDA receptors in cultured radial glia / T. López, A.M. López-Colomé, A. Ortega // *FEBS Lett.* – 1997. № 405(2). - P. 245–248.
526. Palygin, O. Distinct pharmacological and functional properties of NMDA receptors in mouse cortical astrocytes / O. Palygin, U. Lalo, Y. Pankratov // *Br J Pharmacol.* - 2011. № 163(8). – P. 1755–1766.
527. da Re, F. Retrospective Study on Agitation Provoked by Memantine in Dementia/ F. da Re, F. Rucci, V. Isella // *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* - 2015. № 27(1). – P. e10–3.