

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
НЕЙРОНАУК И МЕДИЦИНЫ»**

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)

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Доктор биологических наук

М.А. Тихонова

Новосибирск 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1. Аутофагия: общие представления	15
1.1.1. Шаперон-опосредованная аутофагия.....	17
1.1.2. Макроаутофагия.....	18
1.2. Роль аутофагии в ЦНС	20
1.3. Аутофагия и старение.....	23
1.4. Аутофагия и нейродегенеративные изменения.....	25
1.5. m-TOR зависимые и m-TOR независимые сигнальные пути аутофагии..	27
1.6. Влияние аутофагии на головной мозг и поведение.....	33
1.7. Влияние α - синуклеина на аутофагию.....	34
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	38
2.1. Дизайн эксперимента.....	38
2.2. Иммуногистохимический анализ (ИГХ).....	40
2.3. Лизосомальный осмотический тест.....	42
2.4. Поведенческие тесты.....	43
2.5. Статистический анализ результатов.....	46
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	48
3.1. Влияние оверэкспрессии α -синуклеина на активность аутофагии, нейрональные и поведенческие показатели у мышей.....	48
3.2. Оценка уровня активации аутофагии в различных структурах головного мозга с помощью индукторов аутофагии рапамицина и трегалозы у контрольных мышей линии C57BL/6.....	61
3.3. Влияние индукторов аутофагии на активацию аутофагии в мозге у мышей с оверэкспрессией α -синуклеина и под действием МФТП.....	65

3.4. Влияние активации аутофагии в мозге индукторами аутофагии на нейрональные и поведенческие изменения у мышей, вызванные оверэкспрессией α -синуклеина или воздействием нейротоксина МФТП.....	70
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	85
Выводы.....	97
Список сокращений.....	98
Список литературы.....	99

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования.

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. Ослабление собственного механизма контроля качества белка и органелл вследствие физиологического старения или болезни рассматривается как одна из основных причин возникновения нейродегенеративных изменений в мозге. Наряду с убиквитин-протеасомной системой аутофагия является важнейшим механизмом защиты клетки от токсических белков и единственным средством удаления повреждённых органелл (Pohl, Dikić, 2019). Недостаточность аутофагии может быть одной из ключевых причин развития нейродегенерации (Button et al., 2015; Gomez-Vergilio et al., 2022).

Аутофагия представляет собой катаболический процесс, который разрушает цитоплазматические компоненты, такие как белки, липиды, органеллы, путем их транспортировки в лизосомы, благодаря которому аутофагия является механизмом выживания и обновления клеток (Parzych et al., 2014). Повторное использование мономерных продуктов деградации сегрегированного материала служит осуществлению репаративной/реконструктивной функции аутофагии. Аутофагия может протекать как базальная аутофагия или индуцироваться в ответ на голодание, гипоксию, инвазию патогенов и другие стресс-факторы (Mizushima et al., 2004; Li et al., 2021).

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 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 патологических 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 относятся трегалоза (Sarkar et al., 2007) и некоторые другие соединения (соли лития, карбамазепин). Трегалоза привлекает особое внимание, поскольку вызывает аутофагию на различных моделях нейродегенерации *in vitro* и *in vivo*. На анимальных моделях БП трегалоза значительно ослабляет дегенерацию дофаминергических нейронов черной субстанции и уменьшает двигательный дефицит, вызванный накоплением α -синуклеина (Wu et al., 2015; He et al., 2016). 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 nigростриарной 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 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 морфофункциональных и поведенческих изменений 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 nigростриарной 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 дефицитов 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 nigростриатума *in vivo*.

Теоретическая и практическая значимость.

Результаты проведенного исследования помогут расширить современные представления о вовлечении аутофагии в мозге 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.

Методология и методы исследования

Дизайн экспериментов.

Для решения поставленных задач использовали мышей инбредной линии C57Bl/6 и трансгенной линии B6.Cg-Tg(PrNp-SNCA*A53T)23MKLE/J молодого возраста (5 мес.)

Мыши линии B6.Cg-Tg(PrNp-SNCA*A53T)23MKLE/J характеризуются гиперэкспрессией α -синуклеина, прогрессирующей с возрастом, и паркинсоноподобными изменениями в мозге и поведении.

Создание экспериментальной фармакологической модели нейродегенерации осуществлялось с помощью внутрибрюшинного введения мышам линии C57Bl/6 нейротоксина 1-метил-4-фенил-1,2,3,7-тетрагидропиридина (МФТП), вызывающего селективное повреждение дофаминовых нейронов в нигростриарных отделах мозга, страдающих при БП. Модель не воспроизводит прогрессирующую природу нейродегенеративных расстройств, тем не менее, позволяет исследовать фундаментальные механизмы, лежащие в их основе.

Для изучения влияния усиления активности аутофагии в мозге на нейродегенеративные изменения в мозге и поведение у мышей использовали два типа индукторов аутофагии, рапамицин (mTOR-зависимый путь активации) и трегалозу (mTOR-независимый путь активации), по отдельности и в комбинации. Индукторы применяли в «остром» (через 2 дня после воздействия МФТП) и «отложенном» (через неделю после воздействия МФТП) режимах.

У животных анализировали материалы различных отделов мозга – чёрную субстанцию, стриатум, фронтальную кору, гиппокамп.

Оценку морфофункциональных изменений в образцах мозга проводили с помощью иммуногистохимического (ИГХ) метода, а также биохимического теста, регистрирующего активацию аутофагии по осмотической повреждаемости лизосом (Deter et al., 1967).

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

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.

Степень достоверности результатов

Экспериментальные данные получены с использованием современных методических подходов и подходящих валидных моделей на

экспериментальных животных с помощью высокоинформативных методов исследования (иммуногистохимия, биохимический анализ, 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.

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.

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.

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Pupyshov 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. Pupyshov, T.A. Korolenko, **A.A. Akopyan**, T.G. Amstislavskaya, M.A. Tikhonova // Neuroscience letters. – 2018. – V. 672. – P. 140-144. (материал представлен в разделе **3.1.**).
2. Pupyshov 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. Pupyshov, 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. (материал представлен в разделах **3.2., 3.3, 3.4.**).
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. Овсюкова, **А.А. Акопян**, Н.И. Дубровина, М.А. Тихонова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2021. – Т. 171. – №. 4. – С. 429-435. (материал представлен в разделах **3.3, 3.4.**).
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. (материал частично представлен в разделе **3.1.**).
 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. (материал частично представлен в разделе **3.1.**).
 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. (материал частично представлен в разделе **3.1.**).
 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. (материал частично представлен в разделе **1.5.**).

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. (материал представлен в разделе **3.1.**).
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. (материал представлен в разделах **3.3, 3.4.**).
3. Pupyshev A.B., **Акопян А.А.**, Tenditnik M.V., Dubrovina N.I., Ovsyukova 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. (материал частично представлен в разделах **3.3, 3.4.**).
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. (материал представлен в разделах **3.3, 3.4.**).
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. (материал частично представлен в разделах **3.3, 3.4.**).

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. (материал частично представлен в разделах **3.3, 3.4.**).
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. (материал представлен в разделах **3.3, 3.4.**).

Структура и объем диссертации

Диссертация содержит введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, выводы и список процитированной литературы. 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.

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Аутофагия: общие представления

Аутофагия (в переводе с греч.– «самопоедание»)- это катаболический процесс внутриклеточной деградации полимерного клеточного материала и рециркуляции образующихся мономеров. Аутофагия является высококонсервативным и высокорегулируемым процессом, распространенным у всех эукариот. Благодаря сегрегации и деградации повреждённых цитоплазматических структур, белков и макромолекул, а также благодаря использованию продуктов деградации, аутофагия обновляет клетки, что играет важную роль в выживании и поддержании гомеостаза (Parzych et al., 2014). Этот процесс был впервые описан Кристианом де Дювом более 40 лет назад, но в последние годы научный мир «заново открыл» аутофагию. Важность аутофагии хорошо изучена у млекопитающих, но многие фундаментальные прорывы в понимании того, как аутофагия регулируется и осуществляется на молекулярном уровне, были сделаны у дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*). В частности, с помощью генетического скрининга у дрожжей идентифицировано и изучено 32 различных гена, связанных с аутофагией (Atg), что открыло новый этап в исследовании молекулярных механизмов аутофагии (Glick et al., 2010).

Аутофагию функционально разделяют на неселективную (массовую), связанную с одновременной сегрегацией различных компонентов цитоплазмы, и селективную, направленную на удаление определенных органелл или структур, таких как митохондрии, пероксисомы, рибосомы, эндоплазматический ретикулум, лизосомы, ядра, протеасомы и липидные капли. Эта способность делает селективную аутофагию ключевым процессом

в поддержании клеточного гомеостаза, нарушение которого может привести к нейродегенеративным заболеваниям, онкогенезу, метаболическим нарушениям и т.д. (Li et al. 2021).

В целом, аутофагия подразделяется на три типа: макроаутофагия, микроаутофагия и шаперон-опосредованная аутофагия (ШОА) (Рис.1). Ведущую роль в клетке играет макроаутофагия (в дальнейшем по умолчанию просто аутофагия).

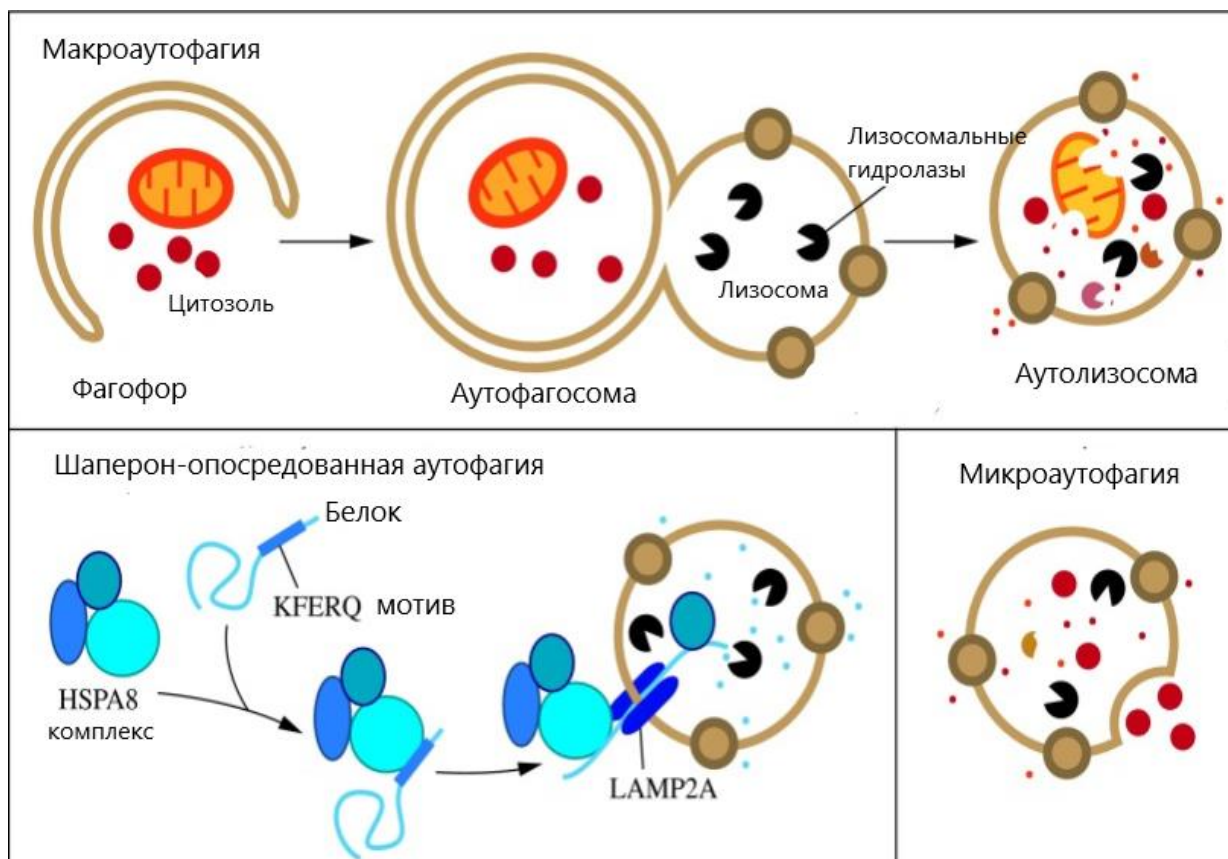


Рис.1. Три типа аутофагии у млекопитающих по (Parzych et al., 2014).

Среди типов аутофагии микроаутофагия не имеет большого практического значения. Это сегрегация цитозольного содержимого посредством инвагинаций в мембране лизосомы с последующей деградацией материала лизосомными ферментами. Молекулярный механизм микроаутофагии все еще плохо изучен (Parzych et al., 2014).

1.1.1. Шаперон-опосредованная аутофагия (ШОА)

Более распространенный тип аутофагии, который до сих пор был описан только в клетках млекопитающих, — это ШОА. В отличие от микроаутофагии и макроаутофагии, которые могут неспецифически поглощать цитоплазму, ШОА высоко специфична. Для активации ШОА требуется презентация мотива-мишени у белка, а именно, пентапептида, включающего последовательность аминокислот KFERQ, который обнажается при аномальном свертывании белка (Kaushik et al. 2008). За распознавание мотива KFERQ отвечает белок теплового шока 70 кДа 8 (HSPA8/HSC70), действующий совместно с рядом ко-шаперонов (Kiffin et al., 2004; Parzych et al., 2014). Образовавшийся комплекс связывается с лизосоמו-ассоциированным мембранным белком 2А (LAMP-2А), который в процессе мультимеризации осуществляет перенос белка-субстрата в просвет лизосомы. Внутри лизосомы субстрат подвергается ферментативному расщеплению. ШОА деградирует широкий спектр белков-субстратов, включая некоторые гликолитические ферменты, факторы транскрипции и их ингибиторы, белки, связывающие кальций и липиды, субъединицы протеасом и белки, участвующие в везикулярном транспорте. Некоторые субстраты ШОА, в частности, мутантные формы α -синуклеина A53T и A30P, блокируя канал переноса белков LAMP-2А, ингибируют активацию данного пути. Помимо существования достаточно редких мутантных форм α -синуклеина, пептид подвергается химической модификации посредством нековалентных взаимодействий белка с дофаминохромом (окисленном дофамином, необходимом для синтеза нейромеланина в чёрной субстанции), либо посредством посттрансляционных модификаций, к примеру, фосфорилированием. Модифицированный α -синуклеин гораздо менее эффективно утилизируется системой ШОА, что может объяснять поражение чёрной субстанции при БП и других синуклеинопатиях (Martinez-Vicente et al., 2013).

1.1.2 Макроаутофагия

Макроаутофагия, чаще всего неселективная, обеспечивает основной обмен долгоживущих белков в клетке. Но сегрегация цитоплазмы в аутофагосомы может протекать и избирательно. Различают аутофагию митохондрий (митофагия), эндоплазматического ретикулула (ретикулофагия), пероксисом (пексофагия), агресом (агрефагия) и т.д. Макроаутофагия состоит в сегрегации цитоплазматического материала двойной мембранной в форме чаши (стадия фагофоры) (Рис.2А). После того, как фагофора нарастает и ее края смыкаются, образующаяся везикула трансформируется в аутофагосому. Аутофагосомы затем сливаются с лизосомами, что приводит к деградации содержимого аутофагосом. Эта последовательность событий регулируется группой белков, кодируемых генами, связанными с аутофагией (ATG) (Karabiyik et al., 2017). По современным понятиям, макроаутофагия делится на три основных этапа: инициация, рост и созревание (Рис.2А).

Инициация и рост мембраны аутофагосомы (Рис.2Б) управляется пятью комплексами: комплексом ULK 1/2 (который состоит из ULK1 / 2 – mAtg13 – FIP200 – Atg101); PI3K Vps34 класса III (который состоит из Vps34 – Vps15 – Beclin1 – Atg14L / Barkor); mAtg9 и связанный с ним механизм; и продукты двух убиквитин-подобных систем конъюгации, Atg12-Atg5:Atg16L и гомологов Atg8 млекопитающих, конъюгированных с фосфатидилэтаноламином (Johnson et al., 2012).

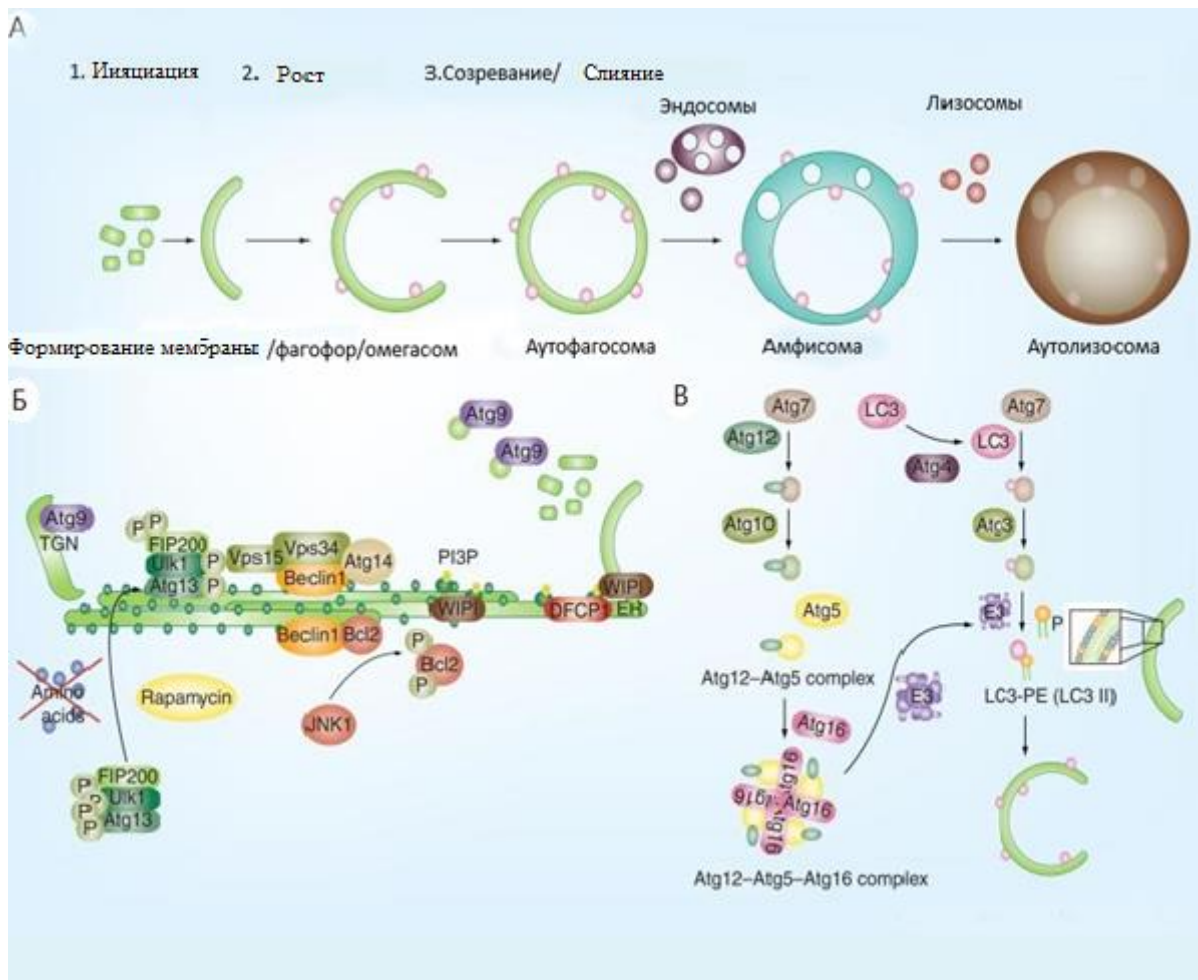


Рис.2. Формирование аутофагосомы по Johnson et al., 2012

Инициирование и рост мембраны аутофагосомы зависит от формирования и активности этих комплексов. В частности, комплекс ULK1 / 2 и комплекс PI3K I Vps34 класса III в ответ на ингибирование mTORC1 посредством рапамицина или отсутствия аминокислот фосфорилируются и комплекс ULK1 / 2 может перемещаться в эндоплазматический ретикулум. Комплекс 1 Vps34 / PI3K, образующийся посредством ассоциации с Beclin 1 и Atg14, управляет образованием PI3P. PI3P привлекает два эффекторных белка WIPI и DFCEP1, первый из которых, необходим для инициации аутофагосомы. На рисунке 2 показано инициирование аутофагосомы, происходящее на эндоплазматическом ретикулуме, хотя есть и вклад Atg9, который обнаруживается в везикулах, происходящих из комплекса Гольджи. Другими источниками мембран, способствующими биогенезу аутофагосом, может быть внешняя мембрана

митохондрий и плазматическая мембрана. Две убиквитиноподобные реакции конъюгации макроаутофагии представлены на Рис.2В. Первая реакция конъюгации приводит к сшивке белков Atg12-Atg5 с образованием тетрамерного комплекса с Atg16L. Atg12-Atg5-Atg16 действует как предполагаемая E3-подобная лигаза для конъюгации LC3 с фосфатидилэтаноламином. Комплекс ULK1/2 является стабильным комплексом, и инициация макроаутофагии регулируется состоянием фосфорилирования ULK1 / 2 и, в свою очередь, mAtg13 и FIP200. Изменение фосфорилирования этого комплекса - это то, что в конечном итоге приводит к созданию изолирующей мембраны. После завершения формирования мембраны комплекс Atg12-Atg5: Atg16L покидает внешнюю мембрану, а аутофагосома затем завершает созревание, сливается с лизосомами, доставляя свой «груз» для действия лизосомных ферментов (Johnson et al., 2012).

1.2 Роль аутофагии в ЦНС

Хотя большая часть работ, характеризующих основы аутофагии, была выполнена на дрожжах и мелких неполяризованных клетках млекопитающих, совсем недавно начали понимать механизмы аутофагии в нейронах, где она играет решающую роль в процессах контроля качества белка и органелл. Нейроны как постмитотические клетки не могут ослабить эффект накопления токсичных молекул или поврежденных органелл посредством клеточного деления и для выживания в основном справляются базовыми уровнями аутофагии. Как формирование нервной системы, так и долгосрочное поддержание жизнеспособности нейронов требуют эффективного удаления появляющихся агрегированных белков и состарившихся или дефектных органелл. Генетические и клеточные исследования показывают, что дефекты обмена белков и органелл тесно связаны с клеточным стрессом, дегенерацией и гибелью клеток.

Специфическая делеция основных генов аутофагии, таких как *ATG7* или *ATG5*, в клетках нейрональной линии вызывает образование цитоплазматических включений и нейродегенерацию в отсутствие какого-либо другого патологического события (Plaza-Zabala et al., 2017). Нейроны обычно окончательно дифференцируются очень рано, почти всегда во время эмбриогенеза, и должны функционировать на протяжении всей жизни организма. Хотя существуют некоторые способности нейронов регенерировать аксоны и замещать погибающие нейроны в зависимости от вида, возраста, типа нейронов и других факторов, большинство организмов, по-видимому, не способны заменять каждый нейрон на протяжении всей жизни организма. Следовательно, нейроны должны надежно справляться со стрессами, воздействующими на удаленные компартменты аксонов на протяжении всей жизни организма, утилизируя агрегированные и/или поврежденные белки и органеллы. Аутофагия может выполнять и выполняет эту функцию в каждом нейронном компартменте, теле (соме) или нейритах нейрона (Stavoe et al., 2019). Таким образом, преобладающие данные указывает на то, что аутофагия в ЦНС играет важную роль в обеспечении целостности и выживания нейронов.

Ранние данные об аутофагии в нейронах появились в 60-х и 70-х годах, задолго до того, как была установлена молекулярная основа аутофагии. Первоначальные электронно-микроскопические (ЭМ) исследования наблюдали увеличение аутофагосомоподобных органелл в соме и окончаниях аксонов, образующихся при аксотомии (Dixon, 1967; Matthews and Raisman, 1972). В другом исследовании (Bunge, 1973) использовали ЭМ для картирования ультраструктурных характеристик каждого компартмента культивируемого симпатического нейрона от кончика аксона до сомы. Множественные аутофаговые структуры были обнаружены как в конце аксона, так и вдоль проводящей части. Кроме того, молодые аутофаговые структуры оказались продолжением гладкого эндоплазматического ретикулума (ГЭР), по-видимому, они произошли от

ГЭР, видимого в конце аксона. Однако, долгое время без маркировки этих структур на аутофагосомные маркеры их идентичность оставалась неподтвержденной. Технологические достижения (Mizushima et al., 2011; Weidberg et al., 2011) теперь позволяют отслеживать этот процесс в реальном времени в живых клетках. За аутофагией легко следить с помощью GFP-меченого LC3, который является хорошо охарактеризованным маркером аутофагосом (Kabeya et al., 2000; Mizushima et al., 2004). Недавний анализ визуализации живых клеток показал, что образование аутофагосом в первичных нейронах является конститутивным процессом, более выраженным в дистальных отделах аксона. О биогенезе аутофагосом свидетельствует появление GFP-LC3-позитивных точек, которые постепенно вырастают в замкнутые структуры ~800 нм в диаметре (Maday et al., 2012; Maday and Holzbaaur, 2014). Формирование аутофагосом в дистальном аксоне происходит посредством упорядоченной сборки белков Atg (связанных с аутофагией) (Mizushima et al., 2011; Weidberg et al., 2011), направляемых из эндоплазматического ретикулума (Maday and Holzbaaur, 2014). Эти результаты согласуются с ранними электроно-микроскопическими исследованиями, в которых сообщалось, что мембраны аутофагосом непрерывны с ГЭР (Bunge, 1973). В то время как основной механизм, необходимый для образования аутофагосом, сохраняется у дрожжей и мелких менее поляризованных клеток млекопитающих, аутофагия в нейронах отличается благодаря пространственной регуляции биогенеза аутофагосом вдоль аксона (Maday, 2016).

Развитие микроскопии живых клеток позволило напрямую визуализировать движение органелл вдоль аксона, сначала с помощью фазово-контрастных подходов, а затем с использованием важных красителей или меток, специфичных для органелл, визуализируемых с помощью флуоресцентной микроскопии. Знаменательная работа Peter Hollenbeck охарактеризовала эндосомную подвижность в аксонах культивируемых эмбриональных периферических нейронов и обнаружила доказательства

ретроградной подвижности, означающей движение от окончания аксона обратно к соме, с ростом закисления органелл (Stavoe et al., 2018). После начального формирования и по мере прохождения через аксон к соме аутофагосомы встречаются и сливаются с поздними эндосомами и лизосомами, что приводит к закислению внутренней среды и, в конечном счете, к формированию аутолизосом, способным к деградации материала (Madau et al., 2012). Хотя лизосомы найдены и в аксоне, им не хватает полного набора ферментов деградации, обнаруженных в соматических лизосомах (Gowrishankar et al., 2015; Cheng et al., 2018). Вполне вероятно, что поскольку аутофагосома транспортируется ретроградно вдоль аксона, она может сливаться с такими более полноценными лизосомами. В поддержку этой возможности достаточно блокировать ретроградный перенос аутофагосом, чтобы заблокировать закисление их среды и деградацию поглощенного материала (Fu et al., 2014; Wong and Holzbaur, 2014). Недавние исследования свидетельствуют о том, что событие слияния с участием ретроградного транспорта осуществляется путем рекрутирования молекулярного «двигателя» микротрубочек динеина (Cheng et al., 2015). Ретроградный транспорт аутофагосом также индуцируется привлечением каркасных белков JIP1 и хантингтина, которые способствуют подвижности, основанной на динеине (Fu et al., 2014; Wong and Holzbaur, 2014).

1.3 Аутофагия и старение

Старение связано со многими неблагоприятными изменениями на клеточном уровне, включая ослабление протеостаза, изменения метаболизма питательных веществ, повреждение органелл и митохондрий, клеточное старение, истощение стволовых клеток и т.д. (López-Otín et al., 2013), что может иметь губительные последствия для здоровья. Ключевыми защитными механизмами в этом отношении являются системы очистки

клеток. Почти у всех стареющих организмов наблюдается постепенное снижение активности как убиквитин-протеасомной системы, так и аутофагии, что, по-видимому, играет важную роль как в физиологическом старении, так и в развитии возрастных расстройств (Nieto-Torres et al., 2021). Все признаки старения взаимосвязаны и многие из них могут возникать, по крайней мере частично, из-за ослабления базальной аутофагии и/или нарушения потока аутофагии под действием клеточного стресса (Rubinsztein et al., 2011). Следовательно функции аутофагии выходят за рамки поддержания протеостаза. Этот основной клеточный процесс также важен для поддержания клеточной энергетики, клеточного ответа на стресс, защиты от патогенов и т.д. (Levine, Klionsky, 2017). Несмотря на то, что данные, оценивающие роль аутофагии в физиологическом старении мозга только начинают появляться, многочисленные исследования на грызунах указывают на то, что аутофагия снижается с возрастом, и это прогрессивное снижение может играть причинную роль в функциональном ухудшении биологических систем (Tan et al., 2013). Например, мыши, несущие специфические делеции в *ATG5* и *ATG7*, показывают спонтанную и ускоренную нейродегенерацию, а мозг старых грызунов демонстрирует повышенную активность *MTORC1* вместе со снижением уровня белков *ATG*, что соответствует снижению аутофаговой функции. Клинические исследования показывают, что в мозге человека с возрастом наблюдается подавление генов аутофагии, включая *ATG5*, *ATG7* и *BECN1* (Lipinski et al., 2010). Все эти результаты свидетельствуют о том, что среди защитных путей аутофагия является центральным механизмом поддержания гомеостаза клеток и организма (Hansen et al., 2018; López-Otín and Kroemer, 2021). Следовательно, механизм аутофагии и пути, регулирующие аутофагию, были идентифицированы как модуляторы долголетия, и что нарушение регуляции аутофагии является основным фактором в развитии многих возрастных заболеваний (Hansen et al., 2018; Nieto-Torres et al., 2021).

1.4 Аутофагия и нейродегенеративные изменения

Нейродегенеративные заболевания, включая болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, являются в разной мере возрастными, наследственными или спорадическими нарушениями, проявляющимися прогрессирующей потерей нейронами своих функций. Общей чертой их патогенеза является то, что в нейронах накапливаются патогенные белковые агрегаты, что приводит к их дисфункции и гибели. Ранние сообщения, демонстрирующие накопление аутофагосом в мозге у пациентов с различными нейродегенеративными заболеваниями (Rubinsztein et al., 2007), привели к первоначальной гипотезе о том, что аутофагия способствовала патогенезу этих нарушений. Более поздние исследования предоставили убедительные доказательства того, что, по крайней мере, у модельных организмов аутофагия очищает клетки от нефункциональных белков и органелл, и что накопление аутофагосом представляет собой в первую очередь активацию аутофагии как благотворную физиологическую реакцию в отношении нейродегенеративных заболеваний (Martinez-Vicente and Cuervo, 2007; Rubinsztein et al., 2007). Помимо удаления белков с аномальным фолдингом, спонтанно образующихся во время рутинного протеосинтеза, аутофагия играет важную роль в клиренсе склонных к агрегированию патологических белков, связанных с различными нейродегенеративными заболеваниями, поскольку олигомерные и агрегированные белки являются плохими субстратами для протеасомной деградации и ШОА. К ним относятся белки с полиглутаминовыми (полиQ) включениями, какие наблюдаются при болезни Хантингтона и спиноцеребеллярной атаксии, мутантные α -синуклеины, вызывающие семейную форму болезни Паркинсона, и различные формы тау, включая мутации, вызывающие лобно-височную деменцию (Williams et al., 2006). Механизм, с помощью которого эти белки проявляют свою

клеточную токсичность, до сих пор остается спорным, но обычно считается, что они особенно токсичны в олигомерных комплексах и что белковые агрегаты более высокого порядка могут образовываться в качестве последней попытки предотвратить токсичность в отсутствие надлежащей функционирующей системы контроля качества белка. Эта точка зрения согласуется с моделью, согласно которой аутофагия функционирует как система контроля качества, нацеленная на олигомерные белки (Martinez-Vicente and Cuervo, 2007). Наблюдения как на экспериментальных моделях, так и при посмертном анализе тканей человека показывают, что нарушение аутофагии может быть общим фактором патогенного процесса при этих заболеваниях (Boland et al., 2018). Эта гипотеза дополнительно подтверждается тем, что мутаций во многих генах, кодирующих белки, которые участвуют в процессе аутофагии, включая *PINK1*, *PARKIN*, *OPTN*, *TBK1*, *ATL1*, *SQSTM1* и *WDR81*, а также *ATG5*, *AP4*, *HTT*, *WIPI4* и *DYNC1H1*, достаточно, чтобы вызвать нарушения развития нервной системы или нейродегенеративные заболевания (Zhu et al., 2019).

Несмотря на то, что существует большой объем информации о механизмах аутофагии, пока нет единого мнения о том, какой этап или этапы могут быть нарушены при старении и нейродегенеративных заболеваниях. На сегодняшний день исследования продемонстрировали нарушения на разных этапах аутофагии, включая биогенез аутофагосом (Rui et al., 2015; De Pace et al., 2018; Stavoe & Holzbaur, 2018), сегрегацию клеточного материала (Martinez-Vicente et al., 2010; Rudnick et al., 2017), внутриклеточный транспорт аутофагосом (Wong & Holzbaur, 2014), закисление аутофагосом или их слияние с лизосомами (Nixon et al., 2005; Lie & Nixon, 2018) на моделях заболеваний. Недостаточность альтернативных путей, таких как убиквитин-протеасомный путь и лизосомная деградация посредством шаперон-опосредованной аутофагии, также, вероятно, способствует нейродегенеративным заболеваниям (Scrivo et al., 2018). Кроме того, еще предстоит выяснить, являются ли дефекты аутофагии нейронов

определяющими, или же родственные пути деградации белка в клетках глии также способствуют возрастной нейродегенерации (Stavoe et al., 2019).

1.5. mTOR зависимые и mTOR независимые сигнальные пути аутофагии

Еще до того, как были раскрыты молекулярные механизмы макроаутофагии генетическими исследованиями на дрожжах, биохимические и ультраструктурные исследования, проведенные на печени крыс (Klionsky, 2007), установили, что голодание и глюкагон могут способствовать макроаутофагии (Deter et al., 1967), в то время как инсулин и свободные аминокислоты могут ее ингибировать (Mortimore et al., 1977). Существуют как ингибиторы макроаутофагии (3-метиладенин, вортманнин, оксид азота и т.д.), так и активаторы (рапамицин, пергекселин, никлозамид и т.д.), действие которых распространяется на разные стадии аутофагии. В отношении mTOR-зависимой аутофагии существуют два класса модуляторов макроаутофагии: ингибиторы Vps34 (Seglen et al., 1982; Blommaert et al., 1997) и ингибиторы mTOR. Эти два семейства соединений вместе с широким спектром лизосомных ингибиторов обеспечивают очень эффективную глобальную регуляцию макроаутофагии на ранних (mTOR), средних (Vps34) и поздних (лизосомной) стадиях аутофагового процесса. mTOR представляет собой первичный ингибирующий сигнал, который участвует в начальном процессе передачи сигнала, действуя выше вовлечения белков ATG. mTOR является основной субъединицей двух функционально различных мультибелковых комплексов mTORC1 и mTORC2. Белок представляет собой киназу, которая реагирует на энергетический и питательный статус клетки и связана с ее ростом и, таким образом, играет центральную роль в клеточном росте, клеточной пролиферации, трансляции и синтезе белка (Johnson et al., 2012).

В целом аутофагия может запускаться двумя сигнальными путями – mTOR-зависимыми и mTOR-независимыми (Рис.3). К mTOR-зависимым путям относятся сигнальный путь PI3K/Акт/mTOR и сигнальный путь киназы AMPK (5' AMP-activated protein kinase). Предполагается, что именно эти пути в основном регулируют аутофагию, индуцированную голоданием, снижением факторов роста и гипоксией, поскольку семейство PI3K регулирует важнейшие функции клетки, такие как рост, дифференцировку и жизнеспособность. PI3K класса I активируется рецепторами G-белков и тирозинкиназными рецепторами. Эти ферменты ответственны за производство PI3P (Phosphatidylinositol phosphate), PI(3,4)P2 (Phosphatidylinositol (3,4)-bisphosphate) и PI(3,4,5)P3 (Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate) (Okkenhaug, 2013). При достаточном поступлении питательных веществ ферменты этого класса активируют Akt (protein kinase B), что приводит к ингибированию комплекса TSC 1/2 (tuberous sclerosis proteins 1/2) и негативной регуляции белка Rheb (Ras homolog enriched in brain); последний активирует mTOR и ингибирует сборку комплекса инициации аутофагии (ULK1) (Manning et al., 2002; Inoki et al., 2003; Huang, Manning , 2008).

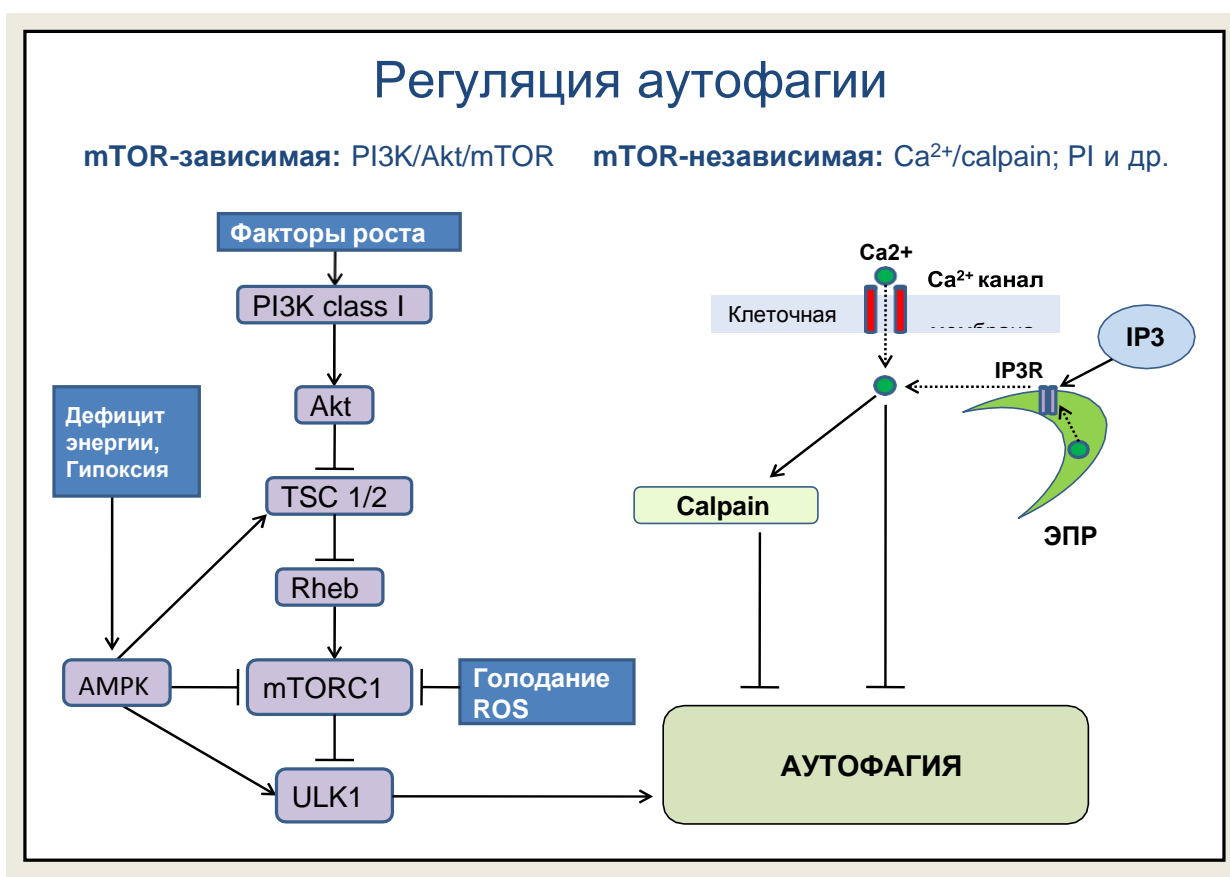


Рис.3. Механизм регуляции аутофагии по mTOR-зависимому и mTOR- независимому путям.

Снижение поступления нутриентов и факторов роста через сигнальный каскад PI3K/Акт/mTOR тормозит активность mTOR и запускает аутофагию. Энергетический дефицит и повышенный уровень HIF1 (hypoxia-inducible factor 1) стимулируют АМПК фосфорилировать комплекс TSC 1/2, что в конечном итоге также приводит к инициации аутофагии через ингибирование mTOR (Shoshani et al., 2002; Inoki et al., 2003; DeYoung et al., 2008).

Активатор аутофагии рапамицин может инициировать макроаутофагию посредством ингибирования комплекса mTORC1, ответственного за поддержание статуса фосфорилирования комплекса ULK1/2 (Mizushima, 2010). Ингибирование mTORC1 приводит к ослаблению анаболической активности клетки, торможению пролиферации и активации аутофагии. В нейропротективном действии рапамицина важнейшая роль отводится

аутофаговому очищению нейронов от накапливающихся патогенных белков. Другим механизмом позитивного действия рапамицина может быть активация митофагии, сниженной, например, у животных с моделированием БП. Накопление дефектных митохондрий ведет к наработке цитотоксичных продуктов, вызывающих активацию каспаз и последующую гибель дофаминергических нейронов. В этих условиях рапамицин способен повышать жизнеспособность нейронов ослаблением этих патогенных изменений. Накапливаются данные о том, что рапамицин в дополнение к активации аутофаговой сегрегации материала, по-видимому, может активировать также и лизосомный поток. Установлена связь между аутофагией и биогенезом лизосом через фактор транскрипции EB (TFEB), активирующийся его транслокацией из цитозоля в ядро, в том числе и под влиянием рапамицина. Возможно, рапамицин оказывает позитивный эффект частично еще и благодаря торможению синтеза общего белка и в том числе аномальных белков, что влияет, например, на образование агрегатов белков, имеющих в структуре полиглутаминовые повторы, но этот эффект требует дополнительного изучения (Пупушев и др., 2018).

Макроаутофаговая деградация может быть усилена и независимым от mTOR образом. mTOR-независимые сигнальные пути весьма многочисленны и включают Ca^{2+} -кальпаиновый сигнальный путь, сигнальный путь фосфоинозитола, а также многие другие (Рис.3.).

Один из возможных путей mTOR-независимой активации макроаутофагии связан с модуляцией комплекса ULK1/2 через другие киназы, в частности посредством эволюционно консервативной киназы AMPK действующей как метаболический регулятор клетки. По мере гидролиза АТФ соотношение АТФ: АМФ снижается, что приводит к активации этой киназы. Было показано, что AMPK является ближним модулятором регуляторного комплекса ULK1/2 (Egan et al., 2011; Kim et al., 2011; Shang et al., 2011). Важно отметить, что предотвращение способности AMPK взаимодействовать с ULK1 ускоряло способность клеток вызывать

реакцию голодания. То есть, активность АМПК и активность mTOR могут быть взаимосвязаны (Inoki et al., 2012).

В течение последних нескольких десятилетий внимание исследователей привлекала трегалоза благодаря ее роли в нейропротекции и, подобно ресвератролу, активирующей аутофагию посредством mTOR-независимого пути, тем самым вызывая очищение клетки от белковых агрегатов (Sarkar et al., 2007; Chen et al., 2016). Многие исследования на животных показали активацию аутофагии и снижение количества белковых агрегатов после введения трегалозы на моделях нейродегенеративных заболеваний. Исследования показали, что действие трегалозы в гепатоцитах направлено на ингибирование трансмембранного переносчика глюкозы SLC2A/GLUT8, что приводит к снижению уровня внутриклеточной глюкозы (DeBosch et al., 2016) (Рис.4). Данные Mayer и соавторов (Mayer et al., 2016) указывают на то, что трегалоза является как транспортным субстратом (или лигандом) для GLUT8, так и сопутствующим ингибитором транспорта глюкозы, вероятно, из-за ее взаимодействия с GLUT8. Снижение уровня глюкозы в клетке, в свою очередь, может запускать передачу сигналов «голодания» по короткому пути АМПК-ULK1 и по пути JNK1/Bcl-2/PI3K/Akt (Vidal et al., 2014). Активированный JNK1 фосфорилирует Bcl-2, диссоциируя его от Bcl-1, что приводит к активации этого основного регулятора аутофагии и последующей сигнальной цепи.

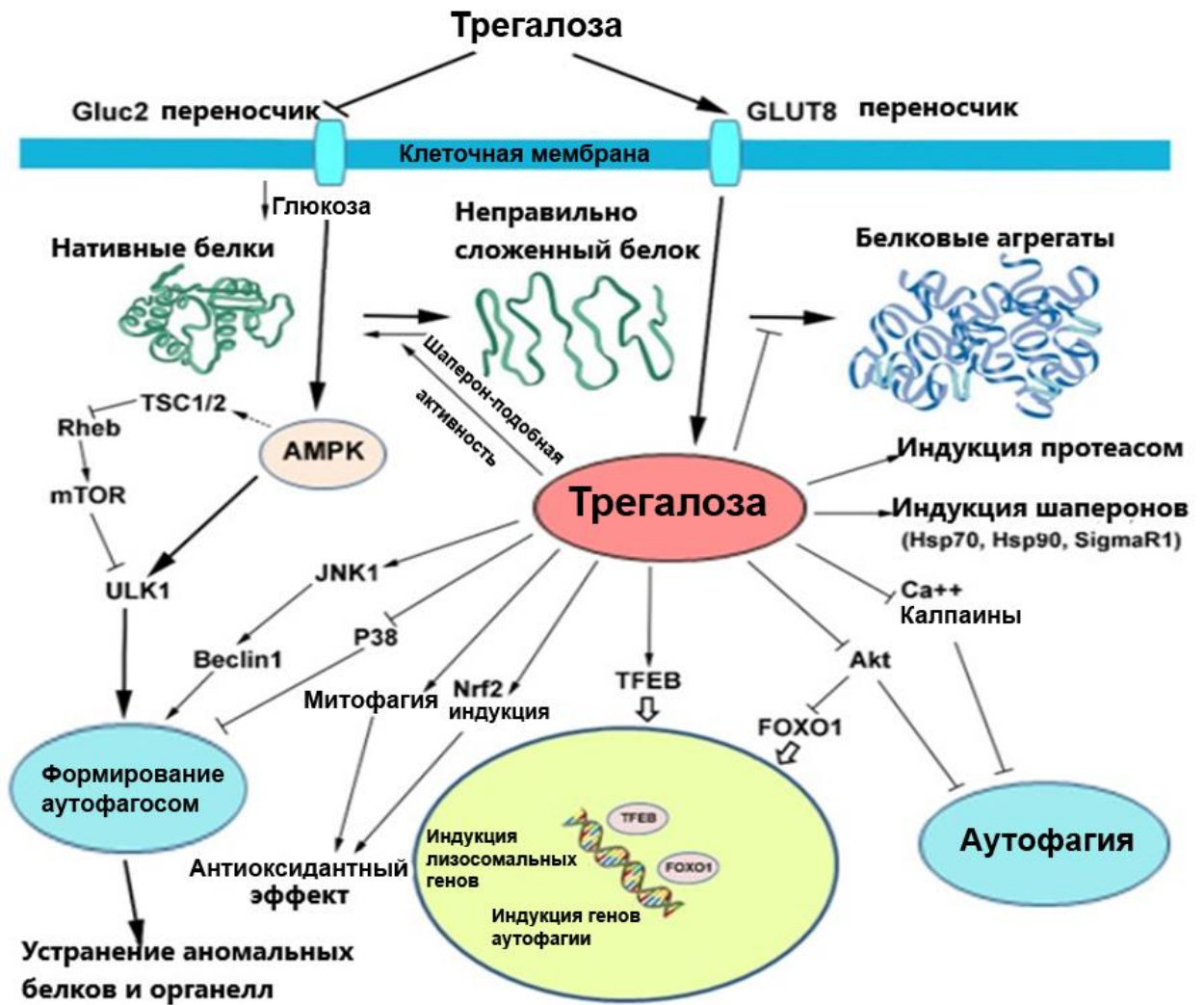


Рис. 4. Модель механизмов действия трегалозы и ее аналогов.

Предполагается, что трегалоза может усиливать аутофагию через активацию TFEB и лизосомного потока. Отмечено, что трегалоза вызывает временный рост проницаемости лизосомной мембраны. По-видимому, это приводит к утечке Ca^{2+} , что активирует фосфатазу PPP3 / кальциневрин. PPP3 специфически дефосфорилирует TFEB, вызывая его активацию и ядерную транслокацию, активируя экспрессию аутофаговых и лизофаговых генов BECN1, ATG10, ATG12, SQSTM1 / p62 и MAP1, LC3B. В результате усиливается аутофагия и лизофагия с удалением поврежденных лизосом и параллельно (при наличии) anomalно свернутых агрегатов белка (Rusmini et al., 2019).

1.6 Влияние аутофагии на головной мозг и поведение

Важность аутофагии в поддержании жизнеспособности нейронов многократно исследовалась на различных моделях животных, в которых гены, необходимые для образования аутофагосом, были генетически инактивированы. ЦНС-специфичного и нейрон-специфичного нокаута генов *Atg5* или *Atg7*, основных генов, необходимых для образования аутофагосом, достаточно, чтобы вызвать у мышей прогрессирующую дегенерацию клеток Пуркинье в мозжечке и пирамидных клеток в коре головного мозга (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006; Komatsu et al., 2007). Обнаружено, что трансгенные мыши, лишенные *Atg7*, особенно в центральной нервной системе, показывают нарушение 2 системы конюгации АТG (*Atg12* и *LC3*), что указывает на дисфункцию аутофагии. В связи с этим, они показывали поведенческие дефекты и моторные нарушения, включая аномальные рефлексы сжимания конечностей и снижение скоординированных движений. Хотя при рождении они ничем не отличались от контрольных мышей, уже через 2 недели мыши демонстрировали задержку роста и умирали в течение 28 недель после рождения (Komatsu et al. 2006). При блокировке аутофагии в нейронах накапливаются убиквитин-позитивные белковые агрегаты, которые увеличиваются в размере и количестве с возрастом. Интересно, что разные популяции нейронов по-разному реагируют на отсутствие аутофагии, накапливая агрегаты в разной степени (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006). Аутофагия играет важную роль в поддержании белкового баланса и в дистальном отделе аксона. Поскольку белки и органеллы в дистальном отделе находятся дальше от первичных участков синтеза белка в соме, они могут быть более восприимчивы к старению и повреждению. Фактически, митохондрии, находящиеся в дистальном аксоне, старше, чем митохондрии, расположенные в проксимальном аксоне (Ferree et al., 2013), и накапливают больше мутаций в мДНК. Кроме того, подавляющее большинство вновь

синтезированных цитозольных белков образуются в соме и перемещаются к дистальным аксонам посредством медленного аксонального транспорта (Scott et al., 2011). Эти цитозольные белки перемещаются со скоростью около 10 мм в день и будут стареть примерно за 120 дней, прежде чем достигнут конца двигательного аксона. Усиленная деградиционная или шапероноподобная активность может противодействовать накоплению состарившегося и поврежденного белка в дистальном отделе аксона (Maday, 2016).

Одной из важных функций аутофагии в головном мозге является регулирование пресинаптической передачи. Нокаут по гену *Atg7* в дофаминергических нейронах у мышей увеличивал амплитуду высвобождения нейротрансмиттера и пресинаптического восстановления. В контрольной ткани индукция аутофагии путем ингибирования mTOR увеличивала количество аутофагосом в пресинаптических участках, а также уменьшала количество синаптических везикул (Hernandez et al., 2012). Таким образом, аутофагия модулирует нейротрансмиссию, потенциально изолируя синаптические пузырьки. Недавно появились данные, утверждающие, что аутофагосомы, возможно, обеспечивают путь для передачи и потока информации от дистального аксона к соме. И этот путь усиливается пресинаптической активностью. Это утверждение объясняется тем, что деполяризация нейронов увеличивает образование аутофагосом в окончаниях аксонов и их последующий ретроградный перенос в сому (Wang et al., 2015).

1.7. Влияние α - синуклеина на аутофагию

Болезнь Паркинсона является вторым после болезни Альцгеймера наиболее распространенным нейродегенеративным заболеванием человека. Патология БП характеризуется образованием внутринейрональных включений, называемых тельцами Леви, которые состоят преимущественно из α -синуклеина. Хотя БП в основном является спорадическим заболеванием,

при семейных формах заболевания α -синуклеин выявлен как причинный ген. Было показано, что мутации в гене α -синуклеина, в том числе точечные мутации и мультипликации всего локуса, вызывают семейные формы БП (Ross et al., 2008). Хотя физиологическая функция этого пресинаптического белка мало изучена, многие исследователи показывают, что оверэкспрессия α -синуклеина оказывает токсическое влияние на клетки, что выражается в том числе и ингибированием аутофагии на ранней стадии образования аутофагосом (Winslow et al., 2010). Один предполагаемый механизм токсичности α -синуклеина был обнаружен в исследованиях на дрожжах, оверэкспрессирующих этот белок. Эти исследования показали, что α -синуклеин дикого типа нарушал образование аутофагосом, ингибируя активность Rab1 (Cooper et al., 2006; Gitler et al., 2008). Согласно другому механизму, модифицированные формы α -синуклеина, по-видимому, влияют на шаперон-опосредованную аутофагию (ШОА) (Cuervo et al., 2004). При ШОА часть цитоплазматических белков, особенно короткоживущих, транслоцируется непосредственно в лизосому без участия везикулярных структур или аутофагосом. Хотя нарушенная ШОА является очень правдоподобным фактором патологии, это может быть не единственным задействованным путем деградации белка (Massey et al., 2006).

Несмотря на то, что существует много исследований, изучавших влияние мутантного α -синуклеина на разные нейрофизиологические механизмы в условиях *in vitro* (на дрожжах, клеточных культурах), многое ещё предстоит выяснить на животных в условиях целого организма *in vivo*. Для таких целей созданы разные трансгенные модели с оверэкспрессией α -синуклеина. α -Синуклеин представляет собой белок длиной 140 аминокислот, который кодируется геном *SNCA*. Существуют три миссенс-мутации в гене *SNCA* (A30P, E46K и A53T), которые связаны с семейными формами БП. Достаточно успешной является модель с мутацией A53T, у которой происходит замена гуанина на аденин, что приводит к замене аминокислоты аланина на треонин в 53 позиции и образованию нового сайта

рестрикции Tsp45. Для создания данной линии с помощью плазмидного вектора производилась инсерция кДНК, несущей A53T мутантную форму человеческого α -синуклеина. Вставка осуществлялась в область, расположенную после промотора белка-приона. Полученный трансген был использован для пронуклеарной инъекции в эмбрион мыши, после чего был произведен бэккроссинг для закрепления мутации в гомозиготном состоянии. Данная модель успешно воспроизводит основные особенности синуклеинопатии, включая усиленную агрегацию α -синуклеина наряду с более тяжелой патологией и поведенческим дефицитом (Giasson et al., 2002).

Таким образом, аутофагия - это важнейший клеточный механизм контроля качества белка, с помощью которого клетка избавляется от поврежденных или цитотоксичных клеточных органелл и белков, тем самым обеспечивает клеточный гомеостаз. Этот процесс протекает во всех клетках организма, но особенно важен для клеток, имеющих ограниченный пролиферативный ресурс, таких как нейроны. Постмитотическая природа и сильно поляризованная морфология нейронов делают эффективную аутофагию необходимой для поддержания их гомеостаза и выживания. Важно, что при старении и некоторых нейродегенеративных нарушениях активность аутофагии снижается, что приводит к нарушению функционирования нейронов и их гибели.

Учитывая, что индукция аутофагии потенциально может смягчить тяжесть нарушений и восстановить жизнеспособность нейронов, нами предложены соединения, активирующие нейропротективную аутофагию разными механизмами и показавшими свою эффективность в системах *in vitro*, а также на разных анимальных моделях нейродегенерации. Нейропротективное действие рапамицина и трегалозы в отношении накопления белковых агрегатов известно в исследованиях *in vitro*. В настоящей работе изучали влияние рапамицина и трегалозы как индукторов аутофагии, запускающих процесс по mTOR-зависимым и mTOR-независимым путям на моделях БП в условиях *in vivo*. Такой подход

исследования позволяет изучить восстановление морфофункциональных и поведенческих показателей нейродегенеративных нарушений на организменном уровне.

ГЛАВА 2. Материалы и методы исследования

2.1. Дизайн эксперимента

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 отличались 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.

В эксперименте по активации аутофагии в мозге рапамицином и трегалозой у мышей C57BL/6 в обычных условиях были следующие группы (5–7 животных в каждой группе):

{1} контроль для рапамицина (растворитель рапамицина, 5 % этанол, 5 % твин-80, 5 % полиэтиленгликоль-400), {2} рапамицин (1 мг / кг), {3} рапамицин (5 мг / кг), {4} рапамицин (10 мг / кг), {5} трегалоза (2% в питьевой воде), {6} рапамицин (10 мг / кг) + трегалоза. Рапамицин и

растворитель вводили внутрибрюшинно. Были оценены эффекты рапамицина в разных дозах, поскольку наиболее эффективная доза его не была ясна.

С учетом выявления эффективной дозы рапамицина для активации аутофагии в мозге мышей, изучено влияние активации аутофагии с помощью индукторов в рамках моделей БП в следующих группах:

(трансгенная модель)

{1} контроль (B6.Cg-Tg), {2} B6.Cg-Tg+растворитель (растворитель рапамицина), {3} B6.Cg-Tg+рапамицин, {4} B6.Cg-Tg+трегалоза, {5} B6.Cg-Tg+рапамицин+трегалоза, {6} B6.Cg-Tg+рапамицин+трегалоза+ЗМА.

Рапамицин вводили внутрибрюшинно в дозе 10 мг/кг, трегалозу – 2% раствор с питьем. Отдельной группе трансгенных мышей вводили ингибитор аутофагии 3-метиладенин (ЗМА) на растворителе рапамицина, внутрибрюшинно в дозе 15 мг/кг за 1 ч до инъекции рапамицина.

(фармакологическая МФТП-индуцированная модель)

{1} контроль (мышам вводили внутрибрюшинно физиологический раствор вместо МФТП), {2} МФТП (внутрибрюшинно в физиологическом растворе), {3} МФТП + растворитель рапамицина, {4} МФТП + рапамицин (10 мг / кг), {5} МФТП + трегалоза (2% в питьевой воде), {6} МФТП + рапамицин + трегалоза.

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 внутрибрюшинно 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 внутривентриально 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.

2.2. Иммуногистохимический анализ (ИГХ)

ИГХ-анализу экспрессии маркера аутофагии белка LC3-II предшествовало введение хлорохина (за 16 ч до эвтаназии, 30 мг / кг, внутривентриально) (Iwai-Kanai et al., 2008). В день эвтаназии, мышей анестезировали с помощью CO₂. Животные были перфузированы транскардиально фосфатно-солевым буфером (PBS) и последующим 4% параформальдегидом в PBS, далее проведена декапитация. Целый мозг быстро извлекали и постфиксировали в фиксаторе, 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) при температуре -20°C и монтировали их на стекла, предварительно покрытые желатином для адгезивного эффекта. Анализ ИГХ проводили на криосрезах толщиной 30 мкм в соответствии с протоколом (Weng et al., 2016; Пупышев и др., 2018). Границы анатомических структур мозга мыши определяли по атласу: корональные срезы мозга вдоль лобной коры (AP: 2,93–2,45 мм), полосатого тела (AP: 1,21–0,73 мм), гиппокампа и миндалина (AP: от -1,67 до -2,45) и чёрной субстанции (AP: от -2,91 до -3,15 мм).

Для иммуногистохимического окрашивания мы применили следующие антитела:

Таблица 1. Список первичных и вторичных антител для иммуногистохимического окрашивания.

Первичные антитела			
Антиген	Тип (хозяин)	Разведение	Компания-производитель Каталожный номер
LC3B/MAP1LC3B	Поликлональные антитела (кролик)	1:400	Novus Biologicals NB100-2220
Tyrosine Hydroxylase, clone LNC1	Моноклональные антитела (мышь)	1:300	Millipore MAB318
AIF-1/Iba1	Поликлональные антитела (коза)	1:250	Novus Biologicals NB100-1028
Alpha- Synuclein	Поликлональные антитела (кролик)	1:1000	Novus Biologicals NB110-61645
Вторичные антитела			
Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 568)	Поликлональные антитела (коза)	1:400	Abcam ab175473
Anti-Rabbit IgG H&L(Alexa Fluor 488)	Поликлональные антитела (коза)	1:600	Abcam ab150077
Anti-Goat IgG H&L(Alexa Fluor 488)	Поликлональные антитела (осёл)	1:200	Abcam ab150129

Флуоресцентные изображения были получены с помощью микроскопа с индукцией флуоресценции AxioPlan 2 (Carl Zeiss) и конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 510 META (Carl Zeiss).

Полученные микрофотографии проанализировали с помощью программы Image Pro Plus Software 6.0 (Media Cybernetics, США). Интенсивность флуоресценции на изображениях измеряли как фоновно-скорректированная оптическая плотность (ОП) с вычитанием окрашивающих сигналов неиммунореактивных областей, преобразованных в оттенки серого. Область интереса составляла 5712 μm^2 в стриатуме, миндалине и 3-й слой лобной коры, 19353 μm^2 в гиппокампе и 99,744 μm^2 в чёрной субстанции.

2.3. Лизосомный осмотический тест

Данный тест на активацию аутофагии основан на высокой осмотической чувствительности восприимчивости аутофаголизосомной мембраны по сравнению с первичными лизосомами или лизосомами в клетке при стабильном состоянии (Deter and De Duve, 1967). Метод был разработан для обнаружения роста популяции аутофаголизосом в печени и был применен здесь к мозгу впервые.

2% гомогенат мозга готовили в изотоническом растворе 0,25 М сахарозы, 1 мМ Na-ЭДТА, рН 7,4, при 0–2 ° С. Гипотоничная обработка состояла в добавлении к гомогенатам холодного дистиллята (1: 1 по объему) и инкубации в течение 30 мин при 0–2 ° С, после чего определяли свободную и общую активности лизосомной β -галактозидазы. Свободная активность β -галактозидазы связана с поддержанием максимальной целостности лизосом (в изотоническом растворе сахарозы), а общая активность оценивается при полной лабильности лизосомных мембран с помощью 0,1% Тритона X-100. Активность кислой β -галактозидазы определяли с субстратом 4-метил-умбеллиферил- β , D-галактопиранозидом (Пупышев и др., 2005). Флуоресцентный продукт расщепления субстрата 4-МУФ регистрировали на спектрофлуориметре Shimadzu RF 5301-PC (Япония). Результаты выражали как отношение свободной ферментативной активности (β -галактозидаз) к общей (в %), и ее прирост, вызванный гипоосмотической обработкой, был

показателем осмотической чувствительности лизосом, увеличивающейся при индукции аутофагии (Deter and de Duve, 1967).

2.4 Поведенческие тесты

Тест пассивного избегания

Выработку условной реакции пассивного избегания (УРПИ) осуществляли по общепринятой методике однократного обучения в автоматизированной установке «Gemini avoidance system» (San-Diego Instruments). Установка представляет экспериментальную камеру с темным и светлым отсеками (20x20x20 см) и полом, состоящим из 2 мм стальных проволок на расстоянии в 1 см. Отсеки разделяются гильотинной дверью (5x5 см). В парадигме УРПИ мышь обучалась ассоциации условного стимула (контекст экспериментальной камеры) с болевым раздражением в темном отсеке (безусловный стимул).

В первый день проводили ознакомление с установкой. Мышь помещалась в светлый отсек аппарата с открытой гильотинной дверью, и ей позволяли обследовать светлый и темный отсеки в течение 180 или 300 с. Регистрировали латентный период первого перехода в темный отсек и количество переходов из отсека в отсек, чтобы оценить двигательную и исследовательскую активность животного. В день обучения (2-й день) мышь помещали в светлый отсек хвостом к открытой двери. При переходе мыши всеми четырьмя лапами в темный отсек дверь автоматически закрывалась, и она получала болевое раздражение током силой 0.5 мА и длительностью 2 с. Каждая мышь получала однократное раздражение током. Через 10 – 15 секунд животное возвращали в домашнюю клетку. При тестировании через 24 часа (3-й день) после выработки условного рефлекса мышь вновь помещали в освещенный отсек с открытой дверью. С помощью программного обеспечения Gemini автоматически регистрируется латентный период перехода в темное отделение. Латентный период перехода в день

обучения до болевого раздражения отражает исходное время предпочтения темной камеры, а при тестировании является показателем выработки условной реакции пассивного избегания. Максимальное время наблюдения за животным составляло 180 или 300 с.

Эффективность обучения УРПИ (формирования следа памяти о страхе) оценивалась как значимое увеличение латентного периода перехода при тестировании (3-й день) по сравнению с днем выработки (2-й день) (Дубровина и др., 2005; 2017).

Тест открытого поля

В поведенческих исследованиях наиболее часто используемый метод для оценки двигательной и исследовательской активности, тревожности и эмоциональности - это тест открытого поля.

Тест был проведен в аппарате с квадратной ареной (40 × 40 см) и пластиковыми стенами высотой 37,5 см, ярко освещенный сверху (1000 люкс). Автоматическую видеорегистрацию осуществляли с помощью видеокамеры (Sony, Китай), расположенной над аппаратом, и оригинального программного обеспечения EthoVision XT (Noldus, Нидерланды).

Мышь помещали возле стены, и ее поведение регистрировали в течение 10 минут. Были определены следующие параметры: общая двигательная активность (пройденный путь в см); вертикальная и исследовательская активность (количество стоек); тревожность (длительность нахождения в центре поля) и эмоциональность (количество актов дефекации).

Тест Барнс

Тест оценивает пространственную память и обучение. Мышь помещали на приподнятую открытую круглую арену без бордюра (120 см в

диаметре, высота от пола – 90 см) с 40 отверстиями на периферии (диаметр отверстия – 5 см, расстояние между центрами отверстий – 8 см). Под одним из отверстий («целевая лунка») находилась темная коробка с укрытием, причем для каждого животного назначали одну из четырех локаций целевой лунки, которую не меняли для данной мыши в течение всего эксперимента. Для усиления поисковой мотивации тестирование проводили при ярком освещении (около 1000 люкс), под действием которого животное пытается укрыться. Стадия привыкания (1-й день, 2 сессии по 3 мин): мышь помещали недалеко от лунки с укрытием, если через 3 мин животное не находило укрытие, его осторожно направляли туда и оставляли на 1 мин. Стадия обучения (2-й – 5-й день, 4 сессии в день по 3 мин): мышь помещали в центр арены и регистрировали латентное время нахождения лунки с укрытием. Если за это время мышь не находила укрытие, ее направляли туда и оставляли на 1 мин. Тестирование (6-й день, 1 сессия по 1 мин): укрытие убирали, мышь помещали в центр арены и проводили регистрацию показателей исследовательской активности и долговременной памяти. Оценивали динамику обучения по времени нахождения укрытия мышами в первой сессии в течение четырех дней обучения. В день тестирования регистрировали общее число тычков носом в лунки (показатель исследовательской активности) и показатели обучения и долговременной памяти (латентное время до первого тычка носом в целевую лунку, количество тычков носом в целевую лунку) (Dudchenko, 2004; Paul et al., 2009).

Тест Т-образный лабиринт

Т-образный лабиринт позволяет исследовать рабочую и пространственную память грызунов. Тест проводили по протоколу спонтанной альтерации при красном освещении 28 люкс (Deacon, Rawlins, 2006). Т-образный аппарат состоит из стартового плеча (30 × 7 см) и двух

боковых рукавов (37×7 см) с пластмассовыми стенками высотой 20 см. Зона старта в стартовом плече 18×7 см, а центральная зона между боковыми плечами 7×7 см. Все отсеки разделены автоматическими раздвижными дверями, управляемыми дистанционно с помощью программного обеспечения EthoVision XT (Noldus, Нидерланды). Тест состоял из трех испытаний в день в течение трех последовательных дней для каждой мыши. Каждое испытание включало два прогона. В начале каждого запуска в стартовую зону помещали мышь и оставляли там некоторое время, для адаптации, после чего открывали заслонку, позволяя выбрать один из рукавов. В первом прогоне, сразу после выбора, дверь-заслонка, отделяющая боковой рукав с мышью, закрывалась, и мышь оставалась в выбранном рукаве 30 с до второго прогона. Во втором прогоне мышь должна выбрать сторону, противоположную выбранной в первом прогоне (правильный выбор). Когда два прогона выполняются в быстрой последовательности, то при втором прогоне животное стремится пойти в ту часть лабиринта, которую не посещала прежде, что говорит о хорошей пространственной памяти. Регистрировали правильные выборы в девяти испытаниях. Процент правильных выборов от общего числа испытаний расценивали как показатель рабочей памяти (Deacon, Rawlins, 2006; Pol et al., 2009). Продолжительность каждого прогона ограничивалась 90 с.

2.5. Статистический анализ результатов

Для выполнения всех статистических обчислений использовалось программное обеспечение STATISTICA 10.0 (StatSoft, Талса, штат Оклахома, США). Все результаты представляли как среднее значение \pm 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 $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. Результаты исследования

3.1. Влияние оверэкспрессии α -синуклеина на активность аутофагии, нейрональные и поведенческие показатели у мышей.

Изначально аутофагия рассматривалась исключительно как клеточный процесс, и изучалась преимущественно на клеточных моделях *in vitro*. До сих пор проведено не так много исследований активности аутофагии в мозге и эффектов ее колебаний на интегративные функции организма, такие как поведенческие реакции. 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.

3.1.1. Активность аутофагии и нейроморфологические изменения в головном мозге мышей трансгенной линии с оверэкспрессией A53T-мутантного α -синуклеина человека.

В возрасте 5 мес. общее состояние мышей трансгенной линии B6.Cg-Tg оверэкспрессией A53T-мутантного α -синуклеина человека не отличалось от контрольных мышей. Висцеральные органы были без видимых патологических изменений.

В качестве основного критерия оценки активности аутофагии в мозге использовали экспрессию маркера аутофагии белка LC3-II, выявляемую методами иммуногистохимии. Концентрирование флуоресцентной метки антител в мембранах аутофагосом связано с конъюгированием цитозольного

белка LC3-I с фосфатидилэтаноламином с образованием мембраносвязанного белка LC3-II, интенсивно накапливающегося только в мембранах аутофагосом. Оценивали «точечную» флуоресценцию, соответствующую локализации антител к LC3-II в везикулярных структурах (аутофагосомах), вычитая фоновую флуоресценцию «цитозоля» из общей флуоресценции препарата. Настоящий подход наряду с иммуноблоттингом LC3-II является наиболее распространенным в исследовании аутофагии (Klionsky et al., 2016).

Трансгенные мыши продемонстрировали резкое снижение экспрессии маркера аутофагии в полосатом теле, обогащенном нейритами дофаминергических нейронов, по сравнению с контрольными мышами дикого типа ($t_{42} = 1,42$, $p < 0,01$). Похожие изменения были обнаружены и в чёрной субстанции, где расположены тела дофаминергических нейронов, а также в миндалине. Уровень LC3-II в лобной коре и в гиппокампе существенно не изменялась (Рис. 7).

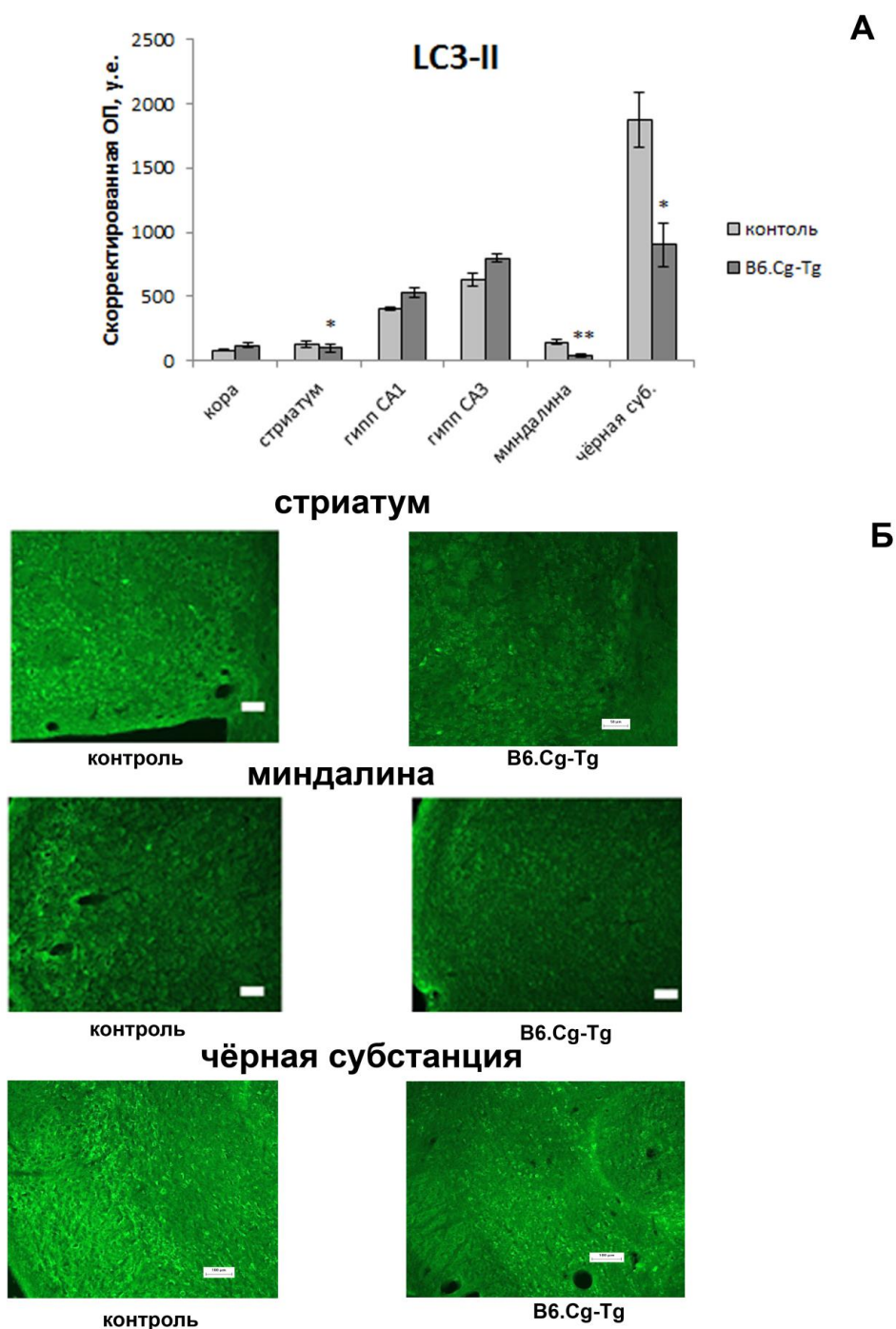


Рис. 7. Активность аутофагии, измеренная по экспрессии LC3-II в лобной коре, полосатом теле, гиппокампе, миндалине и в чёрной субстанции у мышей трансгенной линии (B6.Cg-Tg) с оверэкспрессией A53T-мутантного α -синуклеина человека. А – результаты количественного анализа оцифровки изображений. N=3-4 в группе. Статистически значимые различия: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по сравнению с контрольными мышами. Б – микрофотографии коронарных срезов, иммуногистохимически окрашенных против LC3-II, в

стриатуме, миндалине и черной субстанции. Увеличение в полосатом теле, миндалине 200 ×; в чёрной субстанции 100 ×; шкала 100 μм.

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 (не значимо, $p > 0,05$), в то время как значительное (около 50%) снижение показателя обнаружено в полосатом теле (Рис.8).

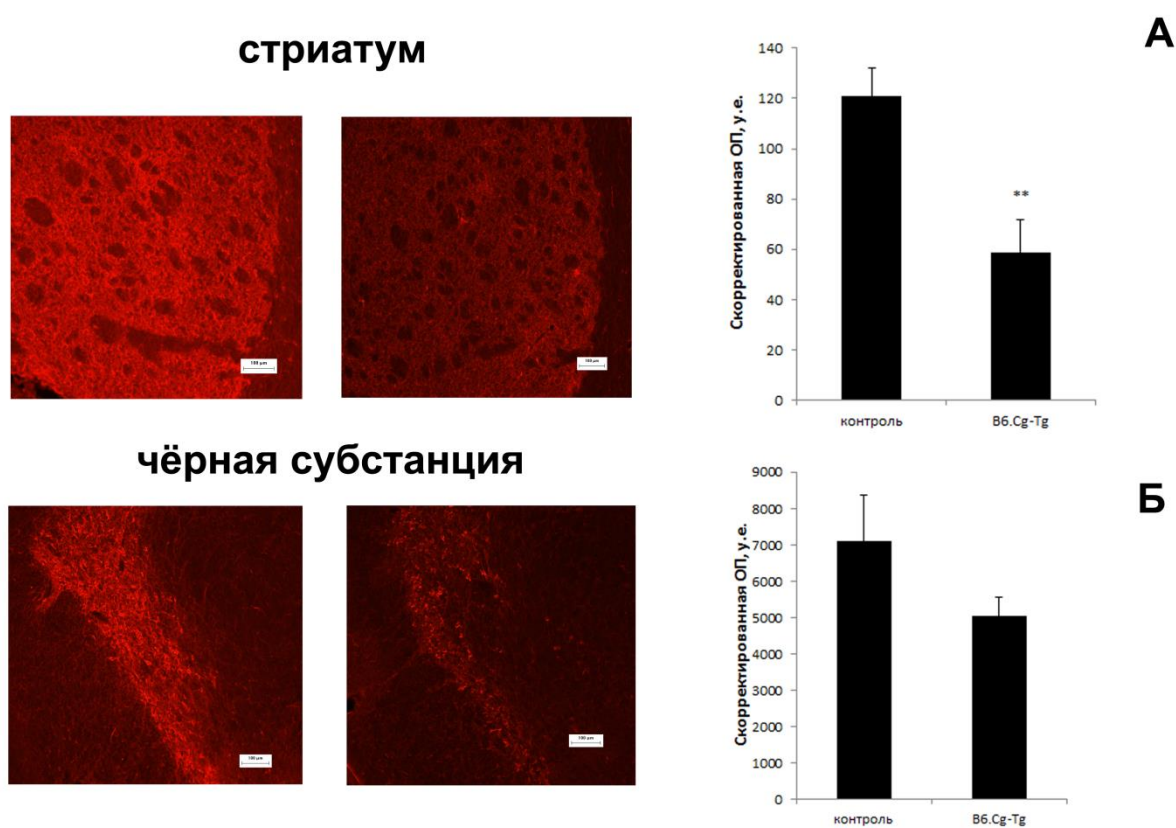
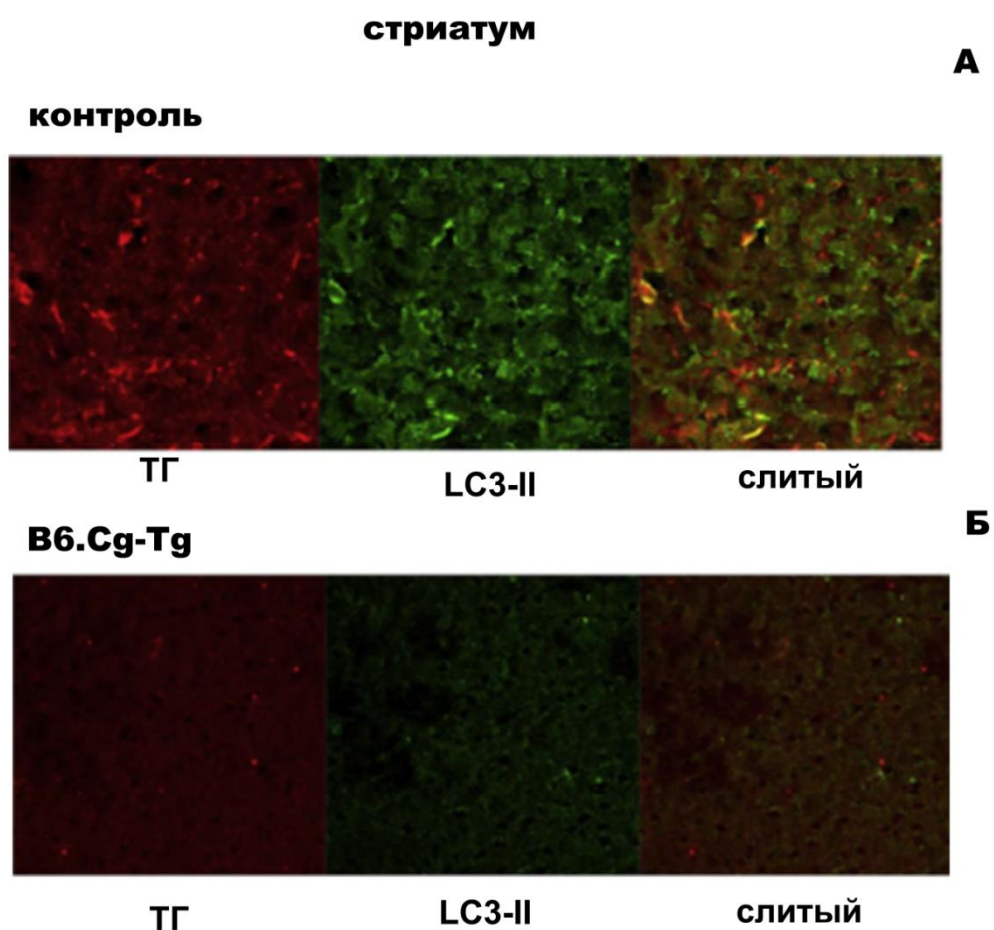


Рис.8. Влияние сверхэкспрессии A53T-мутантного α -синуклеина на экспрессию ТГ в полосатом теле(А) и в чёрной субстанции (Б) у 5-месячных мышей. N=3-4 в группе. Статистически значимые различия: ** $p < 0,01$ по сравнению с контрольными мышами. На микрофотографиях представлены коронарные срезы стриатума и чёрной субстанции, иммуногистохимически окрашенные против ТГ. Увеличение 100 ×, шкала 100 μм.

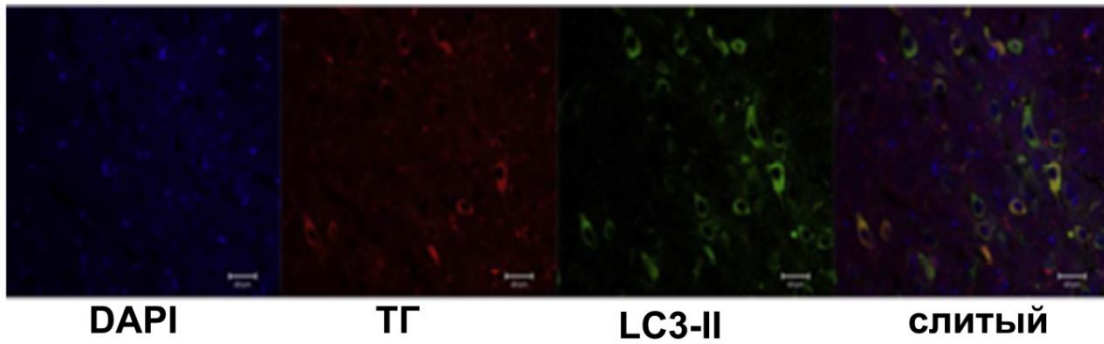
Двойное иммуноокрашивание против ТГ и LC3-II выявило коэкспрессию маркеров в телах дофаминергических нейронов у трансгенных мышей (B6.Cg-Tg) и мышей дикого типа, а так же в дофаминергических терминалях в полосатом теле у контрольных мышей дикого типа. Из-за очень низкой экспрессии обоих маркеров в полосатом теле трансгенных мышей оценить коэкспрессию было невозможно (Рис. 9).



чёрная субстанция

В

контроль



B6.Cg-Tg

Г

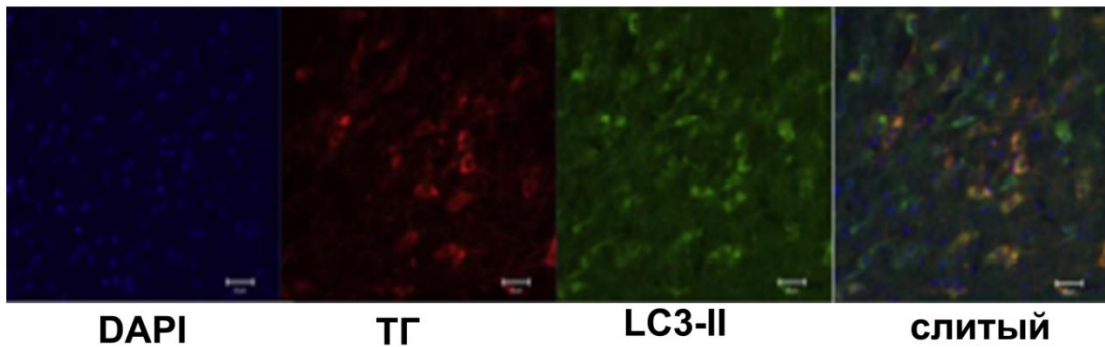


Рис. 9. Двойное окрашивание по маркерам LC3-II и TG в стриатуме и в чёрной субстанции у 5-месячных трансгенных мышей с оверэкспрессией A53T-мутантного α -синуклеина и контроля дикого типа. (А) контроль, стриатум; (Б) B6.Cg-Tg, стриатум; (В) контроль, чёрная субстанция; (Г) B6.Cg-Tg, чёрная субстанция. Увеличение, 400 \times ; шкала 20 μ m.

Важно отметить, что в возрасте 5 месяцев у мышей трансгенной линии еще не происходило накопления агрегатов α -синуклеина в мозге. В то же время, в более позднем возрасте 7,5 месяцев у мышей с оверэкспрессией A53T мутантного человеческого α -синуклеина мы выявили синуклеиновые агрегаты и признаки нейровоспаления. Отложения α -синуклеина были обнаружены во II-м слое лобной коры у мышей линии B6.Cg-Tg (Рис. 10).

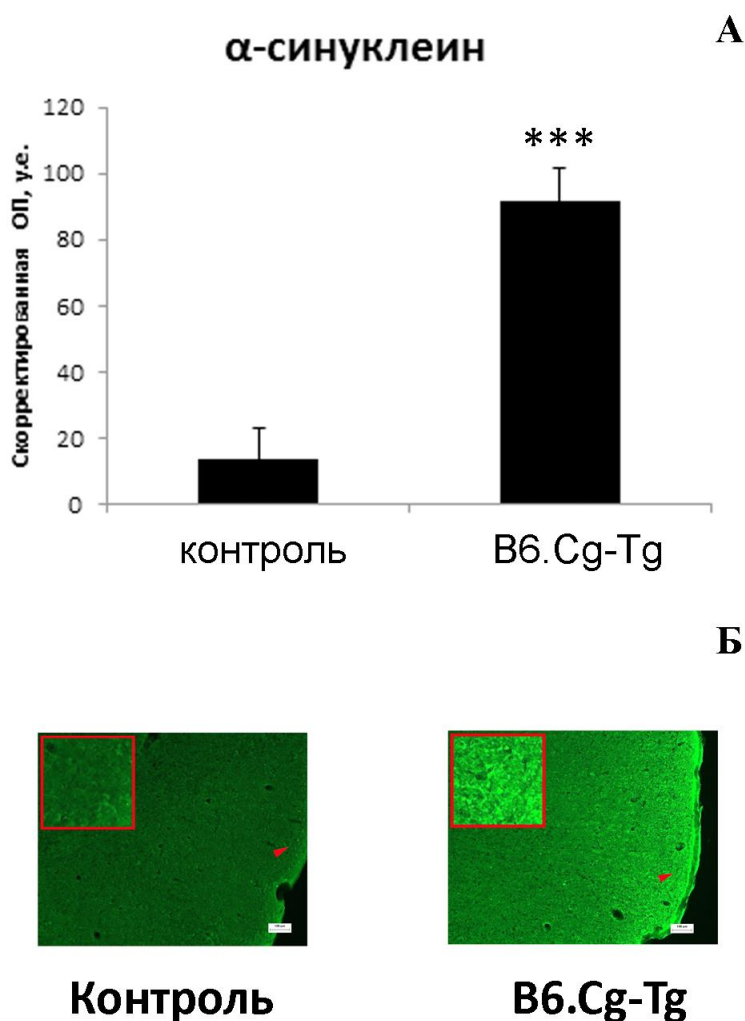


Рис.10 Наличие внутриклеточного α-синуклеина в лобной коре у мышей трансгенной линии в возрасте 7,5 месяцев. А – результаты количественного анализа изображений. N=3-4 в группе. Статистически значимые различия: *** $p < 0,001$ по сравнению с контрольными мышами. Б – микрофотографии коронарных срезов лобной коры, иммуногистохимически окрашенных против α-синуклеина. Увеличение 100 ×; шкала 100 μм.

В связи с накоплением агрегатов α-синуклеина мы обнаружили активацию микроглии в лобной коре и в чёрной субстанции у трансгенных мышей в возрасте 7,5 мес. (Рис. 11).

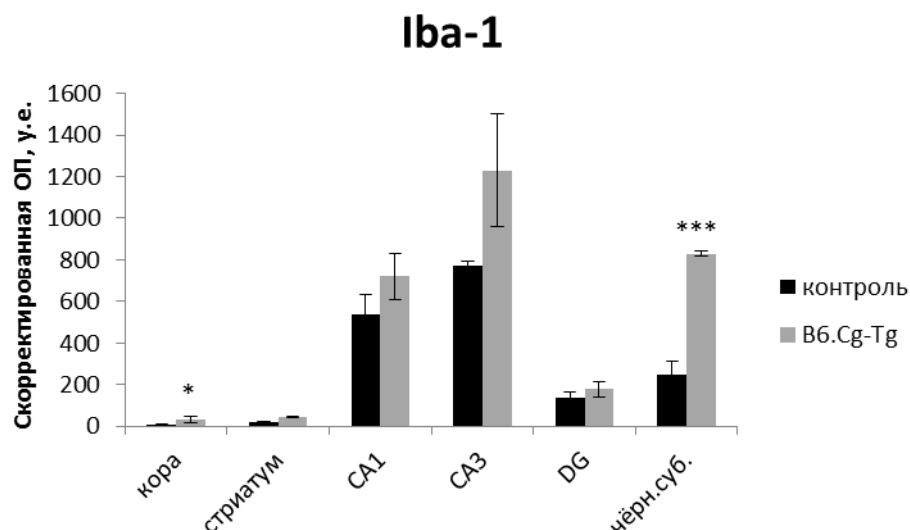
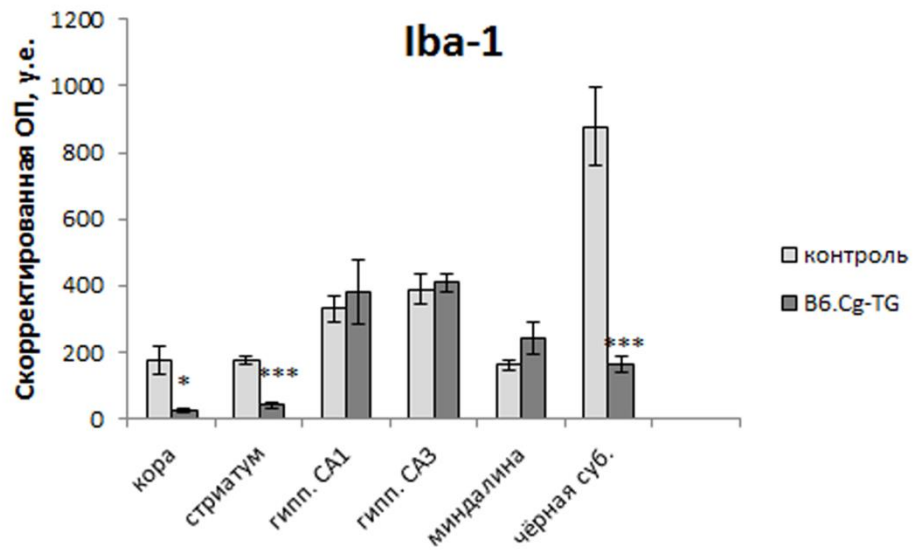


Рис.11. Влияние оверэкспрессии A53T-мутантного α -синуклеина на экспрессию микроглиального маркера Iba-1 в лобной коре, стриатуме, областях CA1, CA3 и DG гиппокампа и в чёрной субстанции у мышей в возрасте 7,5 месяцев. N=3-4 в группе. Статистически значимые различия: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ по сравнению с контрольными мышами.

В то же время, в возрасте 5 месяцев признаков нейровоспалительной реакции и активации микроглии у мышей трансгенной линии не выявлено. Более того, во фронтальной коре, полосатом теле и чёрной субстанции наблюдалось даже снижение экспрессии микроглиального маркера Iba-1 (Рис. 12).

А



Б

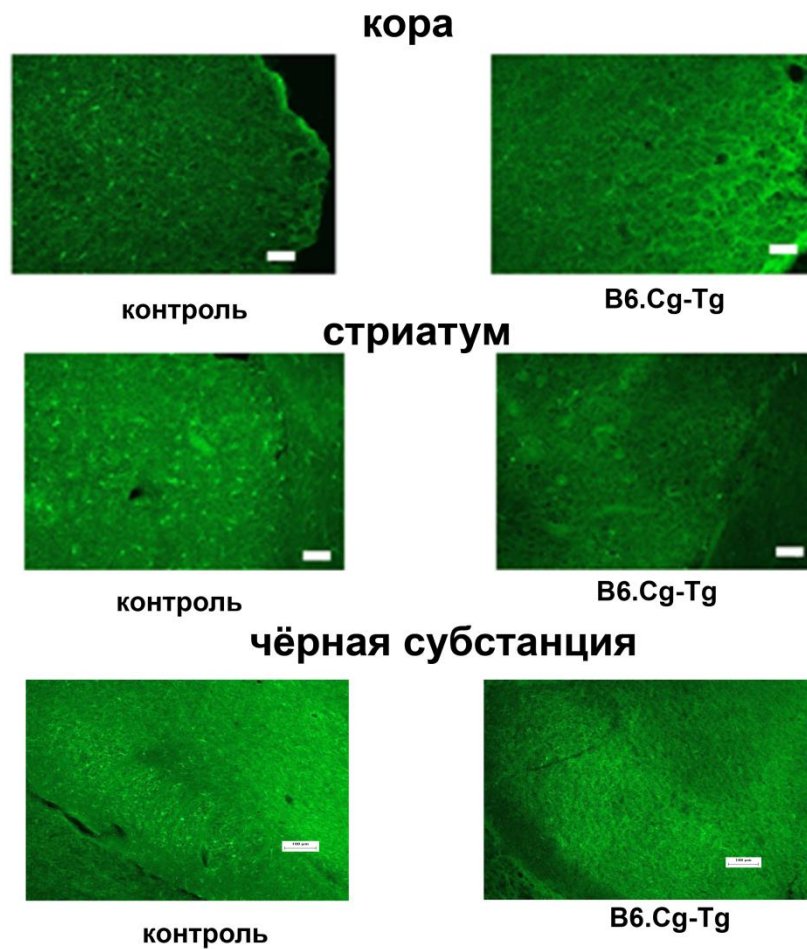


Рис. 12. Экспрессия маркера активированной микроглии Iba-1 в лобной коре, стриатуме, миндалине, областях СА1 и СА3 гиппокампа и в чёрной субстанции у мышей трансгенной линии в возрасте 5 месяцев.

А: Количественные результаты. N=3-6 в группе. Статистически значимые различия: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ по сравнению с контрольными мышами. Б: Иммунореактивность Iba-1 в лобной коре, стриатуме и чёрной субстанции. На микрофотографиях представлены коронарные срезы лобной коры, стриатума и черной субстанции. Увеличение в коре и полосатом теле 200 \times ; в чёрной субстанции 100 \times ; шкала 100 $\mu\text{м}$.

Следует отметить, что в рамках другой модели болезни Паркинсона, когда нейродегенеративные изменения в нигростриарной дофаминергической системе индуцируют введением нейротоксина МФТП, также выявлено угнетение аутофагии в головном мозге у мышей. Отмечено значительное снижение экспрессии маркера LC3-II в черной субстанции у мышей под действием МФТП, тогда как в полосатом теле достоверных различий по сравнению с контролем не наблюдалось (Рис. 13).

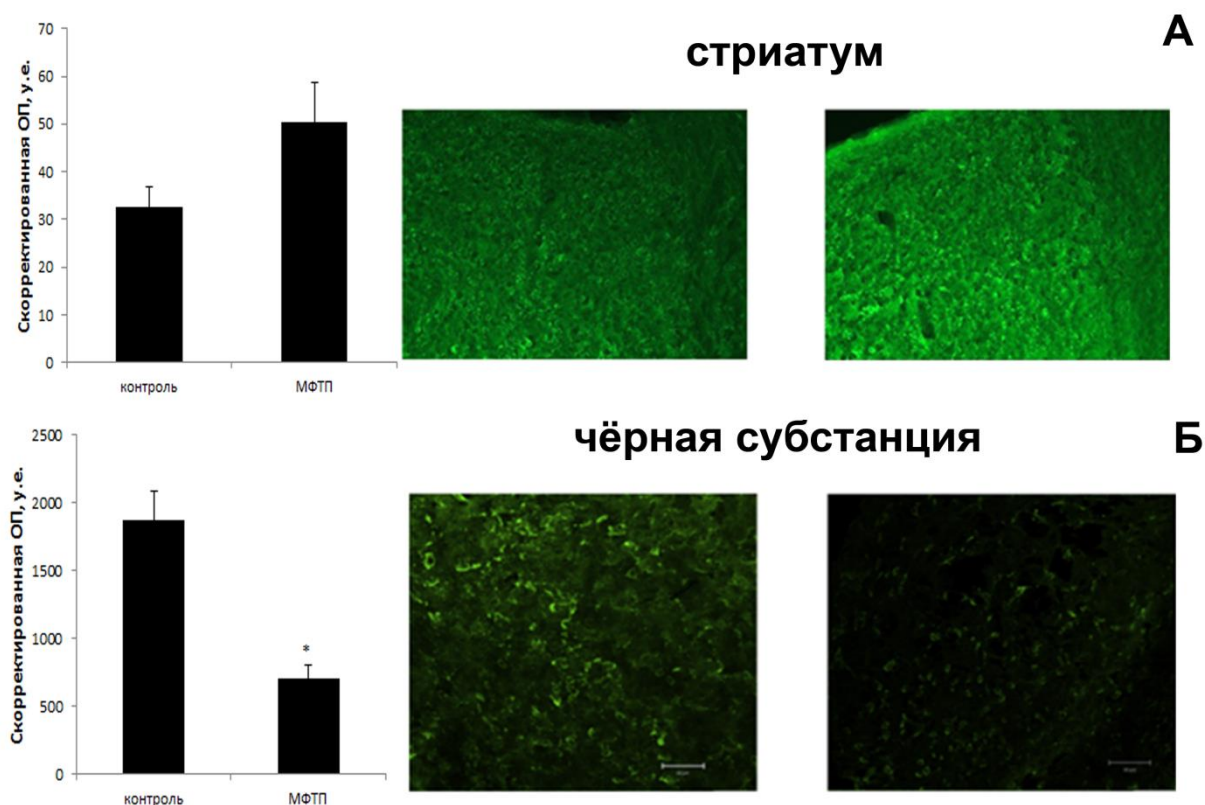


Рис. 13. Активность аутофагии, измеренная по экспрессии LC3-II в полосатом теле (А) и в чёрной субстанции (Б) у мышей с индуцированными

введением МФТП нейродегенеративными изменениями в нигростриарной системе. N=3-4 в группе. Статистически значимые различия: * $p < 0,05$ по сравнению с контрольными мышами. На микрофотографиях представлены коронарные срезы, иммуногистохимически окрашенных против LC3-II. Увеличение 100 \times ; шкала 100 μm .

Таким образом, обобщая выше представленное, можно сказать, что у 5-мес. мышей трансгенной линии наблюдается значительное снижение активности аутофагии в нигростриарной системе по сравнению с контролем, что сопровождается заметной дофаминергической дисфункцией. Подобные результаты были выявлены и у МФТП индуцированных мышей. Важно отметить, что у 5 мес. мышей трансгенной линии не наблюдается накопление агрегатов мутантного человеческого α -синуклеина, что подтверждается отсутствием нейровоспаления и активации микроглии в мозге. Накопление агрегатов α -синуклеина в лобной коре обнаружено у мышей в возрасте 7,5 мес., что привело к нейровоспалению.

3.1.2. Изменения в поведении мышей трансгенной линии с оверэкспрессией A53T-мутантного α -синуклеина человека в возрасте 5 месяцев.

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). По остальным параметрам (время в центре (тревожность), количество

вертикальных стоек (исследовательская активность), число актов дефекации (эмоциональность)) достоверной разницы отмечено не было.

Когнитивные функции оценивали в тестах Барнс (обучение, эпизодическая и долговременная память), Т-образный лабиринт по протоколу спонтанной альтерации (рабочая память) и тесте пассивного избегания (обучение и ассоциативная память страха). В тесте пассивного избегания мыши линии В6.Сg-Tg молодого возраста не проявили значимых отклонений в сравнении с контрольными животными дикого типа. В день теста длительность латентного периода перехода в темный «опасный» отсек не различалась между группами: $116,8 \pm 10,0$ с в контроле и $99,1 \pm 30,6$ с в группе трансгенных мышей ($p > 0,05$). В Т-образном лабиринте мутантные мыши также не отличались значимо от мышей дикого типа по числу правильных выборов (показатель рабочей пространственной памяти): $71,1 \pm 4,5\%$ в контроле и $70,5 \pm 4,7\%$ в группе трансгенных мышей ($p > 0,05$). В то же время, обнаружено достоверное повышение времени нахождения в стартовой зоне лабиринта у мышей с оверэкспрессией α -синуклеина, что указывает на заторможенность когнитивных процессов: $6,6 \pm 2,7$ с в контроле и $21,6 \pm 2,7$ с в группе трансгенных мышей ($p < 0,001$).

В тесте Барнс был отмечен ряд нарушений как в день теста, так и в период обучения у мышей В6.Сg-Tg молодого возраста. В течение первой минуты теста, когда все контрольные животные дикого типа отыскивают целевую лунку, только 45,5% мышей линии В6.Сg-Tg находили ее ($p < 0,01$). В то же время, в течение трех минут тестирования практически все животные и линии В6.Сg-Tg находили целевую лунку (90,1%). Полученные результаты не могут быть связаны со снижением двигательной активности животных мутантной линии, поскольку в тесте «открытое поле» они, напротив, проявили гиперактивность. Наиболее вероятно, они отражают заторможенность когнитивных функций у мышей линии В6.Сg-Tg и снижение исследовательской мотивации. Это подтверждается увеличением латентного времени нахождения целевой лунки мышами В6.Сg-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 у мышей В6.Сg-Tg ($28,0 \pm 3,3$) по сравнению с контролем ($48,8 \pm 4,5$; $p < 0,01$) и уменьшение числа тычков носа в целевую лунку у мышей В6.Сg-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 гиперэкспрессии 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. Динамика латентного времени (с) нахождения укрытия в течение четырех дней обучения (2-5 дни протокола) представлена на Рисунке 14.

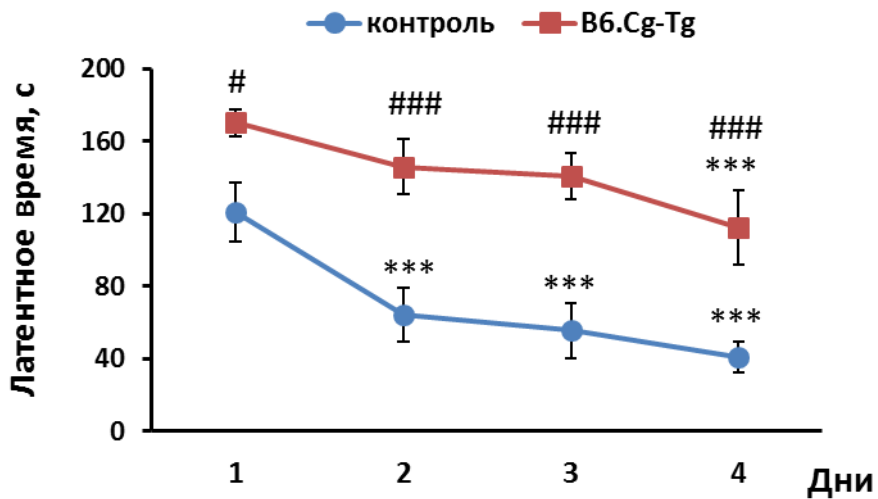


Рис. 14. Динамика обучения в тесте Барнс у мышей трансгенной линии В6.Сg-Tg с гиперэкспрессией α -синуклеина по латентному времени нахождения целевой лунки в течение четырех дней обучения. $N=11-12$ в группе. Статистически значимые различия: *** $p < 0,001$ по сравнению с первым днем обучения; # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ по сравнению с мышами дикого типа.

Среднее время нахождения целевой лунки с укрытием было достоверно меньше у мышей дикого типа во все дни, чем у животных линии В6.Сg-Tg. Более того, уже на второй день обучения латентное время у животных контрольной линии становится меньше, чем в первый день

обучения. В то время как у мышей линии B6.Cg-Tg достоверное уменьшение латентного времени нахождения целевой лунки с укрытием наблюдается только на четвертый день обучения.

Таким образом, у молодых мышей B6.Cg-Tg выявлено повышение общей двигательной активности, а также определенные отклонения в тесте Барнс и Т-образный лабиринт, указывающие на заторможенность когнитивных функций и снижение исследовательской мотивации.

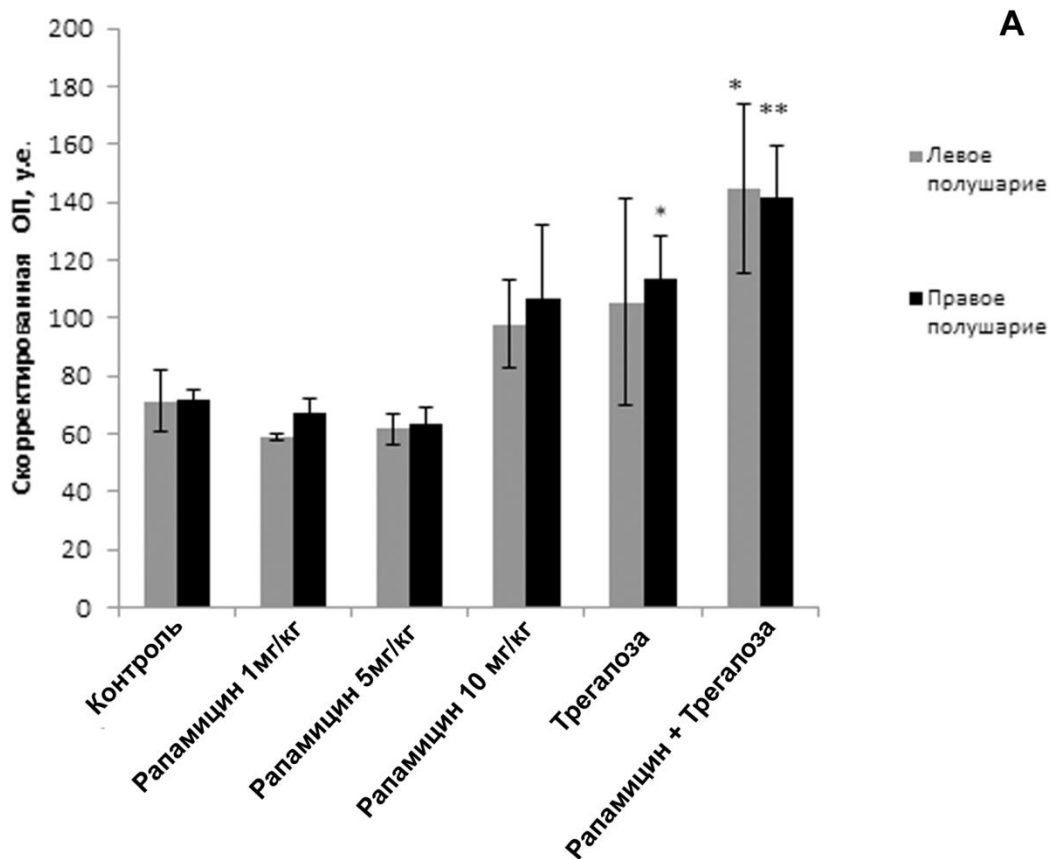
3.2 Оценка уровня активации аутофагии в различных структурах головного мозга с помощью индукторов аутофагии рапамицина и трегалозы у контрольных мышей линии C57BL/6

Мы применили рапамицин в разных дозах, чтобы определить наиболее эффективную концентрацию для индукции аутофагии в мозге у мышей.

Во фронтальной коре двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) выявил значительное влияние группового фактора ($F(5,12) = 8,0$, $p < 0,01$) и отсутствие значимого влияния полушария ($F(1,12) < 1$) или взаимодействие этих факторов ($F(5,12) < 1$) по экспрессии аутофагового маркера LC3-II. Этот параметр практически не меняется под действием рапамицина в дозе 1 и 5 мг/кг веса мыши. Показатель аутофагии повышался примерно в 1,5 раза под влиянием рапамицина в дозе 10 мг/кг и трегалозы, хотя достоверные изменения получены только для эффекта трегалозы в правом полушарии ($p < 0,05$). Наибольший и высоко достоверный эффект стимуляции аутофагии (примерно в 2 раза) вызывает совместное применение рапамицина (10 мг/кг) и трегалозы ($p < 0,01$) (Рис.15А). 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.15Б). Двухфакторный дисперсионный

анализ (ANOVA) выявил значительное влияние группового фактора ($F(5,12) = 7,89, p < 0,01$) и отсутствие значимого влияния полушария ($F(1,12) < 1$) или взаимодействие этих факторов ($F(5,12) < 1$) по вышеуказанному параметру в стриатуме. Практически для всех концентраций рапамицина, влияния на аутофагию не было выявлено. Трегалоза немного повышала величину экспрессии LC3-II, однако достоверный рост получен только для совместного применения рапамицина и трегалозы ($p < 0,01$).

Отметим, что наш интерес к стриатуму связан с тем, что там локализуются нейриты дофаминэргических нейронов, повреждающихся при болезни Паркинсона.



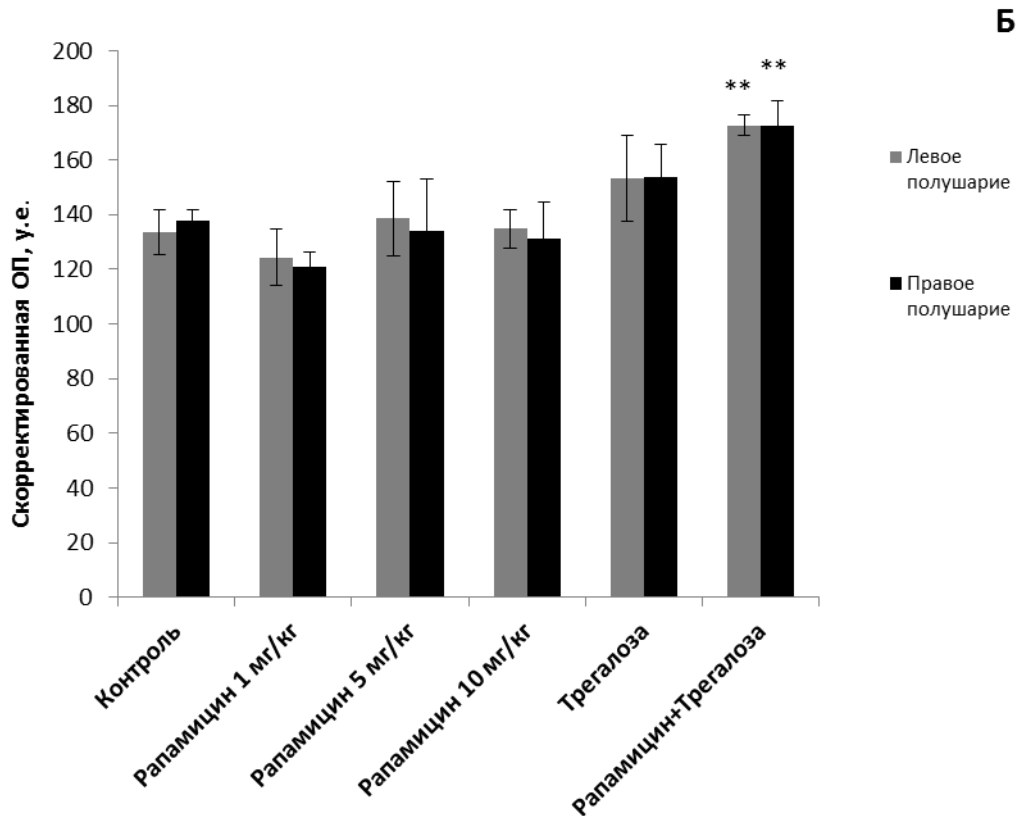


Рис.15. Эффект воздействия рапамидина(1, 5, 10мг/кг/вдень, 7 дней), трегалозы (2% в пит. воду, 7 дней) и их совместное применение на активность аутофагии, измеренная по экспрессии маркера LC3-II в коре (А) и стриатуме (Б) у мышей C57Bl/6. N=3-4 в группе. Статистически значимые различия: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по сравнению с контрольными мышами.

Мы впервые применили к оценке активности аутофагии в мозге осмотический тест, характеризующий стабильность лизосом *in vitro*, ранее практиковавшийся обычно для тканей паренхиматозных внутренних органов. Тест реагирует на соотношение вторичных лизосом (здесь - аутофаголизосом) и первичных лизосом (еще не участвовавших в процессах деградации). Вторичные лизосомы более чувствительны к повреждению в гипотоничной среде, что и используется в основе данного теста. Оценивается прирост свободной активности лизосомных ферментов под действием гипотоничной обработки лизосом. Тест выявляет активацию аутофагии, но не ее подавление, поскольку в норме индекс принимает низкие значения.

Осмотическая чувствительность лизосом в стриатуме изменялась в достаточно близком соответствии с экспрессией LC3-II в коре мозга и стриатуме (рис.16.). В стриатуме на этот показатель существенное влияние оказал групповой (лечебный) фактор ($F(4,16) = 10,46$, $p < 0,001$). Рапамицин в дозе 5 мг/кг не оказывал влияния, и слабый рост отмечен для рапамицина в дозе 10 мг/кг. Достоверный 2-кратный рост показателя получен для трегалозы и еще выше для совместного действия рапамицина и трегалозы. Таким образом, наиболее высокую и надежную активацию аутофагии в стриатуме вызывают трегалоза и ее комбинация с рапамицином. Эти данные хорошо согласуются с результатами иммуногистохимии по оценке экспрессии маркера LC3-II.

В среднем мозге, включающем в себя чёрную субстанцию, значительное влияние группового фактора ($F(4,13) = 4,16$, $p < 0,05$) на осмотическую чувствительность лизосомных мембран был замечен только в группе с применением рапамицина (10 мг/кг). Эффекты стимуляции аутофагии трегалозой и ее комбинацией с рапамицином были невысокими и недостоверными ($p > 0,05$). В данном случае для среднего мозга мы не обнаружили аддитивного эффекта стимуляции аутофагии совместным действием рапамицина и трегалозы в противоположность экспрессии LC3-II в коре мозга и стриатуме. По-видимому, надо принимать во внимание, что в стриатуме локализуются дендриты, обогащенные аутофагосомами, которые двигаются по нейритам к околядерной области нейронов, обогащенной лизосомами, где и образуются аутофаголизосомы. В среднем мозге, а точнее в чёрной субстанции, находятся тела дофаминэргических нейронов с образующимися аутофаголизосомами, таким образом, полученные различия могут быть связаны с преимущественной локализацией аутофагосом в стриатуме, а аутофаголизосом - в чёрной субстанции.

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

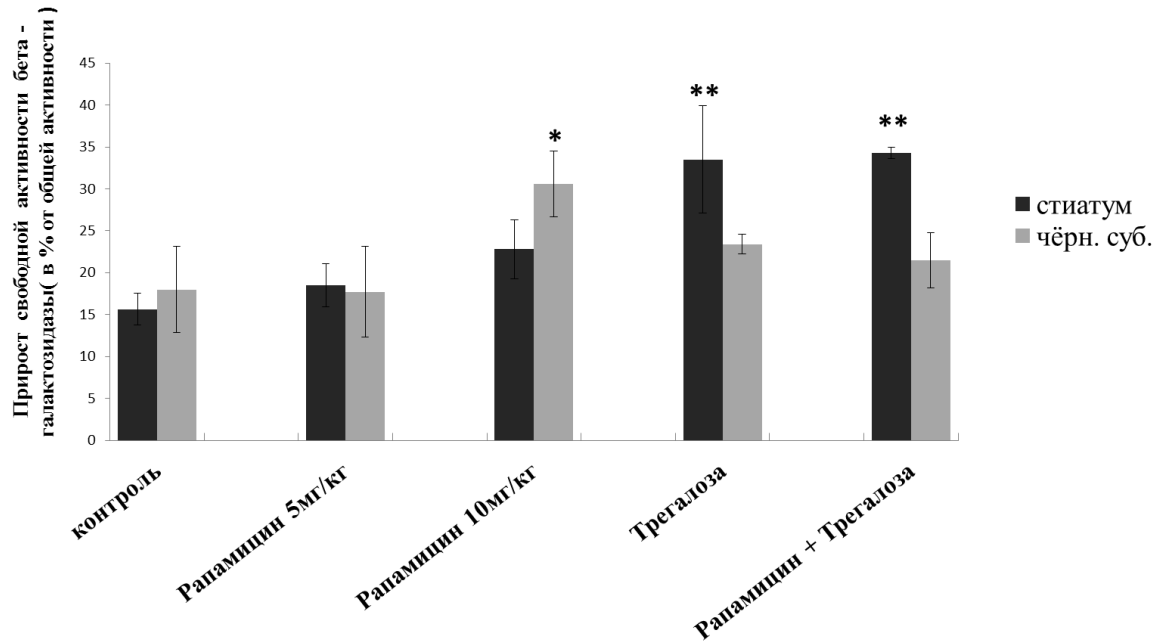


Рис.17. Осмотическая повреждаемость лизосом нейронов стриатума и среднего мозга при действии рапамицина (5мг/кг и 10мг/кг), трегалозы и их совместное применение у мышей линии C57Bl/6. Статистически значимые различия: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по сравнению с контролем. N=5-6 в группе.

Таким образом, у контрольных мышей линии C57Bl/6 наблюдается активация аутофагии в коре и стриатуме при совместном применении рапамицина в дозе 10мг/кг и трегалозы, что показывает аддитивный стимулирующий эффект индукторов. Влияние остальных доз рапамицина не было выявлено. По осмотическому тесту в чёрной субстанции достоверное усиление аутофагии наблюдается только при воздействии рапамицина в дозе 10мг/кг, а в стриатуме – при воздействии трегалозы и при совместном применении с рапамицином, что согласуется с результатом иммуногистохимического анализа.

3.3 Влияние индукторов аутофагии на активацию аутофагии в мозге у мышей с сверхэкспрессией α -синуклеина и под действием МФТП.

Мы оценили влияние индукторов аутофагии рапамицина и трегалозы в разных областях мозга (кора, полосатое тело, чёрная субстанция) у генетической линии мышей с оверэкспрессией α -синуклеина (B6.Cg-Tg) и МФТП -индуцированной модели БП с ослабленным нейровоспалением. Исходя из ранее полученных результатов на контрольных мышах C57Bl/6, рапамицин вводили внутривентриально 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. Тем не менее, значимых межгрупповых различий по экспрессии маркера LC3-II не выявлено ни во фронтальной коре ($F(5,12)=0,15$, $p>0,05$), ни в стриатуме ($F(5,12)=1,9$, $p>0,05$) или чёрной субстанции ($F(5,12)=0,7$, $p>0,05$) у мышей линии B6.Cg-Tg (Рис. 18). По-видимому, эффект активации аутофагии индукторами постепенно ослабевает после прекращения воздействия (био-образцы для ИГХ были взяты через 10 дней после отмены индукторов аутофагии).

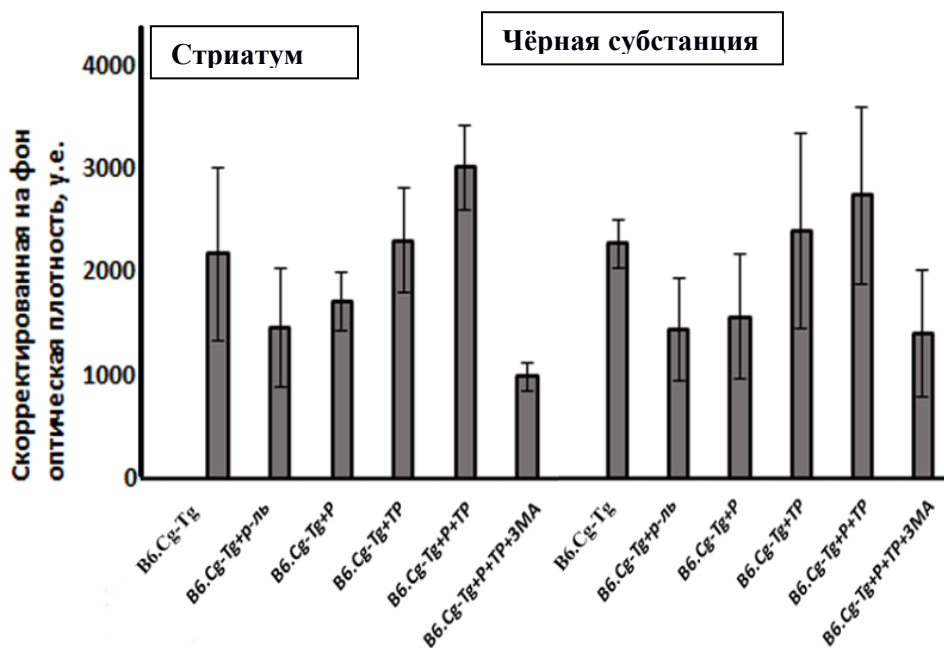


Рис.18. Влияние рапамицина (10 мг/кг/день внутривентриально, 7 раз, через день), трегалозы (2 % в питье, 2 недели) и их совместного применения на экспрессию LC3-II в стриатуме и в чёрной субстанции у трансгенной

модели (B6.Cg-Tg) БП с ослабленным нейровоспалением у мышей. N=3-4 в группе. Сокращения: Р - рапамицин; ТР- трегалоза; р-ль – растворитель; ЗМА – 3-метиладенин.

Значимых межгрупповых различий по экспрессии маркера LC3-II не было выявлено и у мышей с МФТП-индуцированной моделью БП (во фронтальной коре ($F(5,12)=1,1$, $p>0,05$), в стриатуме ($F(5,12)=0,84$, $p>0,05$), в черной субстанции ($F(5,12) =1,2$, $p>0,05$). В то же время, следует отметить, что несмотря на значительное время, прошедшее с момента интоксикации мышей с помощью МФТП (через 31 день), у группы без лечения индукторами аутофагии, в чёрной субстанции сохранялось снижение флуоресценции маркера аутофагосом LC3-II (больше чем в 2 раза) (Рис.19.). Применение индукторов аутофагии начинали через 7 суток после последней интоксикации. Под действием рапамицина и трегалозы флуоресценция маркера LC3-II усиливалась при всех вариантах терапии, хотя и не достоверно($p>0,05$).

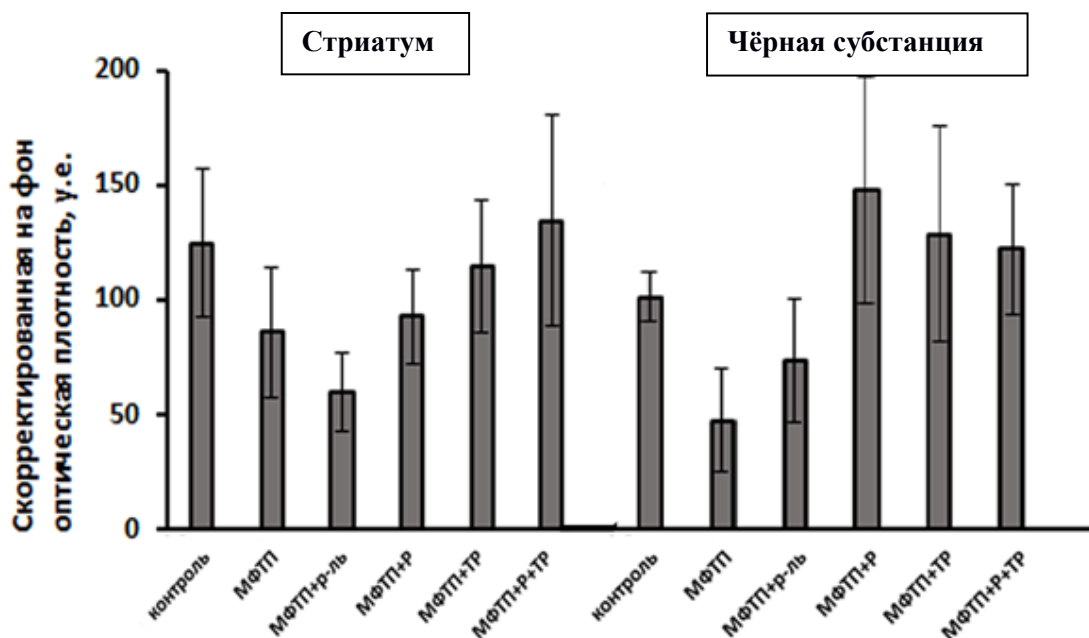


Рис.19. Влияние рапамицина(10 мг/кг/день внутривенно, 7 раз, через день), трегалозы (2 % в питье, 2 недели) и их совместного применения на экспрессию LC3-II в стриатуме и в чёрной субстанции в рамках МФТП-

индуцированной модели БП с ослабленным нейровоспалением у мышей. В рамках МФТП-индуцированной модели (20 мг/кг/день внутрибрюшинно, 4 раза) введение индукторов начинали через 7 дней после последней интоксикации. Группе МФТП + растворитель вводили растворитель рапамицина внутрибрюшинно (5 % этанол, 5 % твин-80, 5 % полиэтиленгликоль-400). N=3-4 в группе. Сокращения: Р - рапамицин; ТР-трегалоза; р-ль – растворитель.

При этом, значительные изменения экспрессии LC3-II обнаружены в нигростриарной системе у мышей с МФТП-индуцированными паркинсоноподобными нарушениями при «остром» режиме активации аутофагии (Рис 20.). Двухфакторный ANOVA показал значительное влияние группы ($F(5,12)=7,1$, $p < 0,01$) и отсутствие значимого влияния полушария ($F(1,12) < 1$) или взаимодействия между этими факторами ($F(5,12) < 1$) на уровне экспрессии LC3-II в стриатуме (Рис 20Б). Экспрессия LC3-II значимо не отличалась между группами, обработанными рапамицином (или рапамицином вместе с трегалозой), и соответствующим контролем (МФТП+растворитель рапамицина) ($p > 0,05$). Почти двукратное увеличение показателя наблюдалось в группе, получавшей трегалозу ($p < 0,05$), по сравнению с группой, получавшей МФТП. В области чёрной субстанции, где располагаются тела дофаминергических нейронов и глиальные клетки, двухфакторный ANOVA показал значительное влияние группы ($F(5,11) = 43,25$, $p < 0,001$) и отсутствие значимого влияния полушария ($F(1,11) = 4,03$, $p > 0,05$) или взаимодействия между этими факторами ($F(5,11) < 1$) по вышеуказанному параметру. Эта структура мозга реагировала на воздействие МФТП выраженным ингибированием аутофагии ($p < 0,05$). Трегалоза ($p < 0,01$) и её совместное применение с рапамицином существенно повысили этот показатель ($p < 0,001$) (Рис 20А).

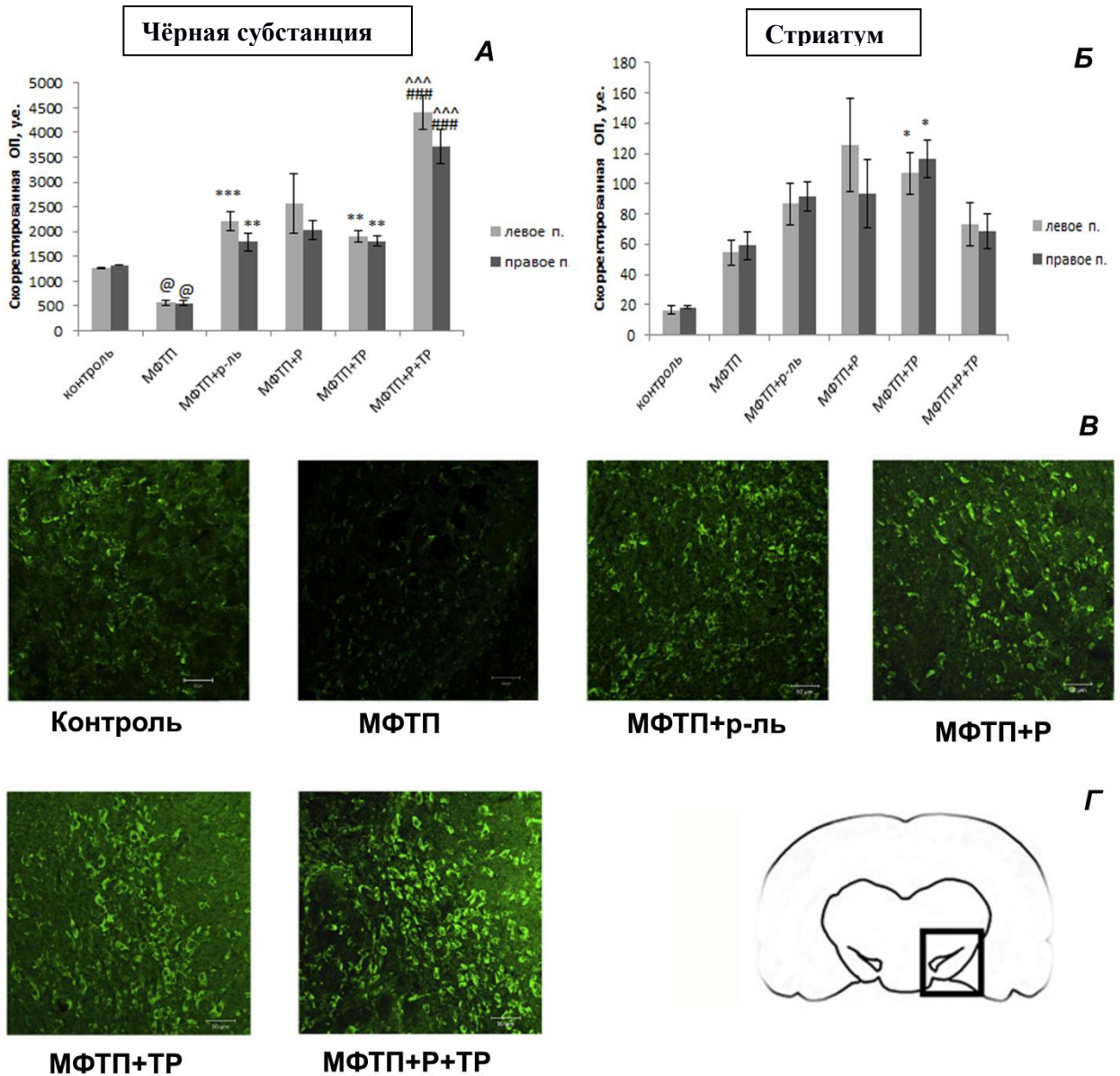


Рис.20. Влияние воздействия рапамицина (10мг/кг/день внутривбрюшинно, 7 дней), трегалозы (2% в питьевой воде, 7 дней) или их комбинации на активность аутофагии, измеряемую количественной иммунореактивностью LC3-II в чёрной субстанции (А) или стриатуме (Б) рамках МФТП-индуцированной модели БП у мышей. Введение индукторов аутофагии начинали через 2 дня после последней инъекции МФТП (20 мг/кг/день внутривбрюшинно, 4 раза). Группе МФТП + растворитель вводили растворитель рапамицина внутривбрюшинно (5 % этанол, 5 % твин-80, 5 % полиэтиленгликоль-400). В: Иммунореактивность LC3-II в чёрной субстанции. Увеличение, 200×; шкала, 50

мм. Прямоугольник в (Г) указывает на область, показанную в (В). N=3-4 в группе. 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. Сокращения: Р - рапамицин; ТР- трегалоза; р-ль – растворитель.

В целом, отдельное и совместное влияние рапамицина и трегалозы на активность аутофагии, оцениваемой по экспрессии LC3-II, оказалось более значимым в эксперименте с «острым» режимом введения индукторов аутофагии. Влияние одного рапамицина на экспрессию аутофагового маркера LC3-II в стриатуме и в чёрной субстанции было слабым, в то время как существенный прирост этого показателя наблюдается в группах с применением трегалозы и при сочетании с рапамицином.

3.4. Влияние активации аутофагии в мозге индукторами аутофагии на нейрональные и поведенческие изменения у мышей, вызванные гиперэкспрессией α -синуклеина 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.

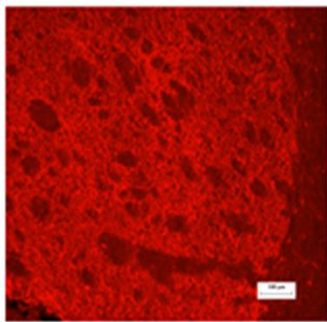
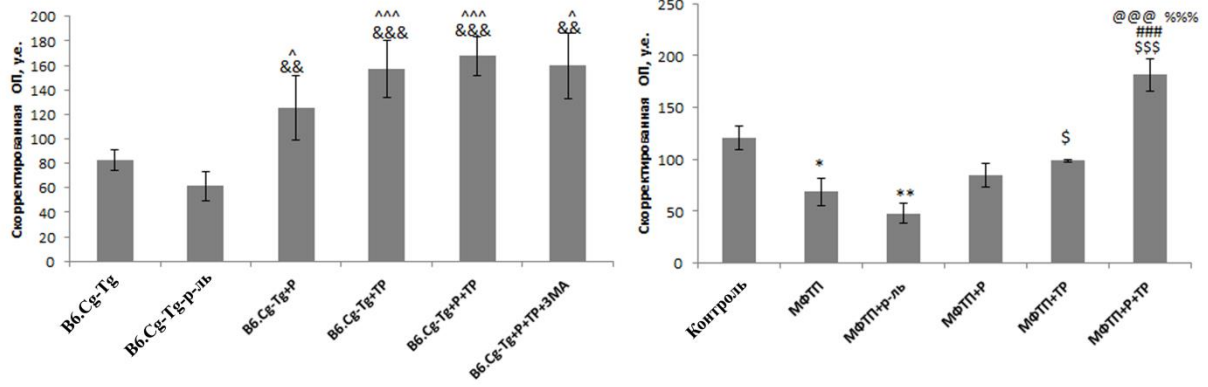
Для трансгенной модели ранее мы показали снижение экспрессии ТГ в нигростриарной системе по сравнению с контрольными животными дикого типа. Под действием индукторов аутофагии рапамицина и трегалозы экспрессия ТГ в стриатуме трансгенных мышей достоверно увеличилась при всех вариантах терапии ($F(5,18)=4,8$, $p < 0,01$) (для рапамицина – в 1,5 раза ($p < 0,01$), трегалозы — 1,9 раза ($p < 0,001$), совместного воздействия – 2 раза ($p < 0,001$) по сравнению с соответствующим контролем (Рис.21А). В чёрной субстанции (Рис.21Б) также выявлены достоверные межгрупповые различия

($F(5,18)=5,9$, $p < 0,05$): 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 ($p < 0,01$). Примечательно, что экспрессия ТГ в стриатуме достоверно позитивно коррелировала с экспрессией LC3-II ($R_{35}=0,568$, $p < 0,001$).

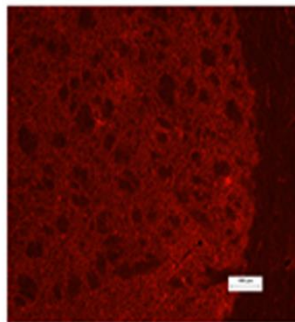
В рамках фармакологической модели БП, индуцированной МФТП, при «отложенном» режиме воздействия индукторов (через 7 дней после введения МФТП) также выявлены выраженные межгрупповые различия в стриатуме ($F(11,35)=8,9$, $p < 0,001$) и чёрной субстанции ($F(11,34)=4,1$, $p < 0,01$) (Рис.21А,Б). При воздействии нейротоксина наблюдается значительное снижение экспрессии ТГ в чёрной субстанции от уровня контрольных мышей ($p < 0,05$) (Рис.21Б). 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 ($p < 0,05$). В стриатуме (Рис.21А) снижение экспрессии ТГ под действием МФТП тоже было заметным (до 57 %, ($p < 0,05$), 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 ($p < 0,001$).

Стриатум

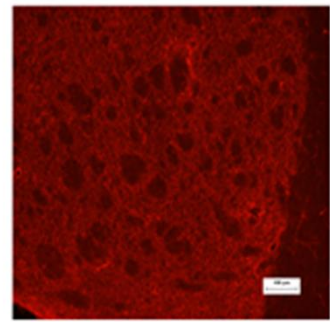
A



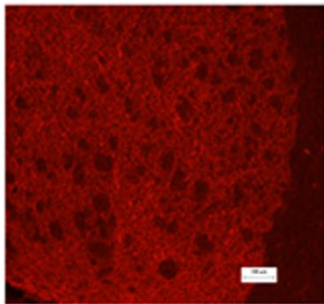
контроль



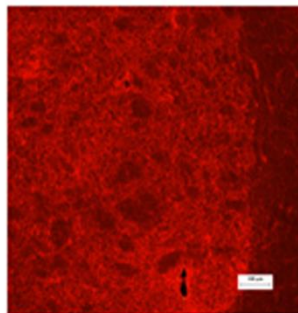
MФТП



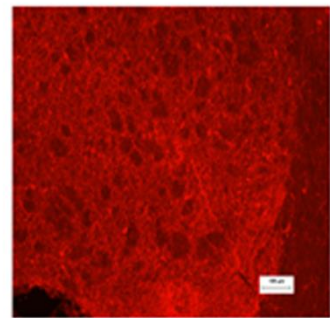
MФТП-p-ль



MФТП+P



MФТП+TP



MФТП+P+TP

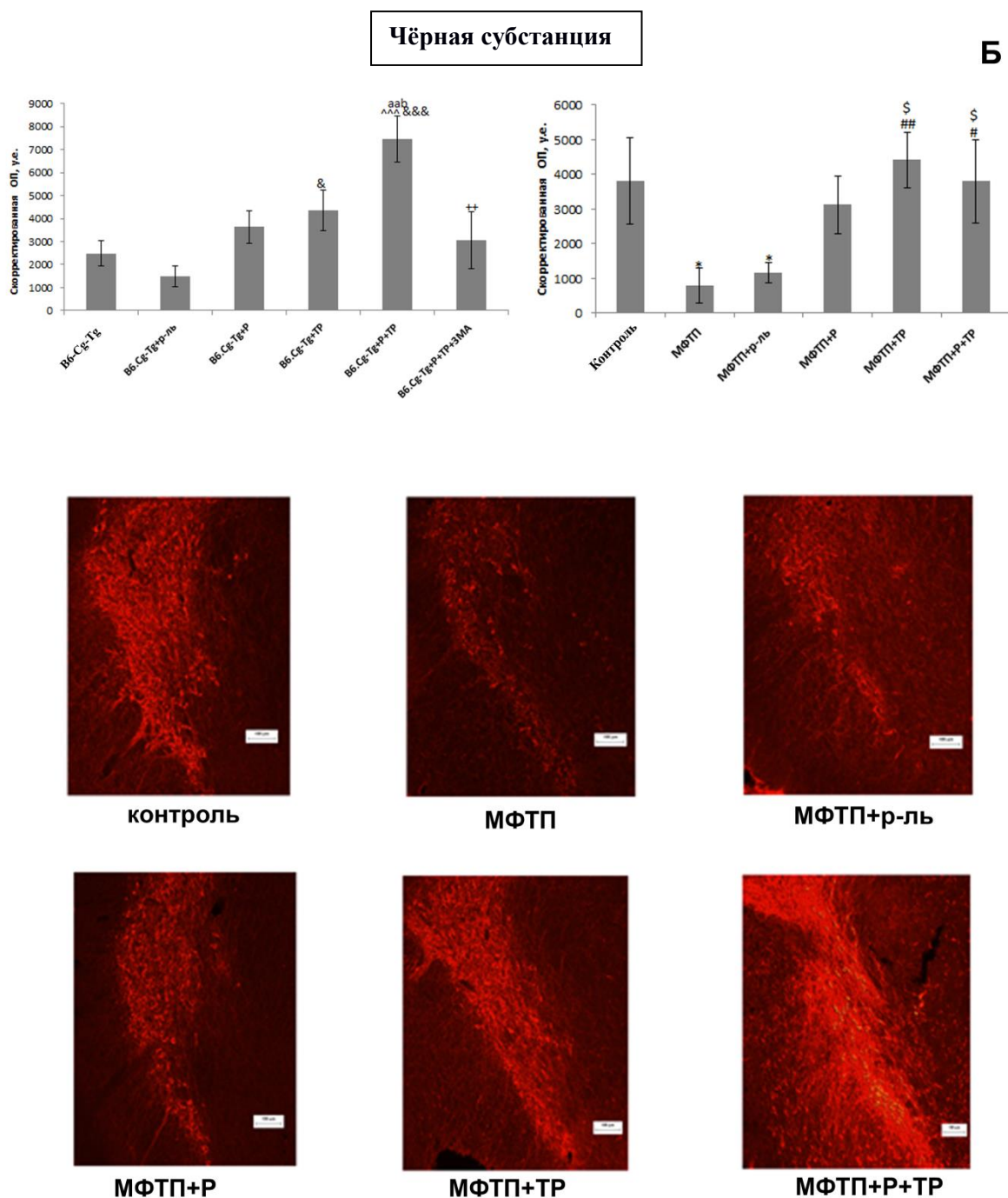


Рис.21. Влияние рапамицина, трегалозы и их совместного применения на экспрессию тирозин гидроксилазы (ТГ) в стриатуме (А) и в чёрной субстанции (Б) в рамках генетической модели БП с оверэкспрессией А53Т-мутантного α -синуклеина человека (B6.Cg-Tg) и МФТП-индуцированной модели БП с ослабленным нейровоспалением у мышей. N=3-4 в группе. Увеличение 200x (стриатум) и 100x (чёрная субстанция), шкала 50 μ m. 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+P; %%% - $p < 0,001$ по сравнению с МФТП+TP; ^ - $p < 0,05$, ^^ - $p < 0,001$ по сравнению с B6.Cg-Tg; & - $p < 0,05$, && - $p < 0,01$, &&& - $p < 0,001$ по сравнению с B6.Cg-Tg +р-ль; aa - $p < 0,01$ по сравнению с B6.Cg-Tg +P; b - $p < 0,05$ по сравнению с МФТП+TP; ++ - $p < 0,01$ по сравнению с B6.Cg-Tg +P+TP. Сокращения: P - рапамицин; TP- трегалоза; р-ль – растворитель; ЗМА – 3-метиладенин.

В эксперименте, где введение индукторов началось через 2 дня после применения МФТП («острый» режим), двухфакторный ANOVA выявил значительное влияние группы ($F(5,12)=14,79$, $p < 0,001$) и отсутствие значимого влияния полушария ($F(1,12) < 1$) или взаимодействия между этими факторами ($F(5,12) = 1,59$, $p > 0,05$) на экспрессию ТГ в чёрной субстанции. Под действием МФТП 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. Рис.22.

В стриатуме двухфакторный дисперсионный анализ выявил достоверное влияние группы ($F(5,12) = 10,37$, $p < 0,001$) и отсутствие значимого влияния полушария ($F(1,12)=1,37$, $p > 0,05$) или взаимодействия этих факторов ($F(5,12) = 1,96$, $p > 0,05$) на экспрессию ТГ. Иммуногистохимический анализ экспрессии ТГ показала, что МФТП значимо снижает интенсивность флуоресценции этого маркера в стриатуме ($p < 0,01$) (Рис.23.). Трегалоза и ее комбинация с рапамицином эффективно восстанавливали уровень ТГ в стриатуме до контрольного уровня ($p < 0,001$).

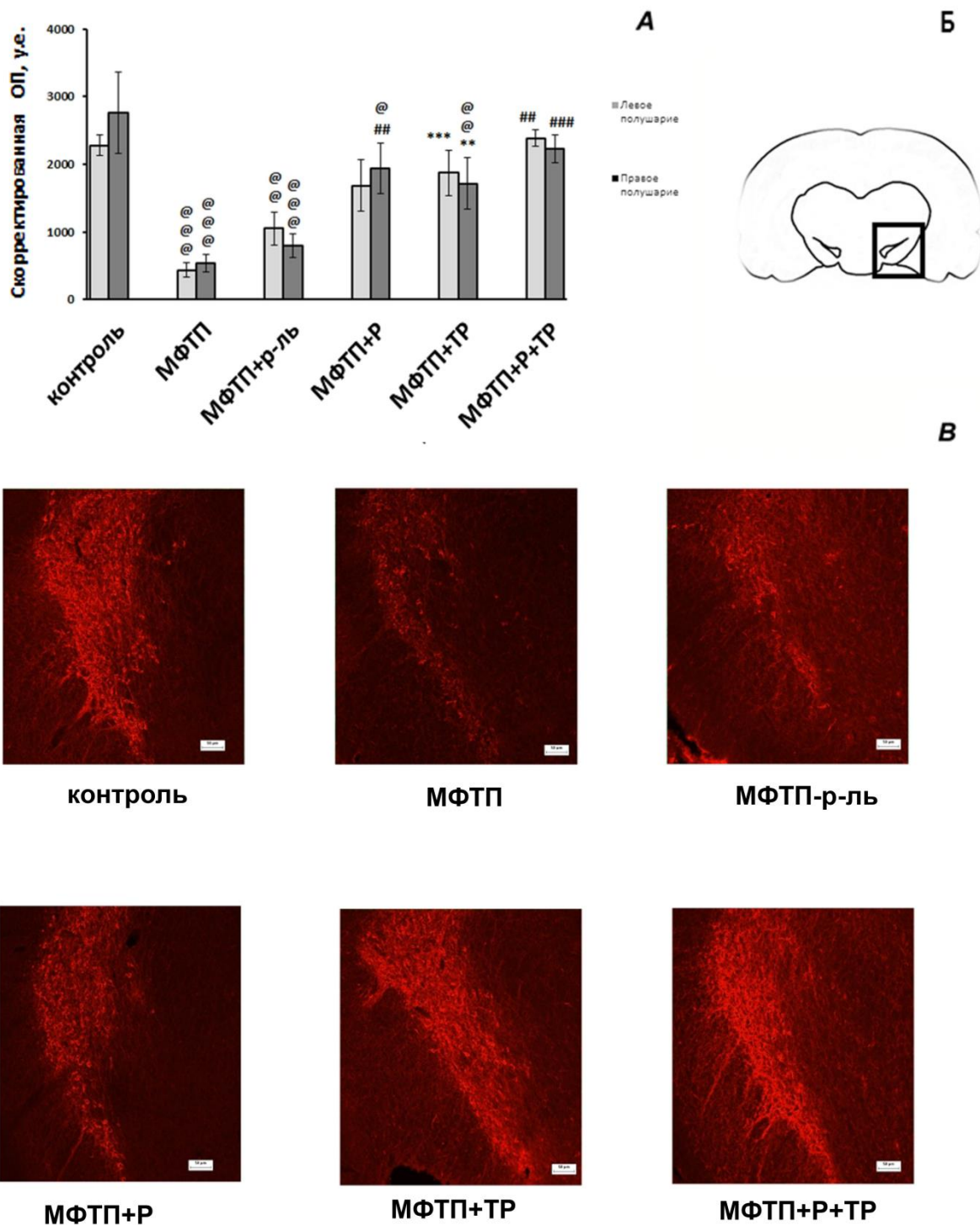


Рис.22. Влияние рапамицина, трегалозы или их комбинации в «остром» режиме (начиная с 3-го дня после применения МФТП) на экспрессию тирозингидроксилазы (ТГ) в чёрную субстанцию в рамках модели БП, индуцированной МФТП, у мышей. А: Количественные результаты. В: Иммунореактивность ТГ в чёрной субстанции. Увеличение,

100×; шкала 50 μm. Прямоугольник в (Б) указывает на область, показанную в (В). 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. Сокращения: Р - рапамицин; ТР- трегалоза; р-ль – растворитель.

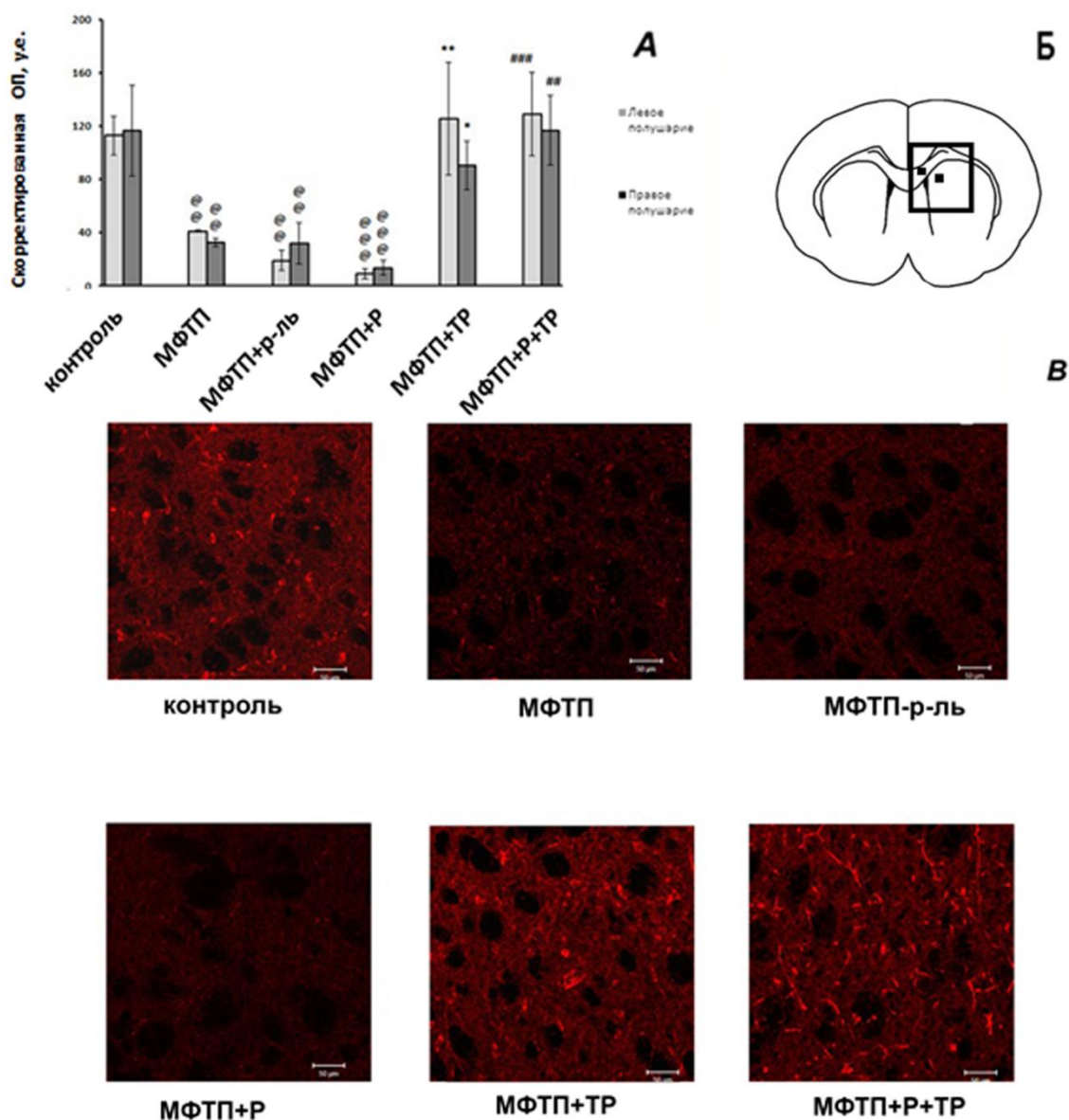


Рис.23. Влияние рапамицина, трегалозы или их комбинации в «остром» режиме (начиная с 3-го дня после применения МФТП) на экспрессию тирозингидроксилазы (ТГ) в стриатуме в рамках модели БП, индуцированной МФТП, у мышей. А: Количественные результаты. В:

Иммунореактивность ТГ в стриатуме. Увеличение, 200×; шкала 50 мкм. Прямоугольник в (Б) указывает область, показанную в (В), и два маленьких черных квадрата внутри прямоугольника указывают области, используемые для измерения оптической плотности (ОП) в полосатом теле. N=3-4 в группе. Статистически значимые различия: $^{@@} p < 0,01$, $^{@@@} p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой; $^* p < 0,05$; $^{**} p < 0,01$ по сравнению с группой, получавшей МФТП; $^{##} p < 0,01$, $^{###} p < 0,001$ по сравнению с группой МФТП + р-ль. Сокращения: Р - рапамицин; ТР-трегалоза; р-ль – растворитель.

Как уже было описано ранее, у 5 мес. мышей трансгенной линии B6.Cg-Tg не наблюдается активации микроглии. Скорее наоборот, есть признаки подавленности базового уровня активности микроглии в исследуемых структурах мозга (кора, стриатум, чёрная субстанция). Выявлено достоверное влияние применения индукторов аутофагии на экспрессию микроглиального маркера Iba-1, отражающего активацию аутофагии, у мышей с оверэкспрессией альфа-синуклеина в коре ($F(5,12)=37,5$, $p<0,001$), стриатуме ($F(5,12)=7,5$, $p<0,01$) и чёрной субстанции ($F(5,12)=12,7$, $p<0,01$). Применение трегалозы и её совместное введение с рапамицином значительно восстановило этот показатель в коре ($p<0,001$) и стриатуме ($p<0,01$). В чёрной субстанции значимый эффект был только при совместном применении индукторов ($p<0,01$) (Рис.24.). Схожая картина наблюдается у мышей в рамках МФТП-индуцированной модели БП с ослабленным нейровоспалением (через 31 дня после воздействия МФТП). У группы, обработанной МФТП, достоверно снижена уровень микроглиального маркера Iba-1 в коре ($p < 0,05$) и стриатуме ($p<0,01$) по сравнению с контролем. Выявлено достоверное влияние применения индукторов аутофагии на активацию микроглии в коре ($F(5,12)=4,7$, $p<0,01$) и в стриатуме ($F(5,12)=8,7$, $p<0,001$). В чёрной субстанции влияние МФТП

через 31 дня после интоксикации уже менее заметен ($p>0,05$), ровно как и восстановительный эффект индукторов (Рис.24).

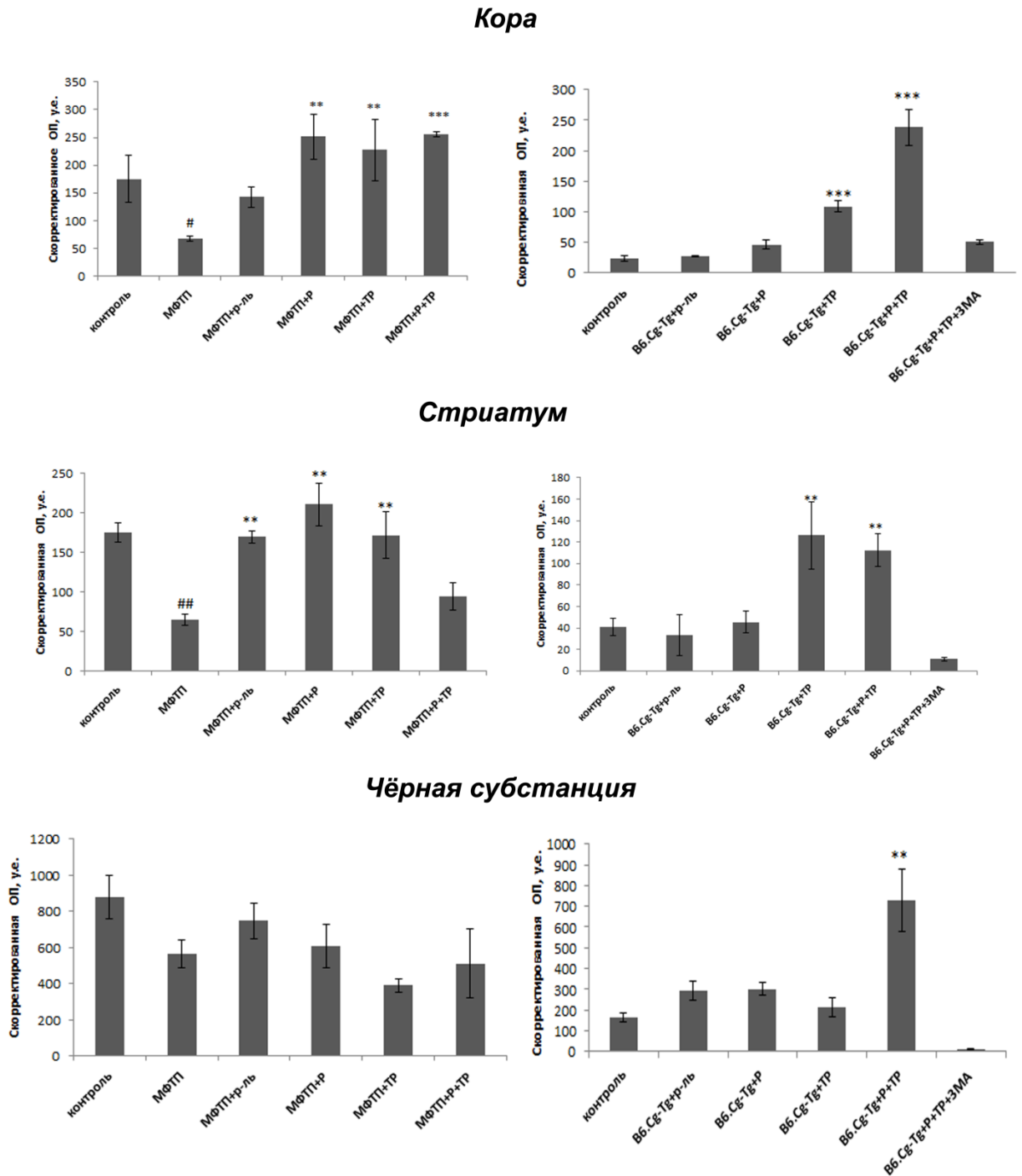


Рис.24. Влияние рапамицина, трегалозы и их совместного применения на экспрессию микроглиального маркера Iba-1, отражающего активацию микроглии в коре, стриатуме и чёрной субстанции у трансгенных мышей с оверэкспрессией A53T-мутантного α -синуклеина человека (B6.Cg-Tg) и в рамках МФТП-индуцированной модели 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-Tg; #- $p < 0,05$; ##- $p < 0,01$ по сравнению с контролем C57Bl/6. Сокращения: Р - рапамицин; ТР-трегалоза; р-ль – растворитель; ЗМА – 3-метиладенин.

В целом, существенное восстановление нейронов нигростриатума с помощью индукторов аутофагии, оцениваемое по экспрессии ТГ, отмечено для действия трегалозы и особенно для ее сочетания с рапамицином. Подобный результат выявлен и для микрогальной активности. Трегалоза и его сочетание с рапамицином восстановили подавленную активность микроглии до контрольных значений.

Тест «памяти страха» (УРПИ).

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 в «остром» и «отложенном» режимах на обучение и память в рамках МФТП-индуцированной модели БП при выработке условной реакции пассивного избегания в тесте пассивного избегания.

В «остром» режиме, где лечение начинали через 2 дня после введения МФТП, выявлено значительное влияние применения препаратов ($F(5,30) = 4,1$, $p < 0,01$), обучения (фактор повторных измерений) ($F(1,30) = 106,6$, $p < 0,001$) и взаимодействия этих факторов ($F(5,30) = 4,4$, $p < 0,01$) на латентный период захода в опасный отсек. Не выявлено значимых межгрупповых различий по латентному периоду захода в темный отсек в день обучения (до удара током). Как свидетельство обучения в день тестирования, через 24 часа после получения электрошока, у контрольных

мышей наблюдалось увеличение латентного периода примерно в 10 раз (150 с.) по сравнению с днём обучения ($p < 0,001$). В отличие от контрольной группы, латентный период мышей из групп «МФТП» и «МФТП + растворитель рапамицина», был резко снижен (примерно в 3 раза), что свидетельствует об ухудшении обучения и памяти о страхе ($p < 0,001$). Индукторы аутофагии в значительной степени восстановили этот показатель. Все три вида лечения (рапамицин или трегалоза отдельно или их комбинация) заметно улучшили дефицит обучения, о чем свидетельствуют значимое удлинение латентного периода по сравнению с соответствующими контрольными группами («МФТП» и «МФТП + растворитель рапамицина»). Тем не менее, аддитивного терапевтического эффекта при комбинации рапамицина и трегалозы не наблюдалось, и не происходило полного восстановления до значений контроля. Рис.25.

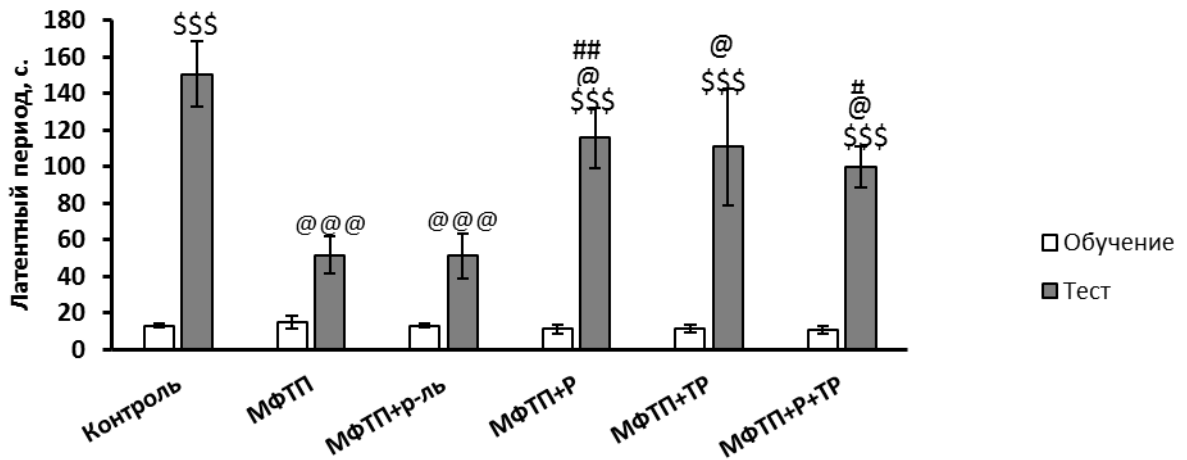


Рис.25. Влияние рапамицина, трегалозы и их совместного применения в «остром» режиме (начиная с 3-го дня после применения МФТП) на обучение и память при выработке условной реакции пассивного избегания (УРПИ) в рамках МФТП-индуцированной модели БП у мышей. N=5-6 в группе. Статистически значимые различия: \$\$\$ $p < 0,001$ по сравнению с тренировочным днём; @ $p < 0,05$, @@ $p < 0,01$, @@@ $p < 0,005$ 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, оцениваемую по латентному периоду захода в опасный отсек. 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.26.

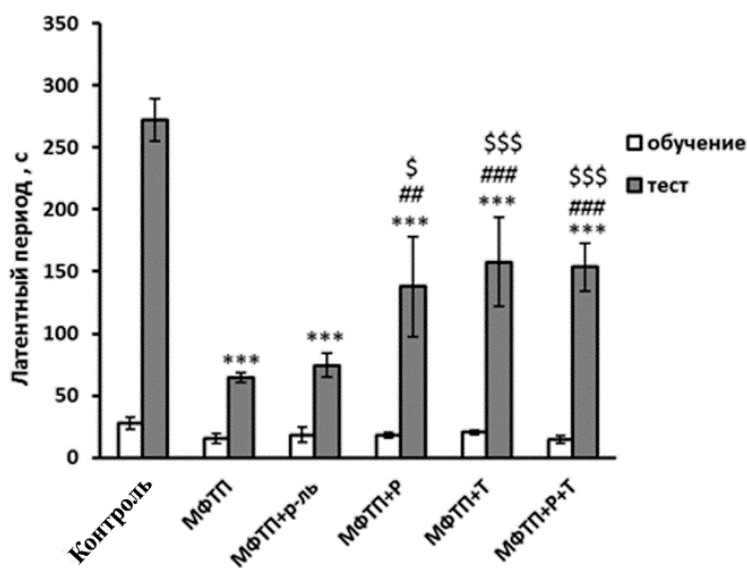


Рис.26. Влияние рапамицина, трегалозы и их совместного применения в «отложенном» режиме (через 7 дней после введения МФТП) обучение и память при выработке условной реакции пассивного избегания (УРПИ) в рамках МФТП-индуцированной модели БП с ослабленным нейровоспалением у мышей. N=5-6 в группе. Статистически значимые различия: *** - $p < 0,001$ по сравнению с контролем; ## - $p < 0,01$, ### - $p < 0,001$ по сравнению с МФТП; \$\$\$ - $p < 0,001$ по сравнению с МФТП+ р-ль. Сокращения: Р - рапамицин; Т- трегалоза; р-ль – растворитель.

Оценку моторных функций проводили с помощью теста «открытое поле» в рамках МФТП-индуцированной модели БП, в котором оценивали показатели общей двигательной активности (длину пробега мыши), вертикальной и исследовательской активности (количество вертикальных стоек), тревожности (длительность нахождения в центре поля) и эмоциональности (количество дефекаций). В экспериментах как с «острым» ($F(4,33) = 3,86$, $p < 0,05$), так и с «отложенным» ($F(5,26) = 8,0313$, $p < 0,001$) режимом воздействия индукторов выявлены достоверные межгрупповые различия по общей двигательной активности мышей (Рис.27). В эксперименте с «острым» воздействием у всех групп, подвергшихся воздействию МФТП, наблюдается подъем моторной активности, достоверного влияния индукторов на этот показатель не обнаружено. По другим поведенческим параметрам (количество стоек, время нахождения в центре поля, количество дефекаций) существенных различий между группами не выявлено. Как показывает результат эксперимента с «отложенным» режимом, стимулирующий эффект влияния МФТП через 30 дней исчезает ($p > 0,05$), несмотря на это, достоверный рост двигательной активности под действием рапамицина и трегалозы сохраняется (Рис.27.Б).

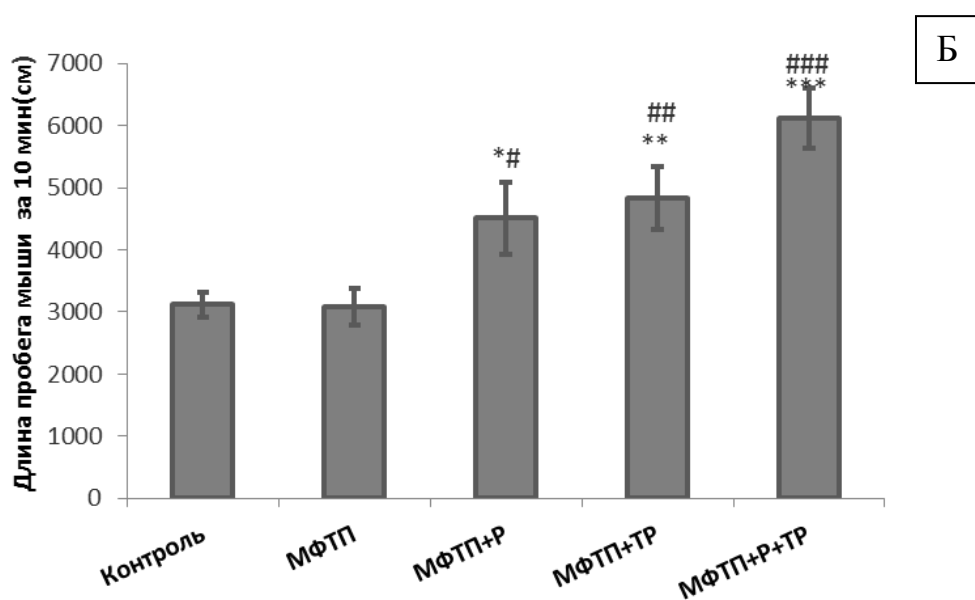
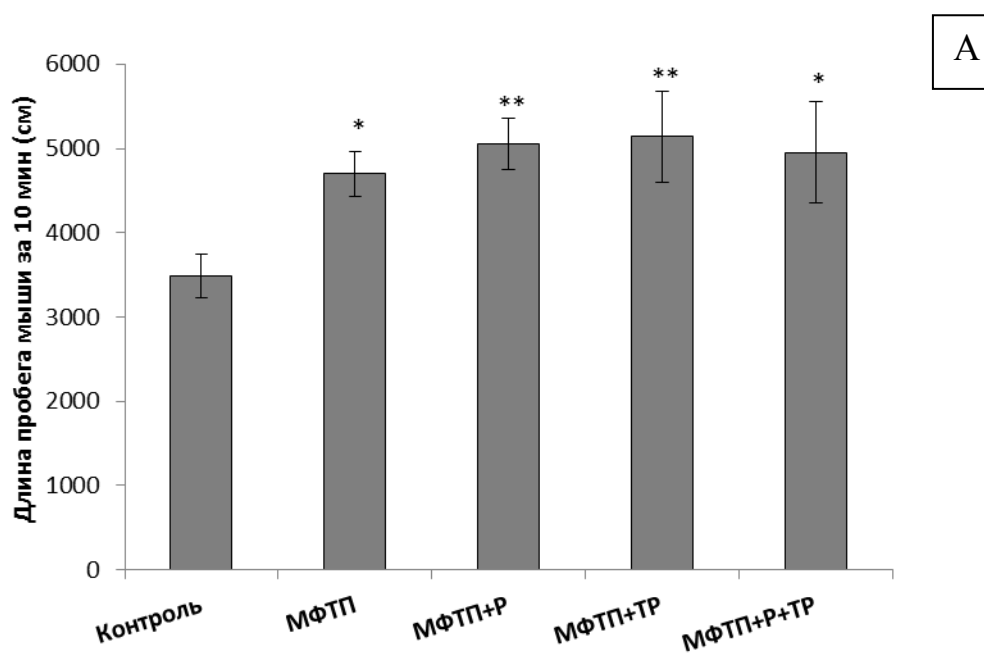


Рис.27. Влияние рапамицина, трегалозы и их совместного применения на общую двигательную активность в тесте «открытое поле» при «остром» (А) и «отложенном» (Б) режимах воздействия у мышей в рамках МФТП-индуцированной модели БП. N=5-6 в группе. Статистически значимые различия: * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$ *** - $p < 0.001$ по сравнению с контролем, # - $p < 0.05$, ## - $p < 0.01$ ### - $p < 0.001$ по сравнению с МФТП. Сокращения: Р - рапамицин; ТР- трегалоза.

Таким образом, частичное восстановление когнитивной функции в тесте «памяти страха» (УРПИ) у мышей в рамках МФТП-индуцированной модели БП наблюдается и в «остром», и «отложенном» режимах воздействия индукторов аутофагии, по отдельности и в комбинации. Результаты исследования когнитивной функции являются специфичными и не связаны с нарушением общей двигательной активности под действием МФТП.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Аутофагия представляет собой высоко консервативный путь лизосомной деградации, активный на базовом уровне во всех клетках. При старении одним из ключевых нарушений, наряду со многими изменениями на клеточном уровне, является постепенное снижение активности убиквитин-протеасомной системы и аутофагии. Это, по-видимому, играет важную роль как в физиологическом старении, так и в развитии возрастных расстройств (Nieto-Torres et al., 2021). Нейроны, как постмитотические клетки, не имеющие пролиферативного ресурса, в значительной степени зависят от аутофагии, так как для поддержания клеточного гомеостаза необходим постоянный контроль качества белков и органелл. Поэтому нарушение аутофагии, как основной системы очистки клеток, приводит к возникновению таких заболеваний, как нейродегенеративные нарушения, в частности - болезнь Паркинсона. БП представляет собой сложное мультисистемное нарушение, характеризующееся патологией α -синуклеина, дегенерацией нигростриарных дофаминергических нейронов и проявлением множество моторных и немоторных симптомов. В отличие от других нейрональных нарушений, для БП разработан широкий спектр доступных моделей: фармакологических, токсинных, генетических и α -синуклеиновых, сосредоточенных на различных молекулярных и цитокинетических механизмах заболевания. Применение 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП), 6-гидроксидофамина (6-OHDA), ротенона и других специфических токсинов подходит для краткосрочного моделирования БП, так как нейропатологические эффекты последних протекают в течение ограниченного периода и частично обратимы (Bazzu et al., 2010). Как правило, эти модели вызывают разрушение митохондриальных комплексов, участвующих в окислительном фосфорилировании, и наряду с увеличением количества активных окислительных частиц, вызывают

быструю потерю дофаминергических клеток, что приводит к двигательной дисфункции и немоторным дефицитам. Несмотря на их частое использование, эти модели не полностью воспроизводят прогрессирующую природу заболевания (Lama, et al., 2021). С открытием семейных форм БП исследователи создали модели на животных, которые пытаются воспроизвести болезнь посредством генетической мутации. Трансгенные технологии, связанные со сверхэкспрессией α -синуклеина (Natami et al., 2014), используются для изучения стойкой дофаминергической дисфункции. Эти модели характеризуются различной активностью промоторов, прикрепленных к перенесенному гену α -синуклеина, что приводит к увеличению синтеза α -синуклеина в головном мозге (в несколько раз по сравнению с контрольными животными) (Giasson, 2002). В головном мозге пациентов с идиопатической формой БП наблюдается сниженная каталитическая активность протеасомной системы наряду со сниженной экспрессией α -субъединицы протеасомы 20S (McNaught et al., 2001). В некоторых моделях потеря нейронов в чёрной субстанции и повреждение дофаминергических нейритов в полосатом теле проявлялось уже у одномесечных трансгенных мышей и сопровождалось нарушением аутофагии и лизосомального потока (Lin et al., 2012). В других исследованиях было обнаружено более позднее накопление LC3-II-позитивных аутофагосом или активация аутофагического потока без слияния с лизосомальным потоком (Crews et al., 2010). Однако снижение активности аутофагии у мышей с генетически обусловленной сверхэкспрессией α -синуклеина встречается чаще (Natami et al., 2014). Была выявлена отрицательная корреляция между уровнями α -синуклеина и активностью аутофагии, поскольку повышенная экспрессия α -синуклеина ингибирует аутофагию, в то время как экспериментальная активация аутофагии, в свою очередь, приводит к деградации агрегатов α -синуклеина (Wu et al., 2015). Таким образом, ослабление базового уровня аутофагии может быть

возможной причиной возникновения подобных нейродегенеративных нарушений.

Накопление A53T-мутантного α -синуклеина запускает три типа клеточного ответа, связанного с аутофагией, включая его ингибирование, компенсаторную активацию макроаутофагии неселективного типа в ответ на ингибирование ШОА и токсические эффекты мутантного α -синуклеина. Хотя нет данных о прямом влиянии α -синуклеина на основные регуляторы аутофагии, некоторые предыдущие сообщения указывали на определенные молекулярные эффекты α -синуклеина, связанные с модуляцией аутофагии. Во-первых, α -синуклеин влияет на Rab1, белок слияния пузырьков, что приводит к неправильной локализации и дисфункции белка аутофагии Atg 9 и ингибированию образования предшественников аутофагосом (Winslow et al., 2010). Второй путь включает взаимодействие α -синуклеина с белком HMGB1, что приводит к нарушению цитозольной транслокации последнего, ингибированию связывания HMGB1 с регулятором аутофагии Beclin1 и тем самым усилению связывания Beclin1 с белком Beclin 2, который окончательно подавляет аутофагию (Wang et al., 2016). Третий эффект мутантного α -синуклеина заключается в дестабилизации лизосом, что приводит к ингибированию расщепления α -синуклеина, накоплению аутофагосом и усугублению нарушений аутофагии (Dehay et al., 2010). Почти все эти результаты были получены на моделях *in vitro*.

Линия мышей B6.Cg-Tg (Prnp-SNCA* A53T) 23Mkle/J, по-видимому, является подходящей моделью для изучения этих молекулярных механизмов *in vivo*. В настоящем исследовании мы оценили активность аутофагии у модели трансгенных мышей с избыточной экспрессией гена мутантной формы человеческого A53T альфа-синуклеина, связанного с промотором приона Prnp мыши. Исследование выявило низкую аутофагическую активность дофаминергических структур у 5-месячных трансгенных мышей. Выявлено заметное снижение аутофагии в полосатом

теле и более слабое изменение в чёрной субстанции. Наши результаты согласуются с результатами других исследований, которые связаны с аккумуляцией α -синуклеина в пресинаптических окончаниях у трансгенных мышей, его большим накоплением в стриатуме по сравнению с чёрной субстанцией (Lee et al., 2002). Дисфункция нигростриарной дофаминергической системы у мышей B6.Cg-Tg подтверждается данными по иммуноокрашиванию тирозингидроксилазы (ТГ), которые указывают на значительное уменьшение последнего в стриатуме. Этот результат хорошо согласуется с другими исследованиями БП у людей и моделей у животных, которые выявили значительное снижение уровней мРНК и белка ТГ в головном мозге, связанное с оверэкспрессией α -синуклеина (Feve et al., 2012). Следует отметить, что иммуноокрашивание ТГ не изменилось в чёрной субстанции мышей B6.Cg-Tg, что согласуется с данными предыдущих исследований о сохранении количества дофаминергических нейронов в данной структуре у молодых 5-мес. мышей этой линии (Oaks et al., 2013). Мы наблюдали коэкспрессию ТГ и LC3-II в некоторых клетках чёрной субстанции и волокнах полосатого тела. Однако из-за очень низкой экспрессии обоих маркеров в стриатуме трансгенных мышей B6.Cg-Tg оценка совместной экспрессии была невозможна. Таким образом, следует ожидать наложения нарушенных физиологических механизмов, которые лежат в основе влияния оверэкспрессии мутантного α -синуклеина на экспрессию ТГ и подавление аутофагии. Более раннее повреждение нейритов по сравнению с телом дофаминергических нейронов может быть связано с нарушением образования аутофагосом на периферии нейрона.

Первоначальные исследования аутофагии были сосредоточены на ее основной роли в поддержании жизнеспособности нейронов, но более свежие данные свидетельствуют о том, что аутофагия также контролирует определенные процессы в микроглии, такие как метаболическая приспособленность, процесс воспаления, фагоцитоз (Plaza-Zabala et al., 2021). Хотя активация микроглии широко исследуется на анимальных моделях БП,

тем не менее вовлечение микроглии в патофизиологические механизмы развития нарушений остается спорным вопросом. В наших исследованиях у 5-месячных мышей трансгенной линии не было обнаружено как накопления агрегатов α -синуклеина, так и активированной микроглии. Скорее наоборот, наблюдается подавленность активности микроглии в некоторых структурах мозга (фронтальная кора, стриатум, чёрная субстанция). Такой результат, скорее всего, связан с подавлением аутофагии, в том числе и в микроглии этих структур мозга, что привело к нарушению функции этих клеток. В гиппокампе и в миндалине значимых различий по экспрессии микроглиального маркера Iba-1 по сравнению с диким типом не было обнаружено. У 7,5 месячных мышей линии B6.Cg-Tg картина кардинально меняется, поскольку в коре, вокруг крупных сосудов, уже обнаруживаются скопление агрегатов α -синуклеина и проявляется микроглиальная активность.

Согласно характеристикам линии B6.Cg-Tg (<https://www.jax.org/strain/006823>), у мышей спонтанно развиваются нейродегенеративные нарушения и прогрессирующая двигательная дисфункция в возрасте от 9 до 16 месяцев. Однако определенные поведенческие изменения у трансгенных мышей были отмечены в более молодом возрасте 5–6 мес. Оценка двигательных нарушений по тесту «открытое поле» показало достоверное повышение значений пройденного пути у линии B6.Cg-Tg по сравнению с контролем. Подобные результаты были выявлены и в рамках МФТП-индуцированной модели БП. Как уже отмечено выше, моделирование поражения моторных нейронов нигростриатума с помощью МФТП проявляется нарушением двигательной активности, которая в зависимости от дозы и схемы введения нейротоксина, может как подавляться, так и стимулироваться (Sedelis et al., 2001). Полученные нами результаты подтверждаются данными других исследований, и, скорее всего, это связано с усилением обмена дофамина (Wang et al., 2013) и серотонина (Sedelis et al., 2001). В эксперименте с

«отложенным» режимом наблюдается слабый эффект токсина на двигательную активность, поскольку прошло около месяца со дня последней обработки МФТП, и нейроны успели восстановиться.

Когнитивные функции оценивали в тестах Барнс (обучение, эпизодическая и долговременная память), Т-образный лабиринт по протоколу спонтанной альтерации (рабочая память) и тесте «пассивного избегания» (обучение и ассоциативная память страха). В тесте «пассивного избегания» существенных различий по сравнению с контролем дикого типа у трансгенных мышей не обнаружено, что показывает адекватную обучаемость и ассоциативную память у них в 5-месячном возрасте. При этом у них наблюдается заторможенность когнитивных процессов, выявленная в Т-образном лабиринте и в тесте Барнса. В тесте Барнса у молодых мышей линии B6.Cg-Tg дополнительно выявлено достоверное снижение исследовательской мотивации по сравнению с диким типом. Следует отметить, что обнаруженные изменения в когнитивной сфере были специфичными и не связаны с угнетением общей двигательной или исследовательской активности. Обобщая результаты поведенческих тестов 5-месячных мышей трансгенной линии, можно сказать, что уже в молодом возрасте в рамках этой модели развиваются определенные немоторные поведенческие нарушения. Выявленное здесь снижение аутофагии тоже может быть добавлено к ранним признакам формирования нейродегенеративных изменений.

Одной из главных задач исследования было выяснение ответа на индукцию аутофагии под действием рапамицина и трегалозы в отделах мозга, содержащих дофаминергические нейроны, установление сходства реакций аутофагии, тестируемых различными методами (иммуногистохимия, осмотический тест), и исследование эффекта стимуляции аутофагии рапамицином и трегалозой на поведенческие реакции мышей у моделей БП. Рапамицин, действуя на mTOR, во многих случаях индуцирует существенную активацию аутофагии и терапевтический эффект на

анимальных моделях нейродегенерации (Cassamo et al., 2010). Однако нередко ингибирование активности mTOR оказывается недостаточным для торможения гибели нейронов (Switon et al., 2017). В связи с этим исследуются возможности включения других, mTOR-независимых путей активации аутофагии. Одним из веществ, привлекающих особое внимание исследователей, является дисахарид трегалоза, проявляющий терапевтический эффект через различные механизмы действия, включая активацию mTOR-независимой аутофагии. Хотя у млекопитающих некоторое количество трегалозы расщепляется на глюкозу в тонком кишечнике с помощью трегалазы, предполагают, что эффекты трегалозы на аутофагию не связаны с ее метаболизмом в глюкозу (Sarkar et al., 2007; Mizushima, 2010). Sarkar и соавторы (2007) продемонстрировали, что трегалоза индуцирует аутофагию, предотвращая образование и очищая клетки от агрегированных белков, таких как α -синуклеин и мутантный хантингтин. Эта способность может защитить клетки от последующих проапоптотических повреждений, возникающих из-за митохондриальной дисфункции. Двойная роль трегалозы как индуктора аутофагии и химического шаперона может способствовать восстановлению паркинсоноподобных нарушений.

Вначале действие индукторов аутофагии рапамицина и трегалозы мы проверили на контрольных мышцах инбредной линии C57Bl/6, так как эффективные дозы препаратов для индукции аутофагии в мозге не были известны. При иммуногистохимическом исследовании фронтальной коры мозга найдено, что экспрессия LC3-II возрастает под действием рапамицина (10 мг/кг) и трегалозы (2%) примерно в одинаковой мере. Важно, что наибольший эффект активации аутофагии, достигающий 2-кратного роста, получен при совместном действии рапамицина и трегалозы. Это соответствует аддитивному эффекту действия препаратов на аутофагию, найденному в системе *in vitro* (Sarkar et al., 2007), и впервые выявлен нами *in vivo*. Важно, что в целом подобный результат получен для экспрессии LC3-II

и в стриатуме, где наибольший эффект стимуляции аутофагии отмечен для совместного действия рапамицина и трегалозы.

Важно было найти подтверждение данной реакции аутофагии другими методами. Один такой подход основан на реакции клеточных мембран на модуляцию аутофагии, например, под действием глюкагона или голодания. Данная реакция, связанная с образованием вторичных лизосом (здесь – аутофаголизосом), сопровождается снижением стабильности лизосомных мембран, и выявляется, например, с помощью осмотического шока лизосом *in vitro*. Оценивается выход из лизосом их маркерных ферментов, таких как β -галактозидаза, N-ацетилглюкозаминидаза и др. Это тест на позднюю стадию аутофагии, связанную с процессом внутрилизосомного переваривания фагоцитированного материала. Для лизосом нейронов среднего мозга, включающего чёрную субстанцию, этот показатель практически не изменялся при всех исследованных воздействиях, что соответствует отсутствию мембраноповреждающих эффектов исследуемых воздействий. Исследование осмотической повреждаемости лизосом стриатума показало довольно близкое соответствие этих данных экспрессии LC3-II в коре мозга и стриатуме, хотя эти показатели характеризуют разные стадии аутофагии. Найдено отсутствие эффекта низких концентраций рапамицина, выраженное влияние трегалозы и ее совместного действия с рапамицином в дозе 10 мг/кг. Отметим, что осмотический тест отражает соотношение между аутофаголизосомами и первичными лизосомами, которые локализуются в телах дофаминэргических нейронов чёрной субстанции (Lynch-Day et al., 2012). Если оценка экспрессии LC3-II с помощью ИГХ окрашивания больше связана с выявлением аутофагосом, локализующихся преимущественно в стриатуме, и в аутофаголизосомах антиген LC3-II деградирует, то осмотический тест описывает преимущественно изменение соотношения между аутофаголизосомами и лизосомами в телах нейронов чёрной субстанции, где скапливаются эти субпопуляции везикул. Таким образом, осмотический тест лучше описывает

изменения активности аутофагии в чёрной субстанции, а оценка экспрессии LC3-II методом ИГХ – в стриатуме. По стриатуму собраны комплексные данные, полученные разными подходами, отражающие максимальный эффект на аутофагию комбинированного воздействия рапамицина и трегалозы.

Эффект индукции аутофагии с помощью рапамицина, трегалозы и их совместном применении у моделей БП в целом схожи. Следует, однако, отметить, что в отличие от трансгенной модели начальный уровень аутофагии до воздействия индукторов у фармакологической модели БП, вызванной четырехкратным введением МФТП, значительно увеличен в стриатуме, где находятся нейриты Дофаминергических нейронов и образуются аутофагосомы. Такие противоположные аутофаговые ответы в стриатуме у фармакологической модели по сравнению с генетической моделью, скорее всего, связаны с нейровоспалением, которое возникает у мышей при введении МФТП, и запуском компенсаторных механизмов в ответ на резкое воздействие токсина. Организм таким образом пытается очиститься от вредных веществ. Как показал «отложенный режим», снижение уровня аутофагии в чёрной субстанции сохраняется даже спустя месяц после воздействия МФТП, хотя восстанавливающий эффект индукторов в отношении активации аутофагии, в таком растянутом режиме, как в чёрной субстанции, так и в стриатуме, был слабым. У генетической модели БП все варианты индукции аутофагии тоже оказывали умеренное влияние на активность аутофагии в мозге. По-видимому, стимулированное индукторами повышение активности аутофагии не является стойким и быстро угасает при прекращении воздействия индукторов. В то же время, нейропротекторные эффекты активации аутофагии сохраняются длительное время и хорошо выражены во всех моделях.

В целом, основным результатом работы является демонстрация восстановления дофаминергических нейронов в нигростриарной системе с помощью двух «альтернативных» путей индукции аутофагии.

Терапевтическое действие, оцениваемое с помощью иммуногистохимии ТГ, найдено для обоих путей регуляции аутофагии - mTOR -зависимого (рапамицин) или mTOR-независимого (трегалоза). Некоторым терапевтическим преимуществом обладали трегалоза и ее комбинация с рапамицином в восстановлении экспрессии тирозин-гидроксилазы. Важно отметить, что с помощью индукторов аутофагии восстановилась и микроглиальная функция у моделей БП до контрольного уровня.

Характерными изменениями при моделировании БП с помощью МФТП являются в том числе и когнитивные нарушения (Naga et al., 2019), которые, в отличие от моторных нарушений, сохраняются длительное время после интоксикации. В настоящей работе мы оценили влияние индукторов аутофагии на обучаемость и память мышей при выработке УРПИ в «остром» и «отложенном» режимах. Через сутки после обучения тестирование показало, что при обоих режимах у МФТП-обработанных мышей время избегания «болевого» отсека резко сокращалось (примерно в 3 раза) по сравнению с контролем, что указывает на дефицит обучения и памяти страха. Применение МФТП избирательно влияет на дофаминергические нейроны и приводит к нарушению их функции, в частности, окислительному стрессу и снижению образования АТФ, и как следствие, истощению количества дофамина в дофаминергических нейронах (More et al., 2016). Дофамин является ключевым нейромедиатором не только для двигательных функций, он играет критическую роль в модуляции обучения и памяти во фронтальной коре, стриатуме и гиппокампе благодаря дофаминергической иннервации этих областей (Jay, 2003). Хотя все 3 воздействия – рапамицином, трегалозой и их комбинацией частично восстановили когнитивную функцию, повысив длительность пассивного избегания, тем не менее, полного возвращения показателей к уровню контрольных животных у мышей в рамках МФТП-индуцированной модели БП не происходило. Следует отметить, что аддитивного эффекта рапамицина и трегалозы не обнаружено. Хотя рапамицин и трегалоза стимулируют аутофагию через разные сигнальные

пути, характер аутофагового ответа, по-видимому, схож и связан с макроаутофагией неселективного типа. Нейродегенеративные заболевания и БП в частности имеют сложную природу, в их патогенез вовлечены помимо нарушений протеостаза различные процессы, которые тесно взаимодействуют и пересекаются, такие как окислительный стресс, нейровоспаление, нарушения митохондриальной функции, ионного гомеостаза клеток, нейротрофической функции, нейрогенеза и пр. Поэтому современной тенденцией при разработке подходов к коррекции нейродегенеративных заболеваний становится формирование многоцелевых комбинированных патогенетически важных воздействий (combination-drugs-multi-targets, CDMT), не вызывающих отрицательных эффектов (Sahoo et al., 2018). Ряд исследовательских групп по всему миру работает в рамках стратегии CDMT (Tikhonova et al., 2022). Мы предполагаем, что благотворное влияние индукторов аутофагии рапамицина и трегалозы в отношении когнитивных паркинсоноподобных нарушений можно усилить сочетанием с веществами, направленными на другие терапевтические мишени, например, активацию митофагии или нейротрофической функции. Следует также отметить, что трегалоза сама по себе является мультицелевым средством, т.к. модулирует несколько механизмов, важных при нейродегенеративных расстройствах. Повышение ее эффективности за счет улучшения фармакокинетики (например, усиления биодоступности трегалозы, абсорбции из желудочно-кишечного тракта или проникновения в клетки мозга) также рассматривается как перспективное направление исследований (Puryshev et al., 2022).

Нейродегенеративные расстройства являются многофакторными и многогранными нарушениями, течение которых со временем затрагивает всё новые звенья. Ослабленная аутофагия, по-видимому, может быть одним из первых признаков/причин возникновения нейродегенеративных изменений при старении и нейродегенеративных заболеваниях. Мультицелевое воздействие через разные пути активации аутофагии (mTOR-зависимый и

mTOR-независимый) может значительно улучшить контроль качества белка и как следствие – способствовать восстановлению нормального функционирования нейронов мозга в целом. Таким образом, совместное применение индукторов аутофагии рапамицина и трегалозы может служить как многообещающий подход в ослаблении паркинсоноподобных изменений (Рис.28).

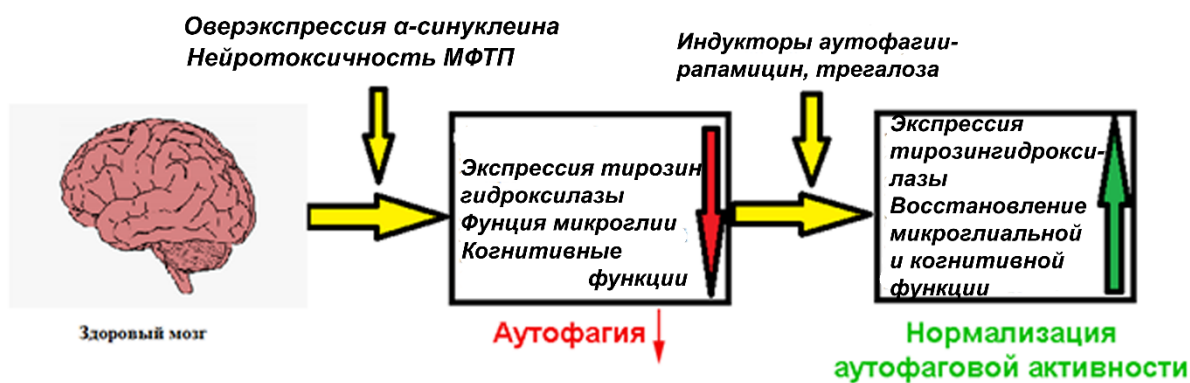


Рис.28 Влияние аутофаговой активности клеток мозга на функционирование нигростриарной системы мозга, микроглиальную функцию и поведение животных, отражающее когнитивную функцию.

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 нигростриарной системе, что сопровождается заметной дофаминергической и микроглиальной дисфункцией и поведенческими изменениями. Сниженная активность аутофагии является 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 нигростриарной системе у мышей с оверэкспрессией α -синуклеина и на МФТП-индуцированной модели болезни Паркинсона. Влияние рапамицина на этот показатель было незначимым.
4. Функциональное восстановление нейронов нигростриатума и показателей когнитивной функции под действием индукторов аутофагии отмечено для трегалозы и особенно ее сочетания с рапамицином у мышей с оверэкспрессией α -синуклеина и на МФТП-индуцированной модели болезни Паркинсона. Восстановительный эффект наблюдается и в отношении микроглиальной активности.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ЭМ- электронная микроскопия

ГЭР- гладкий эндоплазматический ретикулум

ATG- гены связанные с аутофагией

PI3K- фосфатидилинозитол киназа

TSC $\frac{1}{2}$ - белки туберозного склероза $\frac{1}{2}$

Rheb – гомолог Ras обогащённый в мозге

АМРК- AMP протеин киназа

LC3- ассоциированный с микротрубочками протеин 1 лёгкие цепи 3

LAMP-2A- лизосомо-ассоциированный мембранный белок 2A

HIF1- фактор индуцированной гипоксией 1

TFEB – фактор транскрипции EB

БП - болезнь Паркинсона

ТГ – тирозин-гидроксилаза

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

Р – рапамицин

ТР – трегалоза

ЗМА – 3- метиладенин

УРПИ – условный рефлекс пассивного избегания

mTOR – серин-треониновая киназа (мишень рапамицина)

MAO-B - моноаминоксидаза Б

TFEB - фактор транскрипции EB

ИГХ – иммуногистохимия

ШОА – шаперон- опосредованная аутофагия

Список литературы

1. Пупышев А.Б. Терапевтическая мишень Торможения нейродегенерации: Аутофагия / А.Б. Пупышев, Т. А. Короленко, М. А. Тихонова // ЖУРНАЛ ВЫСШЕЙ НЕРВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ им. И.П. Павлова. - 2016, - Т. 66, - № 5, - С. 515–540
2. Пупышев А. Б. Эффекты и механизмы действия рапамицина на экспериментальную нейродегенерацию / А. Б. Пупышев, Т. А. Короленко, М. А. Тихонова // Нейрохимия. – 2018. – Т. 35. – №. 4. – С. 338-350.
3. Bazzu G. et al. α -Synuclein-and MPTP-Generated Rodent Models of Parkinson's Disease and the Study of Extracellular Striatal Dopamine Dynamics: A Microdialysis Approach/ G. Bazzu, P. A. Serra, M. S. Desole, et al., // CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders). – 2010. – Т. 9. – №. 4. – С. 482-490.
4. Blommaert E. F. C. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes / E. F. C. Blommaert, U. Krause, J. P. Schellens, H. Vreeling-Sindelárová, A. J. Meijer // European journal of biochemistry. – 1997. – Т. 243. – №. 1-2. – С. 240-246.
5. Boland B. et al. Promoting the clearance of neurotoxic proteins in neurodegenerative disorders of ageing / B. Boland, W. H. Yu, O. Corti, B. Mollereau, A. Henriques, E. Bezard, M. J. Millan // Nature reviews Drug discovery. – 2018. – Т. 17. – №. 9. – С. 660-688.
6. Bunge M. B. Fine structure of nerve fibers and growth cones of isolated sympathetic neurons in culture // The Journal of cell biology. – 1973. – Т. 56. – №. 3. – С. 713-735.
7. Caccamo A. Molecular interplay between mammalian target of rapamycin (mTOR), amyloid- β , and Tau: effects on cognitive impairments/ A. Caccamo, S. Majumder, A. Richardson et al. // Journal of Biological Chemistry. – 2010.

– T. 285. – №. 17. – C. 13107-13120.

8. Cheng X. T. Characterization of LAMP1-labeled nondegradative lysosomal and endocytic compartments in neurons / X. T. Cheng, Y. X. Xie, B. Zhou, N. Huang, T. Farfel-Becker, Z. H. Sheng // *Journal of Cell Biology*. – 2018. – T. 217. – №. 9. – C. 3127-3139.
9. Cheng X. T. Axonal autophagosomes recruit dynein for retrograde transport through fusion with late endosomes / X. T. Cheng, B. Zhou, M. Y. Lin, Q. Cai, Z. H. Sheng // *Journal of Cell Biology*. – 2015. – T. 209. – №. 3. – C. 377-386.
10. Chen X. Trehalose, sucrose and raffinose are novel activators of autophagy in human keratinocytes through an mTOR-independent pathway / X. Chen, M. Li, L. Li, S. Xu, D. Huang, M. Ju, J. Huang, H. Gu // *Scientific reports*. – 2016. – T. 6. – №. 1. – C. 1-17.
11. Cooper A. A. α -Synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models / A.A. Cooper, A.D. Gitler, A. Cashikar, C.M. Haynes, K.J. Hill, B. Bhullar, S. Lindquist // *Science*. – 2006. – T. 313. – №. 5785. – C. 324-328.
12. Crews L. Selective molecular alterations in the autophagy pathway in patients with Lewy body disease and in models of α -synucleinopathy/ L. Crews, B. Spencer, P. Desplats, C. Patrick, A. Paulino // *PloS one*. – 2010. – T. 5. – №. 2. – C. e9313.
13. Cuervo A. M. Impaired degradation of mutant α -synuclein by chaperone-mediated autophagy / A. M. Cuervo, L. Stefanis, R. Fredenburg, P. T. Lansbury, D. Sulzer // *Science*. – 2004. – T. 305. – №. 5688. – C. 1292-1295.
14. Dehay B. Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson's disease/ B. Dehay, J. Bove, N. Rodriguez-Muela, C. Perier, A. Recasens, P. Boya, M. Vila // *Journal of Neuroscience*. – 2010. – T. 30. – №. 37. – C. 12535-12544.
15. De Pace R. Altered distribution of ATG9A and accumulation of axonal aggregates in neurons from a mouse model of AP-4 deficiency syndrome / R. De Pace, M. Skirzewski, M. Damme, R. Mattera, J. Mercurio, A. M. Foster, J.

- S. Bonifacino // PLoS genetics. – 2018. – T. 14. – №. 4. – C. e1007363.
16. Deter R. L. Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes / R. L. Deter, C. De Duve // The Journal of cell biology. – 1967. – T. 33. – №. 2. – C. 437-449.
 17. DeYoung M. P. Hypoxia regulates TSC1/2–mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14–3–3 shuttling / M. P. DeYoung, P. Horak, A. Sofer, D. Sgroi, L. W. Ellisen // Genes & development. – 2008. – T. 22. – №. 2. – C. 239-251.
 18. DeBosch B. J. et al. Trehalose inhibits solute carrier 2A (SLC2A) proteins to induce autophagy and prevent hepatic steatosis / B. J. DeBosch, M. R. Heitmeier, A. L. Mayer, C. B. Higgins, J. R. Crowley, T. E. Kraft, K. H. Moley // Science signaling. – 2016. – T. 9. – №. 416. – C. ra21-ra21.
 19. Dixon J. S. “Phagocytic” lysosomes in chromatolytic neurones // Nature. – 1967. – T. 215. – №. 5101. – C. 657-658.
 20. Dyllick-Brenzinger M. Reciprocal effects of α -synuclein overexpression and proteasome inhibition in neuronal cells and tissue / M. Dyllick-Brenzinger, C.A. D'Souza, B. Dahlmann, P.M. Kloetzel, A. Tandon // Neurotoxicity research. – 2010. – T. 17. – №. 3. – C. 215-227.
 21. Egan D. The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR / D. Egan, J. Kim, R. J. Shaw, K. L. Guan // Autophagy. – 2011. – T. 7. – №. 6. – C. 643-644.
 22. Ferree A. W. MitoTimer probe reveals the impact of autophagy, fusion, and motility on subcellular distribution of young and old mitochondrial protein and on relative mitochondrial protein age / A. W. Ferree, K. Trudeau, E. Zik, I. Y. Benador, G. Twig, R. A. Gottlieb, O. S. Shirihai // Autophagy. – 2013. – T. 9. – №. 11. – C. 1887-1896.
 23. Feve A. Current status of tyrosine hydroxylase in management of Parkinson's disease/ A. Feve // CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders). – 2012. – T. 11. – №. 4. – C. 450-455.

24. Fu M. LC3 binding to the scaffolding protein JIP1 regulates processive dynein-driven transport of autophagosomes / M. Fu, J. J. Nirschl, E. L. F. Holzbaur // *Developmental cell*. – 2014. – T. 29. – №. 5. – C. 577-590.
25. Giasson B. I. Neuronal α -synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human α -synuclein / B.I. Giasson, J.E. Duda, S.M. Quinn, B. Zhang, J. Q. Trojanowski, V. M. Lee // *Neuron*. – 2002. – T. 34. – №. 4. – C. 521-533.
26. Gitler A. D. et al. The Parkinson's disease protein α -synuclein disrupts cellular Rab homeostasis / A. D. Gitler, B.J. Bevis, J. Shorter, K. E. Strathearn, S. Hamamichi, L. J. Su, S. Lindquist // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008. – T. 105. – №. 1. – C. 145-150.
27. Glick D. Autophagy: cellular and molecular mechanisms / D. Glick, S. Barth, K. F. Macleod // *The Journal of pathology*. – 2010. – T. 221. – №. 1. – C. 3-12.
28. Gowrishankar S. Massive accumulation of luminal protease-deficient axonal lysosomes at Alzheimer's disease amyloid plaques / S. Gowrishankar, P. Yuan, Y. Wu, M. Schrag, S. Paradise, J. Grutzendler, S. M. Ferguson // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2015. – T. 112. – №. 28. – C. E3699-E3708.
29. Haga H. Enhancement of ATP production ameliorates motor and cognitive impairments in a mouse model of MPTP-induced Parkinson's disease / H. Haga, K. Matsuo, Y. Yabuki, C. Zhang, F. Han // *Neurochemistry International*. – 2019. – T. 129. – C. 104492.
30. Hansen M. Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms / M. Hansen, D. C. Rubinsztein, D. W. Walker // *Nature reviews Molecular cell biology*. – 2018. – T. 19. – №. 9. – C. 579-593.
31. Hara T. et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice / T. Hara, K. Nakamura, M. Matsui, A. Yamamoto, Y. Nakahara, R. Suzuki-Migishima, N. Mizushima // *Nature*. – 2006. – T. 441. – №. 7095. – C. 885-889.

32. Hatami A. Transgenic rodent models to study alpha-synuclein pathogenesis, with a focus on cognitive deficits/ A. Hatami, M. F. Chesselet // Behavioral Neurobiology of Huntington's Disease and Parkinson's Disease. – 2014. – C. 303-330.
33. He Q. Treatment with trehalose prevents behavioral and neurochemical deficits produced in an AAV α -synuclein rat model of Parkinson's disease / Q. He, J.B. Koprach, Y. Wang, W. Yu, B. Xiao, J. M. Brotchie, J. Wang // Mol. Neurobiol., - 2016, - V. 53 (4), - P. 2258-2268
34. Hernandez D. Regulation of presynaptic neurotransmission by macroautophagy / D. Hernandez, C. A. Torres, W. Setlik, C. Cebrián, E. V. Mosharov, G. Tang, D. Sulzer // Neuron. – 2012. – T. 74. – №. 2. – C. 277-284.
35. Huang J. The TSC1–TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth / J. Huang, B. D. Manning // Biochemical Journal. – 2008. – T. 412. – №. 2. – C. 179-190.
36. Inoki K. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling / K. Inoki, Y. Li, T. Xu, K. L. Guan // Genes & development. – 2003. – T. 17. – №. 15. – C. 1829-1834.
37. Inoki K. AMPK and mTOR in cellular energy homeostasis and drug targets / K. Inoki, J. Kim, K. L. Guan // Annual review of pharmacology and toxicology. – 2012. – T. 52. – C. 381-400.
38. Jay T. M. Dopamine: a potential substrate for synaptic plasticity and memory mechanisms // Progress in neurobiology. – 2003. – T. 69. – №. 6. – C. 375-390.
39. Johnson C. W. Modulating macroautophagy: a neuronal perspective / C. W. Johnson, T. J. Melia, A. Yamamoto // Future medicinal chemistry. – 2012. – T. 4. – №. 13. – C. 1715-1731.
40. Kaushik S. Constitutive activation of chaperone-mediated autophagy in cells with impaired macroautophagy / S. Kaushik, A. C. Massey, N. Mizushima, A.

- M. Cuervo // *Molecular biology of the cell*. – 2008. – T. 19. – №. 5. – C. 2179-2192.
41. Kabeya Y. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing / Y. Kabeya, N. Mizushima, T. Ueno, A. Yamamoto, T. Kirisako, T. Noda, T. Yoshimori // *The EMBO journal*. – 2000. – T. 19. – №. 21. – C. 5720-5728.
 42. Karabiyik C. Autophagy impairment in Parkinson's disease / C. Karabiyik, M. J. Lee, D. C. Rubinsztein // *Essays in biochemistry*. – 2017. – T. 61. – №. 6. – C. 711-720.
 43. Kiffin R. Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress / R. Kiffin, C. Christian, E. Knecht, A. M. Cuervo // *Molecular biology of the cell*. – 2004. – T. 15. – №. 11. – C. 4829-4840.
 44. Kim J. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1 / J. Kim, M. Kundu, B. Viollet, K. L. Guan // *Nature cell biology*. – 2011. – T. 13. – №. 2. – C. 132-141.
 45. Klionsky D. J. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade // *Nature reviews Molecular cell biology*. – 2007. – T. 8. – №. 11. – C. 931-937.
 46. Komatsu M. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice / M. Komatsu, S. Waguri, T. Chiba, S. Murata, J. Iwata, I. Tanida, K. Tanaka // *Nature*. – 2006. – T. 441. – №. 7095. – C. 880-884.
 47. Komatsu M. Essential role for autophagy protein Atg7 in the maintenance of axonal homeostasis and the prevention of axonal degeneration / M. Komatsu, Q. J. Wang, G. R. Holstein, Jr V. L. Friedrich, J. I. Iwata, E. Kominami, Z. Yue // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2007. – T. 104. – №. 36. – C. 14489-14494.
 48. Lee M. K. Human α -synuclein-harboring familial Parkinson's disease-linked Ala-53 \rightarrow Thr mutation causes neurodegenerative disease with α -synuclein aggregation in transgenic mice/ M.K. Lee, W. Stirling, Y. Xu, X. Xu, D. Qui

- et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2002. – T. 99. – №. 13. – C. 8968-8973.
- 49.** Lehmann H. C. et al. Mitochondrial dysfunction in distal axons contributes to human immunodeficiency virus sensory neuropathy / H. C. Lehmann, W. Chen, J. Borzan, J. L. Mankowski, A. Höke // Annals of neurology. – 2011. – T. 69. – №. 1. – C. 100-110.
- 50.** Levine B. Autophagy in the pathogenesis of disease / B. Levine, G. Kroemer // Cell. – 2008. – T. 132. – №. 1. – C. 27-42.
- 51.** Levine B. Autophagy wins the 2016 Nobel Prize in Physiology or Medicine: Breakthroughs in baker's yeast fuel advances in biomedical research / B. Levine, D. J. Klionsky // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2017. – T. 114. – №. 2. – C. 201-205.
- 52.** Li W. Selective autophagy of intracellular organelles: recent research advances/W. Li, P. He, Y. Huang, Y.F. Li, J. Lu, M. Li, H. Kurihara et al. //Theranostics. – 2021. – T. 11. – №. 1. – C. 222.
- 53.** Lie P. P. Y. Lysosome trafficking and signaling in health and neurodegenerative diseases / P. P. Y. Lie, R. A. Nixon // Neurobiology of disease. – 2019. – T. 122. – C. 94-105.
- 54.** Lin X. Conditional expression of Parkinson's disease-related mutant α -synuclein in the midbrain dopaminergic neurons causes progressive neurodegeneration and degradation of transcription factor nuclear receptor related 1/ X. Lin, L. Parisiadou, C. Sgobio, G. Liu, J. Yu, L. Sun et al. //Journal of Neuroscience. – 2012. – T. 32. – №. 27. – C. 9248-9264.
- 55.** Lipinski M. M. et al. A genome-wide siRNA screen reveals multiple mTORC1 independent signaling pathways regulating autophagy under normal nutritional conditions / M. M. Lipinski, G. Hoffman, A. Ng, W. Zhou, B. F. Py, E. Hsu, J. Yuan // Developmental cell. – 2010. – T. 18. – №. 6. – C. 1041-1052.
- 56.** López-Otín C. The hallmarks of aging / C. López-Otín, M. A. Blasco, L. Partridge, M. Serrano, G. Kroemer // Cell. – 2013. – T. 153. – №. 6. – C.

1194-1217.

57. López-Otín C. Hallmarks of health / C. López-Otín, G. Kroemer // Cell. – 2021. – Т. 184. – №. 1. – С. 33-63.
58. Lu J. Autophagy and Parkinson's disease / J. Lu, M. Wu, Z. Yue // Autophagy: biology and diseases. – 2020. – С. 21-51.
59. Lynch-Day M. A. The role of autophagy in Parkinson's disease/ M. A. Lynch-Day, K. Mao, K. Wang et al. // Cold Spring Harbor perspectives in medicine. – 2012. – Т. 2. – №. 4. – С. a009357.
60. Martinez-Vicente M. Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike / M. Martinez-Vicente, A. M. Cuervo // The Lancet Neurology. – 2007. – Т. 6. – №. 4. – С. 352-361.
61. Martinez-Vicente M. Dopamine-modified α -synuclein blocks chaperone-mediated autophagy / M. Martinez-Vicente, Z. Talloczy, S. Kaushik, A. C. Massey, J. Mazzulli, E. V. Mosharov, A. M. Cuervo // The Journal of clinical investigation. – 2008. – Т. 118. – №. 2. – С. 777-788.
62. Martinez-Vicente M. Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease / M. Martinez-Vicente, Z. Talloczy, E. Wong, G. Tang, H. Koga, S. Kaushik, A. M. Cuervo // Nature neuroscience. – 2010. – Т. 13. – №. 5. – С. 567-576.
63. Martinez-Vicente M. Alpha-synuclein and protein degradation pathways in Parkinson's disease: a pathological feed-back loop / M. Martinez-Vicente, M. Vila // Experimental neurology. – 2013. – Т. 247. – С. 308-313.
64. Maday S. Autophagosomes initiate distally and mature during transport toward the cell soma in primary neurons / S. Maday, K. E. Wallace, E. L. F. Holzbaur // Journal of Cell Biology. – 2012. – Т. 196. – №. 4. – С. 407-417.
65. Maday S. Autophagosome biogenesis in primary neurons follows an ordered and spatially regulated pathway / S. Maday, E. L. F. Holzbaur // Developmental cell. – 2014. – Т. 30. – №. 1. – С. 71-85.
66. Maday S. Mechanisms of neuronal homeostasis: Autophagy in the axon // Brain research. – 2016. – Т. 1649. – С. 143-150.

67. Manning G. The protein kinase complement of the human genome / G. Manning, D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, S. Sudarsanam // *Science*. – 2002. – T. 298. – №. 5600. – C. 1912-1934.
68. Mardones P. Mystery solved: Trehalose kickstarts autophagy by blocking glucose transport / P. Mardones, D. C. Rubinsztein, C. Hetz // *Science signaling*. – 2016. – T. 9. – №. 416. – C. fs2-fs2.
69. Massey A. C. Consequences of the selective blockage of chaperone-mediated autophagy/ A.C. Massey, S. Kaushik, G. Sovak, R. Kiffin, A. M. Cuervo // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2006. – T. 103. – №. 15. – C. 5805-5810.
70. Matthews M. R. A light and electron microscopic study of the cellular response to axonal injury in the superior cervical ganglion of the rat / M. R. Matthews, G. Raisman // *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*. – 1972. – T. 181. – №. 1062. – C. 43-79.
71. Mayer A. L. SLC2A8 (GLUT8) is a mammalian trehalose transporter required for trehalose-induced autophagy / A. L. Mayer, C. B. Higgins, M. R. Heitmeier, T. E. Kraft, X. Qian, J. R. Crowley, B. J. DeBosch // *Scientific reports*. – 2016. – T. 6. – №. 1. – C. 1-15.
72. McNaught K. S. P. Failure of the ubiquitin–proteasome system in Parkinson's disease / K. S. P. McNaught, C. W. Olanow, B. Halliwell, O. Isacson, P. Jenner // *Nature Reviews Neuroscience*. – 2001. – T. 2. – №. 8. – C. 589-594.
73. McNaught K. S. P. Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease / K.S.P. McNaught, R. Belizaire, O. Isacson, P. Jenner, C.W. Olanow // *Experimental neurology*. – 2003. – T. 179. – №. 1. – C. 38-46.
74. Mizushima N. Methods for monitoring autophagy // *The international journal of biochemistry & cell biology*. – 2004. – T. 36. – №. 12. – C. 2491-2502.
75. Mizushima N. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation // *Current opinion in cell biology*. – 2010. – T. 22. – №. 2. – C. 132-139.
76. Mizushima N. The role of Atg proteins in autophagosome formation / N. Mizushima, T. Yoshimori, Y. Ohsumi // *Annual review of cell and*

developmental biology. – 2011. – T. 27. – C. 107-132.

77. More S. V. Toxin-induced experimental models of learning and memory impairment / S.V. More, H. Kumar, D.Y. Cho, Y.S. Yun // International journal of molecular sciences. – 2016. – T. 17. – №. 9. – C. 1447.
78. Mortimore G. E. Induction of autophagy by amino-acid deprivation in perfused rat liver / G. E. Mortimore, C. M. Schworer // Nature. – 1977. – T. 270. – №. 5633. – C. 174-176.
79. Nieto-Torres J. L. Beyond autophagy: the expanding roles of ATG8 proteins / J. L. Nieto-Torres, A. M. Leidal, J. Debnath, M. Hansen // Trends in Biochemical Sciences. – 2021. – T. 46. – №. 8. – C. 673-686.
80. Nixon R. A. Endosome function and dysfunction in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases // Neurobiology of aging. – 2005. – T. 26. – №. 3. – C. 373-382.
81. Oaks A. W. Age-dependent effects of A53T alpha-synuclein on behavior and dopaminergic function/ A.W. Oaks, M. Frankfurt, D.I. Finkelstein, A. Sidhu // PLoS One. – 2013. – T. 8. – №. 4. – C. e60378.
82. Okkenhaug K. Rules of engagement: distinct functions for the four class I PI3K catalytic isoforms in immunity // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2013. – T. 1280. – №. 1. – C. 24-26.
83. Palmieri M. mTORC1-independent TFEB activation via Akt inhibition promotes cellular clearance in neurodegenerative storage diseases / M. Palmieri, R. Pal, H. R. Nelvagal, P. Lotfi, G. R., Stinnett, M. L. Seymour, M. Sardiello // Nature communications. – 2017. – T. 8. – №. 1. – C. 1-19.
84. Parzych K. R. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation / K. R. Parzych, D. J. Klionsky // Antioxidants & redox signaling. – 2014. – T. 20. – №. 3. – C. 460-473.
85. Pickrell A. M. The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease / A. M. Pickrell, R. J. Youle // Neuron. – 2015. – T. 85. – №. 2. – C. 257-273.
86. Plaza-Zabala A. Autophagy and microglia: novel partners in

- neurodegeneration and aging / A. Plaza-Zabala, V. Sierra-Torre, A. Sierra // International journal of molecular sciences. – 2017. – T. 18. – №. 3. – C. 598.
- 87.** 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 // Pharmacological Research. – 2022. – C. 106373.
- 88.** Rodríguez-Navarro J. A. Trehalose ameliorates dopaminergic and tau pathology in parkin deleted/tau overexpressing mice through autophagy activation / J. A. Rodríguez-Navarro, L. Rodríguez, M. J. Casarejos, R. M. Solano, A. Gómez, J. Perucho, M. A. Mena // Neurobiology of disease. – 2010. – T. 39. – №. 3. – C. 423-438.
- 89.** Ross O. A. Genomic investigation of α -synuclein multiplication and parkinsonism / O. A. Ross, A. T. Braithwaite, L. M. Skipper, J. Kachergus, M. M. Hulihan, F. A. Middleton, M. J. Farrer // Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society. – 2008. – T. 63. – №. 6. – C. 743-750.
- 90.** Rubinsztein D. C. Potential therapeutic applications of autophagy / D. C. Rubinsztein, J. E. Gestwicki, L. O. Murphy, D. J. Klionsky // Nature reviews Drug discovery. – 2007. – T. 6. – №. 4. – C. 304-312.
- 91.** Rubinsztein D. C. Autophagy and aging / D. C. Rubinsztein, G. Mariño, G. Kroemer // Cell. – 2011. – T. 146. – №. 5. – C. 682-695.
- 92.** Rudnick N. D. Distinct roles for motor neuron autophagy early and late in the SOD1G93A mouse model of ALS / N. D. Rudnick, C. J. Griffey, P. Guarnieri, V. Gerbino, X. Wang, J. A. Piersaint, T. Maniatis // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2017. – T. 114. – №. 39. – C. E8294-E8303.
- 93.** Rui Y. N. Huntingtin functions as a scaffold for selective macroautophagy / Y. N. Rui, Z. Xu, B. Patel, Z. Chen, D. Chen, A. Tito, S. Zhang // Nature cell biology. – 2015. – T. 17. – №. 3. – C. 262-275.
- 94.** Rusmini P. Trehalose induces autophagy via lysosomal-mediated TFEB activation in models of motoneuron degeneration / P. Rusmini, K. Cortese, V.

- Crippa, R. Cristofani, M. E. Cicardi, V. Ferrari, A. Poletti // *Autophagy*. – 2019. – T. 15. – №. 4. – C. 631-651.
- 95.** Sahoo A. K. Features and outcomes of drugs for combination therapy as multi-targets strategy to combat Alzheimer's disease / A.K. Sahoo, J. Dandapat, U.C.Dash, S. Kanhar // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2018. – T. 215. – C.42-73.
- 96.** Sarkar S. Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and α -synuclein / S. Sarkar, J. E. Davies, Z. Huang, A. Tunnacliffe, D. C. Rubinsztein // *Journal of Biological Chemistry*. – 2007. – T. 282. – №. 8. – C. 5641-5652.
- 97.** Scrivo A. Selective autophagy as a potential therapeutic target for neurodegenerative disorders / A. Scrivo, M. Bourdenx, O. Pampliega, A. M. Cuervo // *The Lancet Neurology*. – 2018. – T. 17. – №. 9. – C. 802-815.
- 98.** Scott D. A. Mechanistic logic underlying the axonal transport of cytosolic proteins / D. A. Scott, U. Das, Y. Tang, S. Roy // *Neuron*. – 2011. – T. 70. – №. 3. – C. 441-454.
- 99.** Sedelis M. Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease / M. Sedelis, R.K.W. Schwarting, J.P. Huston // *Behavioural brain research*. – 2001. – T. 125. – №. 1-2. – C. 109-125.
- 100.** Seglen P. O. 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes / P. O. Seglen, P. B. Gordon P. B. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1982. – T. 79. – №. 6. – C. 1889-1892.
- 101.** Seglen P. O. Autophagy and other vacuolar protein degradation mechanisms / P. O. Seglen, P. Bohley // *Experientia*. – 1992. – T. 48. – №. 2. – C. 158-172.
- 102.** Shang L. Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by Ulk1 dephosphorylation and its subsequent dissociation from AMPK / L. Shang, S. Chen, F. Du, S. Li, L. Zhao, X. Wang // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2011. – T. 108. – №. 12. – C. 4788-4793.
- 103.** Shen W. Autophagy promotes synapse development in *Drosophila* / W. Shen,

- B. Ganetzky // *Journal of Cell Biology*. – 2009. – T. 187. – №. 1. – C. 71-79.
- 104.** Shen D. N. Autophagy in synaptic development, function, and pathology / D. N. Shen, L. H. Zhang, E. Q. Wei, Y. Yang // *Neuroscience bulletin*. – 2015. – T. 31. – №. 4. – C. 416-426.
- 105.** Shoshani T. Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene, RTP801, involved in apoptosis / T. Shoshani, A. Faerman, I. Mett, E. Zelin, T. Tenne, S. Gorodin, E. Feinstein // *Molecular and cellular biology*. – 2002. – T. 22. – №. 7. – C. 2283-2293.
- 106.** Snyder H. Aggregated and monomeric α -synuclein bind to the S6' proteasomal protein and inhibit proteasomal function / H. Snyder, K. Mensah, C. Theisler, J. Lee, A. Matouschek, B. Wolozin // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – T. 278. – №. 14. – C. 11753-11759.
- 107.** Stavoe A. K. H. Autophagy in neurons / A. K. H. Stavoe, E. L. F. Holzbaur // *Annual review of cell and developmental biology*. – 2019. – T. 35. – C. 477.
- 108.** Stavoe A. K. H. Axonal autophagy: mini-review for autophagy in the CNS / A. K. H. Stavoe, E. L. F. Holzbaur // *Neuroscience letters*. – 2019. – T. 697. – C.17-23.
- 109.** Switon K. Molecular neurobiology of mTOR / K. Switon, K. Kotulska, A. Janusz-Kaminska, J. Zmorzynska, J. Jaworski // *Neuroscience*. – 2017. – T. 341. – C.112-153.
- 110.** Tikhonova M. A. Experimental and Innovative Approaches to Multi-Target Treatment of Parkinson's and Alzheimer's Diseases / M.A. Tikhonova, H.M. Chang, S.K. Singh, D.Vieau // *Frontiers in Neuroscience*. – 2022. – T. 16.
- 111.** Vidal R. L. Targeting autophagy in neurodegenerative diseases / R. L. Vidal, S. Matus, L. Bargsted, C. Hetz // *Trends in pharmacological sciences*. – 2014. – T. 35. – №. 11. – C. 583-591.
- 112.** Vingtdeux V. AMP-activated protein kinase signaling activation by resveratrol modulates amyloid- β peptide metabolism / V. Vingtdeux, L. Giliberto, H. Zhao, P. Chandakkar, Q. Wu, J. E. Simon, P. Marambaud // *Journal of Biological Chemistry*. – 2010. – T. 285. – №. 12. – C. 9100-9113.

- 113.** Wang H. Electro-acupuncture stimulation improves spontaneous locomotor hyperactivity in MPTP intoxicated mice/ H. Wang, X. Liang, X. Wang, D. Luo, J. Jia, X. Wang // PLoS One. – 2013. – T. 8. – №. 5. – C. e64403.
- 114.** Wang T. Control of autophagosome axonal retrograde flux by presynaptic activity unveiled using botulinum neurotoxin type A / T. Wang, S. Martin, A. Papadopoulos, C. B. Harper, T. A. Mavlyutov, D. Niranjana, F. A. Meunier // Journal of Neuroscience. – 2015. – T. 35. – №. 15. – C. 6179-6194.
- 115.** Wang K. Beclin1 and HMGB1 ameliorate the α -synuclein-mediated autophagy inhibition in PC12 cells / K. Wang, J. Huang, W. Xie, L. Huang, C. Zhong, Z. Chen // Diagnostic Pathology. – 2016. – T. 11. – №. 1. – C. 1-10.
- 116.** Weidberg H. Biogenesis and cargo selectivity of autophagosomes / H. Weidberg, E. Shvets, Z. Elazar // Annual review of biochemistry. – 2011. – T. 80. – C.125-156.
- 117.** Williams A. Aggregate-prone proteins are cleared from the cytosol by autophagy: therapeutic implications / A. Williams, L. Jahreiss, S. Sarkar, S. Saiki, F. M. Menzies, B. Ravikumar, D. C. Rubinsztein // Current topics in developmental biology. – 2006. – T. 76. – C.89-101.
- 118.** Winslow A. R. α -Synuclein impairs macroautophagy: implications for Parkinson's disease / A. R. Winslow, C. W. Chen, S. Corrochano, A. Acevedo-Arozena, D. E. Gordon, A. A. Peden, ... & D. C. Rubinsztein // Journal of Cell Biology. – 2010. – T. 190. – №. 6. – C. 1023-1037.
- 119.** Wong Y. C. The regulation of autophagosome dynamics by huntingtin and HAP1 is disrupted by expression of mutant huntingtin, leading to defective cargo degradation / Y. C. Wong, E. L. F. Holzbaur // Journal of Neuroscience. – 2014. – T. 34. – №. 4. – C. 1293-1305.
- 120.** Wu H. Crosstalk between macroautophagy and chaperone-mediated autophagy: implications for the treatment of neurological diseases / H. Wu, S. Chen, A.B. Ammar, J. Xu, Q. Wu, K. Pan, Y. Hong // Mol. Neurobiol. – 2015, - V. 52, – P. 1284–1296.
- 121.** Zhang N. Y. α -Synuclein protofibrils inhibit 26 S proteasome-mediated

protein degradation: understanding the cytotoxicity of protein protofibrils in neurodegenerative disease pathogenesis / N. Y. Zhang, Z. Tang, C. W. Liu // Journal of Biological Chemistry. – 2008. – T. 283. – №. 29. – С. 20288-20298.

- 122.** Zhu Y. Autophagy in childhood neurological disorders / Y. Zhu, G. Runwal, P. Obrocki, D. C. Rubinsztein // Developmental Medicine & Child Neurology. – 2019. – T. 61. – №. 6. – С. 639-645.