

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

На правах рукописи

Белозор Ольга Сергеевна

**РОЛЬ АСТРОГЛИИ В ПАТОГЕНЕЗЕ СПИНОЦЕРЕБЕЛЛЯРНОЙ
АТАКСИИ ПЕРВОГО ТИПА**

3.3.3. Патологическая физиология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
кандидат медицинских наук
Шуваев Антон Николаевич

Красноярск – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	5
Актуальность темы исследования	5
Степень разработанности темы исследования	5
Цели и задачи работы	6
Научная новизна.....	7
Теоретическая значимость работы.....	7
Практическая значимость	8
Методология и методы исследования.....	8
Положения, выносимые на защиту	9
Степень достоверности	9
Апробация работы.....	10
Структура и объем диссертации.....	10
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Спинаocerebellярная атаксия	12
1.2. СЦА1	13
1.2.1. Распространение СЦА1	13
1.2.2. Клинические проявления СЦА1	14
1.2.3. Атаксин 1 в норме и патологии	16
1.2.4. Существующие методы лечения	19
1.3. Влияние глии на синаптическую передачу.....	21
1.4. Астроглиоз	25
1.5. Модели СЦА1	28
1.6. Оптогенетика	30
Заключение.....	32
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	33
2.1. Объект исследования	33
2.2. Создание лентивирусных и аденовирусных векторов.	33
2.3. Моделирование нейродегенерации	34

2.4. Иммуногистохимическое исследование	37
2.5. Конфокальная микроскопия и морфометрический анализ	38
2.6. Анализ Шолля клеток ГБ	39
2.7. Электрофизиология	39
2.8. Генотипирование	41
2.9. Тестирование поведения животных	42
2.10. Статистические методы и обработка данных	42
3. РЕЗУЛЬТАТЫ	44
3.1. Изменение морфологии ГБ	44
3.1.1. Экзогенный S100 β изменяет морфологию ГБ	44
3.1.2. Хроническая активация астроцитов, экспрессирующих AVV GFAP-ChR2-mKate, приводит к изменению морфологии ГБ	49
3.1.3. Экспрессия атаксина 1 в ГБ вызывает астроглиоз коры мозжечка	51
3.2. Изменение морфологии КП при астроглиозе	53
3.2.1. Экзогенный белок S100 β вызывает дегенерацию КП	53
3.2.2. Хроническая фотостимуляция ГБ ^{ChR2} приводит к изменению морфологии КП	55
3.3. Влияние астроглиоза на синаптическую передачу в нейронах коры мозжечка	58
3.3.1. Введение S100 β изменяет кинетику ПВ ВПСТ	58
3.3.2. Хроническая фотостимуляция ГБ ^{ChR2} влияет на динамику ПВ ВПСТ	61
3.3.3. Влияние мутантного атаксина 1 на динамику ПВ ВПСТ	63
3.3.4. Изменение динамики ПВ ВПСТ у СЦА1 КИ животных	65
3.3.5. Механизм нарушения динамики ПВ ВПСТ в моделях нейродегенерации мозжечка	67
3.4. Изменение экспрессии переносчиков глутамата	69
3.4.1. Влияние хронической фотостимуляции ГБ ^{ChR2} на экспрессию EAAT1	69
3.4.2. Влияние мутантного атаксина 1 на экспрессию EAAT1	71
3.5. Влияние астроглиоза на синаптическую пластичность в нейронах коры мозжечка	72

3.5.1. Влияние астроглиоза на кратковременную синаптическую пластичность (PPF)	72
3.5.1.1. Ведение S100 β не влияет на PPF	72
3.5.1.2. Влияние фотостимуляции ГБ ^{ChR2} на PPF	74
3.5.1.3. Влияние мутантного атаксина 1 на PPF	76
3.5.2. Изменение DSE.....	78
3.5.2.1. Внеклеточный S100 β изменяет эндоканнабиноид-зависимую краткосрочную пластичность в синапсах ПВ-КП.....	78
3.5.2.2. Экспрессия мутантного атаксина 1 изменяет эндоканнабиноид-зависимую краткосрочную пластичность в синапсах ПВ-КП.....	82
3.5.3. Влияние астроглиоза на долговременную синаптическую пластичность (LTD)	84
3.6. Нарушение координации и двигательных навыков у модельных животных с астроглиозом коры мозжечка	86
4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	89
4.1. Влияние активированной ГБ на морфологию КП.....	89
4.1.1. Морфологические изменения реактивной ГБ.....	89
4.1.2. Влияние реактивной ГБ на морфологию КП	92
4.2. Влияние реактивной глии на синаптическую передачу КП	94
4.3. Нарушение синаптической пластичности в ПВ-КП синапсах, окружённых реактивной ГБ и двигательные расстройства	96
Заключение	100
ВЫВОДЫ.....	103
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	106
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	107

Введение

Актуальность темы исследования

Спиноцеребеллярная атаксия 1 типа (СЦА1) является наиболее часто встречающимся типом СЦА. В России СЦА1 распространена неравномерно: хотя общий уровень заболеваемости по данным ВОЗ составляет 1-2 на 100 тыс. населения, в восточной части России данное заболевание встречается намного чаще – до 48 человек на 100 тыс. населения, в первую очередь, за счёт Якутии [71, 141].

Заболевание начинается в зрелом возрасте и характеризуется постепенным прогрессированием двигательных и экстрапирамидных расстройств. В первую очередь поражаются клетки Пуркинье (КП) мозжечка, со временем в патологический процесс вовлекаются и другие структуры: подкорковые ядра и продолговатый мозг [4, 124]. Смерть наступает от бульбарных расстройств, чаще от нарушения дыхания, через 10-15 лет после клинической манифестации [154]. Таким образом, заболевание является и медицинской и социальной проблемой, так как страдает работоспособное население, увеличивается число инвалидов, возрастают расходы на длительную терапию и реабилитацию больных.

Лечение больных СЦА1 остается поддерживающим, симптоматическим, так как не существует известной терапии для задержки или остановки прогрессирования заболевания.

Степень разработанности темы исследования

В последнее время увеличилось число исследований, изучающих роль астроцитов и микроглии в моделях нейродегенеративных заболеваний на животных [64, 129, 182, 185, 189]. Несмотря на это, роль астроглиоза в патогенезе нейродегенерации до сих пор не ясна. Некоторые из этих исследований представляют доказательства того, что реактивная глия может обладать

нейропротективным действием, другие же предполагают, что может усугублять нейродегенерацию.

Изучение клеточно-молекулярных механизмов развития СЦА1, его патоморфологии с использованием человеческих биологических образцов затруднено. Для изучения патогенеза данной патологии используют модели заболевания на животных [35-37, 40, 80, 105]. Существует не так много исследований о роли астроглии, в частности глии Бергмана (ГБ), в развитии СЦА1 [38, 40, 54], и для полного понимания её роли в развитии нейродегенерации требуются дальнейшие исследования.

Изучение роли астроглии позволит выявить новые фундаментальные механизмы в патогенезе СЦА1. Это позволило бы применять эффективные стратегии лечения до потери клеток или необратимого нарушения функций нейронов, также результаты исследования выявят потенциальные цели лечения.

Цели и задачи работы

Цель настоящей работы заключалась в исследовании роли глии Бергмана в патогенезе СЦА1. В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. Разработать модель ранней стадии астроглиоза с использованием протокола оптогенетики.

2. Изучить морфологию глии Бергмана и клеток Пуркинье при неспецифическом и специфическом астроглиозе, вызванном действием мутантного атаксина 1.

3. Изучить синаптическую передачу и синаптическую пластичность в нейронах коры мозжечка при неспецифическом и специфическом астроглиозе, вызванном действием мутантного атаксина 1, и оценить влияние изменений синаптической пластичности на развитие атаксии.

4. Дополнить схему патогенеза нейродегенерации мозжечка при СЦА1 новыми представлениями о роли и механизмах участия астроглии в повреждении нейронов.

Научная новизна

Впервые созданы две векторные модели селективного астроглиоза коры мозжечка со специфическим (экспрессия мутантного атаксина 1) и неспецифическим (экспрессия ChR2) раздражителями. В этих моделях обнаружено негативное влияние активированной ГБ на морфологию и синаптическую передачу КП в виде уменьшения длины и утолщения отростков ГБ, снижения количества КП и уменьшения толщины молекулярного слоя. Впервые было показано негативное влияние ГБ на синаптическую передачу и пластичность при СЦА1. Выявлено нарушение обратного захвата нейромедиаторов из синаптической щели, что приводит к удлинению времени восстановления ПВ ВПСТ и нарушению кратковременной и долговременной синаптической пластичности (PPF, DSE и LTD). Все эти механизмы лежат в основе развития эксайтотоксичности, нарушений морфологии и функции КП. Таким образом, получены новые данные о фундаментальных механизмах развития нейродегенерации мозжечка. Также полученные в этом исследовании результаты демонстрируют, что астроглиоз является объединяющим признаком различных нейродегенеративных заболеваний мозжечка, в том числе и СЦА1.

Теоретическая значимость работы

Теоретическое значение данной работы состоит в расширении представлений о механизмах развития нейродегенерации в КП мозжечка мышей. Данная работа имеет значение для фундаментальной науки в области исследования роли астроглии и патологических механизмов, которые можно использовать при разработке терапевтического подхода к лечению СЦА1 и других нейродегенеративных заболеваний мозжечка. Это позволило бы применять эффективные стратегии лечения до потери клеток или необратимого

нарушения функций нейронов, также результаты исследования выявляют потенциальные цели лечения.

Практическая значимость

Разработаны модели ранней стадии астроглиоза с использованием протокола оптогенетики – модель с хронической фотоактивацией ГБ, экспрессирующей ChR2, и модель с экспрессией мутантного атаксина 1 в астроцитах, которые позволяют изучать механизмы патологических процессов на начальных этапах нейродегенерации мозжечка до появления клинических признаков патологии.

Доказано влияние активированных астроцитов на транссинаптическую передачу импульсов при патологическом процессе в мозжечке. Понимание механизмов возникновения патологии позволит применять более эффективные методы лечения, направленные на причину заболевания, тогда как сейчас возможно только симптоматическое лечение.

Методология и методы исследования

В работе использовались иммуногистохимическое исследование срезов мозжечка, электрофизиологический метод локальной фиксации потенциала мембраны клеток, тестирование животных с выявлением нарушений функции мозжечка (тест на вращающейся дорожке), методы оптогенетики, стереотаксическое введение веществ в кору мозжечка, генетические методы исследования (ПЦР). Работа проведена на переживающих срезах мозжечка мышей линии CD1 и трангенных мышях линии C57BL/6. Достоверность полученных данных подтверждена методами математической статистики.

Положения, выносимые на защиту

1. Избыточная активация глии Бергмана нарушает её морфологию и отрицательно влияет на морфологию клеток Пуркинье.
2. Избыточная активация глии Бергмана влияет на синаптическую передачу в виде удлинения времени спада ПВ ВПСТ вследствие нарушения обратного захвата нейромедиатора из синаптической щели через снижение экспрессии EAAT1.
3. Избыточная активация глии Бергмана нарушает синаптическую пластичность (PPF, DSE и LTD) в синапсах нейронов коры мозжечка.
4. Центральным механизмом патогенеза при неспецифическом и специфическом астроглиозе мозжечка, вызванном действием мутантного атаксина 1, является эксайтотоксичность.

Степень достоверности

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

Личный вклад соискателя

Автором были определены цели и задачи, разработан дизайн исследования, отработаны протоколы экспериментальной части работы. Автором самостоятельно набран материал для исследований, проведено поведенческое

исследование животных, иммуногистохимические исследования, моделирование патологии на животных (совместно с к.м.н. Шуваевым А.Н.), ПЦР (совместно с н.с. Хилажевой Е.Д.), электрофизиологические эксперименты и оптогенетическая стимуляция (совместно с к.м.н. Шуваевым А.Н.). Автором проведена статистическая обработка данных, полученных в ходе исследований, и интерпретация полученных результатов; подготовка публикаций и оформление рукописи диссертации.

Апробация работы

Данные, полученные в работе, были доложены на международных конференциях в виде устных и стендовых докладов: на «Russia-Japan medical symposium», г. Красноярск, 2018 г.; «II Всероссийской научной конференции с международным участием «ОПТОГЕНЕТИКА+ 2020», г. Санкт-Петербург, 2020 г.

По результатам работы опубликовано 8 печатных работ в журналах, индексируемых аналитическими базами Scopus, Web of Science, RSCI, в том числе в журналах, рекомендованных ВАК для публикации материалов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук.

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

Структура и объем диссертации

Диссертация оформлена в соответствии с Национальным стандартом Российской Федерации ГОСТ Р7.0.11-2011. Материал диссертации изложен на 130 страницах машинописного текста, иллюстрирован 36 рисунками и 7 таблицами. Работа состоит из введения, 4 глав (обзор литературы, материалы и

методы, результаты, обсуждение результатов), заключения, выводов, списка сокращений, списка литературы. Список литературы включает 195 источников, в том числе 10 отечественных и 185 зарубежных.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Спинаocerebellарная атаксия

Спинаocerebellарные атаксии (СЦА) – группа наследственных прогрессирующих нейродегенеративных заболеваний, характеризующихся медленно прогрессирующей дискоординацией походки, движений рук, речи и глаз и т.д. [154]. На сегодняшний день охарактеризовано 40 типов СЦА. Были идентифицированы мутации 28 генов, вызывающих СЦА [173].

Наследственные атаксии классифицируются по типу наследования и гену (или хромосомному локусу), в котором происходят мутации. Возможные типы наследования этого заболевания: аутосомно-доминантный, аутосомно-рецессивный, х-сцепленный, митохондриальный.

АДСЦА (аутосомно-доминантные спинаocerebellарные атаксии) – наиболее часто встречаемые заболевания в группе СЦА, их распространённость составляет приблизительно 1-5 на 100 000 человек [179, 148, 165]. Частота отдельных генетических форм АДСЦА в различных популяциях значительно варьируется, но больше 70% приходится на четыре формы – СЦА1, СЦА2, СЦА3 и СЦА6 [2, 18].

СЦА относятся к группе полиглутаминовых заболеваний – наследственных нейродегенеративных заболеваний, вызванных динамическими мутациями – увеличением числа тринуклеотидных повторов ЦАГ, которые кодируют аномально удлинённую глутаминовую последовательность в соответствующих мутантных белках [124]. Количество тринуклеотидных повторов может значительно варьироваться. Наибольшие экспансии вызывают заболевание в детском или подростковом возрасте, проявляющееся распространённой дистонией, спастичностью и атаксией. Напротив, меньшие экспансии приводят к поздней атаксии, обычно с развитием периферической невропатии и потерей моторных нейронов [47, 84, 106, 171].

Также возможны премутации – мутантные нормальные (промежуточные) аллели, в которых наблюдается умеренное увеличение числа тринуклеотидных

повторов, и возможны незначительные отличия в нуклеотидной последовательности по сравнению с устойчивыми аллелями. Такие аллели не вызывают явные клинические проявления, но они могут привести к увеличению числа тринуклеотидных повторов в следующем поколении, что вызовет раннее начало или более тяжелую форму болезни у потомков (явление антиципации) [2]. Число тринуклеотидных повторов также может оставаться стабильным или даже сокращаться при передаче последующим поколениям.

1.2. СЦА1

1.2.1. Распространение СЦА1

Одной из наиболее частых форм СЦА является спинномозжечковая атаксия типа 1 (СЦА1). Около трети всех случаев АДСЦА приходится на СЦА1 [5]. Ориентировочная распространённость СЦА1 составляет 1-2 случая на 100 000 человек, но её распространённость весьма вариабельна в различных популяциях [67, 101, 114, 179] (таблица 1). Особенно крупный кластер СЦА1 выявлен в Якутии: достоверные сведения получены о больше, чем 200 больных из большого числа семей, которые по результатам анализа гаплотипов связаны между собой единым происхождением [8, 9, 62]. Распространённость СЦА1 в якутской популяции в настоящее время достигла чрезвычайно высокой цифры – 46-48 больных на 100 000 населения и продолжает расти [141]. Среди различных форм наследственных атаксий в Якутии СЦА1 встречается больше чем у 80% всех семей. Высокую распространённость заболевания среди якутов по сравнению с общемировой заболеваемостью называют «сибирским очагом». Особенно высокий уровень наблюдается в Абыйском и Усть-Алданском улусах Якутии, для которых характерны однородный национальный состав, высокий уровень рождаемости, низкий уровень миграций, что, вероятно, способствует распространению мутации [6, 7].

Таблица 1 – Распространённость СЦА1 в мире

Страна	Распространённость, % от случаев АДСЦА	Источник
Польша	68	81
Россия	34	71
Сербия	34	46
Италия	30	24, 133
Великобритания	30	133
Япония	25	120
Индия	22	110
Венесуэла	17	130
Северная Америка	6	84

1.2.2. Клинические проявления СЦА1

СЦА1 характеризуется прогрессирующей атаксией мозжечка, дизартрией и возможным ухудшением бульбарных функций [124, 195]. В начале заболевания у больных наблюдаются нарушение походки, трудности с координацией, значительное повышение сухожильных рефлексов, гиперметрические саккады, нистагм, невнятная речь и легкая дисфагия. С течением времени происходит замедление саккадической скорости, развитие вертикального пареза взора, развивается гипотония, дисметрия, диadoхокинез. На поздних стадиях болезни наблюдаются атрофия мышц, потеря проприоцепции, снижение глубоких сухожильных рефлексов, когнитивные нарушения (например, нарушение словесной памяти), дистония, хорей и бульбарная дисфункция [26].

СЦА1 обычно манифестирует в третье или четвёртое десятилетие, однако, наблюдались и случаи начала в детстве и пожилом возрасте. В случае возникновения СЦА1 в пожилом возрасте заболевание может иметь чисто мозжечковый фенотип. Интервал от начала заболевания до смерти колеблется в пределах от 10 до 30 лет. В случае манифестации СЦА1 в детском возрасте

отмечаются более быстрое прогрессирование и более тяжелые симптомы заболевания. Ювенильная СЦА1 характеризуется тяжелой дисфункцией ствола головного мозга в дополнение к мозжечковым симптомам. Дисфункция ствола головного мозга развивается быстро и приводит к смерти в течение четырёх-восьми лет с начала появления первых симптомов.

У людей может наблюдаться умеренное снижение памяти, вербального и невербального интеллекта. Степень когнитивных нарушений коррелирует с тяжестью заболевания [25].

По мере прогрессирования СЦА1 патологические процессы отмечаются и в других областях головного мозга, включая глубокие мозжечковые ядра, особенно зубчатое ядро, нижнюю оливу, мосты и красные ядра [132, 158]. Компьютерная томография и магнитно-резонансная томография головного мозга выявляют атрофию моста и мозжечка [43], атрофию ствола мозга, включая как серое, так и белое вещество [59], и спинного мозга [104, 134].

При электрофизиологическом обследовании можно зарегистрировать замедление времени периферического и центрального моторного проведения. Морфологически СЦА1 характеризуется типичной картиной оливопонтocerebellарной атрофии: отмечаются дегенерация коры мозжечка (в первую очередь КП) и демиелинизация его белого вещества, дегенерация нижних олив, ядер и поперечных волокон моста мозга [2, 45, 124, 145]. В процесс могут вовлекаться также проводящие пути спинного мозга (чаще всего отмечается значительная потеря аксонов в задних столбах и спиноцереbellарных трактах), клетки передних рогов, дентаторубральная система и кора больших полушарий. Измерения метаболитов, таких как N-ацетиласпартата и миоинозитола, свидетельствуют о потере нейронов в мозжечке, мосту и в зубчатом ядре [126, 149, 192].

1.2.3. Атаксин 1 в норме и патологии

СЦА1 является первой среди доминантно наследованных атаксий, для которой были идентифицированы локус и дефектный ген. СЦА1 – классическое полиглутаминовое заболевание – обусловленное экспансией тандемных ЦАГ-повторов в кодирующей области гена *ATXN1*, расположенного на хромосоме 6p23 [123, 124, 195].

Нормальный атаксин 1, кодируемый этим геном, имеет от 792 до 829 аминокислот, в зависимости от количества повторов ЦАГ. Нормальный ген *ATXN1* содержит от 6 до 35 повторов, тогда как в мутантных генах число ЦАГ-триплетов увеличено – от 41 до 83 [122]. При этом в нормальных аллелях гена обычно повторы более 21 прерваны вставками ЦАГ-триплетов (от одного до трёх), которые не наблюдаются в мутантных генах. Их наличие считается важным фактором стабилизации нормальных аллелей при мейозе; возможно, ранним этапом в превращении нормального и генетически стабильного аллеля в нестабильный (мутантный) является утрата этих вставок. Промежуточные аллели гена *ATXN1* содержат 36-39 повторов (без ЦАГ-вставок) и не ассоциируются с фенотипом болезни, однако они могут при передаче такого гена в следующее поколение мутировать в патологические удлинённые ЦАГ-последовательности [2, 72, 109].

Атаксин 1 – РНК-связывающий белок, ассоциируется с крупными белковыми комплексами и взаимодействует с обширной сетью белков.

К настоящему времени выявлено несколько белков – регуляторов транскрипции, которые взаимодействуют с атаксином 1 и могут быть возможными медиаторами патогенеза СЦА1. К ним относятся PQBP, SMRT, *Caricua* CIC, SMRTER, HDAC3, GFI-1 и ROR α [34, 53, 119, 152, 178]. Атаксин 1 также влияет на экспрессию Homer-3, G-substrate, EAAT4, CARP, IP3R1 в КП, которые являются регуляторами пути передачи сигналов глутамата в КП [85]

Белок может варьировать по своим размерам и свойствам электрофоретического движения в зависимости от числа повторов ЦАГ.

Считается, что удлинённая полиглутаминовая последовательность приводит к неправильной структуре мутантного атаксина 1, приводящей к образованию нерастворимых агрегатов [27, 91]. Растворимый атаксин 1 взаимодействует со многими белками, исследования таких взаимодействий показали, что удлинение полиглутаминовой последовательности в атаксине 1 вызывает как доминирующее усиление их функции, так и её потерю. Было показано, что другие белки нейронов могут модулировать образование агрегатов атаксина 1 и что это, в свою очередь, может влиять на индуцированную агрегатом токсичность [80, 138].

Исследования на трансгенных мышах продемонстрировали, что хотя мутантный атаксин 1 должен проникать в ядро КП, чтобы вызвать заболевание, образование включений само по себе не требуется для инициации заболевания [80], тогда как неправильная укладка и нарушение деградации мутантного атаксина 1, вносит вклад в патогенез [35-37].

Также имеет значение в патогенезе СЦА1 нарушение нормальной функции атаксина 1. Это подтверждают результаты ряда исследований, в которых отмечаются сходства у трансгенных мышей СЦА1 $ATXN1^{82Q/2Q}$, $ATXN1^{154Q/2Q}$, и мышей $ATXN1^{-/-}$, которые повторяют ключевые особенности этого заболевания [34, 105, 121, 175]. В исследовании на модели сверхэкспрессией белка, подобного атаксину 1 – Ataxin 1-Like – было выявлено уменьшение патогенеза СЦА1 путем компенсации частичной потери функции атаксина 1, что подтверждает вклад потери функции атаксина 1 в развитие СЦА1 [22].

Предположительно, критически важным является время экспрессии мутантного атаксина 1, от которого зависит тяжесть нейродегенерации у взрослых мышей. Это, вероятно, является результатом нарушения экспрессии ROR α -опосредованных генов мутантным атаксином 1, которые подавляются на ранней стадии заболевания в КП мышей СЦА1 [151]. Задержка экспрессии мутантного атаксина 1 до момента завершения созревания мозжечка значительно снижает восприимчивость взрослых КП к нейродегенерации, индуцированной мутантным атаксином 1 [152].

Другие модификаторы нейродегенерации, вызванной атаксином 1, включают компоненты процессинга РНК, регуляторы транскрипции вместе с ключевыми генами, неправильно регулируемые при СЦА1, и пути процессинга белка [121, 155]. Исследования секвенирования мозжечковой РНК с использованием трансгенных мышей, экспрессирующих АТХN1^{82Q/2Q}, выявили что экспрессия генов, участвующих в синаптической долговременной депрессии (LTD) и глутаматэргической передаче сигналов, изменяется у трансгенных мышей по сравнению с контрольной группой. Изменения в экспрессии рецепторов и ионных каналов, которые важны для регуляции возбудимости мембран, способствуют появлению структурных изменений в нейронах, что может привести к нарушению моторной функции и гибели клеток [41, 142]. Вероятно, что атаксин 1 участвует более чем в одном пути в КП, причем каждый путь вносит определенный вклад в патогенез СЦА1 (рисунок 1).

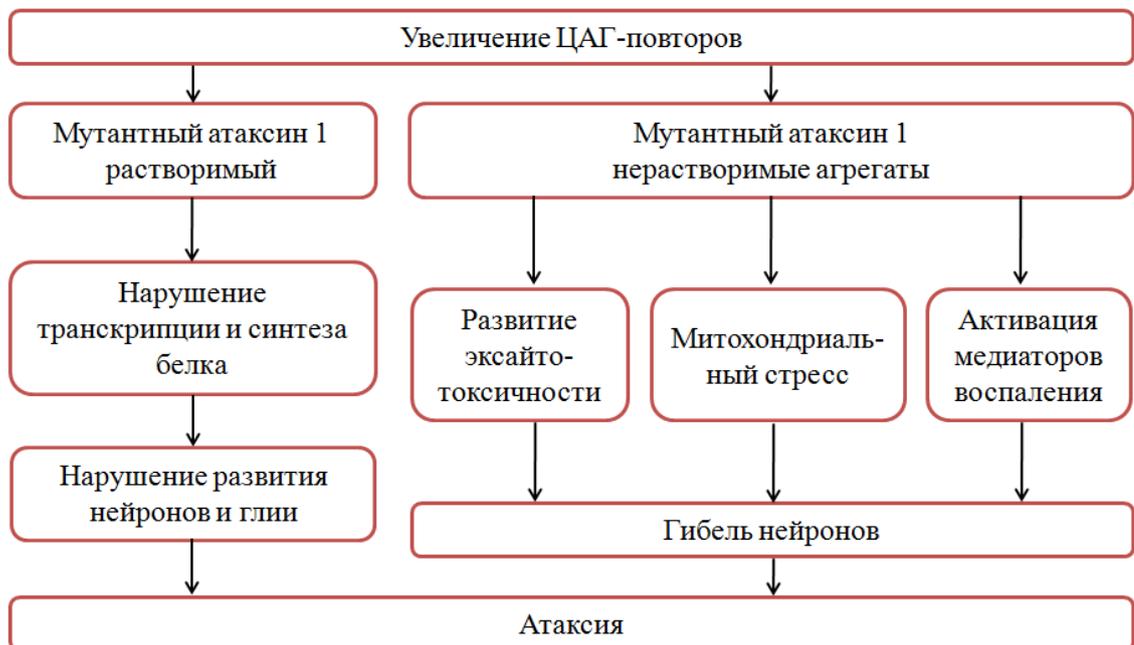


Рисунок 1 – Схема патогенеза СЦА1.

Иммуноблотинг продемонстрировал, что белок атаксин 1 присутствует в различных областях мозга и в ненейрональных тканях, таких как сердце, скелетные мышцы и печень. Также мутантный атаксин 1 экспрессируется как в

нейронах, так и в астроцитах [159]. В то время как в ненейрональных тканях он расположен преимущественно в цитоплазме, в нервной ткани он обнаруживается в ядрах в нейронах базальных ганглиев, моста и коры, а также как в цитоплазме, так и в ядрах клеток КП мозжечка [153]. КП трансгенных мышей являются последним типом нейронов, образующих включения обычно через 30 недель, но они показывают самые серьезные признаки патологии, начиная с 10 недель. Напротив, нейроны в коре головного мозга образуют включения на 6 неделе и не обнаруживают признаков патологии [188].

Таким образом, патогенез зависит от длины полиглутаминовой последовательности, уровня белка и продолжительности воздействия мутантного белка на нейроны [96]. В патогенез СЦА1 вовлечены разные клеточные пути, и для разработки новых методов лечения необходимо исследовать какие механизмы являются ключевыми в патогенезе СЦА1. Воздействие на эти звенья позволит защитить нейроны от дегенерации.

1.2.4. Существующие методы лечения

Лечение больных СЦА1 остается поддерживающим, симптоматическим, так как не существует известной терапии для задержки или остановки прогрессирования заболевания. Поэтому очень важна своевременная диагностика. Современные методы нейровизуализационных и нейрофизиологических исследований и верификация диагноза с помощью ДНК-анализа позволяют диагностировать СЦА1 на ранних стадиях. Также, как и при других наследственных заболеваниях, для предотвращения случаев заболевания в последующих поколениях в семьях с больными СЦА необходимы медико-генетическое консультирование и пренатальная ДНК-диагностика [61, 73].

Больные должны получать специализированное лечение у невролога и консультироваться терапевтом, а также другими специалистами по мере необходимости. Необходимо постоянное наблюдение врачей, неврологическая оценка каждые три-шесть месяцев. Больным назначают препараты

способствующие улучшению обмена веществ, витамины, ноотропы. При наличии спазмов мышц – миорелаксанты, при непроизвольных движениях – противосудорожные препараты. Назначают массаж, лечебную физкультуру, электростимуляцию мышц. Было показано, что интенсивная реабилитация (в том числе, координационная физиотерапия) улучшает двигательную функцию в гетерогенной группе лиц с различными типами дегенерации мозжечка [68, 69, 112].

Появляющиеся данные о механизмах, лежащих в основе полиглутаминовых заболеваний, позволяют предположить, что их можно лечить двумя основными терапевтическими путями.

Первый путь заключается в снижении уровня мутантных белков. Учитывая, что мутантные полиглутаминовые белки могут нарушать экспрессию генов, гомеостаз РНК и белков различными путями с множеством последствий, действие на начальных этапах в каскадах патологических реакций является наиболее привлекательной стратегией для разработки терапии заболевания. Для снижения уровня токсического белка можно использовать антисмысловые олигонуклеотиды или опосредованную вирусом доставку коротких шпилечных РНК или искусственных микроРНК для вмешательства в трансляцию. Доклинические испытания антисмысловых олигонуклеотидов или препаратов на основе микроРНК для лечения СЦА1, СЦА2, СЦА3 и СЦА6 [76] показывают большие возможности для регулирования патологического процесса. Несомненно, недавние успехи в клинических испытаниях препарата на основе антисмысловых олигонуклеотидов для лечения спинальной мышечной атрофии демонстрируют, что доставка олигонуклеотидов в ЦНС люмбальной пункцией является приемлимым терапевтическим подходом [17].

Второй путь заключается в фармакологической модуляции нарушенных путей передачи сигнала в мозжечке. Большое количество исследований механизмов нейродегенераций позволяют предположить возможные молекулы-мишени для модуляции синаптической передачи при СЦА1, что позволит улучшить двигательную активность и замедлить прогрессирование болезни. Но

для разработки действенной терапии необходимо учитывать все компоненты синапса и иметь представление о взаимодействии между ними при патологических процессах, что требует дополнительных исследований.

1.3. Влияние глии на синаптическую передачу

Астроциты классически рассматривались как поддерживающие нейроны клетки, не играющие значительной роли в обработке информации нервной системой. Однако значительное количество доказательств, полученных за последние десятилетия, продемонстрировало существование двунаправленной связи между астроцитами и нейронами [13, 51, 131].

Для описания коммуникации между нейронами и астроцитами был предложен термин «трёхкомпонентный синапс» [137]. В соответствии с этой концепцией, помимо классического «двустороннего» информационного потока между пре- и постсинаптическими нейронами, астроциты обмениваются информацией с синаптическими нейронными элементами, отвечая на синаптическую активность и, в свою очередь, регулируя синаптическую передачу [131]. Таким образом, трёхкомпонентный синапс состоит из нейронального компонента (пресинапса и постсинапса) и глиального компонента (астроцита).

Астроциты регулируют синапсы путем прямого контакта и путем секретирования растворимых факторов – глиотрансмиттеров, которые нацелены на пре- и постсинаптические сайты, тем самым модулируя структуру и функцию как возбуждающих, так и тормозных синапсов. Помимо контакта с нейронами, астроциты связаны друг с другом щелевыми соединениями – специализированными каналами, которые позволяют питательным веществам, ионам или нейромедиаторам диффундировать между сетями астроцитов [167], что даёт астроцитам дополнительные возможности для регуляции синаптической передачи.

Глиальные клетки, астроциты и микроглия, выполняют множество сложных функций, важных для гомеостаза головного мозга [97, 187]. Астроциты не только поддерживают метаболические потребности нейронов, но также помогают регулировать ионную среду, необходимую для оптимального функционирования нейронов и поддерживают уровень нейромедиаторов, особенно в синаптических щелях, и участвуют непосредственно в передаче сигналов, высвобождая такие вещества, как глутамат, АТФ, ГАМК [102, 180]. Глия играет ключевую роль в формировании связей мозга и пластичности, удалении клеточного мусора и в модулировании воспалительных реакций [50, 97].

Глия Бергмана (астроглия, эпителиальные клетки Гольджи, ГБ) является радиально-ориентированными астроцитами в мозжечке, которые имеют клеточные тела в слое КП (СКП) (в среднем 3-8 клеток на одну КП) и отростки, которые распространяются в молекулярный слой (МС). Было подсчитано, что каждая клетка глии работает вокруг 2000-6000 синапсов КП. Они занимают около 15%-18% МС в мозжечке. Размер и форма отличаются в зависимости от вида животного [77]. Клетки ГБ экспрессируют много переносчиков глутамата, которые ограничивают диффузию нейротрансмиттера при его высвобождении из синаптических окончаний [29].

Глутамат является основным возбуждающим нейромедиатором в большинстве областей ЦНС и высвобождается из пресинаптического окончания нейрона. После того как молекула глутамата связывается с молекулой рецептора в постсинаптической мембране и оказывает своё действие, её необходимо удалить, чтобы предотвратить дальнейшую возбуждающую или ингибирующую трансдукцию сигнала и позволить постсинаптической мембране получать новые сигналы из соседних нервных клеток. Глутамат быстро удаляется из внеклеточного пространства под действием переносчиков возбуждающих аминокислот (ЕААТ) [128]. Два подтипа глиальных ЕААТ (ЕААТ1/GLAST и ЕААТ2/GLT1) распределяются на мембранах астроцитов вблизи возбуждающих синапсов [180]. ЕААТ1 и ЕААТ2 предотвращают накопление внеклеточного глутамата и чрезмерную стимуляцию рецепторов глутамата [193]. Переносчики

глутамата также способствуют независимости синапсов, ограничивая выброс глутамата в соседние синапсы и на внесинаптические рецепторы, и модулируют интенсивность и продолжительность постсинаптической активации.

В астроцитах глутамат превращается в глутамин [128], не нейровозбуждающую аминокислоту, и переносится обратно в нейроны для преобразования в глутамат (глутамат-глутаминовый цикл). Затем в пресинапсах глутамат собирается в синаптические везикулы с помощью везикулярных транспортеров глутамата (VGLUT). После пресинаптической деполяризации нейронов кальциевые каналы открываются, обеспечивая приток кальция и запуская слияние пузырьков с мембраной, что приводит к экзоцитозу глутамата в синапс (рисунок 2).

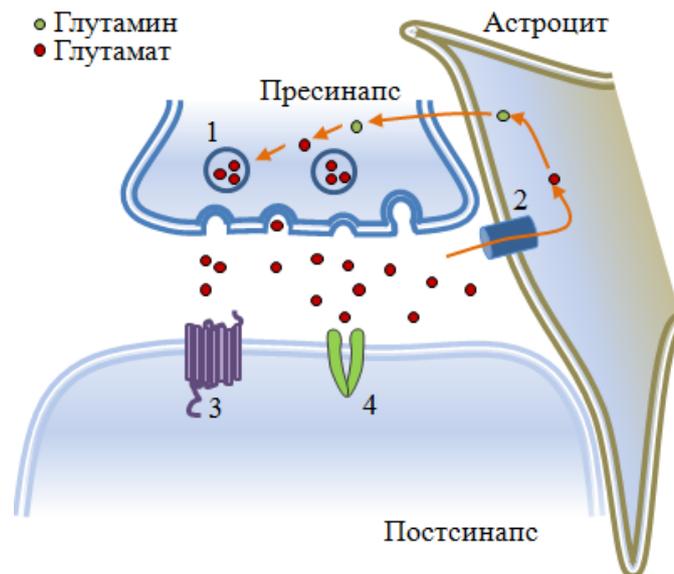


Рисунок 2– Трёхкомпонентный синапс. На рисунке обозначены: 1 – синаптические везикулы с глутаматом; 2 – транспортёр глутамата в астроциты ЕААТ; 3 – метаботропный рецептор глутамата; 4– ионотропный рецептор глутамата.

Попадая во внеклеточное пространство, глутамат может связываться с ионотропными (iGluR) или метаботропными глутаматными (mGluR1-8)

рецепторами. IGLuR включают NMDA-рецепторы, AMPA-рецепторы и KA-рецепторы [15].

AMPA-рецепторы обнаружены во многих частях мозга и являются наиболее часто встречающимися рецепторами в нервной системе, они отвечают за передачу быстрых возбуждающих сигналов в синапсах [168]. Рецепторы NMDA не участвуют в быстрой синаптической передаче. При потенциале покоя канал рецептора NMDA блокируется магнием в зависимости от напряжения. Удаление магния требует деполяризации постсинаптического нейрона, которая обычно происходит после того, как глутамат связывает рецепторы AMPA или KA, что приводит к притоку натрия. Кроме того, рецепторы NMDA требуют связывания глутамата, а также коагониста, глицина или D-серина, чтобы открыть ионный канал, позволяющий кальцию проникать в клетку [1, 118]. Повышенный приток кальция запускает сигнальные каскады, ведущие к установлению долговременной синаптической пластичности, процесса, который лежит в основе обучения и памяти [20, 99, 143]. Однако сверхактивация рецепторов NMDA приводит к избытку внутриклеточного кальция, который запускает серию событий, ведущих к развитию эксайтотоксичности и гибели клеток [3,15, 32, 86].

Регулирование внеклеточных концентраций глутамата имеет большое значение. Чрезмерная стимуляция может разрушить синаптическую регуляцию, что приведет к изменениям в обучении и памяти и к развитию нейродегенерации. Поскольку внеклеточные ферменты, разрушающие глутамат, отсутствуют, единственный способ прекратить передачу сигналов и сохранить низкий уровень внеклеточного глутамата – это поглощение глутамата астроцитами.

Таким образом, астроциты активно участвуют в синаптической передаче и пластичности за счет секреции нейроактивных веществ и активного удаления нейромедиаторов из синаптической щели. Хотя в последнее время был достигнут значительный прогресс в изучении роли астроцитов, сигнальные механизмы секреции и поглощения активных веществ перисинаптическими астроцитами всё еще в значительной степени не исследованы [128].

1.4. Астроглиоз

Исследования последних лет показывают, что в развитии многих нейродегенеративных расстройств замешаны и токсические эффекты глиальных клеток на нейроны [89, 174]. В отношении СЦА 1 влияние астроцитов и микроглии на патогенез всё ещё слабо изучено.

Микроглия и астроциты реагируют на поражение мозга, создавая мультимодальное воспалительное состояние, и действуют как основные защитники и исполнители нейровоспалительных структурных и функциональных изменений [21, 146]. Микроглия и астроциты также играют важную роль в созревании нейронов и поддержании нормальной функции мозга [31, 187]. Этот сложный баланс гомеостатических и нейровоспалительных функций может влиять на начало и течение нейродегенеративных заболеваний.

Астроглиоз (астроцитоз, реактивация астроцитов) является аномальным увеличением числа астроцитов и их чрезмерной активации из-за разрушения соседних нейронов при травме ЦНС, инфекции, ишемии, инсульте, аутоиммунных реакциях и нейродегенеративных заболеваниях [89]. Астроглиоз изменяет молекулярную экспрессию и морфологию астроцитов [92, 167]. Они защищают клетки и ткань ЦНС различными способами, например, через поглощение потенциально эксайтотоксического глутамата, высвобождение аденозина и деградацию амилоидных β -пептидов.

Существует много исследований, изучающих роль астроцитов и микроглии в моделях нейродегенеративных заболеваний на животных. В исследованиях видна двойственная роль активированных астроцитов: глия может обладать нейропротективным действием, особенно на ранних стадиях нейродегенерации, но также реактивные астроциты и микроглия проявляют эксайтотоксические эффекты и усугубляют нейродегенерацию [42, 88, 111, 140, 181]. Например, в модели СЦА1 было продемонстрировано избыточное выделение белка S100 β реактивными астроцитами и его поглощение КП [183]. При патологических

состояниях чрезмерная внеклеточная концентрация S100 β стимулирует выработку провоспалительных цитокинов и вызывает апоптоз [169] (рисунок 3). Также и при других нейродегенеративных заболеваниях, например, таких как, болезнь Альцгеймера, амиотрофический склероз и болезнь Паркинсона, астроциты и микроглия активируются с изменением их морфологии и функции, включая выделение провоспалительных цитокинов, что может отрицательно сказаться на выживаемости нейронов [11, 19, 28, 60, 115, 140, 182].

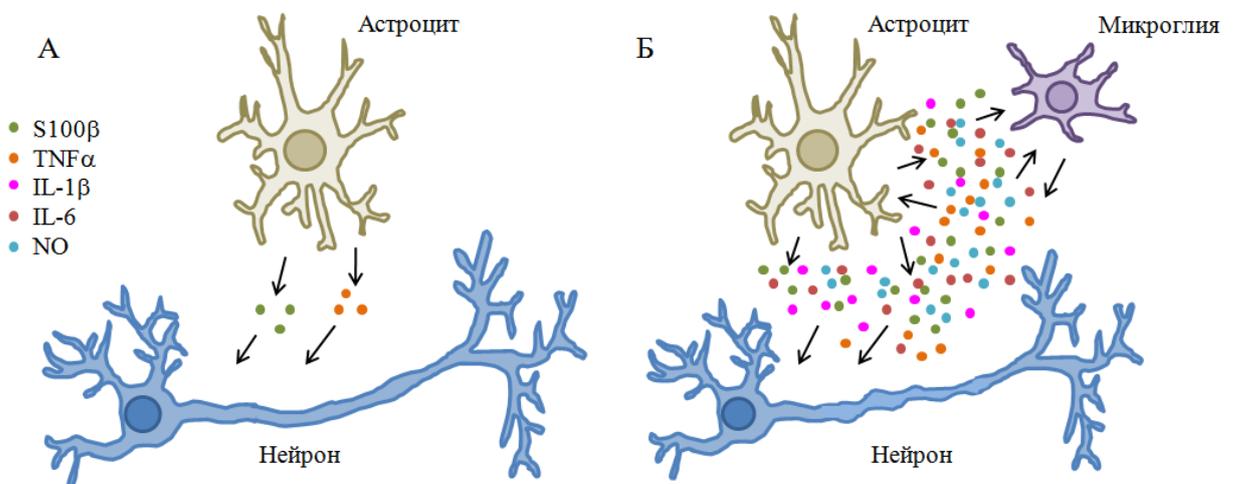


Рисунок 3 – Взаимодействия астроглии и нейронов в норме (А) и при астроглиозе (Б). Активированная астроглия выделяет множество веществ, которые в норме не выделяются или выделяются в низких концентрациях.

Существует не так много исследований о роли астроцитов в развитии СЦА1. Svetanovich et al. выявили, что астроциты и микроглия активируются очень рано в патогенезе СЦА1, даже когда экспрессия мутантного атаксина 1 ограничивается КП – задолго до смерти нейронов или появления поведенческих симптомов атаксии. Во всех использованных ими моделях глиальная активация тесно коррелирует с прогрессированием болезни [40].

Учитывая тесное взаимодействие нейронов и глии в мозжечке, можно предположить, что избыточная активация глии может происходить в ответ на дисфункцию или смерть нейронов. С другой стороны активация ГБ может быть

следствием патогенного действия мутантного атаксина 1 внутри глии, и вызывать дегенерацию КП подобно тому, что наблюдается в СЦА7 [38, 54, 55].

Хотя СЦА1 влияет и на несколько других областей мозга с различной степенью поражения нейронов, активированные микроглия и астроциты обнаруживаются в мозжечке, но не в гиппокампе, т.е. в области, связанной с нейрональной патологией, это показывает, что астроглиоз может определять степень нейродегенерации [186].

В настоящий момент роль астроглиоза при СЦА1 не выяснена. Имеются данные, что на ранних стадиях ингибирование астроглиальной передачи сигналов NF-κB до начала моторного дефицита усугубляет тяжесть заболевания на мышинной модели СЦА1, однако, ингибирование астроглиального NF-κB во время поздней стадии заболевания улучшало моторный дефицит [78]. Также на снижение нейроподдерживающих функций указывает пониженная экспрессия в астроцитах и микроглии генов, участвующих в гомеостазе [39, 108]. Эти результаты показывают, что астроглиоз может играть решающую и двойственную роль в развитии СЦА1 [78, 105, 156, 172].

ГБ является основным компонентом глиальной реакции в мозжечке. В этих клетках происходит изменение экспрессии EAAT [159], что может служить основой морфологических и функциональных изменений, которые поддерживают синаптическую пластичность через глутаматные рецепторы.

В последнее время большое количество работ, посвященных изучению различных нейродегенеративных состояний, описывают и активацию глии [64, 115, 129, 185, 189]. Несмотря на это, роль астроглиоза в патогенезе нейродегенерации до сих пор не ясна. В исследованиях СЦА также очевидно участие астроцитов в патогенезе заболевания [38, 40, 54], но для полного понимания их роли в развитии нейродегенерации требуются дальнейшие исследования.

1.5. Модели СЦА1

В настоящее время для исследований механизмов развития СЦА1 используются различные модели мышей СЦА1.

Модель B05 ATXN1^{82Q/2Q} – трансгенные мыши СЦА1, которые сверхэкспрессируют человеческий атаксин 1 с 82 повторами глутамина. Мутантный ген контролируется специфичным промотором для экспрессии только в КП мозжечка [27]. У трансгенных мышей линии B05 развивается прогрессирующая потеря КП и функции мозжечка. Гомозиготные трансгенные мыши B05 становятся явно атаксическими в возрасте 6 недель, у гетерозигот атаксия начинается в возрасте 12 недель. Хотя эти животные атаксичны, они могут размножаться (с нормальным размером помёта) и прожить более одного года. В первые 8-10 недель жизни появляется начальный неврологический дефицит: тремор головы при ходьбе и лёгкая дискоординация, с последующим ухудшением, пока животные не станут явно атаксичными при ходьбе. После рождения наблюдается нормальное развитие мозжечка, к восьмой неделе начинает развиваться глиоз, на 24 неделе – атрофия дендритов и потеря нейронов [33].

Мыши ATXN1^{154Q/2Q}, у которых один аллель ATXN1 имеет 154 ЦАГ-повторов, а другой аллель имеет 2 ЦАГ-повтора, что является нормальным для мышей дикого типа [188]. У этих мышей мутантный ген находится под контролем своего эндогенного промотора, поддерживая широкомасштабную экспрессию мутантного ATXN1 в головном мозге на физиологических уровнях. Атаксия обнаруживается в возрасте 12 недель. С девятой недели начинается прогрессирующее развитие неврологического фенотипа вплоть до 20 недели, с 12 недели наблюдается атрофия дендритов и потеря КП, на 35-45 неделе – ранняя смерть. В отличие, от модели B05, в модели ATXN1^{154Q/2Q} экспрессия из эндогенного локуса гарантирует точные временные и пространственные паттерны экспрессии на эндогенных уровнях. Эти мыши СЦА1^{154Q/2Q} воспроизводят многие аспекты болезни человека и модель считается наиболее приближенной к СЦА1.

Модель ATXN1^{78Q/2Q} с экспрессией атаксина 1 с 78 повторами глутамина [96]. Сравнение этой модели с мышами ATXN1^{154Q/2Q} наглядно показывает зависимость патогенеза от длины полиглутаминовой последовательности. У мышей ATXN1^{78Q/2Q} наблюдается более мягкий моторный дефицит, возникающий через 6 месяцев. Гистологическое исследование ткани головного мозга мутантных мышей в возрасте до 18 месяцев не выявило ни одного из нейропатологических изменений, наблюдаемых в других трансгенных моделях со сверхэкспрессией удлинённых полиглутаминовых белков.

Для исследований нормальной функции атаксина 1 используются модели ATXN1^{-/-}, которые не экспрессируют атаксин 1, или гетерозиготы ATXN1^{+/-} для изучения 50% потери функции атаксина 1 [34, 105]. В этой модели нейродегенерация не описана.

Также используются трансгенные модели, с заменой серина 776 в атаксине 1. Исследования на этих моделях демонстрируют решающую роль сайта фосфорилирования атаксина 1 в патогенезе нейродегенерации. Например, линия ATXN1[82Q]-A776, где замена этого серина остатком аланина предотвращает токсичность удлинённого ATXN1 [49], и линия ATXN1[30Q]-D776, где замена остатка серина остатком фосфомиметического аспартата вызывает появление признаков СЦА1 даже в отсутствие патогенной полиглутаминовой последовательности [48, 49]

На вышеперечисленных моделях были выявлены ранние механизмы нейродегенерации, влияние атаксина 1 на экспрессию генов, взаимосвязь между образованием агрегатов и дисфункцией нейронов. Но все эти модели не позволяют изучить роль астроцитов в патогенезе СЦА1, так как в этих моделях атаксин 1 экспрессируется или только в КП (B05) или не специфично во всех клетках (ATXN1^{154Q/2Q}, ATXN1^{78Q/2Q}). Для исследования роли астроцитов необходимо создать другую модель СЦА1, что возможно сделать с применением методов оптогенетики.

1.6. Оптогенетика

Оптогенетика – это биологический метод управления активностью клеток с помощью света. Это достигается за счёт селективной экспрессии в клетках-мишенях светочувствительных ионных каналов, насосов или ферментов. На уровне отдельных клеток активируемые светом каналы, ферменты и факторы транскрипции позволяют точно контролировать биохимические сигнальные пути [157]. Первое исследование с использованием оптогенетического метода проведено в 2005 году с мембранным белком-каналом родопсином 2 (channelrhodopsin-2, ChR2) [23]. Оптогенетика была широко распространена для усиления или подавления активности нейронов, и в настоящее время проводится всё больше исследований функций астроцитов с применением оптогенетики.

С помощью методов молекулярной биологии создаются определённые генетические конструкции, доставляемые в клетки мишени различными способами. Включение в состав этих конструкций специфичных промоторов гарантирует, что продукты генов производятся только в определенных типах клеток. Это позволяет не только контролировать с помощью света запуск или блокирование определённых реакций, но и исследовать вклад отдельных клеток в эти реакции.

Вирусные конструкции относительно легко генерировать, и аденоассоциированный вирус наиболее широко используется для инфекции астроцитов. Более специфическое нацеливание может быть достигнуто путем вставки промотора, специфичного для астроцитов [87].

Избирательная экспрессия и фотостимуляция ChR2 в астроцитах приводит к увеличению притока кальция в течение миллисекунд, что приводит к активации нижестоящих сигнальных путей в астроцитах и последующему высвобождению цитокинов и глиотрансмиттеров, которые, в свою очередь, влияют на активность соседних нейронов в культуральных клетках и моделях *in vivo* [12, 52, 136]. Результаты исследований показали увеличение активности пирамидных нейронов гиппокампа в ответ на оптическую стимуляцию клеток астроглии [56, 57].

Хотя было показано, что оптогенетические манипуляции с астроцитами, экспрессирующими ChR2, модулируют как внутриклеточные сигналы Ca^{2+} , так и активность нейронов [136, 190], требуется определённое время, чтобы вызвать возбуждение нейронов, а также возбуждающую и тормозную синаптическую передачу [107]. Также конечный результат оптогенетической активации астроцитов зависит от области мозга. В исследовании астроцитов ствола мозга, экспрессирующих ChR2, их активация приводит к снижению pH с последующим высвобождением АТФ [63]. Фотостимуляция астроцитов мозжечка приводит к высвобождению глутамата и индукции долговременной депрессии синапсов ПВ-КП за счёт активации метаботропных рецепторов глутамата, что способствует нарушению двигательной активности, контролируемой мозжечком [150]. Важно отметить, что стимуляция астроглии может также преобразовать ее в реактивную глию, что может спровоцировать гибель нейронов и усугубить нейровоспаление [87].

Экспрессия и оптогенетическая активация метаботропного опсина Opto- $\alpha 1AR$ в астроцитах гиппокампа даёт возможность модулирования долговременной синаптической пластичности и потенциально может быть использована для нормализации синаптической передачи и пластичности при различных нейропатологических состояниях, включая модели болезни Альцгеймера [56, 87].

Археродопсин (Arch), управляемый светом протонный насос, является гиперполяризующим каналом в нейронах, и его активация блокирует высвобождение глутамата [12].

Трансфицированные меланопсином (Opn4-меланопсин человека) астроциты реагируют за более короткое время освещения, по сравнению с ChR2. Было обнаружено, что меланопсин задействует эндогенный G-белок и сигнальные пути IP3 в астроцитах и может индуцировать высвобождение АТФ/аденозина, который опосредует синаптическое усиление, и глутамата, ответственного за NMDA-зависимые медленные внутренние токи в нейронах зоны CA1 [107].

OptoSTIM1, который может обратимо и количественно модулировать внутриклеточные уровни Ca^{2+} за счёт активации CRAC – Ca^{2+} -каналов,

активируемых высвобождением Ca^{2+} , и результирующие сигналы Ca^{2+} могут быть декодированы Ca^{2+} -чувствительными сигнальными молекулами [83].

Таким образом, методы оптогенетики позволяют избирательно активировать астроциты и изучать механизмы высвобождения глутрансмиттеров, роль астроцитов в модулировании синаптической передачи. Так как астроциты тесно связаны с патогенезом различных нейродегенеративных заболеваний, поиск и разработка способов регулирования их активности становится актуальной задачей в лечении нейродегенеративных заболеваний. С помощью метода оптогенетики можно селективно активировать астроциты и изучить их вклад в патогенез нейродегенерации мозжечка при СЦА1.

Заключение

Таким образом, многочисленные исследования за последние годы демонстрируют, что в развитии различных нейродегенеративных заболеваний астроциты играют не последнюю роль. Несмотря на это имеются противоречивые данные о нейропротекторном или нейротоксическом действиях активированных астроцитов, и их роль в патогенезе нейродегенерации при СЦА1 до сих пор не ясна. Существующие модели СЦА1 не позволяют отдельно изучить вклад астроцитов в патогенез, так как экспрессия мутантного атаксина 1 затрагивает все клетки мозжечка или только КП. Изучив взаимодействия активированных астроцитов, их роль в развитии нейродегенерации, можно будет выявить клетки-мишени для патогенетической терапии СЦА1.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объект исследования

Для проведения исследований использовались мыши линии CD1 обоего пола, возраст – 12 недель. Для изучения роли астроцитов при нейродегенерации были созданы следующие модели *in vivo* животных: в первой группе в мозжечок мышей вводили белок S100 β ; для создания модели с селективной активацией ГБ вводили оптогенетическую конструкцию AVV GFAP-ChR2-mKate и хронически фотостимулировали ГБ; для создания модели нейродегенерации при СЦА1, вызванной экспрессией мутантного ATXN1[Q85] вводили LVV GFAP-ATXN1[Q85]-Flag. Для контроля в соответствующих моделях вводили мышам AVV GFAP-ChR2-mKate (без последующей фотостимуляции) или LVV GFAP-ATXN1[Q2]-Flag и сравнивали данные с показателями животных, получивших инъекцию фосфатно-солевого буфера (PBS). Для электрофизиологических исследований с целью исследования физиологической функции ГБ в СЦА1 модели проводили котрансфекцию LVV GFAP-ATXN1[Q2]-Flag и AVV GFAP-ChR2-mKate или LVV GFAP-ATXN1[Q85]-Flag и AVV GFAP-ChR2-mKate с последующей однократной кратковременной фотостимуляцией. Также использовались трансгенные мыши СЦА KI линии C57BL/6. Исследования выполняли после утверждения заявки и протокола на использование лабораторных животных на заседании биоэтической комиссии по работе с животными при локальном этическом комитете ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (выписка из протокола № 4 от 15.11.2017 г.).

2.2. Создание лентивирусных и аденовирусных векторов.

Для моделирования нейродегенерации использовались следующие конструкции: AVV GFAP-ChR2-mKate (для экспрессии белка-канала ChR2), LVV

GFAP-ATXN1[Q2]-Flag (кодирующий человеческий атаксин 1 с 2 повторами глутамина, ATXN1[Q2]) и LVV GFAP-ATXN1[Q85]-Flag (кодирующий патогенный ATXN1[Q85] с 85 непрерывными глутаминовыми повторами). Для достижения большого уровня экспрессии AVV и LVV векторов в ГБ был использован GFAP-промотор [93]. Методы конструирования AVV GFAP-ChR2-mKate и LVV описаны ранее [52, 63, 65].

AVV векторы нарабатывались в культурах НЕК 293, которые инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 2-3 суток до развития цитопатического эффекта, после чего вирусные частицы высвобождались с помощью сонификации. Дебрис удаляли центрифугированием (3000g x 10 мин). AVV очищали с помощью ультрацентрифугирования («OptimaX», «Beckmann Coulter») в градиенте CsCl. Аликвотированные образцы хранили при -80°C в течение 6 мес.

2.3. Моделирование нейродегенерации

1. Для создания модели астроглиоза вводили белок S100β в мозжечок мышей. Протокол создания изображён на рисунке 4А. Двенадцатинедельных (P84) мышей WT анестезировали внутрибрюшинной инъекцией раствора хлоралгидрата (400 мг/кг массы тела). Внутрибрюшинно вводили 25% маннитол в дозе 30 мл/кг массы тела для дегидратации головного мозга. Затем стереотаксически вводили 2,5 μл 50 μM S100β, растворённого в PBS, в кору червя мозжечка (долька VI) с помощью шприца Гамильтона на 10 μл. Через день после введения белка проводился забор материала.

2. Для создания модели селективной активации ГБ после анестезии и введения маннитола, описанных выше, мышам P84 вводили в кору червя мозжечка 10 μл AVV GFAP-ChR2-mKate ($3,7 \times 10^7$ ЕД/мл) с использованием стереотакса, затем стимулировали светом повторными импульсами в течение 4 дней (60-секундные последовательности импульсов (20/20 мс вкл/выкл) синего света с 60-секундными перерывами) (рисунок 4В). Перфорационное отверстие в

костях черепа расширяли до $2,5 \times 2,5$ мм для лучшего покрытия светом коры мозжечка. Светодиод фиксировали непосредственно над отверстием. Провод от диода к контроллеру был подвешен без натяжения и позволял мышам свободно перемещаться по клетке. Мышам первой контрольной группы также вводили 10 μ л AVV GFAP-ChR2-mKate ($3,7 \times 10^7$ ЕД/мл) в червь мозжечка, но не фотостимулировали. Для исключения токсического влияния AVV данные сравнивали с показателями животных, получивших инъекцию PBS (рисунок 4Б). Через 4 дня после введения оптогенетической конструкции проводился забор материала. Корректность введения конструкций оценивали по флуоресценции mKate методом иммуногистохимии.

3. У мышей следующей опытной группы моделировали нейродегенерацию путём интракортикального введения конструкций, селективно экспрессирующих белок атаксин 1 (рисунок 4Г). Трёхнедельных (P21) мышей CD1 анестезировали и вводили маннитол, как указано выше, и затем вводили 3 μ л LVV GFAP-ATXN1[Q85]-Flag ($6,8 \times 10^9$ ЕД/мл) в червь мозжечка. Мышам 2-й контрольной группы интракортикально в червь мозжечка инъецировали 3 μ л LVV GFAP-ATXN1[Q2]-Flag ($6,5 \times 10^9$ ЕД/мл). Исследования проводили после 9 недель экспрессии LVV в коре мозжечка (P84). Корректность введения конструкций оценивали по меткам анти-Flag методом иммуногистохимии.

4. Последняя опытная группа животных – трансгенная модель СЦА1 KI. Данные, полученные при исследовании созданных нами моделей, сравнивали с результатами модели максимально приближенной к течению СЦА1 у больных «СЦА1 KI» [188], с повсеместной экспрессией белка атаксина 1 с 154 повторами глутамина.

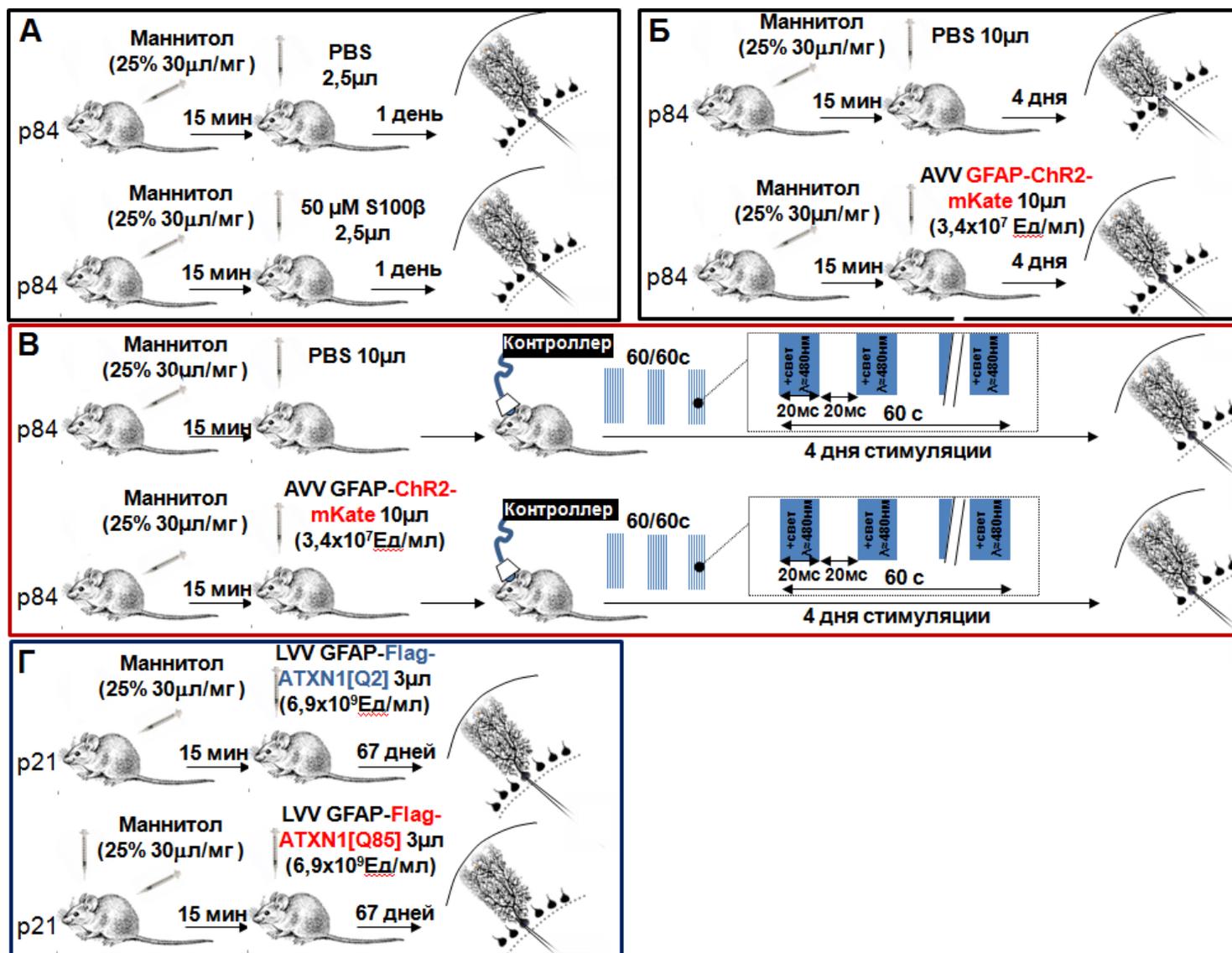


Рисунок 4 – Протокол создания моделей нейродегенерации. А – Модель астроглиоза, вызванного введением белка S100β. Б-В – Модель селективной активации ГБ^{ChR2} и протокол фотостимуляции. Г – Модель нейродегенерации, вызванной экспрессией мутантного атаксина 1.

2.4. Иммуногистохимическое исследование

Для иммуногистохимии мышей под анестезией транскардиально перфузировали 4% параформальдегидом в 0,1 М фосфатном буфере, проводили забор мозга и постфиксировали 4% параформальдегидом в течение ночи. Червь мозжечка разрезали на сагиттальные срезы по 50 μm .

После фиксации срезы промывали в PBS (3 раза по 5 мин), обрабатывали блокирующим раствором (Triton X-100), с последующим добавлением специфических антител. Срезы инкубировали с кроличьими моноклональными антителами к кальбиндину D-28k (1:500, Cloud-Clone Corp., Китай), куриными поликлональными антителами к GFAP (1:1000, Abcam, Великобритания), кроличьими поликлональными антителами к EAAT1 (1:500, Abcam, Великобритания), кроличьими поликлональными анти-Flag (1:500, Cloud-Clone Corp., Китай) и кроличьими поликлональными анти-EAAT2 (1:500, Abcam, Великобритания), кроличьими поликлональными антителами против S100 β (1:1000, Abcam, Великобритания), атаксина 1 (1:1000, Abcam, Великобритания) в течение ночи при 4°C.

После инкубации с первичными антителами срезы промывали в PBS (3 раза по 5 мин) и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре со вторичными антителами: Goat anti-Rabbit Alexa Fluor 514 (1:1000, Life Technologies), Goat anti-Rabbit Alexa Fluor 647 (1:1000, Life Technologies), Goat anti-Rabbit Alexa Fluor 488 (1:1000, Life Technologies), и Goat anti-Chicken Alexa Fluor 647 (1:1000, Life Technologies). Антитела растворяли в растворе PBS, содержащем 2% сыворотки, 0,1% TritonX-100 и 0,05% NaN_3 .

После инкубирования срезы промывали в PBS (3 раза по 5 мин). Переносили срез на предметное стекло, наносили монтирующую жидкость, накрывали срез покровным стеклом и микроскопировали с использованием конфокального микроскопа «Olympus FV 10i».

2.5. Конфокальная микроскопия и морфометрический анализ

Во всех группах для сравнения использовали VI и VII доли червя мозжечка. Флуоресцентные изображения получали с помощью конфокального микроскопа FV10i (Olympus, Япония). Изображения были записаны в виде Z-стеков с использованием объектива $\times 10$ и разрешения 1024×1024 . Для оценки двойной маркировки сравнивали изображения из одной и той же конфокальной плоскости. Толщину и количество отростков ГБ измеряли на конфокальных изображениях сагиттальных срезов мозжечка. Количество радиальных отростков ГБ подсчитывали на $100 \mu\text{м}$ МС. Отростки ГБ анализировали с использованием профилей интенсивности линии длиной $100 \mu\text{м}$, проведенной поперек слоя, где каждый глиальный отросток проявлялся в виде пика флуоресценции GFAP/Alexa Fluor 647. При этом отсекались сигналы интенсивностью менее 30% от максимальной интенсивности флуоресценции (рисунок 5А). Приблизительную длину дендритов КП оценивали по общей толщине МС, визуализируемого с помощью окрашивания анти-кальбиндин/Alexa Fluor 488 (рисунок 5Б).

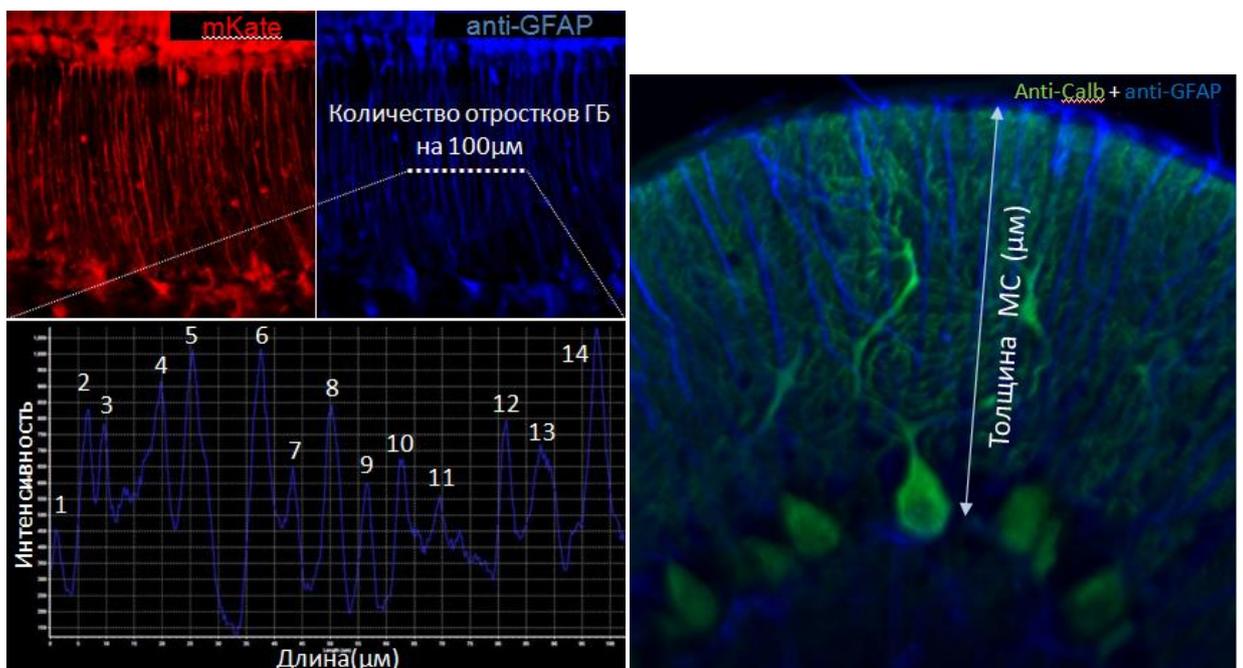


Рисунок 5 – Анализ конфокальных изображений коры мозжечка. А – Способ подсчёта количества отростков ГБ. Б – Подсчёт толщины МС.

2.6. Анализ Шолля клеток ГБ

Количественный морфологический анализ проводили в трехмерном (3D) режиме. Используя конфокальный лазерный сканирующий микроскоп (Olympus, Fluoview, FV10i), меченую анти-GFAP ГБ сканировали в Z-стеках (80–150 последовательных фокальных плоскостей с интервалами 0,25 μm). Для анализа Шолля Z-стеки сомы и отростков ГБ были прослежены в фокальных плоскостях с использованием программного обеспечения ImageJ. Был использован метод концентрических окружностей Шолля [161] с использованием режима ImageJ (набор вложенных концентрических сфер центрируется на теле клетки, а сферы увеличиваются в размерах на радиус 10 μm). Результаты анализа Шолля показали длину отростков и количество пересечений на каждые 10 μm .

2.7. Электрофизиология

Для приготовления живых срезов мышцы были глубоко анестезированы внутрибрюшинной инъекцией хлоралгидрата (400 мг/кг массы тела), декапетированы, вскрыта черепная коробка и забран головной мозг, с последующим охлаждением в ледяном растворе Рингера (234 мМ сахарозы, 2,5 мМ KCl, 1,25 мМ NaH_2PO_4 , 10 мМ MgSO_4 , 0,5 мМ CaCl_2 , 26 мМ NaHCO_3 , 11 мМ D-глюкозы), в течение 1 мин, с аэрацией смесью газов 95% O_2 и 5% CO_2 . Затем был выделен червь мозжечка и использовался для приготовления парасагиттальных срезов. Срезы (толщиной 250 μm) были нарезаны с помощью вибротома и инкубировались не менее 1 часа при комнатной температуре во внеклеточном растворе (125 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl, 1,25 мМ NaH_2PO_4 , 1 мМ MgCl_2 , 2 мМ CaCl_2 , 26 мМ NaHCO_3 , 10 мМ D-глюкозы и 0,1 мМ пикротоксина), который перфузировался 95% O_2 и 5% CO_2 .

Для записи использовались стеклянные электроды, заполненные внеклеточным раствором и внутриклеточным раствором (65 мМ K-глюконат, 65

мМ Cs-methanesulfonate, 10 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 4 мМ Na₂ATP, 1 мМ NaGTP, 20 мМ HEPES, 0,4 мМ EGTA и 5 мМ сахарозы (pH 7,3)). Электроды имели сопротивление от 2 до 4 МОм.

Стимуляцию и регистрацию осуществляли с помощью компьютера (программа «Pachmaster» («НЕКА»)) и усилителя «pClamp10» («Molecular Devices»). Полученные записи анализировали в программе Clampfit 10.5 (Axon Instruments). Регистрировались такие электрофизиологические характеристики клеток, как возбуждающие постсинаптические токи параллельных волокон (ПВ ВПСТ), усиление парных импульсов (PPF), ёмкость и сопротивление мембраны КП. Пассивные электрические свойства КП оценивали с помощью импульсов гиперполяризующего напряжения (от -70 до -80 мВ, длительностью 200 мс). Быстрая ёмкостная составляющая автоматически компенсировалась; сигнал дискретизировался на частоте 50 кГц и подвергался низкочастотной фильтрации на частоте 10 кГц. Потенциал мембраны КП были фиксирован на -70 мВ для регистрации AMPA-опосредованных ВПСТ после активации параллельных волокон. Селективную стимуляцию параллельных волокон подтверждали парным усилением амплитуд (PPF) ПВ ВПСТ (с интервалом в 50 мс).

Для записи астроцит-опосредованных эффектов на PPF ПВ ВПСТ записывали каждые 3 с. После записи стабильного уровня PPF в течение 3 мин для стимуляции ГБ^{ChR2}, был применён паттерн вспышек голубого света (20/20 мс света течение 60 с). Последующая регистрация PPF производилась в течение 4 мин. В экспериментах на срезах, содержащих ГБ^{ChR2}, перед записью патч-клэмп мы сначала подтверждали наличие флуоресценции mKate в этой области.

Для исследования индуцированного деполяризацией подавления возбуждения (DSE) каждые 3 с регистрировали ПВ ВПСТ. После мониторинга базальных ПВ ВПСТ в течение 1 мин КП раздражали одиночным деполяризующим импульсом (5 с от -70 до 0 мВ). Такое раздражение стимулирует открытие потенциалзависимых Ca²⁺-каналов (VGCC) и высвобождение эндоканнабиноидов, которые пресинаптически уменьшают высвобождение глутамата и подавляют амплитуду ПВ ВПСТ. Амплитуды последующих ПВ

ВПСТ нормализовали к среднему значению 12 ответов, вызванных до индукции DSE.

Для исследования длительного синаптического подавления (LTD) каждые 10 с регистрировали ПВ ВПСТ. После записи контрольных значений ПВ ВПСТ в течение 10 мин, КП раздражали 30 одиночными импульсами с частотой 1Гц вместе с 200 мс деполяризацией (от -70 до 0 мВ), что вызывает повышение внутриклеточной концентрации кальция и ведёт к эндоцитозу AMPA-рецепторов, и продолжали запись в течение 30 мин. Усреднённые амплитуды последующих ПВ ВПСТ за 5 минут нормализовали к среднему значению контрольных ответов, вызванных до индукции LTD.

2.8. Генотипирование

Для исследований использовали гетерозиготных по мутантному гену трансгенных мышей СЦА1 К1. Генотипировали однопомётных мышей от гетерозиготных самцов и здоровых самок. Генотипирование проводили методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (RT-PCR) на основе ДНК из кончиков хвостов трёхнедельных мышей (P21). ДНК очищали с использованием набора для выделения ДНК «ДНК-Экстран» («Синтол») в соответствии с инструкциями производителя. Подготовленные образцы вносили в пробирки со смесью для лизиса, перемешивали с помощью вортекса 5 с, затем инкубировали при температуре 56°C 10 мин с периодическим перемешиванием на вортексе. Затем смесь загружали в колонку для адсорбции и после двукратной промывки колонки ДНК элюировали из колонки с помощью специального буфера. Раствор выделенной ДНК далее использовался для проведения RT-PCR. В стандартную реакционную смесь (Taq-полимераза, ПЦР-буфер, dNTP, дистиллированная вода, SYBRGreen, («ПЦР-микс», «Синтол»)) добавлялись праймеры и выделенная ДНК. Используемые прямой и обратный праймеры имели следующие последовательности: 5'-GTG AGT TTG GGT CTG GCA TC-3' и 5'-ССА ААА GTT AGG ATC АСА GCC C-3', соответственно [177]. В качестве

внутреннего стандарта использовали GAPDH. Протокол термоциклирования состоял из начальной денатурации при 95°C в течение 5 мин, за которой следовали 45 циклов при 95°C в течение 15 с и 60°C в течение 1 мин.

2.9. Тестирование поведения животных

Для проверки координации использовали тест на вращающейся дорожке (rotarod). Беговая дорожка состояла из металлического стержня (3 см в диаметре), разделённого четырьмя большими круглыми пластинами (20 см в диаметре). Стержень ускорялся от 0 до 40 оборотов в минуту, а затем оставался на максимальной скорости, общее время теста – 5 минут. Каждую мышь тестировали в течение пяти дней по четыре испытания каждый день с 30 минутным отдыхом между испытаниями, и мы записывали время, которое мыши проводили на стержне, полученные данные за четыре попытки усреднялись. Тестирование мышей СЦА1 К1 проводили один раз в неделю в течение трёх недель. Каждый день тренировки животному давалось четыре попытки, данные усреднялись за один день тренировки.

2.10. Статистические методы и обработка данных

Для статистической обработки и представления данных использовали Excel (Microsoft). В экспериментах было использовано не менее 3 животных в каждой группе, до 15 независимых измерений на группу. Если данные в выборке отвечали нормальному распределению (оценка по критерию Колмогорова-Смирнова), то статистический анализ различий между группами проводили с помощью непарного или парного t-теста Стьюдента. При распределении, отличном от нормального, использовали U-критерий Манна-Уитни. При сравнении нескольких групп использовали ANOVA при нормальном распределении. При ненормальном распределении множественные сравнения проводились с помощью

непараметрического критерия Краскела-Уоллиса. Во всех случаях различия принимали значимыми при $p \leq 0,05$. Результаты представлены в виде $M \pm SD$, где M – среднее значение, SD – стандартная ошибка среднего, либо в виде $Me(Q1;Q3)$ где Me – медиана, $Q1$ и $Q3$ – нижний и верхний квартили.

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

$V_{step} = 10$ мВ [98]:

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

DSE анализировали с использованием уравнения двойной экспоненциальной формы сигнала

$$DSE = 100 + A \left(e^{-\frac{t}{\tau_1}} - e^{-\frac{t}{\tau_2}} \right) \left\{ A = \frac{100a\tau_1\tau_2}{\tau_1 - \tau_2} \right\} \quad (1)$$

Эта кривая удобна для предсказания изменений проводимости в синапсах [170]. Она содержит параметры, как для спада, так и для восстановления ВПСТ отдельно во время протокола DSE. Эта модель была подогнана к экспериментальным данным путем минимизации суммы квадратов остатков по Нелдеру-Миду, чтобы найти « A » – максимальное снижение ВПСТ в процентах от начального уровня, и « τ_1 » и « τ_2 » – периоды полураспада для ВПСТ, чтобы достичь минимума и восстановиться до начальных 100%, соответственно. Для получения 95% доверительных интервалов для параметров A , τ_1 и τ_2 использовался метод параметрической начальной загрузки. Этот анализ был выполнен с использованием Python 3.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Изменение морфологии ГБ

3.1.1. Экзогенный S100 β изменяет морфологию ГБ

Секреция S100 β во время глиального ответа на метаболическое повреждение является наиболее ранним активируемым процессом [147, 183]. S100 β также может стимулировать активацию глии, что приводит к нейровоспалению и нарушению функции нейронов [58, 113]. Астроглиоз, вызванный экзогенным S100 β в мозжечке, может привести к дисфункции нейронов, которая напоминает естественный нейродегенеративный процесс [74, 90]. Поэтому, чтобы вызвать астроглиоз для создания модели нейродегенерации вводили мышам 2,5 μ л 50 μ M S100 β в кору мозжечка. Через 24 часа после введения наблюдались широкое распространение белка S100 β и повышенная экспрессия GFAP в дольках IV-VII коры мозжечка [16], что говорит об астроглиозе [135, 167] (рисунок 6В по сравнению с рисунком 6А). На микрофотографиях областей, в месте инъекции S100 β , заметна колокализация S100 β /GFAP, в отличие от областей, инъецированных PBS (рисунок 6Б, Г).

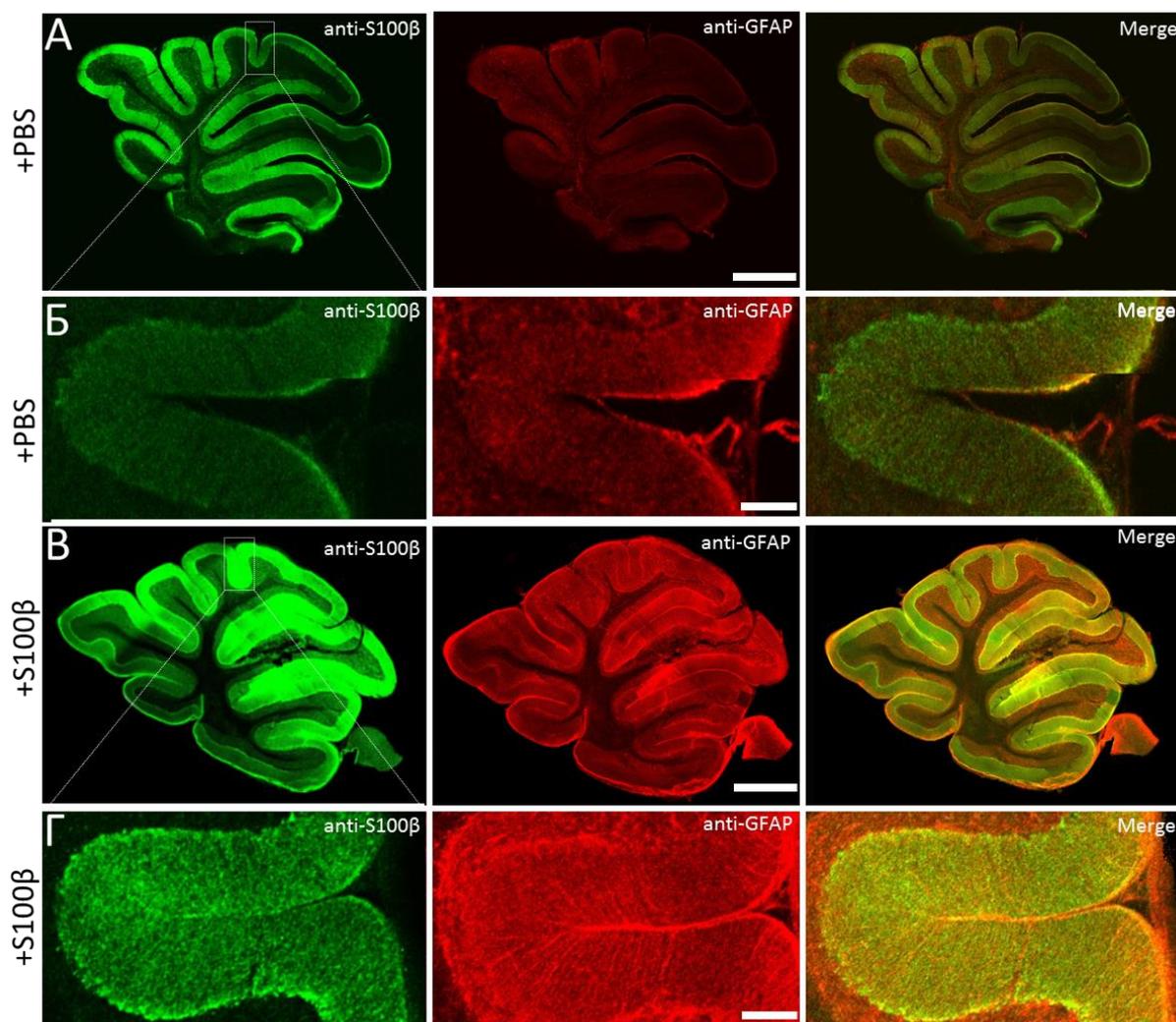


Рисунок 6 – Экспрессия S100 β в коре мозжечка в норме и при нейродегенерации. Слева-направо: анти-S100 β , анти-GFAP, соединённое изображение. А – срез мозжечка мыши, инъецированной PBS. Мерная шкала – 1мм. Б – Увеличенный фрагмент среза. Мерная шкала – 100 μ м. В – Срез мозжечка мыши, инъецированной S100 β . Мерная шкала – 1мм. Г– Увеличенный фрагмент среза. Мерная шкала – 100 μ м. [16]

Было выявлено, что экзогенный S100 β изменяет морфологию ГБ (рисунок 7А, Б) [16]. Для анализа морфологии ГБ мы исследовали количество и толщину анти-GFAP-позитивных глиальных отростков в центральной части МС на участке длиной 100 μ м. Среднее поперечное сечение отростков ГБ у мышей, которым инъецировали S100 β , увеличилось до $3,6 \pm 0,1$ μ м (364 отростка из 17 областей у 5 мышей) по сравнению с $2,8 \pm 0,1$ μ м (358 отростков из 11 областей у 5 мышей) у мышей, которым инъецировали PBS, $p < 0,001$ (рисунок 7В). Количество отростков

на 100 μm продольной длины МС у животных, которым вводили S100 β , было значительно меньше по сравнению с животными, которым вводили PBS (21,4 \pm 2,0 против 32,6 \pm 3,3, $p=0,013$; рисунок 7Г) [16]. Плотность отростков ГБ также была снижена в местах введения S100 β . Для определения плотности была измерена доля «GFAP-негативного» пространства в центральной части МС на 100 μm . В областях, инъецированных S100 β , он увеличился до 24,0 \pm 4,5 % по сравнению с 8,1 \pm 1,6 % в областях, инъецированных PBS, $p=0,015$ (рисунок 7Д). Низкая плотность отростков ГБ в основном является результатом потери некоторых из этих клеток – было выявлено, что количество анти-S100 β -меченых клеточных тел на 100 μm продольной длины СКП у животных, которым вводили S100 β , было значительно снижено по сравнению с контрольной группой (9,1 \pm 0,4 против 10,9 \pm 0,5, $p=0,007$; рисунок 7Е) [16].

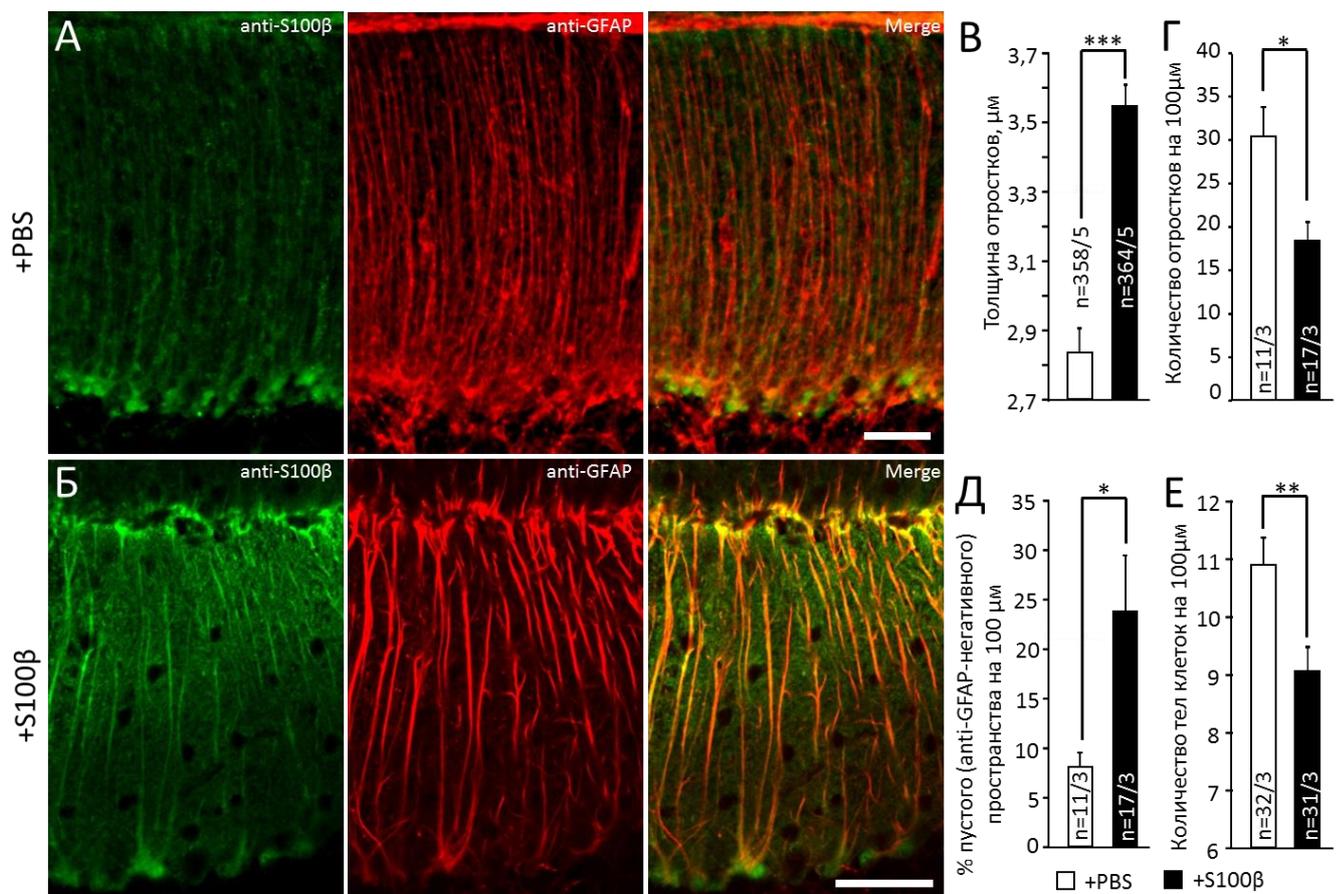


Рисунок 7 – Сравнение морфологии ГБ. А – Экспрессия S100 β и GFAP после инъекции PBS. Мерная шкала 10 μm . Б – Экспрессия S100 β и GFAP после

инъекции S100 β . Мерная шкала 10 μ m. В – Сравнение толщины отростков ГБ после инъекции PBS и после инъекции S100 β . Г – Сравнение количества отростков ГБ после инъекции PBS и S100 β . Д – Для сравнения распространения отростков ГБ на 100 μ m оценивали пустоты – долю «GFAP-негативного» пространства. Е – Сравнение количества тел клеток ГБ после инъекции PBS и S100 β . В столбцах указано количество областей и использованных животных.

*, **, *** означают $p < 0,05$ [16].

Затем с помощью анализа Шолля [161] изучили морфологию отдельных астроцитов. Конфокальные изображения отростков ГБ были искусственно окрашены и реконструированы с помощью программы ImageJ (рисунок 8А). Мы проанализировали максимальное количество этих отростков на клетку. Это число не изменилось в областях введения S100 β ($4,9 \pm 1,2$) по сравнению с участками введения PBS ($4,8 \pm 1,7$, $p = 0,648$; рисунок 8Б) [16]. Анализ по Шоллю выявил увеличение плотности проксимальных отростков в БГ после введения S100 β в проксимальной части МС. В пределах 10 μ m от тела клетки в областях, инъецированных S100 β , астроциты имели $3,3 \pm 0,3$ отростка, тогда как в областях, инъецированных PBS, было $1,8 \pm 0,2$ отростков ($p < 0,001$; рисунок 8В) [16].

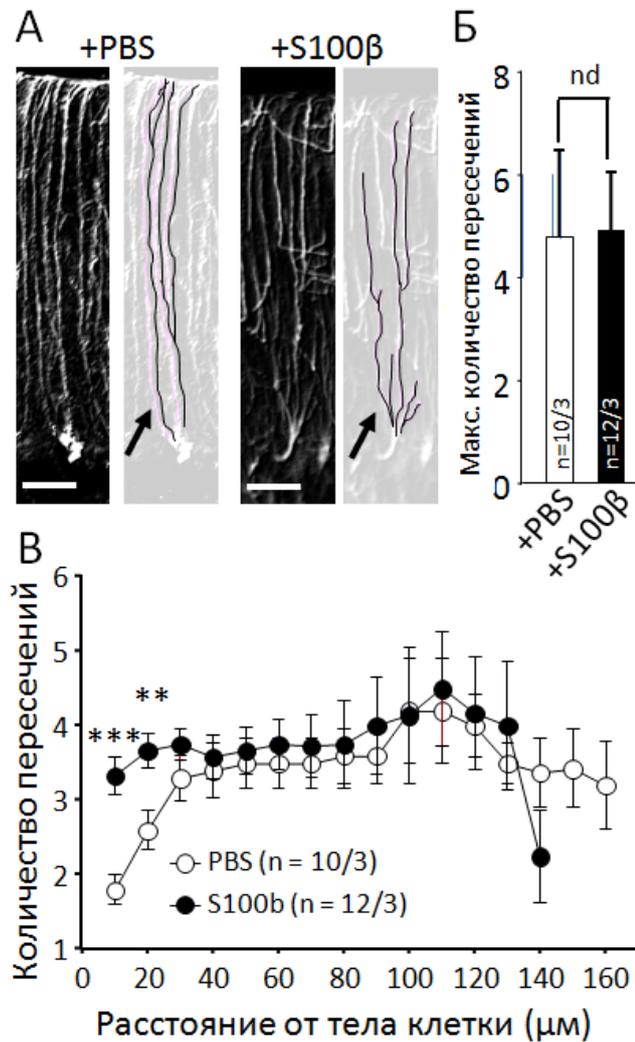


Рисунок 8 – Анализ отростков ГБ у мышей, инъецированных PBS и S100β. А – Чёрно-белые изображения участка коры мозжечка, меченого анти-GFAP после инъекции PBS (слева) и S100β (справа). На осветлённом изображении показаны отростки ГБ, полученные с помощью программы ImageJ. Стрелки показывают проксимальные отростки, чаще встречаемые после инъекции S100β. Мерная шкала 50 μм. Б – Сравнение количества отростков ГБ на 1 клетку ГБ. В – Результаты анализа Шолля (количество пересечений окружностей отростками ГБ на каждые 10 μм радиуса).**p<0,01, ***p<0,001 [16].

3.1.2. Хроническая активация астроцитов, экспрессирующих AVV GFAP-ChR2-mKate, приводит к изменению морфологии ГБ

В модели с селективной активацией астроглии (ГБ^{ChR2}) через 4 дня после введения AVV GFAP-ChR2-mKate флуоресценция mKate была выражена в мозжечковых долях V-VII [162]. В коре мозжечка были обнаружены mKate-положительные тела клеток ГБ вдоль слоя КП (рисунок 9А, обозначены белыми стрелками). mKate-положительное окрашивание (отростков ГБ) было колокализовано с окрашиванием анти-GFAP в МС (рисунок 9Б), что подтверждает селективную экспрессию оптогенетической конструкции в ГБ. Для специфической активации ГБ^{ChR2} стимулировали её синим светом четыре дня. Контролем служили мыши, которым инъецировали AVV GFAP-ChR2-mKate, но не подвергали фотостимуляции (свет -), или инъецировали PBS с (свет +) и без (свет -) фотостимуляции. У животных, которым вводили PBS, количество, толщина и длина отростков ГБ не различались независимо от того, использовалась ли фотостимуляция или нет (рисунок 9В-Д и таблица 2) [162]. Экспрессия ChR2 без фотостимуляции также не влияла на морфологию ГБ. Напротив, хроническая четырёхдневная фотостимуляция у мышей ГБ^{ChR2} значительно увеличивала видимое количество иммунопозитивных отростков ГБ (рисунок 9В) и их толщину (рисунок 9Г и таблица 2), что сопровождалось гораздо более сильным окрашиванием / экспрессией GFAP [162]. При этом длина отростков сокращалась (рисунок 9Д), что соответствовало изменениям морфологии КП (данные приведены ниже). Эти данные свидетельствуют о том, что хроническая специфическая оптогенетическая стимуляция ГБ приводит к характерным для астроглиоза изменениям.

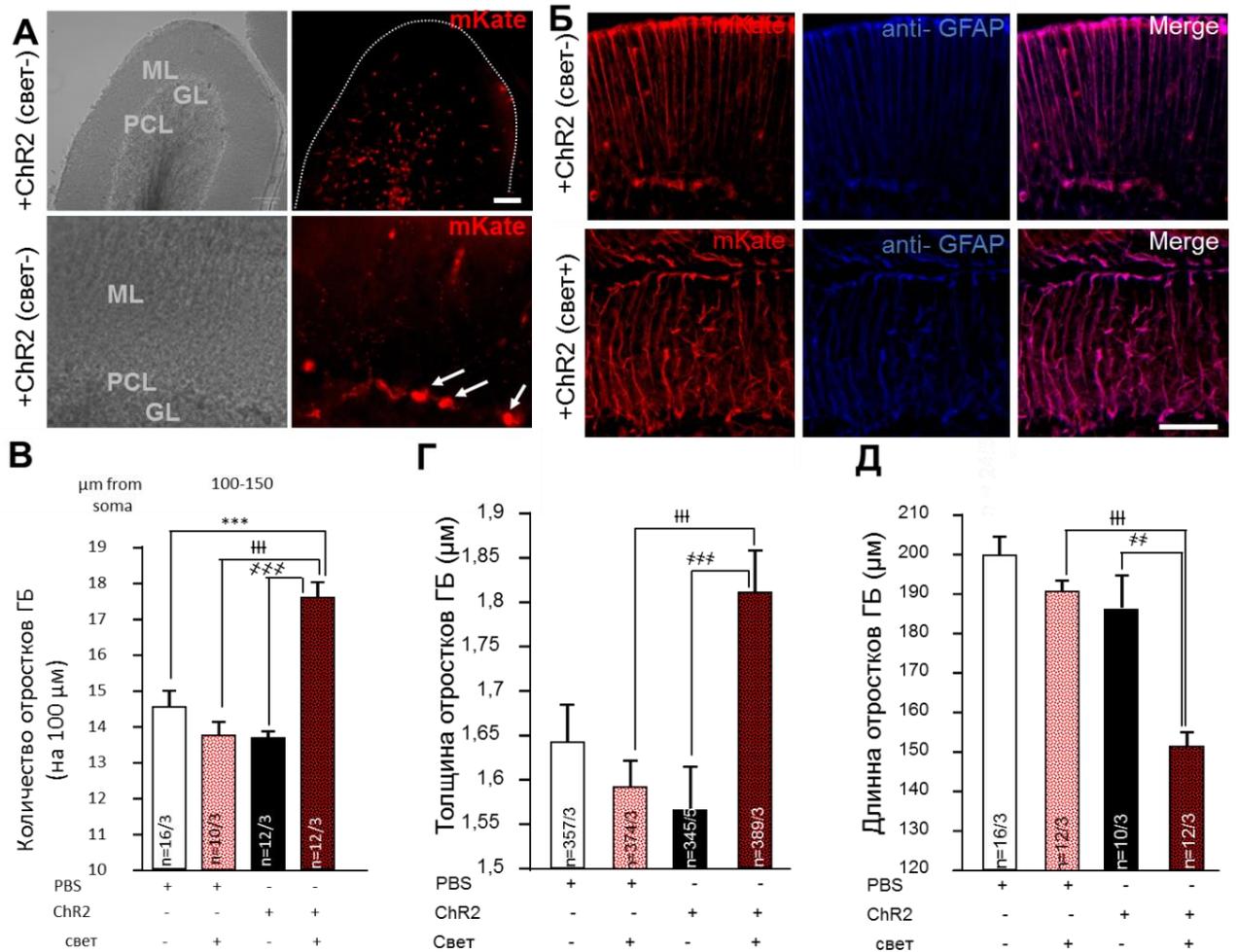


Рисунок 9 – Хроническая фотостимуляция $GFAP^{ChR2}$ приводит к развитию астроглиоза. А – Фазово-контрастные (слева) изображения и нативная флуоресценция mKate (справа) участка коры мозжечка инъецированных мышей через 4 дня после введения AVV GFAP-ChR2-mKate. Шкала – 100μm. Нижняя панель – увеличенные участки верхних изображений. Мерная шкала 25 μm. Отмечены молекулярный слой, гранулярный слой, слой клеток Пуркинью. Стрелками показаны тела клеток ГБ, экспрессирующие GFAP-ChR2-mKate. Б – Конфокальные изображения отростков ГБ через 4 дня после введения GFAP-ChR2-mKate без фотостимуляции (верхний ряд) и с фотостимуляцией (нижний ряд). Аутофлуоресценция mKate (красный цвет) и окрашивание анти-GFAP (синий цвет). Также видна колокализация анти-GFAP и mKate. Мерная шкала 100μm. В-Д – Графики сравнения количества отростков ГБ на 100 μm (В), толщины отростков ГБ (Г), длины отростков ГБ (Д) после инъекции PBS, AVV GFAP-ChR2-mKate, без и с фотостимуляцией. ***, †††, ** отмечено $p < 0,05$ [162].

Таблица 2 – Морфология ГБ в модели селективного астроглиоза

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

В таблице представлены средние значения количества, длины и толщины отростков ГБ. Количество отростков считалось на 100 $\mu\text{м}$ длины СКП. ***, ††, †, ‡ отмечено $p < 0,05$ [162].

3.1.3. Экспрессия атаксина 1 в ГБ вызывает астроглиоз коры мозжечка

В третьей модели мы селективно экспрессировали мутантный ATXN1 [Q85] в ГБ, чтобы проверить, можно ли таким образом вызвать события, напоминающие патологию СЦА1. Конструкция LVV также содержала метку Flag, и через 9 недель после инъекции 3 $\mu\text{л}$ LVV в коре мозжечка был обнаружен заметный анти-Flag-сигнал (рисунок 10А), который был локализован с анти-GFAP сигналом в ГБ и в основном сосредоточен во внутренней части МС [162]. Мы наблюдали, что распределение анти-Flag сигнала в ГБ, экспрессирующей ATXN1[Q2] и ATXN1[Q85], было различным, и что больше сигнала было в области тел клеток в срезах, экспрессирующих ATXN1[Q85] (рисунок 10А). Вероятно, это может быть связано с тенденцией к агрегации и низкой подвижностью мутантных форм этого белка при приобретении им длинной полиглутаминовой последовательности.

Количество и длина восходящих отростков ГБ у животных экспрессирующих ATXN1[Q85], не уменьшались, при этом толщина отростков увеличивалась по сравнению с контрольными группами [162] (рисунок 10Б-Г и таблица 3).

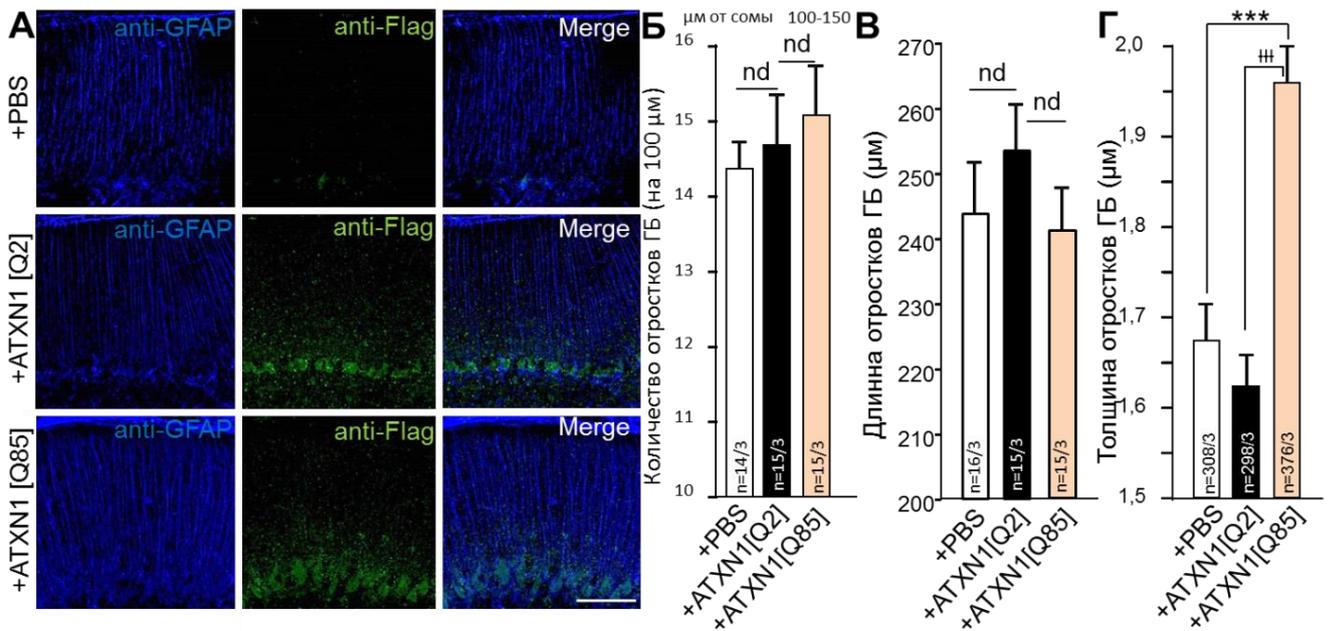


Рисунок 10 – Экспрессия астроцитами мутантного атаксина 1 приводит к развитию астроглиоза. А – Конфокальные изображения отростков ГБ через 9 недель после введения PBS (верхний ряд), LVV GFAP-ATXN1[Q2]-Flag (средний ряд) и LVV GFAP-ATXN1[Q85]-Flag (нижний ряд). Также видна колокализация анти-Flag и анти-GFAP сигналов. Мерная шкала 100 μм. Б-Г – Графики сравнения количества отростков ГБ на 100 μм (Б), толщины отростков ГБ (В) и длины отростков ГБ (Г) после инъекции PBS, LVV GFAP-ATXN1[Q82]-Flag и LVV GFAP-ATXN1[Q85]-Flag. ***, ††† отмечено $p < 0,05$ [162].

Таблица 3 – Морфология ГБ в модели астроглиоза, вызванного экспрессией мутантного атаксина 1

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

В таблице представлены средние значения количества отростков на 100μм, длины и толщины отростков ГБ. ***, †††, отмечено $p < 0,05$ [162].

3.2. Изменение морфологии КП при астроглиозе

3.2.1. Экзогенный белок S100 β вызывает дегенерацию КП

Как показано выше, S100 β влияет на глию, и хорошо известно, что нарушения в глии могут приводить к дегенерации нейронов [139]. Кроме того, S100 β может оказывать прямое влияние на КП. Влияние S100 β на морфологию этих нейронов было исследовано с помощью метода иммуногистохимии, а их физиологическое состояние оценивалось с помощью метода локальной фиксации потенциала. Чтобы оценить приблизительную длину дендритов КП, клетки визуализировали с помощью окрашивания против кальбиндина (рисунок 11А) и измеряли толщину МС (рисунок 5Б). Инъекции S100 β уменьшали толщину МС до $120,0 \pm 5,8$ $\mu\text{м}$ (12 областей от 3 мышей) по сравнению с $150,7 \pm 6,3$ $\mu\text{м}$ (14 областей от 3 мышей) у мышей, которым вводили PBS ($p=0,002$; рисунок 11Б) [16].

С помощью метода локальной фиксации потенциала оценивали ёмкость дендритов и сомы после вычитания медленной составляющей ёмкости из общей ёмкости мембраны КП. Ёмкость мембраны клетки является косвенным показателем площади поверхности клеточной мембраны. Медленный компонент преимущественно отражает размер дендритов нейронов. Обнаружена значительная разница между двумя группами ($p=0,002$). Ёмкости дендритов КП у мышей, которым вводили S100 β , составляли $359,4 \pm 37,5$ пФ ($n = 33$ клетки от 8 мышей) и $513,5 \pm 27,1$ пФ ($n = 52$ клетки от 10 мышей) в группе мышей, инъецированных PBS (рисунок 11В). Ёмкость сомы КП у мышей, которым вводили S100 β , составляла $34,6 \pm 4,4$ пФ (те же клетки) и $61,7 \pm 5,6$ пФ (те же клетки) в группе, получавшей PBS ($p < 0,001$; рисунок 11В) [16]. Эти данные указывают на то, что избыток внеклеточного S100 β влияет на морфологию КП, приводя к уменьшению их тел и дендритов.

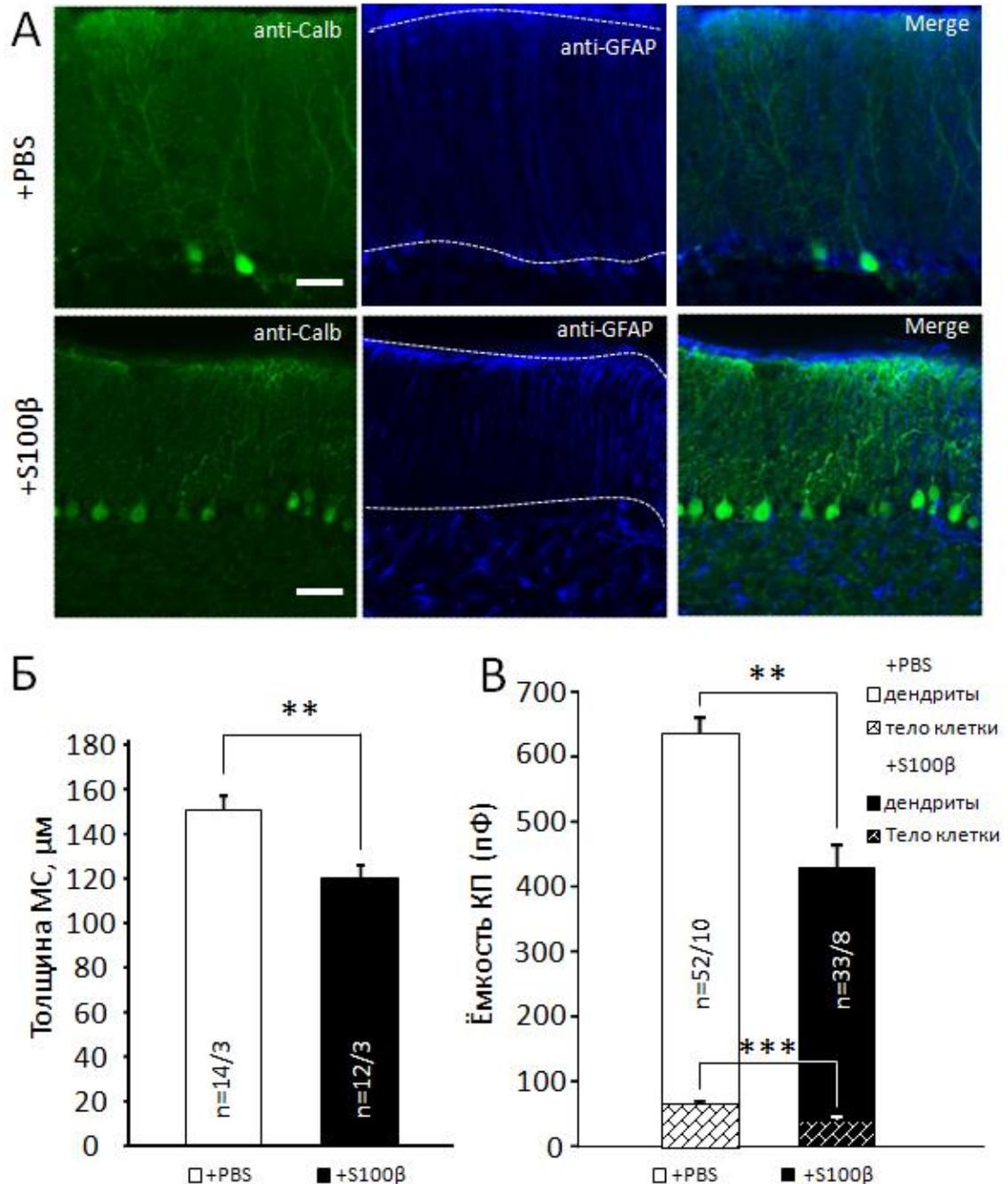


Рисунок 11 – Изменение морфологии КП после инъекции S100β. А – Конфокальные изображения коры мозжечка мышей инъецированных PBS (верхняя панель) и S100β (нижняя панель). Окрашивание анти-кальбиндин и анти-GFAP. Мерная шкала 50 μm. Б – Сравнение толщины МС коры мозжечка мышей, инъецированных PBS и S100β. В – Сравнение ёмкости тел и дендритов КП у мышей, инъецированных PBS и S100β. ** p<0,01.*** p<0,001 [16].

3.2.2. Хроническая фотостимуляция ГБ^{ChR2} приводит к изменению морфологии КП

В модели селективного астроглиоза также исследовали морфологию КП с помощью иммуногистохимии и их электрофизиологические свойства с помощью патч-клэмп (рисунок 12А-Г). Толщину МС измеряли, как описано ранее. МС был значительно тоньше у животных после четырёхдневной фотостимуляции ГБ^{ChR2} по сравнению с нестимулированной группой, $p=0,005$ (рисунок 12Д, таблица 4). Количество КП также было снижено, $p=0,007$ (рисунок 12Е, таблица 4). У мышей, инъецированных PBS, со световой стимуляцией или без неё никаких отличий не было обнаружено (рисунок 12Д-Е, таблица 4). После хронической фотоактивации ГБ^{ChR2} ёмкость мембраны КП снизилась с $728,8 \pm 27,6$ пФ ($n = 24/9$) до $526,2 \pm 27,8$ пФ ($n = 15/7$), $p < 0,001$ (таблица 5) [162].

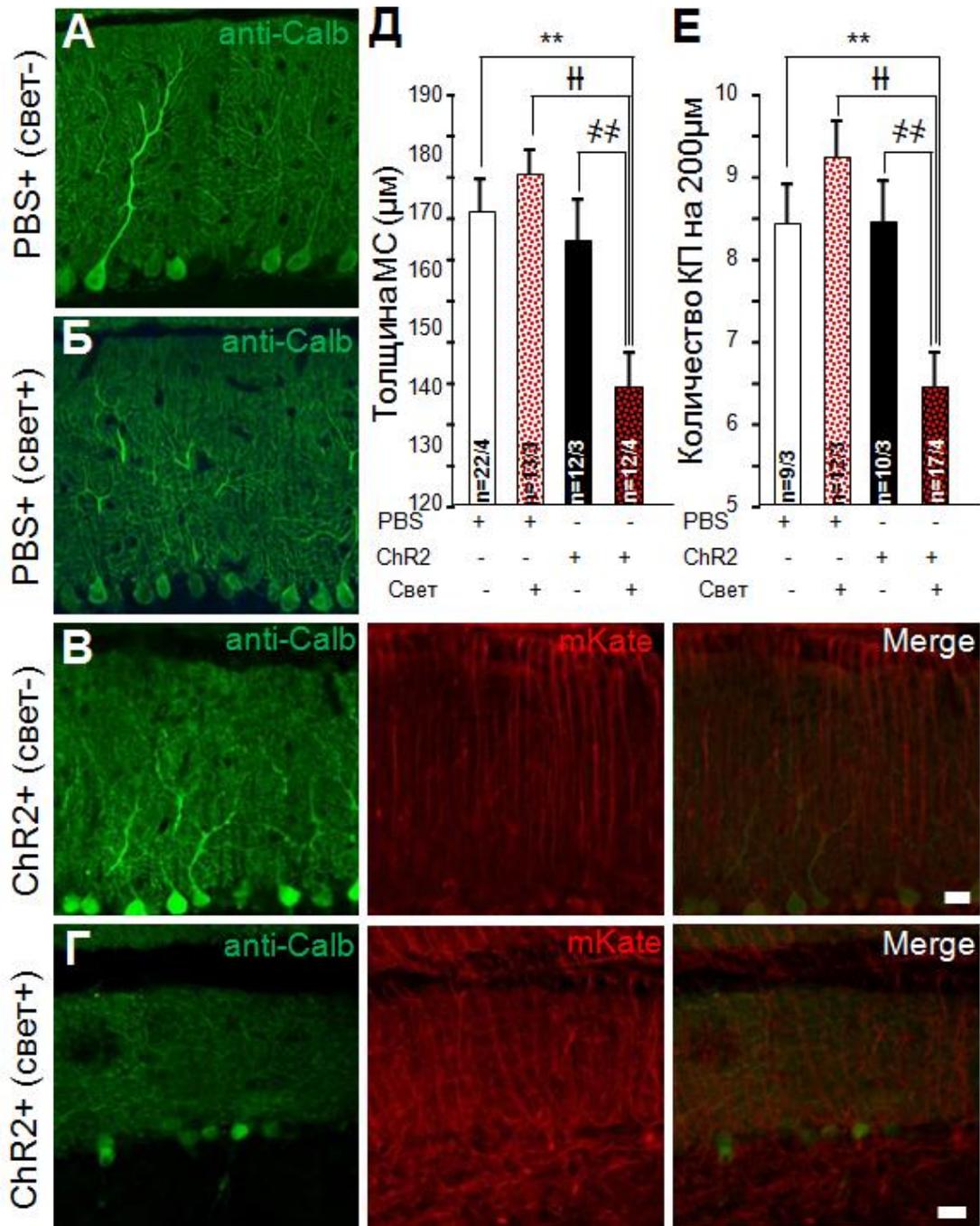


Рисунок 12 – Изменение морфологии КП после хронической фотостимуляции.

А-Г – Конфокальные изображения участка коры мозжечка мышей, инъецированных PBS без фотостимуляции (А), PBS с хронической фотостимуляцией (Б), AVV GFAP-ChR2-mKate без фотостимуляции (В), AVV GFAP-ChR2-mKate с хронической фотостимуляцией (Г). Окрашивание анти-кальбиндином (зелёная метка) и аутофлуоресценция mKate (красная метка). Мерная шкала 50 μm. Д – Сравнение толщины МС. Е – Сравнение количества КП на 200μm. **, ††, ††† отмечено $p < 0,01$ [162].

Таблица 4 – Морфология КП в модели селективного астроглиоза

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

В таблице приведены средние значения меченых анти-кальбиндином КП, толщины МС. Количество КП считалось на 100 $\mu\text{м}$ длины СКП. *** отмечено $p < 0,001$, ††, †* отмечено $p < 0,01$ [162].

Таблица 5 – Пассивные электрофизиологические свойства мембраны КП и свойства ПВ ВПСТ в мышцах, инъецированных PBS, AVV GFAP-ChR2-mKate с или без хронической фотостимуляции

Группа	Ёмкость (pF)	Ra (M Ω)	Rm (M Ω)	Амплитуда PFEPC (pA)	Плотность PFEPC (pA/pF)	PPF	Время нарастания (ms)	Время спада (τ)
+PBS (свет-) (n=14/5)	766,2±49,1	13,7±1,1	193,0±30,8	279,2±39,1	0,4±0,1	1,5±0,1	2,5±0,3	17,0±2,2
+GFAP-ChR2-mKate (свет-) (n=24/9)	728,8±27,6	13,8±0,9	241,8±58,4	359,3±48,8	0,5±0,1	1,5±0,1	2,1±0,2	17,0±1,0
+GFAP-ChR2-mKate (свет+) (n=15/7)	526,2±27,8	13,8±0,7	260,5±36,1	258,3±29,0	0,5±0,1	1,6±0,1	2,6±0,2	19,3±1,3

***отмечено $p < 0,001$, ††отмечено $p < 0,01$ [162].

Подобное уменьшение ёмкости мембраны КП в модели с экспрессией ATXN1[Q85] описано ниже.

3.3. Влияние астроглиоза на синаптическую передачу в нейронах коры мозжечка

3.3.1. Введение S100 β изменяет кинетику ПВ ВПСТ

Не было выявлено статистически значимых различий в амплитуде ПВ ВПСТ у мышей, которым вводили S100 β и PBS (рисунок 13А), но наблюдалось влияние S100 β на кинетику ПВ ВПСТ – время нарастания и время спада (τ) ВПСТ. Время нарастания ПВ ВПСТ у мышей, которым вводили S100 β , было увеличено до $2,7 \pm 0,1$ мс ($n = 35/8$) по сравнению с $2,3 \pm 0,1$ мс ($n = 36/9$) у мышей, которым вводили PBS ($p=0,028$; рисунок 13Б). τ ПВ ВПСТ у мышей, которым вводили PBS, составляло $21,6 \pm 1,5$ мс ($n = 37/9$), а у мышей, которым вводили S100 β , оно уменьшалось до $17,1 \pm 1,5$ мс ($n = 30/8$) ($p=0,04$; рисунок 13В) [16].

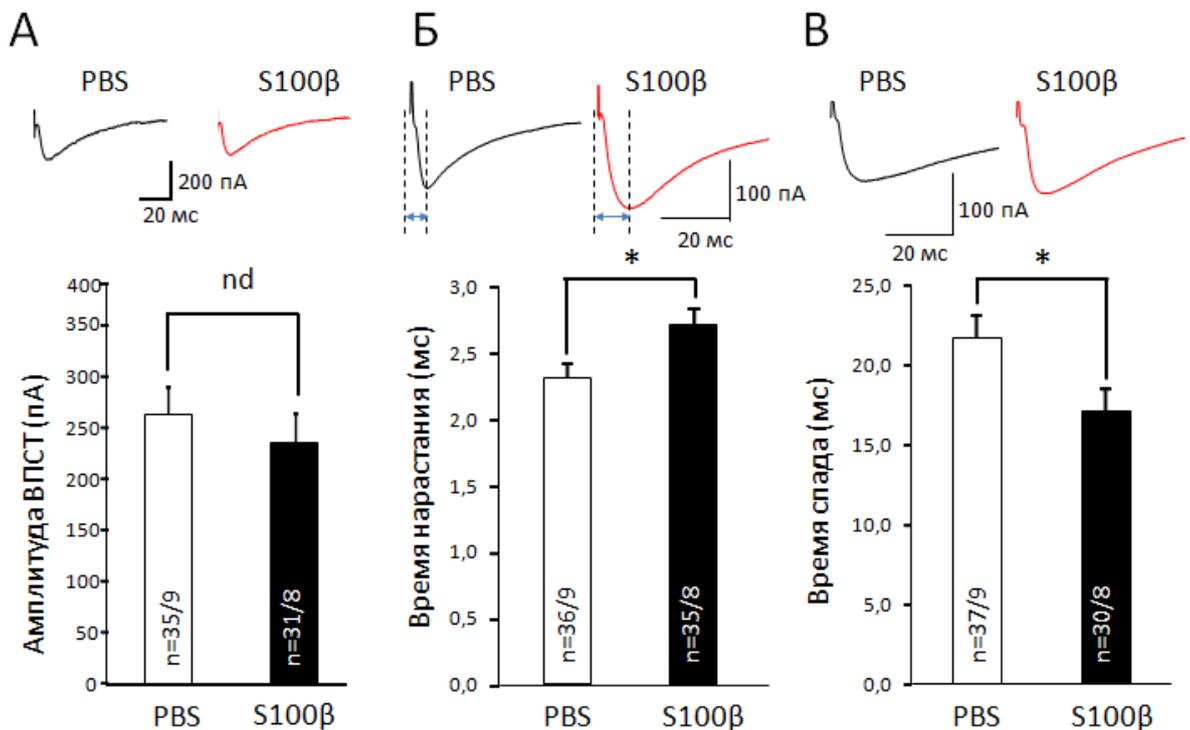


Рисунок 13 – Изменение электрофизиологических свойств КП после введения S100 β . А – Сравнение амплитуды ПВ ВПСТ. Сверху – репрезентативные кривые ПВ ВПСТ. Б – Сравнение времени нарастания ПВ ВПСТ. Сверху –

репрезентативные кривые ПВ ВПСТ. В – Сравнение времени затухания ПВ ВПСТ. Сверху – репрезентативные кривые ПВ ВПСТ * $p < 0,05$ [16].

Время нарастания и спада связано с количеством глутамата в синаптической щели. Наблюдаемые изменения в модели астроглиоза могут указывать на влияние S100 β на захват глутамата астроцитами [128] или на секрецию глутамата пресинапсом, например, через изменение секреции эндоканнабиноидов [75]. Для того чтобы проверить как изменяется функция астроцитов мы использовали флуороцитрат (FC). FC ингибирует метаболизм астроцитов и лишает эти клетки энергии, что приводит к множеству последствий, которые, в конечном итоге, угнетают функции этих клеток. Применение FC приводило к сильному угнетению возбуждающей передачи ПВ-КП, независимо от того, подвергалась ли ткань воздействию S100 β или нет (рисунок 14А, Б) [16]. После 10-минутного применения амплитуда ПВ ВПСТ у мышей, которым инъецировали S100 β , снизилась до $57,7 \pm 9,0\%$ от контроля ($n = 7$ клеток от 4 мышей, $p = 0,006$), а у мышей, которым инъецировали PBS, до $64,4 \pm 9,9\%$ от контроля ($n = 7$ клеток от 4 мышей, $p = 0,014$) (рисунок 14А, Б). Через десять минут после применения FC средние значения амплитуд ПВ ВПСТ в группах, которым вводили S100 β и PBS, не различались ($p = 0,65$). Время нарастания ПВ ВПСТ у мышей, которым вводили PBS и S100 β , увеличивалось после добавления FC. В группе PBS оно увеличилось с $2,3 \pm 0,2$ мс до $2,7 \pm 0,2$ мс ($n = 12$ клеток от 4 мышей, $p = 0,003$; рисунок 14В), а в группе S100 β оно увеличилось с $2,4 \pm 0,2$ мс до $3,5 \pm 0,6$ мс ($n = 10$ клеток от 3 мышей, $p = 0,003$; рисунок 14В) [16].

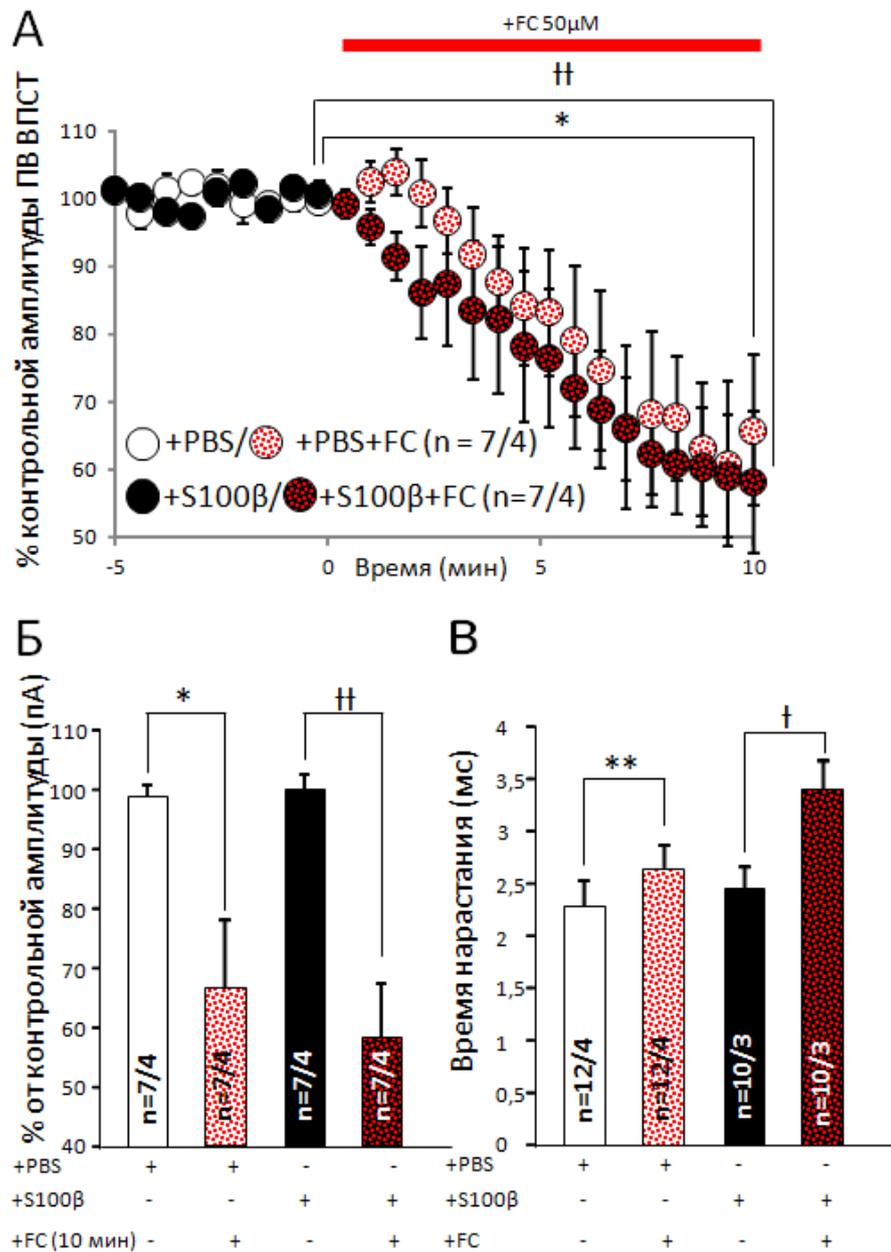


Рисунок 14 – Влияние астроцитов на амплитуду и кинетику ПВВПСТ в синапсах ПВ-КП. А – Динамика амплитуд ПВВПСТ до и после применения 50 μM FC. Б – Сравнение амплитуды ПВВПСТ через 10 минут после применения FC, у животных, которым вводили PBS и S100β. В – Сравнение времени нарастания ПВВПСТ у животных, которым вводили PBS и S100β. ** p < 0,01, † p < 0,05 [16].

Таким образом, FC угнетает функцию астроцитов, что приводит к нарушению синаптической передачи. Снижение амплитуды и увеличение времени нарастания, вероятно, связано с нарушением цикла глутамат-глутамин в астроцитах, и, как следствие, уменьшением количества глутамата в

синаптической щели. Хотя избыточное количество S100 β не оказывает влияния на амплитуду ВПСТ, подобное изменение времени нарастания говорит, что введение S100 β приводит к нарушению функции астроцитов.

3.3.2. Хроническая фотостимуляция ГБ^{ChR2} влияет на динамику ПВ ВПСТ

При исследовании влияния хронической фотостимуляции ГБ^{ChR2} на кинетику ВПСТ, несмотря на тенденцию уменьшения τ ПВ ВПСТ, в результате не было выявлено значимых изменений ($p > 0,05$) (таблица 4) [162]. На время спада ПВ ВПСТ влияют два процесса: один из них – скорость удаления глутамата из рецепторов, а другой – пассивные свойства мембраны КП, которая действует как конденсатор. Однако время пассивного затухания (τ пассивный), которое отражает размер клеток КП, было значительно уменьшено в КП после стимуляции ГБ^{ChR2} (рисунок 15А, Б), что согласуется с наблюдением изменений морфологии КП, подробно описанных выше. По этой причине, чтобы сделать справедливое сравнение, для дальнейшего анализа были выбраны клетки из обеих выборок, для которых пассивный τ находился в диапазоне от 10 до 20 мс (рисунок 15Г, Д). Было обнаружено, что при сравнении ПВ ВПСТ между клетками сопоставимой ёмкости τ ПВ ВПСТ значительно длиннее ($19,3 \pm 1,3$ мс ($n = 12/7$) после хронической стимуляции ГБ^{ChR2} и $15,5 \pm 0,9$ мс ($n = 16/9$) без фотостимуляции, $p = 0,03$) (рисунок 15В, Д) [162]. Удлинение τ ПВ ВПСТ предполагает более длительное присутствие глутамата в синаптической щели и более длительное связывание с постсинаптическими рецепторами.

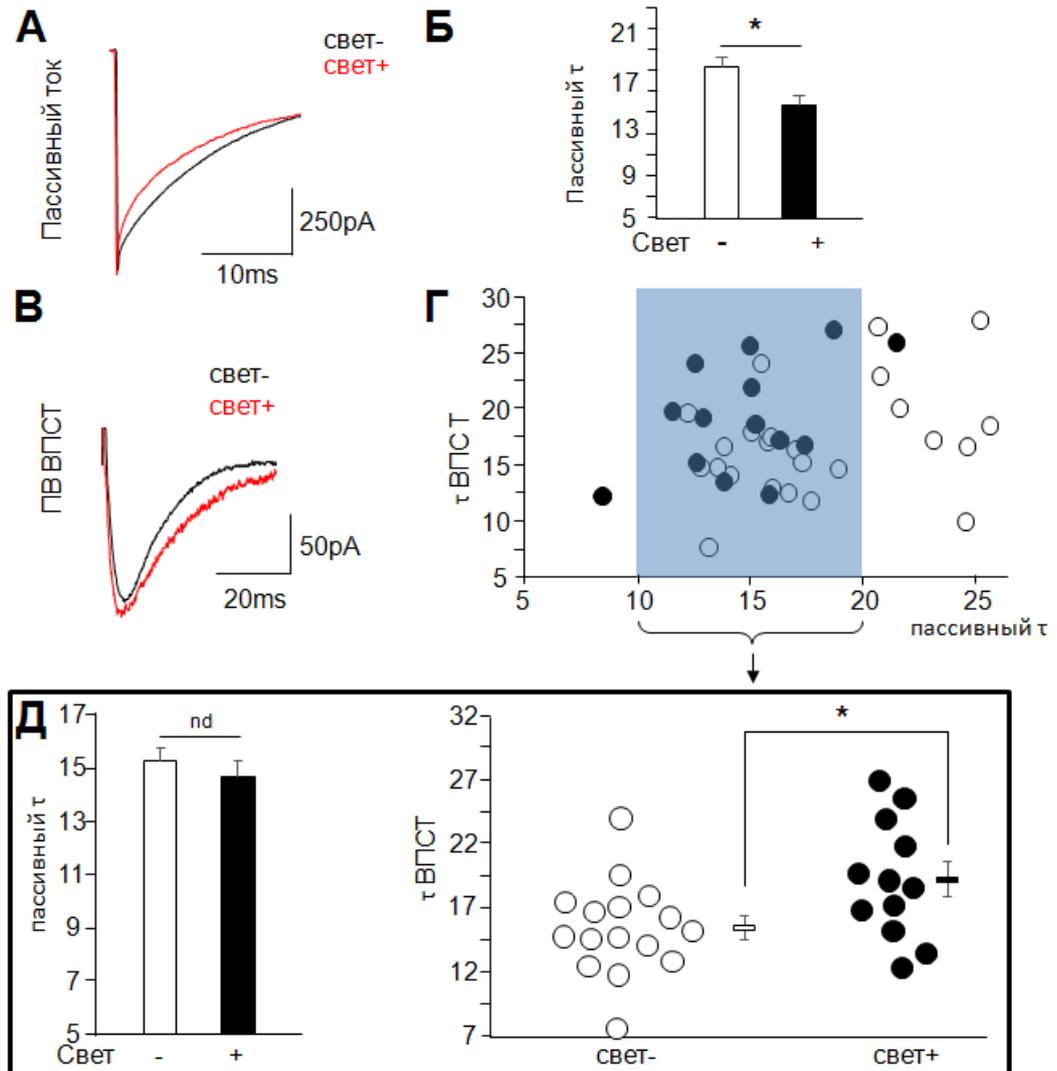


Рисунок 15 – Влияние хронической активации ГБ^{ChR2}, на свойства ПВ ВПСТ. А – репрезентативные кривые, показывающие пассивный τ КП без (черный) и с хронической фотостимуляцией ГБ^{ChR2} (красный). Б – Сравнение пассивного τ КП у мышей без и с хронической фотостимуляцией ГБ^{ChR2}. В – Репрезентативные кривые ПВ ВПСТ без (черный) и с хронической фотостимуляцией ГБ^{ChR2} (красный). Г – Распределение клеток без и с хронической фотостимуляцией ГБ^{ChR2}, для дальнейшего анализа τ ПВ ВПСТ были отобраны клетки без значимых различий по пассивному τ (Д). * p < 0,05 [162]

3.3.3. Влияние мутантного атаксина 1 на динамику ПВ ВПСТ

Такая же картина наблюдалась и в модели нейродегенерации, вызванной экспрессией мутантного атаксина 1. Амплитуда и время нарастания ПВ ВПСТ не различались у мышей, которым вводили LVV GFAP-ATXN1[Q2]-Flag и GFAP-ATXN1[Q85]-Flag. Однако КП у мышей, экспрессирующих ATXN1[Q85], также были меньше по сравнению с мышами, экспрессирующими ATXN1[Q2], о чём свидетельствует уменьшение их ёмкости мембраны, оцененной по пассивной τ ($p=0,024$; рисунок 16А, Б). Чтобы учесть это при анализе данных, клетки также были отсортированы по их пассивной τ аналогично данным, полученным на оптогенетической модели нейродегенерации (см. раздел выше) (рисунок 16Г, Д). Сравнение пулов КП с пассивным τ в диапазоне от 10 до 20 мс (рисунок 16Г) показало, что τ ВПСТ увеличилось у мышей, экспрессирующих ATXN1[Q85], до $23,3 \pm 2,7$ мс ($n = 21/9$) по сравнению с $16,7 \pm 1,0$ мс ($n = 13/8$) у мышей, экспрессирующих ATXN1[Q2], $p=0,04$ (рисунок 16В, Д) [162]. Таким образом, экспрессия мутантного атаксина 1 в ГБ мозжечка приводит к увеличению τ ПВ ВПСТ.

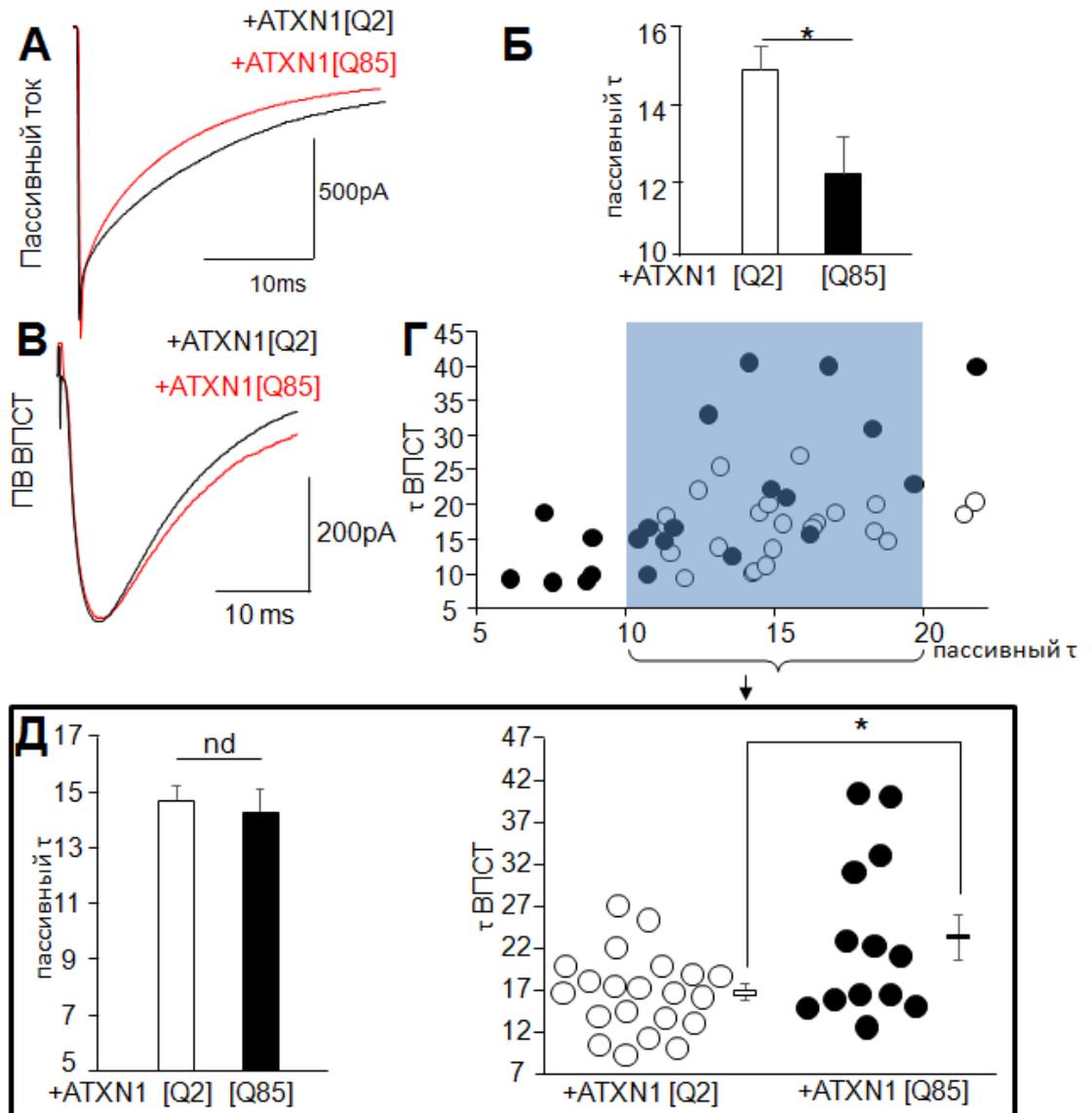


Рисунок 16 – Влияние экспрессии ATXN1[Q85], на свойства ПВ ВПСТ. А– Репрезентативные кривые, показывающие пассивный τ КП у мышей, экспрессирующих ATXN1[Q2] и ATXN1[Q85]. Б – Сравнение пассивного τ КП у мышей, экспрессирующих ATXN1[Q2] и ATXN1[Q85]. В – Репрезентативные кривые ПВ ВПСТ у мышей, экспрессирующих ATXN1[Q2] и ATXN1[Q85]. Г – Распределение клеток у мышей, экспрессирующих ATXN1[Q2] и ATXN1[Q85], для дальнейшего сравнения τ -спада ПВ ВПСТ были отобраны клетки без значимых различий по пассивному τ (Д). * $p < 0,05$ [162].

3.3.4. Изменение динамики ПВ ВПСТ у СЦА1 КИ животных

У трансгенной модели СЦА1 также наблюдалось уменьшение ёмкости мембраны КП (таблица 6) и пассивного τ КП (рисунок 17А, Б) по сравнению с животными дикого типа [162]. Поэтому для дальнейшего анализа также отбирались клетки значимо не различающиеся по размеру – с пассивным τ в диапазоне от 10 до 15мс (рисунок 17Г). Сравнение показало, что τ -спада ПВ ВПСТ увеличилось у СЦА1 КИ мышей, экспрессирующих АТХN1[Q154], до $19,1 \pm 1,3$ мс ($n = 12/9$) по сравнению с $14,7 \pm 0,8$ мс ($n = 13/7$) у мышей дикого типа, $p=0,04$ (рисунок 17В, Д)[162].

Таблица 6 – Пассивные электрофизиологические свойства мембраны КП мышей

	Ёмкость Cm(pF)	Ra (m Ω)	Rm (m Ω)
WT (n = 10/3)	683,8 \pm 57,8***	10,9 \pm 0,6	207,5 \pm 15,4
СЦА1 КИ (n = 8/3)	296,6 \pm 29,0	10,3 \pm 1,4	210,8 \pm 34,3

*** отмечено $p < 0,001$; † $p < 0,05$.

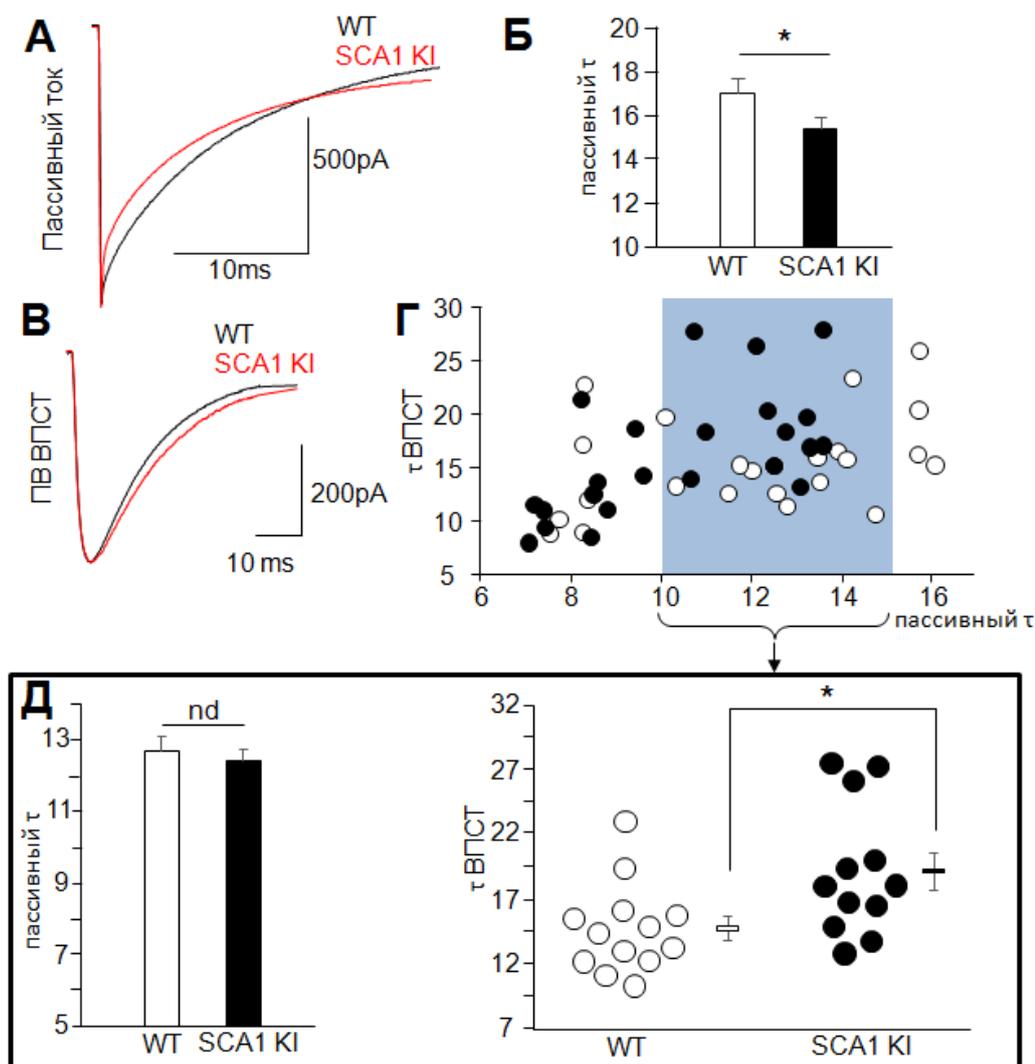


Рисунок 17 – Мутантный атаксин 1 в клетках мозжечка мышей СЦА1 КИ влияет на синаптическую передачу ПВ-КП. А – Репрезентативные кривые пассивных токов КП у животных WT и СЦА1 КИ. Б – Сравнение пассивного τ КП у животных СЦА1 КИ и WT. В – Репрезентативные кривые ПВ ВПСТ у животных WT и СЦА1 КИ. Г – Распределение клеток от животных СЦА1 КИ и WT, для дальнейшего анализа были отобраны клетки без значимых различий по пассивному τ (Д). * отмечено $p < 0,05$ [162].

3.3.5. Механизм нарушения динамики ПВ ВПСТ в моделях нейродегенерации мозжечка

Девяносто процентов всех поглощений глутамата в синапсах ПВ-КП является результатом транспортёров возбуждающих аминокислот EAAT1 и EAAT2, расположенных на мембранах астроцитов, в первую очередь, ГБ [179]. Чтобы продемонстрировать влияние обратного захвата глутаматана τ ВПСТ, мы использовали неселективный ингибитор этих переносчиков глутамата – DL-трео- β -бензилоксиаспарагиновую кислоту (ТВОА, 500 нМ). Для переноса глутамата EAAT используют разницу концентрации катионов внутри и вне клетки (Na^+/K^+ -градиент) [193]. Хроническая фотостимуляция может приводить к накоплению Na^+ и Ca^{2+} внутри ГБ и смещать градиент. Для демонстрации работы данного механизма в EAAT мы использовали убаин (100 нМ). Согласно данным, в низкой концентрации убаин оказывает преимущественное влияние на субъединицу $\alpha 2$ Na^+/K^+ -АТФазы, которая экспрессируется в астроцитах [70]. Na^+/K^+ -АТФаза поддерживает градиент Na^+/K^+ . Таким образом, можно ожидать, что убаин преимущественно влияет на глиальное Na^+ -зависимое поглощение глутамата. Низкие концентрации убаина не влияли на скорость возбуждения КП. Это позволяет предположить, что нейроны не были существенно затронуты. Эти два блокатора, ТВОА и убаин, значительно увеличивали τ ВПСТ в синапсах ПВ-КП (рисунок 18) [162].

Полученные результаты подтверждают, что как ТВОА, так и низкая концентрация убаина вызывают удлинение τ ВПСТ, что аналогично результату, полученному при хронической фотостимуляции ГБ и при экспрессии мутантного атаксина 1.

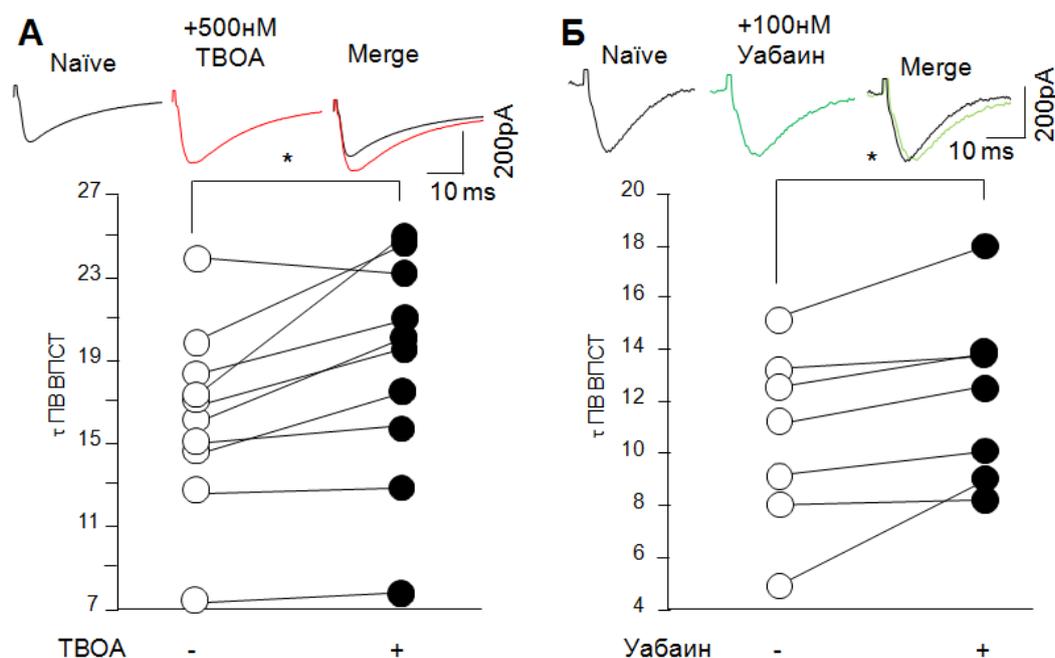


Рисунок 18 – Влияние ингибиторов обратного захвата глутамата на τ ПВВПСТ. А – τ ПВВПСТ до и после применения 500 нМ ТВОА. Репрезентативные кривые до и после применения ТВОА показаны сверху. Б – τ ПВВПСТ до и после применения 100 нМ убаина. Репрезентативные кривые до и после применения убаина показаны сверху. * $p < 0,05$ [162].

При исследовании модели неселективного астроглиоза, мы обнаружили, что добавление 500 нМ ТВОА значительно увеличивало τ ПВВПСТ [16]. У мышей, которым вводили PBS, время затухания изменилось с $30,0 \pm 4,4$ до $39,2 \pm 6,3$ мс ($n = 14$ клеток от 5 мышей, $p = 0,039$, рисунок 19). До применения ТВОА τ ПВВПСТ различались между группами, которым вводили S100 β и PBS ($p = 0,044$), тогда как после ТВОА они достигли примерно одинаковых значений ($p = 0,64$, рисунок 19). У мышей, которым вводили S100 β , увеличение было еще более значительным, с $19,2 \pm 2,7$ мс до $34,6 \pm 7,1$ мс ($n = 12$ клеток от 4 мышей, $p = 0,031$) [16]. Применение ТВОА не оказывало существенного влияния на амплитуду ПВВПСТ и время нарастания в мозжечке мышей, которым вводили PBS и S100 β (данные не показаны).

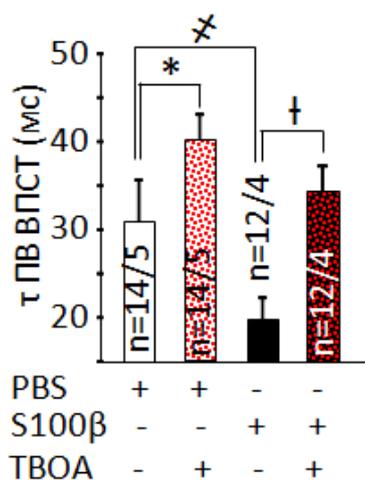


Рисунок 19 – Сравнение τ ПВ ВПСТ у мышей, инъецированных S100 β и PBS без и с добавлением ингибитора обратного захвата глутамата ТВОА. *, †, ‡ отмечено $p < 0,05$ [16].

Полученные результаты позволяют предположить, что изменение кинетики ПВ ВПСТ связано с нарушением обратного захвата глутамата астроцитами из синаптической щели.

3.4. Изменение экспрессии переносчиков глутамата

3.4.1. Влияние хронической фотостимуляции ГБ^{Chr2} на экспрессию ЕААТ1

Чтобы подтвердить, что изменения в кинетике ПВ ВПСТ вызваны нарушением удаления глутамата из синаптической щели, необходимо также проверить экспрессию переносчиков глутамата. ЕААТ1 и ЕААТ2 являются основными переносчиками глиального глутамата, и в мозжечке доминирует ЕААТ1, тогда как экспрессия ЕААТ2 в коре мозжечка низкая [125], что подтверждается полученными результатами (рисунок 20А-Г) [162]. Иммунореактивность ЕААТ1 резко снижена в ГБ через 4 дня фотостимуляции (рисунок 20Д, Е). Количество ЕААТ1-иммунопозитивных элементов снижено на

всем протяжении отростков ГБ. Таким образом, длительная фотоактивация ГБ^{ChR2}, приводит к снижению экспрессии EAAT1.

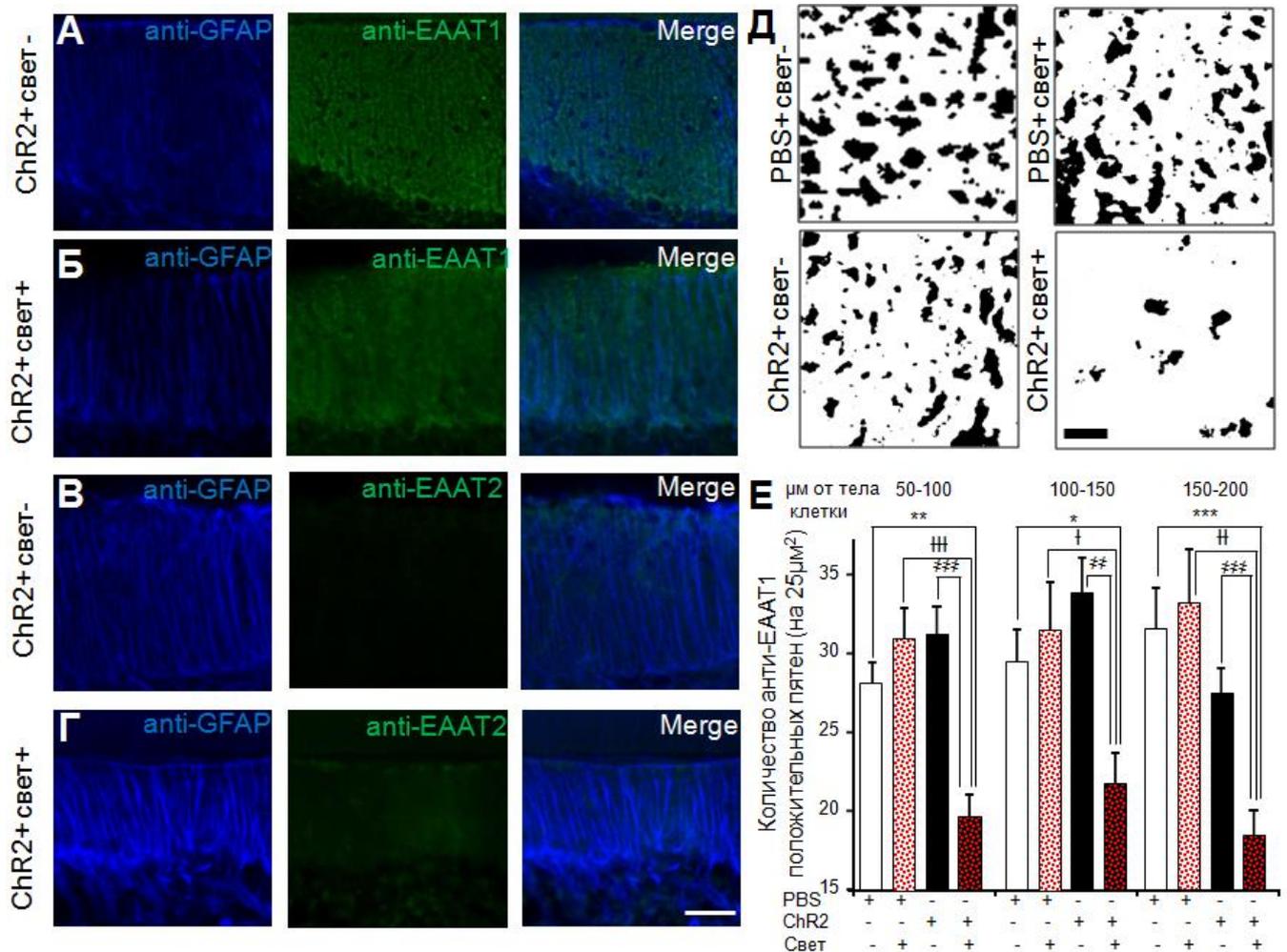


Рисунок 20 – Изменение экспрессии EAAT1 после хронической фотостимуляции. А-Г – Конфокальные изображения отростков ГБ^{ChR2}, меченых анти-GFAP, анти-EAAT1 и анти-EAAT2 у мышей без и с хронической фотостимуляцией. Мерная шкала 100 μм. Д – Цифровые черно-белые изображения участков с метками анти-EAAT1, показывающими распространение / экспрессию EAAT1 у мышей, инъецированных PBS, AVV GFAP-mKate-ChR2 без и с хронической фотостимуляцией, полученные с помощью программы ImageJ. Мерная шкала 10 μм. Е – Сравнение количества анти-EAAT1 положительных пятен на разных участках длины отростков ГБ у мышей, инъецированных PBS, AVV GFAP-mKate-ChR2 без и с хронической фотостимуляцией. *, † отмечено p<0,05; **, ††, *#– p<0,01; ***, †††, *#*–p<0,001 [162].

3.4.2. Влияние мутантного атаксина 1 на экспрессию EAAT1

Также была снижена иммунореактивность EAAT1 в ГБ, экспрессирующей ATXN1[Q85] (нижняя панель рисунка 21А) [162]. Общее количество EAAT1-позитивных меток уменьшалось по всей длине слоя ГБ (рисунок 21Б, В).

Эти результаты показывают, что снижение экспрессии EAAT1 является отличительной чертой дегенерации мозжечка в моделях СЦА1, вызванной воздействиями, специально направленными на ГБ, включая экспрессию астроцитами мутантного ATXN1[Q85] и оптогенетическую гиперактивацию ГБ^{Chr2}.

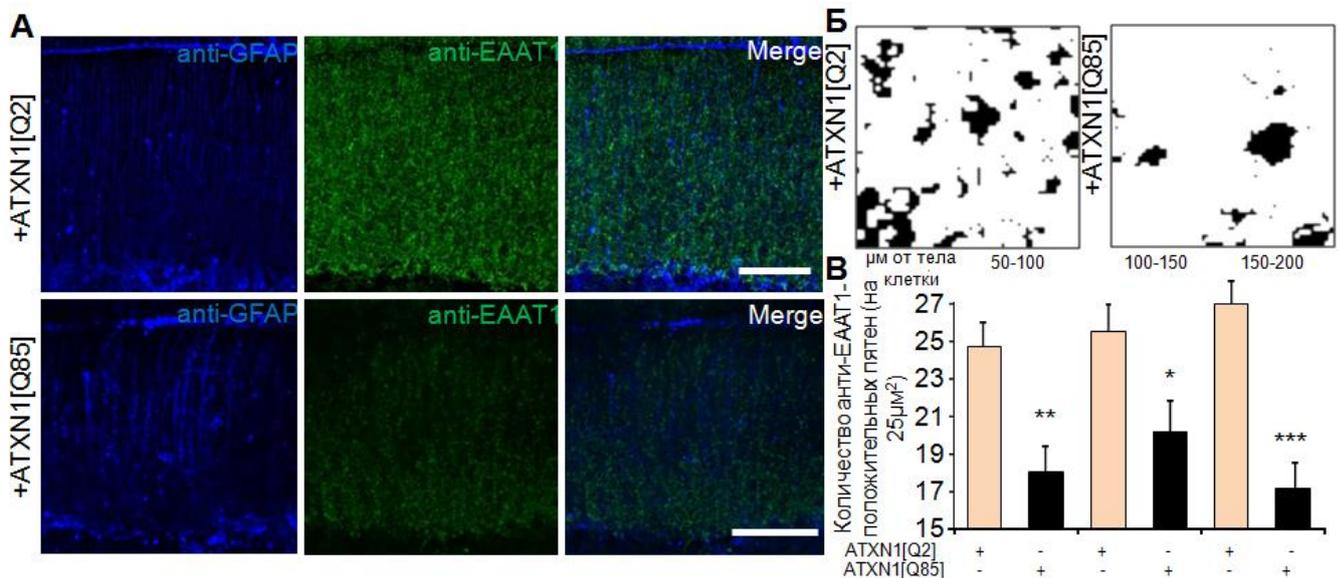


Рисунок 21 – Изменение экспрессии EAAT1 после экспрессии мутантного атаксина 1. А – Конфокальные изображения отростков ГБ, меченых анти-GFAP, анти-EAAT1 у мышей с экспрессией ATXN1 [Q2] и ATXN1 [Q85]. Мерная шкала 100μм. Б – Цифровые черно-белые изображения участков с метками анти-EAAT1, показывающими распространение / экспрессию EAAT1 у мышей, экспрессирующих ATXN1[Q2] и ATXN1[Q85], полученные с помощью программы ImageJ. В – Сравнение количества анти-EAAT1 положительных пятен на разных участках длины отростков ГБ у мышей, экспрессирующих ATXN1 [Q2] и ATXN1 [Q85]. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ [162].

3.5. Влияние астроглиоза на синаптическую пластичность в нейронах коры мозжечка

3.5.1. Влияние астроглиоза на кратковременную синаптическую пластичность (PPF)

Астроциты составляют около половины всех клеток мозга, влияют на многие функции нейронов и участвуют во многих процессах, связанных с синапсами, включая их пластичность. PPF – один из видов кратковременной синаптической пластичности, который, как считается, зависит от пресинаптического высвобождения медиатора. Однако было показано, что на PPF влияет и обратный захват нейромедиаторов астроцитами: время нахождения нейромедиатора в синаптической щели влияет на время восстановления ВПСТ, что влечёт за собой изменение амплитуды второго ответа в паре [194].

3.5.1.1. Ведение S100β не влияет на PPF

Белок S100β, выделяемый реактивными астроцитами в межклеточное пространство приводит к эндоцитозу этого белка нейронами и вызывает различные эффекты, например, хелатирование цитоплазматического Ca^{2+} . Кроме того, астроциты непосредственно контролируют удаление глутамата из синаптического пространства. По этой причине нужно было проверить, влияет ли повышенный внеклеточный S100β на синаптическую передачу в синапсах ПВ-КП. Предполагалось, что S100β будет влиять на процессы, сильно зависящие от высвобождения Ca^{2+} , например, на пресинаптическую секрецию глутамата, поэтому ожидалось изменение PPF в модели нейродегенерации, вызванной введением белка S100β.

Но в исследовании не было обнаружено существенных различий между коэффициентом PPF. Соотношение PPF у мышей, которым инъецировали S100β,

составляло $1,8 \pm 0,4$ ($n = 35/8$) по сравнению с $1,9 \pm 0,1$ ($n = 39/9$) у мышей, которым инъецировали PBS ($p=0,722$; рисунок 22) [16].

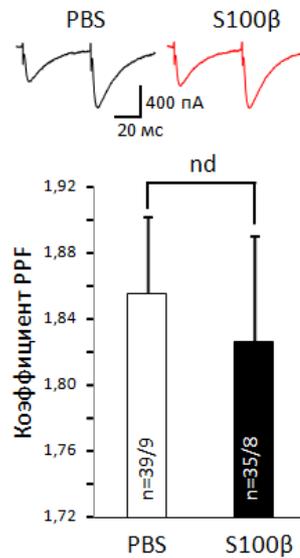


Рисунок 22 – Электрофизиологические свойства КП после введения S100β и PBS. Сравнение коэффициентов PPF. Сверху - репрезентативные кривые ПВ ВПСТ [16].

Добавление ТВОА не влияло на коэффициент PPF ПВ ВПСТ у мышей, которым вводили PBS ($1,86 \pm 0,1$ против $1,84 \pm 0,1$; $n = 16$ клеток от 4 мышей, $p = 0,673$), в то время как у мышей, которым вводили S100β, это приводило к небольшому, но значимому снижению отношения PPF с $1,9 \pm 0,2$ до $1,76 \pm 0,1$ ($n = 10$ клеток от 3 мышей, $p=0,049$, рисунок 23) [16]. Кроме того, ТВОА не влиял на восстановление амплитуды ПВ ВПСТ.

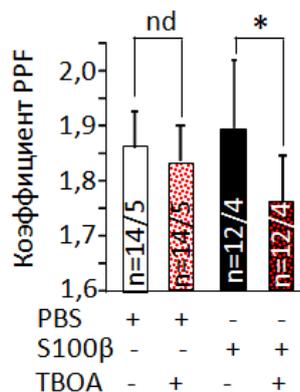


Рисунок 23 – Сравнение PPF у мышей, инъецированных S100β и PBS без и с добавлением ингибитора обратного захвата глутамата ТВОА. * $p < 0,05$ [16].

Эти результаты показывают, что обратный захват глутамата астроцитами влияет на PPF. Таким образом, избыточное внеклеточное накопление белка S100 β не влияет на пресинаптическое высвобождение глутамата, потому что не обнаружено значимых различий в амплитуде ПВВПСТ и коэффициентов PPF, но влияет на кинетику ПВВПСТ – ускорение времени спада, что, скорее всего, отражает изменения в удалении глутамата из синаптической щели.

3.5.1.2. Влияние фотостимуляции ГБ^{ChR2} на PPF

В модели селективного астроглиоза при исследовании электрофизиологических свойств КП при раздражении пресинаптических окончаний было выявлено увеличение коэффициента PPF в группе с хронической четырёхдневной фотостимуляцией ГБ^{ChR2} по сравнению с контролем ($1,57 \pm 0,01$ и $1,53 \pm 0,02$ соответственно, $p=0,004$; рисунок 24А) [10].

Для оценки динамики коэффициента PPF при активации ГБ^{ChR2} применяли острое одноминутное раздражение светом во время записи PPF. При сравнении групп животных, инъецированных PBS, было выявлено, что сам свет не оказывал значимого эффекта после его одноминутного применения во время записи PPF. К 5-й минуте (на графиках обозначена как точка 2) после раздражения не замечено значимых отклонений, и PPF составлял $100,6 \pm 1,3\%$ к контрольному значению (точка 1), $p=0,66$. Эти результаты значимо не различаются с данными без раздражения светом ($99,3 \pm 1,2\%$, $p=0,49$; рисунок 24В) [10]. В группе животных с ГБ^{ChR2} без хронической фотостимуляции к 5-й минуте PPF значимо увеличивался и составлял $104,0 \pm 1,1\%$ ($p=0,002$; рисунок 21Г). У животных после четырёхдневной хронической фотостимуляции острая активация ГБ^{ChR2} вызвала противоположный эффект – значительное понижение PPF к 5-й минуте ($97,5 \pm 1,1\%$, $p=0,04$). К 5-й минуте этот коэффициент PPF значимо отличался по сравнению с мышами без хронической фотостимуляции ($p=0,0013$; рисунок 24Г) [10].

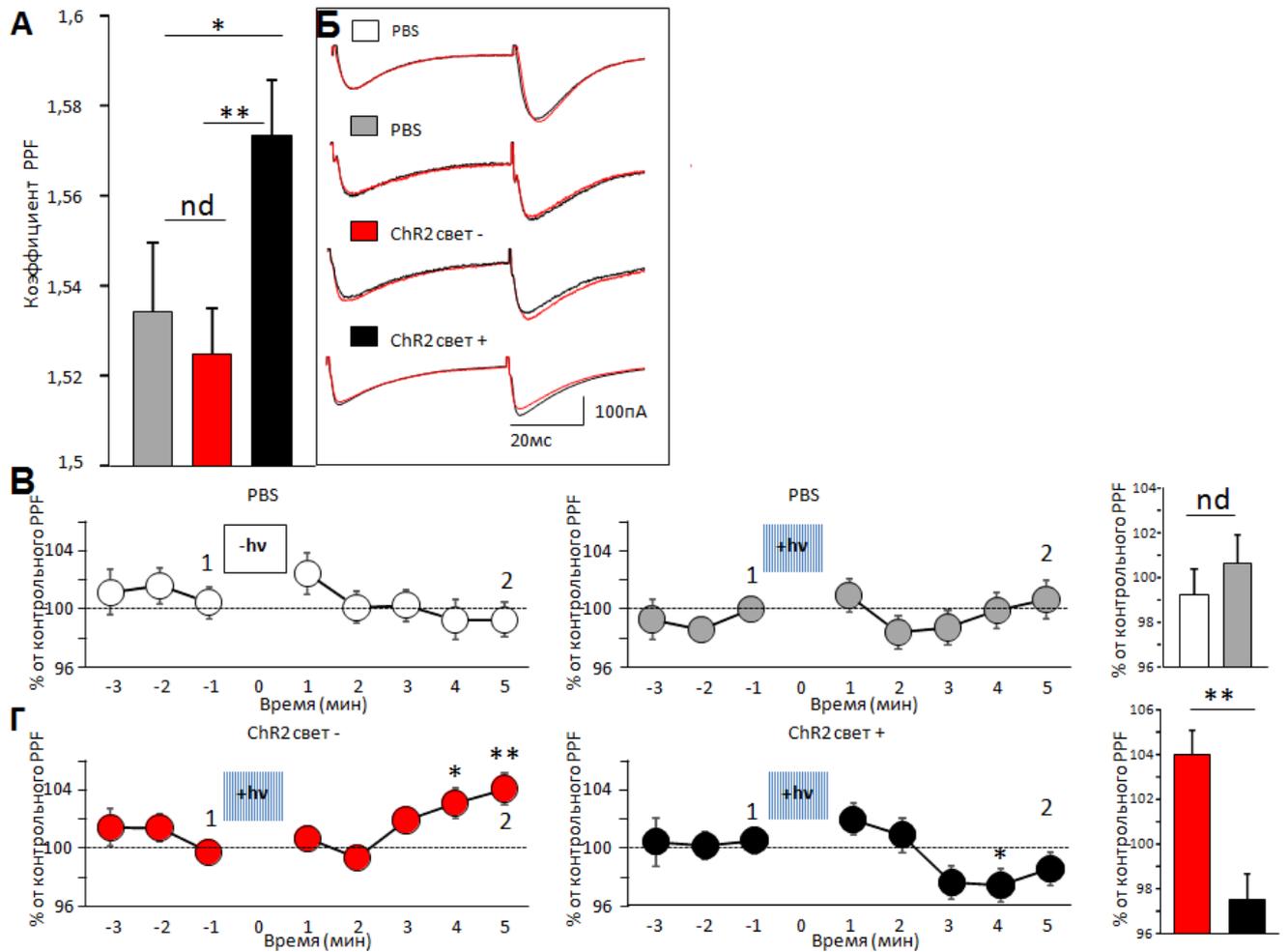


Рисунок 24 – Изменение PPF, вызываемое хронической фотостимуляцией ГВ^{ChR2}. А – Усреднённые значения PPF у животных, инъецированных PBS, AVV GFAP-ChR2-mKate с и без фотостимуляции. Б – Репрезентативные кривые ВПСТ. В – Графики флуктуации PPF у животных, инъецированных PBS до (слева) и после (в центре) острой фотостимуляции. Справа усреднённый график нормированных амплитуд в точке 2. Г – Графики флуктуации PPF у животных, инъецированных AVV GFAP-ChR2-mKate в ответ на острую фотостимуляцию без (слева) и после (в центре) хронической фотостимуляции. Справа усреднённый график нормированных амплитуд в точке 2. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ [10].

3.5.1.3. Влияние мутантного атаксина 1 на PPF

В модели селективного астроглиоза, вызванного экспрессией мутантного ATXN1[Q85] в ГБ, были обнаружены аналогичные патогенетические процессы. Чтобы исследовать влияние активированной ГБ на КП производилась котрансфекция LVV GFAP-ATXN1[Q2]-Flag или LVV GFAP-ATXN1[Q85]-Flag совместно с AVV GFAP-ChR2-mKate. Исследование электрофизиологических свойств КП выявило увеличение коэффициента PPF в группе мышей, экспрессирующей мутантный атаксин 1, по сравнению с контрольной группой, экспрессирующей нормальный атаксин 1 ($1,68 \pm 0,02$ и $1,59 \pm 0,02$ соответственно, $p < 0,001$; рисунок 25А) [10]. Острое одноминутное раздражение светом у животных, экспрессирующих ATXN1[Q2]/ChR2, приводило к увеличению PPF относительно контрольного уровня до стимуляции с максимальным эффектом на 2-й минуте ($104,7 \pm 1,4\%$, $p = 0,006$; рисунок 25Б). Острая фотостимуляция срезов, экспрессирующих ATXN1[Q85]/ChR2, вызывала уменьшение PPF с максимальным эффектом на 3-й минуте ($95,3 \pm 2,0\%$, $p = 0,029$, рисунок 25Б). На 2-й минуте после острой фотоактивации нормированные коэффициенты PPF статистически различались у этих двух групп ($p < 0,001$; рисунок 25Б) [10].

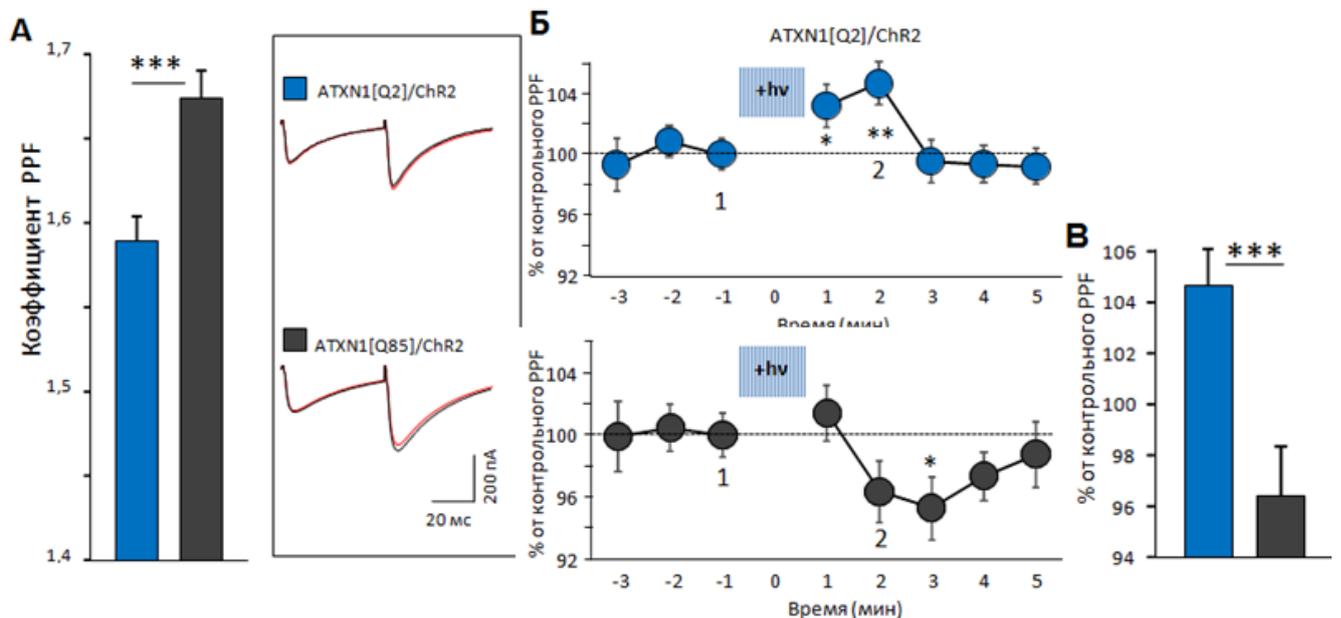


Рисунок 25 – Нарушение PPF, вызванное экспрессией мутантного атаксина 1.

А – График усреднённых значений PPF мышей, экспрессирующих в ГБ АТХN1[Q2]/ChR2 и АТХN1[Q85]/ChR2. Справа показаны репрезентативные кривые ВПСТ до (чёрные кривые) и после (красные кривые) острой фотостимуляции. Б – графики флуктуации PPF у этих животных в ответ на острую фотостимуляцию. Справа – усредненный график нормированных амплитуд в точке 2. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ [10].

Таким образом, во время активации нормальной ГБ, вероятно, происходит повышение обратного захвата нейромедиатора астроцитами и усиление глутамат-глутаминового цикла в них, что приводит, в конечном итоге, к увеличению уровня глутамата в синаптических везикулах на пресинапсе и нарастанию со временем PPF. У реактивной глии нарушен захват глутамата из синаптической щели, и поэтому наблюдается противоположный эффект – со временем PPF уменьшается. Это, наиболее вероятно, связано с нарушением градиента Na^+ в ГБ после острой фотостимуляции.

Данные изменения мы также нашли в ПВ-КП синапсах СЦА1 К1 животных, экспрессирующих мутантный атаксин 1, в том числе, и в астроцитах мозжечка. У данных животных коэффициент PPF составил $1,34 \pm 0,1$, $n = 11$ клеток от 4 мышей, тогда как у животных дикого типа этот показатель был $1,64 \pm 0,1$, $n = 11$ клеток от 4 мышей ($p=0,012$) (рисунок 26) [164].

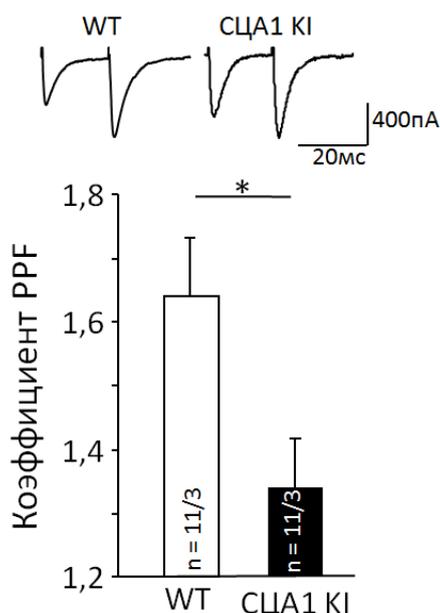


Рисунок 26 – График усреднённых коэффициентов PPF в КП животных дикого типа и СЦА1 KI животных. Репрезентативные кривые ПВ ВПСТ показаны сверху.

* $p < 0,05$ [164].

3.5.2. Изменение DSE

3.5.2.1. Внеклеточный S100 β изменяет эндоканнабиноид-зависимую краткосрочную пластичность в синапсах ПВ-КП

Выше мы предполагали, что S100 β может влиять на процессы, которые, зависят от цитозольной концентрации Ca²⁺. Одним из таких процессов является DSE, которая вызывается деполяризацией мембраны. Деполяризация приводит к открытию потенциалзависимых кальциевых каналов (VGCC) и увеличению внутриклеточного Ca²⁺. Ca²⁺ вызывает высвобождение эндоканнабиноидов из постсинаптических клеток с последовательной активацией рецепторов на пресинаптических окончаниях, что приводит к снижению высвобождения глутамата и является одним из механизмов, защищающих от эксайтотоксичности [103].

Мы исследовали динамику амплитуды ПВ ВПСТ после 50 с деполяризации от -70 до 0 мВ. Интенсивность стимула регулировали для достижения одинаковых

значений амплитуды ПВ ВПСТ в обеих группах до индукции DSE. У контрольных мышей протокол DSE снижал амплитуду на $67,3 \pm 3,5\%$ ($n = 11$ клеток от 4 мышей), что было сопоставимо с результатами у мышей, которым предварительно вводили S100 β ($69,7 \pm 4,7\%$, $n = 13$ клеток от 4 мышей), $p=0,975$; рисунок 27А-Б) [16].

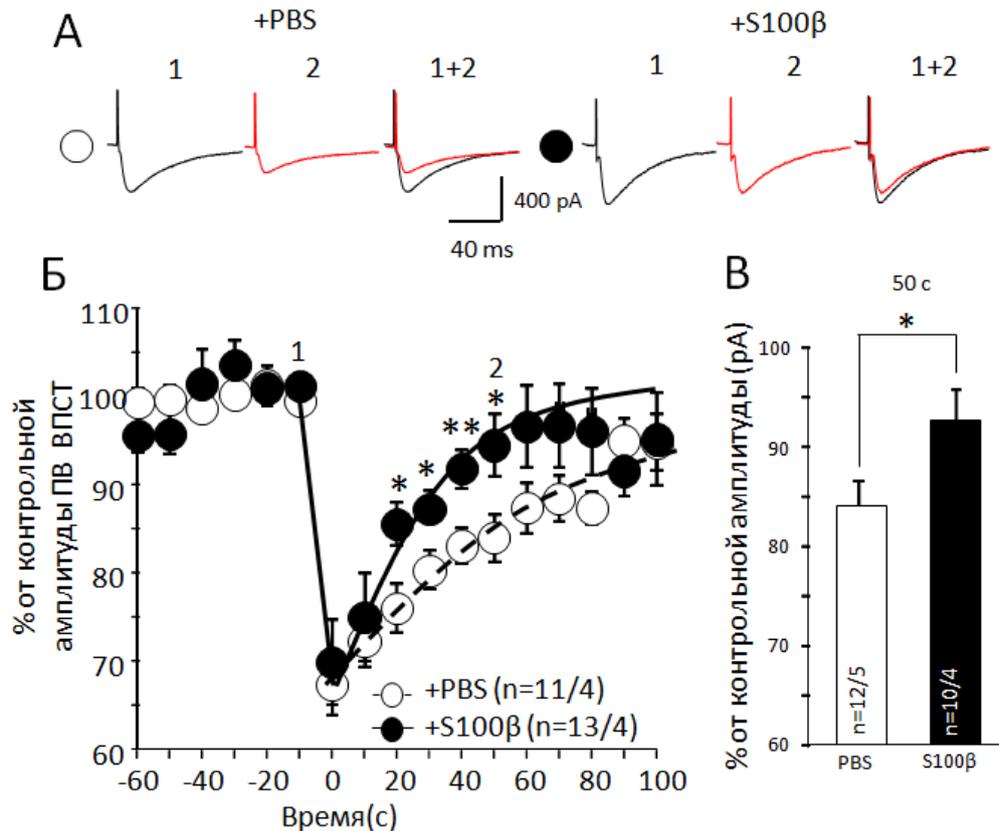


Рисунок 27 – Влияние S100 β на DSE в синапсах ПВ-КП. А – Репрезентативные кривые ПВ ВПСТ у мышей, которым вводили PBS и S100 β . Временные точки: до (1) и через 50 с после (2) деполяризации. Б – Средняя временная диаграмма амплитуд ПВ ВПСТ до и после деполяризации. Амплитуды ПВ ВПСТ нормировали до значений до деполяризации. Пунктирные и черные линии указывают на модель, подходящую для групп, которым вводили PBS и S100 β , соответственно. В – Сравнение амплитуд ПВ ВПСТ через 50 с после деполяризации. * $p < 0,05$ [16].

Однако восстановление амплитуды происходило значительно быстрее у мышей, которым вводили S100 β . Через пятьдесят секунд после деполяризации

амплитуда вернулась к $93,6 \pm 2,8\%$ от контроля у мышей с S100 β по сравнению с $83,9 \pm 2,7\%$ у мышей, которым вводили PBS ($p=0,03$; рисунок 27) [16]. Подгонка модели по формуле (1) подтвердила изменение кинетики восстановления при S100 β . Снижение амплитуды в протоколе DSE существенно не отличалось у мышей, которым вводили S100 β , по сравнению с группой PBS: $45,5\%$ ($30,6\%;63,6\%$) против $38,1\%$ ($31,8\%;44,6\%$) соответственно [16]. Используя протокол подбора, мы подсчитали, что период полураспада для восстановления параметра (τ_2) значительно меньше у мышей, которым вводили S100 β : $29,7$ с ($21,0$ с; $47,2$ с) по сравнению с $64,5$ с ($52,0$ с; $85,1$ с) в группе PBS ($p<0,05$) (рисунок 27Б). Эти результаты демонстрируют, что избыток внеклеточного белка S100 β способствует более быстрому восстановлению после DSE.

Ранее было показано, что астроциты также содержат CB1-рецепторы и могут модулировать синаптическую пластичность [75]. Рецепторы CB1 в астроцитах сопряжены с Gq/11-белками и запускают активацию фосфолипазы C (PLC) [117] и высвобождают такие глиотрансмиттеры, как глутамат, АТФ или d-серин [144]. Это явление зависит от SNARE и очень чувствительно к концентрации АТФ, которая снижается с помощью FC [44, 117]. Однако FC, угнетающий метаболизм в астроцитах, не влиял на экспрессию DSE. После применения FC у мышей, которым вводили PBS, протокол DSE снижал ВПСТ на $56,8 \pm 8,7\%$ ($n = 9$ клеток от 4 мышей), что статистически не отличалось от зарегистрированного без FC у мышей, которым вводили S100 β (рисунок 28А, Б) ($p=0,317$) [16]. Однако это сравнение следует интерпретировать с осторожностью, так FC прямо влияет на ПВ ВПСТ. Модель двойной волны соответствует изменениям амплитуд ПВ ВПСТ после импульса деполяризации и инициации DSE. Максимальное снижение амплитуд составило $51,92\%$ ($41,67\%$, $81,41\%$) для мышей, инъецированных PBS, и $46,23\%$ ($33,28\%$, $75,49\%$) для мышей, инъецированных S100 β [16]. Однако восстановление амплитуды ПВ ВПСТ после добавления FC было значительно медленнее у мышей, инъецированных PBS (рисунок 28В). Через пятьдесят секунд после деполяризации он вернулся к $67,5 \pm 5,4\%$ от контроля по сравнению с необработанными срезами, где он

восстановился до $83,9 \pm 2,7\%$, $p=0,025$ (рисунки 27Б и 28В). Тем не менее, FC практически не влиял на восстановление амплитуды после деполяризации у мышей, которым вводили S100 β (восстановление амплитуды до $81,4 \pm 7,6\%$ от контрольной, по сравнению с $93,6 \pm 2,8\%$ в группе без добавления FC, $p=0,181$) (рисунки 27Б и 28В) [16]. Подгонка модели двойной волны также не выявила существенных изменений после обработки FC. Эти результаты демонстрируют, что замедление захвата глутамата влияет на время спада ПВ ВПСТ и не меняет DSE в модели астроглиоза, вызванного введением белка S100 β .

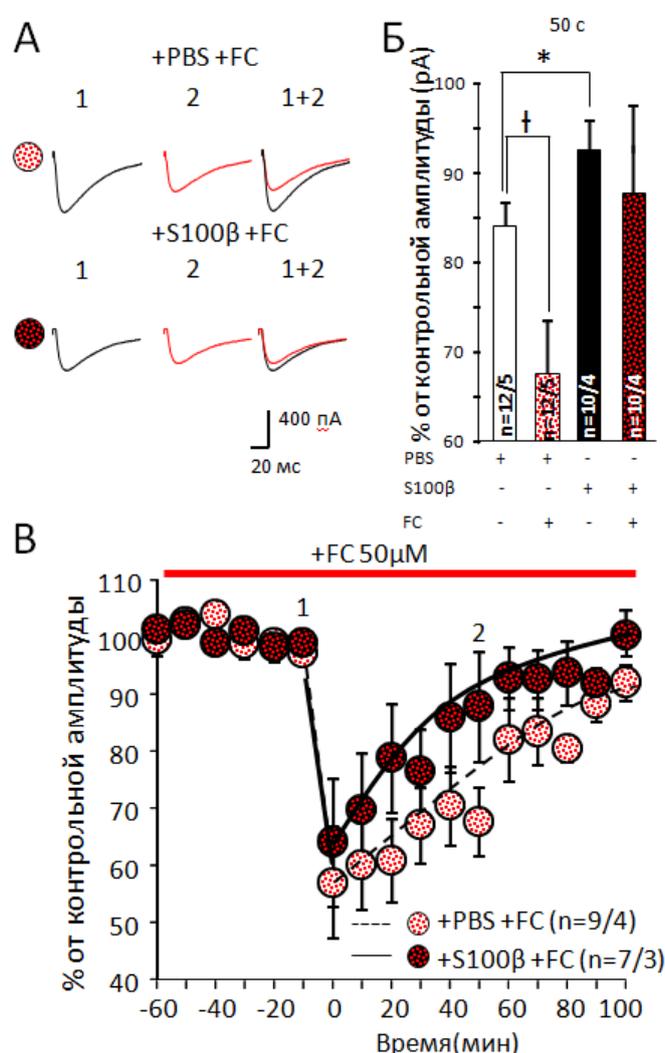


Рисунок 28 – Влияние астроцитов на DSE. А – Репрезентативные кривые ПВ ВПСТ у мышей, которым вводили PBS и S100 β . Временные точки: до (1) и через 50 с после (2) деполяризации. Б – Сравнение амплитуд ПВ ВПСТ через 50 с после деполяризации. В – График усреднённых амплитуд ПВ ВПСТ до и после

деполяризации в срезах, обработанных 50 μM FC. Пунктирные и черные линии указывают на модель двойной волны, подходящую для групп, которым вводили PBS и S100 β , соответственно. *, † $p < 0,05$ [16].

3.5.2.2. Экспрессия мутантного атаксина 1 изменяет эндоканнабиноид-зависимую краткосрочную пластичность в синапсах ПВ-КП

Также мы исследовали динамику амплитуды ПВ ВПСТ в модели селективного астроглиоза, вызванного экспрессией мутантного атаксина 1 в ГБ. У мышей, экспрессирующих ATXN1[Q85], протокол DSE снижал амплитуду до $66,7 \pm 7,3\%$ ($n = 10$ клеток от 3 мышей), что было меньше по сравнению с результатами от мышей, экспрессирующих ATXN1[Q2] ($42,3 \pm 5,9\%$, $n = 10$ клеток от 3 мышей), $p = 0,045$ (рисунок 29) [164]. Эти результаты демонстрируют, что экспрессия мутантного атаксина 1 в ГБ влияет на DSE.

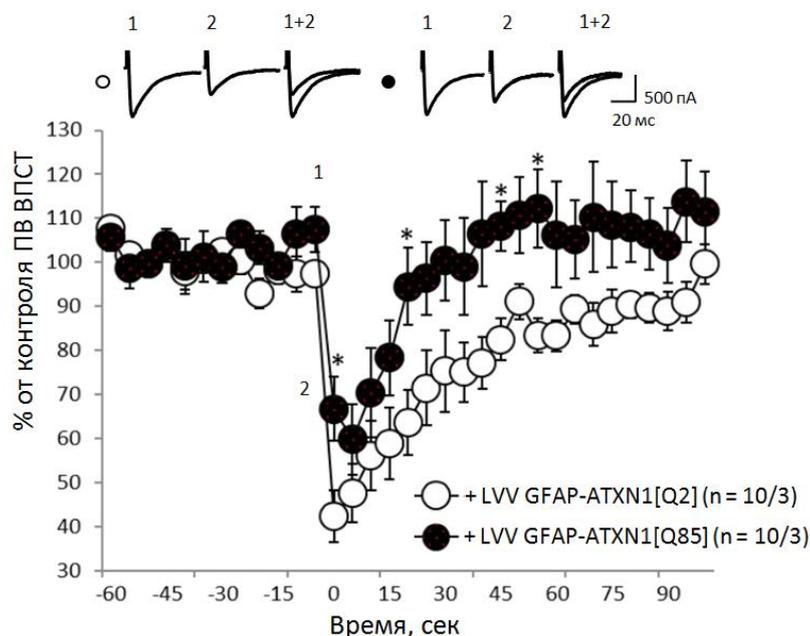


Рисунок 29 – Влияние экспрессии мутантного атаксина 1 на DSE в синапсах ПВ-КП в модели селективного астроглиоза, вызванного экспрессией ATXN1[Q85]. Средняя временная диаграмма амплитуд ПВ ВПСТ до и после деполяризации. Амплитуды ПВ ВПСТ нормировали к значениям до деполяризации. Сверху показаны репрезентативные кривые ПВ ВПСТ у мышей, экспрессирующих

ATXN1[Q2] и ATXN1[Q85]. Временные точки: до (1) и после (2) деполяризации.

* $p < 0,05$ [164].

У трансгенных СЦА1 КИ мышей протокол DSE также снижал амплитуду значительно меньше (до $84,6 \pm 4,2\%$, $n = 10$ клеток от 3 мышей) по сравнению с диким типом ($43,3 \pm 5,8\%$, $n = 10$ клеток от 3 мышей), $p < 0,001$, рисунок 30) [164].

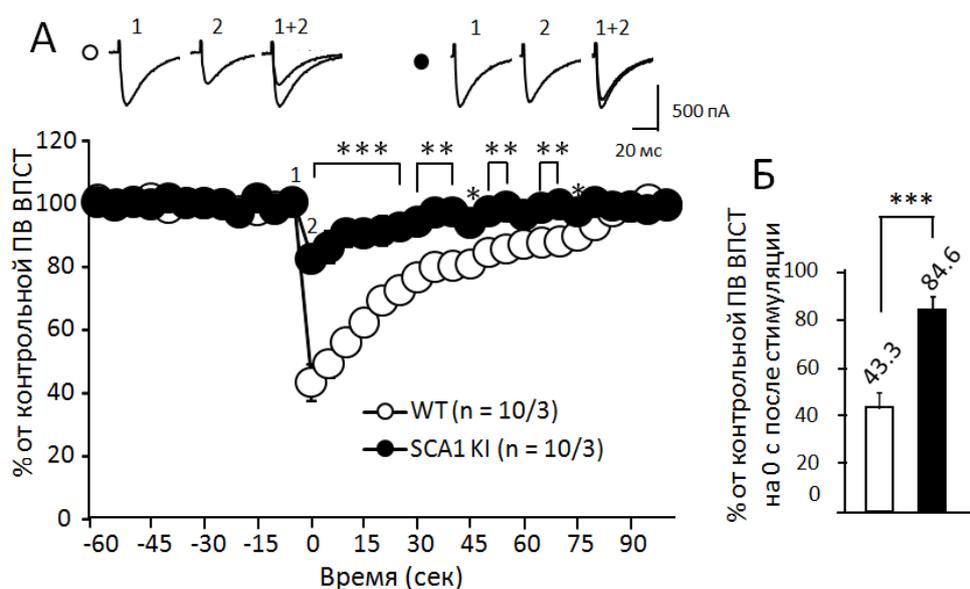


Рисунок 30 – Влияние экспрессии мутантного атаксина 1 на DSE в синапсах ПВ-КП в трансгенной модели СЦА1 КИ. А – Временная диаграмма усреднённых амплитуд ПВ ВПСТ до и после деполяризации. Амплитуды ПВ ВПСТ нормировали к значениям до деполяризации. Репрезентативные кривые ПВ ВПСТ представлены над графиком. Временные точки: до (1) и сразу после (2) деполяризации. Б – Сравнение амплитуд ПВ ВПСТ после деполяризации во временной точке (2). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ [164].

Интересен тот факт, что DSE не нарушается в моделях СЦА1, где мутантный атаксин 1 экспрессируется только в КП, в частности В05 [163]. Подобие результатов полученных при исследовании моделей астроглиоза и трансгенной модели СЦА1 КИ подтверждает, что при СЦА1 именно нарушение функции астроцитов вносит вклад в развитие нейродегенерации.

3.5.3. Влияние астроглиоза на долговременную синаптическую пластичность (LTD)

В отличие от кратковременной пластичности, долговременная пластичность связана с транслокацией мембранных рецепторов, в первую очередь, AMPA рецепторов. Долговременное ослабление импульса (LTD) индуцируется деполяризацией постсинаптической мембраны и одновременным повторяющимся раздражением пресинаптических волокон (сочетанная стимуляция). В головном мозге мозжечок является одной из структур, где LTD является формой нейропластичности. ПВ-КП LTD может играть решающую роль в моторном обучении [99], регулируя заключительную стадию мозжечково-кортикальной интеграции.

Мы исследовали динамику амплитуды ПВ ВПСТ после сочетанной стимуляции. У мышей, экспрессирующих ATXN1[Q2] протокол LTD приводил к снижению амплитуды на $56,2 \pm 5,4\%$ ($n = 5$ клеток от 3 мышей), тогда как в модели селективного астроглиоза с экспрессией мутантного ATXN1[Q85] наблюдалось снижение только до $80,1 \pm 4,8\%$ ($n = 5$ клеток от 3 мышей), $p < 0,05$ (рисунок 31) [164].

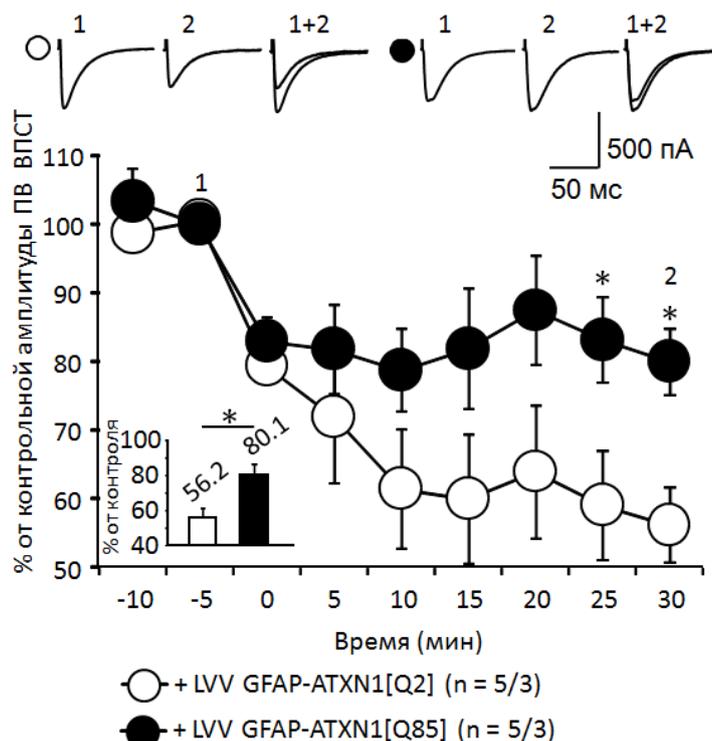


Рисунок 31 – Влияние экспрессии атаксина 1 на LTD в синапсах ПВ-КП в модели селективного астроглиоза. Временная диаграмма усреднённых за 5 мин амплитуд ПВ ВПСТ до и после деполяризации. Вверху показаны репрезентативные кривые ПВ ВПСТ до и после сочетанной стимуляции (временные точки 1 и 2).* $p < 0,05$ [164].

Аналогичные результаты наблюдались и у трансгенных СЦА1 К1 мышей. Через 30 минут после раздражения у трансгенных мышей амплитуда снижалась до $88,9 \pm 6,2\%$ от контрольной (6 клеток от 3 мышей), тогда как у дикого типа снижалась до $63,7 \pm 4,2\%$ (7 клеток от 3 мышей), $p < 0,05$ (рисунок 32) [164].

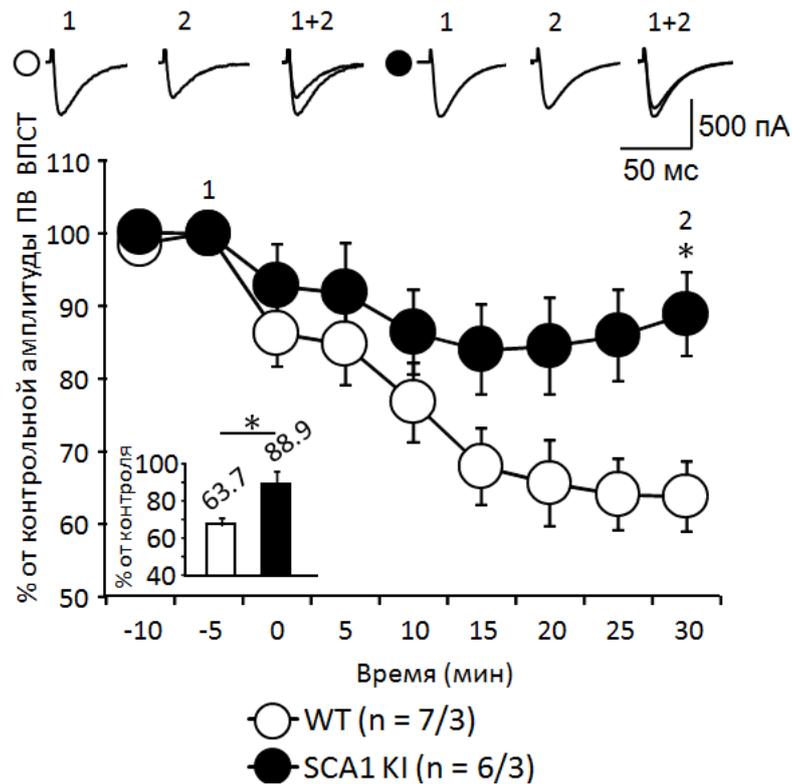


Рисунок 32 – Нарушение LTD в синапсах ПВ-КП СЦА1 КИ животных.

Временная диаграмма усреднённых за 5 мин амплитуд ПВ ВПСТ до и после деполяризации. Вверху показаны репрезентативные кривые ПВ ВПСТ до и после сочетанной стимуляции (временные точки 1 и 2). * $p < 0,05$ [164].

3.6. Нарушение координации и двигательных навыков у модельных животных с астроглиозом коры мозжечка

LTD играет ключевую роль в моторном обучении. И наблюдаемые в моделях изменения синаптической пластичности могут быть причиной возникновения нарушений двигательной активности. Для проверки функционирования мозжечка был проведён тест на вращающейся дорожке (rotarod). Тест позволяет оценить баланс, координацию движений и обучаемость испытуемых животных. В ходе теста мышь помещают на горизонтально ориентированный вращающийся цилиндр, подвешенный над полом клетки, достаточно низко, чтобы животное не травмировалось при падении, но достаточно высоко, чтобы избежать спрыгивания. Скорость вращающегося

цилиндра управляется механически и увеличивается в течение пяти минут. Тест проводится в течение пяти дней, каждый день отмечается время, которое мышка удерживается на ускоряющейся дорожке.

У мышей, экспрессирующих АТХN1[Q85], наблюдается снижение времени до падения с вращающейся дорожки по сравнению с контрольной группой. На второй день у мышей, экспрессирующих АТХN1[Q85], время составляло $129,9 \pm 12,4$ с (11 мышей) и у мышей, экспрессирующих АТХN1[Q2] – $176,6 \pm 9,1$ с (13 мышей), $p=0,007$) (рисунок 33) [164].

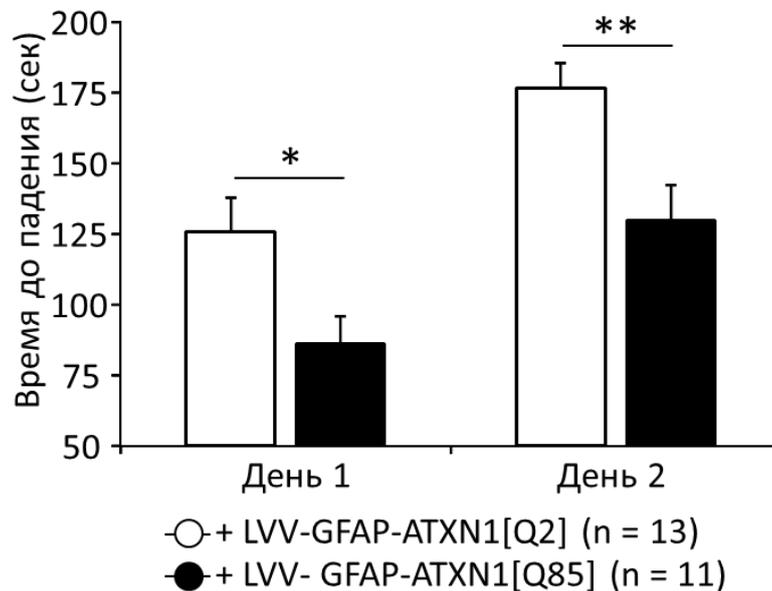


Рисунок 33 – Влияние селективной экспрессии мутантного атаксина 1 на двигательную активность животных. График усреднённого времени нахождения мыши на вращающейся дорожке. Каждый день животному давалось 4 попытки, данные усреднялись за 1 день тренировок. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ [164].

Аналогичные результаты наблюдались и в модели СЦА1 К1, однако были более выраженными. На второй день у мышей СЦА1 К1 время составляло $79,6 \pm 4,8$ с (11 мышей) и у дикого типа – $231,1 \pm 10,6$ с (11 мышей), $p<0,001$ (рисунок 34) [164].

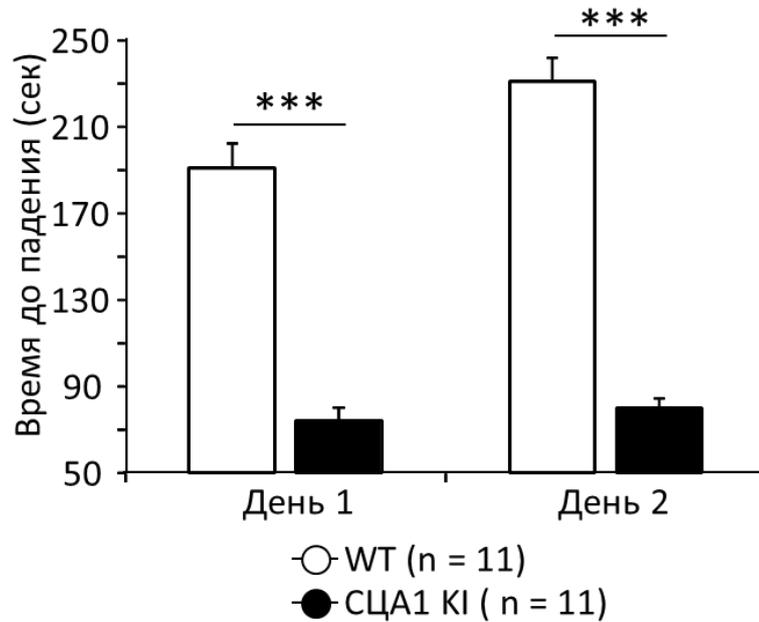


Рисунок 34 – Нарушение двигательной активности СЦА1 КИ животных. График усреднённого времени нахождения мыши на вращающейся дорожке. Каждый день животному давалось 4 попытки, данные усреднялись за 1 день тренировки.*** $p < 0,001$ [164].

Таким образом, можно сделать вывод, что астроглиоз в созданных моделях приводит к нарушению морфологии КП, синаптической передачи и разных видов синаптической пластичности, что оказывает влияние на двигательную активность. Результаты полученные при исследовании созданных моделей сопоставимы с результатами от трансгенной модели СЦА1 КИ максимально приближенной к течению заболевания у СЦА1 пациентов.

4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

4.1. Влияние активированной ГБ на морфологию КП

В норме, астроциты обладают нейропротекторным действием [94], однако реактивные астроциты могут играть негативную роль в патологических процессах [127]. Астроглиоз – это общий признак травмы головного мозга, аутоиммунных заболеваний и различных нейродегенеративных заболеваний, включая СЦА1. При этом меняется морфология и функция астроцитов, что влияет на состояние всех контактирующих с ними клеток и приводит к комплексным нейрпатологическим нарушениям.

ГБ представляет собой высокоспециализированные астроциты коры мозжечка, принимающие участие в метаболических и сигнальных процессах КП и других клеток МС [166]. Потеря и активация ГБ и негативные изменения в КП были зарегистрированы на моделях мышей СЦА1 [40, 160] и СЦА7 [38]. Однако из-за неселективной экспрессии мутантных белков в этих моделях мышей они не позволяют исследовать специфический вклад ГБ. Чтобы исследовать влияние активированных астроцитов на нейродегенерацию при СЦА1 мы использовали несколько моделей мышей: от общей модели нейродегенерации до более специфичных моделей заболевания СЦА1.

4.1.1. Морфологические изменения реактивной ГБ

S100 β представляет собой белок, связывающий Ca²⁺ [44]. При астроглиозе наблюдается избыточное выделение S100 β реактивными астроцитами [183]. При патологических состояниях избыточная внеклеточная концентрация S100 β способствует выделению провоспалительных цитокинов и вызывает апоптоз.

Ранее было показано, что поглощение КП большого количества S100 β , приводит к изменению морфологии и дегенерации КП [147, 183, 184, 188]. В

модели трансгенных мышей СЦА1 образование S100 β -содержащих цитоплазматических вакуолей предшествует накоплению мутантного атаксина 1 и появлению атаксического фенотипа [188], а понижение уровня S100 β устраняет неврологический дефицит. Поэтому утверждалось, что этот белок играет центральную роль в нейродегенерации [183]. Мы попытались имитировать некоторые особенности СЦА1 с помощью инъекций S100 β . Чтобы избежать иммунной реакции на чужеродный антиген, использовался мышинный S100 β .

С помощью иммуногистохимии было обнаружено, что область накопления S100 β распространяется значительно дальше фактического места инъекции и охватывает 2-3 доли мозжечка. Максимальный иммунохимический сигнал наблюдался в долях V-VII (рисунок 6B). Чтобы избежать ложноположительных результатов при измерении морфологии ГБ и КП, мы во всех экспериментах использовали доли VI и VII, на которые инъекция напрямую не влияла.

Избыточное количество S100 β изменило морфологию ГБ: уменьшение числа клеток ГБ (рисунок 7Б, Е) и их отростков (рисунок 7Г) сопровождалось утолщением отростков (рисунок 7В) и прорастанием новых отростков в проксимальных областях (рисунок 8А, В). При измерении толщины МС мы обнаружили, что он значительно уменьшился под действием S100 β (рисунок 11А, Б). Так как толщина МС коррелирует с длиной дендритного дерева КП [66], её уменьшение говорит о дегенерации нейронов. Это подтвердилось и в электрофизиологическом эксперименте – ёмкость мембраны сомы и дендритов КП также значительно изменилась (рисунок 11В).

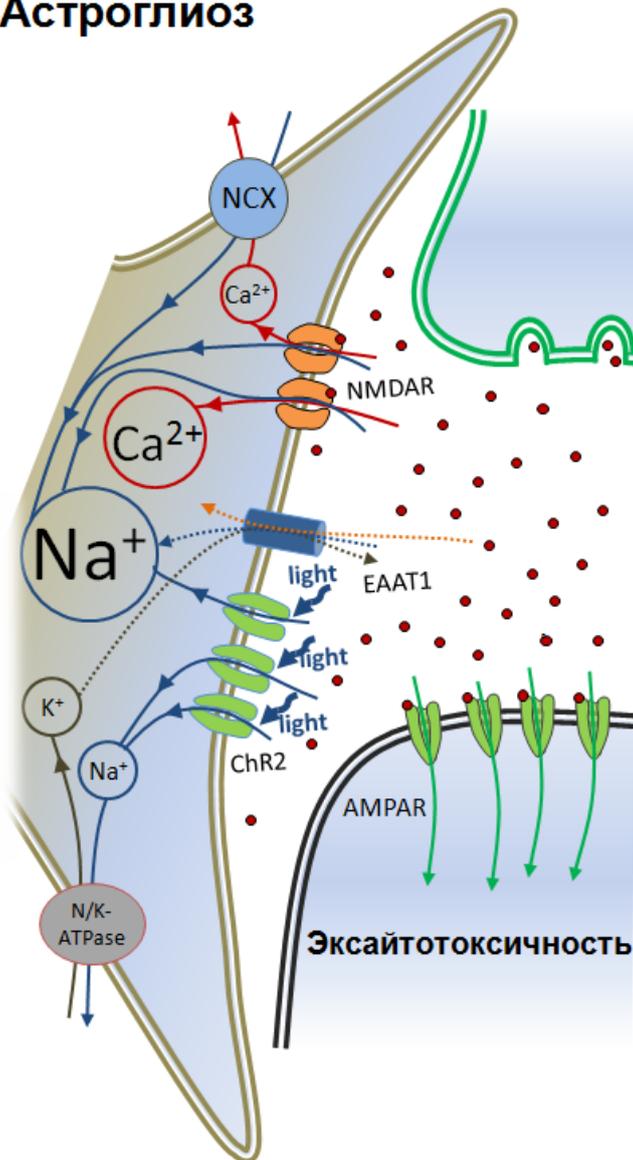
Таким образом, избыточное количество S100 β приводит к нейродегенерации КП, что может быть обусловлено влиянием реактивных астроцитов либо быть следствием захвата этого белка КП.

Чтобы чётко обозначить влияние реактивных астроцитов на КП, была создана модель селективной активации ГБ с неспецифическим раздражителем астроцитов (хроническая фотоактивация с использованием ChR2). Для создания модели мышам вводили в кору червя мозжечка AVV GFAP-ChR2-mKate. Высокая экспрессия векторных конструкций в астроцитах была обеспечена включением

промотора GFAP, специфичного для глиальных клеток [93]. Корректность введения конструкций оценивали по флуоресценции mKate методом иммуногистохимии. Через 4 дня флуоресценция mKate была выражена в мозжечковых дольках V-VII. mKate-положительное окрашивание (отростки ГБ) было колокализовано с окрашиванием анти-GFAP в МС (рисунок 9Б), что подтверждает селективную экспрессию оптогенетической конструкции в ГБ.

После введения оптогенетической конструкции мышей стимулировали светом повторными импульсами в течение четырёх дней. Эффект хронической фотостимуляции отражает метаболический стресс клеток ГБ, вызванный мощной продолжительной стимуляцией. Активация ChR2 приводит к поступлению в цитоплазму натрия (рисунок 35). Из-за сравнительно медленной кинетики натриевые токи, опосредованные ChR2, намного длиннее по сравнению с обычным потенциалом действия. Для восстановления ионного баланса клетки, в данном случае ГБ, вынуждены расходовать большие количества АТФ для питания Na^+/K^+ -АТФазы и других ионных насосов. Кроме того, теоретически возможны другие эффекты, такие как изменения осмотического давления. Это должно вызвать необходимость в большом количестве энергии в клетке и, вероятно, со временем вызвать признаки атрофии, нарушение строения мембраны, цитоскелета и уменьшения размера клеток, что и было продемонстрировано (рисунок 9Б-Д).

Астроглиоз



Норма

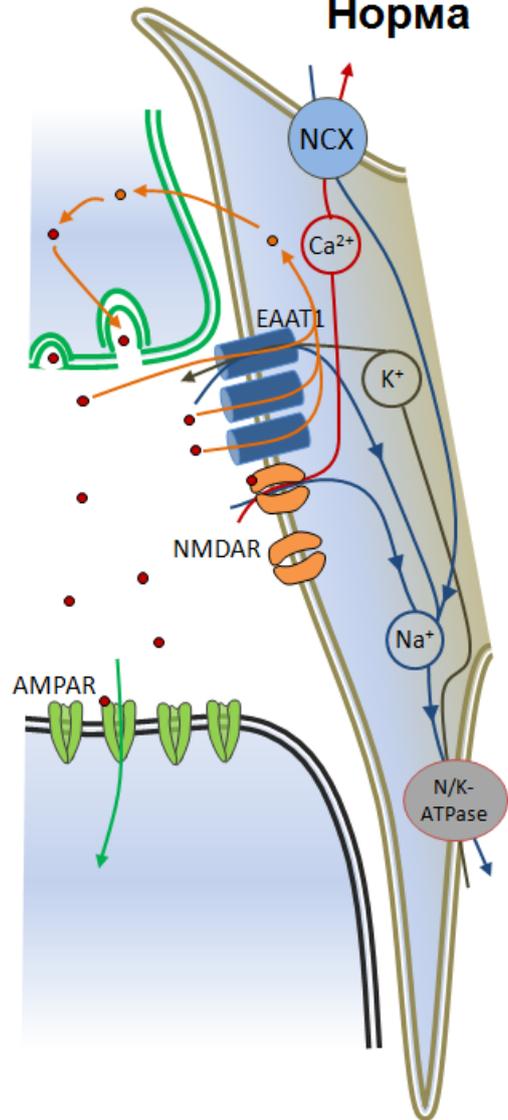


Рисунок 35 – Нарушение функции ГБ в модели ГБ^{ChR2}. Накопление в цитоплазме астроцитов Na^+ замедляет работу транспортёров EAAT, что приводит к накоплению нейромедиатора в синаптической щели и развитию эксайтотоксичности.

4.1.2. Влияние реактивной ГБ на морфологию КП

Кроме того, оптогенетическая сверхактивация и реактивность ГБ приводят к дегенерации КП. Четырёхдневная хроническая фотостимуляция ГБ^{ChR2}, приводит к снижению антикальбиндиновой иммунореактивности КП (рисунок

12А-Г). Наиболее очевидным признаком нейродегенерации КП была атрофия их дендритов, о чем свидетельствует уменьшение толщины МС (рисунок 12Д). Количество КП также уменьшилась (рисунок 12Е и таблица 4). Размер мембраны КП также уменьшился, о чем свидетельствует уменьшение ёмкости мембраны КП (таблица 5). Эти изменения напоминают первую модель – введение S100 β в кору мозжечка также приводило к появлению реактивной ГБ, усилению ветвления и толщины отростков ГБ и дегенерации КП. Это согласуется и с выводами других научных групп [82, 116, 176].

Также была создана модель селективного астроглиоза посредством специфического (экспрессия мутантного атаксина 1) раздражителя астроцитов коры мозжечка, чтобы исследовать прямое влияние реактивной ГБ на нейродегенерацию при СЦА1. Трехнедельным мышам вводили LVV GFAP-ATXN1[Q85]-Flag. Через девять недель проводили иммуногистохимические и электрофизиологические исследования. Включение промотора GFAP, специфичного для глиальных клеток, обеспечивало высокую экспрессию атаксина 1 именно в астроцитах. Корректность введения конструкций оценивали по меткам анти-Flag методом иммуногистохимии. В ГБ, экспрессирующей мутантный атаксин 1, также был усилен анти-GFAP сигнал (рисунок 10А), что говорит о реактивации ГБ [135, 167]. По сравнению с данными от предыдущих моделей, мутантный атаксин 1 оказывал умеренное негативное влияние на морфологию ГБ после 9 недель экспрессии (рисунок 10Б-Г и таблица 3). Тем не менее, он влиял на функцию ГБ и оказывал влияние на соседние КП. У этих мышей размер КП был уменьшен, а τ ПВ ВПСТ с поправкой на размер клеток увеличился (рисунок 18А, В). Интересно, что селективная экспрессия мутантного атаксина 1 в КИ [188] приводила к аналогичному паттерну (рисунок 19).

4.2. Влияние реактивной глии на синаптическую передачу КП

Дендритное дерево каждой КП имеет тысячи синаптических соединений с параллельными волокнами и 1-2 синапса с лазающими волокнами [95]. Следовательно, нарушение морфологии дендритов может привести к изменению синаптической передачи КП. Кроме того, одной из функций астроцитов является обратный захват нейромедиаторов из синаптической щели, следовательно, астроглиоз также может оказывать влияние на синаптическую передачу. Для того чтобы проверить влияние активированной ГБ мы регистрировали такие электрофизиологические характеристики клеток, как ПВ ВПСТ, PPF, DSE, LTD.

В модели неселективного астроглиоза, вызванного введением белка S100 β наблюдалось изменение кинетики ПВ ВПСТ – увеличивалось время нарастания и уменьшалось время спада ВПСТ (рисунок 13). Использование FC (рисунок 14), ингибитора метаболизма астроцитов, показало, что увеличение времени нарастания, вероятно, связано с нарушением цикла глутамат-глутамин в астроцитах, и, как следствие, уменьшением количества глутамата в синаптической щели. Хотя избыточное количество S100 β не оказывает влияния на амплитуду ВПСТ, подобное изменение времени нарастания говорит, что введение S100 β приводит к нарушению функции астроцитов.

В модели селективного астроглиоза через четыре дня фотостимуляции ГБ^{ChR2} основные свойства синаптической передачи между ПВ и КП были относительно сохранены (таблица 5). Очевидно, что снижение ёмкости мембраны клетки, вызванное коллапсом ее дендритного дерева, повлияло на регистрируемую нами ВПСТ. Чтобы обойти различия в размерах КП между группами, мы сравнили τ ВПСТ между КП с примерно сопоставимой ёмкостью, оцененной по « τ пассивному» (рисунок 15А,Б). Этот анализ выявил пролонгацию τ ПВ ВПСТ (рисунок 15В) у животных, экспрессирующих ChR2, после хронической фотостимуляции. У мышей, экспрессирующих GFAP-ATXN1[Q85]-Flag, также размер КП был уменьшен, а τ ВПСТ с поправкой на размер клеток

увеличился (рисунок 16В). Интересно, что селективная экспрессия мутантного атаксина у СЦА1 К1 животных приводила к аналогичному результату (рисунок 17).

Чтобы подтвердить, что удлинение τ ВПСТ является следствием сниженной активности EAAT1, отвечающих за обратный захват глутамата ГБ, мы использовали ТВОА (рисунок 18А). Также использовали низкую концентрацию убаина, который должен предпочтительно воздействовать на транспортёры ГБ посредством нарушения градиента Na^+/K^+ , необходимого для усиления поглощения глутамата EAAT1 [79, 193]. Как и ожидалось, как ТВОА, так и низкая концентрация убаина вызывали удлинение τ ВПСТ (рисунок 18), что аналогично результатам, полученным при хронической фотостимуляции ГБ и при экспрессии мутантного атаксина 1.

При исследовании мышей, которым вводили PBS и S100 β , мы обнаружили, что добавление ТВОА значительно увеличивало τ ПВ ВПСТ (рисунок 19). Применение ТВОА не оказывало существенного влияния на амплитуду ПВ ВПСТ и время нарастания в мозжечке мышей, которым вводили PBS и S100 β . Эти результаты демонстрируют, что избыточное внеклеточное накопление белка S100 β не влияет на пресинаптическое высвобождение глутамата, так как нет значимых различий в амплитуде ПВ ВПСТ и коэффициентов PPF, однако, этот белок влияет на ускорение времени спада, что, скорее всего, отражает изменения в обратном захвате глутамата ГБ.

Основные переносчики глутамата в астроциты – EAAT1 и EAAT2. Для подтверждения, что изменения кинетики ПВ ВПСТ вызваны нарушением удаления глутамата из синаптической щели, была проверена экспрессия переносчиков глутамата. Выявлено, что в мозжечке доминирует экспрессия EAAT1 (рисунок 20А-Г). Наблюдалось снижение экспрессии EAAT1 на всем протяжении отростков ГБ как в модели селективного астроглиоза после хронической фотостимуляции ГБ^{ChR2} (рисунок 20Д, Е), так и в модели с селективной экспрессией ATXN1[Q85] (рисунок 21Б, В). Эти результаты показывают, что снижение количества EAAT1 является отличительной чертой

поражения мозжечка в наших моделях астроцит-опосредованной нейродегенерации СЦА1.

4.3. Нарушение синаптической пластичности в ПВ-КП синапсах, окружённых реактивной ГБ и двигательные расстройства

PPF считается событием, протекающим всецело на пресинаптической мембране. Однако было показано, что при PPF изменение амплитуды второго ответа в паре связано также с пролонгированием времени восстановления ВПСТ [194]. Время восстановления ВПСТ отражает период пребывания нейромедиатора в синаптической щели и, следовательно, зависит от нормального функционирования астроцитов [14].

Наши данные свидетельствуют о том, что S100 β не влияет на пресинаптическое высвобождение глутамата, поскольку он существенно не изменял амплитуду ПВ ВПСТ (рисунок 16) и отношение PPF (рисунок 22). Но при добавлении ТВОА у мышей, которым вводили S100 β , наблюдалось небольшое снижение PPF (рисунок 23), что подтверждает зависимость PPF от обратного захвата глутамата астроцитами.

В моделях селективного астроглиоза реактивная ГБ способствует изменению PPF (рисунки 24, 25). Во время активации нормальной ГБ происходит повышение обратного захвата нейромедиатора и усиление глутамат-глутаминового цикла, что приводит, в конечном итоге, к увеличению уровня глутамата в синаптических везикулах на пресинапсе и нарастанию со временем PPF (рисунок 24Б). Реактивная глия теряет способность захватывать глутамат из синаптической щели и имеет противоположный эффект – со временем происходит уменьшение PPF (рисунки 24В, 25Б). Данный феномен связан, наиболее вероятно, с нарушенным градиентом Na⁺ и неспособностью быстро удалить Na⁺ и Ca²⁺, поступающие в цитозоль ГБ через ChR2 во время острой фотостимуляции.

Аналогично, в КП мышей СЦА1 KI, у которых повсеместно экспрессируется атаксин 1, соотношение PPF было уменьшено по сравнению с диким типом (рисунок 26). При сравнении двух моделей селективного астроглиоза мозжечка и трансгенной модели СЦА1 мы выявили идентичное влияние реактивной ГБ на PPF, что указывает на схожие патогенетические процессы в синапсах.

Влияние S100 β на кратковременную синаптическую пластичность оценивали с помощью DSE. При DSE сильная деполяризация приводит к Ca²⁺-зависимому высвобождению эндоканнабиноидов из КП, которые ретроградно активируют CB1-рецепторы на окончаниях ПВ [75]. Активация CB1 ингибирует везикулярное высвобождение глутамата. S100 β не изменял соотношение PPF, что позволяет предположить, что как таковой механизм высвобождения везикул остался неповрежденным (рисунок 13). CB может оказывать и прямое влияние на глию [117], но в нашей работе этот компонент нами не выявлен.

В модели неселективного астроглиоза DSE наблюдалось снижение амплитуды ПВ ВПСТ до 67–69% от контроля (рисунок 27Б), различий между двумя группами, которым вводили S100 β и PBS не было. Таким образом, S100 β не влиял на фазу индукции DSE, но восстановление после первоначальной депрессии происходило намного быстрее у мышей, инъецированных S100 β . У животных, которым вводили PBS, амплитуда ВПСТ полностью восстанавливалась до контрольного уровня примерно через 100 с после деполяризации, но в группе, инъецированной S100 β , это занимало всего 60–70 с. Предсказанная скорость восстановления с помощью подгонки двойной кривой (показана сплошной и пунктирной линиями на рисунке 27Б) привела к значительно более короткому периоду полувосстановления в группе S100 β по сравнению с PBS.

Более быстрое восстановление после DSE может быть результатом действия S100 β , как хелатора Ca²⁺, так как свободный Ca²⁺ сильно влияет на процесс высвобождения эндоканнабиноидов. Ещё одним возможным объяснением быстрого восстановления ВПСТ является увеличение внеклеточной концентрации

глутамата. Астроциты экспрессируют рецепторы CB1, которые активируются эндоканнабиноидами, выделяемыми нейронами, что приводит к увеличению Ca^{2+} в них, что стимулирует высвобождение глутамата. Таким образом, при взаимодействии с пресинаптическими рецепторами CB1 эндоканнабиноиды вызывают синаптическую депрессию в стимулируемом нейроне, а при взаимодействии с рецепторами CB1 в астроцитах они косвенно приводят к синаптической потенциации [117, 144]. Было показано ранее, что активированные астроциты выделяют во внеклеточное пространство большое количество белка S100 β , который захватывается окружающими нейронами [183]. Являясь хелатором Ca^{2+} , S100 β может оказывать решающее действие на самоподдерживающееся выделение этого вторичного посредника из депо, значительно укорачивая этот процесс.

Мы использовали FC, чтобы вызвать метаболическое «голодание» астроцитов. Как было описано раньше, применение FC приводило к сильному угнетению возбуждающей передачи ПВ-КП, как у мышей, которым вводили PBS, так и у мышей, которым вводили S100 β (рисунок 14А, Б). Однако FC не влиял на экспрессию DSE. FC уменьшил скорость восстановления амплитуды после DSE у мышей, инъецированных PBS, но практически не влиял на DSE у мышей, которым вводили S100 β (рисунок 28Б). Более вероятно, что с помощью FC мы выключили энергетические процессы, которые поддерживают Na^+/K^+ -АТФазу и, тем самым, заблокировали функцию ГБ абсорбировать внеклеточный K^+ во время возбуждения нейрона [191]. Повышенная концентрация внеклеточного K^+ является мощным стимулятором потенциал зависимых натриевых каналов, что и обуславливает более глубокую деполяризацию нейрона и более выраженное DSE. Скомпромитированная S100 β реактивная ГБ, изначально имела нарушенное DSE. Это и нивелировало эффекты от добавления FC.

Аналогичные изменения в DSE были обнаружены и в модели с селективной экспрессией мутантного атаксина 1 в астроцитах и в трансгенной модели, что свидетельствует об общих механизмах.

В отличие от кратковременной пластичности, долговременная пластичность связана с транслокацией постсинаптических рецепторов [30, 100]. LTD играет ключевую роль в моторном обучении [99]. У мышей, экспрессирующих мутантный атаксин 1 в ГБ, LTD приводил к меньшему снижению амплитуды по сравнению с контрольной группой. Подобные изменения в LTD также наблюдались и в модели СЦА1 К1.

Наблюдаемые в моделях изменения долговременной синаптической пластичности могут быть причиной возникновения атаксий. При оценке координации движений с помощью теста на вращающейся дорожке было выявлено нарушение движений у мышей, экспрессирующих ATXN1[Q85], сопоставимое с нарушениями двигательной активности в модели СЦА1К1 (рисунки 33, 34).

Таким образом, в результате активации ГБ специфическими или неспецифическими раздражителями происходит нарушение градиента Na^+ в астроцитах, необходимого для работы EAAT. Из-за этого нарушается способность астроцитов к обратному захвату глутамата из синаптической щели, что обуславливает нарушение синаптической передачи и пластичности и способствует развитию эксайтотоксичности. Избыточная активация глутаматных рецепторов приводит к увеличению концентрации Ca^{2+} и запуску апоптоза. В результате нарушение пластичности и потеря нейронов приводят к нарушению двигательной функции (рисунок 36).

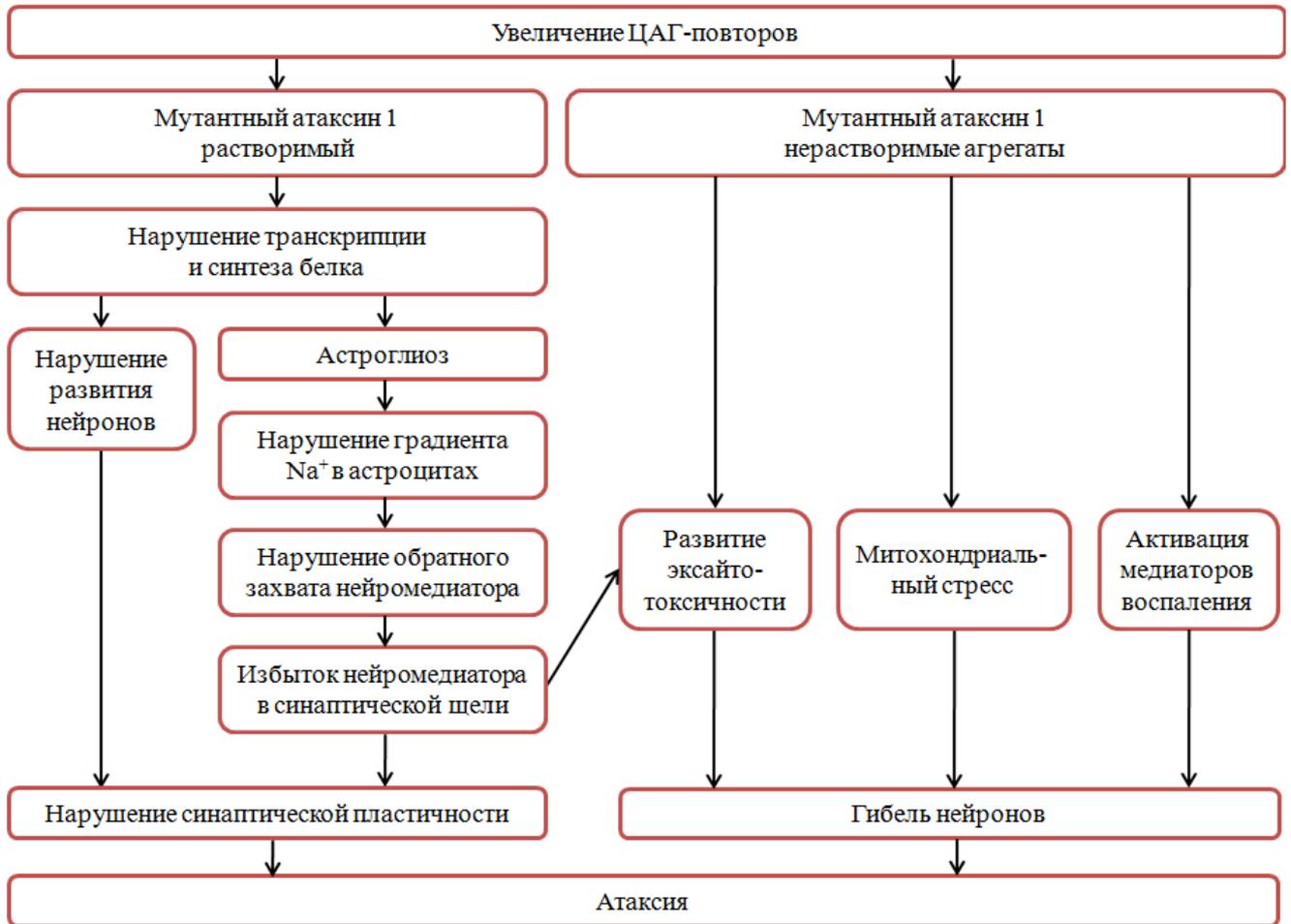


Рисунок 36 – Дополненная схема патогенеза СЦА1.

Заключение

Центральным направлением исследования в диссертационной работе было показать роль патологической глии в развитии СЦА1. Наш подход к изучению такой моногенной патологии, как СЦА1, является нестандартным, так как мы не исследовали отличия, а сконцентрировались на общих механизмах нейродегенерации, которые могут быть при различных хронических заболеваниях мозжечка. Центральным механизмом при этом является астроглиоз и развитие эксайтотоксичности.

Астроглиоз в СЦА1 тесно коррелирует с началом и тяжестью заболевания и развивается до начала клинических проявлений. В наших моделях, повышенный уровень внеклеточного S100 β , хроническая активация ГБ^{Chr2} или экспрессия в

астроцитах мутантного ATXN1[Q85] приводит к нарушению морфологии глии и нейронов и ведёт к изменению синаптической передачи. Эти результаты сопоставимы с данными, полученными от трансгенных моделей СЦА1. Эти модели позволяют изучить механизмы развития нейродегенерации на ранних стадиях заболевания.

Во всех случаях мы наблюдаем нарушение захвата глутамата из-за снижения экспрессии EAAT1, в результате чего нейромедиатор накапливается в синаптической щели и может вытекать из неё, что приводит к развитию эксайтотоксичности и дегенерации КП. Перегрузка Na^+ и снижение активности Na^+/K^+ -АТФазы в ГБ являются важными этапами нарушения обратного захвата глутамата, так как транспортёры возбуждающих аминокислот, используют градиент Na^+ для транспорта глутамата. Увеличение внутриклеточного Na^+ за счет повторного открытия ChR2 или избыточного S100 β приводит к перегрузке цитозоля Na^+ и замедлению обратного захвата. Уменьшение синапсов КП, нарушение её морфологии и Ca^{2+} сигнализации в клетке в наших моделях приводило к подавлению синаптической пластичности, таких как DSE и LTD. Этим можно объяснить нарушение координации и двигательной активности наших модельных животных, так как LTD является молекулярной основой запоминания и формирования новых двигательных навыков.

Связь астроцитоза и нарушение поведения СЦА1 модельных животных в этой работе было показано впервые. Эти данные позволяют проводить дальнейшие исследования молекулярных механизмов нейродегенерации на разработанных моделях.

Таблица 7 – Сравнение используемых моделей астроглиоза и СЦА1

Модель	+	–
S100 β	Легко воспроизводимая, модулируется нейродегенерация.	Неспецифическая модель. Инвазивная процедура.

Хроническая активация ГБ ^{ChR2}	Селективная строго дозированная активация астроцитов.	Неспецифическая модель, кратковременная экспрессия генетической конструкции (AVV). Инвазивная процедура.
Экспрессия ATXN1[Q85] в ГБ	Специфическая модель. Долговременная экспрессия генетической конструкции.	Строгое соблюдение получения и хранение генетических конструкций (LVV), модель не охватывает все типы клеток, вовлекающиеся в патогенез СЦА1. Инвазивная процедура.
СЦА1KI	Специфическая модель, максимально приближенная к течению заболевания.	Требуется бридинг животных, ПЦР тестирование каждого помёта, уменьшение жизни животных и времени выведения потомства.

Учитывая, что астроглиоз является объединяющим признаком различных нейродегенеративных заболеваний мозжечка, наши результаты подчеркивают необходимость разработки новых методов лечения, которые могли бы помочь справиться с эксайтотоксичностью, возможно, сосредоточив внимание на поглощении астроцитами глутамата.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны модели ранней стадии астроглиоза с использованием протоколов оптогенетики со специфическим раздражителем (экспрессией мутантного атаксина 1) и неспецифическим раздражителем (хроническая фотоактивация ГБ, экспрессирующей ChR2).

2. Избыточное количество белка S100 β , хроническая фотоактивация ГБ^{ChR2}, селективная экспрессия атаксина 1 в ГБ приводят к развитию астроглиоза. При астроглиозе число клеток ГБ и их отростков уменьшается, но происходит утолщение их отростков и появление новых в проксимальных отделах. Избыточная активация ГБ приводит к дегенерации КП: уменьшается количество КП, наблюдается атрофия дендритов КП, что приводит к уменьшению толщины МС. Инъекции S100 β уменьшали толщину МС до $120,0 \pm 5,8$ μm по сравнению с $150,7 \pm 6,3$ μm у мышей, которым вводили PBS ($p=0,002$), Также уменьшение МС наблюдалось у животных после четырёхдневной фотостимуляции ГБ^{ChR2} по сравнению с нестимулированной группой ($p=0,005$).

Об изменении размеров КП также свидетельствует уменьшение ёмкости мембраны КП. Ёмкости дендритов КП у мышей, которым вводили S100 β , составляли $359,4 \pm 37,5$ пФ и $513,5 \pm 27,1$ пФ в группе мышей, инъецированных PBS. Ёмкость сомы КП у мышей, которым вводили S100 β , составляла $34,6 \pm 4,4$ пФ и $61,7 \pm 5,6$ пФ в группе, получавшей PBS ($p < 0,001$). После хронической фотоактивации ГБ^{ChR2} ёмкость мембраны КП снизилась с $728,8 \pm 27,6$ пФ до $526,2 \pm 27,8$ пФ, $p < 0,001$.

3. Избыточная активация ГБ, независимо от специфичности раздражителя, влияет на синаптическую передачу в виде удлинения τ ПВ ВПСТ вследствие нарушения обратного захвата нейромедиатора астроцитами из синаптической щели через снижение количества EAAT1. τ ПВ ВПСТ у мышей после хронической стимуляции ГБ^{ChR2} значительно длиннее ($19,3 \pm 1,3$ мс и $15,5 \pm 0,9$ мс без фотостимуляции, $p=0,03$). Увеличение τ ВПСТ наблюдалось и у мышей,

экспрессирующих ATXN1[Q85], до $23,3 \pm 2,7$ мс по сравнению с $16,7 \pm 1,0$ мс у мышей, экспрессирующих ATXN1[Q2], $p=0,04$. Такие же результаты были и у СЦА1 К1 мышей, экспрессирующих ATXN1[Q154] ($19,1 \pm 1,3$ мс по сравнению с $14,7 \pm 0,8$ мс у мышей дикого типа, $p=0,04$).

Нарушение функции астроцитов, уменьшение синапсов КП, нарушение морфологии и Ca^{2+} сигнализации в КП приводит к подавлению синаптической пластичности PPF, DSE и LTD в синапсах нейронов коры мозжечка, что приводит к нарушению двигательной активности. У животных после четырёхдневной хронической фотостимуляции острая активация ГБ^{ChR2} вызвала значительное понижение PPF к 5-й минуте ($97,5 \pm 1,1\%$, $p=0,04$). Аналогично острая фотостимуляция срезов, экспрессирующих ATXN1[Q85]/ChR2, вызывала уменьшение PPF с максимальным эффектом на 3-й минуте ($95,3 \pm 2,0\%$, $p=0,029$).

У мышей, экспрессирующих ATXN1[Q85] протокол DSE снижал амплитуду до $66,7 \pm 7,3\%$, что было меньше по сравнению с результатами от мышей, экспрессирующих ATXN1[Q2] ($42,3 \pm 5,9\%$), $p=0,044$. У трансгенных СЦА1 К1 мышей протокол DSE также снижал амплитуду значительно меньше (до $84,6 \pm 4,2\%$) по сравнению с диким типом ($43,3 \pm 5,8\%$, $p<0,05$).

Также экспрессия мутантного атаксина влияла и на LTD: у мышей, экспрессирующих ATXN1[Q85], через 30 минут амплитуда снижалась только до $80,1 \pm 4,8\%$, тогда как у мышей, экспрессирующих ATXN1[Q2] снижалась до $56,2 \pm 5,4\%$, $p<0,05$. Аналогичные результаты наблюдались и у трансгенных СЦА1 К1 мышей: амплитуда снижалась до $88,8 \pm 15,3\%$ от контрольной, у дикого типа снижалась – $63,7 \pm 10,6\%$, $p<0,05$.

Мыши, экспрессирующие ATXN1 [Q85], демонстрировали нарушение двигательной активности: время до падения с вращающейся дорожки по сравнению с контрольной группой у них было ниже ($129,9 \pm 12,4$ с и $176,6 \pm 9,1$ с соответственно, $p<0,05$). Аналогичные результаты наблюдались и в модели СЦА1 К1, однако были более выраженными.

4. В патогенезе СЦА1 существенную роль играют астроциты, что позволяет использовать гиперактивацию ГБ в качестве методического приёма для создания новых моделей заболевания на экспериментальных животных.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

AMPA-рецептор	–	рецептор α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты
Ca^{2+}	–	ионы кальция
ChR2	–	каналородопсин-2
GFAP	–	глиальный фибриллярный кислый белок
EAAT	–	транспортёр возбуждающих аминокислот
K^+	–	ионы калия
KA-рецептор	–	каинатный рецептор
LTD	–	долговременная депрессия
mKate	–	дальне-красный флуоресцентный белок
NMDA-рецептор	–	рецептор N-метил-D-аспартата
Na^+	–	ионы натрия
PPF	–	усиление парных импульсов
RT-PCR	–	полимеразная цепная реакция в реальном времени
TBOA	–	трео-бета-бензилоксиаспартат
WT	–	животные дикого типа
АДСЦА	–	аутосомно-доминантные спиноцеребеллярные атаксии
ВПСТ	–	возбуждающие постсинаптические токи
ГАМК	–	γ -аминомасляная кислота
ГБ	–	глия Бергмана
ГС	–	гранулярный слой
КП	–	клетки Пуркинье
МС	–	молекулярный слой
ПВ	–	параллельное волокно
СКП	–	слой клеток Пуркинье
СЦА1	–	спиноцеребеллярная атаксия первого типа
ЦНС	–	центральная нервная система

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белозор, О.С. Антагонисты NMDA-рецепторов как потенциальные средства для лечения нейродегенеративных заболеваний мозжечка / О.С. Белозор, А.Н. Шуваев, Я.В. Фрицлер, А.Н. Шуваев // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии = Annals of Clinical and Experimental Neurology*. - 2021. - №16 (2). - С.58-69.
2. Бочков, Н. П. Наследственные болезни: национальное руководство / Под ред. Н. П. Бочкова, Е. К. Гинтера, В. П. Пузырева – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. - 936 с.
3. Иллариошкин, С. Н. Превентивная нейропротекция при нейродегенеративных заболеваниях: использование антагонистов глутаматных рецепторов (обзор литературы и собственный опыт) / С.Н. Иллариошкин, С.А. Ключников, П.В. Брылев, П.А. Федин, Е.Д. Маркова, И.А. Иванова-Смоленская // *Неврологический журнал*. - 2006. - № 11. - С. 47-54.
4. Ключников, С.А. Алгоритм диагностики наследственных атаксий / С.А. Ключников, С.Н. Иллариошкин // *Нервные болезни*. - 2012. - № 1. - С. 7-12.
5. Ключников, С.А. Генетическая структура аутосомно-доминантных и аутосомно-рецессивных атаксий в российской популяции / С.А. Ключников, Н.Ю. Абрамычева, А.С. Ветчинова, Е.П. Нужный, М.В. Ершова, С.Н. Иллариошкин // *сборник Болезнь Паркинсона и расстройства движений. Руководство для врачей. По материалам IV Национального конгресса по болезни Паркинсона и расстройствам движений, Москва*. - С. 258-262.
6. Конева Л.А. Характеристика заболеваемости спиноцереbellлярной атаксией I типа в Усть-Алданском и Абыйском улусах Республики Саха (Якутия) / Л.А. Конева, А.Н. Кучер, В.П. Пузырёв, Н.Р. Максимова, А.Н. Ноговицина, А.Л. Сухомясова, А.Л. Данилова, Ф.А. Платонов, М.Н. Коротов // *Матер. Между-нар. науч.-практич. конф. «Генетические аспекты патологии человека. Проблемы*

сохранения генофонда коренных народов Севера», Якутск: НИПК «Сахаполиграфиздат». - 2005. - С. 99-100.

7. Кучер, А.Н. Генетико-демографическое изучение народонаселения Республики Саха (Якутия) / А.Н. Кучер, А.Л. Данилова, Л.А. Конева, Н.Р. Максимова, А.Н. Ноговицина // Якутский медицинский журнал. - 2009. - № 2(26). - С. 34-37.

8. Максимова, Н.Р. Этноспецифическая наследственная патология в республике Саха (Якутия) / Н.Р. Максимова, А.Л. Сухомясова, А.Н. Ноговицына, В.П. Пузырев // Якутский медицинский журнал. Материалы II научно-практической конференции с международным участием “Актуальные проблемы медицинской генетики на Крайнем Севере” (г. Якутск, 4-5 июня 2009 г.). - 2009. - № 2(26). - С. 15-20.

9. Платонов, Ф.А. Спиноцеребеллярная атаксия первого типа в Якутии: распространенность и клинико-генетические сопоставления / Ф.А. Платонов, С.Н. Иллариошкин, С.К. Кононова, М.П. Гоголев, И.А. Иванова-Смоленская // Мед. Генетика. - 2004. - №5. - С. 242-248.

10. Шуваев, А.Н. Влияние реактивной глии Бергмана на кратковременную синаптическую пластичность в моделях мозжечковой нейродегенерации, вызванной хронической активацией ChR2 и экспрессией мутантного атаксина-1 / А.Н. Шуваев, О.С. Белозор, О.И. Можей, Д.А. Яковлева, А.Н. Шуваев, М.В. Смольникова, Е.А. Пожиленкова, С. Каспаров, В.В. Салмин, А.Б. Салмина // Анналы клинической и экспериментальной неврологии = Annals of Clinical and Experimental Neurology. - 2021. - № 15 (1). - С.51-58.

11. Akassoglou, K. Astrocyte-specific but not neuron-specific transmembrane TNF triggers inflammation and degeneration in the central nervous system of transgenic mice / K. Akassoglou, L. Probert, G. Kontogeorgos, G. Kollias // J. Immunol. - 1997. - № 158. - P. 438-445.

12. Almad, A. A stocked toolbox for understanding the role of astrocytes in disease / A. Almad, N. J. Maragakis // Nature Reviews Neurology. - 2018. - № 14. - P. 351-362.

13. Araque, A. Astrocytes process synaptic information / A. Araque // *Neuron Glia Biol.* - 2008. - № 4(1). - P. 3-10.
14. Armbruster, M. Glutamate clearance is locally modulated by presynaptic neuronal activity in the cerebral cortex / M. Armbruster, E.Hanson, C.G. Dulla // *J. Neurosci.* - 2016. - № 36(40). - P. 10404-10415.
15. Arundine, M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity / M. Arundine, M. Tymianski // *Cell Calcium.* - 2003. - № 34(4-5). - P. 325-37.
16. Belozor, O.S. Extracellular S100b Disrupts Bergman Glia Morphology and Synaptic Transmission in Cerebellar Purkinje Cells / O.S. Belozor, D.A. Yakovleva, I.V. Potapenko, A.N. Shuvaev, M.V. Smolnikova, A. Vasilev, E.A. Pozhilenkova, A.N. Shuvaev // *Brain Sciences.* - 2019. - Vol.9, №4. - P.80-98.
17. Bennett, C.F. Antisense Oligonucleotide Therapies for Neurodegenerative Diseases / C.F. Bennett, A.R. Krainer, D.W. Cleveland // *Annual review of neuroscience.* - 2019. - № 42. - P. 385-406.
18. Bird, T.D. Hereditary Ataxia Overview [Электронный ресурс] / T.D. Bird, M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, editors. GeneReviews® [Internet]. - Seattle (WA): University of Washington, Seattle. - 2019. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1138/>
19. Björkqvist, M. A novel pathogenic pathway of immune activation detectable before clinical onset in Huntington's disease / M. Björkqvist, E.J. Wild, J. Thiele, A. Silvestroni, R. Andre, N. Lahiri, E. Raibon, R.V. Lee, C.L. Benn, D. Soulet, A. Magnusson, B. Woodman, C. Landles, M.A. Pouladi, M.R. Hayden, A. Khalili-Shirazi, M.W. Lowdell, P. Brundin, G.P. Bates, B.R. Leavitt, T. Möller, S.J. Tabrizi // *The Journal of experimental medicine.* - 2008. - № 205(8). - P. 1869-1877.
20. Bliss, T.V. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus / T.V. Bliss, G.L. Collingridge // *Nature.* - 1993. - № 361. - P. 31-39.
21. Block, M.L. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms / M.L. Block, L. Zecca, J.S. Hong // *Nat. Rev. Neurosci.* - 2007. - № 8(1). - P. 57-69.

22. Bowman, A.B. Duplication of Atxn11 suppresses SCA1 neuropathology by decreasing incorporation of polyglutamine-expanded ataxin-1 into native complexes / A.B. Bowman, Y.C. Lam, P. Jafar-Nejad, H.-K. Chen, R. Richman, R.C. Samaco, J.D. Fryer, J.J. Kahle, H.T. Orr, H.Y. Zoghbi // *Nat. Genet.* - 2007. - № 39(3). - P. 373-379.
23. Boyden, E.S. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity / E.S. Boyden, F. Zhang, E. Bamberg, G. Nagel, K. Deisseroth // *Nat. Neurosci.* - 2005. - № 8(9). - P. 1263-1268.
24. Brignolio, F. Prevalence of hereditary ataxias and paraplegias in the province of Torino, Italy / F. Brignolio, M. Leone, A. Tribolo, // *Ital. J. Neurol. Sci.* - 1986. - № 7(4). - P. 431-435.
25. Bürk, K. Cognitive deficits in spinocerebellar ataxia type 1, 2, and 3 / K. Bürk, C. Globas, S. Bosch, T. Klockgether, C. Zühlke, I. Daum, J. Dichgans // *J.Neurol.* - 2003. - № 250. - P. 207-11.
26. Bürk, K. Executive dysfunction in spinocerebellar ataxia type 1 / K. Bürk, S. Bosch, C. Globas, C. Zühlke, I. Daum, T. Klockgether, J. Dichgans // *Eur.Neurol.* - 2001. - № 46. - P. 43-48.
27. Burchette, E.N. SCA1 transgenic mice: a model for neurodegeneration caused by an expanded CAG trinucleotide repeat / E.N. Burchette, H.B. Clark, A. Servadio, T. Matilla, R.M. Feddersen, W.S. Yunis, L.A. Duvick, H.Y. Zoghbi, H.T. Orr // *Cell.* - 1995. - № 82(6). - P. 937-48.
28. Campbell, I.L. Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6 / I.L. Campbell, C.R. Abraham, E. Masliah, P. Kemper, J.D. Inglis, M.B. Oldstone, L. Mucke // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1993. - № 90(21). - P. 10061-10065.
29. Cervetto, C. Calcium-permeable AMPA receptors trigger vesicular glutamate release from Bergmann gliosomes / C. Cervetto, D. Frattaroli, A. Venturini, M. Passalacqua, M. Nobile, S. Alloisio, C. Tacchetti, G. Maura, L.F. Agnati, M. Marcoli // *Neuropharmacology.* - 2015. - № 99. - P. 396-407.

30. Chater, T.E. The role of AMPA receptors in postsynaptic mechanisms of synaptic plasticity / T.E. Chater, Y. Goda // *Front. Cell. Neurosci.* - 2014. - № 8. - P. 401.
31. Chiareli, R. A. The Role of Astrocytes in the Neurorepair Process / R. A. Chiareli, G. A. Carvalho, B. L. Marques, L. S. Mota, O. C. Oliveira-Lima, R. M. Gomes, A. Birbrair, R. S. Gomez, F. Simão, F. Klempin, M. Leist, M. Pinto // *Frontiers in cell and developmental biology.* - 2021. - № 9. - P. 665795.
32. Choi, D.W. Excitotoxic cell death / D.W. Choi // *J. Neurobiol.* - 1992. - № 23. - P. 1261-1276.
33. Clark, H. B. Purkinje cell expression of a mutant allele of SCA1 in transgenic mice leads to disparate effects on motor behaviors, followed by a progressive cerebellar dysfunction and histological alterations / H.B. Clark, E.N. Burrig, W.S. Yunis, S. Larson, C. Wilcox, B. Hartman, A. Matilla, H.Y. Zoghbi, H.T. Orr // *J. Neurosci.* - 1997. - № 17(19). - P. 7385-7395.
34. Crespo-Barreto J. Partial Loss of Ataxin-1 Function Contributes to Transcriptional Dysregulation in Spinocerebellar Ataxia Type 1 Pathogenesis / J. Crespo-Barreto, J.D. Fryer, C.A. Shaw, H.T. Orr, H.Y. Zoghbi // *PLoS Genet.* - 2010. - № 6(7). - P. e1001021.
35. Cummings, C.J. Mutation of the E6-AP ubiquitin ligase reduces nuclear inclusion frequency while accelerating polyglutamine-induced pathology in SCA1 mice / C.J. Cummings, E. Reinstein, Y. Sun, B. Antalffy, Y. Jiang, A. Ciechanover, H.T. Orr, A.L. Beaudet, H.Y. Zoghbi // *Neuron.* - 1999. - № 24. - P. 879-892.
36. Cummings, C.J. Over-expression of inducible HSP70 chaperone suppresses neuropathology and improves motor function in SCA1 mice / C.J. Cummings, Y. Sun, P. Opal, B. Antalffy, R. Mestril, H.T. Orr, W.H. Dillman, H.Y. Zoghbi // *Hum. Mol. Genet.* - 2001. - № 10. - P. 1511-1518.
37. Cummings, C.J. Chaperone suppression of aggregation and altered subcellular proteasome localization imply protein misfolding in SCA1 / C.J. Cummings,

M.A. Mancini, B. Antalffy, D.B. DeFranco, H.T. Orr, H.Y. Zoghbi // *Nat. Genet.* - 1998. - № 19(2). - P. 148-154.

38. Custer, S.K. Bergmann glia expression of polyglutamine-expanded ataxin-7 produces neurodegeneration by impairing glutamate transport / S.K. Custer, G.A. Garden, N. Gill, U. Rueb, R.T. Libby, C. Schultz, S.J. Guyenet, T. Deller, L.E. Westrum, B.L. Sopher, A.R. La Spada // *Nat. Neurosci.* - 2006. - № 9(10). - P. 1302-1311.

39. Cvetanovic, M. Decreased Expression of Glutamate Transporter GLAST in Bergmann Glia Is Associated with the Loss of Purkinje Neurons in the Spinocerebellar Ataxia Type 1 / M. Cvetanovic // *Cerebellum.* - 2015. - № 14. - P. 8-11.

40. Cvetanovic, M. Early activation of microglia and astrocytes in mouse models of spinocerebellar ataxia type 1 / M. Cvetanovic, M. Ingram, H.T. Orr, P. Opal // *Neuroscience.* - 2015. - № 289. - P. 289-299.

41. Dell'Orco, J.M. Neuronal Atrophy Early in Degenerative Ataxia Is a Compensatory Mechanism to Regulate Membrane Excitability / J.M. Dell'Orco, A.H. Wasserman, R. Chopra, M.A. Ingram, Y.S. Hu, V. Singh, H. Wulff, P. Opal, H.T. Orr, V.G. Shakkottai // *J. Neurosci.* - 2015. - № 35(32). - P.11292-307.

42. Ding, Z. B., Astrocytes: a double-edged sword in neurodegenerative diseases / Z.B. Ding, L.J. Song, Q. Wang, G. Kumar, Y.Q. Yan, C.G. Ma // *Neural regeneration research.* - 2021. - № 16(9). - P. 1702-1710.

43. Döhlinger, S. Magnetic resonance imaging in spinocerebellar ataxias / S. Döhlinger, T.K. Hauser, J. Borkert, A.R. Luft, J.B. Schulz // *Cerebellum.* - 2008. - № 7. - P. 204-14.

44. Donato, R. S100: A multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles / R. Donato // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* - 2001. - № 33. - P. 637-668.

45. Donato, S.D. Spinocerebellar ataxia type 1 / S.D. Donato, C. Mariotti, F. Taroni // *Handb. Clin. Neurol.* - 2012. - № 103. - P. 399-421.

46. Dragasević, NT. Frequency analysis and clinical characterization of different types of spinocerebellar ataxia in Serbian patients / N.T. Dragasević, B.

Culjkovic, C. Klein, A. Ristic, M. Keckarevic, I. Topisirovic, S. Vukosavic, M. Svetel, N. Kock, E. Stefanova, S. Romac, V.S. Kostic // *MovDisord.* - 2006. - № 21. - P. 187–91.

47. Dürr, A. Autosomal dominant cerebellar ataxias: polyglutamine expansions and beyond / A Dürr // *Lancet Neurol.* - 2010. - № 9. - P. 885–94.

48. Duvick, L. SCA1-like disease in mice expressing wild-type ataxin-1 with a serine to aspartic acid replacement at residue 776 / L. Duvick, J. Barnes, B. Ebner, S. Agrawal, M. Andresen, J. Lim, G.J. Giesler, H.Y. Zoghbi, H.T Orr // *Neuron.* - 2010. - № 67(6). - P. 929-35.

49. Emamian, E.S. Serine 776 of ataxin-1 is critical for polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic mice / E.S. Emamian, M.D. Kaytor, L.A. Duvick, T. Zu, S.K. Tousey, H.Y. Zoghbi, H.B. Clark, H.T. Orr // *Neuron.* - 2003. - № 38(3). - P. 375-87.

50. Farhy-Tselnicker, I., Allen, N.J. Astrocytes, neurons, synapses: a tripartite view on cortical circuit development / Farhy-Tselnicker, I., Allen, N.J. // *Neural Dev.* - 2018. - №13. – P. 7.

51. Fellin, T. Communication between neurons and astrocytes: relevance to the modulation of synaptic and network activity / T. Fellin // *J. Neurochem.* - 2009. - № 108(3). - P. 533-544.

52. Figueiredo, M. Comparative analysis of optogenetic actuators in cultured astrocytes / M. Figueiredo, S. Lane, R.F. Stout Jr., B. Liu, V. Parpura, A.G. Teschemacher, S. Kasparov // *Cell Calcium.* - 2014. - № 56(3). - P. 208-214.

53. Fryer, J.D. Exercise and genetic rescue of SCA1 via the transcriptional repressor Capicua / J.D. Fryer, P. Yu, H. Kang, C. Mandel-Brehm, A.N. Carter, J. Crespo-Barreto, Y. Gao, A. Flora, C. Shaw, H.T. Orr, H.Y. Zoghbi // *Science.* - 2011. - № 334 (6056). - P. 690-3.

54. Furrer, S.A. Spinocerebellar ataxia type 7 cerebellar disease requires the coordinated action of mutant ataxin-7 in neurons and glia, and displays non-cell-autonomous bergmann glia degeneration / S.A. Furrer, M.S. Mohanachandran, S.M.

Waldherr, C. Chang, V.A. Damian, B.L. Sopher, G.A. Garden, A.R. La Spada // *J. Neurosci.* - 2011. - № 31(45). - P. 16269-16278.

55. Garden, G.A. Polyglutamine-expanded ataxin-7 promotes non-cell-autonomous purkinje cell degeneration and displays proteolytic cleavage in ataxic transgenic mice / G.A. Garden, R.T. Libby, Y.H. Fu, Y. Kinoshita, J. Huang, D.E. Possin, A.C. Smith, R.A. Martinez, G.C. Fine, S.K. Grote, C.B. Ware, D.D. Einum, R.S. Morrison, L.J. Ptacek, B.L. Sopher, A.R. La Spada // *J. Neurosci.* - 2002. - № 22(12). - P. 4897-905.

56. Gerasimov, E. Optogenetic Activation of Astrocytes – Effects on Neuronal Network Function / E. Gerasimov, A. Erofeev, A. Borodinova, A. Bolshakova, P. Balaban, I. Bezprozvanny, O.L. Vlasova // *Int. J. Mol. Sci.* - 2021. - № 22. - P. 9613.

57. Gerasimov, E.I. The effect of optogenetic activation of astrocytes on the hippocampal neurons activity / E.I. Gerasimov , A.I. Erofeev, S.A. Pushkareva, A.V. Bol'shakova, A.A. Borodinova, P.M. Balaban, I.B. Bezprozvanny, O.L. Vlasova // *J. Phys.: Conf. Ser.* - 2021. - № 2086. - P. 012110.

58. Gerlach, R. Active secretion of S100B from astrocytes during metabolic stress / R. Gerlach , G. Demel, H.-G. König, U. Gross, J.H.M. Prehn, A. Raabe, V. Seifert, D. Kögel // *Neuroscience.* - 2006. - № 141(4). - P. 1697-701.

59. Ginestroni, A. Brain structural damage in spinocerebellar ataxia type 1: a VBM study / A. Ginestroni, R. Della Nave, C. Tessa, M. Giannelli, D. De Grandis, R. Plasmati, F. Salvi, S. Piacentini, M. Mascalchi // *J. Neurol.* - 2008. - № 255. - P. 1153-8.

60. Glass, C.K. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration / C.K. Glass, K.Saijo, B.Winner, M.C. Marchetto, F.H. Gage // *Cell.* - 2010. - № 140. - P. 918-934.

61. Goizet, C. French Group for Presymptomatic Testing in Neurogenetic Disorders. Presymptomatic testing in Huntington's disease and autosomal dominant cerebellar ataxias / C. Goizet, G. Lesca, A. Dürr // *Neurology.* - 2002. - № 59. - P. 1330-1336.

62. Goldfarb, L.G. Unstable Triplet and Phenotypic Variability of Spinocerebellar Ataxia Type 1 / L.G. Goldfarb, O. Vasconcelos, F.A. Platonov, A. Lunke, V. Kipnis, S. Kononova, T. Chabrashvili, V.A. Vladimirtsev, V.P. Alexeev, D.C. Gajdusek // *Annals of Neurology*. - 1996. № 39. - P. 500-506.
63. Gourine, A.V. Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP / A.V. Gourine, V. Kasymov, N. Marina, F. Tang, M.F. Figueiredo, S. Lane, A.G. Teschemacher, K.M. Spyer, K. Deisseroth, S. Kasparov // *Science*. - 2010. - № 329(5991). - P. 571-575.
64. Guillot-Sestier, M.-V. Innate immunity in Alzheimer's disease: a complex affair / M.-V. Guillot-Sestier, T. Town // *CNS Neurol. Disord Drug Targets*. - 2013. - № 12(5). - P. 593-607.
65. Hewinson, J. Viral gene delivery: optimized protocol for production of high titer lentiviral vectors / J. Hewinson, J.F. Paton, S. Kasparov // *Methods Mol. Biol.* - 2013. - № 998. - P. 65-75.
66. Hoxha, E. Motor Deficits and Cerebellar Atrophy in Elov15 Knock Out Mice / E. Hoxha, R.M.C. Gabriele, I. Balbo, F. Ravera, L. Masante, V. Zambelli, C. Albergo, N. Mitro, D. Caruso, E. Di Gregorio, A. Brusco, B. Borroni, F. Tempia // *Front. Cell. Neurosci.* - 2017. - № 11. - P. 343.
67. Huang, M. Why do so many genetic insults lead to Purkinje cell degeneration and spinocerebellar ataxia? / M. Huang, D.S. Verbeek // *Neurosci. Lett.* - 2018. - 688. - P. 49-57.
68. Ilg, W. Long-term effects of coordinative training in degenerative cerebellar disease / W. Ilg, M. Synofzik, D. Brötz, S. Burkard, M.A. Giese, L. Schöls // *Neurology*. - 2009. - № 7. - P. 1823-30.
69. Ilg, W. Long-term effects of coordinative training in degenerative cerebellar disease / W. Ilg, D. Brötz, S. Burkard, M.A. Giese, L. Schöls, M. Synofzik // *Mov. Disord.* 2010. - № 25. - P. 2239-46.
70. Illarionova, N.B. Role of Na, K-ATPase $\alpha 1$ and $\alpha 2$ isoforms in the support of astrocyte glutamate uptake / N.B. Illarionova, H. Brismar, A. Aperia, E. Gunnarsson // *PLoS ONE*. - 2014. - № 9. - P. e98469.

71. Illarioshkin, S.N. Spinocerebellar ataxia type 1 in Russia / S.N. Illarioshkin, P.A. Slominsky, I.V. Ovchinnikov, E.D. Markova, N.I. Miklina, S.A. Klyushnikov, M. Shadrina, N.V. Vereshchagin, S.A. Limborskaya, I.A. Ivanova-Smolenskaya // *J. Neurol.* - 1996. - № 243(7). - P. 506-10.
72. Jacobi H. Biological and clinical characteristics of individuals at risk for spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6 in the longitudinal RISCA study: analysis of baseline data / H. Jacobi, K. Reetz, S.T. du Montcel, P. Bauer, C. Mariotti, L. Nanetti, M. Rakowicz, A. Sulek, A. Durr, P. Charles, A. Filla, A. Antenora, L. Schöls, J. Schicks, J. Infante, J.-S. Kang, D. Timmann, R. Di Fabio, M. Masciullo, L. Baliko, B. Melegh, S. Boesch, K. Bürk, A. Peltz, J. B. Schulz, I. Dufaure-Garé, T. Klockgether // *Lancet Neurol.* - 2013. - № 12. - P. 650-658.
73. Jayadev, S. Hereditary ataxias: overview / S. Jayadev, T.D. Bird // *Genet. Med.* - 2013. - № 15. - P. 673-83.
74. Kaminsky, N. Connecting Malfunctioning Glial Cells and Brain Degenerative Disorders / N. Kaminsky, O. Bihari, S. Kanner, A. Barzilai // *Genom. Proteom. Bioinform.* - 2016. - № 14. - P. 155-165.
75. Kano, M. Endocannabinoid-Mediated Control of Synaptic Transmission / M. Kano, T. Ohno-Shosaku, Y. Hashimoto-dani, M. Uchigashima, M. Watanabe // *Physiol. Rev.* - 2009. - № 89. - P. 309-380.
76. Keiser, M.S. Gene suppression strategies for dominantly inherited neurodegenerative diseases: lessons from Huntington's disease and spinocerebellar ataxia / M.S. Keiser, H.B. Kordasiewicz, J.L. McBride // *Hum. Mol. Genet.* - 2016. - № 25(R1). - P. R53-64.
77. Kettenmann, H. Neuroglia. / H. Kettenmann, B.R. Ransom. - Oxford University Press, 2013. - 864 p.
78. Kim, J. H. Astroglia contribute to the pathogenesis of spinocerebellar ataxia Type 1 (SCA1) in a biphasic, stage-of-disease specific manner / J. H. Kim, A. Lukowicz, W. Qu, A. Johnson, M. Cvetanovic // *Glia.* - 2018. - № 66(9). - P. 1972-1987.

79. Kinoshita, P. F. The Influence of Na(+), K(+)-ATPase on Glutamate Signaling in Neurodegenerative Diseases and Senescence / P. F. Kinoshita, J. A. Leite, A. M. Orellana, A. R. Vasconcelos, L. E. Quintas, E. M. Kawamoto, C. Scavone // *Frontiers in physiology*. - 2016. - № 7. - P. 195.
80. Klement, I.A. Ataxin-1 Nuclear Localization and Aggregation / I.A. Klement, P.J. Skinner, M.D. Kaytor, H. Yi, S.M. Hersch, H.B. Clark, H.Y. Zoghbi, H.T. Orr, // *Cell*. - 1998. - № 95 (1). - P. 41-53.
81. Krysa, W. High relative frequency of SCA1 in Poland reflecting a potential founder effect / W. Krysa, A. Sulek, M. Rakowicz, W. Szirkowiec, J.Zaremba // *Neurol. Sci.* - 2016. - № 37. - P. 1319-25.
82. Kulkarni, P.M. Quantitative 3-D analysis of GFAP labeled astrocytes from fluorescence confocal images / P.M. Kulkarni, E. Barton, M. Savelonas, R. Padmanabhan, Y. Lu, K. Trett, W. Shain, J.L. Leasure, B. Roysam // *J. Neurosci. Methods*. - 2015. - № 246. - P. 38-51.
83. Kyung, T. Optogenetic control of endogenous Ca(2+) channels in vivo / T. Kyung, S. Lee, J. E. Kim, T. Cho, H. Park, Y. M. Jeong, W. D. Heo // *Nature Biotechnology*. - 2015. - № 33(10). - P. 1092-1096.
84. La Spada A.R. Trinucleotide repeat instability: genetic features and molecular mechanisms / A.R. La Spada // *Brain Pathol.* - 1997. - № 7. - P. 943-963.
85. Lam, Y. C. ATAXIN-1 interacts with the repressor Capicua in its native complex to cause SCA1 neuropathology / Y.C. Lam, A.B. Bowman, P. Jafar-Nejad, J. Lim, R. Richman, J.D. Fryer, E.D. Hyun, L.A. Duvick, H.T. Orr, J. Botas, H. Y. Zoghbi // *Cell*. - 2006. - № 127. - P. 1335-1347.
86. Lewerenz, J. Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases - What is the Evidence? / J. Lewerenz, P. Maher // *Frontiers in neuroscience*. - 2015. - № 9. - P. 469.
87. Li, D. New tools for investigating astrocyte-to-neuron communication / D. Li, C. Agulhon, E. Schmidt, M. Oheim, N. Ropert // *Frontiers in cellular neuroscience*. - 2013. - № 7. - P. 193.

88. Li, K. Reactive Astrocytes in Neurodegenerative Diseases / K. Li, J. Li, J. Zheng, S. Qin // *Aging and disease*. - 2019. - № 10(3). - P. 664-675.
89. Liddelow, S. A. Reactive astrocytes: Production, function, and therapeutic potential / S. A. Liddelow, B. A. Barres // *Immunity*. - 2017. - № 46(6). - P. 957-967.
90. Liddelow, S. SnapShot: Astrocytes in Health and Disease / S. Liddelow, B. Barres // *Cell*. - 2015. - № 162. - P. 1170-1170.
91. Lim, J. Opposing effects of polyglutamine expansion on native protein complexes contribute to SCA1 / J. Lim, J.Crespo-Barreto, P. Jafar-Nejad, A.B. Bowman, R. Richman, D.E. Hill, H.T. Orr, H.Y. Zoghbi // *Nature*. - 2008. - № 452 (7188). - P. 713-718.
92. Linnerbauer, M. Protective Functions of Reactive Astrocytes Following Central Nervous System Insult / M. Linnerbauer, V. Rothhammer // *Frontiers in immunology*. - 2020. - № 11. - P. 573256.
93. Liu, B. Viral vectors based on bidirectional cell-specific mammalian promoters and transcriptional amplification strategy for use in vitro and in vivo / Liu, B., Paton, J.F., Kasparov, S. // *BMC Biotechnol*. - 2008. - № 8. - P. 49.
94. Liu, B. Astroglia as a cellular target for neuroprotection and treatment of neuro-psychiatric disorders / B. Liu, A.G. Teschemacher, S. Kasparov // *Glia*. - 2017. - № 65(8). - P. 1205-1226.
95. Llinás, R.R. The Electrophysiology of the Cerebellar Purkinje Cell Revisited / R.R. Llinás, M. Sugimori // *Cereb. Rev*. - 1992. - № 1. - P. 167-181.
96. Lorenzetti, D. Repeat instability and motor incoordination in mice with a targeted expanded CAG repeat in the *Scal* locus / D. Lorenzetti, K. Watase, B. Xu, M.M. Matzuk, H.T. Orr, H.Y. Zoghbi // *Hum. Mol. Genet*. - 2000. - № 9(5). - P. 779-785.
97. Magaki, S. D. Glial function (and dysfunction) in the normal & ischemic brain / S. D. Magaki, C. K. Williams, H. V. Vinters // *Neuropharmacology*. - 2018. - № 134. - P. 218-225.

98. Major, G. Solutions for transients in arbitrarily branching cables: II. Voltage clamp theory / G. Major, J.D. Evans, J.J.B. Jack // *Biophys. J.* - 1993. - № 65. - P. 450-468.
99. Malenka, R.C. LTP and LTD: An Embarrassment of Riches / R.C. Malenka, M.F. Bear // *Neuron.* - 2004. - № 44(1). - P. 5-21.
100. Malinow R. AMPA receptor trafficking and long-term potentiation / R. Malinow // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* - 2003. - № 358(1432). - P. 707-714.
101. Manto, M.U. The wide spectrum of spinocerebellar ataxias (SCAs) / M.U. Manto // *Cerebellum.* - 2005. - № 4. - P. 2-6.
102. Maragakis, N.J. Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease / N.J. Maragakis, J.D. Rothstein // *Nature Clinical Practice Neurology.* - 2006. - № 2. - P. 679-689.
103. Marsicano, G. CB1 Cannabinoid Receptors and On-Demand Defense Against Excitotoxicity / G.Marsicano, S. Goodenough, K. Monory, H. Hermann, M. Eder, A. Cannich, S.C. Azad, M.G.Cascio, S.O. Gutierrez, M. van der Stelt, M.L. Lopez-Rodriguez, E. Casanova, G. Schutz, W. Zieglgansberger, V. Di Marzo, C. Behl, B. Lutz // *Science.* - 2003. - № 302(5642). - P. 84-88.
104. Martins, C.R. Spinal Cord Damage in Spinocerebellar Ataxia Type 1 / C.R. Martins, A.R.M. Martinez, T.J.R. de Rezende, L.M.T. Branco, J.L. Pedroso, O.G.P. Barsottini, I. Lopes-Cendes, M.C.Franca Jr. // *Cerebellum.* - 2017. - № 16. - P. 792-796.
105. Matilla, A. Mice lacking ataxin-1 display learning deficits and decreased hippocampal paired-pulse facilitation / A. Matilla, E.D. Roberson, S. Banfi, J. Morales, D.L. Armstrong, E.N. Burright, H.T. Orr, J.D. Sweatt, H.Y. Zoghbi, M.M. Matzuk // *J. Neurosci.* - 1998. - № 18(14). - P. 5508-5516.
106. Matilla-Duenas, A.M. Molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxias / A.M. Matilla-Duenas, R. Goold, P. Giunti // *Brain.* - 2006. - № 129. - P. 1357-70.

107. Mederos, S. Melanopsin for precise optogenetic activation of astrocyte-neuron networks / S. Mederos, A. Hernández-Vivanco, J. Ramírez-Franco, M. Martín-Fernández, M. Navarrete, A. Yang, E.S. Boyden, G. Perea // *Glia*. - 2019. - № 67(5). - P. 915-934.
108. Mellesmoen A. Brain derived neurotrophic factor (BDNF) delays onset of pathogenesis in transgenic mouse model of spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) / A. Mellesmoen, C. Sheeler, A. Ferro, O. Rainwater, M. Cvetanovic // *Front. Cell. Neurosci.* – 2018. - № 12. – P. 509-512.
109. Menon, R.P. The role of interruptions in polyQ in the pathology of SCA1 / R.P. Menon, S. Nethisinghe, S. Faggiano, T. Vannocci, H. Rezaei, S. Pemble, M.G. Sweeney, N.W. Wood, M.B. Davis, A. Pastore, P. Giunti // *PLoS Genet.* - 2013. - № 9. - P.e1003648.
110. Mittal, U. Insights into the mutational history and prevalence of SCA1 in the Indian population through anchored polymorphisms / U. Mittal, S. Sharma, R. Chopra, K. Dheeraj, P.K. Pal, A.K. Srivastava, M. Mukerji // *Hum. Genet.* - 2005. - № 118. - P. 107-14.
111. Mitterauer, B.J. Imbalances of Tripartite Synapses Responsible for the Pathophysiology of Mental Disorders and Epilepsy / B.J. Mitterauer // *J. Neurol. Neuromedicine.* - 2018. - № 3(5). - P. 57-63.
112. Miyai, I. Cerebellar Ataxia Rehabilitation Trialists Collaboration. Cerebellar ataxia rehabilitation trial in degenerative cerebellar diseases / I. Miyai, M. Ito, N. Hattori, M. Mihara, M. Hatakenaka, H. Yagura, G. Sobue, M. Nishizawa // *Neurorehabil. Neural Repair.* - 2012. - № 26. - P. 515-22.
113. Mori, T. Overexpression of human S100B exacerbates cerebral amyloidosis and gliosis in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease / T. Mori, N. Koyama, G.W. Arendash, Y. Horikoshi-Sakuraba, J. Tan, T. Town // *Glia*. - 2010. - № 58(3). - P. 300-14.
114. Moseley, M.L. Incidence of dominant spinocerebellar and Friedreich triplet repeats among 361 ataxia families / M.L. Moseley, K.A. Benzow, L.J. Schut,

T.D. Bird, C.M. Gomez, P.E. Barkhaus, K.A. Blindauer, M. Labuda, M. Pandolfo, M.D. Koob, L.P. Ranum // *Neurology*. - 1998. - № 51. - P. 1666-71.

115. Mosher, K.I. Microglial dysfunction in brain aging and Alzheimer's disease / K.I. Mosher, T. Wyss-Coray // *Biochemical pharmacology*. - 2014. - № 88(4). - P. 594–604.

116. Nash, B. Functional duality of astrocytes in myelination / B. Nash, C.E. Thomson, C. Lington, A.T. Arthur, J.D. McClure, M.W. McBride, S.C. Barnett // *J. Neurosci*. - 2011. - № 31 (37). - P. 13028-13038.

117. Navarrete, M. Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication / M. Navarrete, A. Araque // *Neuron*. - 2008. - № 57. - P. 883-893.

118. Nowak L. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons / L. Nowak, P. Bregestovski, P. Ascher, A. Herbet, A. Prochiantz // *Nature*. - 1984. - № 307(5950). - P. 462-5.

119. Okazawa H. Interaction between mutant ataxin-1 and PQBP-1 affects transcription and cell death / H. Okazawa, T. Rich, A. Chang, X. Lin, M. Waragai, M. Kajikawa, Y. Enokido, A. Komuro, S. Kato, M. Shibata, H. Hatanaka, M.M. Mouradian, M. Sudol, I. Kanazawa // *Neuron*. - 2002. - № 34(5). - P. 701-713.

120. Onodera, Y. High prevalence of spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) in an isolated region of Japan / Y. Onodera, M. Aoki, T. Tsuda, H. Kato, T. Nagata, T. Kameya, K. Abe, Y. Itoyama // *J. Neurol. Sci*. - 2000. - № 178. - P.153-8.

121. Opal, P. Chapter 63 - Animal Models of Spinocerebellar Ataxia Type 1 / P. Opal, H.T. Orr, editors: Mark S. LeDoux // *Movement Disorders (Second Edition)*. - Academic Press, 2015. - P 979-990.

122. Opal, P. Spinocerebellar Ataxia Type 1 [Электронный ресурс] / P. Opal, T. Ashizawa, In: M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon editors. *GeneReviews®* [Internet]. - Seattle (WA): University of Washington, Seattle. - 2022. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1184/>

123. Orr, H.T. Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1 / H.T. Orr, M.Y. Chung, S. Banfi, T.J. Kwiatkowski Jr., A.

Servadio, A.L. Beaudet, A.E. McCall, L.A. Duvick, L.P. Ranum, H.Y. Zoghbi // *Nat. Genet.* - 1993. - № 4. - P. 221-6.

124. Orr, H.T. Trinucleotide repeat disorders / H.T. Orr, H.Y. Zoghbi // *Annu. Rev. Neurosci.* - 2007. - № 30. - P. 575-621

125. Otis, T.S. Transporter Proteins in Neurons and Glia / T.S. Otis, P.D. Dodson // *Encyclopedia of Neuroscience.* - 2009. - P. 1159-1166.

126. Oz, G. Neurochemical alterations in spinocerebellar ataxia type 1 and their correlations with clinical status / G. Oz, D. Hutter, I. Tkáč, H.B. Clark, M.D. Gross, H. Jiang, L.E. Eberly, K.O. Bushara, C.M. Gomez // *Mov. Disord.* - 2010. - № 25. - P. 1253-61.

127. Pacey, L.K. Persistent astrocyte activation in the fragile X mouse cerebellum / L.K. Pacey, S. Guan, S. Tharmalingam, C. Thomsen, D.R. Hampson // *Brain and Behavior.* - 2015. - № 5(10). - P. e00400.

128. Paixão, S. Neuron-astrocyte communication and synaptic plasticity / S. Paixão, R. Klein // *Current Opinion in Neurobiology.* - 2010. - № 20(4). - P. 466-73.

129. Papadimitriou, D. Inflammation in ALS and SMA: sorting out the good from the evil / D. Papadimitriou, V. Le Verche, A. Jacquier, B. Ikiz, S. Przedborski, D.B. Re // *Neurobiol. Dis.* - 2010. - № 37(3). - P. 493-502.

130. Paradisi, I. Spinocerebellar ataxias in Venezuela: genetic epidemiology and their most likely ethnic descent / I. Paradisi, V. Ikonomu, S.J. Arias // *Hum. Genet.* - 2016. - № 61(3). - P. 215-22.

131. Parpura, V. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signaling / V Parpura 1, T A Basarsky, F Liu, K Jeftinija, S Jeftinija, P G Haydon // *Nature.* - 1994. - № 369(6483). - P. 744-7.

132. Paulson, H.L. Polyglutamine spinocerebellar ataxias - from genes to potential treatments / H.L. Paulson, V.G. Shakkottai, H.B. Clark // *Nat. Rev. Neurosci.* - 2017. - № 18(10). - P. 613-626.

133. Pedley, T.A. *Merritt's Neurology 12th Edition* / T.A. Pedley, edit. L.P. Rowland. - Lippincott Williams & Wilkins, 2009. - 1216 p.

134. Pedroso, J.L. Spinal cord atrophy in spinocerebellar ataxia type 1 / J.L. Pedroso, O.G. Barsottini // *Arq. Neuropsiquiatr.* - 2013. - № 71. - P. 977-9.
135. Pekny, M. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis / M. Pekny, U. Wilhelmsson, M. Pekna // *Neurosci. Lett.* - 2014. - № 565. - P.30-38.
136. Perea, G. Optogenetic astrocyte activation modulates response selectivity of visual cortex neurons in vivo / G. Perea, A. Yang, E. Boyden, M. Sur // *Nat. Commun.* - 2014. - № 5. - P. 3262.
137. Perea, G. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information / G. Perea, M. Navarrete, A. Araque // *Trends Neurosci.* - 2009. - № 32(8). - P. 421-31.
138. Petrakis, S. Identification of human proteins that modify misfolding and proteotoxicity of pathogenic ataxin-1 / S. Petrakis, T. Raskó, J. Russ, R.P. Friedrich, M. Stroedicke, S.P. Riechers, K. Muehlenberg, A. Möller, A. Reinhardt, A. Vinayagam, M.H. Schaefer, M. Boutros, H. Tricoire, M.A. Andrade-Navarro, E.E. Wanker // *PLoS Genet.* - 2012. - № 8. - P. e1002897.
139. Phatnani, H. Astrocytes in neurodegenerative disease / H. Phatnani, T. Maniatis // *Cold Spring Harbor perspectives in biology.* - 2015. - № 7(6). - P. a020628.
140. Pitsillou, E. The cellular and molecular basis of major depressive disorder: towards a unified model for understanding clinical depression / E. Pitsillou, S.M. Bresnahan, E.A. Kagarakis, S.J. Wijoyo, J. Liang, A. Hung, T. Karagiannis // *Mol. Biol Rep.* - 2020. - № 47. - P. 753-770.
141. Platonov, F.A. Genetic fitness and selection intensity in a population affected with high-incidence spinocerebellar ataxia type 1 / F.A. Platonov, K. Tyryshkin, D.G. Tikhonov, T.S. Neustroyeva, T.M. Sivtseva, N.V. Yakovleva, V.P. Nikolaev, O.G. Sidorova, S.K. Kononova, L.G. Goldfarb, N.M. Renwick // *Neurogenetics.* - 2016. - №17. - P. 179–185.
142. Power, E.M. Prolonged Type 1 Metabotropic Glutamate Receptor Dependent Synaptic Signaling Contributes to Spino-Cerebellar Ataxia Type 1 / E.M. Power, A. Morales, R.M. Empson // *J. Neurosci.* - 2016. - № 36(18). - P. 4910-6.

143. Ramirez, A. The N-Methyl-D-Aspartate Receptor: Memory, Madness, and More / A. Ramirez, M. R. Arbuckle // *Biological psychiatry*. - 2017. - № 82(1). - P. e1-e3.
144. Rasooli-Nejad, S. Cannabinoid receptors contribute to astroglial Ca²⁺-signalling and control of synaptic plasticity in the neocortex / S. Rasooli-Nejad, O. Palygin, U. Lalo, Y. Pankratov // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* - 2014. - № 369. - P. 20140077
145. Robitaille, Y. The neuropathology of CAG repeat diseases: review and update of genetic and molecular features / Y. Robitaille, I. Lopes-Cendes, M. Becher, G. Rouleau, A.W. Clark // *Brain. Pathol.* - 1997. - № 7. - P. 901-26.
146. Rodgers, K.R. Innate Immune Functions of Astrocytes are Dependent Upon Tumor Necrosis Factor-Alpha / K.R. Rodgers, Y. Lin, T.J. Langan, Y. Iwakura, R.C. Chou // *Sci. Rep.* - 2020. - № 10. - P. 7047.
147. Rothermundt, M. S100B in Brain Damage and Neurodegeneration / M. Rothermundt, M. Peters, J.H.M. Prehn // *Microsc. Res. Tech.* - 2003. - № 632. - P. 614-632.
148. Ruano, L. The global epidemiology of hereditary ataxia and spastic paraplegia: a systematic review of prevalence studies / L. Ruano, C. Melo, M.C. Silva, P. Coutinho // *Neuroepidemiology*. - 2014. - № 42. - P. 174-183.
149. Rüb, U. Clinical features, neurogenetics and neuropathology of the polyglutamine spinocerebellar ataxias type 1, 2, 3, 6 and 7 / U. Rüb, L. Schöls, H. Paulson, G. Auburger, P. Kermer, J.C. Jen, K. Seidel, H.W. Korf, T. Deller // *Prog. Neurobiol.* - 2013. - № 104. - P. 38-66.
150. Sasaki, T. Application of an optogenetic byway for perturbing neuronal activity via glial photostimulation / T. Sasaki, K. Beppu, K. F. Tanaka, Y. Fukazawa, R. Shigemoto, K. Matsui // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 2012. - № 109(50). - P. 20720-20725.
151. Serra H.G., Gene profiling links SCA1 pathophysiology to glutamate signaling in Purkinje cells of transgenic mice / H.G. Serra, C.E. Byam, J.D. Lande, S.K.

Tousey, H.Y. Zoghbi, H.T. Orr // *Human Molecular Genetics*. - 2004. - № 13(20). - P. 2535-2543.

152. Serra, H.G. ROR α -Mediated Purkinje Cell Development Determines Disease Severity in Adult SCA1 Mice / H.G. Serra, L. Duvick, T. Zu, K. Carlson, S. Stevens, N. Jorgensen, A. Lysholm, E. Burrigh, H.Y. Zoghbi, H. B. Clark, J.M. Andresen, H.T. Orr // *Cell*. - 2006. - № 127(4). - P. 697-708.

153. Servadio, A. Expression analysis of the ataxin-1 protein in tissues from normal and spinocerebellar ataxia type 1 individuals / A. Servadio, B. Koshy, D. Armstrong, B. Antalffy, H.T. Orr, H.Y. Zoghbi, // *Nature Genet*. - 1995. - № 10. - P. 94-98.

154. Shakkottai, V.G. Clinical neurogenetics: autosomal dominant spinocerebellar ataxia / V.G. Shakkottai, B.L. Fogel // *Neurol. Clin*. - 2013. - № 31. - P. 987-1007.

155. Shao, J. Polyglutamine diseases: emerging concepts in pathogenesis and therapy / J. Shao, M. Diamond // *Hum. Mol. Genet*. - 2007. - № 16(2). - P.R115-23.

156. Sheeler, C. Glia in Neurodegeneration: The Housekeeper, the Defender and the Perpetrator / C. Sheeler, J.G. Rosa, A. Ferro, B. McAdams, E. Borgenheimer, M. Cvetanovic // *International journal of molecular sciences*. - 2020. - № 21(23). - P. 9188.

157. Shimizu-Sato, S. A light-switchable gene promoter system / S. Shimizu-Sato, E. Huq, J.M. Tepperman, P.H. Quail // *Nature Biotechnology*. - 2002. - № 20(10). - P. 1041-1044.

158. Shiojiri, T. Vocal cord abductor paralysis in spinocerebellar ataxia type 1 / T. Shiojiri, T. Tsunemi, T. Matsunaga, H. Sasaki, I. Yabe, K. Tashiro, N. Nishizawa, K. Takamoto, T. Yokota, H. Mizusawa // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. - 1999. - № 67. - P. 695-8.

159. Shiwaku, H. Suppression of the novel ER protein Maxer by mutant ataxin-1 in Bergman glia contributes to non-cell-autonomous toxicity / H. Shiwaku, N. Yoshimura, T. Tamura, M. Sone, S. Ogishima, K. Watase, K. Tagawa, H. Okazawa // *The EMBO journal*. - 2010. - № 29(14). - P. 2446–2460.

160. Shiwaku, H. Bergmann glia are reduced in spinocerebellar ataxia type 1 / H. Shiwaku, S. Yagishita, Y. Eishi, H. Okazawa // *Neuroreport*. - 2013. - № 24(11). - P. 620-625.
161. Sholl, D.A. Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat / D.A. Sholl // *J. Anat.* - 1953. - № 87. - P. 387-406.
162. Shuvaev, A.N. Chronic optogenetic stimulation of Bergmann glia leads to dysfunction of EAAT1 and Purkinje cell death, mimicking the events caused by expression of pathogenic ataxin-1 / A.N. Shuvaev, O.S. Belozor, O.I. Mozhei, D.A. Yakovleva, I.V. Potapenko, A.N. Shuvaev, M.V. Smolnikova, V.V. Salmin, A.B. Salmina, H. Hirai, A.G. Teschemacher, S. Kasparov // *Neurobiology of Disease*. - 2021. - Vol.154. - P. 105340.
163. Shuvaev, A.N. Experience of mGluR1 Gene Therapy in Transgenic Models of SCA1 Mice / A.N. Shuvaev, H. Hirai // *Современные технологии в медицине*. - 2016. - № 8(4). - P. 143-156.
164. Shuvaev, A.N. Indirect Negative Effect of Mutant Ataxin 1 on Short- and Long-term Synaptic plasticity in Mouse knock-in Model of Spinocerebellar Ataxia type 1 / A.N. Shuvaev, O.S. Belozor, O. Mozhei, A.N. Shuvaev, Ya.V. Fritzler, E.D. Khilazeva, A.I. Mosyagina, H. Hirai, A.G. Teschemacher, S. Kasparov // *Cells*. - 2022. - №11 (14). - P. 2247.
165. Shuvaev, A.N. Population genetics of spinocerebellar ataxias caused by polyglutamine expansions / A.N. Shuvaev, O.S. Belozor, M.V. Smolnikova, D.A. Yakovleva, Andr.N. Shuvaev, O.M. Kazantseva, E.A. Pozhilenkova, O.I. Mozhei, S. Kasparov // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. - 2019. - V.23. - № 4. - P. 473-481.
166. Sild, M. Radial glia: progenitor, pathway, and partner / M. Sild, E.S. Ruthazer // *Neuroscientist*. - 2011. - № 17(3). - P. 288-302.
167. Sofroniew, M.V. Astrocytes: biology and pathology / M.V. Sofroniew, H.V. Vinters // *Acta Neuropathol.* - 2010. - № 119(1). - P.7-35.
168. Song, I. Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity / I. Song, R.L. Huganir // *Trends Neurosci.* - 2002. - № 25 (11). - P. 578-88.

169. Sorci, G. S100B Protein, A Damage-Associated Molecular Pattern Protein in the Brain and Heart, and Beyond / G. Sorci, R. Bianchi, F. Riuzzi, C. Tubaro, C. Arcuri, I. Giambanco, R. Donato // *Cardiovascular psychiatry and neurology*. - 2010. - № 2010. - P. 656481.
170. Sterratt, D. Principles of Computational Modelling in Neuroscience / D. Sterratt, B. Graham, A. Gillies, D. Willshaw // Cambridge: Cambridge University Press, 2011. - 404p.
171. Stevanin, G. Clinical and molecular advances in autosomal dominant cerebellar ataxias: from genotype to phenotype and physiopathology / G. Stevanin, A. Durr, A. Brice // *Eur J Hum Genet*. - 2000. - № 8. - P. 4-18.
172. Suh, J. Loss of Ataxin-1 Potentiates Alzheimer's Pathogenesis by Elevating Cerebral BACE1 Transcription / J. Suh, D.M. Romano, L. Nitschke, S.P. Herrick, B.A. DiMarzio, V. Dzhala, J.S. Bae, M.K. Oram, Y. Zheng, B. Hooli, K. Mullin, V.A. Gennarino, W. Wasco, J.D. Schmahmann, M.W. Albers, H.Y. Zoghbi, R.E. Tanzi // *Cell*. - 2019. - № 178(5). - P. 1159-1175.e17.
173. Sun, Y.M. Spinocerebellar ataxia: relationship between phenotype and genotype – a review / Y.M. Sun, C. Lu, Z.Y. Wu // *Clin. Genet*. - 2016. - № 90. - P. 305-314.
174. Tamura, T. Glial Cell Lineage Expression of Mutant Ataxin-1 and Huntingtin Induces Developmental and Late-Onset Neuronal Pathologies in Drosophila Models / T. Tamura, M. Sone, M. Yamashita, E.E. Wanker, H. Okazawa // *PLoS One*. - 2009. - № 4(1). - P. e4262.
175. Taniguchi, J.B. RPA1 ameliorates symptoms of mutant ataxin-1 knock-in mice and enhances DNA damage repair / J.B. Taniguchi, K. Kondo, K. Fujita, X. Chen, H. Homma, T. Sudo, Y. Mao, K. Watase, T. Tanaka, K. Tagawa, T. Tamura, S.-I. Muramatsu, H. Okazawa // *Hum. Mol. Genet*. - 2016. - № 25. - P. 4432-4447.
176. Tavares, G. Employing an open-source tool to assess astrocyte tridimensional structure / G. Tavares, M. Martins, J.S. Correia, V.M. Sardinha, S. Guerra-Gomes, S.P. das Neves, F. Marques, N. Sousa, J.F. Oliveira // *Brain Struct. Funct*. - 2017. - № 222(4). - P. 1989-1999.

177. The genotyping protocol [Электронный ресурс] // The Jackson Laboratory. Режим доступа: <https://www.jax.org/Protocol?stockNumber=005601&protocolID=41099> (Дата обращения: 05.10.2020).
178. Tsai, C.C. Ataxin 1, a SCA1 neurodegenerative disorder protein, is functionally linked to the silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors / C.C. Tsai, H.Y. Kao, A. Mitzutani, E. Banayo, H. Rajan, M. McKeown, R.M. Evans // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 2004. - № 101(12). - P. 4047-4052.
179. van de Warrenburg, B.P. Spinocerebellar ataxias in the Netherlands: prevalence and age at onset variance analysis / B.P. van de Warrenburg, R.J. Sinke, C.C. Verschuuren-Bemelmans, H. Scheffer, E.R. Brunt, P.F. Ippel, J.A. Maat-Kievit, D. Dooijes, N.C. Notermans, D. Lindhout, N.V. Knoers, H.P. Kremer // *Neurology*. - 2002. - № 58. - P.702-708.
180. Vasile, F. Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain / F. Vasile, E. Dossi, N. Rouach // *Brain Struct. Funct.* - 2017. - № 222. - P. 2017-2029.
181. Verkhratsky, A. Astroglia dynamics in ageing and Alzheimer's disease / A. Verkhratsky, R. Zorec, J. J. Rodriguez, V. Parpura // *Current Opinion in Pharmacology*. - 2016. - № 26. - P. 74-79.
182. Verkhratsky, A. Astroglia in neurological diseases / A. Verkhratsky, J. J. Rodríguez, V. Parpura // *Future Neurology*. - 2013. - № 8(2). - P. 149-158.
183. Vig, P.J.S. Glial S100B Positive Vacuoles in Purkinje Cells: Earliest Morphological Abnormality in SCA1 Transgenic Mice / P.J.S. Vig, M.E. Lopez, J. Wei, D.R. D'Souza, S.H. Subramony, J. Henegar, J.D. Fratkin // *J. Neurol. Sci. Turk.* - 2006. - № 23. - P.166-174.
184. Vig, P.J.S. Glial S100B protein modulates mutant ataxin-1 aggregation and toxicity: TRTK12 peptide, a potential candidate for SCA1 therapy / P.J.S. Vig, S. Hearst, Q. Shao, M.E. Lopez, H.A. Murphy, E. Safaya // *Cerebellum*. - 2011. - № 10(2). - P. 254-266.

185. Vila, M. The role of glial cells in Parkinson's disease / M. Vila, V. Jackson-Lewis, C. Guégan, D.C. Wu, P. Teismann, D.K. Choi, K. Tieu, S. Przedborski // *Curr. Opin. Neurol.* - 2001. - № 14(4). - P. 483-9.
186. Vinet, J. Neuroprotective function for ramified microglia in hippocampal excitotoxicity / J. Vinet, H.R. Weering, A. Heinrich, R.E. Kälin, A. Wegner, N. Brouwer, F.L. Heppner, N.v. Rooijen, H.W. Boddeke, K. Biber // *J. Neuroinflammation.* - 2012. - № 9. - P. 27-31.
187. Wake, H. Functions of microglia in the central nervous system – beyond the immune response / H. Wake, A. J. Moorhouse, J. Nabekura // *Neuron Glia Biology.* - 2011. - № 7. - P. 47-53.
188. Watase, K. A long CAG repeat in the mouse *Scal* locus replicates SCA1 features and reveals the impact of protein solubility on selective neurodegeneration / K. Watase, E.J. Weeber, B. Xu, B. Antalffy, L. Yuva-Paylor, K. Hashimoto, M. Kano, R. Atkinson, Y. Sun, D.L. Armstrong, J.D. Sweatt, H.T. Orr, R. Paylor, H. Y. Zoghbi // *Neuron.* - 2002. - № 34(6). - P. 905-919.
189. Wilton, D. K. The contribution of glial cells to Huntington's disease pathogenesis / D. K. Wilton, B. Stevens // *Neurobiology of disease.* - 2020. - № 143. - P. 104963.
190. Xie, Z. Optogenetic manipulation of astrocytes from synapses to neuronal networks: A potential therapeutic strategy for neurodegenerative diseases / Z. Xie, Q. Yang, D. Song, Z. Quan, H. Qing // *Glia.* - 2020. - № 68(2). - P. 215-226.
191. Xiong, Z.Q. Astrocytic regulation of the recovery of extracellular potassium after seizures in vivo / Z.Q. Xiong, J.L. Stringer // *Eur. J. Neurosci.* - 1999. - № 11(5). - P. 1677-84.
192. Yamada, M. CAG repeat disorder models and human neuropathology: similarities and differences / M. Yamada, T. Sato, S. Tsuji, H. Takahashi // *Acta. Neuropathol.* - 2008. - № 115. - P. 71-86.
193. Zhang, L.N. Glutamate Transporters/Na(+), K(+)-ATPase Involving in the Neuroprotective Effect as a Potential Regulatory Target of Glutamate Uptake /

L.N. Zhang, Y.J. Sun, L.X. Wang, Z.B. Gao // *Mol. Neurobiol.* - 2016.- № 53(2). - P. 1124-1131.

194. Zinebi, F. Comparison of paired-pulse facilitation of AMPA and NMDA synaptic currents in the lateral amygdale / F. Zinebi, R.T. Russell, M. McKernan, P. Shinnick-Gallagher // *Synapse.* - 2001. - № 42(2). - P. 115-127.

195. Zoghbi, H.Y. Pathogenic mechanisms of a polyglutamine-mediated neurodegenerative disease, spinocerebellar ataxia type 1 / H.Y. Zoghbi, H.T. Orr // *The Journal of biological chemistry.* - 2009. - № 284(12). - P. 7425-9.