

На правах рукописи

АКОПЯН АННА АЛЕКСАНОВНА

**Нейрофизиологические механизмы влияния активации
аутофагии в головном мозге на нейродегенеративные изменения
и поведение у мышей**

1.5.5. Физиология человека и животных (биологические науки)

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Новосибирск 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины» (НИИНМ) (г. Новосибирск)

Научный руководитель:

Тихонова Мария Александровна – д.б.н., главный научный сотрудник, заведующая лабораторией экспериментальных моделей нейродегенеративных процессов ФГБНУ «НИИ нейронаук и медицины» (г. Новосибирск)

Официальные оппоненты:

1.Малиновская Наталия Александровна - д.м.н., заведующая кафедрой биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава РФ

2. Бондарь Наталья Петровна – к.б.н., старший научный сотрудник сектора молекулярной нейробиологии стресса Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН)

Ведущее учреждение - Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук (ФГБУН ИФ РАН).

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2023 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.178.01. при ФГБНУ «Научно - исследовательский институт нейронаук и медицины» по адресу: 630117, г. Новосибирск, ул. акад. Тимакова, 4. Адреса для корреспонденции: тел. (383)335-98-01, факс (383) 335-97-54, эл. почта dissovet@neuronm.ru/.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИНМ и на сайте <http://www.neuronm.ru/>.

Автореферат разослан _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
д-р биол. наук

М.А. Тихонова

Общая характеристика работы

Актуальность работы. Механизмы контроля качества белка и органелл играют критическую роль в поддержании нормального функционирования клеток организма. Особенно важны эти механизмы для мозга, поскольку нейроны обладают крайне ограниченным пролиферативным ресурсом во взрослом возрасте. Наряду с убиквитин-протеасомной системой аутофагия является важнейшим механизмом защиты клетки от токсических белков и единственным средством удаления повреждённых органелл. Ослабление собственного механизма контроля качества белка и органелл вследствие физиологического старения или болезни рассматривается как одна из основных причин возникновения нейродегенеративных изменений в мозге. (Pohl, Dikic, 2019).

Индукция аутофагии способствует выживанию клеток, что особенно важно для нейронов. Действительно, нейроны, как постмитотические клетки, не могут ослаблять эффект накопления токсичных молекул или поврежденных органелл с помощью клеточного деления и в основном полагаются на базовые уровни аутофагии для выживания. Однако в условиях различных вариантов стрессирования нейронов, накопления агрегированных белков и состарившихся или дефектных органелл происходит нарушение гомеостаза клетки, и требуется активация аутофагии для усиления удаления цитотоксического материала (Plaza-Zabala et al., 2017). Следует отметить, что в основном данные о вовлечении аутофагии в регуляцию функционирования нервных клеток получены *in vitro*, и требуется детальное изучение этих процессов *in vivo*, в мозге экспериментальных животных.

Классическим индуктором аутофагии является рапамицин. Мишенью рапамицина в клетке является белок mTOR, который входит в состав белковых комплексов mTORC1 и mTORC2 (Switon et al., 2017). При избытке пищевых ресурсов в клетке, белок mTOR находится в фосфорилированном состоянии, поддерживает процессы синтеза белков в организме. Дефосфорилирование mTOR под действием рапамицина вызывает торможение синтеза белка и запускает процесс аутофагии, очистку клетки от цитотоксических белков и органелл. Активация mTOR-зависимого пути регуляции аутофагии рапамицином на анимальных моделях нейродегенерации, в том числе болезни Паркинсона (БП), часто дает положительный терапевтический результат, что приводит к уменьшению гибели нейронов и улучшению поведенческих нарушений (Lu et al., 2020).

Перспективы индукции аутофагии связаны с возможностью активирования различных путей и механизмов, лежащих в основе контроля качества белка, связанного с аутофагией и протеасомной системой. Представляется перспективным использование комбинации рапамицина с другими индукторами аутофагии, в частности, действующими посредством mTOR-независимых путей активации аутофагии, что может быть полезным в коррекции нейродегенеративных изменений. К индукторам mTOR-независимой

аутофагии относится трегалоза (Sarkar et al., 2007). Трегалоза одновременно обладает свойствами шаперона, индуктора шаперон-опосредованной аутофагии и индуктора mTOR-независимой макроаутофагии (Sarkar et al., 2007; Rodriguez-Navarro et al., 2010). Другим полезным клеточным эффектом трегалозы является активация транскрипционного фактора EB (TFEB), регулирующего биогенез лизосом (Palmieri et al., 2017).

Совместное использование рапамицина и трегалозы оказывает нейрозащитное действие от накопления белковых агрегатов, что было показано на моделях *in vitro* (Sarkar et al., 2007). Между тем, эффективность такой комбинированной терапии практически не изучались на моделях БП *in vivo*.

Таким образом, представляется актуальным исследование роли аутофагии в мозге при развитии нейродегенеративных изменений и возможности их коррекции с помощью модуляции различных путей регуляции аутофагии *in vivo*.

Цель работы - изучение влияния активности аутофагии в мозге на функционирование nigrostriарной системы мозга, микроглиальную функцию и поведение мышей.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Оценить активность аутофагии в мозге, морфофункциональные и поведенческие изменения у мышей с оверэкспрессией α -синуклеина.

2. Оценить уровень индукции аутофагии в различных структурах головного мозга с помощью индукторов аутофагии, рапамицина и трегалозы, у контрольных инбредных мышей линии C57BL/6J.

3. Изучить влияние индукторов на активацию аутофагии в мозге у мышей с оверэкспрессией α -синуклеина и в рамках модели БП, индуцированной с помощью МФТП.

4. Исследовать эффективность стимуляции аутофагии отдельным и совместным применением рапамицина и трегалозы для коррекции поведенческих и морфофункциональных нарушений на моделях БП у мышей.

Научная новизна. Впервые выявлено раннее ослабление аутофагии и микроглиальной функции у мышей с оверэкспрессией мутантного α -синуклеина. Показано усиление аутофагии в мозге под действием индукторов аутофагии по mTOR-зависимому (рапамицин) и mTOR-независимому (трегалоза) путям как у обычных мышей инбредной линии C57BL/6J, так и у мышей с БП-подобными изменениями.

Для уменьшения нейродегенеративных изменений в дофаминергических нейронах nigrostriарной системы, вызванных нейротоксином МФТП или оверэкспрессией мутантного α -синуклеина, мы впервые применили совместное воздействие индукторов аутофагии рапамицина и трегалозы в условиях *in vivo*. Было показано значимое восстановление нейрональных функций с применением индукторов и улучшение поведенческих показателей на моделях БП у мышей. Таким образом, продемонстрировано, что фармакологическая модуляция активности аутофагии оказывает нейропротекторное действие на нейроны nigrostriарума *in vivo*.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты проведенного исследования помогут расширить современные представления о вовлечении аутофагии в мозг в развитие нейродегенеративных изменений. Совместное применение индукторов аутофагии рапамицина и трегалозы может служить многообещающим подходом в восстановлении нейрональных и поведенческих дефицитов при нейродегенерации, и в первую очередь, при БП.

Личный вклад автора. Диссертационная работа является результатом исследований автора, частично поддержана грантом № 16-04-01423-а от Российского фонда фундаментальных исследований (Россия) и НГУ: Академическая стратегическая единица «Нейронаука и трансляционная медицина» (Новосибирск, Россия).

Экспериментальная часть ИГХ исследований и обработка полученных данных были выполнены автором в полном объеме самостоятельно. Тестирование и анализ поведения осуществлялись совместно с К.С. Павловым и д.б.н. Н.И. Дубровиной. Забор образцов мозга для ИГХ проводили совместно с к.б.н. М.В. Тендитником. Осмотический тест на аутофагию выполняли совместно с к.б.н. А.Б. Пупышевым. Статистическая обработка и интерпретация данных осуществлялись совместно с к.б.н. А.Б. Пупышевым и научным руководителем д.б.н. М.А. Тихоновой. Автор принимала активное участие в представлении результатов исследования на конференциях и в подготовке материалов для научных публикаций.

Степень достоверности результатов. Экспериментальные данные получены с использованием современных методических подходов и подходящих валидных моделей на экспериментальных животных с помощью высокоинформативных методов исследования (иммуногистохимия, биохимия, автоматизированный анализ поведения животных). Выборки животных формировались в соответствии с принципами гуманности и в объеме строго необходимом для проведения полноценного анализа полученных данных. Для статистической обработки полученных результатов использованы адекватные методы статистического анализа. Научные положения и выводы аргументированы.

Положения, выносимые на защиту:

1. Оверэкспрессия α -синуклеина у мышей подавляет активность аутофагии в структурах мозга в молодом возрасте, что приводит к морфофункциональным дефицитам в нигростриарной системе и поведенческим отклонениям. Нейродегенеративные изменения сопровождаются снижением микроглиальной функции.

2. Индукторы аутофагии рапамицин и трегалоза через mTOR-зависимый и mTOR-независимый пути активации повышают интенсивность аутофагии в мозге у мышей с оверэкспрессией α -синуклеина или нейродегенеративными изменениями, вызванными нейротоксином МФТП, что способствует восстановлению нейронов нигростриарной системы и поведенческих показателей, а также модулируют микроглиальную активность, восстанавливая её до показателей контрольных животных.

Апробация результатов. Полученные результаты были представлены и обсуждены на международной конференции, посвящённой 100-летию со дня рождения академика Беляева (Новосибирск, 2017); 21-st ESGLD WORKSHOP AND GRADUATE COURSE (France, 2017); IV-й Российской конференции с международным участием «Современные проблемы биологической психиатрии и наркологии» (Томск, 2018); XII –й международной мультikonференции «BIOINFORMATICS OF GENOME REGULATION AND STRUCTURE/ SYSTEMS BIOLOGY» BGRS/SB-2020 (Новосибирск, 2020); XIII –й международной мультikonференции «Genomics, genetics and system biology of animals» BGRS/SB-2022 (Новосибирск, 2022).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 14 работ, в том числе 7 статей в рецензируемых зарубежных и отечественных журналах из «Перечня» ВАК, индексируемых в базах Scopus и Web of Science.

Структура и объем диссертации. Диссертация содержит введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и цитированную литературу. Работа изложена на 113 страницах, содержит 28 рисунков и 1 таблицу. Список литературы включает 122 ссылки.

Благодарности. Автор выражает благодарность научному руководителю д.б.н. Тихоновой Марии Александровне, д.б.н. Амстиславской Тамаре Геннадьевне и сотрудникам лаборатории: к.б.н. А.Б. Пупышеву, к.б.н. М.В. Тендитнику, д.б.н. Н.И. Дубровиной, К.С. Павлову за помощь в выполнении исследования.

Материалы и методы исследования

В работе использованы 5 мес. мыши трансгенной линии B6.Cg-Tg(PrNp-SNCA*A53T)23MKLE/J (далее - B6.Cg-Tg) с оверэкспрессией A53T-мутантного α -синуклеина человека, мыши контрольной линии дикого типа и мыши инбредной линии C57BL/6, содержащиеся на обычной лабораторной диете.

Всех мышей содержали в группах по пять особей на клетку (40 × 25 × 15 см) в стандартных условиях (температура: 18–22°C, относительная влажность: 50–60%, цикл свет/темнота 14/10 ч (выключение света в 15-00) с едой и стерильной водой ad libitum. Масса тела трансгенных мышей существенно не отличалась от контрольных мышей дикого типа. Содержание экспериментальных животных и все процедуры были выполнены в соответствии с международными правилами обращения с животными National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80023), 1996. Были приложены все усилия, чтобы свести к минимуму количество использованных животных и их страдания.

Для воспроизведения фармакологической модели 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МФТП) вводили в дозе 20 мг/кг (внутрибрюшинно, ежедневно) в течение 4 дней. Введение индукторов аутофагии начинали через 2 дня после последней инъекции МФТП при «остром» режиме. Рапамицин (2 мг/мл, растворитель 5 % этанол, 5 % твин-80, 5 % полиэтиленгликоль-400)

вводили в дозе 10 мг/кг веса тела внутривбрюшинно ежедневно в течение недели. Трегалозу добавляли в питьевую воду (2%), которая была в свободном доступе, также на 1 неделю. Мышей декапитировали через 1 день после окончания всех воздействий для оценки лизосомального осмотического теста и 5 дней позже - для иммуногистохимического (ИГХ) анализа (интервал был запланирован для поведенческих тестов).

В «отложенном» режиме воздействие индукторами начинали через 7 суток после последней интоксикации МФТП у мышей. Рапамицин вводили внутривбрюшинно в дозе 10 мг/кг веса тела 7 раз через день в течение 2-х недель. Трегалозу добавляли в питье (2 %) на такой же срок. Подобный дизайн был применён и в эксперименте с мышами линии B6.Cg-Tg.

Иммуногистохимический анализ. Мышей усыпляли с помощью CO₂ и транскардиально перфузировали фосфатно-солевым буфером (PBS) с последующим 4% параформальдегидом в PBS, затем мозг быстро вырезали и постфиксировали в растворе, содержащем 30% сахарозы, при 4°C и держали в нем до полной дегидратации. После мозг замораживали в среде Tissue-Tek O.C.T. Compound («Sakura Finetek», США) и хранили при температуре -72° C. Срезы мозга приготавливали на криостате MicroCut-SADV («Citotest Labware Manufacturing Co.», Китай). Анализ ИГХ проводили на криосрезах толщиной 30 мкм. Подробное описание иммуногистохимического анализа с флуоресцентными метками и перечень использованных антител представлены в тексте диссертации.

Биохимический тест. Этот анализ основан на высокой осмотической чувствительности аутофаголизосомных мембран по сравнению с первичными лизосомами и повышении осмотической чувствительности лизосом при активации аутофагии. Подробное описание представлено в тексте диссертации.

Поведенческие тесты. Моторные и когнитивные функции животных оценивали с помощью поведенческих тестов: «открытое поле», условная реакция пассивного избегания, Т-образный лабиринт, тест Барнс.

Статистический анализ. Для выполнения всех статистических обчислений использовалось программное обеспечение STATISTICA 10.0 (StatSoft, Талса, штат Оклахома, США). Все результаты представляли как среднее значение ± стандартная ошибка среднего и сравнивали с использованием t-критерия Стьюдента, одно- или двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим *post-hoc* анализом с применением LSD критерия Фишера. При анализе данных в тесте УРПИ применяли дисперсионный анализ Repeated Measures ANOVA с повторными измерениями. В случае с категориальными переменными (доля мышей, нашедших целевую лунку в тесте Барнс в день теста) различия между группами оценивали точным двусторонним критерием Фишера в 2 × 2 таблицах сопряженности. Корреляцию между экспрессией ТГ и LC3-II рассчитывали с помощью коэффициента Пирсона. Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

1. Влияние оверэкспрессии α -синуклеина на активность аутофагии, нейрональные и поведенческие показатели у мышей линии B6.Cg-Tg.

В данной работе мы изучили активность аутофагии в головном мозге, а также нейрональные и поведенческие показатели у мышей трансгенной линии, характеризующихся оверэкспрессией A53T-мутантного α -синуклеина человека.

В качестве основного критерия оценки активности аутофагии в мозге использовали экспрессию маркера аутофагии белка LC3-II, выявляемую методами иммуногистохимии. Трансгенные мыши продемонстрировали резкое снижение экспрессии маркера аутофагии в полосатом теле, обогащенном нейритами дофаминергических нейронов, по сравнению с контрольными мышами дикого типа. Похожие изменения были обнаружены и в чёрной субстанции, где расположены тела дофаминергических нейронов, а также в миндалине (Рис.1).

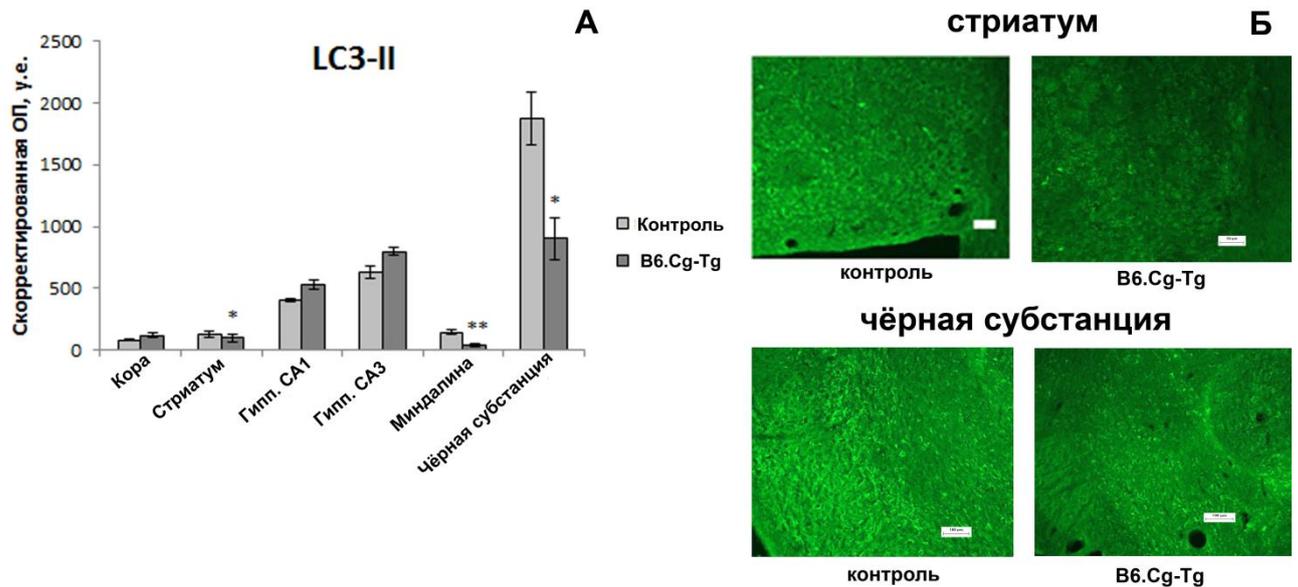


Рис.1. Активность аутофагии, измеренная по экспрессии LC3-II в лобной коре, полосатом теле, гиппокампе, миндалине и в чёрной субстанции у мышей трансгенной линии (B6.Cg-Tg) с оверэкспрессией A53T-мутантного α -синуклеина человека (А). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по сравнению с контрольными мышами. Б – микрофотографии корональных срезов, иммуногистохимически окрашенных против LC3-II, в стриатуме и в черной субстанции. Увеличение в стриатуме 200 \times ; в чёрной субстанции 100 \times ; шкала 100 μ м.

Признаки дофаминергической дисфункции у трансгенных мышей были выявлены с помощью иммуногистохимического анализа экспрессии ключевого фермента биосинтеза дофамина тирозингидроксилазы (ТГ) в полосатом теле и в чёрной субстанции. Значения параметра были меньше примерно на 25% в

чёрной субстанции у мышей B6.Cg-Tg ($p > 0,05$), в то время как значительное (около 50%) снижение показателя обнаружено в полосатом теле (Рис.2).

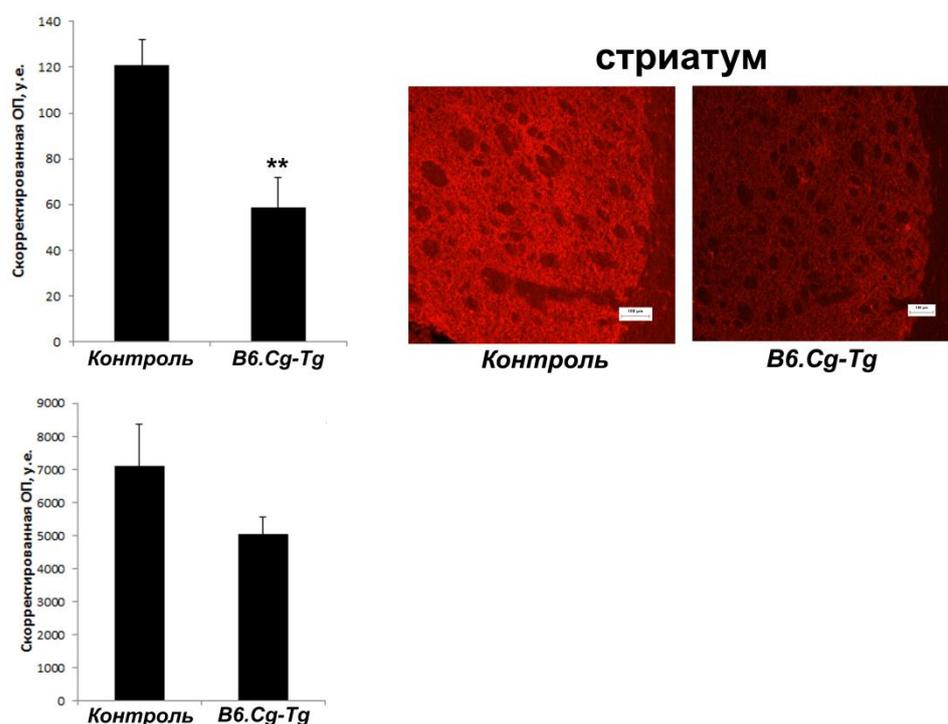


Рис.2. Влияние оверэкспрессии A53T-мутантного α -синуклеина на экспрессию ТГ в стриатуме (А) и в чёрной субстанции (Б) у 5-месячных мышей. ** $p < 0,01$ по сравнению с контрольными мышами. В - на микрофотографиях представлены корональные срезы стриатума, иммуногистохимически окрашенные против ТГ. Увеличение $100 \times$, шкала $100 \mu\text{m}$.

Следует отметить, что в рамках другой модели БП, у которой нейродегенеративные изменения в нигростриарной дофаминергической системе индуцируют введением нейротоксина МФТП, также выявлено угнетение аутофагии в головном мозге у мышей.

Важно отметить, что в возрасте 5 месяцев у мышей трансгенной линии не выявлено накопления агрегатов α -синуклеина в структурах мозга, которые обычно вызывают активацию микроглии. Наоборот, наблюдается подавление базовой активности микроглии, оцениваемой по экспрессии маркера микроглии Iba-1 (Рис.3). Схожая картина в разных структурах мозга наблюдается также у мышей в рамках МФТП-индуцированной модели БП в «отложенном» режиме (через 31 дня после воздействия МФТП).

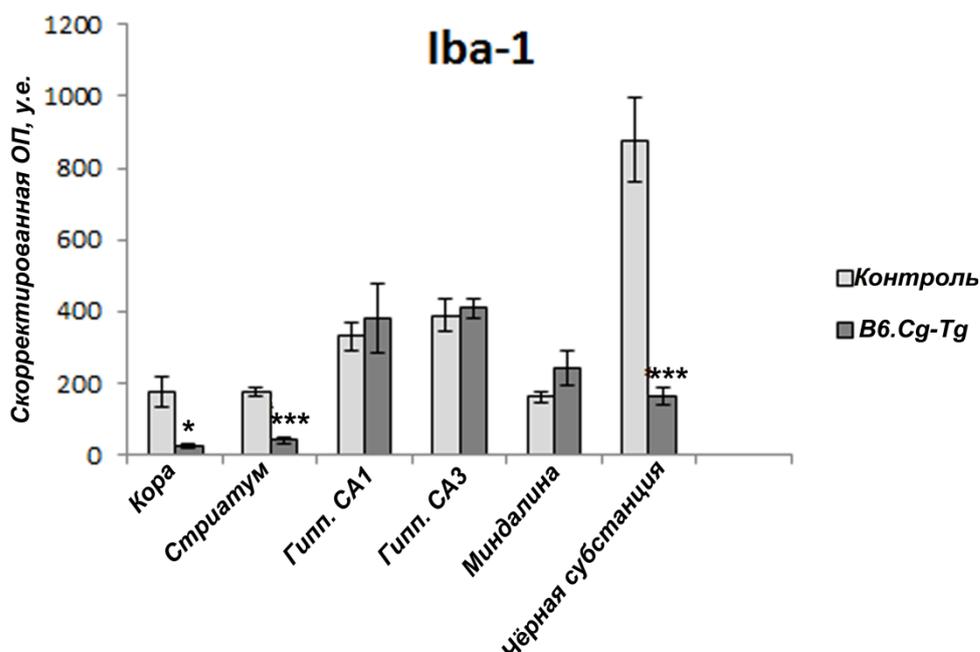


Рис.3. Экспрессия маркера активированной микроглии Iba-1 в лобной коре, стриатуме, миндалине, областях СА1 и СА3 гиппокампа и в чёрной субстанции у мышей трансгенной линии в возрасте 5 месяцев. N=3-6 в группе. Статистически значимые различия: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ по сравнению с контрольными мышами.

Наряду со снижением активности аутофагии в мозге и нейрональными изменениями выявлены отклонения в поведении у мышей трансгенной линии в молодом возрасте 5 месяцев. Общая двигательная активность (пройденный путь (см)) в тесте «открытое поле» была достоверно повышена у мышей линии B6.Cg-Tg ($3852,4 \pm 149,0$) по сравнению с контролем ($2521,8 \pm 183,5$, $p < 0,001$), что согласуется с ранее полученными данными (Farrell et al., 2014).

В тесте пассивного избегания и в Т-образном лабиринте мыши линии B6.Cg-Tg молодого возраста не проявили значимых отклонений в сравнении с контрольными животными дикого типа. В тесте Барнс был отмечен ряд нарушений как в день теста, так и в период обучения у мышей B6.Cg-Tg. Мы предполагаем, что они отражают заторможенность когнитивных процессов у мышей линии B6.Cg-Tg и снижение исследовательской мотивации. Это подтверждается увеличением латентного времени нахождения целевой лунки мышами B6.Cg-Tg ($59,0 \pm 15,4$ с) по сравнению с контролем ($27,6 \pm 4,1$ с; $p < 0,05$), а также снижением общего количества тычков носа в лунки ($28,0 \pm 3,3$) по сравнению с контролем ($48,8 \pm 4,5$; $p < 0,01$) и уменьшением числа тычков носа в целевую лунку у мышей B6.Cg-Tg ($1,45 \pm 0,61$) по сравнению с контролем ($3,50 \pm 0,61$; $p < 0,05$). Аналогичные выводы можно сделать по динамике обучения животных в этом тесте. Выявлено достоверное влияние факторов оверэкспрессии α -синуклеина ($F(1,63)=23,6$, $p < 0,001$) и обучения ($F(3,63)=12,5$, $p < 0,001$) на латентный период нахождения укрытия мышами (Рис.4).

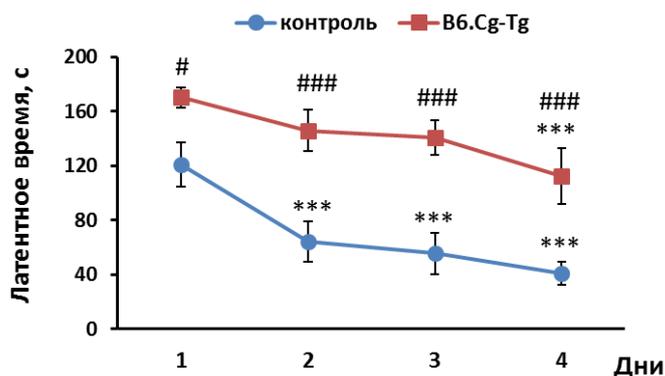


Рис.4. Динамика обучения в тесте Барнс у мышей трансгенной линии B6.Cg-Tg с оверэкспрессией α -синуклеина по латентному времени нахождения целевой лунки в течение четырех дней обучения. N=11-12 в группе. Статистически значимые различия: *** $p < 0,001$ по сравнению с первым днем обучения; # $p < 0,05$, #### $p < 0,001$ по сравнению с мышами дикого типа.

2. Оценка уровня активации аутофагии в различных структурах головного мозга с помощью индукторов аутофагии рапамицина и трегалозы у мышей инбредной линии C57BL/6.

Рапамицин применяли в разных дозах с целью определения наиболее эффективных концентраций для индукции аутофагии в мозге у мышей. Во фронтальной коре наибольший и высоко достоверный эффект стимуляции аутофагии (примерно в 2 раза) вызывает совместное применение рапамицина (10 мг/кг) и трегалозы ($p < 0,01$) (Рис.5А). В данном случае можно говорить об аддитивном стимулирующем эффекте рапамицина и трегалозы. Подобная, однако, менее выраженная картина стимуляции аутофагии получена для экспрессии LC3-II в стриатуме (Рис.5Б). Достоверный рост получен только для совместного применения рапамицина и трегалозы ($p < 0,01$).

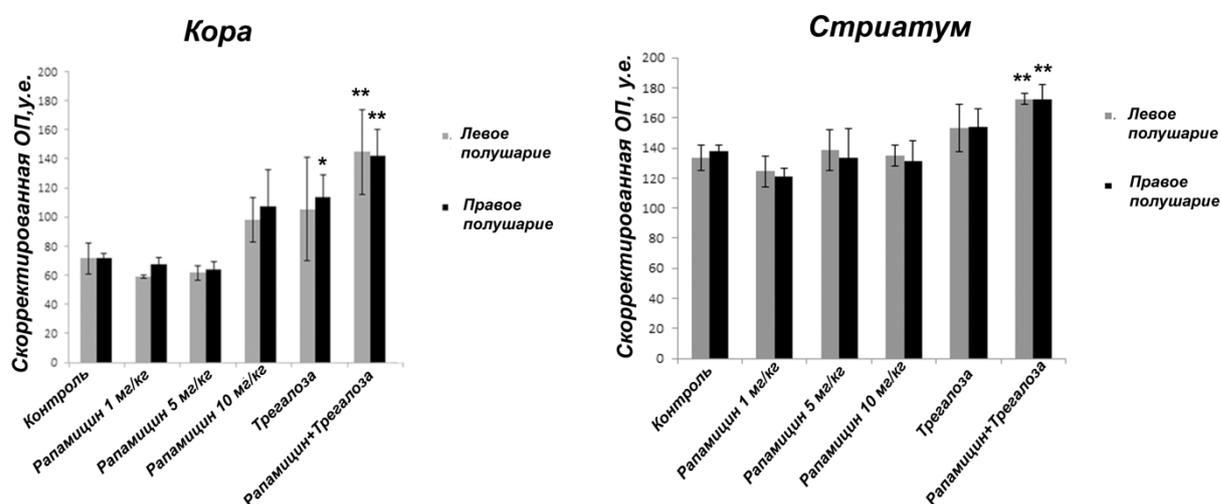


Рис.5. Эффект воздействия рапамицина (1, 5, 10мг/кг в день, 7 дней), трегалозы (2% в пит. воду, 7 дней) и их совместного применения на активность аутофагии, оцениваемой по экспрессии маркера LC3-II в коре и стриатуме у мышей C57Bl/6. N=3-4 в группе. Статистически значимые различия: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по сравнению с контрольными мышами.

Мы впервые применили к оценке активности аутофагии в мозге осмотический тест, характеризующий изменение популяционного состава лизосом/аутофаголизосом *in vitro*. В стриатуме достоверный 2-кратный рост показателя получен для трегалозы и еще выше для совместного действия рапамицина и трегалозы. Эти данные хорошо согласуются с ИГХ результатами по оценке экспрессии маркера LC3-II. В среднем мозге, включающем в себя чёрную субстанцию, значимый эффект отмечен только в группе с применением рапамицина (10 мг/кг) (Рис.6).

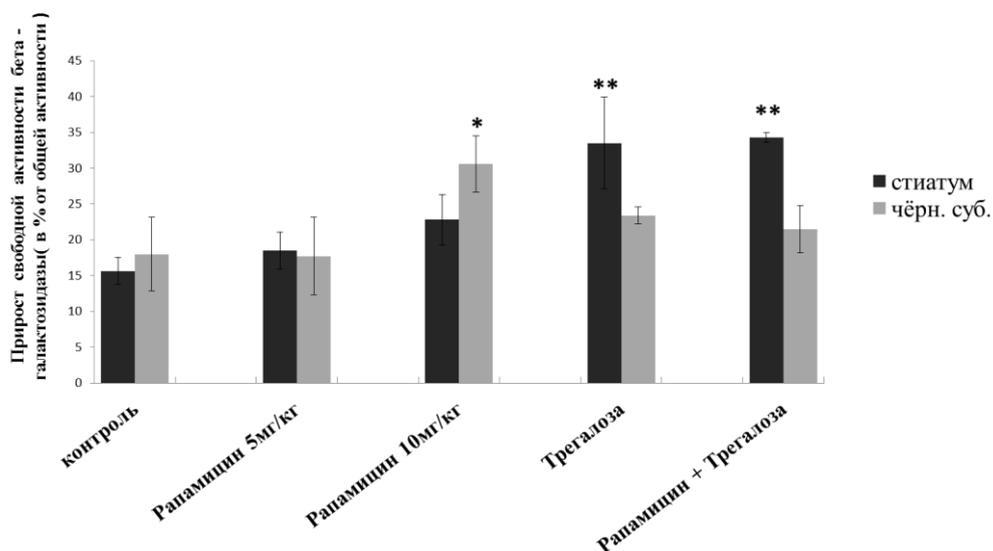


Рис.6. Осмотическая повреждаемость лизосом нейронов стриатума и среднего мозга при действии рапамицина (5мг/кг и 10мг/кг), трегалозы и их совместном применении у мышей линии C57Bl/6. Статистически значимые различия: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по сравнению с контролем. N=5-6 в группе.

3. Влияние индукторов аутофагии на активацию аутофагии в мозге у мышей с оверэкспрессией α -синуклеина и у мышей линии C57Bl/6 под действием МФТП.

Мы оценили влияние индукторов аутофагии рапамицина и трегалозы в разных областях мозга (кора, полосатое тело, чёрная субстанция) у трансгенной линии мышей с оверэкспрессией α -синуклеина (B6.Cg-Tg) и у мышей линии C57Bl/6, обработанных МФТП, с ослабленным нейровоспалением в «отложенном» режиме. Иммуногистохимическое исследование образцов мозга не выявило значимых межгрупповых различий по экспрессии маркера LC3-II у

мышей. По-видимому, эффект активации аутофагии индукторами постепенно ослабевает после прекращения воздействия (био-образцы для ИГХ были взяты через 10 дней после отмены индукторов аутофагии).

Значительные изменения экспрессии LC3-II обнаружены в нигростриарной системе у МФТП-индуцированных мышей при «остром» режиме активации аутофагии (Рис.7). Двухфакторный ANOVA показал значительное влияние группы ($F(5,12)=7,1$, $p < 0,01$) на уровни экспрессии LC3-II в стриатуме (Рис.7Б). В области чёрной субстанции, двухфакторный ANOVA показал значительное влияние группы ($F(5,11) = 43,25$, $p < 0,001$) на вышеуказанный параметр (Рис.7А).

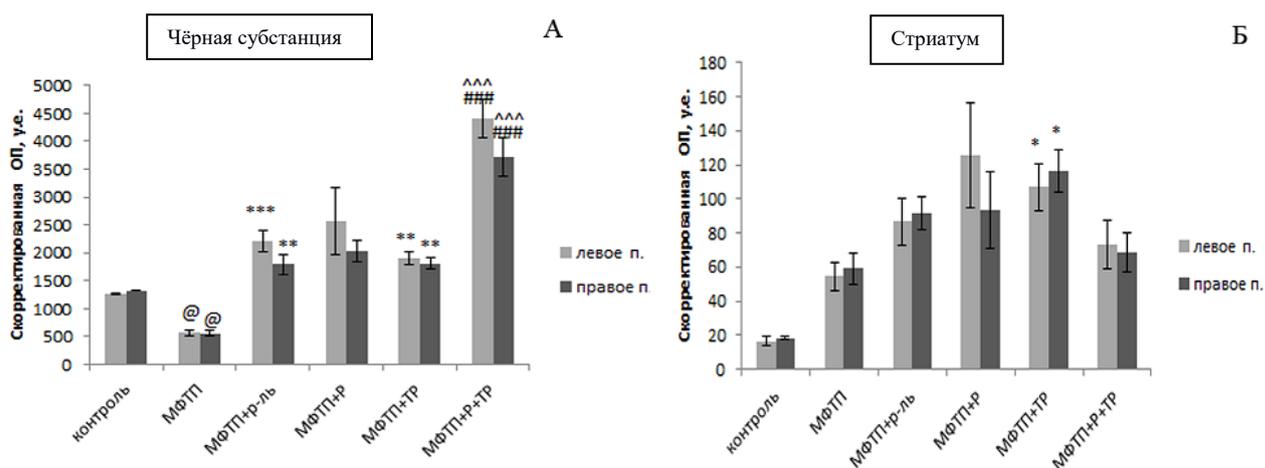


Рис.7. Воздействия рапамицина (10мг/кг/день внутривбрюшинно, 7 дней), трегалозы (2% в питьевой воде, 7 дней) или их комбинации на активность аутофагии, оцениваемой по уровню LC3-II в чёрной субстанции (А) или стриатуме (Б) в рамках МФТП-индуцированной модели БП у мышей. Статистически значимые различия: @ $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ по сравнению с группой, получавшей МФТП; ### $p < 0,001$ по сравнению с группой МФТП + р-ль; ^^^ $p < 0,001$ по сравнению с группой МФТП + ТР.

4. Влияние активации аутофагии в мозге индукторами аутофагии на нейрональные и поведенческие изменения у мышей, вызванные гиперэкспрессией α -синуклина или воздействием нейротоксина МФТП.

Несмотря на то, что эффект активации аутофагии с помощью индукторов постепенно ослабевает после прекращения воздействия, нейрональные и поведенческие изменения сохранялись как минимум в течение 10 дней после отмены препаратов и были высоко достоверны. Под действием индукторов аутофагии рапамицина и трегалозы, сниженная экспрессия ТГ в стриатуме трансгенных мышей достоверно увеличилась при всех вариантах терапии

(Рис.8). В чёрной субстанции также выявлены достоверные межгрупповые различия: восстановительный эффект рапамицина и трегалозы по отдельности был незначимым, тогда как совместное действие индукторов вызывало выраженный рост экспрессии ТГ, превышающий контрольные значения интактных трансгенных мышей ($p < 0,001$). Следует отметить, что применение ингибитора аутофагии, 3-метиладенина, достоверно уменьшало уровень ТГ в чёрной субстанции трансгенных мышей по сравнению с совместным воздействием рапамицина и трегалозы ($p < 0,01$), а экспрессия ТГ в стриатуме достоверно позитивно коррелировала с экспрессией LC3-II ($R_{35} = 0,568$, $p < 0,001$).

В рамках фармакологической модели БП, индуцированной МФТП, при «отложенном» режиме воздействия индукторов также выявлены выраженные межгрупповые различия в стриатуме ($F(11,35) = 8,9$, $p < 0,001$) и чёрной субстанции ($F(11,34) = 4,1$, $p < 0,01$). При воздействии нейротоксина МФТП наблюдается значительное снижение экспрессии ТГ в чёрной субстанции от уровня контрольных мышей ($p < 0,05$). Воздействие рапамицина в значительной мере (но не достоверно ($p > 0,05$)) восстанавливало уровень ТГ. Максимальный эффект достигался применением трегалозы ($p < 0,05$) и ее комбинации с рапамицином ($p < 0,05$) по сравнению с группой МФТП. В стриатуме тоже наблюдается снижение экспрессии ТГ под действием МФТП (до 57 %, ($p < 0,05$) по сравнению с контролем), при этом восстановительный эффект рапамицина ($p > 0,05$) и трегалозы ($p < 0,05$) по отдельности был слабым. Выраженный рост экспрессии ТГ в стриатуме, превышающий значения контрольных мышей, достигался совместным действием рапамицина и трегалозы ($p < 0,001$) (Рис.8).

В эксперименте, где применение индукторов началось через 2 дня после применения МФТП («острый» режим), под действием МФТП также происходило существенное снижение экспрессии ТГ в чёрной субстанции по сравнению с контролем ($p < 0,001$). По сравнению с этим уровнем экспрессия ТГ значительно восстанавливалась под влиянием рапамицина или трегалозы ($p < 0,01$), а максимальный эффект ($p < 0,001$) и полное восстановление до уровня контроля наблюдались при совместном применении этих препаратов. В стриатуме МФТП сильно снижает интенсивность флуоресценции этого маркера ($p < 0,01$), а трегалоза и ее комбинация с рапамицином эффективно восстанавливали уровень ТГ до контрольного уровня ($p < 0,001$) (Рис.9).

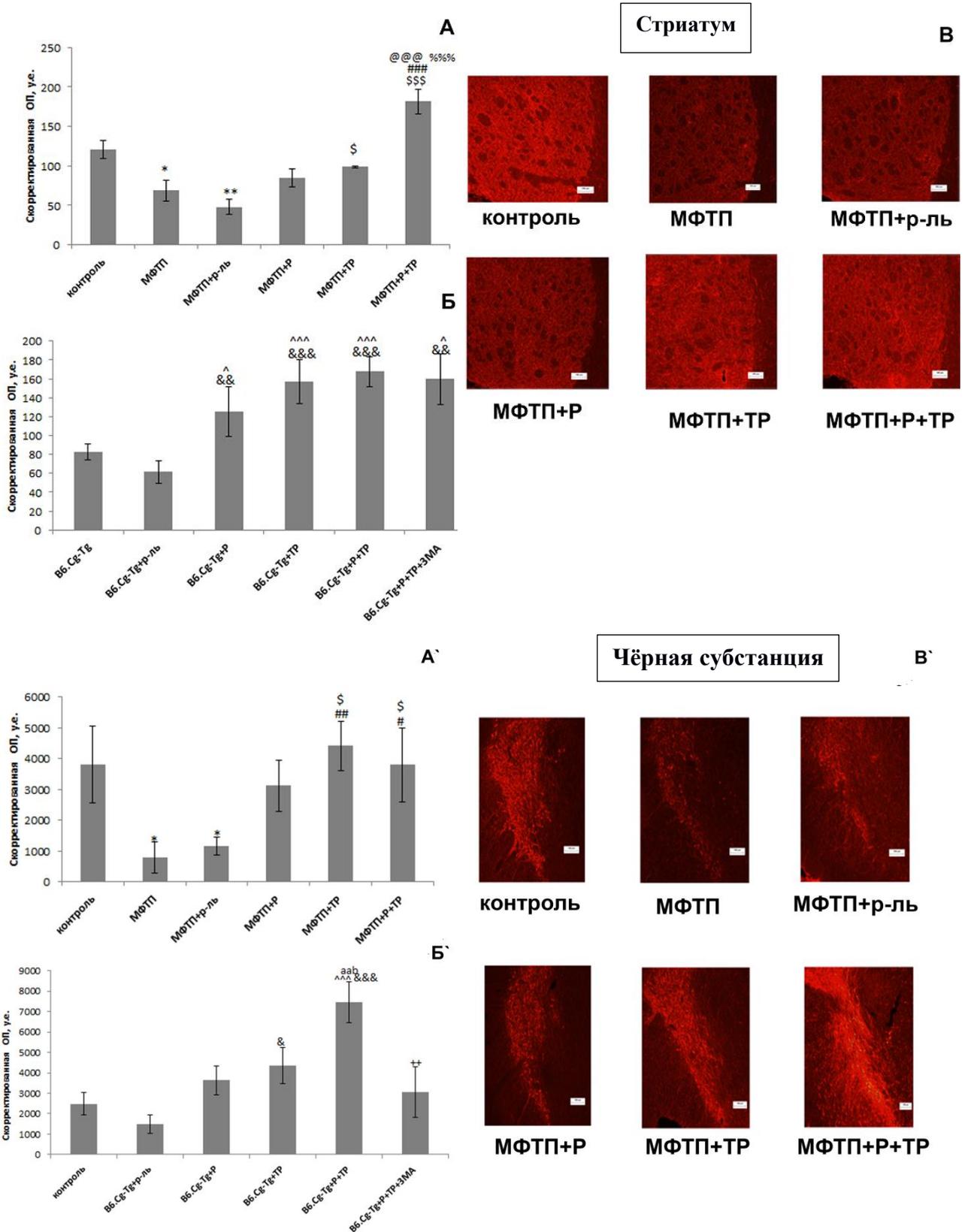


Рис.8. Влияние рапамицина, трегалозы и их совместного применения на экспрессию ТГ в стриатуме (А, Б) и в чёрной субстанции (А', Б') в рамках генетической модели БП с гиперэкспрессией А53Т-мутантного α -синуклеина человека (B6.Cg-Tg) (Б, Б') и МФТП-индуцированной модели БП с ослабленным нейровоспалением у мышей (А, А', В, В'). N=3-4 в группе. Увеличение на микрофотографиях (В, В') 200 \times (стриатум) и 100 \times (чёрная

субстанция), шкала 50 μm . Статистически значимые различия: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по сравнению с контролем; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ по сравнению с МФТП; \$ $p < 0,05$, \$\$\$ $p < 0,001$ по сравнению с МФТП+р-ль; @@@ $p < 0,001$ по сравнению с МФТП+Р; %%% $p < 0,001$ по сравнению с МФТП+ТР; ^ $p < 0,05$, ^^ $p < 0,01$, ^^ $p < 0,001$ по сравнению с В6.Сg-Tg; & $p < 0,05$, && $p < 0,01$, &&& $p < 0,001$ по сравнению с В6.Сg-Tg +р-ль; aa $p < 0,01$ по сравнению с В6.Сg-Tg +Р; b $p < 0,05$ по сравнению с МФТП+ТР; ++ $p < 0,01$ по сравнению с В6.Сg-Tg +Р+ТР.

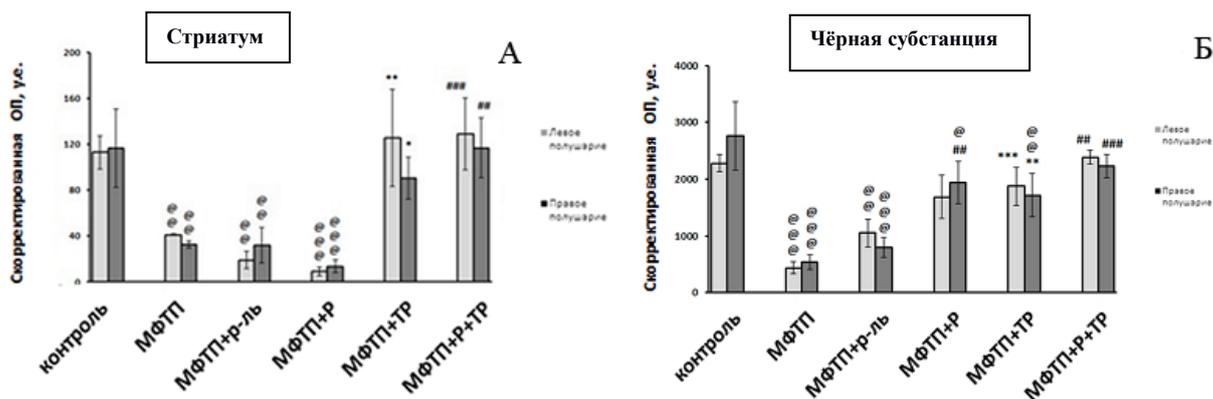


Рис.9. Влияние рапамицина, трегалозы или их комбинации в «остром» режиме (начиная с 3-го дня после применения МФТП) на экспрессию ТГ в стриатуме (А) и в чёрной субстанции (Б) в рамках модели БП, индуцированной МФТП, у мышей. N=3-4 в группе. Статистически значимые различия: @ $p < 0,05$, @@ $p < 0,01$, @@@ $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ по сравнению с группой, получавшей МФТП; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ по сравнению с группой МФТП+ р-ль.

Выявлено достоверное влияние применения индукторов аутофагии на экспрессию микроглиального маркера Iba-1, отражающего активацию аутофагии, у мышей с оверэкспрессией альфа-синуклеина в стриатуме ($F(5,12)=7,5$, $p < 0,01$) и в чёрной субстанции ($F(5,12)=12,7$, $p < 0,01$). Применение трегалозы и её совместное введение с рапамицином значительно восстановило подавленную микроглиальную функцию в стриатуме ($p < 0,01$) (Рис.10Б). В чёрной субстанции значимый эффект был только при совместном применении индукторов ($p < 0,01$) (Рис.10Г). Схожая картина наблюдается и в рамках МФТП-индуцированной модели с ослабленным нейровоспалением (через 31 день после интоксикации). У группы, обработанной МФТП, достоверно снижена активность микроглии в стриатуме ($p < 0,01$) по сравнению с контролем (С57В1/6) (Рис.10А). Выявлено достоверное влияние применения индукторов аутофагии в «отложенном» режиме на активацию микроглии в стриатуме ($F(5,12)=8,7$, $p < 0,001$). В чёрной субстанции влияние МФТП через 31 день после интоксикации уже менее заметен ($p > 0,05$), ровно как и восстановительный эффект индукторов (Рис.10В).

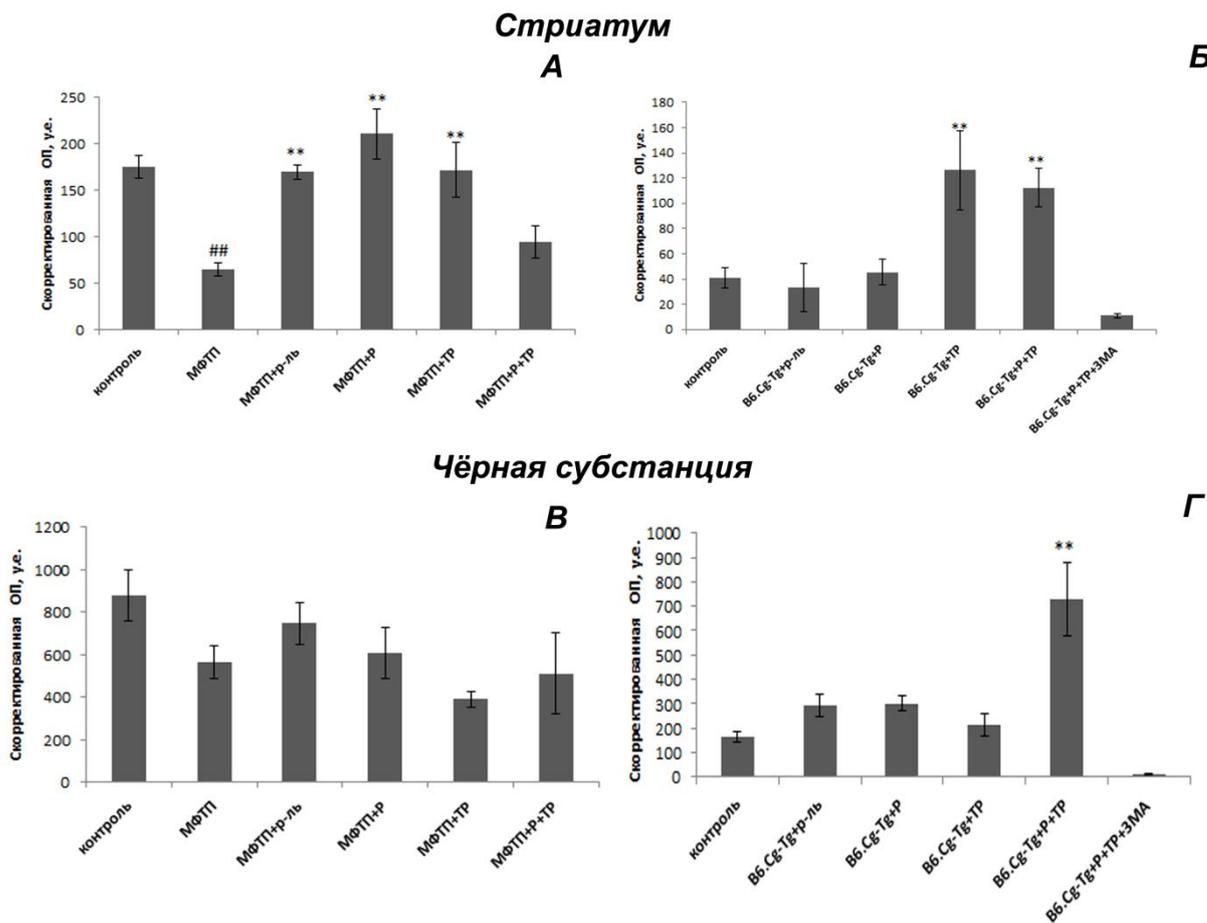


Рис.10. Влияние рапамицина, трегалозы и их совместного применения на экспрессию микроглиального маркера Iba-1, отражающего активацию микроглии, в стриатуме (А, Б) и в чёрной субстанции (В, Г) у трансгенных мышей с оверэкспрессией А53Т-мутантного α -синуклеина человека (В6.Сg-Тg) и в рамках МФТП-индуцированной модели БП с ослабленным нейровоспалением (через 31 дня после воздействия МФТП) у мышей. N=3-4 в группе. Статистически значимые различия: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ по сравнению с контролем (МФТП) или с контролем В6.Сg-Тg; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ по сравнению с контролем С57Вl/6. Сокращения: Р - рапамицин; ТР- трегалоза; р-ль – растворитель; ЗМА – 3-метиладенин.

На организменном уровне характерными изменениями при моделировании БП с помощью МФТП являются когнитивные нарушения, которые, в отличие от моторных дефицитов, сохраняются длительное время после интоксикации. В настоящей работе мы оценили влияние рапамицина и трегалозы на обучение и память у мышей после воздействия МФТП при выработке условного рефлекса в тесте пассивного избегания в «остром» и «отложенном» режимах.

По итогам результатов эксперимента в «остром» режиме показано значительное влияние группы ($F(5,30) = 4,1$, $p < 0,01$), обучения (повторные измерения) ($F(1,30) = 106,6$, $p < 0,001$) и взаимодействия этих факторов ($F(5,30) = 4,4$, $p < 0,01$) на латентный период захода в опасный отсек (Рис.11).

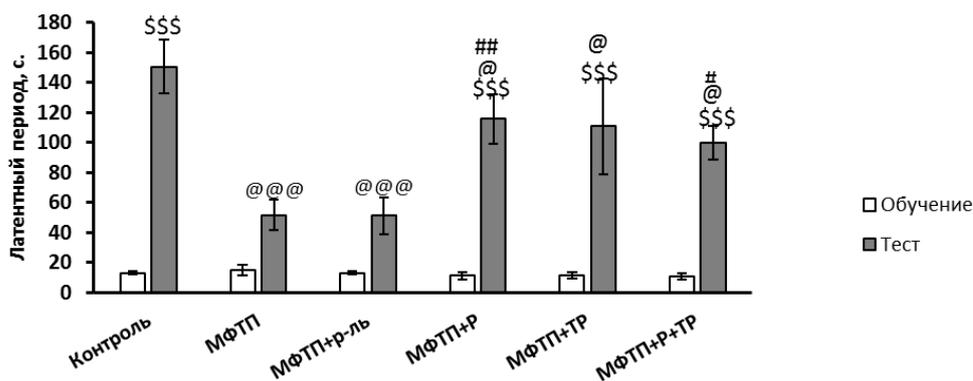


Рис.11. Влияние рапамицина, трегалозы и их совместного применения в «остром» режиме (начиная с 3-го дня после применения МФТП) на обучение и память при выработке условной реакции пассивного избегания в рамках МФТП-индуцированной модели БП у мышей. N=5-6 в группе. Статистически значимые различия: \$\$\$ $p < 0.001$ по сравнению с тренировочным днём; @ $p < 0.05$, @@ $p < 0.01$, @@@ $p < 0.05$ по сравнению с контролем; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ по сравнению с группой МФТП+ р-ль. Сокращения: Р - рапамицин; ТР- трегалоза; р-ль – растворитель.

При «отложенном» воздействии рапамицина и трегалозы в рамках МФТП-индуцированной модели БП с ослабленным нейровоспалением выявлено достоверное влияние факторов обучения ($F(1,20)=212,1$, $p < 0,001$), фармакологического воздействия ($F(5,20)=12,6$, $p < 0,001$) и взаимодействия факторов ($F(5,20)=13,2$, $p < 0,001$) на выработку условного рефлекса пассивного избегания (Рис.12). Несмотря на то, что после введения МФТП прошло много времени (более 20 дней), когнитивные нарушения у этих мышей сохранились и были четко выражены. Через сутки после обучения показано, что у мышей из групп «МФТП» и «МФТП + растворитель рапамицина» резко сокращалась длительность избегания опасного отсека ($p < 0,001$) по сравнению с контрольными мышами, что указывает на дефицит обучения и памяти страха, и согласуется с результатами в серии с применением индукторов аутофагии в «остром» режиме в рамках МФТП-индуцированной модели БП у мышей. Восстановление когнитивной функции найдено для всех терапевтических воздействий ($p < 0,001$). Однако, как и при «остром» режиме, полного

восстановления до контрольных значений не происходило.

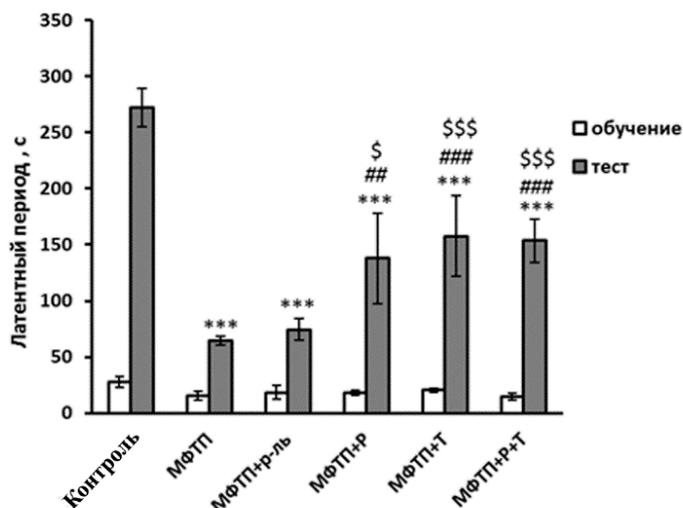


Рис.12. Влияние рапамицина, трегалозы и их совместного применения на обучение и память при выработке условной реакции пассивного избегания в рамках МФТП-индуцированной модели БП с ослабленным нейровоспалением у мышей N=5-6 в группе. Статистически значимые различия: *** - $p < 0,001$ по сравнению с интактными; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ по сравнению с МФТП; \$\$\$ $p < 0,001$ по сравнению с МФТП+ р-ль.

Результаты исследования когнитивной функции являются специфичными и не связаны с нарушением общей двигательной активности под действием МФТП.

Заключение

Получена ценная информация о роли аутофагии в ходе формирования нейродегенеративных заболеваний. В целом, выявлено, что модуляция активности аутофагии (подавление при оверэкспрессии альфа-синуклеина, с одной стороны, и активация с помощью индукторов аутофагии, с другой) в мозге у мышей оказывает существенное влияние на функционирование nigrostriарной системы мозга, микроглиальную функцию и поведение животных, отражающее когнитивную функцию (Рис.13).

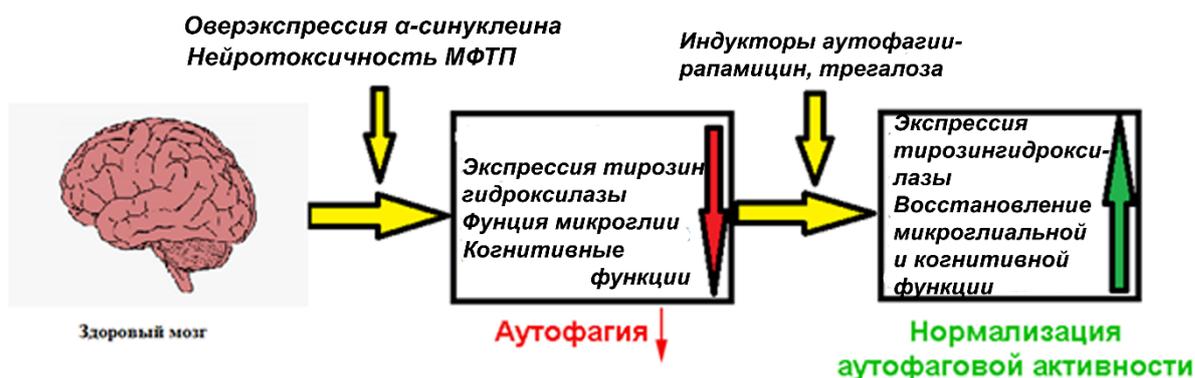


Рис.13. Влияние аутофаговой активности клеток мозга на функционирование nigrostriарной системы мозга, микроглиальную функцию и поведение животных, отражающее когнитивную функцию.

Выводы

1. У мышей трансгенной линии (B6.Cg-Tg(PrNp-SNCA*A53T)23MKLE/J) с оверэкспрессией мутантного человеческого α -синуклеина в раннем возрасте 5 мес. выявлено значительное снижение активности аутофагии в nigrostriарной системе, что сопровождается заметной дофаминергической и микроглиальной дисфункцией и поведенческими изменениями. Сниженная активность аутофагии может служить как один из первых признаков развития нейродегенеративных нарушений.
2. Показан аддитивный стимулирующий эффект индукторов рапамицина и трегалозы у мышей инбредной линии C57Bl/6 на активацию аутофагии во фронтальной коре и стриатуме мозга.
3. Выявлен высокий активирующий эффект трегалозы и её сочетания с рапамицином на экспрессию аутофагового маркера LC3-II в nigrostriарной системе у мышей с оверэкспрессией α -синуклеина и в рамках МФТП-индуцированной модели болезни Паркинсона. Влияние рапамицина на этот показатель было умеренным.
4. Функциональное восстановление нейронов nigrostriатума и показателей когнитивной функции под действием индукторов аутофагии отмечено для трегалозы и особенно её сочетания с рапамицином у мышей с оверэкспрессией α -синуклеина и в рамках МФТП-индуцированной модели болезни Паркинсона. Восстановительный эффект наблюдается и в отношении микроглиальной активности.

Список сокращений

БП - болезнь Паркинсона

ТГ – тирозин-гидроксилаза

МФТП - 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин

Р – рапамицин

ТР – трегалоза

mTOR – серин-треониновая киназа (мишень рапамицина)

LC3- ассоциированный с микротрубочками протеин лёгкие цепи 3

ИГХ- иммуногистохимия

TFEB – фактор транскрипции EB

PBS- фосфатно-солевой буфер

Список работ по теме диссертации

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Pupyshev A. B. Suppression of autophagy in the brain of transgenic mice with overexpression of A53T-mutant α -synuclein as an early event at synucleinopathy progression/ A. B. Pupyshev, T.A. Korolenko, **A.A. Akopyan**, T.G. Amstislavskaya, M.A. Tikhonova // *Neuroscience letters*. – 2018. – V. 672. – P. 140-144.
2. Pupyshev A. B. Therapeutic activation of autophagy by combined treatment with rapamycin and trehalose in a mouse MPTP-induced model of Parkinson's disease / A. B. Pupyshev, M.A. Tikhonova, **A.A. Akopyan**, M.V. Tenditnik, N.I. Dubrovina, T.A. Korolenko // *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. – 2019. – V. 177. – P. 1-11.
3. Пупышев А. Б. Восстановление паркинсоноподобных нарушений путём активации аутофагии через mTOR-зависимый и m-TOR-независимый механизмы в рамках фармакологической и трансгенной моделей болезни Паркинсона у мышей/ А. Б. Пупышев, М.В. Тендитник, М.В. Овсяюкова, **A.A. Акопян**, Н.И. Дубровина, М.А. Тихонова // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2021. – Т. 171. – №. 4. – С. 429-435.
4. Tikhonova M. A. Effects of grape polyphenols on the life span and neuroinflammatory alterations related to neurodegenerative parkinson disease-like disturbances in mice/ M. A. Tikhonova, N.G. Tikhonova, M. V. Tenditnik, M.V. Ovsyukova, **A.A. Akopyan**, N.I. Dubrovina, T.G. Amstislavskaya, E.K. Khlestkina // *Molecules*. – 2020. – V. 25. – №. 22. – Article 5339.
5. Korolenko T. A. Early Parkinson's Disease-Like Pathology in a Transgenic Mouse Model Involves a Decreased Cst3 mRNA Expression But Not Neuroinflammatory Response in the Brain/ T. A. Korolenko, Shintyapina A.B., Belichenko V.M., Pupyshev A.B., **Akopyan A.A.**, L.A. Fedoseeva, G.S. Russkikh, V.A. Vavilin, M. V. Tenditnik, C.-L. Lin, T.G. Amstislavskaya, M. A. Tikhonova // *Medical University*. – 2020. – V. 3. – №. 2. – P. 66-78.
6. Tikhonova M. A. Evaluating the effects of grain of isogenic wheat lines differing in the content of anthocyanins in mouse models of neurodegenerative disorders/ M. A. Tikhonova, O. Y. Shoeva, M. V. Tenditnik, M.V. Ovsyukova, **A.A. Akopyan**, N.I. Dubrovina, T.G. Amstislavskaya, E.K. Khlestkina // *Nutrients*. – 2020. – V. 12. – №. 12. – Article 3877.
7. Pupyshev A. B. Disaccharide trehalose in experimental therapies for neurodegenerative disorders: Molecular targets and translational potential/ A.B. Pupyshev, T.P. Klyushnik, **A.A. Akopyan**, S.K. Singh, M.A. Tikhonova // *Pharmacol. Res*. – 2022. – V. 183. – Article 106373.

Тезисы:

1. Амстиславская Т.Г., Тихонова М.А., Тендитник М.В., **Акопян А.А.** «Когнитивные и нейротрофические нарушения у мышей трансгенной модели болезни Паркинсона с оверэкспрессией альфа синуклеина». В сборнике: Современные проблемы биологической психиатрии и наркологии, IV Российской конференции с международным участием Томск. 2018. С.14-15.
2. **Акопян А.А.**, Pupyshev A.B., Tikhonova M. A. Possibilities of enhancing the neuroprotective effect of autophagy activation in the brain by stimulation of an mTOR- independent pathway of its regulation in a transgenic mouse model of Parkinson`s disease. В сборнике: Bioinformatics of genome regulation and structure/systems biology (BGRS/SB-2020). The twelfth international multiconference abstracts. 2020. С.270.
3. Pupyshev A.B., **Акопян А.А.**, Tenditnik M.V., Dubrovina N.I., Ovsiyukova M.V., Korolenko T.A., Tikhonova M. A. Positive effect of joint activation of mTOR – dependent and mTOR- independent pathways of autophagy in the treatment of two experimental models of neurodegeneration. В сборнике: Bioinformatics of genome regulation and structure/systems biology (BGRS/SB-2020).The twelfth international multiconference abstracts. 2020. С.287-288.
4. Пупышев А.Б., **Акопян А.А.**, Короленко Т.А. Эффекты индукции аутофагии в мозге в рамках нейротоксической модели болезни Паркинсона у мышей. Современные проблемы биологической психиатрии и наркологии. В сборнике: IV Российской конференции с международным участием. 2018. С.126-127.
5. Korolenko T.A., Pupyshev A.B., **Акопян А.А.**, Tikhonova M. A. Possibilities and limitations of autophagy modulation in correction of neurodegeneration. В сборнике: Belyaev conference: A triumphant event in commemoration of the centenary of the birth of Academician Dmitri Belyaev. 2017. С.239.
6. Pupyshev A.B., Korolenko T.A., **Акопян А.А.**, Tenditnik M.V., Tikhonova M. A. Suppressed autophagy in mouse model of neurodegeneration and autophagy stimulation in brain by rapamycin and trehalose. В сборнике: 21st ESGLD WORKSHOP AND GRADUATE COURSE. 2017. С.73.
7. **Акопян А.А.**, Pupyshev A.B., Dubrovina N.I., Tikhonova M.A. Therapy of Parkinson`s disease-like deficits with rapamycin and trehalose in murine models with attenuated neuroinflammation. В сборнике: Animal genetics, bioinformatics and systems computational biology (BGRS/SB-2022). 13th International Multiconference abstracts. 2022. С.727.