

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого
Институт биомедицинских систем и биотехнологий

Работа допущена к защите

Директор ВШБСиТ ИБСиБ

_____ О.Л. Власова

«__» _____ 2020 г.

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ
НАРУШЕНИЯ СИНАПТИЧЕСКОЙ АКТИВАЦИИ КЛЕТОК ПУРКИНЬЕ
МОЗЖЕЧКА СИСТЕМОЙ АФФЕРЕНТНЫХ ВОЛОКОН В
ПАТОГЕНЕЗЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПОЛИГЛУТАМИНОВОГО ТРАКТА
по направлению подготовки 16.04.01 «Техническая физика»
Профиль 16.04.01_13 «Медицинская физика»

Выполнил
студент гр. 4741601/81301



А.В. Гаврилова

Научные руководители
к.ф.-м.н., н.с. ЛМН СПбПУ

П.А. Егорова

к.ф.-м.н., доцент ВШБСиТ ИБСиБ

Я.А. Забродская

Консультант по нормоконтролю
к.ф.-м.н., доцент ВШБСиТ ИБСиБ

В.П. Октябрьский

Санкт-Петербург
2020

РЕФЕРАТ

На 110 с., 19 рисунков, 2 таблицы

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: мозжечок, клетки Пуркинье, спиноцеребеллярные атаксии, болезнь Хантингтона, трансгенные животные, калиевые каналы, хлорзоксазон

Тема выпускной квалификационной работы: «Нарушения синаптической активации клеток Пуркинье мозжечка системой афферентных волокон в патогенезе заболеваний полиглутаминового тракта».

Болезнь Хантингтона (БХ) и некоторые виды аутосомно-доминантных спиноцеребеллярных атаксий (СЦА) являются самыми известными среди нейродегенеративных полиглутаминовых заболеваний. Как при БХ, так и при СЦА2 наблюдается поражение клеток Пуркинье (КП) коры мозжечка и нарушения моторных функций. Известно, что кальций-активируемые калиевые каналы малой проводимости (SK каналы) осуществляют контроль пейсмекерной активности КП. Используя метод внеклеточной регистрации, мы проанализировали электрофизиологические функции КП анестезированных мышей-моделей БХ линии YAC128 и бодрствующих мышей-моделей СЦА2 линии SCA2-58Q. В результате систематического введения положительного модулятора SK каналов хлорзоксазона наблюдалось восстановление электрофизиологических функций КП и улучшение синаптической активации КП параллельными волокнами в случае мышей БХ и восстановление нормальной регулярности генерации импульсных сигналов КП в случае мышей СЦА2 и БХ. Мы предполагаем, что SK каналы могут быть рассмотрены в качестве возможной мишени для лечения БХ и СЦА2.

THE ABSTRACT

110 p., 19 pictures, 2 tables

KEYWORDS: cerebellum, Purkinje cells, spinocerebellar ataxias, Huntington's disease, transgenic animals, potassium channels, chlorzoxazone

The subject of the graduation qualification work is "Disruptions of cerebellar Purkinje cells synaptic activation by a system of afferent fibers in the pathogenesis of polyglutamine disorders".

Huntington's disease (HD) and several types of spinocerebellar ataxias (SCA) are the most common diseases among the neurodegenerative polyglutamine disorders. Dysfunction of cerebellar Purkinje cells (PCs) and impairment of motor functions are observed both in HD and SCA2. It is known that small conductance calcium-activated potassium channels (SK channels) are responsible for the cerebellar PC pacemaker activity. Using an extracellular single-unit recording method we evaluated electrophysiological functions of PCs of anesthetized transgenic mice-models of HD line YAC128 and awake transgenic mice-models of SCA2 line SCA2-58Q of different ages. As a result of systematic administration of positive modulator of SK channels chlorzoxazone, the restoration of electrophysiological functions of PCs and improvement of PCs synaptic activation by parallel fibers in the case of HD mice and restoration of normal firing pattern of PCs in the case of SCA2 and HD mice were observed. We propose that SK channels can be a possible target to treat HD and SCA2.

Содержание

Список сокращений	6
Введение.....	8
Глава 1. Обзор литературы.....	12
1.1. Нейродегенеративные заболевания	12
1.2. Нейродегенеративные заболевания полиглутаминового тракта	14
1.2.1. Болезнь Хантингтона	22
1.2.1.1. Патофизиологические особенности болезни Хантингтона.....	24
1.2.1.2. Мутации в гене HTT	25
1.2.2. Аутосомно-доминантныеocerebellарные атаксии.....	27
1.2.2.1. Патофизиологические особенности на примере СЦА2	29
1.2.2.2. Мутации в гене ATXN2.....	31
1.3. Структурная организация мозжечка.....	32
1.3.1. Кора мозжечка	32
1.3.2. Проводящие пути мозжечка.....	34
1.3.3. Дисфункция КП при атаксиях и БХ	35
1.3.4. Дисфункция проводящих путей в патогенезе СЦА.....	39
1.4. Кальций-активируемые калиевые каналы	42
1.4.1. SK каналы.....	44
1.4.2. Роль SK и BK каналов в НДЗ.....	47
Глава 2. Материалы и методы.....	52
2.1. Бридинг мышей и генотипирование	52
2.2. Внеклеточная регистрация от одиночного отведения КП <i>in vivo</i>	54

2.2.1. На анестезированных мышах	54
2.2.2. На бодрствующих мышах	54
2.3. Инъекции CHZ	57
2.4. Статистический анализ.....	57
Глава 3. Результаты.....	59
3.1. Анализ спонтанной активности КП мышей линии YAC128 различных возрастов	59
3.2. CHZ нормализует активность КП мозжечка стареющих BX мышей.....	64
3.3. Анализ спонтанной активности КП мышей линии SCA2-58Q различных возрастов	69
3.4. Влияние CHZ на свойства КП мышей линии SCA2-58Q.....	74
Заключение	80
Список литературы	86

Список сокращений

- АДЦА – аутосомно-доминантныеocerebellарные атаксии
- БА – болезнь Альцгеймера
- БАС – боковой амиотрофический склероз
- БП – болезнь Паркинсона
- БХ – болезнь Хантингтона
- в/б инъекции – внутривнутрибрюшинные инъекции
- ГАМК – гамма-аминомасляная кислота
- ДЕ нейроны – дофаминергические нейроны
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ДРПЛА – дентаторубрал-паллидолуизийская атрофия
- ДТ – дикий тип
- КВ МИИ – коэффициент вариации межимпульсного интервала
- КП – клетка Пуркинье
- ЛВ – лазающее волокно
- МВ – мшистое волокно
- НАД – никотинаминдинуклеотид
- НДЗ – нейродегенеративные заболевания
- НО – нижняя олива
- ПВ – параллельное волокно
- ПС – простой спайк
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- СБМА – спинобульбарная мышечная атрофия
- СС – сложный спайк
- СЦА – спиноцереbellарная атаксия
- УПС – убиквитин-протеасомная система
- ЦНС – центральная нервная система
- ЭА – эпизодическая атаксия

AHP – afterhyperpolarization, следовая гиперполяризация

ANOVA – analysis of variance, дисперсионный анализ

БК каналы – big conductance calcium-activated potassium channels, кальций-активируемые калиевые каналы большой проводимости

CaM – calmodulin, кальмодулин

CDK5 – cyclin-dependent kinase 5, циклин-зависимая киназа 5

CHZ – chlorzoxazone, хлорзоксазон

CK2 – casein kinase 2, казеин киназа 2

EDTA – ethylenediaminetetraacetic acid, этилендиаминтетрауксусная кислота

GABA – gamma-aminobutyric acid, гамма-аминомасляная кислота

Glu, Q – глутамин

Htt – хантингтин

ИК каналы – intermediate conductance calcium-activated potassium channels, кальций-активируемые калиевые каналы промежуточной проводимости

LTD – long-term depression, долговременная депрессия

mHtt – мутантный хантингтин

NMDAR – *N*-methyl-*D*-aspartate receptor, рецептор *N*-метил-*D*-аспаратной кислоты

PABP – poly(A)-binding protein, поли(А)-связывающий белок

PAM2 – PABP-interacting motif 2, мотив 2, взаимодействующий с PABP

PKC γ – protein kinase C gamma type, протеинкиназа C гамма типа

PP2A – protein phosphatase 2, протеин фосфатаза 2

SDS – sodium dodecyl sulfate, додецилсульфат натрия

SEM – standard error of the mean, стандартная ошибка среднего

СК каналы – small conductance calcium-activated potassium channels, кальций-активируемые калиевые каналы малой проводимости

Tris – tris(hydroxymethyl)aminomethane, трис(гидроксиметил)аминометан

5PP – инозитол-1,4,5-трифосфат-5-фосфатаза

Введение

Нейродегенеративные заболевания (НДЗ) полиглутаминового тракта – это наследственные заболевания, причина возникновения которых является патологическое увеличение количества CAG повторов в определённом гене, вследствие чего наблюдается трансляция мутантного белка, который часто проявляет токсические функции, приводя в итоге к смерти клетки. К НДЗ полиглутаминового тракта относятся такие заболевания, как БХ, некоторые виды спиноцеребеллярных атаксий (СЦА), атрофия зубчатого ядра мозжечка, красного ядра, бледного шара и Люисова тела, а также спинобульбарная мышечная атрофия (СБМА).

БХ является аутосомно-доминантным НДЗ, при котором наблюдается моторная дисфункция, включая хорею, а также различные психические отклонения, которые сопровождаются прогрессирующей деменцией [235]. В случае БХ в первую очередь наблюдается дегенерация ГАМК-ергических средних шипиковых нейронов стриатума [235, 236]. На молекулярном уровне причина БХ заключается в патологическом увеличении количества остатков глутамина на N-концевом участке белка хантингтин (Htt), что было выявлено методами молекулярного клонирования [89]. На мышинной модели BACHD было продемонстрировано, что в случае нейронов стриатума мутантных животных наблюдается статистически значимое понижение частоты генерации импульсов и, соответственно, увеличение значения межимпульсных интервалов по сравнению с характеристиками нейронов стриатума мышей дикого типа (ДТ) того же возраста [68]. Недавние исследования, проведенные на нескольких мышинных моделях БХ с медленной манифестацией, показали, что нарушения электрофизиологической активности нейронов стриатума наблюдаются на ранних стадиях развития БХ еще до проявления нарушений моторных функций. Возможно, дисфункция генерации импульсов связана с уменьшением числа первичных дендритных отростков нейронов, а также с нарушением работы потенциал-зависимых калиевых каналов [196].

Довольно давно известно, что в случае БХ также наблюдается дегенерация мозжечка [178]. Исследования на пациентах с БХ выявили, что на ранних стадиях развития заболевания происходит атрофия мозжечковых структур, при этом данный патологический процесс происходит независимо от атрофии стриатума [185]. На мышинной модели БХ было показано, что в случае данного заболевания наблюдается дисфункция клеток Пуркинье (КП), выражающаяся в снижении экспрессии кальций-связывающих белков, таких как парвальбумин и кальбиндин [58]. На мышинной модели БХ в возрасте 12 месяцев было обнаружено уменьшение количества КП, а также изменение электрофизиологических свойств КП срезов мозжечка мышей БХ по сравнению с мышами ДТ [58]. Однако до настоящего момента исследования электрофизиологических свойств КП мозжечка мышей-моделей БХ *in vivo* не проводились.

Спиноцеребеллярная атаксия 2-го типа (spinocerebellar ataxia type 2, SCA2, СЦА2) – это неизлечимое наследственное НДЗ полиглутаминового тракта (увеличение числа CAG-повторов, кодирующих глутамин в белке атаксин-2, мутация которого вызывает данное заболевание). При СЦА2 первыми поражаются КП коры мозжечка, кроме того, наблюдается атрофия мозжечка и ствола мозга, а также дегенерация других частей мозга, вовлеченных в моторную активность, таких как нижняя олива (НО), понтоцеребеллярные волокна и ядра ствола. Эти данные были получены с помощью магнитно-резонансной томографии и посредством исследования *post mortem* пациентов со СЦА2 [30]. В большинстве случаев последние стадии болезни у пациентов, больных атаксией, характеризуются практически полной дегенерацией КП [91]. Существует гипотеза, согласно которой не клеточная смерть, в дисфункция КП и потеря способности правильно генерировать сигнал являются причинами ранних симптомов, наблюдаемых при СЦА2. В подтверждение этой гипотезы на мышинных моделях ЭА2 [239], а также некоторых типов СЦА [111, 199] были обнаружены нарушения регулярной пейсмейкерной активности КП. Исследования показали, что SK каналы осуществляют строгий контроль

пейсмейкерной активности КП [247]. В результате исследований электрофизиологическими методами *in vitro* на срезах мозжечка подопытных мышей было обнаружено, что различные активаторы SK каналов имеют терапевтический эффект в случае заболеваний ЭА2 [239], СЦА2 [110] и СЦА3 [199].

Предыдущие эксперименты на мышах-моделях СЦА2 показали, что электрофизиологическая активность взрослых КП была нарушена по сравнению с КП мышей ДТ [67], однако в дальнейших исследованиях было выявлено, что нейрональная дисфункция при СЦА2 является следствием не только нарушенной активности КП, но и неправильной синаптической передачи в пути лазающее волокно (ЛВ)-КП [65]. Кроме того, было выявлено, что в результате фармакологической активации работы SK каналов наблюдается восстановление нормальной регулярности генерации импульсных сигналов КП [67]. Нарушения в синапсе ЛВ-КП были ранее обнаружены на мышах-моделях СЦА1 трансгенных линий SCA1-82Q и SCA1-30Q [21]. Дисфункция оливо-мозжечкового пути, включающего в себя ЛВ, также наблюдалась у мутантных мышей с КП-специфичным подавлением экспрессии BK каналов, вследствие чего у данных мышей наблюдались нарушения моторной координации [38]. Однако до настоящего момента исследования синаптической активации КП системой ЛВ *in vivo* не проводились на бодрствующих мышах в патогенезе СЦА2.

Цель работы состояла в исследовании электрофизиологических функций КП коры интактного мозжечка мышей-моделей БХ и СЦА2 и мышей ДТ *in vivo* различных возрастов, а также в возрасте 12 месяцев в условиях активации работы SK каналов.

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

1. Анализ паттерна активности КП и формы СС КП анестезированных БХ и ДТ мышей в возрасте 6 и 9 месяцев

2. Анализ паттерна активности КП и формы СС КП анестезированных БХ и ДТ мышей в возрасте 12 месяцев в отсутствие и после систематического введения хлорзоксилона
3. Анализ паттерна активности КП и формы СС КП бодрствующих СЦА2 и ДТ мышей в возрасте 6 и 9 месяцев
4. Анализ паттерна активности КП и формы СС КП бодрствующих СЦА2 и ДТ мышей в возрасте 12 месяцев в отсутствие и после систематического введения хлорзоксилона

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Нейродегенеративные заболевания

Нейродегенеративные заболевания (НДЗ) – это группа заболеваний, связанных с дисфункцией нейронов определенного типа и последующей деградацией соответствующих отделов головного/спинного мозга. Самыми распространенными НДЗ являются болезнь Альцгеймера (БА) и болезнь Паркинсона (БП). При БА в первую очередь наблюдается гибель нейронов гиппокампа, а при дальнейшем развитии заболевания происходит дегенерация глубоких мозговых структур, ответственных за осуществление связей между корой и другими отделами центральной и периферической нервной системы [139]. При БП постепенно гибнут дофаминергические (ДЕ) нейроны черной субстанции, в результате чего снижается концентрация нейромедиатора дофамина в полосатом теле, что, в свою очередь, влечет за собой усиление тормозного влияния на ядра таламуса и снижение возбуждающего влияния таламуса на кору [13]. В нейронах пораженных областей наблюдается наличие телец Леви, характерных также и для других НДЗ – деменции с тельцами Леви. Тельца Леви образуются вследствие скопления в цитоплазме α -синуклеина [194], которые могут вызвать нейрональную гибель [251]. К менее распространенным НДЗ относятся болезни двигательных нейронов (боковой амиотрофический склероз (БАС), спинальные амиотрофии) и заболевания полиглутаминового тракта, вызываемые патологическим увеличением количества остатков аминокислоты глутамин в составе определенных белков (БХ, некоторые типы СЦА).

Некоторые НДЗ принадлежат к классу протеопатий, поскольку они ассоциированы с агрегацией неправильно свернутых белков. Например, белок альфа-синуклеин может агрегировать с образованием нерастворимых фибрилл при патологических состояниях, характеризующихся тельцами Леви, такими как БП, деменция с тельцами Леви и множественная системная атрофия. Белки

тау и бета-амилоид являются основными компонентами нейрофибриллярных клубков и сенильных бляшек при БА. Митохондриальная дисфункция и окислительный стресс также являются одной из причин возникновения НДЗ, в том числе БА, БП, БХ и БАС [128]. Активные формы кислорода, образующиеся в результате окислительного метаболизма, являются основным источником повреждения ДНК в мозге. Увеличение окислительного повреждения ДНК в головном мозге связано с БА и БП [104]. Дефектная репарация ДНК также связана с нейродегенеративными нарушениями, такими как БА, БАС, синдромом Коккейна и БП [104, 134].

Считается, что недостаток парвальбумина и кальбиндина, а также нарушенная регуляция Ca^{2+} играют важную роль в патогенезе БА, БП, СЦА, БХ и БАС. Нейроны, экспрессирующие кальций-буферные белки, менее уязвимы к нейродегенерации в неокортексе пациентов в БА [151], спинном мозге и стволе мозга пациентов с БАС [151] и стриатуме БХ пациентов [150]. Различия в некоторых типах нейротрансмиттеров и рецепторов, чувствительных к этим нейротрансмиттерам, между подтипами нейронов может объяснить селективную нейрональную уязвимость в НДЗ. Исследования показали, что субъединицы GluN1 и GluN2 рецептора NMDA более подвержены эффекту старения в патологии БА [136]. Неравная экспрессия рецепторов mGluR (групп I и II) в специфических популяциях нейронов может быть ответственна за селективную нейрональную дегенерацию при БАС [123, 227]. Некоторые клеточные и молекулярные изменения, которые происходят во время нормального старения, могут сделать нейроны уязвимыми к нейродегенерации. Исследования показали, что возраст-зависимое снижение экспрессии кальбиндина вовлечено в выборочную дегенерацию базальных холинергических нейронов переднего мозга и нейронов II слоя энторинальной коры при БА, DE нейронов при БП и среднешипиковых нейронов при БХ [140]. Исследования на мышах также продемонстрировали связь между молекулярными изменениями, лежащими в основе процесса старения и нейродегенерации. У мышей-моделей СЦА2 линии SCA2-127Q наблюдалось снижение экспрессии белка кальбиндина, маркера

КП, уже на 4 неделе жизни, что предшествовало уменьшению молекулярного слоя мозжечка, состоящего из КП, в течение последующих нескольких недель [90].

Таким образом, изменения в клеточном гомеостазисе Ca^{2+} , особенно в экспрессии кальций-связывающих белков, могут играть важную роль в избирательной уязвимости нейронов при старении и дегенерации [8, 72, 85, 96, 135].

1.2. Нейродегенеративные заболевания полиглутаминового тракта

НДЗ полиглутаминового тракта – это группа неизлечимых наследственных НДЗ, вызываемые патологическим увеличением количества САГ триплетов в определенных генах. Группу полиглутаминовых (поли-Q) заболеваний составляют: болезнь Смита (дентаторубрал-паллидолуизийская атрофия, ДРПЛА), БХ, спинобульбарная мышечная атрофия (СБМА или болезнь Кеннеди) и СЦА различных типов (СЦА1, 2, 3, 6, 7 и 17) [213]. За исключением связанной с X хромосомой СБМА, все остальные перечисленные поли-Q заболевания наследуются аутосомно-доминантным образом [159].

Несмотря на то, что НДЗ полиглутаминового тракта включают в себя девять различных расстройств, каждое из них имеет свой собственный ген, в котором происходят мутации, с различной хромосомной локализацией и уникальное пороговое количество САГ триплетов, выше которого наблюдается нарушение функций мутантного белка в клетке и проявление болезни (табл.1.1). Эти полиглутаминовые заболевания имеют общие патологические особенности, такие как: первичная манифестация симптомов в среднем возрасте, прогрессирующее ухудшение в течение 15-20 лет, ведущее к смерти, прямая зависимость между количеством САГ триплетов и возрастом начала проявления болезни. НДЗ полиглутаминового тракта являются относительно широко распространенными гетерогенными заболеваниями, их встречаемость составляет от 1 до 10 случаев на 100 000 населения [138].

Таблица 1.1

Типы и особенности НДЗ полиглутаминового тракта.

Тип	(CAG) _n в норме	(CAG) _n при патологии	Ген	Локализация гена на хромосоме	Белок	Функции белка	Ссылки
ДРПЛА	7 – 23	49 – 88	<i>ATNI/DRPLA</i>	12p13.31	атрофин-1	до конца не выяснена, предположительно является транскрипционным ко-репрессором и участвует в регуляции уровня инсулина в цитоплазме клетки	[108, 119, 156, 202, 228]
БХ	6 – 35	36 – 250	<i>HTT</i>	4p16.3	хантингтин	регуляция механизмов аксонального транспорта, антероградного и ретроградного перемещения везикул и органелл, а также транспорта сигнальных молекул и трофических факторов	[184]
СБМА	9 – 36	38 – 62	<i>AR</i>	Xq11-12	андрогенный рецептор	регуляция транскрипции, поддержание скелетной и гормональной	[14, 76, 207, 240]

						физиологии у мужчин посредством связывания тестостерона, регуляция женской фертильности	
СЦА1	6 – 35	49 – 88	<i>ATXN1</i>	6p22-23	атаксин-1	регуляция экспрессии генов, взаимодействие с регуляторами транскрипции и участие в сплайсинге РНК	[116, 122, 158]
СЦА2	14 – 32	33 – 77	<i>ATXN2</i>	12q24.12	атаксин-2	регуляция эндоцитоза и процессинга РНК, модуляция сигнальных путей кальция, контроль метаболизма клетки	[160, 231]
СЦА3	12 – 40	55 – 86	<i>ATXN3</i>	14q32.1	атаксин-3	поддержание белкового гомеостаза, транскрипции, регуляция стабилизации цитоскелета	[112, 127, 179]
СЦА6	4 – 18	21 – 30	<i>CACNA1A</i>	19p13.13	α_{1A} -субъединица кальциевого канала P/Q-типа	поступление ионов кальция в возбудимые клетки, участие в различных кальций-зависимых	[101, 257]

						процессах, включая сокращение мышц, высвобождение гормонов или нейротрансмиттеров, а также участвует в регуляции экспрессии генов, подвижности клеток, делении и гибели клеток	
СЦА7	7 – 17	38 – 120	<i>ATXN7</i>	13p14.1	атаксин-7	до конца не выяснена, предположительно участвует в регуляции транскрипции и стабилизации цитоскелета микротрубочек	[49]
СЦА17	25 – 42	47 – 63	<i>TBP</i>	16q27	ТАТА-связывающий белок	регуляция инициации транскрипции, участие в плавлении ДНК	[77, 86, 154]

Экспансия триплетных повторов возникает из-за нарушений в процессе репликации или репарации ДНК. Поскольку тандемные повторы имеют идентичную последовательность друг к другу, спаривание оснований между двумя цепями ДНК может происходить в нескольких точках вдоль последовательности. Это может привести к образованию «петлевых» структур во время репликации или репарации ДНК, что, в свою очередь, вызывает

повторное копирование повторяемой последовательности, увеличивая количество повторов [229]. Во время синтеза белков нестабильная экспансия кодона CAG в экзонах специфических генов транслируется в непрерывную последовательность из остатков глутамина, формирующую полиглутаминовый тракт. Мутантные белки с патологически увеличенной полиглутаминовой последовательностью агрегируют в белковые клеточные включения, имеющие микронные размеры.

Существует две типовые схемы образования этих клеточных включений: 1) прямая реорганизация полиQ мономеров, богатых β -листами, и 2) образование растворимых интермедиатов, которые претерпевают реорганизацию в мультимерную структуру, в результате чего образуется фибриллярная структура, содержащая β -листы (рис. 1.1) [2, 220]. Существует несколько причин, почему мутантные полиQ белки начинают накапливаться в клетке. Например, фланкирующие последовательности аминокислот, прилегающие к полиглутаминовому тракту в белке, могут усилить вероятность агрегации этого мутантного белка, в частности, это было замечено при СБМА: в последовательности андрогенного рецептора перед полиQ доменом находится альфа-спиральный домен, богатый остатками лейцина, что способствует агрегации этого белка [64]. Кроме того, было выяснено, что посттрансляционные модификации также влияют на способность мутантных белков собираться в агрегаты. Например, фосфорилирование, ацетилирование и сумоилирование мутантного андрогенного рецептора при СБМА влияют на структуру белка и побуждают его к аккумуляции (табл. 1.2) [148, 153, 161, 162].

Существует два подтвержденных сайта фосфорилирования в белке атаксин-1, один из которых расположен рядом с полиглутаминовым трактом [51]. Фосфорилирование атаксина-2 циклин-зависимой киназой 5 (CDK5) приводит к деградации белка с помощью убиквитин-протеасомной системы (УПС), поэтому активация CDK5 может снизить токсичность при СЦА2 [15]. Относительно белка хантингтин, или Htt, известны, по крайней мере, 48

посттрансляционных модификаций, которые влияют на локализацию Htt, функцию и его токсичность в составе агрегатов [190]. Скопления агрегатов наблюдаются, в основном, в ядре и цитоплазме [226].

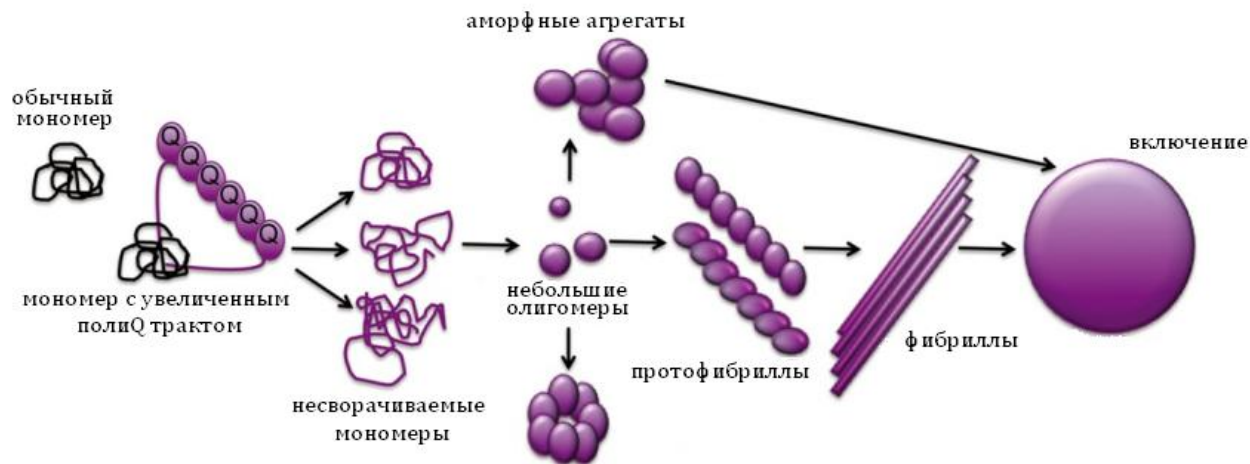


Рис. 1.1. Схема образования агрегатов из мутантных полиQ белков. Адаптировано из [226].

Аккумуляция мутантных белков может ухудшить или полностью нарушить действие различных систем в клетке. Например, клеточный механизм протеостаза, т.е. клеточных процессов, регулирующих точное производство, поддержание и деградацию белков, приобретает токсичные функции, ассоциированные с мутантным Htt (mHtt), содержащим увеличенный полиглутаминовый тракт [35, 183]. Молекулярные шапероны и белки теплового шока являются главными компонентами клеточного протеостаза. Было выявлено, что клетки, экспрессирующие mHtt, имели сильно нарушенный ответ теплового шока (heat shock response) и имели сниженный уровень фактора теплового шока 1, главного транскрипционного регулятора в ответе теплового шока и клеточного протеостаза, и, как следствие, повышенную чувствительность к протеостатическому стрессу [183].

Таблица 1.2

Пост-трансляционные модификации мутантных белков, связанных с
полиглутаминовыми заболеваниями

Белок	Эффект	Ссылки
Фосфорилирование		
андрогенный рецептор	Усиленная деградация УПС, усиление агрегации белка	[155, 161, 169, 175]
хантингтин	Усиленная деградация УПС, аутофагия	[93, 172, 225]
атаксин-1	Усиление стабильности белка	[107]
атаксин-2	Усиленная деградация белка	[15]
атаксин-3	Сниженная агрегация	[75]
Метилирование по остатку аргинина		
андрогенный рецептор	Усиление токсичности белка	[188]
Пальмитирование		
хантингтин	Сниженное образование клеточных включений	[250]
Ацетилирование		
андрогенный рецептор	Усиленная агрегация, повышенная локализация в ядре	[148]
атаксин-7	Сниженное расщепление белка	[149]
Сумоилирование		
хантингтин	Усиление стабильности белка	[214]
атрофин-1	Усиленная агрегация	[222]
атаксин-1	Усиленная агрегация	[186]
атаксин-3	Усиление стабильности белка	[256]
атаксин-7	Сниженная агрегация	[100]
Убиквитинилирование		
андрогенный рецептор	Сниженная агрегация	[1]
хантингтин	Усиленная деградация белка	[98]
атаксин-1	Сниженная агрегация	[3]
атаксин-3	Сниженная агрегация	[243]

Известно, что непатогенные короткие полиглутаминовые последовательности в составе какого-либо белка могут быть ассоциированы с полиглутаминовыми агрегатами мутантных белков, связанных с поли-Q заболеваниями посредством Glu-Glu взаимодействий. Высокая частота таких коротких CAG повторов в последовательностях регуляторов транскрипции, локализованные по большей части в ядре – главным местом аккумуляции мутантных белков – приводит к встраиванию транскрипционных регуляторов в полиглутаминовые агрегаты. В самом деле, такие регуляторы как СВР (cAMP response element binding protein) [113], ТВР (TATA-binding protein) [168], TAF_{II}130 (TBP-associated factor) [204] и белок специфичности 1 (Sp1) [204] при патологии находятся не только в свободном состоянии, но также внутри клеточных включений, состоящих из мутантных белков. Встраивание этих факторов транскрипции в полиглутаминовые агрегаты может быть причиной изменений в экспрессии генов, обнаруженных на трансгенных моделях таких полиглутаминовых заболеваний, как БХ и ДРПЛА [131, 132]. Молекулярные шапероны и протеасомы привлекаются в полиглутаминовые агрегаты, распознавая неправильно свернутую структуру аккумулялированных мутантных белков [46]. Поскольку шапероны ассоциируются с агрегатными белками лишь временно и перемещаются свободно внутрь и наружу агрегатов [117], протеасома старается развернуть и разрушить убиквитинилированные агрегированные белки [24]. Перераспределение протеасом в агрегатах может снизить их доступность внутри клетки, что приводит к сниженной степени расщепления и вредному накоплению других неправильно свернутых или поврежденных клеточных белков, нарушая, таким образом, работу УПС в клетке. Это, в свою очередь, задействует ответ на клеточный стресс и вызывает апоптоз [24, 99]. В результате, обнаружение агрегатов этих белков в нейронах таких структур мозга как мозжечок при СЦА1-3, СЦА6-7 и СЦА17, мост в случае СЦА1, СЦА3, СЦА7 и СБМА, спинной мозг при СЦА3 и СБМА [69, 166, 215, 258], а также в нейронах стриатума и коры мозга в случае БХ [133] приводит к дисфункции и дегенерации специфичных нейрональных

субпопуляций [84]. Увеличенное количество CAG повторов имеет тенденцию к дальнейшему расширению в ходе наследования генов, что приводит к более раннему проявлению болезни и более тяжелому ее протеканию у последующих поколений. Этот феномен называется «антисипацией» и является отличительной чертой всех полиглутаминовых заболеваний [159].

1.2.1. Болезнь Хантингтона

Болезнь Хантингтона (синдром Гентингтона, хорея Гентингтона или Хантингтона, БХ) является частным случаем НДЗ полиглутаминового тракта и представляет собой аутосомно-доминантное неизлечимое заболевание, при котором наблюдается патологическое увеличение повторов CAG кодона в гене *HTT*, вызывающем трансляцию mHtt с цитотоксическими функциями. Название болезни было дано в честь трех поколений врачей, изучавших ее в штате Коннектикут, США. В частности, есть мнение, что данное заболевание было названо в честь американского врача Джорджа Хантингтона, который первым дал его классическое описание [60]. БХ характеризуется нарушениями моторных функций, включая хорею (беспорядочные, неконтролируемые движения), а также психическими нарушениями, сопровождающимися прогрессирующей деменцией.

Было выяснено, что количество повторов CAG в мутантном гене *HTT* ассоциировано как с возрастом начала проявления симптомов, так и с возрастом смерти пациентов, но, что интересно, не связано с длительностью болезни [114]. Для БХ в первую очередь характерна потеря нейронов стриатума [174], при этом в случае БХ также наблюдается атрофия мозжечковых структур [185]. Первичная манифестация БХ может наблюдаться как в молодом, так и в пожилом возрасте, однако в большинстве случаев первые симптомы БХ обнаруживаются у пациентов в возрасте от 35 до 44 лет [238], при этом средняя продолжительность жизни больных БХ после начала проявления симптомов составляет около 15-20 лет.

В настоящее время хорея Хантингтона не поддается медикаментозному лечению, однако разработаны некоторые успешные терапии, улучшающие различные симптомы при БХ. Например, замедления прогрессирующей болезни можно достичь с помощью терапии, направленной на купирование симптомов, – нейролептики и бензодиазепины, такие как тетрабеназин, позволяют снизить проявление хореи, противопаркинсонические средства помогают облегчить гипокинезию и ригидность мышц. Кроме того, применение селективных ингибиторов обратного захвата серотонина показало свою эффективность для устранения депрессии, а атипичные антипсихотики зачастую назначаются при нарушениях поведения и психозах [26]. Было выяснено, что ламотригин [203] и литиевая терапия [47] положительно влияют на раздражительность и тревогу при БХ, однако было проведено слишком мало исследований, позволяющих с точностью подтвердить возможный терапевтический эффект от этих подходов. Исследования показали положительное влияние музыкальной терапии на социо-когнитивное функционирование, проблемы с поведением у пациентов с БХ, улучшив их коммуникационные навыки, что привело к лучшему качеству жизни этих пациентов [230].

Антисмысловая терапия улучшала психические и когнитивные расстройства у мышей-моделей БХ линии Nu97/18 [211]. Кроме того, антисмысловой олигонуклеотид IONIS-HTT_{Rx} (известный еще как RG6042), сконструированный, чтобы связывать специфическую последовательность Htt мРНК, способствует деградации мРНК, и, таким образом, производится меньше mHtt. Поскольку RG6042 успешно прошел фазу IIa клинических испытаний на людях, то планируется провести следующую фазу III испытаний, чтобы определить, улучшит или замедлит ли данный антисмысловой олигонуклеотид симптомы БХ [125].

Частота встречаемости заболевания среди населения с европейскими корнями составляет примерно 3-7 случаев на 100 000 человек и 1 случай на

1 000 000 человек среди остальных рас [237]. В частности, исследования показали, что в США от хореи Хантингтона страдает около 25 000 человек [61].

1.2.1.1. Патофизиологические особенности болезни Хантингтона

Симптомы БХ могут проявиться в любом возрасте, при этом выраженные не явно малые изменения личности и когнитивных способностей происходят на ранних стадиях болезни, поэтому первыми очевидными показателями проявления болезни являются физические симптомы. Для начальной стадии заболевания характерными симптомами являются хорея, проявляющаяся при беспокойстве, непроизвольных или незаконченных действиях, замедление скачкообразных движений глаз (саккад), а также нарушения координации [238]. Помимо постепенной дисфункции двигательного аппарата, при БХ наблюдаются соматомоторные нарушения (брадикинезия, дистония (ухудшение произношения вследствие нарушения иннервации речевого аппарата), ригидность, дизартрия, дисфагия), окуломоторные дисфункции (нарушение координации движений глаз), когнитивные нарушения, проблемы с жевательным и глотательным рефлексом, потеря веса и нарушения сна из-за быстрых движений глаз. Больные БХ обычно проходят через все стадии физического расстройства, однако начало заболевания, прогрессирование и степень когнитивных и психических нарушений различаются у отдельных лиц [120].

На анатомическом уровне БХ на ранних стадиях проявляется в первую очередь в поражении стриатума, области базальных ганглиев, называемой полосатым телом, состоящего из хвостатого ядра и скорлупы. Помимо повреждения стриатальных структур наблюдается атрофия и других частей мозга, таких как чёрная субстанция, гиппокамп, 3, 5 и 6 слои коры головного мозга, КП в мозжечке, боковые туберальные ядра гипоталамуса и часть таламуса. В исследованиях на пациентах с БХ было обнаружено, что атрофия мозжечка, наблюдаемая на начальных стадиях развития заболевания,

происходит независимо от дегенерации стриатума [185]. Базальные ганглии, играющие ключевую роль в контроле движений и поведения, наиболее заметно повреждаются при БХ [45].

Хорея Хантингтона может проявиться в любом возрасте, при этом менее 10% всех случаев составляют случаи проявления заболевания в возрасте до 20 лет [20]. Средняя продолжительность жизни после первичной манифестации симптомов составляет 17 лет [238], при этом причинами смерти пациента могут быть не только потеря мышечного тонуса и когнитивные расстройства, но и сопутствующие осложнения, такие как пневмония и сердечно-сосудистые заболевания. Кроме того, суицид и физические травмы в результате падений также являются частыми причинами смерти пациентов с БХ.

1.2.1.2. Мутации в гене *HTT*

Причина возникновения БХ состоит в патологической экспансии CAG кодона в гене *HTT*, находящегося на коротком плече 14-ой хромосомы человека (14p16.3), что соответствует увеличенному количеству остатков глутамина в белке Htt. В норме количество CAG повторов в гене *HTT* составляет от 10 до 35 повторов [238], при этом для хореи Хантингтона характерно наличие в гене от 40 до 250 CAG повторов [184]. Промежуточное количество CAG повторов (от 36 до 39) не всегда точно указывает на наличие заболевания. Существует так называемая «ювенильная» форма БХ, которая характеризуется очень большой экспансией CAG кодона (от 60 повторов) и проявлением симптомов в возрасте до 20 лет [184].

Белок Htt экспрессируется повсеместно во всех типах тканей, при этом наибольшая его экспрессия в мозге наблюдается в коре мозжечка, неокортексе, стриатуме и гиппокампальной формации. Белок имеет молекулярную массу 348 кДа и состоит из 3142 аминокислотных остатков. Htt локализуется во многих органеллах, включая ядро, эндоплазматический ретикулум, комплекс Гольджи и эндосомы. Htt содержит домены убиквитинирования, сумоилирования,

пальмитоилирования на N-конце, после которых идет полиглутаминовый и полипролиновый тракт. HEAT повторы (хантингтин, фактор элонгации 3, PR65/A регуляторная субъединица протеинфосфатазы 2A и Tor1 или Huntingtin, Elongator factor3, PR65/A regulatory subunit of PP2A, and Tor1) встречаются в составе всего Htt и опосредуют белок-белковые взаимодействия Htt с другими белками. Кроме того, Htt имеет на N- и C-конце сигнал ядерного экспорта (NES), необходимый для экспорта белка из ядра клетки в цитоплазму через комплекс ядерных пор с использованием ядерного транспорта. 18 аминокислотных остатков на N-конце Htt взаимодействуют с тетратрикопептидным повтором (TPR), поровым белком ядра, который имеет транслокационную активность [16]. Этот домен на N-конце формирует амфифильный мембран-связывающий домен имеющий структуру альфа-спирали, который обратимо опосредует связывание Htt с эндоплазматическим ретикулумом, эндосомами и аутофаговыми везикулами. Точечные мутации и делеции в этой области приводят к накоплению Htt внутри ядра и, в результате, к клеточной токсичности [44]. Исследования показали, что Htt прежде всего ассоциирован с везикулами и микротрубочками, а также с транспортом митохондрий [173]. Кроме того, Htt необходим для регуляции экспрессии нейротрофического фактора мозга (BDNF), который вовлечен в механизм развития нейронов и сохранения долговременной памяти. Секвенирование РНК показало, что экспрессия mHtt в кортикальных нейронах ведет к устойчивым изменениям в экспрессии некоторых генов прежде, чем нейроны погибнут. Было выяснено, что транскрипционный фактор Twist1, необходимый для эмбриогенеза и обычно экспрессируемый в низких количествах в здоровых нейронах, усиленно экспрессируется в нейронах, содержащих mHtt в культуре клеток и у мышинной модели БХ линии R6/2 [163]. Известно, что Htt участвует в транспорте везикул и органелл вдоль аксонов, поэтому mHtt может нарушить эти процессы и, таким образом, влиять на патогенез заболевания. Как и в случае других белков, сопряженных с полиглутаминовыми заболеваниями, mHtt склонен агрегировать в

нерастворимые нейрональные внутриклеточные включения, которые содержат компоненты внутриклеточных машин, ответственных за транспортировку и деградацию неправильно свернутых белков (убиквитин, субъединицы протеасомы, шапероны [145]). Несмотря на то, что эти внутриклеточные включения могут присутствовать в коре головного мозга и стриатуме пациентов с БХ, их патогенетическая роль в гибели нейронов остается невыясненной. При БХ, в нейронах, имеющих агрегаты Htt, наблюдается дисфункция митохондриального транспорта [36, 126], при этом стриатальные нейроны могут быть более восприимчивы к дисфункции трафика, чем другие типы нейронов, такие как кортикальные нейроны. mHtt играет ключевую роль в дисфункции митохондрий, включающей ингибирование транспорта электронов, повышение уровня активных форм кислорода и усиление окислительного стресса [129]. Кроме того, mHtt может способствовать окислительному повреждению ДНК, что также может приводить к возникновению БХ [17].

1.2.2. Аутосомно-доминантные церебеллярные атаксии

Аутосомно-доминантные церебеллярные атаксии (АДЦА) – это группа нейродегенеративных неизлечимых наследственных заболеваний, характеризующиеся различными клиническими особенностями и генетическими нарушениями: экспансиями триплетов, многочисленными перестановками в генах и мутациями. Группу АДЦА составляют: типичные СЦА различных типов (СЦА1-37) [91], эпизодические атаксии (ЭА 1-6) и атипичные СЦА (атрофия зубчатого ядра мозжечка, красного ядра, бледного шара и Люисова тела, спинобульбарная мышечная атрофия) [209]. При всех АДЦА наблюдается атрофия мозжечка и проводящих путей, а также нарушенное функционирование таламуса, НО, черной субстанции и других областей мозга [232]. На настоящий момент существует почти 40 различных видов типичных СЦА. Выявлены 35 генов, ассоциированных с СЦА, однако каким образом

мутации в этих генах приводят к возникновению СЦА, до сих пор остаётся неясным [42].

СЦА могут проявиться в любом возрасте – среднее время жизни больных СЦА составляет около 15-20 лет после начала проявления симптомов, однако можно продлить жизнь на 7-10 лет, если вовремя выявить заболевание и начать поддерживающее лечение. В настоящее время СЦА не поддаются медикаментозному лечению, но с помощью симптоматической терапии можно достичь замедления прогрессирующей болезни – проводят специальную лечебную физкультуру, электростимуляцию мышц, вестибулярные тренировки, а также социальную и бытовую реабилитацию. Например, проходящие нейрореабилитацию пациенты с СЦА7 демонстрировали улучшение таких симптомов заболевания, как тремор, дисметрия и дизартрия [223]. Кроме того, 24-недельный курс нейрореабилитации помог пациентам с СЦА2 улучшить моторные симптомы, такие как нестабильная походка и дискоординация конечностей [180]. Однако, помимо симптоматической терапии некоторые современные медикаментозные подходы для лечения СЦА уже показали свое потенциальное терапевтическое действие в случае доклинических испытаний на мышах. Известно, что нарушенный сигналинг mGluR в патогенезе СЦА1 можно улучшить с помощью баклофена, агониста ГАМК_B рецепторов, в результате чего наблюдается улучшение моторной активности мышечных моделей СЦА1 линии SCA1-Tg, а также восстановление mGluR-зависимой синаптической пластичности [206]. Успешной считается также антисмысловая терапия, которая улучшила локомоцию и координацию мышечных моделей СЦА3 линии SCA3-84Q [142].

Среди НДЗ СЦА являются одними из наименее изученных заболеваний. Эпидемиологические данные о распространенности СЦА ограничиваются лишь некоторыми исследованиями отдаленных географических регионов, которые по большей части не отражают истинную частоту заболевания. Поскольку СЦА представляют собой крайне гетерогенные НДЗ, количество больных атаксией варьирует между различными этническими и континентальными популяциями,

и составляет от 1 до 50 случаев на 100 000 населения [62, 197]. В частности, второй наиболее часто встречающийся подтип СЦА после СЦА3 (болезнь Мачадо-Джозефа), СЦА2, широко распространен по всему миру. Большие популяции СЦА2 семей описаны в Мексике [6], Южной Африке [29], Индии [73], Италии [28] и Венесуэле [164]. Благодаря эффекту первооткрывателя наибольший уровень распространенности СЦА2 присутствует на Кубе [231] (рис. 1.2). В провинции Ольгин, в северном регионе острова, зафиксирована самая высокая частота случаев заболевания – около 40 человек с выраженной симптоматикой и почти 200 носителей СЦА2 на 100 000 населения [124].

1.2.2.1. Патофизиологические особенности на примере СЦА2

СЦА2 представляет собой частный случай АДЦА, для которого характерны следующие признаки, прогрессирующие с развитием заболевания: атаксия, постуральная неустойчивость, дизартрия, дисметрия и другие [231]. Однако существуют другие признаки, помимо симптомов, связанных с поражением мозжечка, по которым можно выявить СЦА2, в частности, офтальмоплегия (паралич мышц глаза вследствие поражения глазодвигательных нервов), глазодвигательные нарушения (нистагм, замедленные горизонтальные саккадические движения глаз [193]), нейропатия (дегенерация нижних мотонейронов), признаки дисфункций кортикоспинального тракта (нарушение разгибательного рефлекса стопы, спастичность и гиперрефлексия) [192]), дегенерация сетчатки глаз, атрофия зрительных нервов, периферическая нейропатия, и другие [231]. Исследования на пациентах со СЦА2 показали, что на ранних этапах развития болезни наблюдается дегенерация КП коры мозжечка [91], при этом для последних стадиях заболевания дегенерация всего мозжечка и ствола мозга, а также атрофия других мозговых структур, вовлеченных в моторную активность, таких как НО, ядра ствола и понтоцеребеллярные волокна.

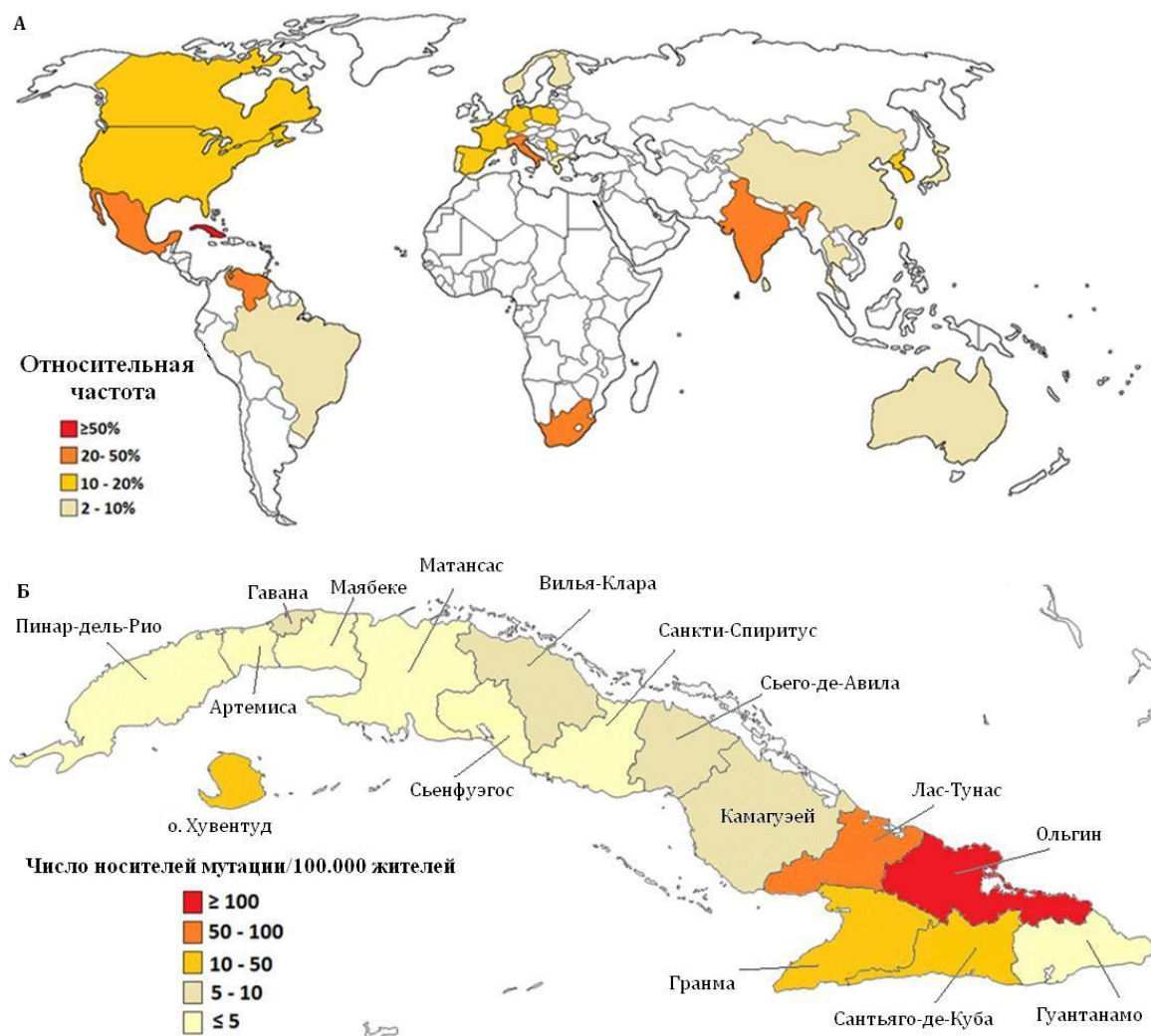


Рис. 1.2. Эпидемиологические характеристики СЦА2. (А) Относительная частота СЦА2 по всему миру. (Б) Уровень распространенности СЦА2 на Кубе. Адаптировано из [231]

СЦА2 наблюдается, чаще всего, у людей в молодом и зрелом возрасте, средний возраст начала заболевания – 35 лет [11, 54]. Пациент утрачивает свои двигательные способности, в среднем, примерно спустя 15 лет после начала манифестации заболевания. Исследования по продолжительности жизни пациентов с СЦА2 показали, что данный параметр сильно зависит от географического расположения нации, например, в Италии средний возраст смерти людей с СЦА2 составлял 67 лет [12], в то время как на Кубе и в Испании – 52 года [5] и 58 лет [7] соответственно.

1.2.2.2. Мутации в гене *ATXN2*

На молекулярном уровне причина возникновения СЦА2 состоит в нестабильной экспансии CAG кодона в первом экзоне гена *ATXN2* [200], расположенном на коротком плече 12-ой хромосомы человека (12q24.12), что соответствует полиглутаминовому тракту в белке атаксин-2. В норме количество CAG повторов в гене *ATXN2* составляет от 14 до 32 повторов, при этом для СЦА2 характерно наличие в гене от 34 до 124 CAG повторов [234]. Известно, что в мутантном гене *ATXN2* наиболее часто встречаются 39-40 повторов данного кодона [170], однако существует «ювенильная» форма СЦА2, которая характеризуется очень большим количеством остатков Glu в мутантных белках СЦА2 пациентов и манифестацией заболевания в раннем детском возрасте [18]. Как при БХ, так и при СЦА2 существует зависимость между длиной поли-Q тракта и степенью тяжести заболевания – чем он длиннее, тем раньше и тяжелее проявляется болезнь.

Зрелый белок атаксин-2 – это цитозольный полипептид, экспрессируемый во всех типах тканей, с молекулярной массой около 140 кДа и состоящий из 1312 аминокислотных остатков. Атаксин-2 содержит два LSm домена, позволяющие белку связываться с РНК, РАМ2 мотив, необходимый для ассоциирования с поли(А)-связывающим белком (РАВР), и поли-Q тракт, локализованный на N-конце полипептида. Атаксин-2 вовлечён в такие клеточные механизмы, как регуляцию эндоцитоза и процессинга РНК, контроль метаболизма и энергетического баланса, а также модуляцию сигнальных путей кальция [160]. Присутствие увеличенного полиглутаминового тракта в белке атаксин-2, возможно, вызывает в нем конформационные изменения, приводящие к приобретению новых цитотоксичных функций и/или частичной потере нормальных функций белка, и, в результате, к клеточной дисфункции и смерти нервных клеток [48, 95, 115]. Исследования показали, что такие патогенетические механизмы, как нарушение регуляции транскрипции и генетической экспрессии, изменения кальциевого гомеостаза и синаптической

передачи, митохондриальный стресс и апоптоз связаны с неправильной работой мутантного атаксина-2 [231].

1.3. Структурная организация мозжечка

Известно, что мозжечок играет ключевую роль в регуляции мышечного тонуса и равновесия, а также он отвечает за моторное обучение и координацию движений. Поражение какой-либо части мозжечка влечет за собой нарушение или полную утрату его функций. Как уже было сказано выше, КП коры мозжечка первыми поражаются в случае СЦА2, после чего происходит дегенерация других частей мозга, вовлеченных в моторную активность.

1.3.1. Кора мозжечка

Кора мозжечка состоит из трех слоев – наружного (молекулярного), ганглионарного (слоя КП) и зернистого (гранулярного) (рис. 1.3).

В КП сигнал поступает по двум различным афферентным путям – по системам лазающих и мшистых волокон (рис. 1.3). От нейронов НО идут лазающие волокна (ЛВ, обозначены розовым цветом), посылающие информацию от коры мозга к КП, образуя при этом многочисленные синаптические контакты (от 250 до 1500 штук) с проксимальными дендритами КП (область взаимодействия с ЛВ обозначена светло-розовым цветом). От нейронов в спинном мозге и стволе мозга идут мшистые волокна (МВ), передающие информацию от периферии и коры мозга к КП посредством аксонов гранулярных клеток, формирующие параллельные волокна (ПВ, обозначены зеленым цветом).

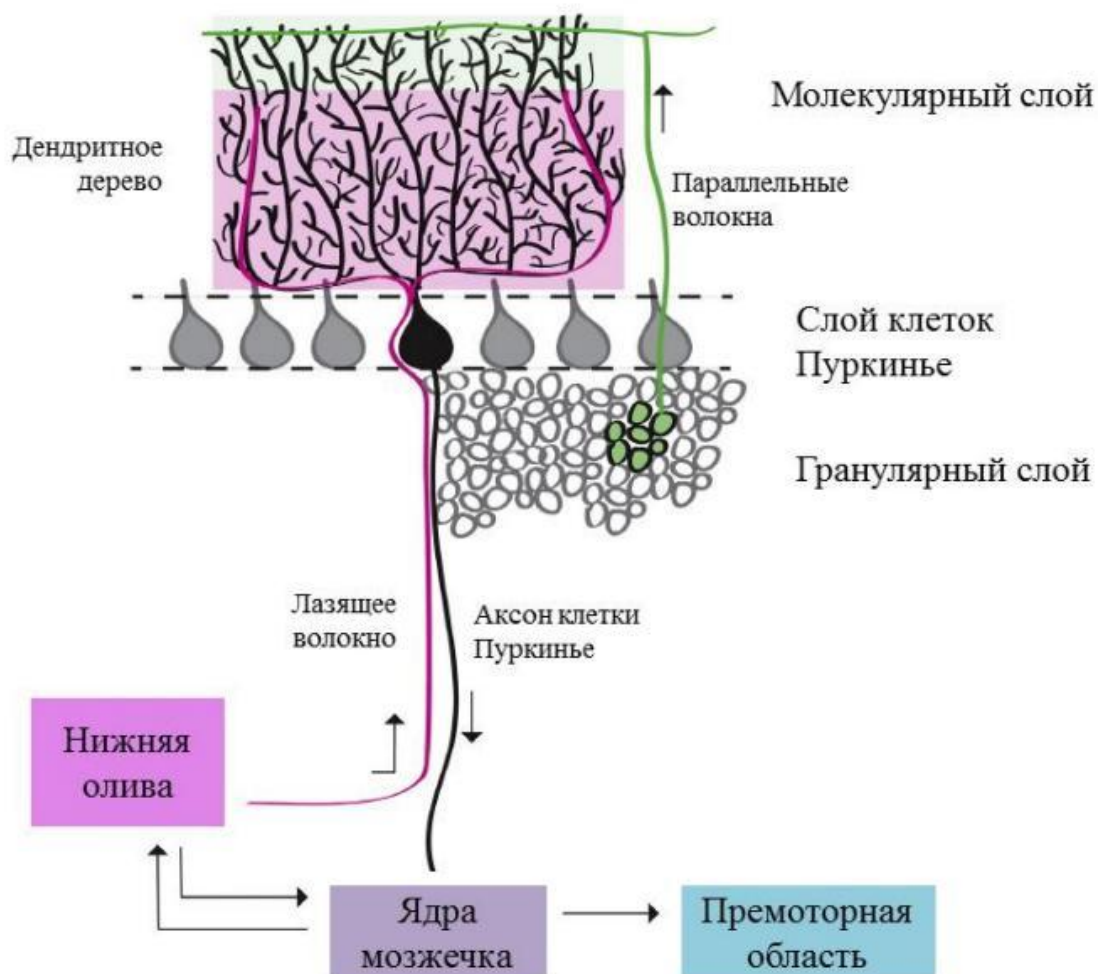


Рис. 1.3. Схема взаимодействия между собой различных нейронов коры мозжечка. Адаптировано из [209].

МВ образуют многочисленные синаптические контакты с дистальной областью дендритного дерева КП (область взаимодействия обозначена светло-зеленым цветом). Таким образом, наличие порядка 200 000 различных ПВ в области взаимодействия ПВ с дендритами КП приводит к созданию огромного количества синапсов между КП и ПВ [209]. Известно, что КП генерируют два различных типа спайков: простые и сложные. Сложные спайки (СС) образуются вследствие иннервации КП ЛВ: вслед за начальным высокоамплитудным потенциалом действия генерируются высокочастотные всплески потенциалов с меньшей амплитудой (спайклеты). В то же самое время КП генерирует простые спайки (ПС) в ответ на возбуждающие потенциалы, исходящие от ПВ [31, 50, 171]. СС возникают нерегулярно и имеют низкую

частоту – около 1 Гц, в отличие от ПС, которые, напротив, возникают регулярно, при этом их частота составляет в среднем 20-100 Гц при внеклеточной регистрации *in vivo* [88, 97].

1.3.2. Проводящие пути мозжечка

С другими отделами нервной системы мозжечок связан при помощи многочисленных проводящих путей. Различают эфферентные (идущие от мозжечка) и афферентные (идущие к мозжечку) пути, которые проходят в ножках мозжечка и соединяют его со спинным мозгом, подкорковыми ядрами, стволовой частью головного мозга и корой полушарий. Через верхние ножки мозжечка проходят эфферентные пути: передний спинально-мозжечковый, мозжечково-таламический, зубчато-красный, мозжечково-вестибулярный пути и мозжечково-ретикулярный, соединяющие мозжечок с ядрами мозгового ствола. В средних ножках мозжечка проходят афферентные пути, по которым передается информация от коры головного мозга к мозжечку, – лобно-мосто-мозжечковый, височно-мосто-мозжечковый и затылочно-мосто-мозжечковый тракты. В нижних ножках мозжечка проходят афферентные проводящие пути, идущие от спинного мозга и ствола головного мозга к коре мозжечка, – задний спинально-мозжечковый, вестибуло-мозжечковый, ретикуло-мозжечковый и оливо-мозжечковый пути [189].

Оливо-мозжечковый путь является афферентным проводящим путем в мозжечке и представлен ЛВ, которые берут свое начало в ядрах НО и заканчиваются на КП коры мозжечка. Нейроны НО получают информацию от коры головного мозга посредством билатеральных проекций из двигательных зон коры, а также ипсилатеральных проекций из соматосенсорных областей коры, и с помощью оливо-мозжечкового пути передают информацию от премоторных зон коры (областей, ответственных за планирование движений) к КП.

1.3.3. Дисфункция КП при атаксиях и БХ

Ранние симптомы НДЗ полиглутаминового тракта, возможно, являются результатом не клеточной смерти, а дисфункции КП и потери способности КП правильно генерировать сигнал. Данное предположение подтвердилось обнаружением нарушенной пейсмейкерной активности КП на мышинной модели в случае ЭА2 [239]. Было выяснено, что нерегулярная активность КП является причиной моторной дисфункции мышей-моделей ЭА2 C57/B16 бэкграунда, при этом прямые инъекции активатора кальций-активируемых калиевых каналов NS309 в мозжечок нормализовали нерегулярную активность КП, смягчая таким образом моторные симптомы заболевания у этих мышей [221].

Исследования на мышинной модели СЦА1 трансгенной линии SCA1-82Q позволили выявить ненарушенную пейсмейкерную активность КП на ранних стадиях заболевания у мышей, однако вместе с постепенно проявляющимися моторными нарушениями пейсмейкерная активность КП становилась нерегулярной. Кроме того, одновременно с моторной дисфункцией наблюдалась аномальная деполяризация пейсмейкерной активности КП. В результате уменьшения экспрессии кальций-активируемых калиевых каналов большой проводимости (ВК каналов, Big conductance calcium-activated potassium channels) и потенциал-активируемых калиевых каналов, кальциевый ток беспрепятственно проникал в клетку, вследствие чего импульсные сигналы генерировались нерегулярно на ранних стадиях заболевания. Последующее восстановление правильной генерации сигнала КП у трансгенных мышей коррелирует с восстановлением плотности ВК каналов и их активацией, с улучшением моторной дисфункции, а также частичным восстановлением морфологии КП [52]. На мышинной модели СЦА1 трансгенной линии SCA1-82Q с помощью поведенческих тестов было выявлено ухудшение координации начиная с возраста 5 недель, прогрессирующее с возрастом, с сопутствующим уменьшением количества дендритных отростков КП и сниженным числом шипиков на них, а также атрофией сомы КП и относительно небольшой

потерей самих КП [41]. На этой же мышинной модели СЦА1 был обнаружен недостаток цитохром-С-оксидазы (СОХ) в КП у мышей в возрасте от 2 до 6 месяцев, при этом более заметный дефицит этого фермента наблюдался у стареющих мышей. Кроме того, было обнаружено разрушение митохондриальной ДНК в КП с окислительной дисфункцией. Нарушенный окислительный метаболизм наблюдался в КП, экспрессирующих мутантный атаксин-1, у мышей уже в возрасте 8 недель, подтверждая таким образом предположение о возможном развитии атаксии, вызванной экспрессией мутантного атаксина-1, в результате клеточной дисфункции и морфологических изменений, которые происходят до гибели нейронов, а не гибели клеток как таковой [176].

Нарушения моторной активности, такие как ранние признаки потери координации, сопряженные с дисфункцией КП, небольшие покачивания головы во время движения, а также гибель самих КП в случае мышинной модели СЦА1 линии ATXN1(30Q)-D776 наблюдались уже в возрасте 6 недель [63]. Исследования показали, что снижение экспрессии эндотелиального фактора роста сосудов А (Vegfa) в КП мышей-моделей СЦА1 линии B05 способствует развитию заболевания. Кроме того, было выяснено, что супрессия мутантного атаксина-1, опосредованная РНК интерференцией, является подающим надежды подходом для потенциального лечения СЦА1: снижение экспрессии мутантного атаксина-1 в КП трансгенных мышей привело к значительной нормализации экспрессии маркеров заболевания, таких как кальбиндин-1 и Vegfa [181].

С помощью электрофизиологических исследований на срезах мозжечка мышей-моделей СЦА2 линии SCA2-58Q было обнаружено, что количество КП с пачечной и нерегулярной активностью значительно увеличивается с возрастом у трансгенных мышей [111], что также было обнаружено с помощью внеклеточных записей активности КП [67]. В исследованиях на этой же линии мышей была достигнута хроническая супрессия нарушенного кальциевого сигналинга, опосредованного инозитол-1,4,5-трифосфатным рецептором с

помощью вирус-опосредованной экспрессии инозитол-1,4,5-трифосфат-5-фосфатазы (5PP) в КП мышей. Было выяснено, что чрезмерная экспрессия рекомбинантной 5PP уменьшала возраст-зависимую нерегулярную активность КП. Кроме того, хроническая экспрессия 5PP также улучшала моторную координацию, ухудшавшуюся с возрастом у СЦА2 мышей [111].

КП в мышинной модели СЦА3 линии SCA3-84Q проявляют повышенную внутреннюю возбудимость, приводящую к блокированию деполяризации мембраны и потере способности поддерживать повторяющуюся спонтанную генерацию сигнала. Эти изменения ассоциированы с повышенной инактивацией потенциал-активируемых калиевых каналов. Введение активатора кальций-активируемых калиевых каналов, SKA-31, частично исправляло нарушенную генерацию импульсов КП, а также улучшало моторные функции подопытных мышей. Было выяснено, что ранняя дисфункция КП связана с нарушенной физиологией потенциал-активируемых калиевых каналов, что приводит к моторным нарушениям, обнаруженным у этих мышей, и, в конечном итоге, к атаксии [199].

Нарушение точности генерации импульсов КП, а также моторных функций также было обнаружено на мышинной модели СЦА6 линии SCA6-84Q в возрасте 7 месяцев. Применение FDA-одобренного (U.S. Food and Drug Administration) препарата 4-аминопиридина, блокатора калиевых каналов, улучшало моторную координацию и восстанавливало точность генерации сигнала КП до значений КП мышей ДТ, как на срезах, так и *in vivo*. Таким образом, дисфункция КП может способствовать дефициту моторной координации, что, в свою очередь, приводит к атаксическому фенотипу [102].

На трансгенных мышях-моделях СЦА7 линии SCA7-92Q, у которых экспрессировался мутантный атаксин-7 во всех нейронах центральной нервной системы (ЦНС), кроме КП, была выявлена значительная дегенерация КП. Исследования на мышинной модели СЦА7 линии SCA7-266Q обнаружили значительную дисфункцию митохондрий в КП в таких окислительных процессах, как потребление кислорода и дыхательный обмен, с помощью

ультраструктурного анализа было выявлено увеличение размеров митохондрий как в соме КП, так и в дендритах. На модельной системе стволовых клеток, с помощью которой можно выявить дефекты морфологии митохондрий и нарушенный окислительный метаболизм, было зафиксировано снижение экспрессии никотинамидадениндинуклеотида (НАД⁺). Ратиометрические флуоресцентные датчики показали снижение количества НАД⁺ в митохондриях КП пациентов с СЦА7. Таким образом, митохондриальная дисфункция КП является определяющей характеристикой СЦА7 [242]. На мышинной модели заболевания СЦА7 линии PrP-SCA7-92Q уже в возрасте 20 недель наблюдались нарушения моторных функций и характерные симптомы прогрессирующей атаксии, а в возрасте 40 недель – снижение экспрессии кальбиндина (маркера КП) [80].

Известно, что миссенс мутации в гене, кодирующем белок протеинкиназу С гамма типа (PKC γ), способствуют развитию СЦА14 [216]. Исследования на культурах КП показали, что аденовирус-опосредованная экспрессия мутантного белка PKC γ в КП приводит к образованию агрегатов внутри клетки и вызывает апоптоз. Присутствие мутантного PKC γ в КП нарушало развитие дендритов КП и снижало способность КП к образованию синапсов с другими клетками [198]. На мышинной модели СЦА14 C57BL/6J бэкграунда, несущей миссенс мутацию H101Y в гене домена С1 белка PKC γ , были выявлены изменения в морфологии КП, а также потеря КП у мышей к возрасту 4 недель. Кроме того, к 12 месяцам данные трансгенные мыши имели моторную дисфункцию, такую как вывихивание задних конечностей [254].

На мышинной модели БХ линии R6/2 с помощью иммуногистохимического анализа был обнаружен сниженный уровень в КП количества кальций-связывающих белков парвальбумина и кальбиндина, а также фермента глутаматдекарбоксилазы 67. Для того, чтобы определить, связано ли снижение экспрессии маркера КП с потерей клеток, были выполнены стереологические подсчеты, которые показали значительное уменьшение количества КП у мышей R6/2 с конечной стадией БХ, но они не выявили никаких изменений у

животных с пресимптоматической стадией (в возрасте 4 недели). При анализе спонтанной генерации сигнала КП 4-недельных пресимптоматических мышей был обнаружен дефицит в активности КП (снижение частоты спайков на 57%), предшествующий нарушениям моторной активности этих мышей [59]. Кроме того, исследования на мышах-моделях БХ линии HdhQ200 выявили потерю кальциевого буфера и маркера КП кальбиндина у симптоматических мышей в возрасте 50 недель. Было также обнаружено снижение экспрессии парвальбумина и глутаматдекарбоксилазы. Стереологический анализ показал общее уменьшение количества КП у этих мышей на 40%, с помощью метода луз-патч также было обнаружено снижение частоты генерации сигнала у мышей БХ [58]. Таким образом, можно сделать предположение о том, что ранняя дисфункция КП способствует нарушениям моторной функции при БХ.

Одним из возможных объяснений наблюдаемых патологических изменений в электрофизиологических и биохимических функциях КП при связанных с дегенерацией мозжечка НДЗ может быть нарушение гомеостаза кальция в КП. Кальциевый сигналинг в КП является важной составляющей нормального функционирования клетки, поскольку в этих нейронах экспрессируется огромное количество кальциевых каналов, кальций-чувствительных киназ и фосфатаз, а также кальциевых сенсоров для поддержания кальциевого гомеостаза. Было показано, что нарушения в кальциевом сигналинге КП ведут к дисфункции мозжечка и атаксическим симптомам, а также к смерти КП при СЦА1-3, 5-6 и 14-16 [109].

1.3.4. Дисфункция проводящих путей в патогенезе СЦА

Помимо дисфункции КП, при АДЦА обнаружены нарушения функционирования проводящих путей мозжечка, в частности, дисфункция ЛВ была выявлена на мышах-моделях СЦА1-2, СЦА6-7, СЦА14 и СЦА23.

В мышах-моделях СЦА1 линии ATXN1(30Q)-D776 была обнаружена измененная морфология ЛВ, выражающаяся в сокращении разветвлений ЛВ

вдоль дендритов КП, снижении ответной реакции КП на активацию ЛВ, а также уменьшении количества синаптических контактов с апикальными дендритами КП, что указывает на изменения в морфологии ЛВ [63]. Активность КП у этих мышей была снижена в возрасте 12 недель, нарушения морфологии ЛВ наблюдались в возрасте от 5 до 12 недель. Кроме того, был также обнаружен сниженный ответ КП на стимуляцию ЛВ. Таким образом, повреждения ЛВ являются одной из возможных причин возникновения атаксии в случае СЦА1 мышей.

В исследованиях нашей лаборатории на мышинной модели СЦА2 было показано, у взрослых трансгенных мышей линии SCA2-58Q функциональное состояние пути ЛВ-КП ухудшается у 12-месячных мышей по сравнению с мышами в возрасте 9 месяцев, что говорит о том, что наблюдаемые нарушения прогрессируют с возрастом у мышей. Ухудшение синаптической передачи информации между ЛВ и КП может способствовать нарушению моторной активности, обнаруженной у этих мышей, что в итоге приводит к атаксическому фенотипу [65].

На мышинной модели СЦА6 трансгенной линии SCA6-84Q, которая проявляет позднюю моторную дисфункцию в возрасте 7 месяцев, были проанализированы синаптические и внутренние свойства КП во время постнатального развития. Было обнаружено, что точность и частота генерации сигналов КП были повышены во время постнатального развития у трансгенных мышей в возрасте 10-13 дней, при этом наблюдалась избыточная иннервация КП ЛВ, однако не было обнаружено никаких изменений в моторном поведении [103].

У мышей-моделей СЦА7 линии PrP-SCA7-92Q в возрасте 20 недель наблюдалась ненарушенная морфология ЛВ, которая характеризовалась равномерным распределением синаптических контактов, при этом в возрасте 40 недель было обнаружено повышенное скопление синапсов ЛВ в проксимальной области, – это говорит о том, что с возрастом окончания ЛВ перераспределяются в мозжечке СЦА7 мышей в результате экспрессии

мутантного атаксина-7. При этом у данных мышей атаксический фенотип проявляется до видимых изменений морфологии ЛВ. Таким образом, можно предположить, что развитие СЦА7 вызвана в первую очередь дисфункцией КП [187].

На мышинной модели СЦА14 C57BL/6 бэкграунда было показано, что если инжектирование лентивирусного вектора в кору мозжечка, в результате которой в данной области экспрессировалась мутантная форма РКСγ, проводилось на этапе роста и развития ЛВ (P6-7), то была нарушена множественная иннервация КП различными ЛВ. При этом, если инжектирование вируса проводилось после окончательного формирования ЛВ (P21-25), то не наблюдалось нарушений в морфологии ЛВ [205]. Кроме того, в этом случае была нарушена постсинаптическая долговременная депрессия (long-term depression, LTD) относительно ПВ, однако не было обнаружено изменений в пресинаптической LTD – это говорит о том, что РКСγ принимает участие в формировании постсинаптической, но не пресинаптической LTD ПВ. Таким образом, при экспрессии мутантной РКСγ все равно наблюдаются нарушения функционального состояния проводящих путей мозжечка.

В случае мышинной модели СЦА23 линии PDYN-R212W экспрессируется мутантный продинорфин [208], в результате чего уже начиная с возраста 3-х месяцев проявляются признаки постепенно развивающейся СЦА, такие как прогрессирующее уменьшение терминалей ЛВ, при этом гибель КП наблюдается в возрасте 12 месяцев. В результате экспрессии мутантного гормона продинорфина и, соответственно, секреции мутантного опиоидного пептида динорфина А, у этих мышей наблюдалась нарушенная синаптическая передача между ЛВ и КП. Интересно, что анатомически развитие патологии ЛВ ограничивается главным образом червем мозжечка и совпадает с началом проявления симптомов атаксии [208]. Таким образом, можно сделать вывод, что причиной развития СЦА23, как и СЦА1, возможно, являются неправильное функционирование ЛВ и их повреждение, а не потеря КП.

Правильное функционирование нейронов мозжечка и его проводящих путей обеспечивает моторное обучение и слаженную работу мозжечка. Поскольку ЛВ составляют важную часть данной системы, то любые изменения в морфологии ЛВ и их взаимодействии с другими частями мозжечка могут пагубно влиять на работу всего мозжечка. Таким образом, в случае АДЦА нарушения в синаптической активации КП системой афферентных волокон наравне с потерей КП играют важную роль в появлении симптомов атаксии [109, 209].

1.4. Кальций-активируемые калиевые каналы

Кальций-активируемые калиевые каналы представляют собой калиевые каналы, работа которых зависит от концентрации кальция в клетке. Впервые они были обнаружены в 1958 году венгерским ученым Г. Гардосом, который увидел, что уровень кальция в клетке может влиять на проницаемость калия через клеточную мембрану [137]. Затем, в 1970 году, американский ученый Р.В. Мич впервые обнаружил, что внутриклеточный кальций может вызывать потоки калия через клеточную мембрану [143].

Данные каналы подразделяются на три подтипа: каналы с большой проводимостью, имеющие очень высокую проводимость в диапазоне от 100 до 300 пСм (ВК каналы), каналы с промежуточной проводимостью в диапазоне от 25 до 100 пСм (ИК каналы) и каналы с малой проводимостью 2-25 пСм (СК каналы) [245]. Это семейство ионных каналов в большинстве своем активируется внутриклеточными ионами кальция, однако некоторые из этих каналов, относящиеся к СК типу, (K_{Ca4} и K_{Ca5} каналы) реагируют на другие внутриклеточные лиганды, такие как натрий, хлор, а также на рН.

ВК каналы экспрессируются повсеместно, однако наибольшая их экспрессия наблюдается в нейронах обонятельных луковиц, коры, базальных ганглиев, гиппокампа, таламуса, мозжечка, вестибулярных ядер и спинного мозга [43]. Кроме того, высокая экспрессия ВК каналов наблюдается и в не

нейрональных клетках, таких как астроциты, олигодендроциты [34] и миоциты гладких мышц [255]. IK каналы также экспрессируются повсеместно, кроме клеток миокарда и скелетных мышц [121]. Высокая экспрессия каналов промежуточной проводимости наблюдается в клетках крови [83], эпителиальных клетках [224] и энтеральных нейронах [79]. В ЦНС IK каналы экспрессируются в симпатических и сенсорных нейронах [19, 147], а также микроглии [167]. SK каналы экспрессируются, в основном, в ЦНС, однако их экспрессия наблюдается также в кардиомиоцитах [74], тонкой кишке [78] и мочевом пузыре [219].

BK каналы участвуют в релаксации клеток гладких мышц, в которых увеличение концентрации внутриклеточного кальция вызывает их сокращение. Повышенный уровень кальция в клетке вызывает открытие BK каналов, позволяя ионам K^+ выходить из клетки, в результате чего возникает гиперполяризация и закрытие потенциал-управляемых кальциевых каналов, после чего происходит релаксация мышц [248]. Исследования на нокаутных по гену BK каналов мышцах выявили у этих мышей сильный тремор, меньшую длину шага и более медленную скорость плавания по сравнению с не нокаутными мышами. Эти атаксические симптомы указывают на то, что BK каналы играют важную роль в моторной активности, регулируемой нейронами мозжечка [27].

IK каналы являются наименее изученными из всех кальций-активируемых калиевых каналов. Считается, что они имеют с BK каналами схожий принцип работы с некоторыми различиями в проводимости и способах модуляции, при этом IK каналы модулируются кальмодулином (CaM), в отличие от BK каналов [141].

SK каналы являются единственными из кальций-активируемых калиевых каналов, которые не зависят от потенциала, они активируются только при повышенном уровне внутриклеточного кальция. Как и другие каналы, они участвуют в гиперполяризации клеток после генерации потенциала действия [71].

1.4.1. SK каналы

Кальций-активируемые калиевые каналы малой проводимости (SK каналы) представляют собой подтип кальций-активируемых калиевых каналов. Для одиночного SK канала наблюдается электрическая проводимость порядка 10 пкСм, поэтому данный тип каналов называется каналами малой проводимости [118]. SK каналы являются потенциал-независимыми клеточными машинами, которые пропускают ионы калия сквозь клеточную мембрану и активируются в результате увеличения концентрации внутриклеточного кальция. После возникновения потенциала действия, происходит реполяризация мембраны клетки, концентрация внутриклеточного кальция увеличивается, вызывая так называемую следовую гиперполяризацию (afterhyperpolarization, АНР). Начальная более быстрая фаза АНР происходит в результате активации BK каналов, в то время как медленная фаза АНР наступает за счет активации SK каналов. В активном состоянии SK каналы вытесняют ионы калия из клетки, придавая мембране более отрицательный заряд [25]. Исследования показали, что блокировка SK каналов апаминотом увеличивала возбудимость гиппокампальных нейронов и облегчала индукцию синаптической пластичности путем смещения порога модификации к более низким частотам. У мышей, получавших апамин, наблюдалось ускоренное кодирование пространственной и непространственной памяти, зависящее от гиппокампа. Им потребовалось меньше сессий для нахождения местоположения скрытой платформы в водном лабиринте Морриса и меньше времени для запоминания объектов по сравнению с мышами, получавшими физиологический раствор. Таким образом, была выяснена роль SK каналов в формировании синаптической пластичности гиппокампа. Кроме того, они важны в процессах обучения и памяти [212], а также в кальциевом сигналинге [56]. Во многих нейронах SK каналы регулируют импульсную активность за счет увеличения следовой гиперполяризации, например, в неокортексе, гиппокампе, ядрах НО [218], а также в КП [247]. Эти каналы играют важную

роль в мозжечке: было показано, что блокировка SK каналов селективным блокатором апамином влечет за собой дисфункцию КП [152]. На мышинной модели СЦА3 C57BL/6 бэкграунда было показано, что внутрибрюшинное введение активатора SK каналов SKA3 частично способствовало восстановлению нарушенной генерации сигналов КП. Кроме того, наблюдалось улучшение координации и моторной активности у этих мышей [199].

SK каналы имеют в целом такую же структуру, как и потенциал-зависимые кальциевые каналы (рис. 1.4) [141]. Одна белковая молекула содержит четыре белковые субъединицы, образуя, таким образом, тетрамер. Каждая субъединица имеет 6 гидрофобных трансмембранных доменов, представляющих собой α -спирали (на рис. 1.4 обозначены соответственно M1 – M6). Петля между доменами M5 и M6, называемая P-петлей, образует порообразующую область, представляющая собой кальций-селективный фильтр, которая всегда располагается в центре канала [217]. SK каналы могут существовать как в виде гомотетрамера, так и в виде гетеротетрамера, состоящего из более чем одного типа SK каналов. Белковая молекула SK канала C-концевым участком своей полипептидной цепи тесно связывается с белком CaM, который обеспечивает чувствительность данных каналов к ионам кальция [195].

Полипептидная цепь SK канала с цитозольной стороны взаимодействует с фосфорилирующей киназой CK2 и дефосфорилирующей протеин фосфатазой 2A (PP2A) [130]. Эти ферменты также обеспечивают тонкую регуляцию чувствительности SK каналов к ионам кальция [244]. Способность фермента CK2 к фосфорилированию зависит от конформации белковой молекулы SK канала и данный процесс происходит только тогда, когда канал находится в закрытом состоянии [4]. В условиях ингибирования киназы CK2 фосфатаза PP2A дефосфорилирует CaM [130].

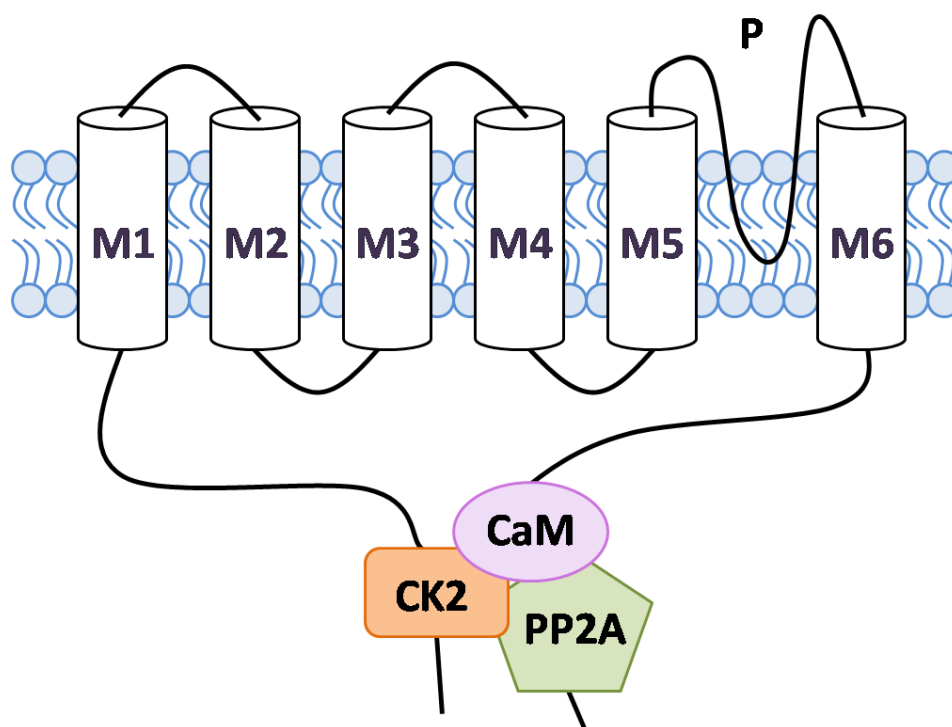


Рис. 1.4. Структура SK каналов. Адаптировано из [244].

Существует четыре подтипа SK каналов – SK1, SK2, SK3 и SK4. Первые два подтипа широко экспрессируются в неокортексе и гиппокампе, в стриатуме и базальных ганглиях, однако экспрессия SK1 каналов встречается также в периферической нервной системе и сенсорной системе [33], а SK2 каналы экспрессируются и в кардиомиоцитах [253]. SK3 каналы экспрессируются в стволе головного мозга [90, 91], при этом в нейронах ЦНС экспрессии каналов SK4 не наблюдается [224]. В мозжечке экспрессия разных подтипов SK каналов (SK1-3) зависит от типа нейронов, например, в КП наблюдается экспрессия только SK2 каналов [40], а в гранулярных клетках – высокая экспрессия SK3 каналов [218]. Поскольку в КП наблюдается экспрессия только SK2 каналов, которые ответственны за контроль пейсмейкерной активности КП, было выдвинуто предположение о том, что SK каналы являются возможной фармакологической мишенью для лечения различных видов атаксий [9, 67, 239].

1.4.2. Роль SK и BK каналов в НДЗ

Мутации в генах, кодирующих SK и BK каналы, и последующая утрата изначальной их функции, могут быть причиной огромного количества заболеваний.

BK каналы локализируются в дендритах, аксонах, соме и синаптических терминалях нейронов различных регионов мозга, включая кору и гиппокамп, где они играют ключевую роль в длительности потенциала действия и высвобождению нейротрансмиттеров [43]. Поскольку ионные каналы являются главными компонентами в регуляции нейрональной возбудимости, то дисфункция одного из подтипов этих каналов, BK каналов, способствует развитию эпилепсии. BK каналы активируются как деполяризацией мембраны, так и увеличением концентрации внутриклеточного Ca^{2+} , как следствие возбуждения нейронов. Через BK каналы проходит поток ионов K^+ наружу для прекращения потенциала действия. После гиперполяризации, вызванной BK-каналами, закрываются потенциал-зависимые кальциевые каналы и, таким образом, предотвращается избыточный приток Ca^{2+} внутрь клетки. Дисфункция BK каналов влечет за собой неспособность мембраны гиперполяризоваться, в результате чего происходит чрезмерное накопление цитозольного Ca^{2+} , то есть гипервозбуждение нейронов, и, как следствие, судороги [252]. Было выявлено, что администрация селективного ингибитора BK каналов мартенотоксина в гиппокамп значительно увеличивала время латентности между судорогами и снижала число судорог. В результате блокады BK каналов наблюдалось снижение нейрональной гипервозбудимости на мышцах-моделях эпилепсии, однако противосудорожных эффектов не было обнаружено у животных, которые не имели ранее периодов судорог [106, 201].

В результате исследований было обнаружено, что однонуклеотидный полиморфизм в гене *KCNMA1*, кодирующем субъединицу α BK канала [23], и в гене *KCNMB2*, кодирующем регуляторную субъединицу β BK канала [22], тесно связаны с патофизиологией БА. Внутриклеточное введение амилоидного

β пептида в неокортикальных пирамидальных нейронах крыс и мышей увеличивало нейрональную возбудимость, снижая активность ВК каналов [249]. Дисфункция ВК каналов была также обнаружена при синдроме ломкой X хромосомы, моногенной формы интеллектуальной инвалидности и аутизма, ассоциированной со сайленсингом транскрипции гена *Fmr1*, кодирующем FMRP (Fragile X mental retardation protein) [233]. Недавние исследования показали, что этот белок регулирует выброс нейротрансмиттера в СА3 нейронах гиппокампа напрямую взаимодействуя с $\beta 4$ субъединицей ВК канала [53].

Среди СЦА примерно треть вызвана мутациями в генах, кодирующих ионные каналы, включая калиевые каналы. Было выяснено, что у мышей с отсутствующим геном ВК канала развивались нарушения, связанные с рефлексом моргания, локомоции и нарушенной моторной активности, проверенной с помощью теста прохождения по перекладине [191], что указывает на развитие у таких мышей симптомов церебеллярной атаксии. Кроме того, у этих нокаутных мышей возникала дисфункция КП, выражающаяся в сниженной АНР. Регистрации сигнала *in vivo* подчеркнули небольшое уменьшение частоты ПС и значительное снижение частоты СС в КП [92]. Другие исследования показали, что отсутствие субъединицы α ВК канала деполяризует мембранный потенциал покоя КП и снижает спонтанную активность КП. Кроме того, уменьшенная активность КП нарушает дальнейшую нейрональную цепь, что, в конечном итоге, приводит к снижению возбуждающему ответу от нейронов НО. Это нарушение оливо-мозжечкового пути способствует молчанию КП, таким образом, блокируя передачу сигналов из мозжечка в другие отделы нервной системы [38].

Нарушения в работе СК каналов также были найдены среди различных НДЗ. Например, было обнаружено подавление экспрессии и функционирования СК каналов на пилокарпиновой модели эпилепсии на крысах [157]. Спонтанная мутация в гене, кодирующем СК3 канал, приводящая к делеции N-концевого участка этого белка, была обнаружена у пациентов с шизофренией, в результате

чего мутантные каналы подавляли идущие через них потоки ионов [146]. Селективная экспрессия этого мутантного канала в ДЕ нейронах мышей уменьшала степень связи SK3 каналов и NMDA рецепторов, вызывая усиленный выброс дофамина, в конечном счете, влияя на поведение животных [210]. Было показано, что SK3 каналы ослабляют возбуждающую синаптическую передачу на входах слоев 2/3 и слоя 5 к слою 5 пирамидальных нейронов в медиальной префронтальной коре. SK3 каналы расположены в постсинапсе, где они активируются во время синаптической передачи потока Ca^{2+} через NMDA рецепторы. Блокировка SK3-опосредованного «шунта» синаптической передачи вызывает значительную NMDA-опосредованную активацию во время базальной синаптической передачи, которая больше на входе в слой 5 (около 30%), чем в слое 2/3 (около 20%). Таким образом, была выявлена связь между NMDA рецепторами и SK3 каналами [70]. Кроме того, было показано, что недостаточное функционирование SK каналов может влиять на содержание дофамина в клетке, дисбаланс которого обычно наблюдается в патогенезе шизофрении [87]. БП, которая ассоциирована со смертью ДЕ нейронов черной субстанции, также связана с дисфункцией калиевых каналов, включая SK каналы [241]. Однако, роль SK каналов в этиологии БП остается до конца невыясненной из-за противоречивых фактов. Было показано, что активация SK каналов положительным модулятором NS309 в ДЕ нейронах человека подавляла спонтанную активность, усиливая АНР [105] и снижая нейротоксичность [55]. Эти результаты указывают на то, что увеличение активности SK каналов может спровоцировать или по крайней мере поддержать уровень синтеза дофамина, который, в свою очередь, будет смягчать моторные симптомы при БП. В результате ряда исследований на мышинной модели БП C57BL/6 бэкграунда было показано, что блокада SK каналов ядом пчел апамином усиливает симптомы БП как *in vitro*, так и *in vivo* [57]. Однако, блокирование SK каналов восстанавливало минимальную активность ДЕ нейронов в стриатуме крыс, билатерально и нигростриатально поврежденном 6-гидроксидопамином, ослабляя немоторные симптомы при БП [37]. Возможное

объяснение этих противоречивых результатов состоит в том, что позитивные или негативные модуляторы SK каналов могут оказывать благоприятное или неблагоприятное действие в зависимости от стадии болезни.

В мозжечке SK каналы играют важную роль в генерации сигналов КП, клеток Гольджи и глубоких мозжечковых ядер. В КП изменения концентрации внутриклеточного кальция приводят к активации SK2 каналов [246]. Различные модуляторы SK каналов были идентифицированы как основа для возможного лечения НДЗ. Эксперименты на мозжечковых срезах мышей-моделей ЭА2 показали успешное применение хлорзоксазона (CHZ) [9] и 4-аминопиридина [10] в качестве потенциального лечения данного заболевания, приводившее к восстановлению регуляции генерации импульсов КП и улучшению моторной активности этих мышей. Кроме того, пероральный прием CHZ позволил улучшить моторную координацию мышей-моделей ЭА2 и снизить степень, частоту и длительность периодов дискинезии без побочных эффектов, с помощью предложенного механизма восстановления функции SK каналов [9]. Недавние исследования на мышинной модели СЦА1 выявили, что улучшение генерации импульсов у КП, а также восстановление моторной активности СЦА1 мышей происходило после совместной администрации CHZ и баклофена [32]. В предыдущих исследованиях нашей лаборатории на примере мышей-моделей СЦА2 линии SCA2-58Q было показано, что восстановление регулярности импульсной активности КП наблюдается при фармакологической активации работы SK каналов CHZ *in vivo* [67]. В результате исследований влияния селективного активатора SK2/3 каналов NS13001 на мышинной модели СЦА2 было выявлено ослабление проявления симптомов данного заболевания [110]. Положительный эффект лечения различных видов атаксий в ходе проведения клинических испытаний наблюдался и от активатора SK каналов рилузола, который улучшил атаксические симптомы пациентов с ЭА2, СЦА1, СЦА2 и атаксией Фридрейха [177, 182].

Таким образом, исследования на животных моделях и клинические испытания на пациентах с СЦА продемонстрировали потенциальное

положительное влияние CHZ и других активаторов SK каналов в качестве возможных терапевтических средств для лечения различных видов атаксий.

Глава 2. Материалы и методы

В наших исследованиях были использованы 10 мышей-моделей СЦА2 трансгенной линии SCA2-58Q FVB бэкграунда, 23 мыши-модели БХ трансгенной линии YAC128 FVB бэкграунда и 43 мыши ДТ того же бэкграунда.

2.1. Бридинг мышей и генотипирование

В Лаборатории молекулярной нейродегенерации СПбПУ была разведена колония трансгенных мышей-моделей СЦА2 и мышей-моделей БХ FVB бэкграунда. Геном трансгенной модели SCA2-58Q имеет ген-вставку человеческого мутантного атаксина-2, содержащего 58 CAG повторов. Данный ген находится под контролем высокоспецифичного для КП L7/rpr2 промотора [94]. Геном трансгенной модели YAC128 имеет ген-вставку человеческого mHtt, содержащего 128 CAG повторов. Для получения смешанного (СЦА2 и ДТ, БХ и ДТ) потомства, бридинг мышей осуществлялся следующим образом – гетерозиготный самец мышей SCA2-58Q (FVB) и YAC128 (FVB) скрещивался с самкой ДТ того же бэкграунда.

Для выделения ДНК у мышей отрезались кончики хвостов (0,3 – 0,5 см), к которым затем добавляли смесь из 13 мкл протеиназы К в концентрации 10 мг/мл и 125 мкл SNET буфера (состав буфера: 10мМ Tris pH 8,0, 0,1М EDTA и 0,5% SDS), после чего данную смесь оставляли инкубироваться на ночь при температуре +55°C. После инкубации проводились следующие процедуры: экстракция ДНК фенол-хлороформом, смешивание на смесителе Vortex, центрифугирование на скорости 13400 об/мин в течение 10 минут и затем хранение при -20°C. В результате центрифугирования смесь разделялась на фазы, и в самой верхней фазе находилась ДНК, которую потом отбирали и использовали для полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Генотипирование мышей СЦА2/ДТ проводилось при помощи ПЦР на наличие трансгена *ATXN2*. Объем одной пробы для ПЦР составлял 25 мкл и содержал: 2,5 мкл 10-ти кратного буфера для Taq полимеразы, 0,5 мкл 10мМ смеси азотистых оснований, 1,5 мкл 25 мМ хлорида магния, по 0,125 мкл праймеров (прямого и обратного), 0,25 мкл Taq полимеразы, 2 мкл ДНК, 9 мкл воды для инъекций и 9 мкл энхансера бетаина. Мы использовали бетаин в качестве ПЦР-добавки для усиления амплификации GC-богатых последовательностей, поскольку она обладает способностью растворять вторичную структуру, которая блокирует действие полимеразы. Последовательность прямого праймера: 5'-GCGAACACAAAGAGAAGGACCTGGA-3', обратного праймера: 5'-GCCCTTGCTTCCCGTTTTAA-3'. ПЦР-продукт имел размер 232 п.н.

Генотипирование мышей БХ/ДТ проводилось также при помощи ПЦР на наличие трансгена *HTT*. Объем одной пробы для ПЦР составлял 25 мкл и содержал: 2,5 мкл 10-ти кратного буфера для Taq полимеразы, 0,5 мкл 10мМ смеси азотистых оснований, 1,5 мкл 25 мМ хлорида магния, по 0,125 мкл праймеров (прямого и обратного), 0,25 мкл Taq полимеразы, 2 мкл ДНК, 18 мкл воды для инъекций. Последовательность прямого праймера: 5'-CCGCTCAGGTTCTGCTTTTA-3', обратного праймера: 5'-TGGAAGGACTTGAGGGACTC-3'. ПЦР-продукт имел размер 170 п.н.

Животные содержались в группах от 2 до 6 в каждой клетке. В виварии поддерживалась температура на уровне 22-24°C и 12-ти часовой световой день. У мышей был доступ к стандартной еде и воде *ad libitum*. Все процедуры были проведены в соответствии с положениями Европейской конвенции (Страсбург, 1986), Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными (Хельсинки, 1996), а также согласно Приказу Министерства здравоохранения и социального развития от 23.08.2010 № 708н, ГОСТу Р 53434-2009, Санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) от 06.04.1973 № 1045-73, Приказу Министерства здравоохранения

СССР № 755 от 12.08.1977 и Приказу Министерства высшего и среднего специального образования СССР № 742 от 13.11.1984.

2.2. Внеклеточная регистрация от одиночного отведения КП *in vivo*

2.2.1. На анестезированных мышях

Метод внеклеточной регистрации активности КП от одиночного отведения *in vivo* на анестезированных мышях был адаптирован из ранее опубликованных работ [67, 82]. Были использованы мыши-модели БХ и мыши ДТ FVB бэкграунда в возрасте 6, 9 и 12 месяцев. Подопытные животные были наркотизированы внутривенно дробным образом с использованием уретана (Sigma-Aldrich, США) из расчета 1200 мг/кг массы тела для начальной инъекции. Затем спустя 40 минут эта концентрация была увеличена до 1800 мг/кг. Закрепление мыши в стереотаксической установке (RWD Life Science, США) осуществлялось после того как был достигнут обезболивающий эффект. Температура тела мыши поддерживалась на уровне 37°C при помощи подогревающей подушечки (Harvard Apparatus, США), контролируемой по принципу обратной связи. Затем, после снятия скальпа с области над мозжечком, просверливалась кость черепа под ламбдовидным швом, в области червя мозжечка. Эксперименты по записи активности КП проводились от 1 до 6 часов после последней инъекции с анестезирующим веществом.

2.2.2. На бодрствующих мышях

Данный метод регистрации активности КП *in vivo* в случае бодрствующих мышей с помощью установки Mobile HomeCage (Neurotar, Финляндия) в условиях отсутствия подавления нейрональной активности анестетическими средствами не был ранее использован на мышинных моделях полиглутаминовых заболеваний. В работе были использованы мыши-модели СЦА2 и мыши ДТ FVB бэкграунда в возрасте 6, 9 и 12 месяцев. Для крепления адаптера в виде

«вертолета» к черепу мыши были выполнены следующие действия. Подопытные животные были наркотизированы смесью уретана в концентрации 150 мг/мл и ксилазина в концентрации 20 мг/мл. Закрепление мыши в стереотаксической установке (RWD Life Science, США) осуществлялось после того как был достигнут обезболивающий эффект. Температура тела мыши поддерживалась на уровне 37°C при помощи подогревающей подушечки (Harvard Apparatus, США), контролируемой по принципу обратной связи. При необходимости, для предотвращения отеков и внутреннего воспаления, подкожно вводили дексаметазон в концентрации 5 мг/кг на вес животного. После снятия скальпа с области от мозжечка до брововидного шва, адаптер в виде «вертолета» приклеивался на череп мыши в области над мозжечком с помощью быстросохнущего клея (использовали моментальный клей «Момент», либо цианоакрилатный клей фирмы Vetbond). После того, как клей застывал, в специальные отверстия в адаптере ввинчивались винтики для более надежного прикрепления «вертолета» к черепу, при этом поверхность мозга и околосозговая оболочка не должны быть задеты во избежание кровотечения и заражения. Затем была разведена масса для дополнительной фиксации адаптера, состоящая из зубного цемента в виде порошка, смешанного с цементирующей жидкостью (фирма УНИФАС-2), которую наносили вокруг адаптера, создавая прослойку из цемента между адаптером и черепом. После высыхания цементирующей массы, микродрелью просверливалась кость черепа под лямбовидным швом, в области червя мозжечка. Образовавшееся отверстие затем заливали расплавленной и остывшей примерно до 30-40°C 1% агарозой для предотвращения дальнейшего заражения открытой области мозга. Прооперированную мышь помещали в клетку с подогревающей подушечкой и доступом к еде и воде до ее полного выхода из наркоза. На следующий день, если вышедшая из наркоза мышь чувствовала себя хорошо, начинали тренировочные сессии. При необходимости, вводили внутримышечно карпрофен в концентрации 2 мг/кг веса животного для устранения болевых ощущений. Мышь держали в руках по 5-10 минут, 2-3 раза, чтобы она

привыкла к частому контакту к рукам. После того, как наступало привыкание, мышь фиксировали с помощью адаптеров в заземляющем механизме установки Mobile HomeCage, а само животное при этом находилось в карбоновой камере. При этом положение головы должно быть горизонтальным и параллельным относительно поверхности установки. Систему Mobile HomeCage подключали к компрессору, в результате чего легкая карбоновая камера скользила над поверхностью установки по принципу воздушной подушки, позволяя подопытному животному свободно перемещать камеру с помощью своих лап. Поскольку в случае возникающей воздушной подушки наблюдается практически отсутствие трения, мышь испытывает иллюзию свободного перемещения по камере. Таким образом, наблюдается уменьшение стресса и сохранение спокойствия подопытного животного на протяжении всего эксперимента, что не всегда наблюдается при других методах записи электрофизиологической активности на бодрствующих животных. Тренировки проводились 2 раза в день по 2 часа сессий в системе Mobile HomeCage. После 8-12 тренировок, мышь использовали в экспериментальной сессии от 2 до 3 часов в день.

Для обоих методов внеклеточной регистрации активности КП *in vivo* записи проводились с IV-V мозжечковых долек при помощи микроэлектродов из боросиликатного стекла (внешний диаметр – 1,5 мм, внутренний – 0,86 мм; Sutter Instruments, США), наполненных 2,5М раствором хлорида натрия, с сопротивлением 3-10 МОм. С помощью одноосевого масляного гидравлического микроманипулятора (Narishige Group, Япония) микроэлектрод внедрялся в кору мозжечка на глубину до 5 мм. Регистрация электрофизиологической активности проводилась от одиночной клетки. Активность КП определялась по наличию СС, а также по наличию тормозной паузы ПС после генерации СС. СС возникают из-за активации КП ЛВ, которое запускает генерирование кальций-зависимых активных потенциалов в дендритах, в то время как ПС генерируются КП в ответ на синаптическую

активацию ПВ, представляющими собой аксоны гранулярных клеток. С помощью дифференциального усилителя (AC/DC Differential Amplifier, A-M Systems. Inc, США) регистрируемые электрические сигналы усиливались, затем они обрабатывались с помощью фильтра низких частот 10 кГц, после чего происходила оцифровка этих сигналов с помощью аналого-цифрового преобразователя NI PCI-6221 (National Instruments, США) и сохранялись для дальнейшего компьютерного анализа. Для регистрации электрофизиологической активности КП была использована программа Bioactivity Recorder v.5.9. Характеристики СС также оценивались в программе Bioactivity Recorder v.5.9. Анализ ПС проводился при помощи программ Clampfit v10.3.1.5 и Bioactivity Recorder v.5.9. Статистический анализ осуществлялся с помощью программ Origin и Excel.

2.3. Инъекции CHZ

Самки мышей из каждого потомства были отгенотипированы, подобраны по весу и разделены на группы (СЦА2/ДТ мыши и БХ/ДТ мыши), в каждой из которой содержалось от 9 до 12 мышей. Мышам вводили внутривентриально (в/б) хлорзоксазон (CHZ) два раза в неделю в концентрации 30 мг/кг, разведенным в 5% ДМСО в PBS. Контрольные группы мышей получали инъекции контрольного раствора (5% ДМСО в PBS) в той же концентрации и с той же периодичностью. Мышей инжесктировали в возрасте от 2 до 11 месяцев. Между 11 и 12 месяцами всем мышам делались инъекции контрольного раствора с целью определения долговременного эффекта терапии CHZ.

2.4. Статистический анализ

Для выявления статистически значимых различий между группами был использован односторонний критерий ANOVA с post-hoc тестом Бонферрони. Для анализа электрофизиологических особенностей активности КП, были

найлены средние значения частоты СС и ПС и средние длительности периода молчания ПС после генерации СС (пауза после СС). Для анализа формы СС были найдены средние значения длительности СС, частоты спайклетов и числа спайклетов. Полученные данные о паттерне активности КП и форме СС КП у мышей ДТ, мышей SCA2-58Q и мышей YAC128 были представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего (SEM). Последняя величина была рассчитана по следующей формуле

$$SEM = \frac{SD}{\sqrt{N}}, \quad (2.1)$$

где SD – стандартное отклонение;

N – количество записей, зарегистрированных с КП.

Стандартное отклонение SD , в свою очередь, было определено по формуле

$$SD = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}, \quad (2.2)$$

где N – количество записей, зарегистрированных с КП;

x_i – i -ое значение выборки;

\bar{x} – среднее значение выборки.

Для оценки регулярности электрофизиологического сигнала КП вычислялось значение коэффициента вариации межимпульсного интервала (КВ МИИ) по формуле

$$CV = \frac{SD}{ISI}, \quad (2.3)$$

где CV представляет собой КВ МИИ (coefficient of variation), SD – стандартное отклонение, ISI – среднее значение МИИ (interspike interval).

Глава 3. Результаты

3.1. Анализ спонтанной активности КП мышей линии YAC128 различных возрастов

Мы выполнили серию внеклеточных регистраций активности КП *in vivo* над однопометными 6- и 9-месячными мышами YAC128 и мышами ДТ соответствующего возраста (рис. 3.1). Не было выявлено статистически значимых различий между частотами СС у 6- и 9-месячных ДТ и БХ мышей ($P = 0,75$, $P = 0,05$ соответственно; рис. 3.2А). Средняя частота СС для 6-месячных ДТ мышей составляла 319 ± 57 мГц ($n = 23$ клетки, $m = 10$ мышей), а для 6-месячных мышей YAC128 составляла 296 ± 45 мГц ($n = 24$, $m = 6$; рис. 3.2А). Среднее значение частоты СС для 9-месячных ДТ мышей составляло 327 ± 34 мГц ($n = 34$, $m = 7$), а для 9-месячных БХ мышей – 458 ± 63 мГц ($n = 31$, $m = 7$; рис. 3.2А). Мы обнаружили, что средняя частота ПС у КП была одинаковой у 6-месячных мышей БХ и мышей ДТ из того же помета ($P = 0,45$, рис. 3.2Б), но была значительно снижена у 9-месячных мышей БХ ($*P < 0,05$, рис. 3.2Б). Таким образом, средняя частота ПС для 6-месячных мышей ДТ составила $28,9 \pm 2,0$ Гц ($n = 23$ клетки, $m = 10$ мышей), а для 6-месячных мышей БХ была $31,5 \pm 2,7$ Гц ($n = 24$, $m = 6$; рис. 3.2Б). Среднее значение частоты ПС для 9-месячных ДТ мышей составляло $37,0 \pm 1,9$ Гц ($n = 34$, $m = 7$), а для 9-месячных мышей БХ составило $30,5 \pm 1,6$ Гц ($n = 31$, $m = 7$; рис. 3.2Б). Кроме того, мы обнаружили, что средняя длительность паузы после СС была сходной у 6-месячных БХ мышей и мышей ДТ из одного помета ($P = 0,85$, рис. 3.2В), но была значительно увеличена у 9-месячных БХ мышей ($*P < 0,05$, рис. 3.2В).

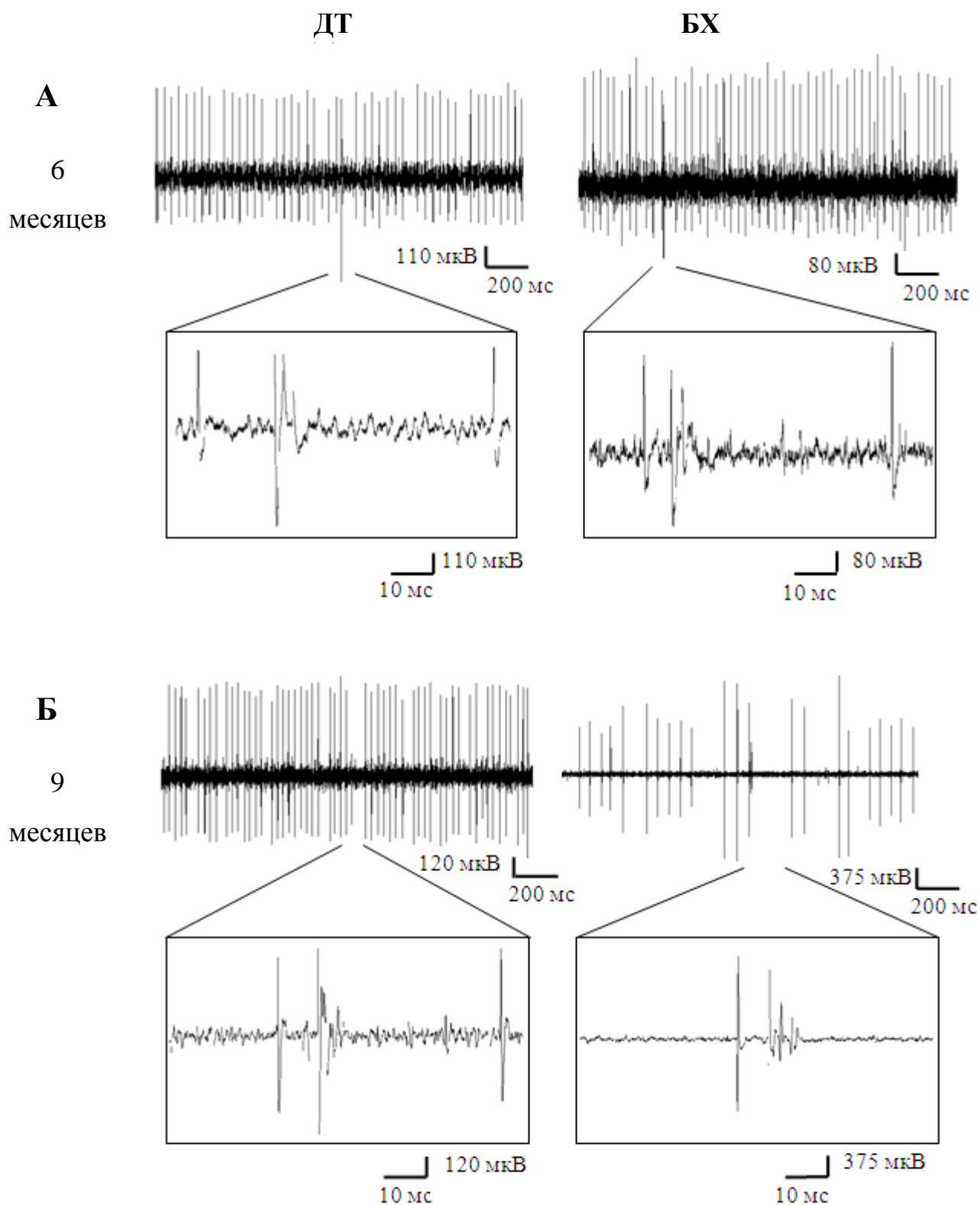


Рис. 3.1. Записи спонтанной активности КП (вверху), ниже приведен увеличенный фрагмент записи *СС in vivo*, генерируемые КП в мышцах ДТ и БХ различных возрастов. (А,Б) Примеры активности КП у 6-месячных мышей ДТ и БХ (А) и 9-месячных мышей ДТ и БХ (Б).

Средняя длительность паузы после СС для 6-месячных ДТ и БХ мышей составила $72,1 \pm 8,9$ мс ($n = 23$ клетки, $m = 10$ мышей) и $69,7 \pm 9,6$ мс ($n = 24$, $m = 6$) соответственно (рис. 3.2B). Средняя длительность паузы после СС для 9-месячных ДТ мышей составила $42,5 \pm 2,6$ мс ($n = 34$, $m = 7$), а для 9-месячных БХ мышей – $56,2 \pm 4,7$ мс ($n = 31$, $m = 7$; рис. 3.2B). Таким образом, поскольку частота ПС и длительность паузы после СС напрямую зависят от точности синаптической активации КП ПВ, то мы наблюдали нарушения в синапсе ПВ-КП у мышей БХ, проявляющиеся с возрастом.

В результате анализа характеристик формы СС для 6- и 9-месячных мышей БХ и мышей ДТ из одного помета, не было обнаружено статистически значимых различий в форме СС. Таким образом, средняя длительность СС для 6-месячных мышей ДТ и БХ составила 5758 ± 313 мкс ($n = 23$ клетки, $m = 10$ мышей) и 5221 ± 308 мкс ($n = 24$ клетки, $m = 6$ мышей) соответственно ($P = 0,23$, рис.3.2E). Средняя длительность СС для 9-месячных ДТ мышей составила 5463 ± 239 мкс ($n = 34$, $m = 7$), а для 9-месячных БХ мышей – 5383 ± 232 мкс ($n = 31$, $m = 7$) соответственно ($P = 0,81$, рис. 3.2B). Средняя частота спайклетов для 6-месячных мышей ДТ и БХ составила 438 ± 22 Гц ($n = 23$ клетки, $m = 10$ мышей) и 393 ± 26 Гц ($n = 24$ клетки, $m = 6$ мышей) соответственно ($P = 0,20$, рис.3.2Д). Средняя частота спайклетов для 9-месячных ДТ мышей составила 363 ± 15 Гц ($n = 34$, $m = 7$), а для 9-месячных БХ мышей – 385 ± 15 Гц ($n = 31$, $m = 7$) соответственно ($P = 0,31$, рис. 3.2Д). Среднее число спайклетов в составе СС для 6-месячных мышей ДТ и БХ составило $3,27 \pm 0,15$ штук ($n = 23$ клетки, $m = 10$ мышей) и $2,94 \pm 0,17$ штук ($n = 24$ клетки, $m = 6$ мышей) соответственно ($P = 0,16$, рис.3.2E). Среднее число спайклетов в составе СС для 9-месячных ДТ мышей составило $2,84 \pm 0,10$ штук ($n = 34$, $m = 7$), а для 9-месячных БХ мышей – $2,97 \pm 0,14$ штук ($n = 31$, $m = 7$) соответственно ($P = 0,43$, рис. 3.2E).

Таким образом, в ходе наших экспериментов было обнаружено, что основные характеристики СС были одинаковыми у мышей ДТ и БХ различных возрастов. Можно сделать предположение, что нейроны НО и путь ЛВ-КП в случае данных мышей, скорее всего, не поражены.

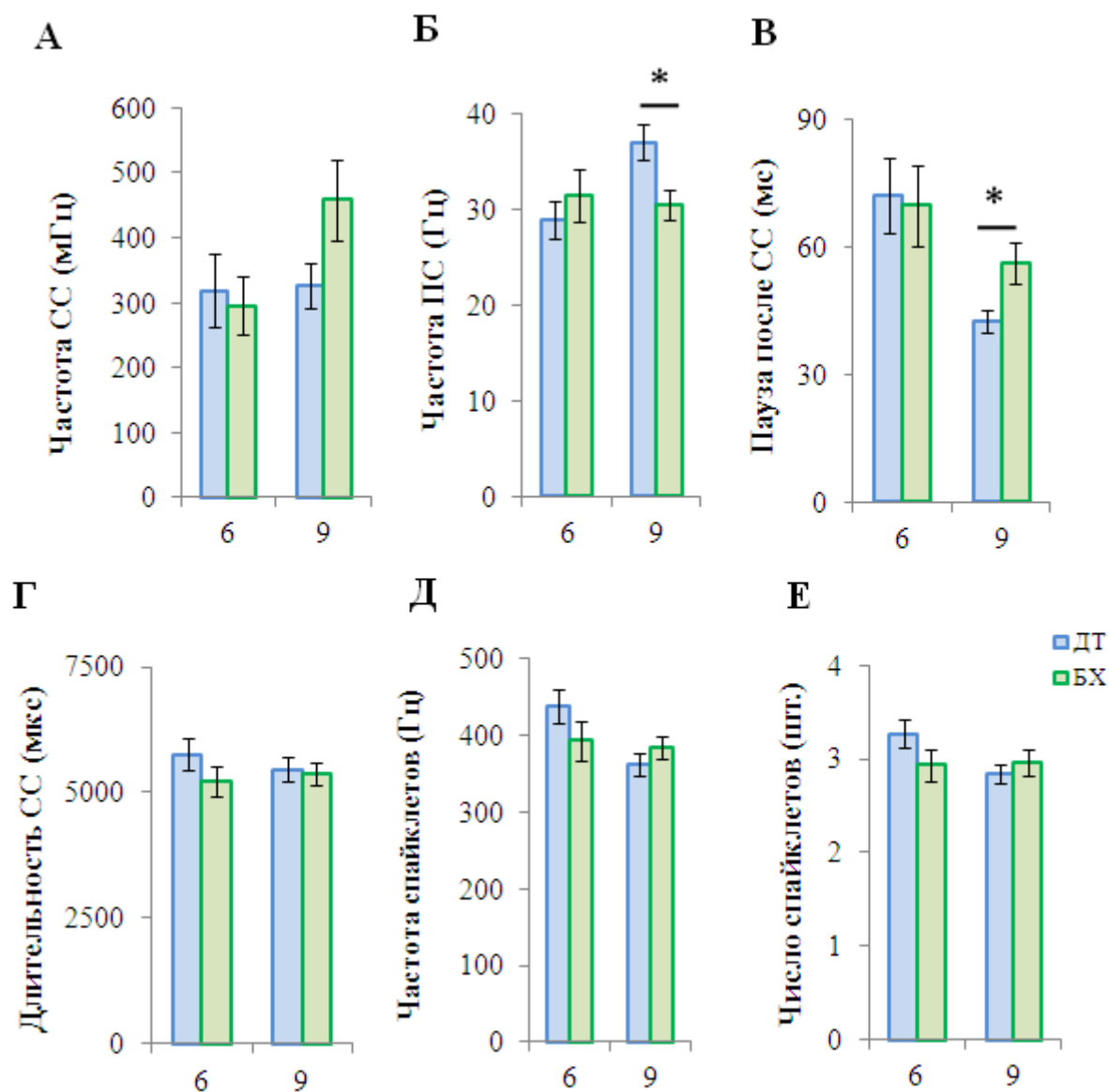


Рис. 3.2. Анализ паттерна активности КП и формы СС КП мышей ДТ и БХ различных возрастов. (А) Средние частоты генерации СС КП у 6- и 9-месячных мышей ДТ ($n = 23$ и 34 клетки, $m = 10$ и 7 мышей) и БХ ($n = 24$ и 31 клетка, $m = 6$ и 7 мышей) представлены в виде среднего \pm SEM. (Б) Средние частоты генерации ПС КП у 6- и 9-месячных мышей ДТ ($n = 23$ и 34 клетки, $m = 10$ и 7 мышей) и БХ ($n = 24$ и 31 клетка, $m = 6$ и 7 мышей) представлены в виде среднего \pm SEM. $*P < 0,05$. (В) Средняя длительность паузы после СС КП у 6- и 9-месячных мышей ДТ ($n = 23$ и 34 клетки, $m = 10$ и 7 мышей) и БХ ($n = 24$ и 31 клетка, $m = 6$ и 7 мышей) представлена в виде среднего \pm SEM. $*P < 0,05$. Средняя длительность СС (Г), частота спайклетов (Д) и число спайклетов (Е) у

6- и 9-месячных мышей ДТ ($n = 23$ и 34 клетки, $m = 10$ и 7 мышей) и мышей БХ ($n = 24$ и 31 клетка, $m = 6$ и 7 мышей) представлены в виде среднего \pm SEM. Не было обнаружено статистически значимых различий. Post-hoc тест Бонферрони.

Затем, мы определили среднее КВ МИИ для КП во всех исследуемых группах мышей. Мы обнаружили, что КВ МИИ был одинаковым для мышей ДТ и БХ мышей в возрасте 6 месяцев ($P = 0,75$), но был значительно выше у 9-месячных мышей БХ по сравнению с мышами ДТ того же возраста ($**P < 0,01$). Таким образом, среднее КВ МИИ для 6-месячных мышей ДТ составил $0,26 \pm 0,02$ ($n = 23$ клетки, $m = 10$ мышей), для 6-месячных мышей БХ составил $0,27 \pm 0,02$ ($n = 24$ клетки, $m = 6$ мышей). Среднее КВ МИИ для 9-месячных мышей ДТ составил $0,28 \pm 0,02$ ($n=34$ клетки, $m = 7$ мышей), для 9-месячных мышей БХ составил $0,40 \pm 0,03$ ($n=31$ клетки, $m=7$ мышей; рис. 3.3).

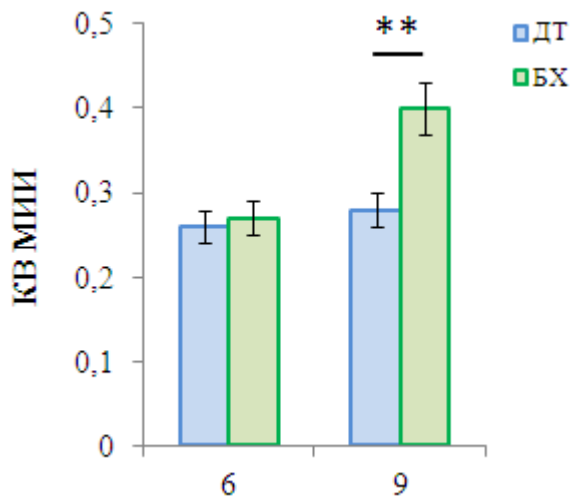


Рис. 3.3. Значения коэффициента вариации межимпульсного интервала КП мышей ДТ и БХ в возрасте 6 и 9 месяцев. $**P < 0,01$. Post-hoc тест Бонферрони.

Полученные записи *in vivo* позволяют предположить, что КП мозжечка менее часто и менее регулярно генерируют активность у стареющих мышей БХ, по сравнению с мышами ДТ, и это наблюдение согласуется с предыдущими исследованиями на срезах мозжечка мышей БХ и ДТ [58, 59]. Таким образом,

нарушения электрофизиологической активности КП являются следствием дисфункции КП и напрямую связана с атаксическими симптомами, проявляющимися в случае БХ.

3.2. CHZ нормализует активность КП мозжечка стареющих БХ мышей

В предыдущих исследованиях нашей лаборатории на примере мышей-моделей СЦА2 линии SCA2-58Q было показано, что в результате фармакологической активации работы SK каналов CHZ *in vivo* восстанавливается нормальная регулярность генерации электрофизиологической активности КП [67]. В настоящих экспериментах мы использовали метод внеклеточной регистрации активности КП для оценки функциональных эффектов CHZ у БХ и ДТ мышей в возрасте 12 месяцев (рис. 3.4 – 3.7). Преимущество CHZ состоит в том, что это соединение было использовано во многих доклинических испытаниях в качестве возможного терапевтического агента для ЭА2 [9], муковисцидоза [81] и гипертонии [165]. В следующей серии экспериментов были изучены следующие экспериментальные группы (рис. 3.4): мыши ДТ в контрольной группе, которым вводили контрольный раствор (ДТ), мыши ДТ, которым вводили CHZ (ДТ CHZ), мыши БХ в контрольной группе (БХ) и мыши БХ, которым вводили CHZ (БХ CHZ). Все мыши были в возрасте 12 месяцев.

Подобно 6- и 9-месячным экспериментальным группам, мы не наблюдали статистически значимой разницы в средних значениях частоты СС между исследуемыми группами (рис. 3.5А). Таким образом, средняя частота СС для мышей ДТ составила 631 ± 62 мГц ($n = 51$ клетка, $m = 7$ мышей), для мышей ДТ CHZ была 592 ± 60 мГц ($n = 51$, $m = 8$, $P = 0,14$), для мышей БХ частота составила 559 ± 61 мГц ($n = 40$, $m = 11$, $P = 0,41$), а у мышей БХ CHZ она была равна 574 ± 75 мГц ($n = 34$, $m = 9$, $P = 0,19$; рис. 3.5А).

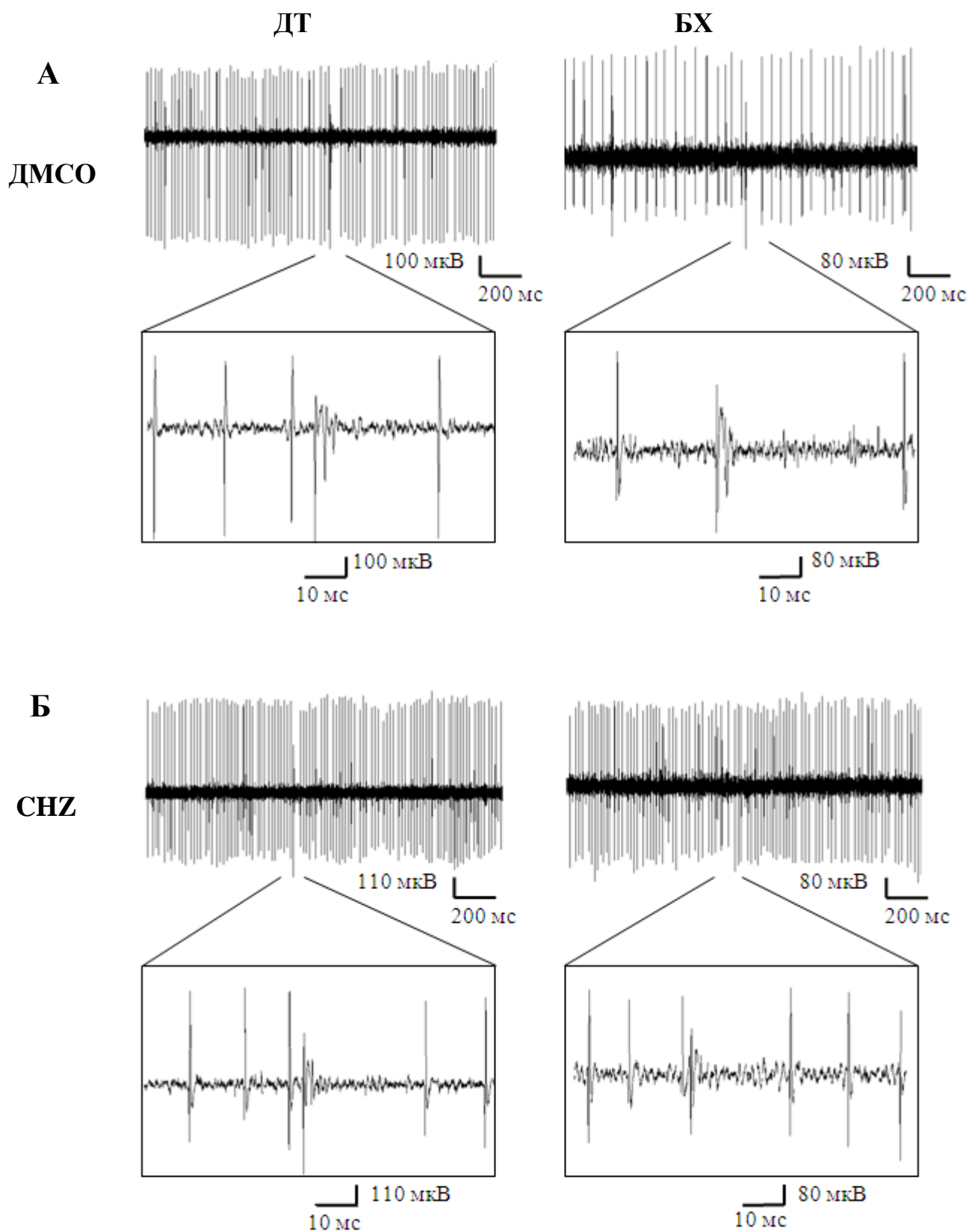


Рис. 3.4. Записи спонтанной активности КП (вверху), ниже приведен увеличенный фрагмент записи *СС in vivo*, генерируемые КП в мышцах ДТ и БХ в возрасте 12 месяцев в контроле (А) и после введения CHZ (Б).

В наших экспериментах долгосрочные в/б инъекции 30 мг/кг CHZ приводили к восстановлению частоты ПС у 12-месячных мышей БХ (рис. 3.5Б). Таким образом, средняя частота ПС для мышей ДТ составила $39,1 \pm 2,2$ Гц ($n = 51$ клетка, $m = 7$ мышей), для мышей ДТ CHZ была $35,3 \pm 2,8$ Гц ($n = 51$, $m = 8$, $P = 0,48$), для мышей БХ была равна $30,1 \pm 2,5$ Гц ($n = 40$, $m = 11$, $** P < 0,01$), а у мышей БХ CHZ – $34,3 \pm 1,9$ Гц ($n = 34$, $m = 9$, $P = 0,56$; рис. 3.5Б). Мы также отметили, что длительные инъекции CHZ восстанавливают среднее значение длительности паузы после генерации СС (рис. 3.5В).

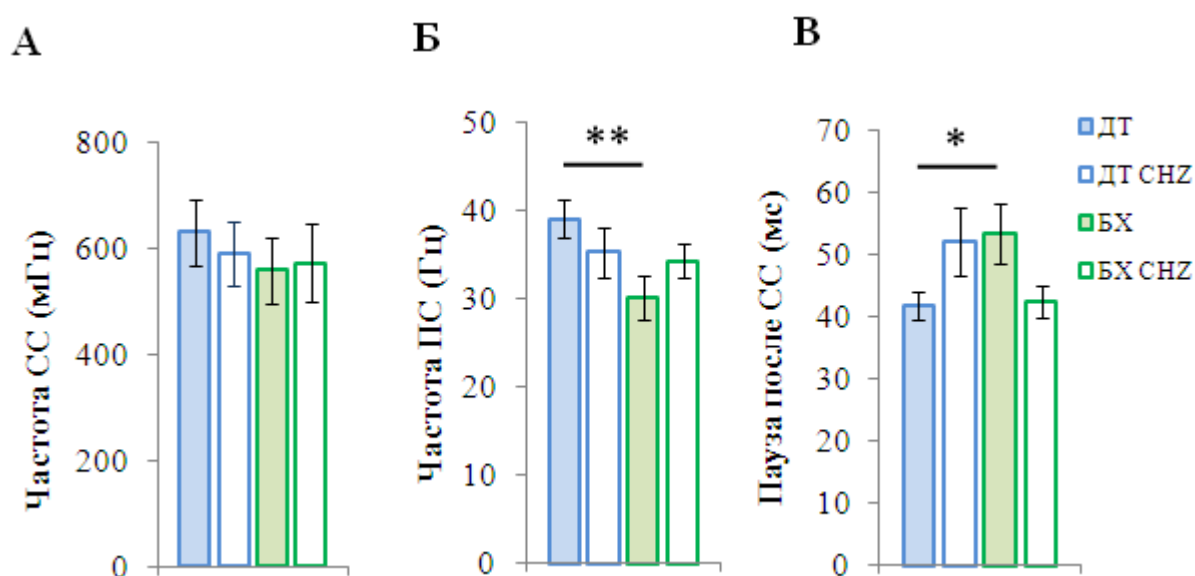


Рис. 3.5. Анализ паттерна активности КП мышей ДТ и БХ в возрасте 12 месяцев в контроле и после введения CHZ. (А) Средние частоты генерации СС КП мышей ДТ и БХ в возрасте 12 месяцев в контроле ($n = 51$ и 40 клеток, $m = 7$ и 11 мышей) и после введения CHZ ($n = 51$ и 34 клеток, $m = 8$ и 9 мышей) представлены в виде среднего \pm SEM. (Б) Средние частоты генерации ПС КП мышей ДТ и БХ в возрасте 12 месяцев в контроле ($n = 51$ и 40 клеток, $m = 7$ и 11 мышей) и после введения CHZ ($n = 51$ и 34 клеток, $m = 8$ и 9 мышей) представлены в виде среднего \pm SEM. $**P < 0,01$ (В) Средняя длительность паузы после СС КП мышей ДТ и БХ в возрасте 12 месяцев в контроле ($n = 51$ и 40 клеток, $m = 7$ и 11 мышей) и после введения CHZ ($n = 51$ и 34 клеток, $m = 8$ и

9 мышей) представлена в виде среднего \pm SEM. $*P < 0,05$. Post-hoc тест Бонферрони.

Таким образом, средняя длительность паузы после СС для мышей ДТ составила $41,8 \pm 2,3$ мс ($n = 51$, $m = 7$), для мышей ДТ CHZ была равна $52,2 \pm 5,4$ мс ($n = 51$, $m = 8$, $P = 0,05$), для мышей БХ составила $53,3 \pm 4,9$ мс ($n = 40$, $m = 11$, $* P < 0,05$), а у мышей БХ CHZ была $42,5 \pm 2,6$ мс ($n = 34$ клеток, $m = 9$ мышей, $P = 0,07$; рис. 3.5B).

Мы также оценили влияние долгосрочных инъекций CHZ на форму СС в тех же экспериментальных группах (рис. 3.6). Было обнаружено, что введение CHZ привело к восстановлению средней продолжительности СС у 12-месячных мышей БХ (рис. 3.6A). Таким образом, средняя продолжительность СС для мышей ДТ составила 4652 ± 254 мкс ($n = 51$, $m = 7$), для мышей ДТ CHZ была 4776 ± 246 мкс ($n = 51$, $m = 8$, $P = 0,88$), для мышей БХ была равна 3854 ± 229 мкс ($n = 40$, $m = 11$, $* P < 0,05$), а для мышей БХ CHZ была равна 4643 ± 313 мкс ($n = 34$, $m = 9$, $P = 0,18$; рис. 3.6A). Интересно, что, несмотря на то, что частота спайклетов у контрольных групп ДТ и БХ была одинаковой, инъекции CHZ привели к значительному снижению частоты спайклетов у КП мышей БХ (рис. 3.6B). Таким образом, средняя частота спайклетов для мышей ДТ была 551 ± 15 Гц ($n = 51$, $m = 7$), для мышей ДТ CHZ была 488 ± 26 Гц ($n = 51$, $m = 8$, $P = 0,10$), для мышей БХ составила 536 ± 16 Гц ($n = 40$, $m = 11$, $P = 0,51$), а для мышей БХ CHZ была 390 ± 14 Гц ($n = 34$, $m = 9$, $****P < 0,0001$; рис. 3.6B). Кроме того, количество спайклетов было значительно меньше у КП контрольных мышей БХ по сравнению с КП контрольных мышей ДТ, и инъекции CHZ не повлияли на этот параметр (рис. 3.6B). Таким образом, среднее количество спайклетов для мышей ДТ составляло $3,27 \pm 0,14$ штук ($n = 51$, $m = 7$), для мышей ДТ CHZ было $2,91 \pm 0,09$ штук ($n = 51$, $m = 8$, $P = 0,93$), для мышей БХ было $2,83 \pm 0,11$ штук ($n = 40$, $m = 11$, $* P < 0,05$), а у мышей БХ CHZ было равно $2,68 \pm 0,11$ штук ($n = 34$, $m = 9$, $** P < 0,01$; рис. 3.6B).

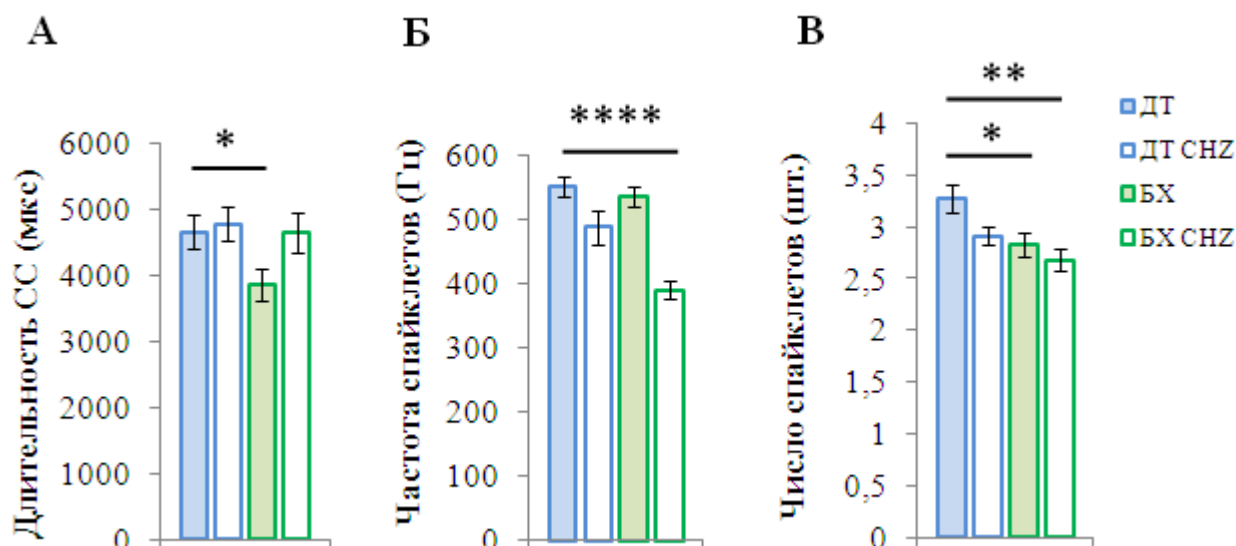


Рис. 3.6. Анализ характеристик формы СС у КП БХ и ДТ мышей в возрасте 12 месяцев в контроле и после введения CHZ. (А) Средняя длительность СС КП ДТ и БХ мышей в возрасте 12 месяцев в контроле ($n = 51$ и 40 клеток, $m = 7$ и 11 мышей) и после введения CHZ ($n = 51$ и 34 клеток, $m = 8$ и 9 мышей) представлены в виде среднего \pm SEM. $*P < 0,05$. (Б) Средние частоты спайклетов у мышей ДТ и БХ в возрасте 12 месяцев в контроле ($n = 51$ и 40 клеток, $m = 7$ и 11 мышей) и после введения CHZ ($n = 51$ и 34 клеток, $m = 8$ и 9 мышей) представлены в виде среднего \pm SEM. $****P < 0,0001$. (В) Среднее число спайклетов мышей ДТ и БХ в возрасте 12 месяцев в контроле ($n = 51$ и 40 клеток, $m = 7$ и 11 мышей) и после введения CHZ ($n = 51$ и 34 клеток, $m = 8$ и 9 мышей) представлены в виде среднего \pm SEM. $*P < 0,05$, $**P < 0,01$. Post-hoc тест Бонферрони.

Затем мы определили среднее КВ МИИ для КП во всех исследуемых группах мышей. Таким образом, средний КВ МИИ для мышей ДТ составлял $0,37 \pm 0,03$ ($n = 51$ клеток, $m = 7$ мышей), для ДТ CHZ мышей он составлял $0,38 \pm 0,02$ ($n = 51$ клеток, $m = 8$ мышей, $P = 0,15$), для мышей БХ – $0,47 \pm 0,04$ ($n = 40$ клеток, $m = 11$ мышей, $*P < 0,05$) и для мышей БХ CHZ он составлял $0,38 \pm 0,03$ ($n = 34$ клеток, $m = 9$ мышей, $P = 0,76$; рис. 3.7).

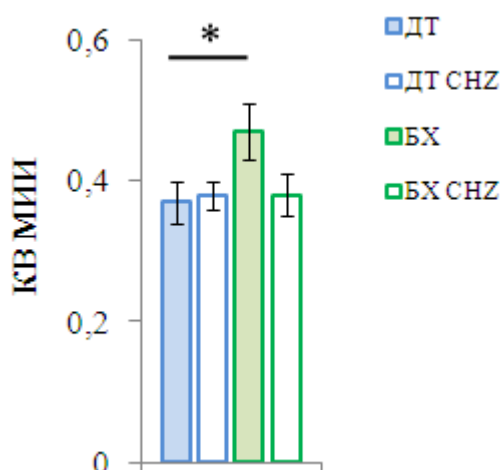


Рис. 3.7. Средние значения коэффициента вариации межимпульсного интервала КП мышей ДТ и БХ в возрасте 12 месяцев в контроле и после введения CHZ. * $P < 0,05$. Post-hoc тест Бонферрони.

Таким образом, полученные записи *in vivo* позволяют предположить, что КП мозжечка менее часто и менее регулярно генерируют активность у мышей БХ, по сравнению с мышами ДТ, при этом систематические инъекции CHZ привели к восстановлению нормальной генерации активности сигналов КП у мышей БХ CHZ.

3.3. Анализ спонтанной активности КП мышей линии SCA2-58Q различных возрастов

Был проведен анализ электрофизиологических свойств КП *in vivo* в случае бодрствующих мышей в условиях отсутствия подавления нейрональной активности анестетическими средствами с помощью установки Mobile HomeCage (Neurotar, Финляндия) над однопометными 6- и 9-месячными мышами ДТ и СЦА2 (рис.3.8).

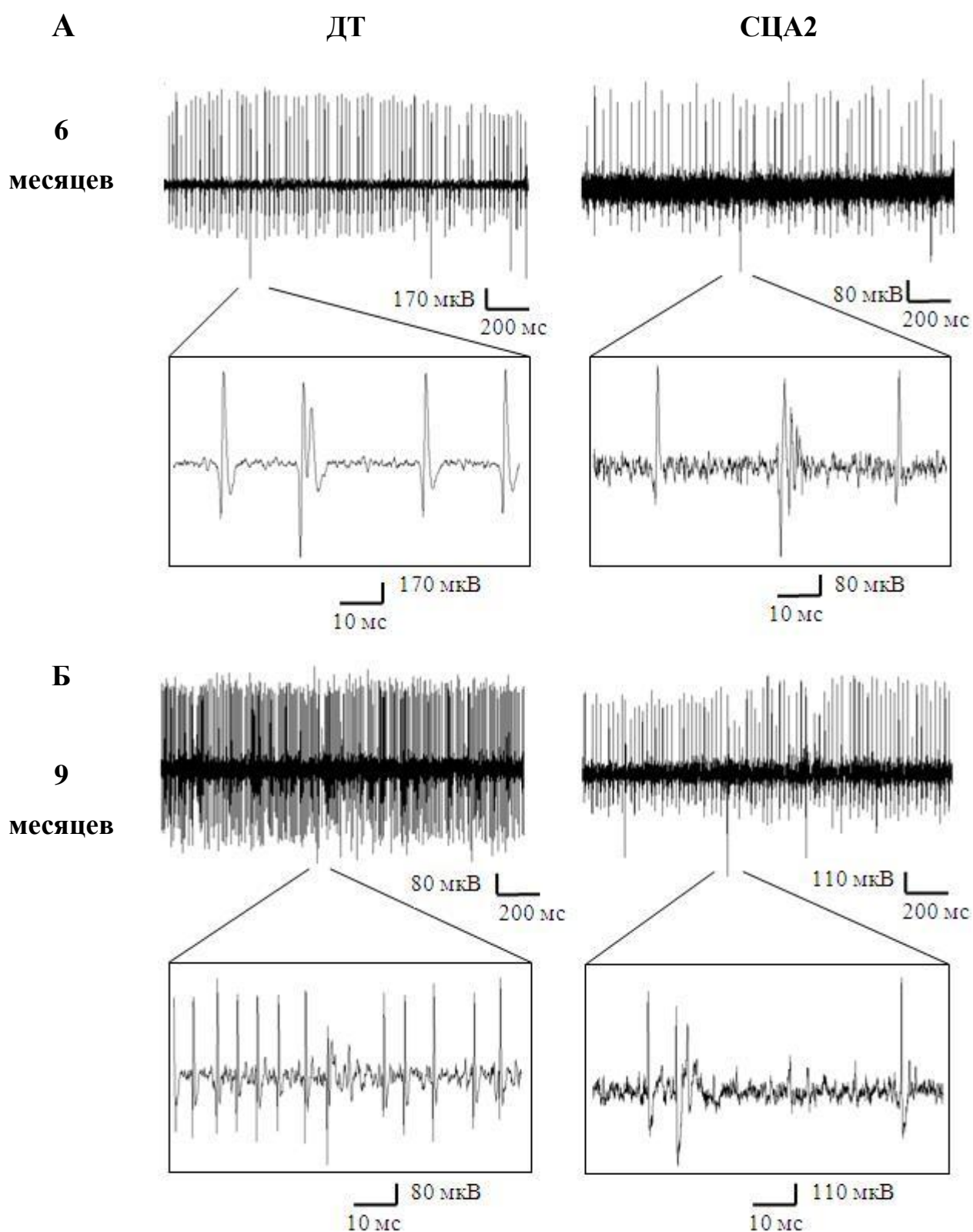


Рис. 3.8. Записи спонтанной активности КП (вверху), ниже приведен увеличенный фрагмент записи *СС in vivo*, генерируемые КП в мышях ДТ и БХ различных возрастов. (А, Б) Примеры активности КП у 6-месячных мышей ДТ и СЦА2 (А) и 9-месячных мышей ДТ и СЦА2.

Данный метод внеклеточной регистрации активности КП *in vivo* не был ранее использован на мышинных моделях полиглутаминовых заболеваний. Мы обнаружили, что частота спонтанных СС незначительно уменьшается с возрастом у мышей как ДТ, так и СЦА2 (рис.3.9), однако статистически значимых различий между 6- и 9-месячными мышами ДТ и СЦА2 выявлено не было ($P = 0,49$, $P = 0,11$ соответственно, рис. 3.9А). Таким образом, среднее значение частоты СС у 6-месячных мышей ДТ составило 770 ± 153 мГц ($n = 9$, $m = 4$), у 6-месячных мышей СЦА2 было 615 ± 88 мГц ($n = 5$, $m = 3$), у 9-месячных мышей ДТ оно составило 519 ± 111 мГц ($n = 12$, $m = 3$), а для 9-месячных мышей СЦА2 было 306 ± 76 мГц ($n = 9$, $m = 2$; рис. 3.9А). Мы обнаружили значительное снижение частот ПС КП у мышей СЦА2 в возрасте 6 и 9 месяцев по сравнению с мышами ДТ тех же возрастов ($**P < 0,01$, $*P < 0,05$ соответственно, рис. 3.9Б). Таким образом, среднее значение частот ПС для 6-месячных мышей ДТ составило $38,6 \pm 2,7$ Гц ($n = 9$, $m = 4$), для 6-месячных мышей СЦА2 оно было равно $27,1 \pm 1,4$ Гц ($n = 5$, $m = 3$), для 9-месячных мышей ДТ оно составило $51,9 \pm 9,7$ Гц ($n = 12$, $m = 3$), для 9-месячных мышей СЦА2 оно было равно $27,7 \pm 4,0$ Гц ($n = 9$, $m = 2$, рис. 3.9Б). Не было обнаружено статистически значимых различий в длительности паузы после СС у 6- и 9-месячных мышей ДТ и СЦА2 ($P = 0,37$, $P = 0,29$, рис. 3.9В). Таким образом, среднее значение паузы после СС у 6-месячных мышей составило $27,9 \pm 2,4$ мс ($n = 9$, $m = 4$), для 6-месячных мышей СЦА2 оно было равно $32,8 \pm 5,8$ мс ($n = 5$, $m = 3$), для 9-месячных мышей ДТ оно составило $33,9 \pm 8,3$ мс ($n = 12$, $m = 3$), для 9-месячных мышей СЦА2 оно было равно $50,5 \pm 13,8$ Гц ($n = 9$, $m = 2$, рис. 3.9В).

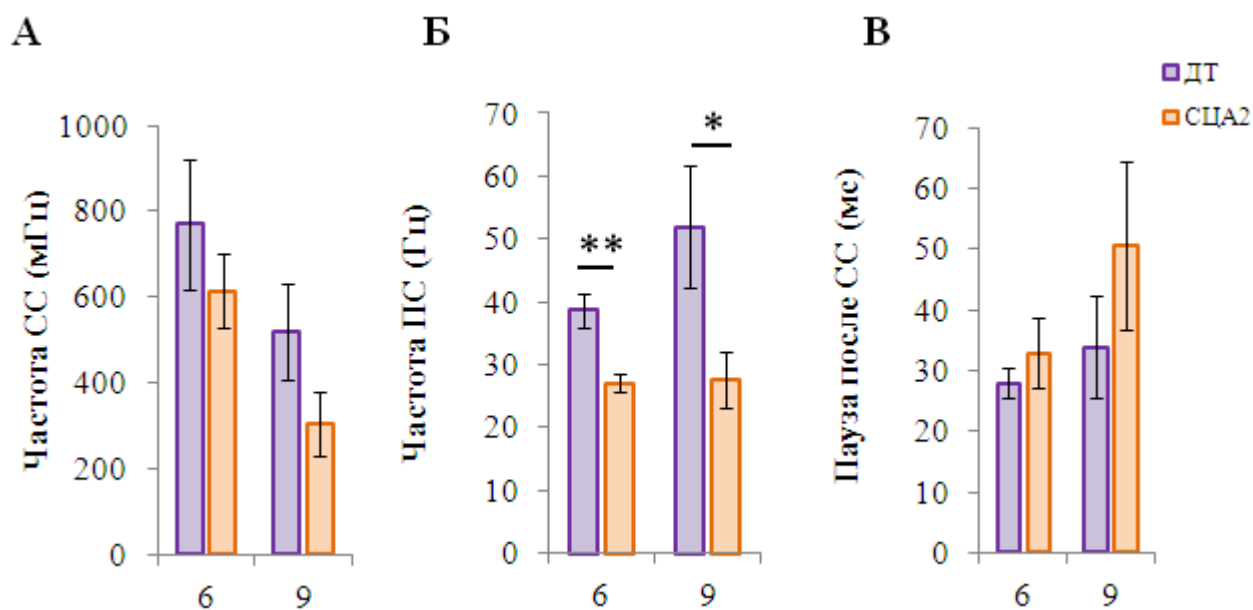


Рис. 3.9. Анализ паттерна активности КП мышей ДТ и СЦА2 различных возрастов. (А) Средние частоты генерации СС КП у 6- и 9-месячных мышей ДТ ($n = 9$ и 12 клеток, $m = 4$ и 3 мыши) и СЦА2 ($n = 5$ и 9 клеток, $m = 3$ и 2 мыши) представлены в виде среднего \pm SEM. (Б) Средние частоты генерации ПС КП у 6- и 9-месячных мышей ДТ ($n = 9$ и 12 клеток, $m = 4$ и 3 мыши) и СЦА2 ($n = 5$ и 9 клеток, $m = 3$ и 2 мыши) представлены в виде среднего \pm SEM. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$. (В) Средняя длительность паузы после СС КП у 6- и 9-месячных мышей ДТ ($n = 9$ и 12 клеток, $m = 4$ и 3 мыши) и СЦА2 ($n = 5$ и 9 клеток, $m = 3$ и 2 мыши) представлена в виде среднего \pm SEM. Post-hoc тест Бонферрони.

Анализируя длительность СС и частоту спайклетов у 6-месячных мышей ДТ и СЦА2, мы не обнаружили статистически значимых различий ($P = 0,16$, $P = 0,62$ соответственно, рис. 3.10А, Б), однако у 9-месячных мышей эти параметры значительно различались у мышей ДТ и СЦА2 (* $P < 0,05$, рис. 3.10А, Б). Таким образом, средняя длительность СС у 6-месячных мышей составила 3218 ± 170 мкс ($n = 9$, $m = 4$), для 6-месячных мышей СЦА2 она была равна 3776 ± 399 мкс ($n = 5$, $m = 3$), для 9-месячных мышей ДТ она составила 2745 ± 150 мкс ($n = 12$, $m = 3$), для 9-месячных мышей СЦА2 она была равна 3488 ± 286 мкс ($n = 9$, $m = 2$, рис. 3.10А). Средняя частота спайклетов у 6-

месячных мышей ДТ составила 562 ± 41 Гц ($n = 9$, $m = 4$), для 6-месячных мышей СЦА2 она была равна 522 ± 77 Гц ($n = 5$, $m = 3$), для 9-месячных мышей ДТ она составила 617 ± 40 Гц ($n = 12$, $m = 3$), для 9-месячных мышей СЦА2 она была равна 424 ± 62 Гц ($n = 9$, $m = 2$, рис. 3.10Б).

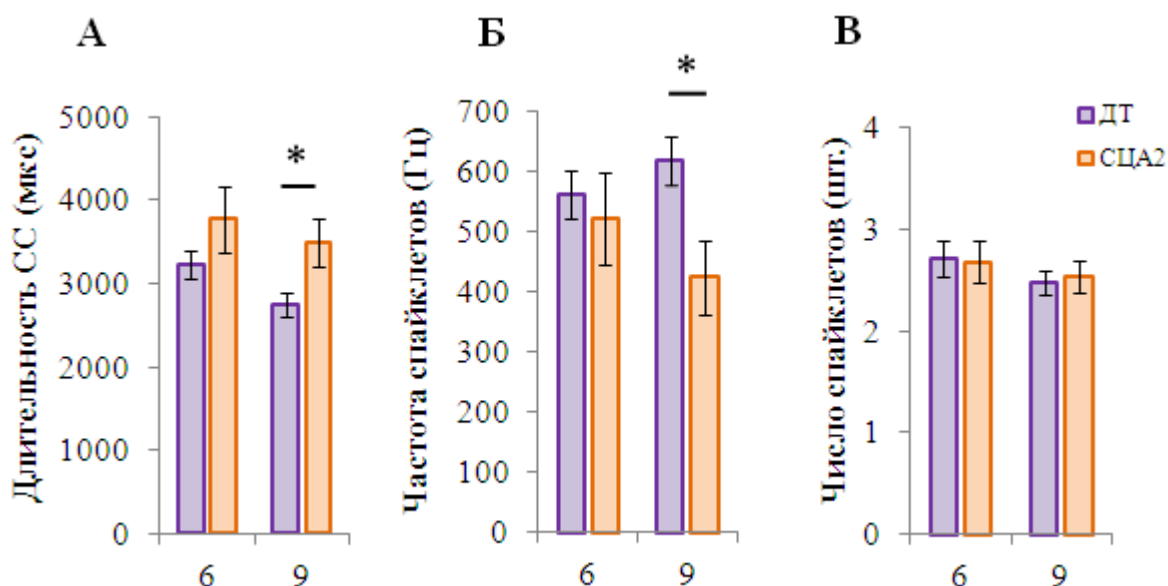


Рис. 3.10. Анализ формы СС КП 6- и 9-месячных мышей ДТ и СЦА2. (А) Средняя длительность СС КП у 6- и 9-месячных мышей ДТ ($n = 9$ и 12 клеток, $m = 4$ и 3 мыши) и СЦА2 ($n = 5$ и 9 клеток, $m = 3$ и 2 мыши) представлена в виде среднего \pm SEM. $*P < 0,05$. (Б) Средняя частота спайклетов КП у 6- и 9-месячных мышей ДТ ($n = 9$ и 12 клеток, $m = 4$ и 3 мыши) и СЦА2 ($n = 5$ и 9 клеток, $m = 3$ и 2 мыши) представлена в виде среднего \pm SEM. $*P < 0,05$. (В) Среднее число спайклетов КП у 6- и 9-месячных мышей ДТ ($n = 9$ и 12 клеток, $m = 4$ и 3 мыши) и СЦА2 ($n = 5$ и 9 клеток, $m = 3$ и 2 мыши) представлено в виде среднего \pm SEM. Post-hoc тест Бонферрони.

Мы не обнаружили статистически значимых различий в числе спайклетов в составе СС у исследуемых групп ($P = 0,90$, $P = 0,83$, рис. 3.10В). Таким образом, среднее число спайклетов у 6-месячных мышей ДТ составило $2,72 \pm 0,18$ штук ($n = 9$, $m = 4$), для 6-месячных мышей СЦА2 оно было равно $2,68 \pm$

0,21 штук ($n = 5$, $m = 3$), для 9-месячных мышей ДТ оно составило $2,48 \pm 0,12$ штук ($n = 12$, $m = 3$), для 9-месячных мышей СЦА2 оно было равно $2,53 \pm 0,16$ штук ($n = 9$, $m = 2$, рис.3.10B).

Затем мы определили среднее КВ МИИ для КП во всех исследуемых группах мышей. Мы не обнаружили статистически значимых различий в значениях КВ МИИ для мышей ДТ и СЦА2 мышей в возрасте 6 и 9 месяцев ($P = 0,63$, $P = 0,36$ соответственно, рис. 3.11).

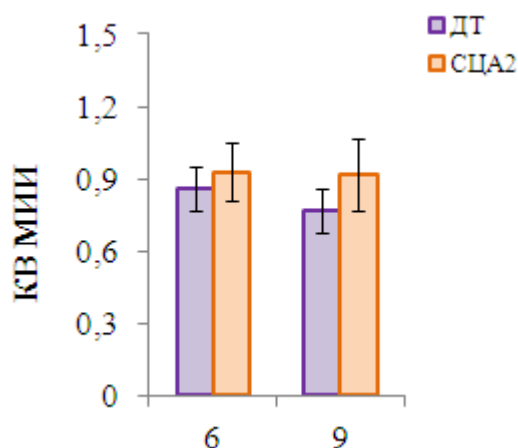


Рис. 3.11. Значения коэффициента вариации межимпульсного интервала КП мышей ДТ и СЦА2 в возрасте 6 и 9 месяцев. Post-hoc тест Бонферрони.

3.4. Влияние CHZ на свойства КП мышей линии SCA2-58Q

В предыдущих исследованиях нашей лаборатории было выявлено, что восстановление регулярности импульсной активности КП мышей-моделей СЦА2 линии SCA2-58Q наблюдается при фармакологической активации работы SK каналов положительным модулятором CHZ [67]. В следующей серии экспериментов были изучены следующие экспериментальные группы: мыши ДТ в контрольной группе, которым вводили контрольный раствор (ДТ), мыши ДТ, которым вводили CHZ (ДТ CHZ), мыши СЦА2 в контрольной группе (СЦА2) и мыши СЦА2, которым вводили CHZ (СЦА2 CHZ) (рис. 3.12). Все мыши были в возрасте 12 месяцев.

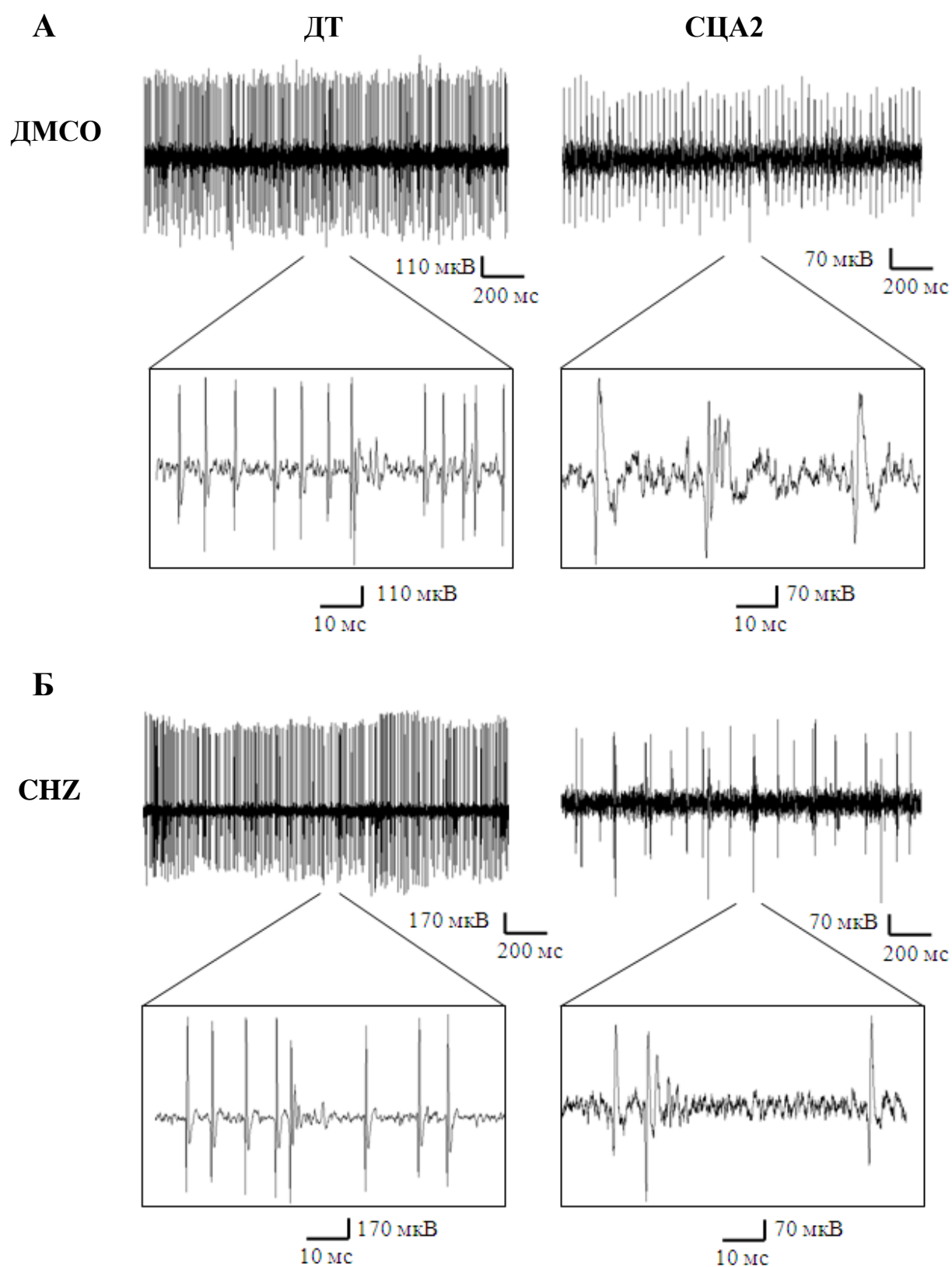


Рис. 3.12. Записи спонтанной активности КП (вверху), ниже приведен увеличенный фрагмент записи СС *in vivo*, генерируемые КП в мышцах ДТ и СЦА2 в возрасте 12 месяцев в контроле (А) и после введения СНЗ (Б).

Подобно 6- и 9-месячным экспериментальным группам, мы не обнаружили статистически значимых различий в частоте СС между исследуемыми группами (рис. 3.13А). Таким образом, средняя частота СС для мышей ДТ составила 369 ± 88 мГц ($n = 5$, $m = 2$), для мышей ДТ CHZ была 478 ± 111 мГц ($n = 13$, $m = 2$, $P = 0,57$), для мышей СЦА2 была равна 560 ± 244 мГц ($n = 6$, $m = 3$, $P = 0,51$), а для мышей СЦА2 CHZ была равна 600 ± 180 мГц ($n = 5$, $m = 2$, $P = 0,28$; рис. 3.13А).

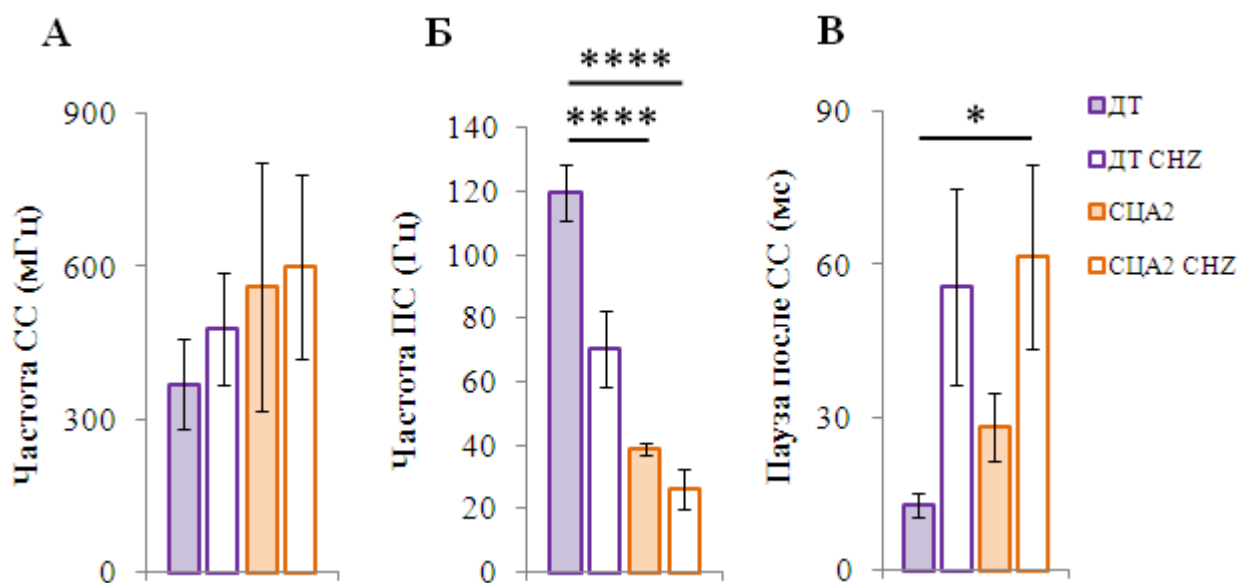


Рис. 3.13. Анализ паттерна активности КП мышей ДТ и СЦА2 в возрасте 12 месяцев в контроле и после введения CHZ. (А) Средние частоты генерации СС КП мышей ДТ и СЦА2 в возрасте 12 месяцев в контроле ($n = 5$ и 6 клеток, $m = 2$ и 3 мыши) и после введения CHZ ($n = 13$ и 5 клеток, $m = 2$ и 2 мыши) представлены в виде среднего \pm SEM. (Б) Средние частоты генерации ПС КП мышей ДТ и СЦА2 в возрасте 12 месяцев в контроле ($n = 5$ и 6 клеток, $m = 2$ и 3 мыши) и после введения CHZ ($n = 13$ и 5 клеток, $m = 2$ и 2 мыши) представлены в виде среднего \pm SEM. **** $P < 0,0001$. (В) Средняя длительность паузы после СС КП мышей ДТ и БХ в возрасте 12 месяцев в контроле ($n = 5$ и 6 клеток, $m = 2$ и 3 мыши) и после введения CHZ ($n = 13$ и 5 клеток, $m = 2$ и 2 мыши) представлена в виде среднего \pm SEM. * $P < 0,05$. Post-hoc тест Бонферрони.

Мы обнаружили, что средняя частота ПС КП значительно уменьшается у мышей СЦА2 по сравнению с мышами ДТ ($****P < 0,0001$, рис. 3.13Б), при этом после в/б инъекций СНЗ среднее значение частоты ПС КП у мышей СЦА2 СНЗ не изменилось. Таким образом, средняя частота ПС для мышей ДТ составила $119,5 \pm 8,7$ Гц ($n = 5, m = 2$), для мышей ДТ СНЗ была $70,4 \pm 12,1$ Гц ($n = 13, m = 2, P = 0,05$), для мышей СЦА2 была равна $39,1 \pm 1,9$ Гц ($n = 6, m = 3, **** P < 0,0001$), а для мышей СЦА2 СНЗ была равна $26,4 \pm 6,4$ Гц ($n = 5, m = 2, **** P < 0,0001$). Кроме того, было обнаружено, что в/б инъекции СНЗ приводили к увеличению длительности паузы после СС у КП мышей СЦА2 по сравнению с мышами ДТ ($* P < 0,05$, рис. 3.13В). Таким образом, средняя длительность паузы после СС для мышей ДТ составила $12,7 \pm 2,3$ мс ($n = 5, m = 2$), для мышей ДТ СНЗ была $55,6 \pm 19,2$ мс ($n = 13, m = 2, P = 0,19$), для мышей СЦА2 была равна $28,0 \pm 6,7$ мс ($n = 6, m = 3, P = 0,08$), а для мышей СЦА2 СНЗ была равна $61,5 \pm 18,2$ мс ($n = 5, m = 2, * P < 0,05$; рис. 3.13В).

Мы также оценили влияние долгосрочных инъекций СНЗ на форму СС в тех же экспериментальных группах. Анализируя форму СС у 12-месячных мышей ДТ и СЦА2 в контроле и после в/б введения СНЗ, были обнаружены статистически значимые различия в длительности СС у СЦА2 мышей, которым вкалывали СНЗ ($* P < 0,05$, рис. 3.14А). Увеличение длительности СС наблюдалось также относительно мышей ДТ, однако в этом случае различия не достигали статистической значимости (рис. 3.14А). Таким образом, средняя длительность СС КП мышей ДТ составила 2415 ± 374 мкс ($n = 5, m = 2$), для мышей ДТ СНЗ была 3724 ± 716 мкс ($n = 13, m = 2, P = 0,29$), для мышей СЦА2 была равна 3013 ± 525 мкс ($n = 6, m = 3, P = 0,40$), а для мышей СЦА2 СНЗ была равна 4331 ± 512 мкс ($n = 5, m = 2, * P < 0,05$; рис. 3.14А). Мы обнаружили статистически значимое снижение средней частоты спайклетов у мышей ДТ и СЦА2, которым вкалывали СНЗ ($****P < 0,0001, *** P < 0,001$ соответственно, рис. 3.14Б). Средняя частота спайклетов для мышей ДТ составила 1091 ± 98 Гц ($n = 5, m = 2$), для мышей ДТ СНЗ была 510 ± 50 Гц ($n = 13, m = 2, ****P < 0,0001$), для мышей СЦА2 была равна 798 ± 105 Гц ($n = 6, m = 3, P = 0,07$), а для

мышей СЦА2 CHZ была равна 396 ± 64 Гц ($n = 5$, $m = 2$, $*** P < 0,001$; рис. 3.14Б). Мы не обнаружили статистически значимых различий в числе спайклетов между исследуемыми группами (рис. 3.14В). Таким образом, среднее число спайклетов для мышей ДТ составило $3,17 \pm 0,17$ штук ($n = 5$, $m = 2$), для мышей ДТ CHZ это значение было равно $2,62 \pm 0,30$ штук ($n = 13$, $m = 2$, $P = 0,31$), для мышей СЦА2 составило $3,02 \pm 0,21$ штук ($n = 6$, $m = 3$, $P = 0,58$), а для мышей СЦА2 CHZ – $2,62 \pm 0,31$ штук ($n = 5$, $m = 2$, $P = 0,19$; рис. 3.14В).

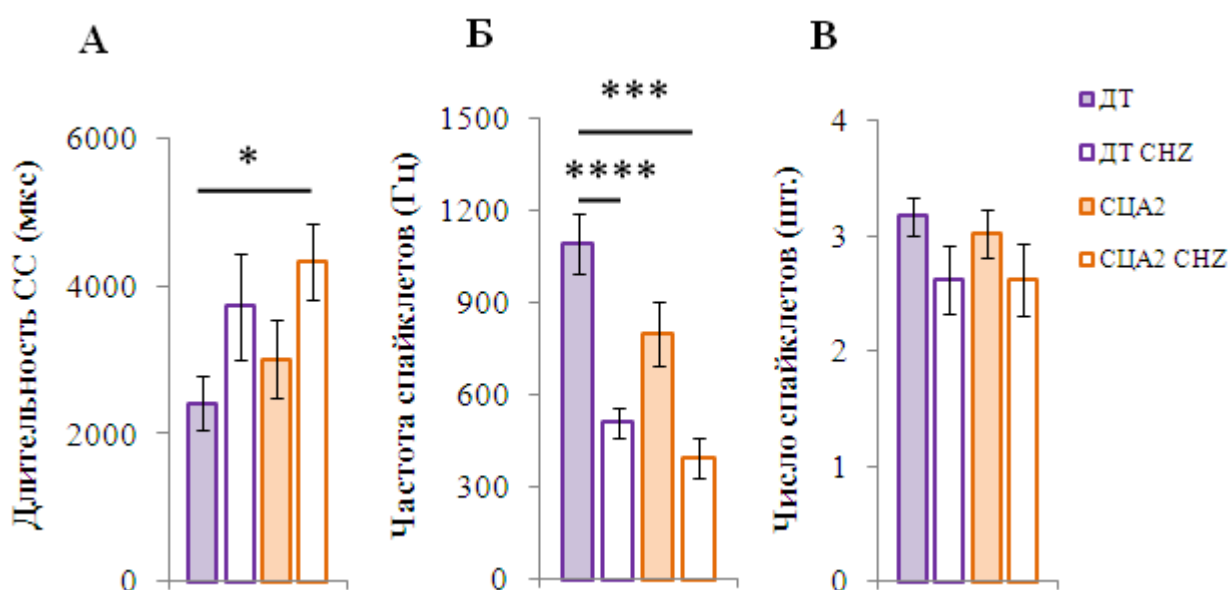


Рис. 3.14. Анализ характеристик формы СС у КП СЦА2 и ДТ мышей в возрасте 12 месяцев в контроле и после введения CHZ. (А) Средняя длительность СС КП ДТ и СЦА2 мышей в возрасте 12 месяцев в контроле ($n = 5$ и 6 клеток, $m = 2$ и 3 мыши) и после введения CHZ ($n = 13$ и 5 клеток, $m = 2$ и 2 мыши) представлены в виде среднего \pm SEM. $*P < 0,05$ (Б) Средние частоты спайклетов у мышей ДТ и СЦА2 в возрасте 12 месяцев в контроле ($n = 5$ и 6 клеток, $m = 2$ и 3 мыши) и после введения CHZ ($n = 13$ и 5 клеток, $m = 2$ и 2 мыши) представлены в виде среднего \pm SEM. $***P < 0,001$ (В) Среднее число спайклетов мышей ДТ и БХ в возрасте 12 месяцев в контроле ($n = 5$ и 6 клеток, $m = 2$ и 3 мыши) и после

введения CHZ ($n = 13$ и 5 клеток, $m = 2$ и 2 мыши) представлены в виде среднего \pm SEM. Post-hoc тест Бонферрони.

Затем мы определили средний КВ МИИ для КП во всех исследуемых группах мышей. Таким образом, средний КВ МИИ для мышей ДТ составлял $0,78 \pm 0,08$ ($n = 5$, $m = 2$), для ДТ CHZ мышей он составлял $0,87 \pm 0,12$ ($n = 13$, $m = 2$, $P = 0,65$), для мышей СЦА2 – $1,37 \pm 0,15$ ($n = 6$, $m = 3$, $** P < 0,01$) и для мышей СЦА2 CHZ он составлял $0,89 \pm 0,09$ ($n = 5$, $m = 2$, $P = 0,39$; рис. 3.15).

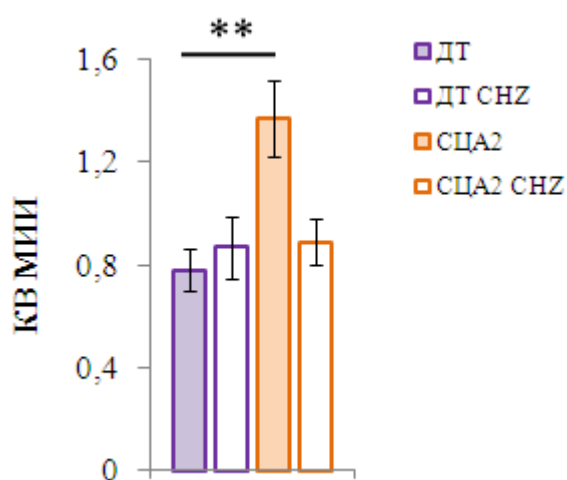


Рис. 3.15. Средние значения коэффициента вариации межимпульсного интервала КП мышей ДТ и СЦА2 в возрасте 12 месяцев в контроле и после введения CHZ. $**P < 0,01$. Post-hoc тест Бонферрони.

В итоге, в результате в/б инъекций CHZ не наблюдалось изменений в частоте СС и ПС КП бодрствующих мышей СЦА2, однако администрация CHZ приводила к значительному увеличению длительности паузы ПС после генерации СС КП мышей СЦА2 по сравнению с мышами ДТ. Фармакологическая активация SK каналов CHZ не повлияла на характеристики формы СС, при этом наблюдалось восстановление регулярности активности КП бодрствующих мышей СЦА2 до значений соответствующего параметра КП мышей ДТ.

Заключение

В настоящей работе впервые было проведено исследование электрофизиологических функций КП коры интактного мозжечка мышей-моделей БХ трансгенной линии YAC128 различных возрастов методом внеклеточной регистрации электрофизиологической активности КП *in vivo*. Был проанализирован паттерн активности КП БХ мышей и мышей ДТ в возрасте 6 и 9 месяцев, а также выявлено влияние активатора SK каналов хлорзоксазона на характеристики КП БХ и ДТ мышей в возрасте 12 месяцев. Необходимо отметить, что регистрация *in vivo* активности КП до и после систематических внутривентрикулярных инъекций CHZ до этого никогда не проводилась на мышах-моделях БХ.

Согласно предыдущим исследованиям на срезах мозжечка мышей ДТ и БХ линий HdhQ200 и R6/2 [58, 59], мы наблюдали значительное снижение частоты ПС КП мышей БХ начиная с возраста 9 месяцев (рис. 3.2Б, 3.5Б). Похожее снижение частоты ПС было ранее обнаружено на срезах мозжечка мышинных моделей СЦА2 в трансгенных мышах линии SCA2-58Q [110, 111] и линии SCA2-127Q [90].

Затем мы обнаружили увеличение КВ МИИ у КП мышей БХ начиная с 9 месяцев (рис. 3.3, 3.7) по сравнению с КП мышей ДТ того же возраста. Интересно отметить, что возраст начала проявления электрофизиологических отклонений у КП мышей БХ в возрасте 9 месяцев (рис. 3.2) совпадает с возрастом начала проявления поведенческих симптомов у мышей БХ в предыдущих исследованиях [39, 66]. Результаты, полученные в данной работе (рис. 3.3, 3.7) и в предыдущих исследованиях на мышинных моделях [52, 67, 109, 199] подтвердили гипотезу, что потеря точной генерации сигналов КП является следствием дисфункции КП и напрямую связана с атаксическими симптомами. Этот вывод коррелирует с установленной важностью правильной генерации сигналов КП для поддержания функционирования мозжечка [239].

Метод записи *in vivo*, использованный в этом исследовании, позволил нам проанализировать не только частоты генерации ПС у КП, но и менее изученную генерацию СС. Мы не наблюдали различий в частоте СС между мышами БХ и ДТ в любом протестированном возрасте (рис. 3.2А, 3.5А). Тем не менее, мы обнаружили, что депрессия ПС после генерации СС была значительно выше у мышей БХ, начиная с 9-месячного возраста, по сравнению с мышами ДТ того же возраста (рис. 3.2В, 3.5В), что указывает на наиболее вероятную задержку передачи сигнала синапса ПВ-КП у стареющих мышей БХ. Подобное снижение синаптической передачи между ПВ и КП было ранее обнаружено на мышинной модели СЦА1 в возрасте 40 недель [21].

Анализ характеристик СС КП мышей ДТ и БХ в возрасте 6 и 9 месяцев не выявил значимых различий (рис.3.2Г-Е). Тем не менее, мы наблюдали более короткую продолжительность СС (рис. 3.6А) и уменьшенное число спайклетов (рис. 3.6В) у 12-месячных мышей БХ по сравнению с мышами ДТ того же возраста. Кроме того, мы также обнаружили, что КВ МИИ КП 6-месячных мышей БХ имел такое же значение, как и КП мышей ДТ того же возраста, однако данный параметр был значительно выше у 9-месячных мышей БХ по сравнению с мышами ДТ того же возраста (рис. 3.3).

Пейсмейкерная активность КП регулируется SK каналами [247]. Известно, что повышенная концентрация внутриклеточного кальция замедляет пейсмейкерную активность КП через SK каналы [144]. В нашем исследовании были выполнены продолжительные внутрибрюшинные инъекции CHZ для проверки того, может ли положительная модуляция кальций-активированных калиевых каналов оказывать положительный эффект на нарушенную электрофизиологическую активность КП при БХ. Не было обнаружено различий в частоте СС после инъекций CHZ между исследуемыми группами (рис. 3.5А). Мы выяснили, что в результате инъекций CHZ восстанавливалась частота ПС у мышей БХ в возрасте 12 месяцев до значения соответствующего параметра у мышей ДТ того же возраста (рис. 3.5В). В результате инъекций положительного модулятора SK каналов наблюдалось восстановление среднего

значения длительности паузы после генерации СС у мышей БХ, что может указывать на улучшение синаптической передачи в синапсе ПВ-КП (рис. 3.5В). Мы также обнаружили, что администрация CHZ восстанавливает длительность СС у мышей БХ до значения соответствующего параметра у мышей ДТ (рис. 3.6А), а также вызывает изменения в частоте спайклетов (рис. 3.6Б), при этом не было обнаружено никакого влияния на количество спайклетов ни в одной исследуемой группе после инъекций CHZ (рис. 3.6В). Исследования в нашей лаборатории показали, что инъекции CHZ приводили к улучшению морфологии КП, а также было выявлено значительное улучшение двигательной активности мышей БХ после длительных инъекций CHZ, тогда как лечение этим положительным модулятором SK каналов не оказывало влияния на двигательную активность мышей ДТ [66]. Наблюдаемое восстановление частоты ПС и длительности паузы после генерации СС КП БХ мышей после систематического введения CHZ до значений соответствующих параметров ДТ мышей может быть объяснено восстановлением электрофизиологических функций КП и улучшением синаптической активации КП ПВ, нарушенной при БХ. Администрация CHZ, скорее всего, не влияет на функционирование НО, источника ЛВ, что может объяснить наблюдаемое отсутствие изменений частоты и количества спайклетов у мышей БХ (рис. 3.6Б, В).

Таким образом, можно сделать вывод, что использование CHZ может иметь потенциальный терапевтический эффект при лечении атаксических симптомов при БХ, а также что SK каналы выступают в качестве возможной мишени для лечения БХ.

Помимо исследований на мышцах-моделях БХ различных возрастов были проанализированы электрофизиологические функции КП коры интактного мозжечка мышей-моделей СЦА2 трансгенной линии SCA2-58Q различных возрастов методом внеклеточной регистрации электрофизиологической активности КП *in vivo* на бодрствующих животных с использованием установки Mobile HomeCage (Neurotar, Финляндия). Был проанализирован паттерн активности КП СЦА2 мышей и мышей ДТ в возрасте 6 и 9 месяцев, а также

выявлено влияние активатора SK каналов хлорзоксазона на характеристики активности КП СЦА2 и ДТ мышей в возрасте 12 месяцев. Необходимо отметить, что исследований активности КП на бодрствующих животных с помощью внеклеточных регистраций *in vivo* в условиях патологии НДЗ полиглутаминового тракта на настоящий момент в мировой практике проведено не было. В наших экспериментах была выявлена тенденция к понижению с возрастом частоты СС КП мышей ДТ, в отличие от мышей СЦА2 (рис. 3.9А, 3.13А), при этом не было обнаружено различий между группами мышей ДТ и СЦА2 различных возрастов. В случае КП ДТ мышей с возрастом наблюдалась тенденция к увеличению частоты генерации ПС, тогда как в случае КП СЦА2 мышей ПС генерировались примерно с той же частотой во всех возрастах (рис. 3.9Б, 3.13Б). Было обнаружено, что КП СЦА2 мышей генерировали ПС значительно реже по сравнению с КП ДТ мышей во всех рассмотренных возрастах (рис. 3.9Б, 3.13Б).

В дальнейших экспериментах были выполнены внутрибрюшинные инъекции CHZ мышам ДТ и СЦА2 с возраста 2 месяцев до 11 месяцев, чтобы проверить, оказывает ли положительная модуляция SK каналов положительный эффект на нарушенную электрофизиологическую активность КП при СЦА. Было выяснено, что курс инъекций CHZ не повлиял на генерацию СС и ПС (рис. 3.13А, Б). Интересно отметить, что в результате в/б инъекций CHZ увеличилась длительность паузы ПС после генерации СС (рис. 3.13Б), а также увеличилась длительность СС у мышей СЦА2 (рис. 3.14А). Кроме того, была обнаружена тенденция к увеличению данных параметров у мышей ДТ после проведения курса инъекций CHZ (рис. 3.13Б, 3.14А). Мы обнаружили снижение частоты спайклетов у мышей ДТ и мышей СЦА2 после систематических инъекций CHZ, по сравнению с контрольной группой (рис. 3.14Б). Было выяснено, что инъекции CHZ не повлияли на количество спайклетов в составе СС КП мышей экспериментальных групп (рис. 3.14В). Кроме того, мы также обнаружили, что КП мышей СЦА2 генерируют сигнал менее регулярно по

сравнению с КП ДТ мышей, при этом регулярность активности КП СЦА2 СНЗ мышей восстанавливается после курса инъекций СНЗ (рис. 3.15).

Мы наблюдали различия в паттерне активности КП у мышей СЦА2 по сравнению с мышами ДТ – у них были обнаружены нарушения в частоте ПС. Кроме того, были выявлены различия в таких характеристиках формы СС КП мышей СЦА2, как длительность СС и частота спайклетов. Мы обнаружили, что КП мозжечка менее часто и менее регулярно генерируют активность у мышей СЦА2 по сравнению с мышами ДТ. Продолжительные инъекции СНЗ не повлияли на паттерн активности КП мышей СЦА2 СНЗ, при этом наблюдалось их влияние на форму СС: в случае длительности СС КП ДТ мышей наблюдалась такая же тенденция к ее увеличению, что и в случае КП СЦА2 мышей, однако она не достигла статистической значимости, а в случае частоты спайклетов инъекции СНЗ влияли одинаково на КП ДТ СНЗ мышей и СЦА2 СНЗ мышей. Кроме того, мы обнаружили, что инъекции активатора SK каналов СНЗ у мышей СЦА2 приводят к восстановлению значения регулярности генерации сигналов КП до значения соответствующего параметра у мышей ДТ. В предыдущих экспериментах нашей лаборатории восстановление электрофизиологической активности КП также наблюдалось при в/б инъекции СНЗ во время записи активности КП на анестезированных СЦА2 мышей линии SCA2-58Q [67]. Наблюдаемое действие СНЗ на КП бодрствующих СЦА2 мышей отличается от действия СНЗ на КП анестезированных мышей БХ, что может объясняться как различиями в физиологических основах заболеваний, так и отсутствием анестезии в случае СЦА2 мышей.

Используя метод внеклеточной регистрации, мы проанализировали электрофизиологические функции КП анестезированных мышей БХ и бодрствующих мышей СЦА2 в возрасте 6 и 9 месяцев. Кроме того, в результате систематического введения СНЗ мышам в возрасте от 2 до 11 месяцев наблюдалось восстановление электрофизиологических функций КП и улучшение синаптической активации КП ПВ в случае мышей БХ и восстановление регулярности генерации активности сигналов КП в случае

мышей СЦА2 и БХ. Таким образом, активация кальций-активируемых калиевых каналов имеет потенциальный терапевтический эффект для лечения заболеваний полиглутаминового тракта, связанных с атрофией мозжечка.

Список литературы

1. Adachi H., et al. CHIP overexpression reduces mutant androgen receptor protein and ameliorates phenotypes of the spinal and bulbar muscular atrophy transgenic mouse model // *J Neurosci.* — 2007. N. 27. — P. 5115-5126.
2. Adegbuyiro A., et al. Proteins Containing Expanded Polyglutamine Tracts and Neurodegenerative Disease. // *Biochemistry.* — 2018. — 9. N. 56. — P. 1199-1217.
3. Al-Ramahi I., et al. CHIP protects from the neurotoxicity of expanded and wild-type ataxin-1 and promotes their ubiquitination and degradation // *J Biol Chem.* — 2006. — 36. N. 281. — P. 26714-24.
4. Allen D., Fakler B., Maylie J. and Adelman J. P. Organization and regulation of small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel multiprotein complexes // *J Neurosci.* — 2007. — 9. N. 27. — P. 2369-76.
5. Almaguer-Mederos L. E., et al. Estimation of survival in Spinocerebellar Ataxia type 2 Cuban patients // *Clin Genet.* — 2013. — 3. N. 83. — P. 293-4.
6. Alonso E. M.-R. I., De Biase I., Mader C., Ochoa A., Yescas P., et al. Distinct distribution of autosomal dominant spinocerebellar ataxia in the Mexican population // *Mov Disord.* — 2007. — 7. N. 22. — P. 1050-3.
7. Álvarez-Paradelo S., García A., Infante J. and Berciano J. Multimodal neurophysiological study of SCA2 and SCA3 autosomal dominant hereditary spinocerebellar ataxias // *Neurología.* — 2011. — 3. N. 26. — P. 157-165.
8. Alvarez J., et al. The role of Ca^{2+} signaling in aging and neurodegeneration: insights from *Caenorhabditis elegans* models // *Cells.* — 2020. — 204. N. 9.
9. Alvina K. and Khodakhah K. KCa channels as therapeutic targets in episodic ataxia type-2 // *J Neurosci.* — 2010. — 21. N. 30. — P. 7249-57.
10. Alvina K. and Khodakhah K. The therapeutic mode of action of 4-aminopyridine in cerebellar ataxia // *J Neurosci.* — 2010. — 21. N. 30. — P. 7258-68.

11. Amarante T., Takeda S., Teive H. and Zonta M. B. Impact of disease duration on functional status of patients with spinocerebellar ataxia type 2 // *Arq Neuropsiquiatr.* — 2017. — 11. N. 75. — P. 773-777.
12. Antenora A., et al. Predictors of survival in spinocerebellar ataxia type 2 population from Southern Italy // *Neurol Sci.* — 2018. — 11. N. 39. — P. 1857-1860.
13. Arias-Carrión O., et al. Neurogenesis in substantia nigra of parkinsonian brains? // *J Neural Transm Suppl.* — 2009. N. 73. — P. 279-285.
14. Arnold F. J. and Merry D. E. Molecular mechanisms and therapeutics for SBMA/Kennedy's disease // *Neurotherapeutics.* — 2019. — 4. N. 16. — P. 928-947.
15. Asada A., et al. Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates and induces the degradation of ataxin-2 // *Neurosci Lett.* — 2014. N. 563. — P. 112-117.
16. Atwal R. S., et al. Huntingtin has a membrane association signal that can modulate huntingtin aggregation, nuclear entry and toxicity // *Hum Mol Genet.* — 2007. — 21. N. 16. — P. 2600-15.
17. Ayala-Pena S. Role of oxidative DNA damage in mitochondrial dysfunction and Huntington's disease pathogenesis // *Free Radic. Biol. Med.* — 2013. N. 62. — P. 102-10.
18. Babovic-Vuksanovic D. S. K., Patterson M.C., Michels V.V. Spinocerebellar ataxia type 2 (SCA 2) in an infant with extreme CAG repeat expansion // *Am J Med Genet.* — 1998. — 5. N. 79. — P. 383-7.
19. Bahia P. K., et al. A functional role for small-conductance calcium-activated potassium channels in sensory pathways including nociceptive processes // *J Neurosci.* — 2005. N. 25. — P. 3489-3498.
20. Barbeau A. Parental ascent in the juvenile form of Huntington's chorea // *Lancet.* — 1970. — 7679. N. 2. — P. 937.
21. Barnes J. A., et al. Abnormalities in the climbing fiber-Purkinje cell circuitry contribute to neuronal dysfunction in ATXN1[82Q] mice // *J Neurosci.* — 2011. — 36. N. 31. — P. 12778-89.

22. Beecham G. W., et al. Genome-wide association meta-analysis of neuropathologic features of Alzheimer's disease and related dementias // *PLoS Genet.* — 2014. N. 10.
23. Beecham G. W., et al. Genome-wide association study implicates a chromosome 12 risk locus for late-onset Alzheimer disease // *Am J Hum Genet.* — 2009. N. 84. — P. 35-44.
24. Bence N. F., Sampat R. M. and Kopito R. R. Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation // *Science.* — 2001. — 5521. N. 292. — P. 1552-5.
25. Bond C. T., Maylie J. and Adelman J. P. Small-conductance calcium-activated potassium channels // *Ann N Y Acad Sci.* — 1999. N. 868. — P. 370-8.
26. Bonelli R. M., Wenning G. K. and Kapfhammer H. P. Huntington's disease: present treatments and future therapeutic modalities // *Int Clin Psychopharmacol.* — 2004. — 2. N. 19. — P. 51-62.
27. Brenner R. Cloning and functional characterization of novel large conductance calcium-activated potassium channel beta subunits, hKCNMB3 and hKCNMB4 // *J Biol Chem.* — 2000. — 9. N. 275. — P. 6453-6461.
28. Brusco A. G. C., et al. Molecular genetics of hereditary spinocerebellar ataxia: mutation analysis of spinocerebellar ataxia genes and CAG/CTG repeat expansion detection in 225 Italian families // *Arch Neurol.* — 2004. N. 5. — P. 727-33.
29. Bryer A. K. A., Bill P., Davids V., Bryant D., Butler J., et al. The hereditary adult-onset ataxias in South Africa // *J Neurol Sci.* — 2003. N. 216. — P. 47-54.
30. Burk K. A. M., Fetter M., Dichgans J., Skalej M., Laccone F., Didierjean O., Brice A., Klockgether T. Autosomal dominant cerebellar ataxia type I clinical features and MRI in families with SCA1, SCA2 and SCA3 // *Brain.* — 1996. — 5. N. 119. — P. 1497-505.
31. Burroughs A. W. A. K., Xiao J., Houghton C., Tang T., Suh C.Y., et al. . The dynamic relationship between cerebellar Purkinje cell simple spikes and the spikelet number of complex spikes // *The Journal of physiology.* — 2017. — 1. N. 595. — P. 283-99.

32. Bushart D. D., et al. Targeting potassium channels to treat cerebellar ataxia // *Ann Clin Transl Neurol.* — 2018. — 3. N. 5. — P. 297-314.
33. Cabo R., et al. Calcium-activated potassium channel SK1 is widely expressed in the peripheral nervous system and sensory organs of adult zebrafish // *Neurosci Lett.* — 2013. N. 555. — P. 62-7.
34. Cahoy J. D., et al. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function // *J Neurosci.* — 2008. — 1. N. 28. — P. 264-78.
35. Chafekar S. M. and Duennwald M. L. Impaired heat shock response in cells expressing full-length polyglutamine-expanded huntingtin // *PLoS One.* — 2012. — 5. N. 7.
36. Chang D. T., Rintoul G. L., Pandipati S. and Reynolds I. J. Mutant huntingtin aggregates impair mitochondrial movement and trafficking in cortical neurons // *Neurobiol Dis.* — 2006. — 2. N. 22. — P. 388-400.
37. Chen L., et al. SK channel blockade reverses cognitive and motor deficits induced by nigrostriatal dopamine lesions in rats. // *Int J Neuropsychopharmacol.* — 2014. N. 17. — P. 1295-1306.
38. Chen X., et al. Disruption of the olivo-cerebellar circuit by Purkinje neuron-specific ablation of BK channels // *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 2010. — 27. N. 107. — P. 12323-8.
39. Chen X., et al. Dantrolene is neuroprotective in Huntington's disease transgenic mouse model // *Mol Neurodegener.* — 2011. N. 6. — P. 81.
40. Cingolani L. A., et al. Developmental regulation of small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel expression and function in rat Purkinje neurons // *J Neurosci.* — 2002. — 11. N. 22. — P. 4456-67.
41. Clark H. B., et al. 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 // *J Neurosci.* — 1997. — 19. N. 17. — P. 7385-95.

42. Coarelli G., Brice A. and Durr A. Recent advances in understanding dominant spinocerebellar ataxias from clinical and genetic points of view // *F1000Research*. — 2018. N. 7.
43. Contet S., Goulding S. P., Kuljis D. A. and Barth A. L. BK channels in the central nervous system // *Int Rev Neurobiol*. — 2016. N. 128. — P. 281-342.
44. Cornett J., et al. Polyglutamine expansion of huntingtin impairs its nuclear export // *Nat Genet*. — 2005. — 2. N. 37. — P. 198-204.
45. Crossman A. R. Functional anatomy of movement disorder // *Journal of Anatomy*. — 2000. — 4. N. 196. — P. 519-525.
46. Cummings C. J., et al. Chaperone suppression of aggregation and altered subcellular proteasome localization imply protein misfolding in SCA1 // *Nature Genetics*. — 1998. N. 19. — P. 148-154.
47. Danivas V., et al. Off label use of lithium in the treatment of Huntington's disease: A case series // *Indian J Psychiatry*. — 2013. — 1. N. 55. — P. 81-83.
48. Dansithong W., et al. Ataxin-2 Regulates RGS8 Translation in a new BAC-SCA2 Transgenic Mouse Model // *PLoS Genet*. — 2015. — 4. N. 11.
49. David G., et al. Cloning of the SCA7 gene reveals a highly unstable CAG repeat expansion // *Nat Genet*. — 1997. — 1. N. 17. — P. 65-70.
50. Davie J.T. C. B. A., Hausser M. The origin of the complex spike in cerebellar Purkinje cells // *J Neurosci*. — 2008. — 30. N. 28. — P. 7599-609.
51. de Chiara C. and Pastore A. Prediction and Experimental Detection of Structural and Functional Motifs in Intrinsically Unfolded Proteins // *Selected works in bioinformatics*. — 2011. N.
52. Dell'Orco J. M., Wassermann A. H. and Chopra R. Neuronal atrophy early in degenerative ataxia is a compensatory mechanism to regulate membrane excitability // *J Neurosci*. — 2015. — 52. N. 35. — P. 11292-307.
53. Deng P. Y., et al. FMRP regulates neurotransmitter release and synaptic information transmission by modulating action potential duration via BK channels // *Neuron* — 2013. N. 77. — P. 696-711.

54. Diallo A., et al. Survival in patients with spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6 (EUROSCA): a longitudinal cohort study. // *Lancet Neurol.* — 2018. — 4. N. 17. — P. 327-334.
55. Dolga A. M., et al. Subcellular expression and neuroprotective effects of SK channels in human dopaminergic neurons // *Cell Death Dis.* — 2014. N. 5.
56. Dolga A. M., et al. KCa2 channels activation prevents $[Ca^{2+}]_i$ deregulation and reduces neuronal death following glutamate toxicity and cerebral ischemia // *Cell Death Dis.* — 2011. — e147. N. 2.
57. Doo A. R., et al. Neuroprotective effects of the bee venom pharmaceutical acupuncture in acute 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced mouse model of Parkinson's disease // *Neurol. Res.* — 2010. — 1. N. 32. — P. 88-91.
58. Dougherty S. E., et al. Purkinje cell dysfunction and loss in a knock-in mouse model of Huntington disease // *Exp Neurol.* — 2013. N. 240. — P. 96-102.
59. Dougherty S. E., et al. Disruption of Purkinje cell function prior to huntingtin accumulation and cell loss in an animal model of Huntington disease. // *Exp Neurol.* — 2012. — 1. N. 236. — P. 171-8.
60. Douglas J. George Huntington (1850-1916) and Hereditary Chorea // *Journal of the History of the Neurosciences.* — 2010. — 1. N. 9. — P. 76-89.
61. Driver-Dunckley E. and Caviness J. N. Huntington's disease // *Neurology and Clinical Neuroscience.* — 2007. N. 67. — P. 879-885.
62. Durr A. Autosomal cerebellar ataxias: polyglutamine expansions and beyond // *Lancet Neurol.* — 2010. — 9. N. 9. — P. 885-94.
63. Ebner B. A., Ingram M. A. and Barnes J. A. Purkinje cell ataxin-1 modulates climbing fiber synaptic input in developing and adult mouse cerebellum // *J Neurosci.* — 2013. — 13. N. 33. — P. 5806-20.
64. Eftekharzadeh B., et al. Sequence context influences the structure and aggregation behavior of a polyQ tract // *Biophys J.* — 2016. — 11. N. 110. — P. 2361-2366.

65. Egorova P. A., Gavrilova A. V. and Bezprozvanny I. B. In vivo analysis of the climbing fiber – Purkinje cell circuit in SCA2-58Q transgenic mouse model // *Cerebellum*. — 2018. — 5. N. 17. — P. 590-660.
66. Egorova P. A., Gavrilova A. V. and Bezprozvanny I. B. Ataxic symptoms in Huntington's disease transgenic mouse model are alleviated by chlorzoxazone // *Front Neurosci*. — 2020. — 279. N. 14.
67. Egorova P. A., Zakharova O. A., Vlasova O. L. and Bezprozvanny I. B. In vivo analysis of cerebellar Purkinje cell activity in SCA2 transgenic mouse model // *J Neurophysiol*. — 2016. — 6. N. 115. — P. 2840-51.
68. Estrada-Sanchez A. M., et al. Cortical efferents lacking mutant huntingtin improve striatal neuronal activity and behavior in a conditional mouse model of Huntington's disease // *J Neurosci*. — 2015. — 10. N. 35. — P. 4440-51.
69. Evert B. O., Wüllner U. and Klockgether T. Cell death in polyglutamine diseases // *Cell Tissue Res*. — 2000. — 1. N. 301. — P. 189-204.
70. Faber E. S. Functional interplay between NMDA receptors, SK channels and voltage-gated Ca²⁺ channels regulates synaptic excitability in the medial prefrontal cortex // *J Physiol*. — 2010. — 8. N. 588. — P. 1281-1292.
71. Faber E. S. and Sah P. Functions of SK channels in central neurons // *Clin Exp Pharmacol Physiol*. — 2007. — 10. N. 34. — P. 1077-83.
72. Fairless R., Williams S. K. and Diem R. Calcium-Binding Proteins as Determinants of Central Nervous System Neuronal Vulnerability to Disease // *Int J Mol Sci*. — 2019. — 9. N. 20.
73. Faruq M. S. V., Singh I., Tyagi S., Srivastava A.K., Mukerji M. SCA-LSVD: a repeat-oriented locus-specific variation database for genotype to phenotype correlations in spinocerebellar ataxias // *Hum Mutat*. — 2009. N. 30. — P. 1037-42.
74. Feher A., Broskova Z. and Bagi Z. Age-related impairment of conducted dilation in human coronary arterioles // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. — 2014. — 12. N. 306. — P. 1595-1601.

75. Fei E., et al. Phosphorylation of ataxin-3 by glycogen synthase kinase 3 beta at serine 256 regulates the aggregation of ataxin-3 // *Biochem Biophys Res Commun.* — 2007. N. 357. — P. 487-492.
76. Frank G. R. Role of estrogen and androgen in pubertal skeletal physiology // *Med Pediatr Oncol.* — 2003. — 3. N. 41. — P. 217-21.
77. Friedrich J. K., et al. TBP-TAF complex SL1 directs RNA polymerase I pre-initiation complex formation and stabilizes upstream binding factor at the rDNA promoter // *J Biol Chem.* — 2005. — 33. N. 280. — P. 29551-8.
78. Fujita A., Takeuchi T., Jun H. and Hata F. Localization of Ca²⁺-activated K⁺ channel, SK3, in fibroblast-like cells forming gap junctions with smooth muscle cells in the mouse small intestine // *J Pharmacol Sci.* — 2003. — 1. N. 92. — P. 35-42.
79. Furness J. B., et al. Intermediate conductance potassium (IK) channels occur in human enteric neurons // *Auton Neurosci.* — 2004. N. 112. — P. 93-97.
80. Furrer S.A. M. M. S., Waldherr S.M. 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 // *J Neurosci.* — 2011. — 45. N. 31. — P. 16269-78.
81. Gao L., et al. Chlorzoxazone or 1-EBIO increases Na⁽⁺⁾ absorption across cystic fibrosis airway epithelial cells // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* — 2001. — 5. N. 281. — P. 1123-9.
82. Gao Z., et al. Cerebellar ataxia by enhanced Ca(V)2.1 currents is alleviated by Ca²⁺-dependent K⁺-channel activators in Cacna1a(S218L) mutant mice // *J Neurosci.* — 2012. — 44. N. 32. — P. 15533-46.
83. Gardos G. The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes // *Biochim Biophys Acta.* — 1958. N. 30. — P. 653-654.
84. Gatchel J. R. and Zoghbi H. Y. Diseases of unstable repeat expansion: mechanisms and common principles // *Nat Rev Genet.* — 2005. — 10. N. 6. — P. 743-55.

85. Gibson C. L., et al. Glial loss of the metallo β -lactamase domain containing protein, SWIP-10, induces age- and glutamate-signaling dependent, dopamine neuron degeneration // *PLoS Genet.* — 2018. — 3. N. 14.
86. Gouge J., et al. Redox signaling by the RNA polymerase III TFIIB-related factor Brf2 // *Cell.* — 2015. — 6. N. 163. — P. 1375-87.
87. Grace A. A. Phasic versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsivity: a hypothesis for the ethiology of schizophrenia // *Neuroscience.* — 1991. — 1. N. 41. — P. 1-24.
88. Grigorian R. A., Grigorian V. Z. and Khorkov A. D. Deistvie malykh doz etanola na aktivnost kletok Purkinje mozzhechka krys // *Doklady akademii nauk SSSR.* — 1992. — 4. N. 325. — P. 865-868.
89. Group T. H. s. D. C. R. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes // *Cell.* — 1993. — 6. N. 72. — P. 971-83.
90. Hansen S. T., Meera P., Otis T. S. and Pulst S. M. Changes in Purkinje cell firing and gene expression precede behavioral pathology in a mouse model of SCA2 // *Hum Mol Genet.* — 2012. — 2. N. 22. — P. 271-283.
91. Hekman K. E. and Gomez C. M. The autosomal dominant spinocerebellar ataxias: emerging mechanistic themes suggest pervasive Purkinje cell vulnerability // *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* — 2015. — 5. N. 86. — P. 554-61.
92. Hoxha E., Balbo I., Miniaci M. C. and Tempia F. Purkinje cell signaling deficits in animal models of ataxia // *Frontiers in Synaptic Neuroscience.* — 2018. — 6. N. 10. — P. 344-361.
93. Humbert S., et al. The IGF-1/Akt Pathway Is Neuroprotective in Huntington's Disease and Involves Huntingtin Phosphorylation by Akt // *Dev Cell.* — 2002. — 831-837. N. 2.
94. Huynh D. P., Figueroa K., Hoang N. and Pulst S. M. Nuclear localization or inclusion body formation of ataxin-2 are not necessary for SCA2 pathogenesis in mouse or human // *Nat Genet.* — 2000. — 1. N. 26. — P. 44-50.

95. Huynh D. P., et al. Expansion of the polyQ repeat in ataxin-2 alters its Golgi localization, disrupts the Golgi complex and causes cell death // *Hum Mol Genet.* — 2003. — 13. N. 12. — P. 1485-96.
96. Imamura K., et al. Calcium dysregulation contributes to neurodegeneration in FTLD patient iPSC-derived neurons // *Sci Rep.* — 2016. — 34904. N. 6.
97. Ito M. Cerebellar long-term depression: characterization, signal transduction, and functional roles // *Physiol Rev.* — 2001. — 3. N. 81. — P. 1143-95.
98. Jana N. R., et al. Co-chaperone CHIP associates with expanded polyglutamine protein and promotes their degradation by proteasomes // *J Biol Chem.* — 2005. N. 280. — P. 11635-11640.
99. Jana N. R., Tanaka M., Wang G. and Nukina N. Polyglutamine length-dependent interaction of Hsp40 and Hsp70 family chaperones with truncated N-terminal huntingtin: their role in suppression of aggregation and cellular toxicity // *Hum Mol Genet.* — 2000. — 13. N. 9. — P. 2009-18.
100. Janer A., et al. SUMOylation attenuates the aggregation propensity and cellular toxicity of the polyglutamine expanded ataxin-7 // *Hum Mol Genet.* — 2010. N. 19. — P. 181-195.
101. Jayabal S. Rapid Onset of Motor Deficits in a Mouse Model of Spinocerebellar Ataxia Type 6 Precedes Late Cerebellar Degeneration // *eNeuro.* — 2015. — 6. N. 2. — P. 0094-15.
102. Jayabal S., Chang H. H. V., Cullen K. E. and Watt A. J. 4-aminopyridine reverses ataxia and cerebellar firing deficiency in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 6 // *Sci Rep.* — 2016. — 6. N. 6.
103. Jayabal S., Ljungberg L. and Watt A. J. Transient cerebellar alterations during development prior to obvious motor phenotype in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 6. // *J Physiol.* — 2017. — 3. N. 595. — P. 949-966.
104. Jeppesen D. K., Bohr V. A. and Stevnsner T. DNA repair deficiency in neurodegeneration // *Prog Neurobiol.* — 2014. — 2. N. 94. — P. 166-200.

105. Ji H. and Shepard P. D. SK Ca²⁺-activated K⁺ channel ligands alter the firing pattern of dopamine-containing neurons in vivo // *Neuroscience*. — 2006. N. 140. — P. 623-633.
106. Jin W., et al. Relationship between large conductance calcium-activated potassium channel and bursting activity // *Brain Res*. — 2000. — 21-28. N. 860.
107. Jorgensen N. D., et al. Phosphorylation of ATXN1 at Ser776 in the cerebellum // *J Neurochem*. — 2009. N. 110. — P. 675-686.
108. Kanazawa I. Molecular pathology of dentatorubral-pallidoluysian atrophy // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. — 1999. — 1386. N. 354. — P. 1069-74.
109. Kasumu A. and Bezprozvanny I. Deranged Calcium Signaling in Purkinje Cells and Pathogenesis in Spinocerebellar Ataxia 2 (SCA2) and Other Ataxias // *Cerebellum (London, England)*. — 2012. — 3. N. 11. — P. 630-9.
110. Kasumu A. W., et al. Selective positive modulator of calcium-activated potassium channels exerts beneficial effects in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 2 // *Chem Biol*. — 2012. — 10. N. 19. — P. 1340-53.
111. Kasumu A. W., et al. Chronic suppression of inositol 1,4,5-triphosphate receptor-mediated calcium signaling in cerebellar purkinje cells alleviates pathological phenotype in spinocerebellar ataxia 2 mice // *J Neurosci*. — 2012. — 37. N. 32. — P. 12786-96.
112. Kawaguchi S. CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1 // *Nat Genet*. — 1994. — 3. N. 8. — P. 221-8.
113. Kazantsev A., et al. Insoluble detergent-resistant aggregates form between pathological and nonpathological lengths of polyglutamine in mammalian cells. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. — 1999. — 20. N. 96. — P. 11404-9.
114. Keum J. W. The HTT CAG-expansion mutation determines age at death, but not disease duration in Huntington's disease // *Am J Hum Genet*. — 2016. — 2. N. 98. — P. 287-98.
115. Kiehl T. R., et al. Generation and characterization of Sca2 (ataxin-2) knockout mice // *Biochem Biophys Res Commun*. — 2006. — 1. N. 339. — P. 17-24.

116. Kim E. H., Lee Y., Choi S. and Song J. J. Structural basis of the phosphorylation dependent complex formation of neurodegenerative disease protein Ataxin-1 and RBM17 // *Biochem Biophys Res Commun.* — 2014. — 4. N. 449. — P. 339-404.
117. Kim S., et al. Polyglutamine protein aggregates are dynamic. // *Nat Cell Biol.* — 2002. — 10. N. 4. — P. 826-31.
118. Kohler M., et al. Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain // *Science.* — 1996. — 5282. N. 273. — P. 1709-14.
119. Koide R., et al. Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA) // *Nat Genet.* — 1994. — 1. N. 6. — P. 9-13.
120. Kremer B. Clinical neurology of Huntington's disease // *Huntington's Disease [Book Section]* / book auth. G. Bates, P. Harper and L. Jones. - Oxford Oxford University Press, 2002.
121. Kshatri A. S., Gonzalez-Hernandez¹ A. and Giraldez T. Physiological Roles and Therapeutic Potential of Ca²⁺ Activated Potassium Channels in the Nervous System // *Front Mol Neurosci.* — 2018. — 258. N. 11. — P. 291-310.
122. Lam Y. C. Ataxin-1 interacts with the repressor Capicua in its native complex to cause SCA1 neuropathology // *Cell.* — 2006. — 7. N. 127. — P. 1335-47.
123. Laslo P., Lipski J. and Funk G. D. Differential expression of Group I metabotropic glutamate receptors in motoneurons at low and high risk for degeneration in ALS // *Neuroreport.* — 2001. N. 12. — P. 1903-1908.
124. Lastres-Becker I., Rub U. and Auburger G. Spinocerebellar ataxia 2 (SCA2) // *Cerebellum.* — 2008. — 2. N. 7. — P. 115-24.
125. Leavitt B. L., Kordasiewicz H. B. and Schobel S. A. Huntingtin-Lowering Therapies for Huntington Disease A Review of the Evidence of Potential Benefits and Risks // *JAMA Neurol.* — 2020. N.
126. Lee W. C., Yoshihara M. and Littleton J. T. Cytoplasmic aggregates trap polyglutamine-containing proteins and block axonal transport in a *Drosophila* model of Huntington's disease // *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 2004. — 9. N. 101. — P. 3224-9.

127. Li F., Macfarlan T., Pittman R. N. and Chakravarti D. Ataxin-3 is a histone-binding protein with two independent transcriptional corepressor activities // *J Biol Chem.* — 2002. — 47. N. 277. — P. 45004-12.
128. Lin M. T. and Beal M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases // *Nature.* — 2006. — 7113. N. 443. — P. 787-95.
129. Liu Z., et al. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications // *Oxid Med Cell Longev.* — 2017. N.
130. Lujan R., Maylie J. and Adelman J. P. New sites of action for GIRK and SK channels // *Nat Rev Neurosci.* — 2009. — 7. N. 10. — P. 475-80.
131. Luthi-Carter R., et al. Decreased expression of striatal signaling genes in a mouse model of Huntington's disease // *Hum Mol Genet.* — 2000. — 9. N. 9. — P. 1259-71.
132. Luthi-Carter R., et al. Polyglutamine and transcription: gene expression changes shared by DRPLA and Huntington's disease mouse models reveal context-independent effects // *Hum Mol Genet.* — 2002. — 17. N. 11. — P. 1927-37.
133. Macdonald D., et al. Quantification assays for total and polyglutamine-expanded huntingtin proteins // *PLoS One.* — 2014. — 5. N. 9.
134. Madabhushi R., Pan L. and Tsai L. H. DNA damage and its links to neurodegeneration // *Neuron.* — 2014. — 2. N. 83. — P. 266-282.
135. Magi S., et al. Intracellular Calcium Dysregulation: Implications for Alzheimer's Disease // *Biomed Res Int.* — 2016. — 6701324. N. 2016.
136. Magnusson K. R., Brim B. L. and Das S. R. Selective vulnerabilities of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors during brain aging // *Front Aging Neurosci.* — 2010. — 11. N. 2.
137. Maher A. D. and Kuchel P. W. The Gárdos channel: a review of the Ca²⁺-activated K⁺ channel in human erythrocytes // *Int J Biochem Cell Biol.* — 2003. — 8. N. 35. — P. 1182-97.
138. Margulis B. A., et al. Pharmacological protein targets in polyglutamine diseases: mutant polypeptides and their interactions // *FEBS Letters.* — 2013. — 13. N. 587. — P. 1997-2007.

139. Matsuda H. Voxel-based morphometry of brain MRI in normal aging and Alzheimer's disease // *Aging Dis.* — 2013. — 1. N. 4. — P. 29-37.
140. Mattson M. P. and Magnus T. Ageing and neuronal vulnerability // *Nat Rev Neurosci.* — 2006. N. 7. — P. 278-294.
141. Maylie J., Bond C. T. and Herson P. S. Small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels and calmodulin // *J Physiol.* — 2004. — 2. N. 554. — P. 255-61.
142. McLoughlin H. S., et al. Oligonucleotide therapy mitigates disease in Spinocerebellar Ataxia Type 3 mice // *Ann Neurol.* — 2018. — 1. N. 84. — P. 64-77.
143. Meech R. W. Intracellular calcium injection causes increased potassium conductance in *Aplysia* nerve cells // *Comp Biochem Physiol* —1972. — 2. N. 42. — P. 493-499.
144. Meera P., Pulst S. M. and Otis T. S. Cellular and circuit mechanisms underlying spinocerebellar ataxias // *J physiol.* — 2016. — 16. N. 594. — P. 4653-4660.
145. Michalik A. and van Broeckhoven C. Pathogenesis of polyglutamine disorders: aggregation revisited // *Hum Mol Genet.* — 2003. — 2. N. 12. — P. 173-183.
146. Miller M. J., et al. Nuclear localization and dominant-negative suppression by a mutant SKCa3 N-terminal channel fragment identified in a patient with schizophrenia // *Journal of Biological Chemistry.* — 2001. — 30. N. 276. — P. 27753-27759.
147. Mongan L. C., et al. The distribution of small and intermediate conductance calcium-activated potassium channels in the rat sensory nervous system // *Neuroscience.* — 2005. N. 131. — P. 161-175.
148. Montie H. L., Pestell R. G. and Merry D. E. SIRT1 modulates aggregation and toxicity through deacetylation of the androgen receptor in cell models of SBMA // *J Neurosci.* — 2011. — 48. N. 31. — P. 17425-36.
149. Mookerjee S., et al. Posttranslational modification of ataxin-7 at lysine 257 prevents autophagy-mediated turnover of an N-terminal caspase-7 cleavage fragment // *J Neurosci.* — 2009. N. 29. — P. 15134-15144.

150. Morigaki R. and Goto S. Striatal vulnerability in Huntington's disease: neuroprotection versus neurotoxicity // *Brain Sci.* — 2017. — 63. N. 7.
151. Morrison B. M., Hof P. R. and Morrison J. H. Determinants of neuronal vulnerability in neurodegenerative diseases // *Ann Neurol.* — 1998. — 1. N. 44. — P. 32-44.
152. Mourre C., Fournier C. and Soumireu-Mourat B. Apamin, a blocker of the calcium-activated potassium channel, induces neurodegeneration of Purkinje cells exclusively // *Brain Res.* — 1997. — 405-408. N. 778.
153. Mukherjee S., et al. Small ubiquitin-like modifier (SUMO) modification of the androgen receptor attenuates polyglutamine-mediated aggregation // *J Biol Chem.* — 2009. — 32. N. 284. — P. 21296-306.
154. Nakamura K., et al. SCA17, a novel autosomal dominant cerebellar ataxia caused by an expanded polyglutamine in TATA-binding protein // *Hum Mol Genet.* — 2001. — 14. N. 10. — P. 1441-8.
155. Nedelsky N. B., et al. Native Functions of the Androgen Receptor Are Essential to Pathogenesis in a Drosophila Model of Spinobulbar Muscular Atrophy // *Neuron.* — 2010. N. 67. — P. 936-952.
156. Okamura-Oho Y., Miyashita T., Ohmi K. and Yamada M. Dentatorubral-pallidoluysian atrophy protein interacts through a proline-rich region near polyglutamine with the SH3 domain of an insulin receptor tyrosine kinase substrate // *Hum Mol Genet.* — 1999. N. 8. — P. 947-57.
157. Oliveira M. S., et al. Altered expression and function of small-conductance (SK) Ca(2+)-activated K⁺ channels in pilocarpine-treated epileptic rats // *Brain Res.* — 2010. N. 1347. — P. 187-199.
158. Orr H. T. and al. e. Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1 // *Nat Genet.* — 1993. — 3. N. 4. — P. 221-6.
159. Orr H. T. and Zoghbi H. Y. Trinucleotide repeat disorders // *Annu Rev Neurosci.* — 2007. N. 30. — P. 575-621.
160. Ostrowski L.A. H. A. C., Mekhail, K. Ataxin-2: From RNA Control to Human Health and Disease // *Genes (Basel).* — 2017. — 6. N. 8. — P. 137-57.

161. Palazzolo I., et al. Akt blocks ligand binding and protects against expanded polyglutamine androgen receptor toxicity // *Hum Mol Genet.* — 2007. — 13. N. 16. — P. 1593-603.
162. Palazzolo I., et al. Overexpression of IGF-1 in muscle attenuates disease in a mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy // *Neuron.* — 2009. — 3. N. 63. — P. 316-28.
163. Pan Y., et al. The role of Twist1 in mutant huntingtin-induced transcriptional alterations and neurotoxicity // *J Biol Chem.* — 2017. — 30. N. 293. — P. 11850-11866.
164. Paradisi I. I. V., Arias S. Spinocerebellar ataxias in Venezuela: genetic epidemiology and their most likely ethnic descent // *Journal of Human Genetics.* — 2016. N. 61. — P. 215-222.
165. Patel H. D., et al. Efficacy and Safety of Combination of NSAIDs and Muscle Relaxants in the Management of Acute Low Back Pain // *Pain Ther.* — 2019. — 1. N. 8. — P. 121-132.
166. Paulson H. L., et al. Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3 // *Neuron.* — 1997. — 2. N. 19. — P. 333-44.
167. Pedarzani P. and Stocker M. Molecular and cellular basis of small- and intermediate-conductance, calcium-activated potassium channel function in the brain // *Cell Mol Life Sci.* — 2008. N. 65. — P. 3196-3217.
168. Perez M. K., et al. Recruitment and the Role of Nuclear Localization in Polyglutamine-mediated Aggregation // *J Cell Biol.* — 1998. — 6. N. 143. — P. 1457-1470.
169. Polanco M. J., et al. Adenylyl cyclase activating polypeptide reduces phosphorylation and toxicity of the polyglutamine-expanded androgen receptor in spinobulbar muscular atrophy // *Sci Transl Med.* — 2016. N. 8.
170. Pulst S. M., et al. Spinocerebellar ataxia type 2: polyQ repeat variation in the CACNA1A calcium channel modifies age of onset // *Brain.* — 2005. — Pt 10. N. 128. — P. 2297-303.

171. Raman I. M. and Bean B. P. Ionic currents underlying spontaneous action potentials in isolated cerebellar Purkinje neurons // *J Neurosci.* — 1999. — 5. N. 19. — P. 1663-74.
172. Rangone H., et al. The serum- and glucocorticoid-induced kinase SGK inhibits mutant huntingtin-induced toxicity by phosphorylating serine 421 of huntingtin // *J Neurosci.* — 2004. N. 19. — P. 273-279.
173. Reddy P. H. and Shirendeb U. R. Mutant Huntingtin, Abnormal Mitochondrial Dynamics, Defective Axonal Transport of Mitochondria, and Selective Synaptic Degeneration in Huntington's Disease // *Biochim Biophys Acta.* — 2011. — 2. N. 1822. — P. 101-110.
174. Reiner A. and Deng Y.-P. Disrupted striatal neuron inputs and outputs in Huntington's disease // *CNS Neuroscience and Therapeutics.* — 2018. — 4. N. 14. — P. 250-80.
175. Rinaldi C., et al. Insulinlike Growth Factor (IGF)-1 Administration Ameliorates Disease Manifestations in a Mouse Model of Spinal and Bulbar Muscular Atrophy // *Mol Med.* — 2012. N. 18. — P. 1261-1268.
176. Ripolone M., et al. Purkinje cell COX deficiency and mtDNA depletion in an animal model of spinocerebellar ataxia type 1 // *J Neurosci Res.* — 2018. — 9. N. 96. — P. 1576-1585.
177. Ristori G., et al. Riluzole in cerebellar ataxia: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot trial // *Neurology.* — 2010. — 10. N. 74. — P. 839-45.
178. Rodda R. A. Cerebellar atrophy in Huntington's disease // *J Neurol Sci.* — 1981. — 1. N. 50. — P. 147-57.
179. Rodrigues A. J., et al. Absence of ataxin-3 leads to cytoskeletal disorganization and increased cell death. // *Biochim Biophys Acta.* — 2010. — 10. N. 1803. — P. 1154-63.
180. Rodriguez-Diaz J. C., et al. Neurorehabilitation Therapy in Spinocerebellar Ataxia Type 2: A 24-Week, Rater-Blinded, Randomized, Controlled Trial // *Mov Disord.* — 2018. — 9. N. 33. — P. 1481-1487.

181. Rodriguez-Lebron E., et al. Altered Purkinje cell miRNA expression and SCA1 pathogenesis // *Neurobiol Dis.* — 2013. N. 54. — P. 456-63.
182. Romano S., et al. Riluzole in patients with hereditary cerebellar ataxia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial // *Lancet Neurol.* — 2015. — 10. N. 14. — P. 985-91.
183. Roth D. M. and Balch W. E. Modeling General Proteostasis: Proteome Balance in Health and Disease // *Curr Opin Cell Biol.* — 2010. — 2. N. 23. — P. 126-134.
184. Rub U., et al. Huntington's disease (HD): Degeneration of select nuclei and widespread occurrence of neuronal nuclear and axonal inclusions in brainstem // *Brain Pathol.* — 2014. — 3. N. 24. — P. 247-60.
185. Rub U., et al. Degeneration of the cerebellum in Huntington's disease (HD): possible relevance for the clinical picture and potential gateway to pathological mechanisms of the disease process // *Brain Pathol.* — 2013. — 2. N. 23. — P. 165-77.
186. Ryu J., Cho S., Park B. and Lee D. H. Oxidative stress-enhanced SUMOylation and aggregation of ataxin-1: implication of JNK pathway // *Biochem Biophys Res Commun.* — 2010. N. 393. — P. 280-285.
187. S.A. F., Waldherr S. M. and Mohanachandran M. S. Reduction of mutant ataxin-7 expression restores motor function and prevents cerebellar synaptic reorganization in a conditional mouse model of SCA7 // *Hum Mol Genet.* — 2013. — 5. N. 22. — P. 890-903.
188. Sacaramuzzino C., et al. Protein arginine methyltransferase 6 enhances polyglutamine-expanded androgen receptor function and toxicity in spinal and bulbar muscular atrophy // *Neuron.* — 2015. N. 85. — P. 88-100.
189. Sapin M. R., Nikitiuk D. B. and Revasov V. S. *Anatomia cheloveka // Medicina.* — 2001. — T. 1/ Pod red. M.R. Sapina. N. 5-e izdanie, pererab. i dop. — P. 640.
190. Saudou F. and Humbert S. The biology of huntingtin // *Neuron.* — 2016. — 5. N. 89. — P. 910-26.

191. Sausbier M., et al. Cerebellar ataxia and Purkinje cell dysfunction caused by Ca^{2+} activated K^{+} channel deficiency // *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 2004. N. 101. — P. 9474-9478.
192. Schmitz-Hubsch T., et al. Spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6: disease severity and nonataxia symptoms // *Neurology.* — 2008. — 13. N. 71. — P. 982-9.
193. Schols L., et al. Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis // *Lancet Neurol.* — 2004. — 5. N. 3. — P. 291-304.
194. Schulz-Schaeffer W. J. The synaptic pathology of alpha-synuclein aggregation in dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease and Parkinson's disease dementia // *Acta Neuropathol.* — 2010. — 2. N. 120. — P. 131-143.
195. Schumacher M. A., Rivard A. F., Bachinger H. P. and Adelman J. P. Structure of the gating domain of a Ca^{2+} -activated K^{+} channel complexed with Ca^{2+} /calmodulin // *Nature.* — 2001. — 10. N. 5. — P. 758-70.
196. Sebastianutto I., Cenci M. A. and Fieblinger T. Alterations of striatal indirect pathway neurons precede motor deficits in two mouse models of Huntington's disease // *Neurobiol Dis.* — 2017. N. 105. — P. 117-131.
197. Seidel K. S. S., Brunt E.R., den Dunnen W., Korf H.W., Rüb U. Brain pathology of spinocerebellar ataxias // *Acta Neuropathol.* — 2012. — 1. N. 124. — P. 1-21.
198. Seki T., et al. Mutant γPKC found in spinocerebellar ataxia type 14 induces aggregate-independent maldevelopment of dendrites in primary cultured Purkinje cells // *Neurobiol of Dis.* — 2009. N. 33. — P. 260-273.
199. Shakkottai V. G., et al. Early changes in cerebellar physiology accompany motor dysfunction in the polyglutamine disease spinocerebellar ataxia type 3 // *J Neurosci.* — 2011. — 36. N. 31. — P. 13002-14.
200. Shakkottai V. G. and Fogel B. L. Clinical neurogenetics: autosomal dominant spinocerebellar ataxia // *Neurol Clin.* — 2013. — 4. N. 31. — P. 987-1007.
201. Sheehan J. J., Benedetti B. L. and Barth A. L. Anticonvulsant effects of the BK-channel antagonist paxilline // *Epilepsia.* — 2009. N. 50. — P. 711-720.

202. Shen Y., et al. Functional architecture of atrophins // *The Journal of Biological Chemistry*. — 2007. — 7. N. 282. — P. 5037-44.
203. Shen Y. C. Lamotrigine in motor and mood symptoms of Huntington's disease // *World J Biol Psychiatry*. — 2008. — 2. N. 9. — P. 147-9.
204. Shimohata T., et al. Expanded polyglutamine stretches interact with TAFII130, interfering with CREB-dependent transcription // *Nat Genet*. — 2000. — 1. N. 26. — P. 29-36.
205. Shuvaev A. N., et al. Mutant PKC γ in spinocerebellar ataxia type 14 disrupts synapse elimination and long-term depression in Purkinje cells in vivo // *J Neurosci*. — 2011. — 40. N. 31. — P. 14324-34.
206. Shuvaev A. N., et al. Progressive impairment of cerebellar mGluR signalling and its therapeutic potential for cerebellar ataxia in spinocerebellar ataxia type 1 model mice // *J Physiol*. — 2017. — 1. N. 595. — P. 141-164.
207. Sinnesael M., et al. Androgen receptor (AR) in osteocytes is important for the maintenance of male skeletal integrity: evidence from targeted AR disruption in mouse osteocytes // *J Bone Miner Res*. — 2012. — 12. N. 27. — P. 2535-43.
208. Smeets C. J., Jeziarska J. and Watanabe H. Elevated mutant dynorphin A causes Purkinje cell loss and motor dysfunction in spinocerebellar ataxia type 23 // *Brain*. — 2015. — 9. N. 138. — P. 2537-52.
209. Smeets C. J. and Verbeek D. S. Climbing fibers in spinocerebellar ataxia: A mechanism for the loss of motor control // *Neurobiol Dis*. — 2016. N. 88. — P. 96-106.
210. Soden M. E., et al. Disruption of dopamine neuron activity pattern regulation through selective expression of a human KCNN3 mutation // *Neuron*. — 2013. N. 80. — P. 997-1009.
211. Southwell A. L., et al. Huntingtin suppression restores cognitive function in a mouse model of Huntington's disease // *Sci Transl Med*. — 2018. N. 10.
212. Stackman R. W., et al. Small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels modulate synaptic plasticity and memory encoding // *J Neurosci*. — 2002. — 23. N. 22. — P. 10163-71.

213. Stefanie L. B., Rebecca D., Huang Y. and Mead C.-L. CAG-encoded polyglutamine length polymorphism in the human genome // *BMC Genomics*. — 2007. — 126. N. 8.
214. Steffan J. S., et al. SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology // *Science*. — 2004. — 5667. N. 304. — P. 100-4.
215. Stevanin G. and Brice A. Spinocerebellar ataxia 17 (SCA17) and Huntington's disease-like 4 (HDL4) // *Cerebellum*. — 2008. — 2. N. 7. — P. 170-8.
216. Stevanin G., et al. Mutation in the catalytic domain of protein kinase C gamma and extension of the phenotype associated with spinocerebellar ataxia type 14. // *Arch Neurol*. — 2004. — 8. N. 61. — P. 1242-8.
217. Stocker M. Ca(2+)-activated K⁺ channels: molecular determinants and function of the SK family // *Nat Rev Neurosci*. — 2004. — 10. N. 5. — P. 758-70.
218. Stocker M. and Pedarzani P. Differential distribution of three Ca(2+)-activated K(+) channel subunits, SK1, SK2, and SK3, in the adult rat central nervous system // *Mol Cell Neurosci*. — 2000. — 5. N. 15. — P. 476-93.
219. Takagi H. and Hashitani H. Effects of K(+) channel openers on spontaneous action potentials in detrusor smooth muscle of the guinea-pig urinary bladder // *Eur J Pharmacol*. — 2016. N. 789. — P. 179-186.
220. Takeuchi T. and Nagai Y. Protein Misfolding and Aggregation as a Therapeutic Target for Polyglutamine Diseases // *Brain Sci*. — 2017. — 10. N. 7.
221. Tara E., Vitenzon A., Hess E. and Khodakhah K. Aberrant cerebellar Purkinje cell activity as the cause of motor attacks in a mouse model of episodic ataxia type 2 // *Dis Model Mech*. — 2018. — 9. N. 11.
222. Terashima T., et al. SUMO-1 co-localized with mutant atrophin-1 with expanded polyglutamines accelerates intranuclear aggregation and cell death // *Neuroreport*. — 2002. N. 12. — P. 2359-2364.
223. Tercero-Pérez K., et al. Effects of Physical Rehabilitation in Patients with Spinocerebellar Ataxia Type 7 // *Cerebellum*. — 2019. — 3. N. 18. — P. 397-405.

224. Thompson-Vest N., Shimizu Y., Hunne B. and Furness J. B. The distribution of intermediate-conductance, calcium-activated, potassium (IK) channels in epithelial cells // *J Anat.* — 2006. — 2. N. 208. — P. 219-29.
225. Thompson L. M., et al. IKK phosphorylates Huntingtin and targets it for degradation by the proteasome and lysosome // *J Cell Biol.* — 2009. — 7. N. 187. — P. 1083-99.
226. Todd W. T. and Lim J. Aggregation formation in the polyglutamine diseases: protection at a cost? // *Mol Cells.* — 2013. — 185-194. N. 36.
227. Tomiyama M. Expression of metabotropic glutamate receptor mRNAs in the human spinal cord: implications for selective vulnerability of spinal motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis // *J Neurol Sci.* — 2001. N. 189. — P. 65-69.
228. Tsuji S. Dentatorubral-pallidoluisian atrophy // *Handb Clin Neurol.* — 2012. N. 103. — P. 587-94.
229. Usdin K., House N. C. and Freudenreich C. H. Repeat instability during DNA repair: insights from model systems // *Crit Rev Biochem Mol Biol.* — 2015. — 2. N. 50. — P. 142-67.
230. van Bruggen-Rufi M., Vink A., Achterberg W. and Roos R. Music therapy in Huntington's disease: a protocol for a multi-center randomized controlled trial // *BMC Psychology.* — 2016. — 38. N. 4.
231. Velázquez-Pérez L. C., Rodríguez-Labrada R. and Fernandez-Ruiz J. Spinocerebellar Ataxia Type 2: Clinicogenetic Aspects, Mechanistic Insights, and Management Approaches // *Front Neurol.* — 2017. N. 8. — P. 472-86.
232. Verbeek D. S., et al. Mapping of the SCA23 locus involved in autosomal dominant cerebellar ataxia to chromosome region 20p13-12.3 // *Brain.* — 2004. — 11. N. 127. — P. 2551-2557.
233. Verkerk A. J., et al. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome // *Cell.* — 1991. N. 65. — P. 905-914.

234. Vinther-Jensen T., et al. Germ-line CAG repeat instability causes extreme CAG repeat expansion with infantile-onset spinocerebellar ataxia type 2 // *Eur J Hum Genet.* — 2013. — 6. N. 21. — P. 626-629.
235. Vonsattel J. P. and DiFiglia M. Huntington disease // *J Neuropathol Exp Neurol.* — 1998. — 5. N. 57. — P. 369-84.
236. Vonsattel J. P., et al. Neuropathological classification of Huntington's disease // *J Neuropathol Exp Neurol.* — 1985. — 6. N. 44. — P. 559-77.
237. Waldvoegel H. J., et al. The neuropathology of Huntington's disease // *Curr Top Behav Neurosci.* — 2015. N. 22. — P. 33-80.
238. Walker F. O. Huntington's disease // *Lancet.* — 2007. — 9557. N. 369. — P. 218-28.
239. Walter J. T., et al. Decreases in the precision of Purkinje cell pacemaking cause cerebellar dysfunction and ataxia // *Nat Neurosci.* — 2006. — 3. N. 9. — P. 389-97.
240. Walters K. A., Simanainen U. and Handelsman D. J. Molecular insights into androgen actions in male and female reproductive function from androgen receptor knockout models // *Hum Reprod.* — 2010. — 5. N. 16. — P. 543-58.
241. Wang Y., et al. Potassium channels: possible new therapeutic targets in Parkinson's disease // *Med. Hypotheses.* — 2008. — 546-550. N. 71.
242. Ward J. M., et al. Metabolic and Organelle Morphology Defects in Mice and Human Patients Define Spinocerebellar Ataxia Type 7 as a Mitochondrial Disease // *Cell Rep.* — 2019. — 5. N. 26. — P. 1189-1202.
243. Warrick J. M., et al. Ataxin-3 suppresses polyglutamine neurodegeneration in *Drosophila* by a ubiquitin-associated mechanism // *Mol Cell.* — 2005. — 1. N. 18. — P. 37-48.
244. Weatherall K. L., Goodchild S. J., Jane D. E. and Marrion N. V. Small conductance calcium-activated potassium channels: from structure to function // *Prog Neurobiol.* — 2010. — 3. N. 91. — P. 242-55.
245. Weaver C. M. S., H. Expression and function of calcium-activated potassium channels in human glioma cells // *Glia.* — 2006. — 3. N. 54. — P. 223-233.

246. Womack M. D., Chevez C. and Khodakhah K. Calcium-activated potassium channels are selectively coupled to P/Q-type calcium channels in cerebellar Purkinje neurons // *J Neurosci.* — 2004. — 40. N. 24. — P. 8818-22.
247. Womack M. D. and Khodakhah K. Somatic and dendritic small-conductance calcium-activated potassium channels regulate the output of cerebellar Purkinje neurons // *J Neurosci.* — 2003. — 7. N. 23. — P. 2600-7.
248. Wu R. S. and Marx S. O. The BK potassium channel in the vascular smooth muscle and kidney: α - and β -subunits // *Kidney International.* — 2010. — 2. N. 78. — P. 963-974.
249. Yamamoto K., et al. Suppression of neocortical potassium channel activity by intracellular amyloid-beta and its rescue with Homer1a // *J Neurosci.* — 2011. N. 31. — P. 11100-11109.
250. Yanai A., et al. Palmitoylation of huntingtin by HIP14 is essential for its trafficking and function // *Nat Neurosci.* — 2006. N. 9. — P. 824-831.
251. Yasuda T., Nakata Y. and Mochizuki H. α -Synuclein and Neuronal Cell Death // *Mol Neurobiol.* — 2013. — 2. N. 47. — P. 466-483.
252. Zang K., Zhang Y., Hu J. and Wang Y. The Large Conductance Calcium- and Voltage-activated Potassium Channel (BK) and Epilepsy // *CNS Neurol Disord Drug Targets.* — 2018. — 4. N. 17. — P. 248-254.
253. Zhang X.-D., et al. Coupling of SK channels, L-type Ca^{2+} channels, and ryanodine receptors in cardiomyocytes // *Sci Rep.* — 2018. — 4670. N. 8.
254. Zhang Y., et al. Loss of Purkinje cells in the PKC γ H101Y transgenic mouse. // *Biochem Biophys Res Commun.* — 2009. — 3. N. 378. — P. 524-8.
255. Zhao H., et al. A Role of BK Channel in Regulation of Ca^{2+} Channel in Ventricular Myocytes by Substrate Stiffness // *Biophys J.* — 2017. — 7. N. 112. — P. 1406-1416.
256. Zhou Y. F., et al. SUMO-1 modification on K166 polyQ-expanded ataxin-3 strengthens its stability and increases its cytotoxicity // *PLoS One.* — 2013. N.

257. Zhuchenko O., et al. Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha 1A-voltage-dependent calcium channel // *Nat Genet.* — 1997. — 1. N. 15. — P. 62-9.
258. Zoghbi H. Y. and Orr H. T. Polyglutamine diseases: protein cleavage and aggregation // *Curr Opin Neurobiol.* — 1999. — 5. N. 9. — P. 566-70.