

На правах рукописи



Егорова Полина Анатольевна

**РОЛЬ КАЛЬЦИЙ-АКТИВИРУЕМЫХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ (SK  
КАНАЛОВ) В РЕГУЛЯЦИИ ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ  
АКТИВНОСТИ КЛЕТОК ПУРКИНЬЕ КОРЫ МОЗЖЕЧКА МЫШЕЙ  
ТРАНСГЕННОЙ ЛИНИИ SCA2-58Q**

03.01.02 – биофизика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Санкт-Петербург – 2016

Работа выполнена в лаборатории молекулярной нейродегенерации Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», г. Санкт-Петербург.

**Научный руководитель:**

**Безпрозванный Илья Борисович**  
доктор биологических наук

**Официальные оппоненты:**

**Чижов Антон Вадимович**  
доктор физико-математических наук,  
ФГБУН Физико-технический институт  
им. А.Ф. Иоффе РАН,  
старший научный сотрудник

**Салмина Алла Борисовна**  
доктор медицинских наук, профессор,  
ГБОУ ВПО «Красноярский государственный  
медицинский университет им. проф. В.Ф.  
Войно-Ясенецкого», заведующая кафедрой

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук, 199034, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, д.6.

Защита состоится «28» июня 2016 г. в 14-00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.229.25 при ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» (ФГАОУ ВО «СПбПУ») по адресу: 194021, г. Санкт-Петербург, ул. Хлопина, д. 11.

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» по адресу: 195251, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., д. 29, а также на сайте ФГАОУ ВО «СПбПУ»: <http://www.spbstu.ru>

Автореферат разослан «  » \_\_\_\_\_ 2016 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук:



Линькова Наталья Сергеевна

## Общая характеристика работы

**Актуальность.** Спинаocerebellарная атаксия 2-го типа (СЦА2) является неизлечимым наследственным нейродегенеративным заболеванием, связанным с экспансией полиглутамина в белке, кодирующем атаксин-2. При СЦА2 наблюдается прогрессирующее расстройство координации движений, которое нередко сопровождается такими неврологическими симптомами, как: дизартрия, офтальмоплегия, пирамидные и экстрапирамидные симптомы, полиневропатия, дегенерация сетчатки, атрофия зрительных нервов. В отличие от большинства нейродегенеративных заболеваний (НДЗ), проявляющихся преимущественно у людей пожилого возраста, манифестация СЦА2 происходит в молодом или зрелом возрасте. До сих пор остаётся неизвестной причина исследуемого НДЗ, соответственно, на настоящий момент не существует эффективного способа его лечения. Крайне важными являются фундаментальные исследования, направленные на изучение молекулярных основ СЦА2, поскольку именно правильное представление о причинах заболевания даст возможность в дальнейшем найти терапевтическое средство от исследуемых нарушений.

Известно, что поражение клеток Пуркинье (КП) коры мозжечка наблюдается при многих заболеваниях, связанных с нарушением координации движения, в частности, в случае различных типов атаксий. У большинства пациентов, больных атаксией, на последних стадиях заболевания наблюдается практически полная дегенерация КП. Однако исследования показали, что ранние симптомы этого заболевания, возможно, являются результатом не клеточной смерти, а дисфункции КП и потери способности правильно генерировать сигнал. В подтверждение этой гипотезы нарушения регулярной пейсмейкерной активности КП были обнаружены на мышинных моделях в случае эпизодической атаксии 2-го типа (ЭА2), а также в случае некоторых типов СЦА. На основании полученных результатов было высказано предположение о том, что препараты, способные нормализовать регулярную активность КП, могут привести к терапевтическим улучшениям в случае пациентов, больных атаксией.

Исследования показали, что кальций-активируемые калиевые каналы малой проводимости (SK каналы) являются одним из главных типов ионных каналов, осуществляющих строгий контроль пейсмейкерной активности КП. Активация SK каналов приводит к возникновению следовой гиперполяризации клеточной мембраны, что обуславливает регулярность генерации потенциала действия и ограничивает частоту импульсного сигнала КП. Следовательно, семейство SK каналов является потенциальной фармакологической мишенью для лечения cerebellарных атаксий. Некоторый терапевтический эффект активаторов SK каналов был обнаружен в случае заболеваний ЭА2 и СЦА3 методами электрофизиологии *in vitro* на мозжечковых срезах подопытных мышей. До настоящего момента подобных экспериментов на мышинной модели СЦА2 не проводилось. Следует отметить, что при работе на целом животном в большей степени, чем на срезах, сохраняется целостность структур мозжечка. Следовательно, крайне важным является изучение импульсной активности КП и их ответ на применение модуляторов SK каналов в условиях

проведения эксперимента *in vivo*, однако в мировой научной практике исследований подобного плана практически не проводилось.

**Цель работы.** Анализ роли SK каналов в регуляции импульсной активности КП коры мозжечка мышей трансгенной линии SCA2-58Q биофизическими методами регистрации биоэлектрических потенциалов *in vitro* и *in vivo*.

**Задачи:**

1. Сравнить характеристики спонтанной активности клеток Пуркинье коры мозжечка СЦА2 мышей и мышей дикого типа *in vitro*;
2. Оценить влияние активаторов SK каналов на импульсную активность клеток Пуркинье срезов мозжечка СЦА2 мышей *in vitro*;
3. Проверить возможность регуляции активности КП *in vivo* с помощью применения модуляторов SK каналов на лабораторных мышах;
4. Сравнить биофизические и физиологические свойства клеток Пуркинье коры мозжечка СЦА2 мышей и мышей дикого типа *in vivo*;
5. Оценить влияние активаторов SK каналов на электрофизиологическую активность клеток Пуркинье коры интактного мозжечка СЦА2 мышей *in vivo*.

**Научная новизна.** В настоящей работе впервые методами электрофизиологии *in vitro* было проведено сравнение характеристик спонтанной активности КП срезов мозжечка мышей трансгенной линии SCA2-58Q. Было показано, что в случае мутантных мышей с возрастом наблюдается увеличение количества КП с пачечной активностью по сравнению с мышами дикого типа (ДТ). Далее было показано, что применение активаторов SK каналов приводит к нормализации активности КП *in vitro*, обращая пачечную активность в тоническую.

До настоящего момента электрофизиологические свойства КП мышей-моделей атаксии практически не были исследованы биофизическими методами регистрации сигнала *in vivo*. В представленных экспериментах методом внеклеточной регистрации электрофизиологической активности от одиночного отведения КП *in vivo* впервые было продемонстрировано, что аппликации растворов активаторов SK каналов NS309 и СуРРА на открытую поверхность мозжечка способны ограничивать генерацию потенциалов действия КП *in vivo*. Также впервые было показано, что внутривенная инъекция активатора SK каналов СуРРА приводит к ограничению импульсного сигнала КП *in vivo*. В работе впервые было продемонстрировано, что внутрибрюшинные инъекции ингибитора SK каналов NS8593 приводят к уменьшению регулярности электрофизиологической активности КП *in vivo*. Также впервые было показано, что внутрибрюшинное введение активатора  $Ca^{2+}$ -активируемых  $K^+$  каналов CHZ приводит к обратимому уменьшению частоты простых спайков КП лабораторных мышей *in vivo*.

В работе впервые был представлен анализ характеристик электрофизиологической активности КП интактного мозжечка мышей трансгенной линии SCA2-58Q *in vivo*. Также, как и в исследованиях *in vitro*, было выявлено, что с увеличением возраста в случае СЦА2 мышей по сравнению с ДТ мышами уменьшается доля тонических клеток, однако данные различия, наблюдаемые *in vivo*, были более существенными, чем в случае исследований *in vitro*. Наконец,

в настоящей работе было показано, что внутрибрюшинные инъекции CHZ способны обращать пачечную активность СЦА2 КП в тоническую в условиях проведения эксперимента *in vivo*, что является фундаментально важным результатом для подтверждения гипотезы о том, что активация SK каналов является потенциальным терапевтическим методом для лечения заболевания cerebellar ataxia.

**Теоретическая и практическая значимость.** Результаты настоящей работы являются крайне важными для изучения биофизических основ заболевания СЦА2. Полученные в настоящей работе результаты подтвердили гипотезу о том, что ранние симптомы атаксии связаны не столько с гибелью нейронов коры мозжечка, сколько с нарушением их физиологических функций. Также результаты настоящего исследования показали, что применение активаторов SK каналов приводит к нормализации активности СЦА2 КП не только в экспериментах *in vitro*, но и в условиях *in vivo*. Таким образом, было подтверждено предположение о том, что активаторы SK каналов являются потенциальным средством терапевтического лечения заболеваний cerebellar ataxia.

Результаты настоящей работы стали основой для проведения научных исследований, совместных с биофармацевтической компанией Ataxion Therapeutics, в рамках доклинических испытаний новейших модуляторов SK каналов в качестве терапевтических средств от атаксии.

Полученные в настоящей работе результаты используются в курсах лекций кафедры «Медицинская физика» ИФНиТ СПбПУ: прикладные проблемы нейробиологии, клеточная нейрофизиология, семинары по электрофизиологии на английском языке.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Доля тонической спонтанной активности клеток Пуркинье срезов мозжечка *in vitro* значительно меньше в случае стареющих мутантных мышей по сравнению с мышами дикого типа (для мышей возраста 24 нед:  $*p < 0.05$ , для 36 и 48 нед:  $**p < 0.01$ ).
2. Модуляция работы SK каналов *in vitro* приводит к нормализации активности клеток Пуркинье в случае использования активатора SK каналов NS309 (100% случаев) и в случае активатора SK каналов СуРРА (61% случаев).
3. В процессе старения у трансгенных мышей линии SCA2-58Q наблюдаются значимые изменения электрофизиологических свойств активности клеток Пуркинье коры мозжечка *in vivo* по сравнению с клетками Пуркинье мышей дикого типа той же возрастной группы (для мышей возраста 6 и 9 мес:  $*p < 0.05$ , для 12 мес:  $**p < 0.01$ ).
4. Ингибирование SK каналов приводит к возникновению иррегулярных (46% случаев) и пачечных (54% случаев) паттернов в картине разряда КП, тогда как активация SK каналов нормализует активность КП *in vivo* (100% случаев).

**Личный вклад автора.** Основные результаты диссертационной работы получены лично автором с использованием экспериментальной базы Лаборатории Молекулярной Нейродегенерации СПбПУ. Автор принимала непосредственное участие в выполнении всех представленных в работе экспериментов. Планирование и выполнение экспериментов на срезах мозжечка, а также обсуждение результатов данных экспериментов проводилось совместно с

сотрудниками UTSW Medical Center, Даллас, штат Техас. Планирование экспериментов *in vivo* по исследованию влияния поверхностных аппликаций активаторов SK каналов, а также обсуждение результатов данных экспериментов проводилось совместно с сотрудниками ИЭФБ РАН. Планирование экспериментов *in vivo* по изучению влияния внутрибрюшинных инъекций модуляторов SK каналов проводилось совместно с представителями Ataxion. Планирование экспериментов по изучению спонтанной активности КП *in vivo* проводилось лично автором. Выполнение экспериментов *in vivo* проводилось непосредственно автором. Обработка данных, подготовка результатов к публикациям в рецензируемых журналах проводилась лично автором, тексты публикаций подготавливались совместно с соавторами.

**Апробация работы.** Основные результаты диссертационной работы докладывались на российских и международных конференциях и семинарах, а именно, на XLI, XLII, XLIII и XLIV научно-практической конференции с международным участием «Неделя науки СПбГПУ» (Санкт-Петербург, Россия, декабрь 2012, 2013, 2014 и 2015 соответственно), на молодёжной научной конференции «Студенты и молодые учёные – инновационной России» (Санкт-Петербург, Россия, май 2013), на международной конференции «18th International symposium on Ca<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> binding proteins in health and disease» (Кируна, Швеция, июль 2013), на международной конференции «Calcium Signaling: from basic to bedside» (Стокгольм, Швеция, июль 2014), на международной конференции «Science of the future» (Санкт-Петербург, Россия, сентябрь 2014), на международной конференции «From Molecular Mechanisms to Therapeutics» (Лукка, Италия, май 2015), на международной конференции «CAG Repeat Expansion Diseases: From Basic Biology to Therapeutics» (Лукка, Италия, июнь 2015), на V съезде биофизиков (Ростов-на-Дону, Россия, октябрь 2015), а также на научно-практическом семинаре в Karolinska Institutet «Aperia-Brismar-Bezprozvanny Lab Meeting» (Стокгольм, Швеция, 2 июля 2014).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликована 21 работа, из них 16 печатных работ и 5 онлайн публикаций. Опубликовано 7 статей в рецензируемых журналах и 14 тезисов докладов.

**Структура и объём диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, четырёх глав, выводов, списка цитируемой литературы (149 наименований). Работа изложена на 145 страницах, включает 36 рисунков и 2 таблицы.

## Содержание работы

Во **введении** обоснована актуальность диссертационной работы, поставлена цель и сформулированы задачи исследования, аргументирована научная новизна представленной работы, обоснована теоретическая и практическая значимость настоящего исследования, представлены положения, выносимые на защиту, описана апробация работы, упомянуты публикации, а также охарактеризованы структура и объём диссертационного исследования.

В первой главе рассмотрена проблематика нейродегенеративных заболеваний мозжечка. В частности, подробно описана клиническая картина аутосомно-доминантных церебеллярных атаксий (АДЦА), представлен обзор возможных молекулярных основ патогенеза данных заболеваний на примере заболевания спиноцеребеллярной атаксии 2-го типа (СЦА2). Данное заболевание связано с экспансией полиглутамина в белке атаксин-2. На настоящий момент не существует единого мнения о том, какие молекулярные механизмы являются причиной патогенеза СЦА2 и других форм АДЦА. При заболевании АДЦА на начальных стадиях наблюдается дегенерация клеток Пуркинье (КП) коры мозжечка, а к последним стадиям заболевания происходит практически полная элиминация этих нейронов.

В работе рассмотрены биофизические и физиологические свойства КП, описаны проводящие пути мозжечка. Сигнал в КП поступает по двум различным афферентным входам: по системам лазающих и мшистых волокон. КП генерируют два различных типа спайков: простые и сложные. Возникновение сложных спайков обусловлено многочисленными синапсами, формируемыми между единственным лазающим волокном и проксимальной частью дендритного дерева КП. Простые спайки генерируются КП в ответ на возбуждение, приходящее по мшистым волокнам. Неотъемлемым свойством мембраны КП является бистабильность, представляющая собой сосуществование двух типов электрофизиологической активности. КП, согласно свойству бистабильности, генерируют активность, соответствующую различным состояниям мембраны, а действие суммарного тока катионов, вызванного гиперполяризацией мембраны, направлено на поддержание мембранного потенциала на стабильном уровне.

Физиологические и биофизические свойства КП были исследованы методами электрофизиологии на различных мышечных моделях заболеваний АДЦА. Результаты исследований показали, что активность КП стареющих трансгенных мышей значительно отличается от активности КП мышей дикого типа того же возраста. Таким образом, исследования пейсмейкерной активности КП мозжечковых срезов мышей-моделей заболеваний АДЦА привели к возникновению гипотезы о том, что ранние симптомы атаксии могут быть вызваны нарушениями физиологических функций КП, т. е., нарушениями регулярности генерации электрофизиологической активности КП, а не клеточной смертью КП.

В случае СЦА2, а также некоторых других типов АДЦА, наблюдается нарушение кальциевой сигнализации, которое приводит к эффекту эксайтотоксичности через внутриклеточные кальций-зависимые механизмы, а также посредством прямого разрушительного воздействия на функциональные свойства КП. Важным свойством КП является их способность генерировать пейсмейкерную активность, что критично для передачи информации от коры мозжечка к глубинным ядрам мозжечка и далее, к другим областям, отвечающим за моторную координацию, таким как таламус, красное ядро среднего мозга и спинной мозг. Таким образом, дисфункция генерации сигнала КП может приводить к нарушениям координации движений и моторной активности. Было показано, что кальций-активируемые калиевые каналы малой проводимости (SK каналы) отвечают за пейсмейкерную

активность КП. Была выдвинута гипотеза о том, что активация SK каналов может быть использована для повышения регулярности электрофизиологической активности, генерируемой КП, и может принести потенциальную терапевтическую пользу в случае заболевания атаксии. Некоторый терапевтический эффект активаторов SK каналов был обнаружен в случае заболеваний ЭА2 и СЦА3 методами электрофизиологии *in vitro* на мозжечковых срезах подопытных мышей. До настоящего момента подобных экспериментов на мышинной модели СЦА2 не проводилось. В мировой научной практике до сих пор не был осуществлен анализ модуляции SK каналов на модели заболевания атаксией в условиях проведения эксперимента *in vivo*.

На основании первой главы была обозначена цель исследования, а также сформулированы задачи для достижения поставленной цели.

Во **второй главе** описаны материалы и методы, используемые в настоящем исследовании. В работе использовали активатор SK/IK каналов NS309, активатор SK2/SK3 каналов СуРРА, активатор  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых  $\text{K}^+$  каналов CHZ и ингибитор SK каналов NS8593. Работа выполнялась на мышах трансгенной линии SCA2-58Q FVB бэкграунда, а также на беспородных лабораторных мышах из питомника Рапполово. В Лаборатории Молекулярной Дегенерации СПбПУ в рамках настоящей работы была разведена колония трансгенных мышей-моделей заболевания СЦА2. Геном данной трансгенной модели (SCA2-58Q) имеет ген-вставку человеческого мутантного атаксина-2, содержащего 58 CAG повторов, кодирующих глутамин, который находится под контролем L7/rpr2 промотора, высокоспецифичного для КП. В настоящей работе бридинг осуществлялся следующим способом: гемизиготный самец SCA2-58Q (FVB) скрещивался с самкой дикого типа (ДТ) того же бэкграунда с целью получения смешанного (СЦА2 и ДТ) потомства. Генотипирование потомства проводилось с помощью ПЦР на определение наличия трансгена *ATXN2*.

Для оценки моторной координации движений в мышах линии SCA2-58Q был использован метод Beam walk («прогулка по перекладине»). Для каждой мыши были зарегистрированы значения быстроты пробега и количество соскальзывания лап. В процессе статистической обработки результатов для каждой мыши были вычислены средние значения быстроты пробега и количества соскальзывания лап, затем полученные значения усреднялись для каждой экспериментальной группы и представлялись на графике в виде среднего значения  $\pm$  SEM (standard error of the mean, стандартная ошибка среднего).

Исследование спонтанной активности КП проводили с помощью методов электрофизиологии. Регистрация электрофизиологической активности КП *in vitro* осуществлялась на живых мозжечковых срезах подопытных мышей методом локальной фиксации потенциала в конфигурации луз-патч. Все опыты по записи клеточного сигнала осуществляли в течение не более 5-ти часов после извлечения мозжечка. Запись сигнала проводили в течение минимум 5-ти мин в случае каждой КП. Полученные записи анализировались на наличие тонической, либо пачечной активности. Тоническая активность КП характеризовалась генерацией регулярных спайков с относительно постоянной частотой.



Активность клетки называлась пачечной, если более 5% значений межимпульсного интервала (МИИ) анализируемой записи не попадали в интервал ( $\langle x \rangle - 3SD$ ;  $\langle x \rangle + 3SD$ ), где  $\langle x \rangle$  – среднее значение МИИ,  $SD$  – стандартное отклонение (standard deviation). Для каждой КП было вычислено значение частоты генерации спайков, а также значение коэффициента вариации (КВ) МИИ. Результаты, усреднённые по каждому генотипу и по каждой возрастной группе, были представлены в графическом виде как среднее значение  $\pm SEM$ .

Регистрация спонтанной активности *in vivo* осуществлялась с помощью метода внеклеточной регистрации активности КП от одиночного отведения. Наркотизированная мышь закреплялась на стереотаксической установке, в районе мозжечка снимался скальп, в области червя мозжечка, под ламбдовидным швом, просверливалась кость черепа. Внеклеточная регистрация спайковой активности выполнялась в IV – V дольках червя мозжечка. Погружение микроэлектрода в кору мозжечка осуществлялось с помощью одноосевого масляного гидравлического микроманипулятора на глубину до 5 мм. Продолжительная регистрация паттернов активности проводилась от одиночной клетки. Идентифицировалась активность КП по наличию в картине разряда сложного спайка, а также по наличию тормозной паузы простых спайков после сложного разряда. Все опыты по внеклеточной регистрации активности КП осуществлялись в течение не более 5-ти часов после последней инъекции анестетика. С целью определения типа электрофизиологической активности КП, запись соответствующего разряда КП проводилась в течение минимум 5-ти минут. Для анализа модуляции работы SK каналов регистрация активности КП осуществлялась в течение 3-х часов после введения исследуемого вещества.

Для анализа электрофизиологических свойств КП определялись средние значения частоты генерации простых спайков (ПС) и сложных спайков (СС). Полученные результаты представлялись в виде средних значений абсолютных частот  $\pm SEM$ , либо в виде средних значений относительных частот  $\pm SEM$ , т. е.  $(F_i/F_0) \pm SEM$ , где  $F_i$  – значение частоты генерации ПС или СС до инъекции тестируемого вещества,  $F_0$  – значение частоты генерации ПС или СС после инъекции тестируемого вещества. Аналитическую обработку полученных данных начинали с проверки статистической гипотезы по критерию согласия Пирсона о том, что ряд экспериментальных данных в каждый момент времени имеет форму нормального распределения. Далее, с целью анализа статистически значимых различий между экспериментальными группами, использовался однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA, analysis of variance).

Для оценки регулярности электрофизиологического сигнала КП вычислялось значение коэффициента вариации межимпульсного интервала (КВ МИИ) по формуле 1:

$$CV = \frac{SD}{ISI} \quad (1)$$

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

Для оценки изменений иррегулярности электрофизиологической активности КП после инъекции активатора SK каналов был введен параметр  $\chi$ , который вычисляется по формуле 2:

$$\chi = \frac{CV_b - CV_a}{CV_b} \quad (2)$$

Где  $CV_b$  представляет собой коэффициент вариации межимпульсного интервала (КВ МИИ) до инъекции активатора SK каналов,  $CV_a$  – КВ МИИ после инъекции тестируемого соединения.

В большинстве наблюдаемых экспериментов распределение МИИ в разряде КП далеко от нормального распределения и не может быть описано ни одной известной функцией распределения. Однако, можно составить закон распределения случайной величины, основываясь на распределении МИИ анализируемого участка записи активности КП. Таким образом, среднее значение и дисперсия случайной величины могут быть вычислены напрямую из закона распределения МИИ, при этом в нижеприведенных формулах  $x_i$  –  $i$ -тая реализация случайной величины, а  $p_i$  – вероятность  $i$ -той реализации случайной величины. В данном контексте случайная величина – это значение МИИ.

Значение математического ожидания МИИ вычисляется по формуле 3:

$$M[x] = \sum_{i=1}^n x_i p_i \quad (3)$$

Значение дисперсии МИИ вычисляется по формуле 4:

$$D[x] = \sum_{i=1}^n x_i^2 p_i - (M[x])^2 \quad (4)$$

Значение стандартного отклонения вычисляется по формуле 5:

$$d[x] = \sqrt{D[x]} \quad (5)$$

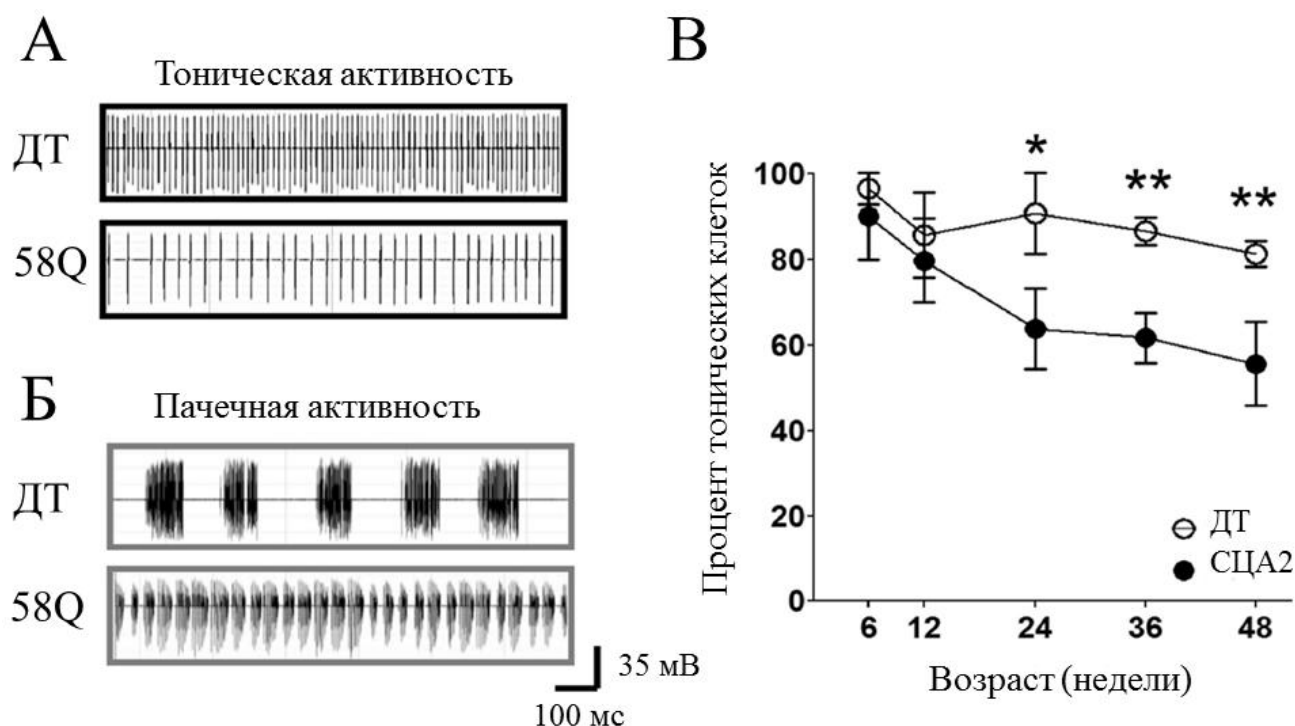
Коэффициент вариации вычисляется по формуле 6:

$$CV = \frac{d[x]}{M[x]} \quad (6)$$

Данный способ анализа был разработан для использования в исследованиях, проводимых совместно с биофармацевтической компанией Ataxion Therapeutics с целью анализа воздействия новейших активаторов SK каналов на электрофизиологическую активность КП *in vivo*. Данный способ анализа был впервые применен для подобных экспериментов. Большинство существующих ранее методов анализа воздействия тестируемых веществ на свойства нейронов не учитывали, что распределение МИИ не является нормальным распределением.

В **третьей главе** представлены результаты, полученные в настоящем исследовании. Был представлен анализ характеристик спонтанной активности КП СЦА2 мышей *in vitro*. Было выявлено, что КП срезов мозжечка стареющих СЦА2 мышей все чаще начинают генерировать пачечную активность *in vitro*. В каждом эксперименте активность КП классифицировалась как

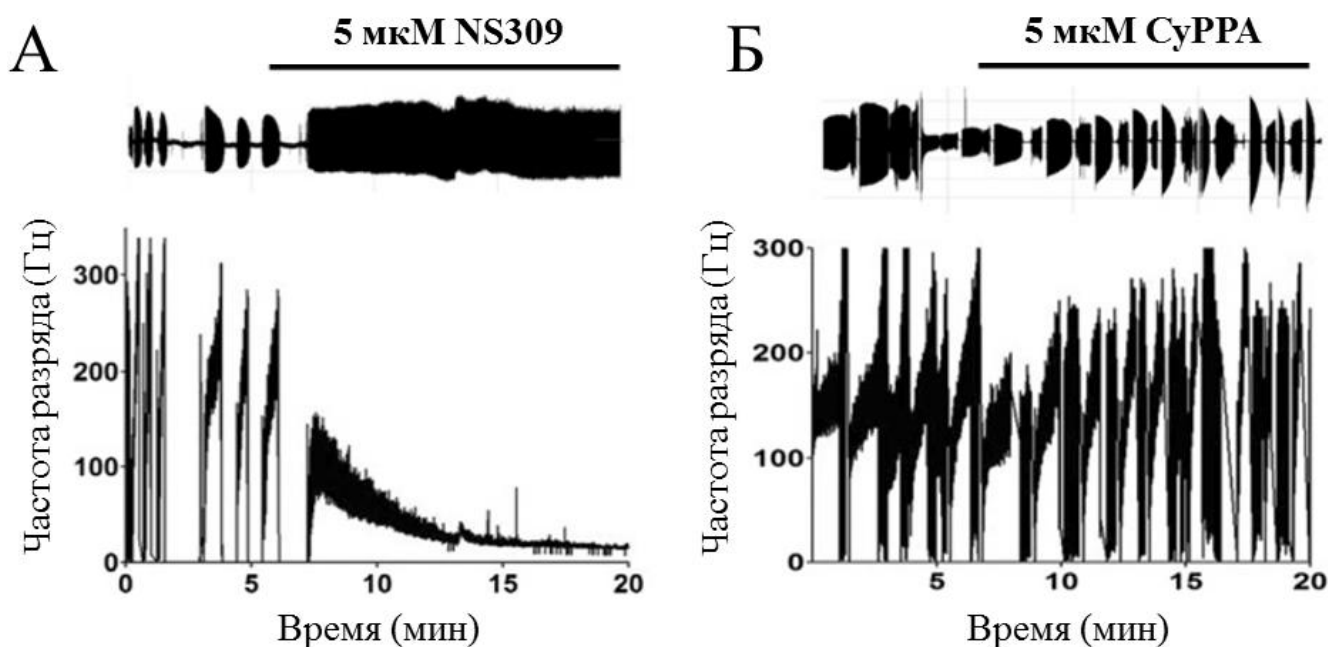
тоническая (Рис. 1А), либо пачечная (Рис. 1Б). Определение типа активности проводилось на основе 5-ти минутного участка записи. Было выявлено, что в случае всех возрастных групп большинство (80-90%) КП срезов мозжечка мышей дикого типа генерировали тоническую активность (Рис. 1В). В то же время, в случае КП срезов мозжечка мутантных мышей наблюдалось прогрессирующее с возрастом уменьшение количества клеток, генерирующих тоническую активность (Рис. 1В). Так, начиная с возраста 24-х недель, доля тонических клеток в срезах мозжечка мутантных мышей составляла всего 50-60%, что значительно меньше показателей мышей дикого типа (Рис. 1В).



**Рис. 1.** Спонтанная активность КП мозжечковых срезов ДТ и СЦА2 мышей. Приведены примеры фрагментов записей тонической (А) и пачечной активности (Б) КП у ДТ и СЦА2 мышей в возрасте 24 недели. (В) Доля тонических клеток была подсчитана как процент от общего количества клеток, проявляющих электрофизиологическую активность, результаты представлены в виде среднего значения доли тонических клеток  $\pm$  SEM. Достоверность различий: \* -  $p \leq 0.05$ , \*\* -  $p \leq 0.01$ .

Для проверки предположения о том, что фармакологическая активация SK каналов способна нормализовать активность КП СЦА2 мышей *in vitro*, была проведена серия экспериментов на мозжечковых срезах СЦА2 мышей в возрасте 24-х недель в присутствии панселективного модулятора SK/IK каналов NS309 и селективного для SK2/3 каналов модулятора СуРРА. Было показано, что применение 5 мкМ NS309 переключает пачечную активность СЦА2 КП в тоническую (Рис. 2А) во всех зарегистрированных случаях ( $n = 11$  из 11 КП). Вещество СуРРА оказалось менее эффективным, чем NS309, поскольку применение 5 мкМ СуРРА переключало пачечные СЦА2 КП в тонический режим только в 11-ти случаях из 18-ти. Пример отсутствия эффекта после применения СуРРА представлен на Рис. 2Б. В

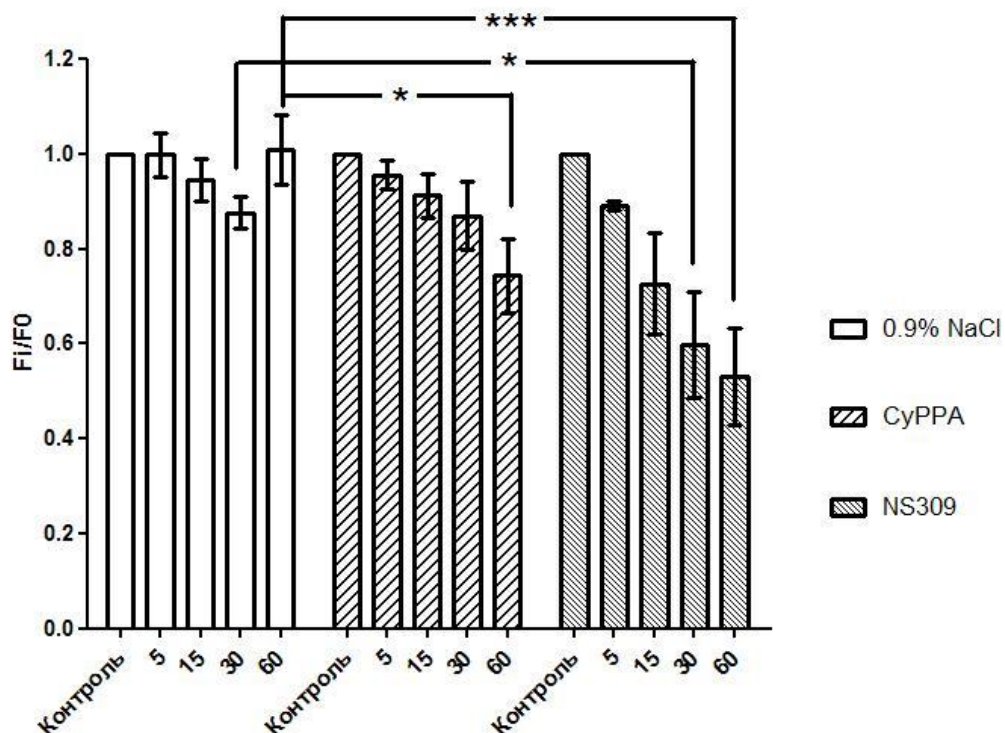
проведённых экспериментах более низкая эффективность СуРРА по сравнению с NS309 обуславливается относительно низкой степенью сродства СуРРА к SK каналам. Полученные данные свидетельствуют о том, что активаторы SK каналов нормализуют пейсмейкерную активность СЦА2 КП *in vitro* и представляют собой потенциальное терапевтическое средство от атаксии.



**Рис. 2.** Активаторы SK каналов модулируют устойчиво пачечную активность КП *in vitro* в случае СЦА2 мышей в возрасте 24-х недель. На рисунках представлены график скользящего среднего частоты активности КП (внизу), а также паттерн анализируемой активности (наверху), соответствующий 20-ти минутам записи до и после добавления 5 мкМ NS309 (А) и 5мкМ СуРРА (Б). Время добавления обозначено горизонтальной чертой.

С целью подтверждения того, что модуляторы SK каналов могут влиять на активность КП *in vivo*, в настоящей работе была представлена серия экспериментов по внеклеточной регистрации активности от одиночного отведения КП на анестезированных лабораторных мышках в возрасте 2 мес. В настоящих экспериментах было показано, что поверхностная аппликация активаторов SK каналов СуРРА и NS309 на открытую поверхность мозжечка приводит к зависимому от времени уменьшению частоты генерации ПС в лабораторных мышках (Рис. 3). Таким образом, в настоящей работе впервые было продемонстрировано, что активация SK каналов действительно способна регулировать работу КП, ограничивая частоту разряда, генерируемого этими клетками, в условиях проведения эксперимента *in vivo*. Также было выявлено, что в опытах, выполненных на целом животном, влияние модуляторов SK каналов на работу КП происходит подобным образом, как и в случае исследований *in vitro*. Данные результаты были важны для последующих этапов научной работы. В дальнейшем были проведены подобные исследования с использованием других способов доставки исследуемых

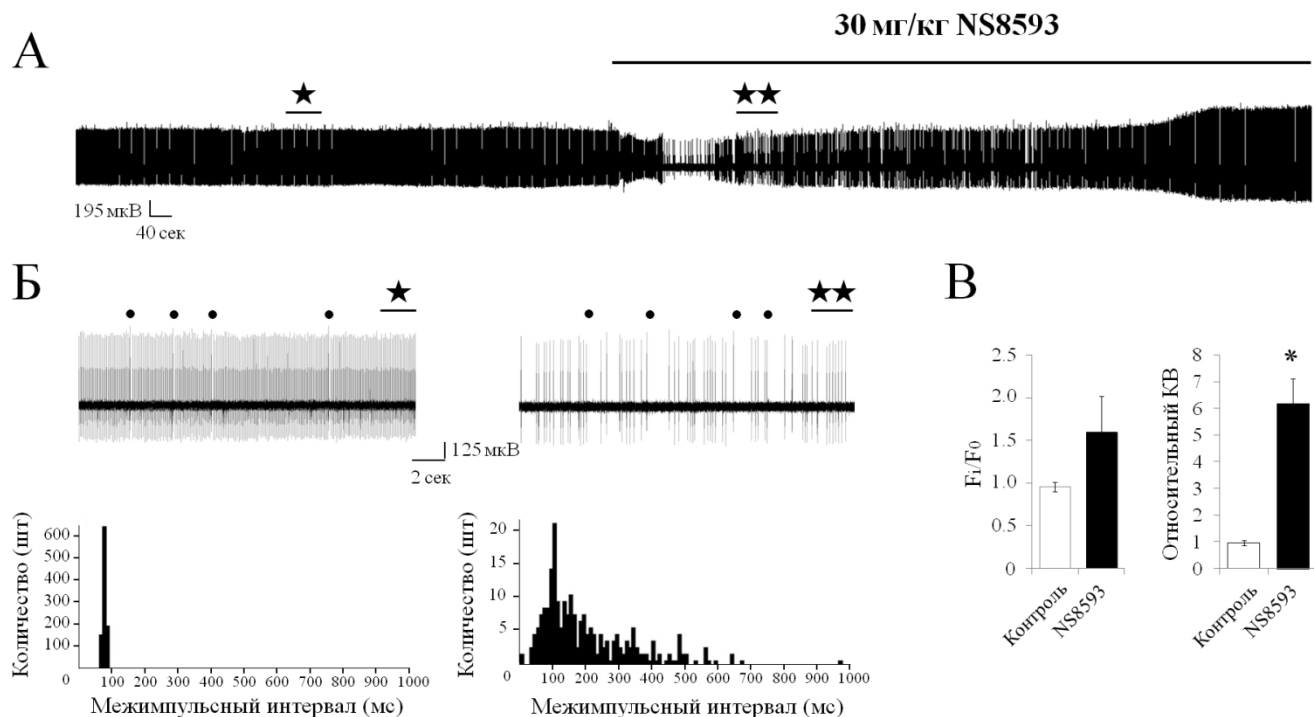
веществ, а именно, с помощью внутривенных и внутрибрюшинных инъекций, что было важно для модуляции способа доставки веществ в организм, общепринятого в клинике.



**Рис. 3.** Сопоставление влияний исследованных соединений на частоту простых спайков клеток Пуркинью. По оси абсцисс: три группы полученных данных с 0.9 % NaCl (число экспериментов,  $n = 6$ ), CyPPA ( $n = 9$ ) и NS309 ( $n = 7$ ), действие которых оценивалось через 5, 15, 30 и 60 мин после аппликации. В качестве контроля представлена относительная частота сигнала за 5 мин до нанесения вещества. По оси ординат: относительные частоты нейрональной активности с их среднеквадратичными отклонениями. Достоверность различий: \* -  $p \leq 0.05$ , \*\*\* -  $p \leq 0.001$  (ANOVA).

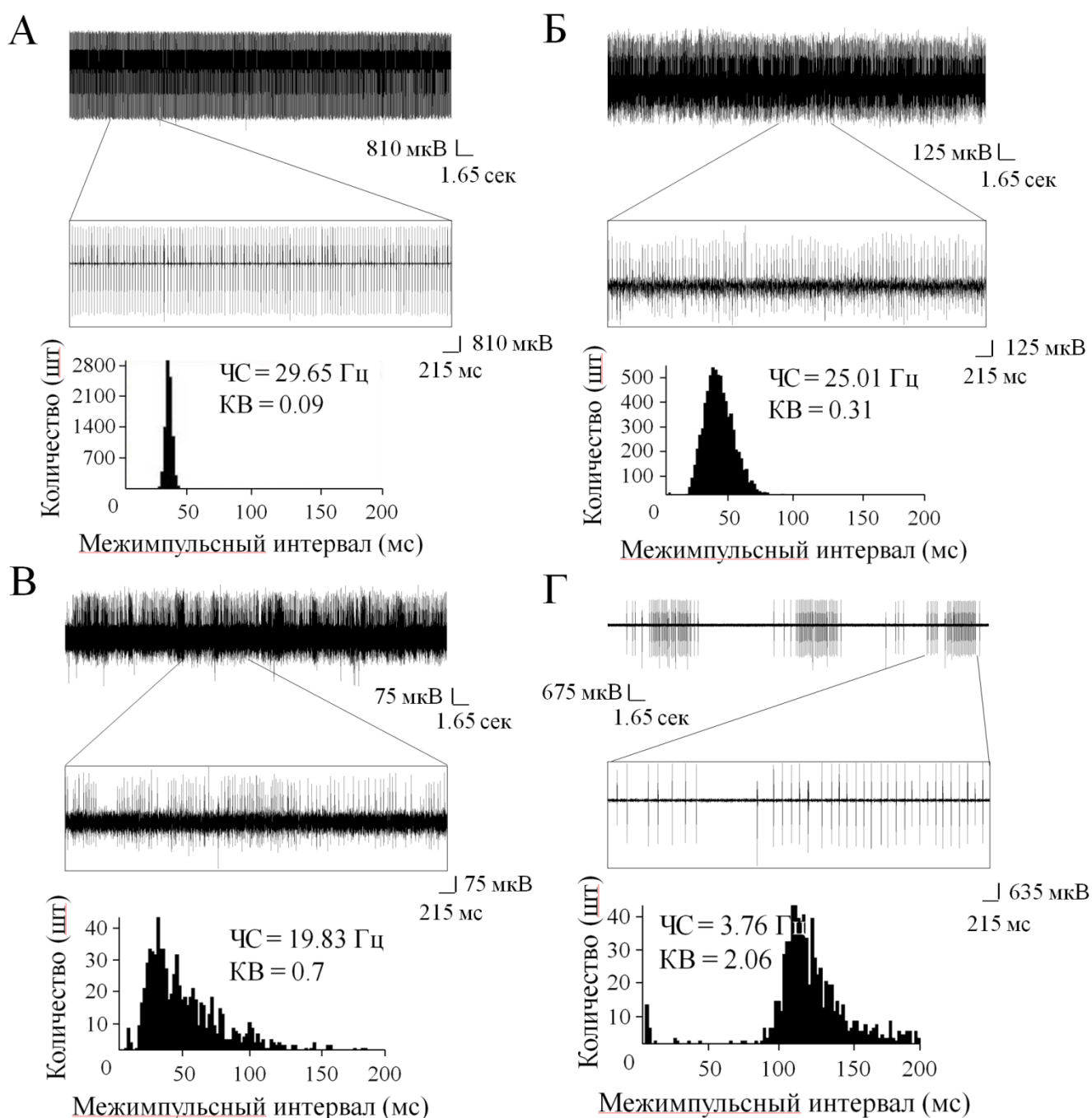
С целью проверки того, что активность КП интактного мозжечка может модулироваться *in vivo* не только положительно, но и отрицательно, был проведен ряд экспериментов по внутрибрюшинной (в.б.) доставке специфичного ингибитора SK каналов NS8593. В настоящих экспериментах в.б. инъекции NS8593 в концентрации 30 мг/кг приводили к обращению тонической активности КП в пачечную в 54% случаев. В остальных экспериментах в.б. инъекции NS8593 приводили к возникновению иррегулярных паттернов активности КП (Рис. 4А, 4Б). Пример распределения МИИ анализируемой иррегулярной активности приведён на Рис. 4Б *внизу* (справа). В данном случае гистограмма распределения имеет гораздо более широкую форму по сравнению с распределением МИИ до инъекции (Рис. 4Б *внизу*, слева), что говорит об уменьшении регулярности генерации ПС после введения ингибитора. В настоящих экспериментах было выявлено, что применение NS8593 увеличивает частоту ПС на  $63 \pm 36\%$  по сравнению с контрольной группой в случае обращения тонического сигнала в иррегулярный, однако данная разница не была статистически значимой (Рис. 4В, слева). Также было показано,

что после инъекции ингибитора SK каналов, активность КП становилась значительно менее регулярной, наблюдалось увеличение КВ МИИ на  $523 \pm 83 \%$  (Рис. 4В, справа). Таким образом, было показано, что ингибирование работы SK каналов путём системного введения NS8593 нарушает регулярность электрофизиологической активности, генерируемой КП, а также обуславливает возникновение пачечных паттернов в картине разряда КП *in vivo*.



**Рис. 4.** Негативная фармакологическая модуляция работы SK каналов приводит к возникновению иррегулярных паттернов активности в КП *in vivo*. (А) Запись электрофизиологической активности КП длиной 12 мин. Время внутрибрюшинной инъекции 30 мг/кг NS8593 обозначено горизонтальной чертой. (Б, *вверху*) Представлены увеличенные фрагменты записи активности КП длительностью 15 сек до (обозначено одной звёздочкой) и 15 сек после (обозначено двумя звёздочками) внутрибрюшинной инъекции 30 мг/кг NS8593. Сложные спайки обозначены точками. (Б, *внизу*) Распределения МИИ, вычисленные для фрагментов записи сигнала длиной 60 сек до и после инъекции NS8593. (В) Влияние внутрибрюшинного введения ингибитора SK каналов NS8593 (30 мг/кг) на характеристики электрофизиологической активности КП интактного мозжечка лабораторных мышей. *Слева*: эффект инъекций NS8593 на частоту ПС. Результаты представлены в виде относительной частоты  $F_i/F_0$ , где  $F_0$  – частота ПС до введения ингибитора,  $F_i$  – частота ПС после введения ингибитора. *Справа*: влияние инъекций NS8593 на вариабельность распределения МИИ. Данные представлены в виде значений КВ, нормированных на значения КВ до введения ингибитора для каждой КП. Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  SEM. Количество анализируемых записей,  $n = 6$  для случая NS8593,  $n = 4$  для контрольной группы. Достоверность различий: \* -  $p \leq 0.05$  (ANOVA).

Известно, что КП коры мозжечка генерируют импульсную активность *in vivo* с гораздо меньшей регулярностью по сравнению с импульсной активностью КП срезов мозжечка *in vitro*.



**Рис. 5.** Типы спонтанной активности КП мышей линии SCA2-58Q *in vivo*. Вверху, паттерн разряда КП длительностью 40 сек с увеличенным фрагментом записи длиной в 5 сек. Внизу, распределение МИИ ПС для (А) тонического, (Б) иррегулярно-тонического, (В) иррегулярного и (Г) пачечного типа активности КП. Приведены средние значения частоты импульсного сигнала (ЧС) КП и коэффициента вариации (КВ) межимпульсного интервала.

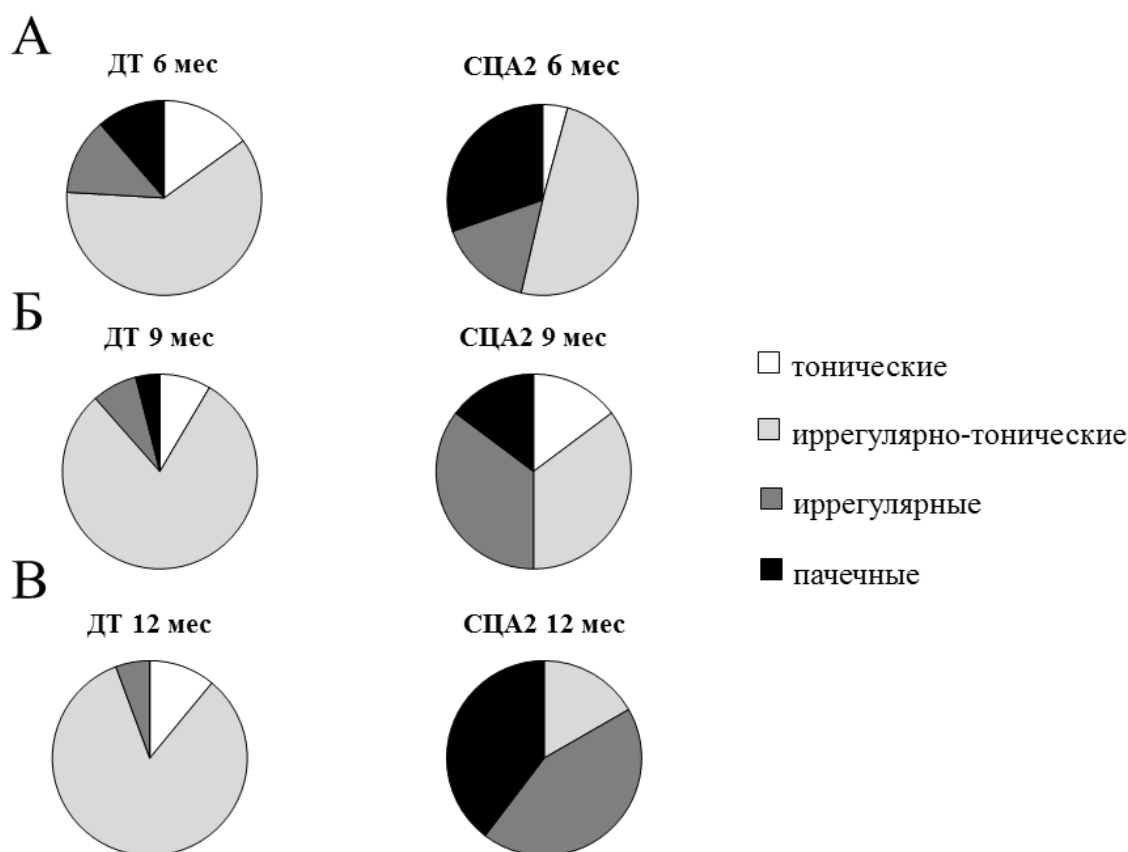
Было предположено, что такие механизмы, как кратковременные и долговременные синаптические процессы скорее всего играют важную роль в контроле генерации регулярного паттерна, и, соответственно, определяют значения МИИ в случае регистрации

электрофизиологической активности КП *in vivo*. Поскольку активность КП интактного мозжечка, генерируемая *in vivo*, качественно отличается от активности КП срезов мозжечка, регистрируемой *in vitro*, была введена новая расширенная система классификации типов активности КП, детектируемой методом внеклеточной регистрации электрофизиологической активности от одиночного отведения КП *in vivo*. Классификация была представлена на основе анализа 30-ти секундного участка записи, через 5-10 мин после начала наблюдения за регистрируемой активностью КП. На основе наблюдаемых паттернов разряда КП было принято решение о введении следующих типов активности КП: тонической (Рис. 5А), иррегулярно-тонической (Рис. 5Б), иррегулярной (Рис. 5В) и пачечной (Рис. 5Г). Активность КП относилась к тонической (Рис. 5А), если распределение МИИ ПС имело форму распределения Гаусса (Рис. 5А, *внизу*, количество интервалов разбиения,  $N = 100$ ), а коэффициент вариации МИИ был меньше 0.15. Активность КП относилась к иррегулярно-тонической (Рис. 5Б), если распределение МИИ ПС имело форму распределения Пуассона (Рис. 5Б, *внизу*, количество интервалов разбиения,  $N = 100$ ), а значение КВ МИИ лежало в интервале от 0.15 до 0.5. Активность КП относилась к иррегулярной (Рис. 5В), если в записи активности КП были явно различимы паттерны разряда с различной частотой ПС. При этом распределение МИИ ПС имело такую форму, которую нельзя было отнести ни к одному из известных статистических распределений (Рис. 5В, *внизу*, количество интервалов разбиения,  $N = 100$ ), а значение КВ МИИ было больше, чем 0.5. Активность КП относилась к пачечной (Рис. 5Г), если в разряде КП были чётко различимы пачки ПС, перемежаемые периодами молчания (Рис. 5Г, *вверху*). Распределение МИИ имеет в данном случае два пика (Рис. 5Г, *внизу*, количество интервалов разбиения,  $N = 100$ ), обусловленные сильно различающимися значениями МИИ. Значение коэффициента вариации МИИ ПС в данном случае – больше единицы.

Далее было проведено сравнение частоты встречаемости различных типов активности для каждой экспериментальной группы мышей (Рис. 6). С этой целью частота встречаемости каждого паттерна активности была усреднена для мышей одного возраста и генотипа. Было обнаружено, что для 6-ти месячных ДТ мышей наблюдалось  $15 \pm 15$  % КП с тонической активностью,  $61 \pm 12$  % с иррегулярно-тонической,  $13 \pm 9$  % с иррегулярной и  $11 \pm 7$  % с пачечной активностью (Рис. 6А, слева). В случае СЦА2 мышей того же возраста наблюдалось  $4 \pm 4$  % КП с тонической активностью,  $49 \pm 8$  % с иррегулярно-тонической,  $16 \pm 4$  % с иррегулярной и  $30 \pm 6$  % с пачечной активностью (Рис. 6А, справа). Для ДТ мышей в возрасте 9 мес. было характерно наличие  $9 \pm 9$  % КП с тонической активностью,  $80 \pm 3$  % с иррегулярно-тонической,  $8 \pm 8$  % с иррегулярной и  $4 \pm 4$  % с пачечной активностью (Рис. 6Б, слева). В случае СЦА2 мышей того же возраста  $15 \pm 3$  % КП имели тоническую активность,  $35 \pm 5$  % – иррегулярно-тоническую,  $35 \pm 5$  % – иррегулярную и  $15 \pm 8$  % – пачечную (Рис. 6Б, справа). Наконец, у ДТ мышей старшей возрастной группы наблюдалось  $11 \pm 7$  % КП с тоническим импульсным разрядом,  $83 \pm 8$  % с иррегулярно-тоническим и  $6 \pm 6$  % с иррегулярным паттерном разряда (Рис. 6В, слева). При этом клеток с пачечной активностью в данной экспериментальной группе обнаружено не было. В случае СЦА2 мышей того же возраста



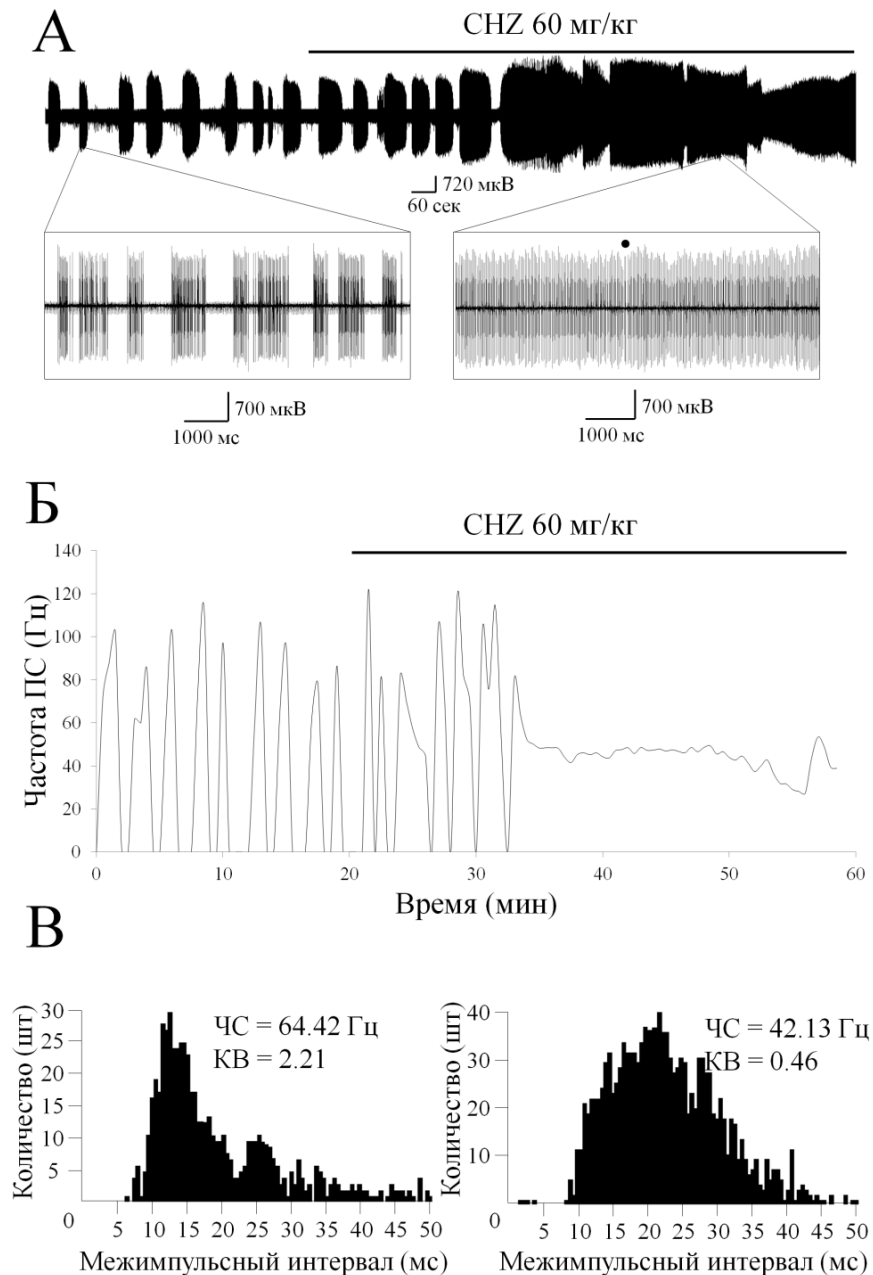
клеток с тоническим разрядом не наблюдалось,  $17 \pm 10$  % КП имели иррегулярно-тоническую активность,  $44 \pm 21$  % – иррегулярную и  $40 \pm 15$  % – пачечную активность (Рис. 6В, справа). На основе полученных данных был сделан вывод о том, что увеличение количества пачечных клеток и уменьшение количества тонических клеток является наиболее вероятной причиной ухудшения координации движений и фенотипа атаксии в стареющих СЦА2 мышах.



**Рис. 6.** Распределение наблюдаемых паттернов по типам активности КП для ДТ и СЦА2 мышей *in vivo*. (А) Распределение для мышей в возрасте 6 мес. (количество мышей,  $m = 3$  и  $4$  для ДТ и СЦА2 мышей соответственно). (Б) Распределение по типам активности КП для ДТ ( $m = 3$ ) и СЦА2 ( $m = 2$ ) мышей в возрасте 9 мес. (В) Распределение по типам активности КП для ДТ ( $m = 3$ ) и СЦА2 ( $m = 4$ ) мышей в возрасте 12 мес.

С целью доказательства того, что активаторы SK каналов способны нормализовывать активность СЦА2 КП, обращая пачечную активность в тоническую *in vivo*, были представлены эксперименты по внеклеточной регистрации активности КП коры интактного мозжечка мышей трансгенной линии SCA2-58Q до и после в.б. введения CHZ в концентрации 60 мг/кг. Эксперименты проводились на мутантных мышах в возрасте 6 мес. Выбор данного возраста объясняется тем, что мыши данной возрастной группы переносят наркоз и хирургические операции лучше, чем мыши более старшего возраста. Для экспериментов выбирались СЦА2 КП с очевидной пачечной активностью (Рис. 7А). Внутривентрикулярная инъекция 60 мг/кг CHZ приводила к переходу пачечной активности КП в тоническую (Рис. 7А) в течение 12 мин после инъекции. С целью анализа полученного в данном эксперименте результата, было произведено

вычисление скользящего среднего частоты простых спайков, генерируемых КП, в течение всей 60-ти минутной записи импульсного сигнала (Рис. 7Б). Вычисление скользящего среднего производилось с шагом в 15 сек.



**Рис. 7.** Системная доставка CHZ обращает пачечную активность КП коры мозжечка СЦА2 мышей в тоническую при регистрации активности клеток *in vivo*. (А) Запись электрофизиологической активности КП СЦА2 мыши в возрасте 6 мес. длительностью 60 мин. Время внутрибрюшинной инъекции 60 мг/кг CHZ обозначено горизонтальной чертой. Представлены увеличенные фрагменты записи активности КП до и после внутрибрюшинной инъекции 60 мг/кг CHZ. Сложный спайк обозначен точкой. (Б) Скользящее среднее частоты ПС записи электрофизиологической активности КП. (В) Слева, распределение МИИ до инъекции CHZ. Справа, распределение МИИ после инъекции CHZ. Приведены средние значения частоты импульсного сигнала (ЧС) КП и коэффициента вариации (КВ) межимпульсного интервала.

Графическое представление скользящего среднего частоты ПС однозначно иллюстрирует преобразование пачечной активности КП в тоническую, о чём можно судить по отсутствию периодов молчания, наблюдаемому уже через 12 мин после инъекции. Также следует обратить внимание на понижение частоты генерации ПС клеткой Пуркинье после введения СНЗ, что обусловлено активацией кальций-активируемых калиевых каналов. Распределение МИИ до инъекции имеет два пика (Рис. 7В, слева), тогда как распределение МИИ после стремится к распределению Гаусса (Рис. 7В, справа). Далее, с целью вычисления коэффициента  $\chi$ , было проведено сравнение распределения МИИ для фрагментов записи длиной 15 мин до и 15 мин после инъекции СНЗ. Данные распределения были использованы для определения соответствующих значений  $CV_b = 1.69$  и  $CV_a = 0.51$  по формулам 3-6, приведённым в описании второй главы. Используя полученные значения, по формуле 2 было подсчитано значение параметра  $\chi = 0.70$ . Полученное значение параметра  $\chi$  близко к 1.0, что говорит о значительном уменьшении иррегулярности активности СЦА2 КП в ответ на в.б. инъекцию 60 мг/кг СНЗ. Подобные результаты были получены в случае двух других независимых экспериментов, в которых значения параметра  $\chi$  составили 0.92 и 0.96 соответственно. Таким образом, можно сделать вывод о том, что внутрибрюшинная инъекция СНЗ приводит к достоверному увеличению регулярности паттернов активности КП коры интактного мозжечка мышей трансгенной линии SCA2-58Q.

### Заключение

В работе были представлены *in vitro* и *in vivo* исследования электрофизиологических свойств КП мышей трансгенной линии SCA2-58Q. Было показано, что в обоих случаях происходит прогрессирующее уменьшение количества клеток с тонической активностью в случае стареющих мутантных мышей по сравнению с мышами дикого типа. Также в работе была показана возможность регуляции электрофизиологической активности КП с помощью фармакологической модуляции SK каналов. Было продемонстрировано, что при ингибировании работы SK каналов происходит превращение тонической активности КП в пачечную или иррегулярную, что соответствует электрофизиологическим свойствам КП СЦА2 мышей *in vivo* (Рис. 6). При этом активация SK каналов приводит к возникновению следовой гиперполяризации (АНР) клеточной мембраны. АНР подавляет работу ионотропного рецептора глутамата, селективно связывающего N-метил-D-аспартат (NMDA рецептора) и, таким образом, ингибирует опосредованную NMDA рецептором эксайтотоксичность. В частности, наблюдается уменьшение токов  $Na^+$  и  $Ca^{2+}$  внутрь клетки. Было предположено, что повышенное высвобождение ионов кальция внутрь клетки может играть важную роль в патогенезе СЦА, следовательно, уменьшение концентрации ионов кальция внутри клетки может привести к терапевтическому эффекту в случае СЦА и некоторых других нейродегенеративных заболеваний.

## Выводы

1. Доля тонической спонтанной активности клеток Пуркинье срезов мозжечка *in vitro* значительно меньше в случае стареющих мутантных мышей по сравнению с мышами дикого типа. Для мышей возраста 24 нед процент тонических клеток составляет: ДТ 91±10%, СЦА2 64±9%; 36 нед: ДТ 87±3%, СЦА2 62±6%; 48 нед: ДТ 76±4%, СЦА2 56±10%.
2. Модуляция работы SK каналов *in vitro* приводит к нормализации активности клеток Пуркинье в случае использования неселективного активатора SK каналов NS309 (18 из 18-ти случаев) и в случае селективного активатора SK каналов СуРРА (11 из 18-ти случаев).
3. С возрастом у СЦА2 мышей наблюдается уменьшение количества тонических КП *in vivo* по сравнению ДТ мышами. Для мышей возраста 6 мес процент тонических клеток составляет: ДТ 76±3%, СЦА2 54±6%; 9 мес: ДТ 89±12%, СЦА2 50±3%; 12 мес: ДТ 97±3%, СЦА2 17±10%.
4. Ингибирование SK каналов приводит к уменьшению упорядоченности электрофизиологической активности КП *in vivo*: коэффициент вариации межимпульсного интервала увеличивается в среднем в пять раз после внутривентрикулярной инъекции NS8593 по сравнению с контролем.
5. Активация SK каналов способствует обращению пачечного сигнала СЦА2 КП *in vivo* в тонический, тем самым нормализуя электрофизиологическую активность КП. В проведённых экспериментах данный эффект наблюдался в трёх случаях из трёх.

## Благодарности

Автор выражает благодарность своему научному руководителю, Илье Борисовичу Безпрозванному, за предоставленную возможность работы над интересным проектом, за проявленное терпение и понимание, а также за организацию двух научных стажировок в UTSW Medical Center, Даллас, штат Техас. Власовой Ольге Леонардовне за стимулирующее обсуждение проекта и консультативную поддержку в написании диссертации. Антонову Сергею Михайловичу за предоставление возможности работы в ИЭФБ РАН. Татьяне Викторовне Карелиной за обучение методике регистрации активности КП *in vivo* и Adebimpre W. Kasumi за обучение методу патч-кламп на срезах мозжечка *in vitro*. Большаковой Анастасии Викторовне за организацию трансфера трансгенных лабораторных животных из США в Санкт-Петербург. Хотину Михаилу Георгиевичу за организацию закупок химических реактивов. Плотниковой Полине Владимировне за оказание помощи в административных вопросах. Сотрудникам кафедры «Медицинская физика» и лаборатории молекулярной нейродегенерации СПбПУ за поддержку и интерес к проекту. За финансовую поддержку проекта на разных стадиях его осуществления автор выражает благодарность ФЦП, КНВШ, РНФ, конкурсу на получение стипендии Президента РФ, программе «УМНИК», биофармацевтической компании Ataxion Therapeutics, программе 5-100, Министерству образования и науки РФ в рамках государственного задания.

## Список публикаций по теме диссертации

### Статьи

1. Kasumu A.W., Liang X., Egorova P., Vorontsova D., Bezprozvanny I. Chronic suppression of inositol 1,4,5-triphosphate receptor-mediated calcium signaling in cerebellar Purkinje cells alleviates pathological phenotype in spinocerebellar ataxia 2 mice // *J. Neuroscience*. 2012. Vol 32. № 37. P. 12786-12796
2. Kasumu A.W., Hougaard C., Rode F., Jacobsen T.A., Sabatier J.M., Eriksen B.L., Strøbæk D., Liang X., Egorova P., Vorontsova D., Christophersen P., Rønn L.C.B., Bezprozvanny I. Selective Positive Modulator of Calcium-Activated Potassium Channels Exerts Beneficial Effects in a Mouse Model of Spinocerebellar Ataxia Type 2 // *Chemistry and Biology*. 2012. Vol 19. № 10. P. 1340–1353
3. Егорова П.А., Карелина Т.В., Власова О.Л., Антонов С.М., Безпрозванный И.Б. Влияние модуляторов SK каналов на частоту простых спайков в разряде клеток Пуркинье мозжечка лабораторных мышей // *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 2014. Т. 50, №2, с. 102-108.
4. Егорова П.А., Безпрозванный И.Б. Исследование молекулярных основ заболевания спиноцеребеллярной атаксии 2-го типа *in vivo* // Неделя науки Санкт-Петербургского государственного политехнического университета. Сборник докладов научного форума с международным участием. 2014. №1. С. 199-206.
5. Egorova P., Popugaeva E., Bezprozvanny I. Disturbed calcium signaling in spinocerebellar ataxias and Alzheimer's disease // *Seminars in cell & developmental biology*. 2015. Vol. 40. P. 127-133.
6. Egorova P., Zakharova O., Vlasova O., Bezprozvanny I. In vivo analysis of cerebellar Purkinje cell activity in SCA2 transgenic mouse model // *J. Neurophysiology*. 2016. p. jn 00913 2015.
7. Егорова П.А., Власова О.Л., Безпрозванный И.Б. Ограничение импульсной активности клеток Пуркинье мозжечка лабораторных мышей путем активации SK-каналов *in vivo* // Научно-технические ведомости СПбГПУ. Физико-математические науки. 2016. № 2 (242).

### Тезисы

1. Егорова П.А., Безпрозванный И.Б. Электрофизиологическое исследование роли кальциевого сигналинга при спиноцеребеллярной атаксии 2-го типа // XLI Неделя науки СПбГПУ: материалы научно-практической конференции с международным участием. 2012. Ч. XVI, с. 7-8.
2. Егорова П.А. Модуляция кальциевой сигнализации в клетках Пуркинье влияет на их функции // Студенты и молодые ученые – инновационной России: материалы работ молодежной научной конференции. 2013. С. 137-139.
3. Егорова П.А., Безпрозванный И.Б. Измерения активности клеток Пуркинье электрофизиологическими методами // Измерения в современном мире - 2013. Сборник научных трудов 4-й Международной научно-практической конференции. 2013. С. 182-183.

4. Egorova P., Kasumu A., Hougaard C., Christophersen P., Bezprozvanny I. Electrophysiological Study of the Role of Ca<sup>2+</sup> Signaling in Spinocerebellar Ataxia 2 // Materials of a conference “18th International symposium on Ca<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> binding proteins in health and disease”. 2013.
5. Егорова П.А. Влияние активаторов SK каналов на активность клеток Пуркинье мозжечка мышей // Системно-технические решения проблем визуализации в нейродегенерации: материалы Всероссийской конференции. 2013. С. 22-24.
6. Егорова П.А., Безпрозванный И.Б. Активаторы SK каналов влияют на активность клеток Пуркинье мозжечка лабораторных мышей // Неделя науки СПбГПУ: материалы научно-практической конференции с международным участием. Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций СПбГПУ. 2014. Ч. 2. С. 127-129.
7. Egorova P.A., Bezprozvanny I.B. Electrophysiological study of the SK channels modulators effect on the cerebellar Purkinje cells activity in laboratory mice *in vivo* // Materials of a conference “Calcium Signaling: from basic to bedside”. 2014.
8. Egorova P.A., Bezprozvanny I.B. Electrophysiological study of the SK channels modulators effect on the cerebellar Purkinje cells activity in laboratory mice *in vivo* // Online publication on the website of a conference “Science of the future”. 2014.
9. Егорова П.А., Безпрозванный И.Б. Электрофизиологическое исследование *in vivo* этиологии заболевания спиноцереbellарной атаксии 2-го типа // Научный форум с международным участием «Неделя науки СПбПУ»: материалы научно-практической конференции. Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций СПбПУ. 2015. С. 396-400.
10. Захарова О.А., Егорова П.А. Исследование действия модуляторов SK каналов на спайковую активность клеток Пуркинье *in vivo* // Научный форум с международным участием «Неделя науки СПбПУ»: материалы научно-практической конференции. Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций СПбПУ. 2015. С. 418-420.
11. Egorova P., Zakharova O., Bezprozvanny I. Effect of the SK channels modulators on electrophysiological activity of Purkinje cells in SCA2-58Q mice *in vivo* // Materials of a conference “From Molecular Mechanisms to Therapeutics”. 2015.
12. Egorova P., Zakharova O., Bezprozvanny I. Effect of the SK channels modulators on electrophysiological activity of Purkinje cells in SCA2-58Q mice *in vivo* // Materials of a conference “CAG Repeat Expansion Diseases: From Basic Biology to Therapeutics”. 2015.
13. Егорова П.А., Безпрозванный И.Б. Исследование влияния модуляторов SK каналов на электрофизиологическую активность клеток Пуркинье коры мозжечка мышей трансгенной линии SCA2-58Q *in vivo* // V Съезд биофизиков России. Материалы докладов: в 2 т – Ростов-на-Дону: Издательство Южного федерального университета. 2015. Т. 1. С. 355.
14. Егорова П.А., Безпрозванный И.Б. Роль модуляторов кальций-активируемых калиевых каналов малой проводимости (SK каналов) в регуляции электрофизиологической активности клеток Пуркинье коры мозжечка мышей трансгенной линии SCA2-58Q // Неделя науки СПбГПУ: материалы научно-практической конференции с международным участием. Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций СПбГПУ. 2015. С. 437-438.