

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
ОРЛОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.С.ТУРГЕНЕВА

На правах рукописи

Серёгина Евгения Сергеевна

Роль активных форм кислорода в поддержании жизнеспособности
клеток головного мозга и мышц

1.5.2 Биофизика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д.б.н. Абрамов Андрей Юрьевич

Орел-2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	11
1.1 Окислительно-восстановительный баланс в физиологии	11
1.2 Понятие активных форм кислорода и азота	14
1.3 Физиологическая роль активных форм кислорода и азота.....	17
1.4 Основные источники активных форм кислорода в клетках: митохондрии, ферменты и рецепторы.....	20
1.5 НАДФН-оксидаза	24
1.6 Ксантиноксидаза	28
1.7 Ферменты метаболизма катехоламинов	30
1.8 Характеристика отдельных заболеваний, сопровождающихся митохондриальными нарушениями.....	36
1.9 Белки семейства синуклеинов: характеристика структуры, распределения в организме и роли в физиологии и патологии	44
1.10 Рецепторы продуктов конечного гликирования белков: роль в функционировании клеток головного мозга.....	52
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	60
2.1 Используемые реактивы	60
2.2 Используемые модели животных	61
2.3 Клеточные культуры	62
2.4 Получение переживающих срезов	64
2.5 Синтетические пептиды RAGE	65
2.6 Измерение скорости продукции АФК.....	66
2.7 Получение суспензии митохондрий.....	67
2.8 Измерение дыхания митохондрий.....	67
2.9 Оценка мембранного потенциала.....	68
2.10 Измерение уровня НАДН и ФАД.....	69
2.11 Измерение относительного уровня АТФ	70

2.12	Измерение уровня восстановленного глутатиона.....	70
2.13	Морфометрический анализ мышечных волокон	71
2.14	Измерение содержания некротических клеток в культуре	71
2.15	Определение скорости перекисного окисления липидов в клеточной культуре	72
2.16	Статистическая обработка.....	72
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ		74
3.1	RAGE вызывает физиологическую активацию НАДФН- оксидазы в нейронах и астроцитах и нейропротекцию	74
3.2	Дефицит HPRT1 вызывает изменение энергетического метаболизма митохондрий в головном мозге	86
3.3	Регуляция окислительно-восстановительной сигнализации белками-синуклеинами и её взаимодействие с другими компонентами внутриклеточной сигнализации.....	95
3.4	Активация митохондриальными субстратами стимулирует продукцию АФК, энергетический метаболизм и увеличивает диаметр мышечного волокна крысы	99
ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....		112
ЗАКЛЮЧЕНИЕ		118
ВЫВОДЫ		123
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ		125
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ		126

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования.

Продукция активных форм кислорода (АФК) приводит к изменению окислительно-восстановительного баланса и запуску **окислительно-восстановительной сигнализации** в клетках. Последняя представляет собой элемент паракринной системы (также называемой аутокринной), в которой сигналы, вырабатываемые в клетке, активируют один или несколько каналов в соседних (целевых) клетках через цепочку медиаторов [1]. История изучения окислительно-восстановительной сигнализации развивалась от рассмотрения роли оксидантов в патологии к пониманию их участия в нормальной передаче сигналов [2]. Сигнал возникает в ответ на изменения в скорости образования АФК или окислительно-восстановительного (reduction-oxidation, редокс) состояния биологической системы [3]. Понятие **окислительно-восстановительного состояния** описывает баланс соотношений ключевых метаболитов, таких как окисленный и восстановленный глутатион, НАД⁺/НАДН, НАДФ⁺/НАДФН, ФАД⁺⁺/ФАДН₂ в биологических системах, что влияет на множество клеточных процессов [4]. При работе электронтранспортной цепи (ЭТЦ), расположенной в митохондриях (МХ), происходит последовательная передача электронов от доноров, таких как НАДН и ФАДН₂, к акцепторам, включая кислород. Этот процесс сопровождается изменением редокс-потенциалов соединений, что обеспечивает эффективное производство АТФ через окислительное фосфорилирование, что говорит о тесной связи окислительно-восстановительных процессов и биоэнергетики. Важно отметить, что баланс вовлеченных в этот процесс механизмов имеет решающее значение для поддержания клеточной функции и гомеостаза, и при сдвиге баланса в одну из сторон может возникать окислительный стресс, приводящий к развитию различных патологий. Хотя клеточные механизмы, участвующие в окислительно-восстановительной сигнализации в основном

идентифицированы, по-прежнему является не выясненным различия между продукцией АФК и запуском клеточной сигнализации [5].

Головной мозг и мышцы представляют собой два важных органа человеческого организма, которые для обеспечения своей работы требуют огромного количества энергии, что приводит к сдвигу окислительно-восстановительного баланса и изменения скорости производства АТФ [6,7]. Нарушение механизмов обеспечения окислительно-восстановительного баланса и биоэнергетики вследствие генетических нарушений или естественного старения могут привести к развитию серьезных заболеваний

С другой стороны, АФК могут выполнять сигнальную функцию, когда повышение продукции АФК не приводит к окислительному стрессу, и даже стимулирует защитные механизмы. Современные исследования направлены на выяснение того, как именно АФК участвуют в регуляции метаболических путей и как можно контролировать их уровень для достижения оптимального функционирования клеток. В этом контексте разработка способов регулирования окислительно-восстановительных систем является перспективным направлением, которое может существенно изменить подходы к лечению заболеваний, связанных с окислительным стрессом. Актуальность этих исследований продолжает возрастать на фоне глобальных проблем здравоохранения, связанных со старением населения и ростом заболеваемости, требующих поиска новых эффективных решений. Следовательно, акцент на окислительно-восстановительной сигнализации и ее связи с энергетическим метаболизмом МХ и биоэнергетикой открывает новые горизонты в понимании клеточной физиологии и патологии.

Цель исследования: изучение роли АФК и окислительно-восстановительного сигнала в поддержании жизнеспособности клеток головного мозга и мышц в ответ на внешнее или внутреннее воздействие.

Основные задачи исследования:

1. Изучить влияние активации рецептора конечных продуктов гликирования (RAGE) на продукцию АФК, определить источник АФК и роль этого сигнала в поддержании жизнеспособности клеток головного мозга.

2. Исследовать взаимодействие энергетического метаболизма и окислительно-восстановительного баланса в механизме патологии Леши-Нихена, связанной с мутацией в гене белка HPRT1.

3. Изучить роль различных форм эндогенных синуклеинов в поддержании окислительно-восстановительного баланса клеток головного мозга.

4. Изучить способность митохондриальных субстратов воздействовать на энергетический метаболизм и окислительно-восстановительный баланс в клетках скелетных мышц.

Научная новизна работы.

Впервые выявлен нейропротекторный эффект активации RAGE коротким фрагментом V-домена данного рецептора (пептид 60-76), что обусловлено запуском продукции АФК ферментом НАДФН-оксидазой. Выявлено, что стимуляция RAGE-индуцированной продукции АФК в клетках не приводит к возникновению окислительного стресса. Напротив, проявляется защитный эффект короткого фрагмента RAGE в клеточной модели бета-амилоидной ($A\beta$) токсичности, связанный с активацией RAGE и последующим запуском сигнального каскада через НАДФН-оксидазу.

Впервые было показано, что дефицит HPRT1 вызывает изменение митохондриального энергетического метаболизма клеток головного мозга. Было обнаружено, что в клетках мозга животных с данной мутацией наблюдается ингибирование митохондриального комплекса I, снижение потребления митохондриального НАДН и уменьшение митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$). Выявлено, что повышенная продукция АФК связана с митохондриальной дисфункцией, но не сопровождается снижением уровня восстановленного глутатиона (GSH) и окислительным стрессом. Продемонстрировано, что нарушение энергетического метаболизма нейронов

и астроцитов, вызванное дефицитом HPRT1, потенциально может привести к энергетической недостаточности и стать основным пусковым механизмом развития патологии болезни Леша-Нихена.

Впервые показано, что генетическая инактивация генов, связанных с производством α - и β - синуклеинов, приводит к изменению продукции АФК и изменению уровня GSH за счет влияния данных белков на работу НАДФН-оксидазы и моноаминоксидазы (МАО) в клетках среднего мозга.

Впервые было показано, что обеспечение митохондриальными субстратами на основе холина, сукцината и никотинамида улучшает энергетический метаболизм клеток скелетных мышц, активирует продукцию АФК, не понижая значительно уровня эндогенного антиоксиданта GSH, но защищает от возрастной саркопении в животной модели.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Полученные результаты позволяют расширить понимание роли окислительно-восстановительной сигнализации в физиологии и ряде патологических процессов. В частности, был показан защитный и стимулирующий эффект активации продукции АФК. Исходя из полученных результатов, показавших защитный эффект для клеточной культуры на модели $A\beta$ -токсичности, можно предположить возможность использования короткого фрагмента RAGE (пептид 60-76) в качестве нейропротекторного соединения на основании его способности к увеличению продукции АФК НАДФН-оксидазой через RAGE. Также, в работе показано, что в клетках головного мозга HPRT1-дефицитных мышей, являющихся моделью болезни Леша-Нихена, мутация затрагивает как величину $\Delta\Psi_m$, так и увеличивает продукцию АФК, не вызывая окислительный стресс. Помимо этого, показана взаимосвязь α - и β - синуклеинов с ферментами, связанными с образованием АФК. Также выявлена возможность улучшения митохондриального метаболизма и защитной функции клеток при использовании митохондриального субстрата на основе дихолина сукцината и никотинамида.

Методология и методы диссертационного исследования.

Диссертационная работа была выполнена на первичной нейрон-глиальной культуре и переживающих срезах головного мозга, на клеточной культуре и переживающих срезах мышечной ткани крыс линии Wistar, на клеточной культуре, переживающих срезах и изолированных MX CRISPR-изированных мышей с делецией TCG в первом экзоне (HPRT1del8Val) и мышей на основе линии C57Bl/6J с генетической инактивацией генов синуклеинов. Исследования проводились с применением современных методов конфокальной и флуоресцентной микроскопии с использованием флуоресцентных зондов, а также методов оценки потребления кислорода при помощи электрода Кларка. Проведенная работа была выполнена в лаборатории клеточной физиологии и патологии Научно-технологического центра биомедицинской фотоники Орловского государственного университета имени И.С. Тургенева. Компьютерную обработку серий изображений тканей и культур клеток, полученных с применением флуоресцентной и конфокальной микроскопии, проводили с помощью программ ZEN Microscopy Software и ImageJ. Статистический анализ данных проводили с использованием программного обеспечения OriginPro (OriginLab Corp., США) и MATLAB R2021a. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. Различия считались значимыми при $p < 0,05$ по результатам U-критерия Манна-Уитни и ANOVA с тестом Тьюки.

Положения, выносимые на защиту:

1. Активация RAGE в клетках головного мозга приводит к запуску продукции АФК НАДФН-оксидазой, что обеспечивает защиту клеток от гибели в условиях стресса, индуцированного А β .
2. Делеция HPRT1 ингибирует комплекс I-зависимое митохондриальное дыхание, что приводит к увеличению митохондриального НАДН, падению $\Delta\Psi_m$ и увеличению продукции АФК в МХ и цитозоле клеток, которое, однако, не приводит к возникновению окислительного стресса.
3. α - и β - синуклеины регулируют производство АФК и уровень GSH в клетках головного мозга за счет регуляции НАДФН-оксидазы.

4. β -синуклеин регулируют производство АФК и уровень GSH в клетках головного мозга за счет регуляции MAO.

5. Митохондриальные субстраты улучшают энергетический метаболизм миотрубочек активируют окислительно-восстановительную сигнализацию и защищают ткань скелетных мышц животных от возрастной саркопении.

Личный вклад автора.

Личный вклад автора заключается в проведении обзора литературы об особенностях окислительно-восстановительного баланса, ферментах и механизмах, которые поддерживают данный баланс, и кальциевой сигнализации в физиологии и патологии нейродегенеративных заболеваний (НДЗ), а также в планировании и проведении экспериментальных исследований. Работа была выполнена и апробирована на базе лаборатории клеточной физиологии и патологии НТЦ биомедицинской фотоники Орловского государственного университета имени И.С. Тургенева. Все результаты, полученные соискателем, получены при выполнении научных исследований по темам: «Митохондрии как мишени в механизме нейродегенеративных заболеваний» (грант Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих учёных в российских образовательных организациях высшего образования, научных учреждениях и государственных научных центрах Российской Федерации № 075-15-2019-1877, 2019-2021 гг.; № 075-15-2022-1095, 2022-2023 гг.) и «Механизм нейродегенерации: древняя молекула как необходимый элемент физиологии и патологии клеток мозга» (грант Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих учёных в российских образовательных организациях высшего образования, научных учреждениях и государственных научных центрах Российской Федерации № 075-15-2024-621).

Степень достоверности и апробация результатов.

Работа проведена с помощью современных методов исследования – конфокальной и флуоресцентной микроскопии в сочетании с определением скорости потребления МХ кислорода, приборов, реактивов и программного обеспечения, которые соответствуют поставленным целям и задачам. Все полученные результаты имеют статистическую значимость и являются воспроизводимыми. Научные положения и выводы обоснованы, достоверны и напрямую вытекают из экспериментальных данных, полученных автором.

Апробация

Материалы диссертационного исследования доложены и обсуждены на международных и всероссийских конференциях, в частности на международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, Россия 2021, 2023), международной научной конференции «Клеточные технологии в экспериментальной медицине» (Курск, Россия 2022), школе-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века» (Пушино, Россия, 2022), VI и VIII Всероссийском конкурсе Научно-исследовательских работ студентов и аспирантов в рамках Всероссийского молодежного научного форума «Наука будущего - Наука молодых» 2021 г., 2023 г., «Ломоносов-2024» и др.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 20 работ, из которых 3 в ведущих рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК, а также 17 тезисов докладов на научных конференциях всероссийского и международного уровней.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Окислительно-восстановительный баланс в физиологии

Исследования окислительно-восстановительной сигнализации претерпели значительные изменения с момента первых работ, сосредоточенных на АФК и их воздействии на клетки. Открытие двойственной природы АФК, которые одновременно играют ключевую роль в регуляции сигнальных путей и способствуют активации процессов старения, имеет критическое значение для разработки стратегий, направленных на предотвращение возрастных заболеваний. В 1930-х годах ученые Warburg и Szent-Gyorgyi заметили, что окислительно-восстановительные реакции играют ключевую роль в регулировании клеточных функций. Однако в то время было недостаточно эффективных инструментов для детального изучения этих процессов, а понимание образования АФК в клетках было весьма ограниченным. В 1970-х годах исследования помогли установить, что активность глутатионпероксидазы является главным механизмом катаболизма перекиси водорода и тесно связана со скоростью пентозофосфатного пути в ответ на инсулин [8,9]. Далее ученые переключились на изучение того, как гидроперекиси ингибируют так называемый респираторный взрыв [10], убивая клетки, и позже выяснили, что низкие концентрации гидроперекисей могут усиливать этот процесс. В настоящее время внимание исследователей сосредоточено на более тонких аспектах окислительно-восстановительной сигнализации, включая роль специфических эндогенных и экзогенных коферментов и рецепторов.

Понятие окислительно-восстановительного баланса тесно связано с окислительным стрессом [11,12]. Окислительный стресс – это нарушение равновесия между продукцией АФК и уровнем антиоксидантов [13,14]. При нормальных условиях низкие уровни АФК действуют как важные регуляторы метаболических путей, способствуя активации ключевых ферментов, участвующих в гликолизе и окислительном метаболизме жирных кислот [15].

Однако при избытке АФК происходит активация окислительного стресса, что может привести к нарушению функции МХ и снижению их способности производить АТФ [16]. Это создает порочный круг, в котором недостаток энергии усугубляет уровень окислительного стресса, что, в свою очередь, приводит к дальнейшему ухудшению митохондриальной функции. Например, супероксид анион, образующийся как побочный продукт при работе ЭТЦ, может вызывать повреждение клеточных структур, особенно в условиях окислительного стресса или избытка электронов, однако он также выполняет важные функции в регуляции клеточной сигнализации [17].

МХ, как главные органеллы, отвечающие за клеточную энергию, не только обеспечивают клетки АТФ, но и служат основным источником АФК, что делает их центром окислительно-восстановительной сигнализации. Уровень АФК в МХ может изменяться в зависимости от состояния клеток; например, при гипоксии или внешнем окислительном стрессе наблюдается увеличение продукции АФК, что приводит к активации антиоксидантных защитных механизмов. Эти механизмы включают синтез таких молекул, как глутатион и супероксиддисмутаза (СОД), которые помогают нейтрализовать избыточные АФК и минимизировать ущерб, наносимый клеточным компонентам.

Не вполне ясно, является ли митохондриальная дисфункция, наблюдаемая при спорадических НДЗ с поздним началом, ключевым механизмом патогенеза или одним из проявлений патологического молекулярного каскада при НДЗ. Но наследственные формы болезни Альцгеймера (БА), болезни Паркинсона (БП) или другие НДЗ связаны с МХ, поскольку все агрегированные аномально свернутые белки, такие как А β , тау, α -синуклеин, ингибируют функцию МХ, вызывая окислительный стресс [18]. Участие окислительного стресса в механизме потери нейронов установлено для большинства нейродегенеративных расстройств. Однако прямая антиоксидантная терапия не показала клинического эффекта для большинства

из этих болезней, что может говорить о более глубоком механизме повреждения нейрональных тканей.

Возникновение когнитивных нарушений и проявление особых нейроповеденческих реакций может быть связано и с другими генетическими заболеваниями. Синдром Леша-Нихена (СЛН) – редкое наследственное заболевание [19,20], характеризующееся увеличением синтеза мочевой кислоты и вызванное дефектом фермента гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы (HPRT) развивая характерный нейроповеденческий синдром, который включает дистонию, хореоатетоз, спастичность, когнитивные нарушения и повторяющееся самоповреждающее поведение. Связь между нарушением метаболизма пуринов и развитием неврологических расстройств у пациентов остается до конца не изученной, особенно с точки зрения митохондриальной биоэнергетики и окислительно-восстановительных процессов [21,22].

Еще одним аспектом, связанным с окислительно-восстановительной сигнализацией вследствие старения организма, является саркопения - потеря мышечной массы и силы с возрастом [23]. Мышцы являются метаболически активным органом, и они играют ключевую роль в поддержании общего здоровья и физической функции. Снижение активности МХ и уровня сигнализации в мышцах ухудшает их функции и способствует саркопении, особенно при НДЗ [24–26]. Кроме того, окислительный стресс, возникающий в результате накопления свободных радикалов, может повреждать клеточные компоненты, что еще больше усугубляет процессы старения и, в частности, саркопению [27,28]. Снижение уровня окислительно-восстановительной сигнализации также может нарушать регуляцию анаболических процессов, таких как синтез белков в мышцах, тем самым препятствуя восстановлению и росту мышечной массы. Исследования показывают, что регулярные физические упражнения, особенно силовые тренировки, могут улучшать митохондриальную функцию и окислительно-восстановительный баланс в мышцах, замедляя развитие саркопении [29,30]. Также стоит отметить

важность питания, которое может оказывать поддерживающее действие на мышечную систему.

1.2 Понятие активных форм кислорода и азота

АФК можно определить как кислородсодержащие химически активные вещества, которые могут быть представлены как свободными радикалами, так и нерадикальными производными кислорода (рисунок 1) [31,32]. Эти высокореактивные и нестабильные структуры служат для защиты организма от агрессивных агентов окружающей среды (например, патогенов) или внутренних стрессовых факторов (например, неправильно сформированных белков). Однако, когда уровень АФК повышен, это может привести к развитию окислительного стресса, который характеризуется повреждением различных клеточных структур [2,33–36]. Наиболее известные АФК, образующиеся в организме, включают свободные радикалы (супероксид анион $O_2^{\bullet-}$, гидроксильные радикалы HO^{\bullet}) и нерадикалы (перекись водорода H_2O_2 , хлорноватистая кислота $HOCl$ и синглетный кислород O_2^{\bullet}). Супероксид анион естественным образом образуется как побочный продукт утилизации кислорода в процессе метаболизма и аэробного клеточного дыхания [37–39]. Образование АФК может также происходить в ответ на воздействие пестицидов, химических веществ, и ионизирующего излучения [33,40–43]. Основным источником продукции АФК является ЭТЦ МХ, металлы переменной валентности в цитоплазме или клеточных органеллах, а также ряд ферментов, таких как, например, НАДФН-оксидаза, ксантинооксидаза (КО) и другие [44–49].

Положительная роль АФК проявляется, в частности, в том, что они могут являться сигнальными молекулами при адаптации к гипоксии или для активации аутофагии [50]. При нарушении гомеостаза нарушается и баланс выработки АФК, что может привести к токсичности, связанной с высоким уровнем окислительного стресса [14]. АФК опосредуют нормальные физиологические функции, которые включают сигнальные процессы,

пролиферацию, миграцию, дифференцировку и апоптоз клеток [12,14,51]. АФК также создают защиту от патогенов, регулируя иммунные реакции и поддерживая окислительно-восстановительный баланс.



Рисунок 1 –Схематичное изображение основных активных формы кислорода и азота

Организм обладает мощной врожденной антиоксидантной системой для предотвращения накопления АФК и поддержания равновесия между их образованием и нейтрализацией. Эти антиоксиданты включают малые молекулы, такие как глутатион, токоферолы, каротиноиды, и ферменты, такие как СОД, каталаза и глутатионпероксидаза. АФК и азота в основном играют полезную роль, но при патологических условиях могут вызывать деструктивные клеточные повреждения [14,52].

Активные формы азота, такие как оксид азота (NO), перекись азота (NO_2), пероксинитрит (NO_3^-) и другие (рисунок 1), играют важную роль в регуляции различных биологических процессов [53,54]. Эти молекулы обладают свойствами медиаторов сигнальных систем и могут влиять на клеточные функции, включая расширение сосудов, иммунные реакции и

синаптическую передачу в нервной системе. Активные формы азота проявляют свою активность как в физиологических, так и в патологических условиях [54–56]. Например, оксид азота (NO) играет ключевую роль в регуляции сосудистого тонуса, иммунного ответа и нейротрансмиссии [57,58]. Однако, неконтролируемое образование активных форм азота может привести к окислительному стрессу и повреждению клеток [59,60].

Оксид азота ($\cdot\text{NO}$), также известный как фактор релаксации эндотелия (EDRF), обнаружен в разных типах клеток, таких как сосудистый эндотелий, гепатоциты, гладкомышечные клетки, макрофаги, нейтрофилы и легочный эпителий. $\cdot\text{NO}$ синтезируется по меньшей мере тремя формами $\cdot\text{NO}$ -синтазы (NOS), которые были идентифицированы в тканях различных животных и человека как отдельные генные продукты. Эти формы могут быть зависимыми от кальция и постоянно активными (cNOS, конститутивная, тип III и bNOS, тип I), а также независимыми от кальция и активируемыми (iNOS, индуцибельная, тип II). Конститутивная NOS создает малое количество $\cdot\text{NO}$ (в пико-наномолярном диапазоне) короткими импульсами в ответ на сигналы от рецепторов. Индуцибельная NOS, обычно активируемая провоспалительными молекулами, создает гораздо больше $\cdot\text{NO}$ (в нано-микромолярном диапазоне), чем cNOS, и производит его на более длительные периоды времени. Исследования сфокусированы на понимании физиологических, биохимических и молекулярных функций оксида азота как в нормальных, так и в патологических процессах.

Пероксинитрит (ONOO^-) обычно образуется в результате диффузионно-лимитированной рекомбинации высокореактивных радикалов оксида азота ($\cdot\text{NO}$) и супероксид аниона ($\text{O}_2^{\cdot-}$) [61–65]. Пероксинитрит может вырабатываться клетками микроглии, активированными провоспалительными цитокинами или $\text{A}\beta$ в ЦНС [66].

Пероксинитрит, продукт взаимодействия оксида азота и супероксид аниона, участвует в патогенез НДЗ, таких как БА, БП и боковой амиотрофический склероз (БАС) [66,67]. Поскольку пероксинитрит является

сильным оксидантом и соединением, способным вступать в реакцию со всеми классами биомолекул, его гиперпродукция ведет к окислительному повреждению и нитрованию аминокислот [67]. Пероксинитрит проявляет высокую реакционную способность по отношению к CO_2 , что приводит к образованию химически активных промежуточных продуктов, которые являются более мощными нитрирующими веществами, чем сам пероксинитрит. CO_2 повсеместно присутствует в тканях, и соответственно реакция пероксинитрита с CO_2 составляет большую часть реакционной способности пероксинитрита *in vivo*. В ЦНС данная реакция может быть фактором, который усиливает нитрование остатков тирозина, особенно при патологиях, способствующих развитию ацидоза. Исследования показали повышенный уровень пероксинитрита в деградирующем мозге, а его роль в гибели клеток нейронов была продемонстрирована при старении и возрастных дегенеративных заболеваниях [68]. Терапевтические мероприятия, направленные на борьбу с пероксинитритом, такие как катализаторы его распада, показали свою эффективность на животных моделях НДЗ [69].

1.3 Физиологическая роль активных форм кислорода и азота

АФК занимают ключевое место в качестве вторичных мессенджеров в метаболизме Ca^{2+} и процессе фосфорилирования белков [50]. Имеются экспериментальные данные о непосредственном влиянии физиологических концентраций оксидантов (O_2^- , H_2O_2 , NO^*) на состояние Ca^{2+} -каналов и насосов, что сопровождается освобождением Ca^{2+} из клеточных депо или перемещения Ca^{2+} из внеклеточного пространства в цитоплазму клеток [70,71]. Они увеличивают концентрацию Ca^{2+} в цитозоле и тем самым запускают целый каскад реакций, регулируемых Ca^{2+} , что особенно важно в клетках нервной системы. Оксиданты играют значительную роль в реакциях фосфорилирования и дефосфорилирования, которые являются ключевыми механизмами регуляции клеточного метаболизма и сигнализации [72]. В процессе фосфорилирования оксиданты могут активировать ферменты,

известные как киназы, которые переносят фосфатные группы на молекулы белков. Они также способны изменять окислительно-восстановительное состояние клеток, что может влиять на конформацию белков и их доступность для фосфорилирования. Что касается дефосфорилирования, оксиданты могут ингибировать активность фосфатаз — ферментов, отвечающих за удаление фосфатных групп с белков. Кроме того, окислительные модификации, вызванные оксидами, могут изменять функциональные свойства белков и их взаимодействие с фосфатазами [73].

В клетке постоянно происходит образование АФК, однако её жизнеспособность поддерживается за счёт эффективных систем антиоксидантной защиты [15,33]. Данная система способна не только нейтрализовать эти АФК и предотвращать их разрушительное воздействие, но также является одним из важных участников окислительно-восстановительной сигнализации клеток.

Физиологические функции NO разнообразны и включают расширение сосудов, ингибирование адгезии-агрегации тромбоцитов, а также уничтожение патогенов, опосредованное макрофагами и нейтрофилами [52]. Большинство этих эффектов опосредовано активацией растворимой гуанилатциклазы, синтезом циклического гуанозинмонофосфата и активацией семейства киназ [74,75]. Биохимические реакции, сопровождающиеся действием оксида азота, представляют собой многогранный процесс, играющий ключевую роль в регуляции функций клеток и в активации экспрессии генов важнейших медиаторов воспаления [54]. Несмотря на наличие доказательств того, что $\cdot\text{NO}$ играет существенную роль в определенных воспалительных состояниях, окончательные эффекты $\cdot\text{NO}$ могут быть как оксидантными, так и антиоксидантными в зависимости от различных факторов, включая оксидантные, антиоксидантные, антинейтрофильные, антитромбоцитарные и гемодинамические свойства этого вещества [15,58].

Оксид азота может действовать как антиоксидант, поскольку $\cdot\text{NO}$ является эффективным лигандом железа и, следовательно, может

ингибировать зависимое от железа и перекиси водорода производство $\cdot\text{OH}$ [58,59] или приводить к образованию нитрозильных комплексов железа, которые являются менее мощными стимулами перекисное окисление липидов [76]. В литературе указано, что $\cdot\text{NO}$ завершает реакции роста радикальных цепей липида (L) путем объединения с алкоксильными ($\text{LO}\cdot$) и пероксильными ($\text{LOO}\cdot$) промежуточными радикалами во время перекисного окисления липидов с образованием LONO и LOONO [11,55,77]. Предпочтительная реакция $\cdot\text{NO}$ с липидными радикалами может предотвратить окисление α -токоферола [78–80] и тем самым усилить антиоксидантные защитные механизмы тканей. Другие экспериментальные исследования показали, что микромолярные концентрации $\cdot\text{NO}$ могут быть цитотоксичными [54,81]. Сообщается, что прооксидантная роль $\cdot\text{NO}$ способствует повреждению тканей после ишемии, консервационной трансплантации, эндотоксического и гиповолемического шока и атеросклероза [82,83]. Пневмония, индуцированная вирусом гриппа, также приводит к высвобождению провоспалительных медиаторов ($\text{IFN-}\gamma$) и связанному с этим увеличению уровня NO и активности NO -синтазы [84,85]. Эффекты провоспалительных медиаторов на $\cdot\text{NO}$ могут также способствовать повреждению легких и сердца, связанному с гепатоэнтеральной ишемией и хроническими проявлениями, такими как отторжение трансплантата [86,87].

Пероксинитрит имеет двойственный эффект. В положительном ключе он играет роль важного физиологического активатора и сигнальной частицы, контролирующей многочисленные физиологические процессы, а также обеспечивающей устойчивость к экзогенным микроорганизмам [53,88]. Кроме того, он перспективен для вспомогательной терапии рака, усиливая разрушение злокачественных клеток [89,90]. Тем не менее, при избыточном уровне ONOO- живая система может столкнуться с неблагоприятными последствиями. Избыток пероксинитрита приводит к перестройке окислительно-восстановительного состояния организма в прооксидантное состояние, вызывая окислительные повреждения биомолекул, таких как

липиды, здоровые белки, а также нуклеиновые кислоты [91–93]. Это приводит к перекисному окислению клеток, может вызвать повреждение органелл, а также привести к необратимым повреждениям здоровых белков и нуклеиновых кислот, что может способствовать возникновению состояний, ассоциированных с кардиологическими, нейровоспалительными заболеваниями или раком [31,52,94–96]. В зависимости от концентрации пероксинитрита в клетках запускаются различные механизмы, вызывающие некроз, апоптоз, аутофагию, пироптоз и некроптоз [97].

1.4 Основные источники активных форм кислорода в клетках: митохондрии, ферменты и рецепторы

АФК продуцируются в клетках ферментативным и неферментативным способами и играют множественную физиологическую роль в клетках головного мозга [31]. МХ играют важную роль во внутриклеточной редокс-биологии, являясь местом постоянной продукции АФК [51,98]. Важно отметить, что АФК в МХ могут продуцироваться ферментами, не участвующими в процессе производства энергии, в том числе расположенными на внешней митохондриальной мембране, например, МАО и цитохром b5 редуктазой (Cb5R); ферментами внутренней митохондриальной мембраны, такими как глицерол-3-фосфатдегидрогеназа; а в некоторых типах клеток – различными монооксигеназами цитохрома P450. Другими весьма важными источниками АФК в клетках головного мозга выступают ферменты семейства НАДФН-оксидаз, а также ряд иных цитозольных и связанных с мембранами белков. Измерение скорости образования АФК с использованием селективных ингибиторов или активаторов может выступать инструментом оценки роли исследуемых процессов в поддержании внутриклеточного редокс-баланса или его нарушении (рисунок 2).

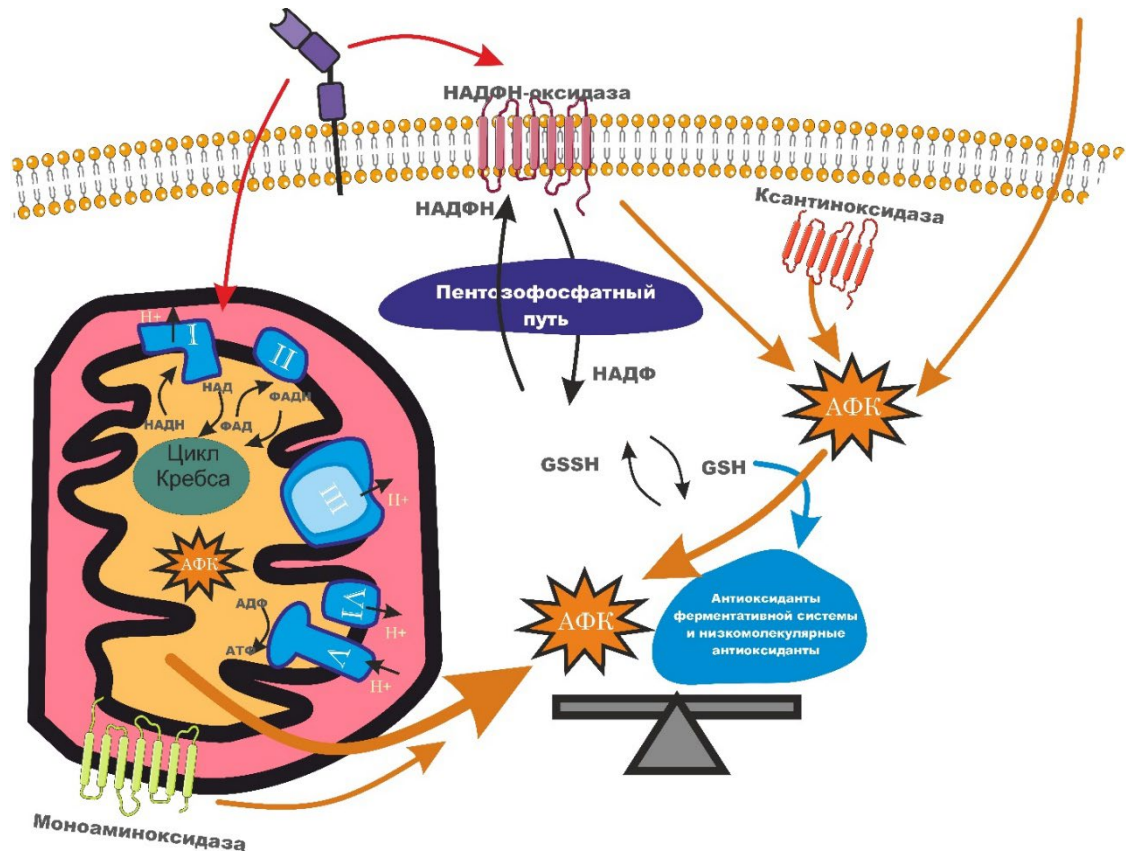


Рисунок 2 – Основные источники АФК в клетке и антиоксидантная система

Основным источником продукции АФК в клетках является ЭТЦ. МХ – одна из важнейших органелл, выполняющих в клетке множество функций. Синтез аденозинтрифосфата (АТФ) в МХ в процессе окислительного фосфорилирования связан с клеточным дыханием и функционированием ЭТЦ митохондрий. Это возможно благодаря поддержанию $\Delta\Psi_m$, который формируется путем транспорта протонов в межмембранное пространство посредством митохондриальных комплексов I, III и IV ЭТЦ. Подавляющее большинство свободных радикалов, называемых в литературе «митохондриальными АФК», продуцируются в процессе работы ЭТЦ. Скорость продукции АФК, $\Delta\Psi_m$ и активность комплексов ЭТЦ взаимосвязаны и взаимообусловлены [48,99]. Поэтому, с одной стороны, нарушение механизмов формирования $\Delta\Psi_m$ может привести к увеличению генерации АФК при ингибировании дыхания [100,101]. Но с другой стороны, процесс разобщения $\Delta\Psi_m$ может привести к снижению скорости производства

свободных радикалов [102,103]. Таким образом, образование АФК в ЭТЦ зависит от высвобождения электронов из ЭТЦ с последующим образованием свободных радикалов. Процесс высвобождения электронов может быть индуцирован обратным потоком электронов и активностью комплексов I и II как доноров электронов, а также частичным ингибированием комплексов ЭТЦ при гиперполяризации мембраны МХ, гипоксии или под влиянием химических соединений [100]. Выход электронов из ЭТЦ генерирует свободные радикалы преимущественно в виде супероксид аниона, который позже преобразуется в пероксид водорода.

Также, некоторые ферменты при осуществлении своих реакций могут производить АФК. Одним из них является НАДФН-оксидаза – это фермент, который обладает способностью катализировать передачу электронов от НАДФН на молекулярный кислород с образованием супероксид аниона и играет ключевую роль в окислительно-восстановительных реакциях [104–107]. Этот процесс является важной частью физиологических и патологических процессов в клетке. Активация НАДФН-оксидазы происходит в результате специфических стимулов, таких как воздействие факторов роста, цитокинов, бактериальных компонентов, окисленных липидов и других сигнальных молекул. Процесс активации НАДФН-оксидазы обычно включает в себя сборку ферментного комплекса и сопровождается образованием супероксид аниона и других АФК. Важно отметить, что дисфункция НАДФН-оксидазы может наблюдаться при различных заболеваниях, включая сердечно-сосудистые, воспалительные, а также нейродегенеративные [104,108–110]. Поэтому исследования по изучению механизмов действия НАДФН-оксидазы имеют важное значение для разработки новых подходов к лечению и профилактике этих заболеваний.

Помимо ферментов и ЭТЦ, увеличение генерации АФК может быть связано как с протеканием реакций гликирования, так и с воздействием его конечных продуктов. Конечные продукты гликирования (AGE) представляют собой гетерогенную группу белков, липидов и нуклеиновых кислот, которые

гликируются и окисляются после постоянного контакта с редуцирующими сахарами посредством неферментативной реакции [111,112]. Было продемонстрировано, что AGE запускают сигнальные каскады и приводят к окислительному стрессу и активации NF-κB, что усиливает проявление патологии у пациентов с БП [113,114]. Активация различных рецепторов конечных продуктов гликирования может вызывать генерацию АФК через активацию НАДФН-оксидазы [104,115,116]. Функциональные сигналы и экспрессия белков, вызванных активацией рецептора конечных продуктов гликирования (receptor for advanced glycation end products, RAGE) под действием таких факторов, как NF-κB, увеличение экспрессии цитокинов и хемокинов, активация MAPK и JAK/STAT, также приводит к активации НАДФН-оксидазы [117], поэтому как связывание лигандов RAGE, так и вызванные RAGE сигналы могут быть использованы для регуляции активности НАДФН-оксидазы. Взаимодействие между RAGE и НАДФН-оксидазой является двунаправленным, при этом выработка АФК способствует дальнейшей экспрессии RAGE. Эта петля положительной обратной связи приводит к хроническому воспалению и повреждению тканей. Хотя точный механизм, с помощью которого RAGE активирует НАДФН-оксидазу, до конца не изучен, считается, что он связан с привлечением внутриклеточных сигнальных молекул, таких как Ras и p47phox, к плазматической мембране [110,118].

Ферментативные антиоксиданты, такие как СОД, каталаза, глутатионпероксидаза и глутатионредуктаза, играют решающую роль в гомеостазе АФК в организме [119,120]. Три фермента СОД – СОД1, СОД2 и СОД3 – активируются в присутствии каталитического металла (Cu или Mn) и катализируют превращение $O_2^{\cdot-}$ в H_2O_2 [32,121]. Глутатионпероксидаза и глутатионредуктаза являются участниками системы GSH [122–124]. Глутатионпероксидаза восстанавливает гидропероксиды липидов до соответствующих им спиртов и свободную перекись водорода до воды при помощи GSH, преобразуя восстановленную форму в окисленный глутатион

(GSSG). GSSG впоследствии преобразуется в GSH с использованием протонов, обеспечиваемых НАДФН, в результате каталитического действия глутатионредуктазы [124,125].

Неферментные антиоксиданты в основном включают витамин С, витамин Е, β -каротин и другие каротиноиды, селен, цинк, таурин и восстановленный глутатион [125], которые играют жизненно важную роль в гомеостазе АФК *in vivo*.

1.5 НАДФН-оксидаза

НАДФН-оксидаза – это фермент, который обладает способностью катализировать передачу электронов от восстановленной формы НАДФН на молекулярный кислород с образованием супероксид аниона и играет ключевую роль в реакциях окисления и восстановления молекул [104–107]. Этот процесс является важной частью физиологических и патологических процессов в клетке.

НАДФН-оксидаза обеспечивает генерацию АФК, которые могут быть как полезными, так и вредными для клетки [107]. АФК участвуют в регуляции различных сигнальных путей, иммунных реакций, а также играют роль в патологических процессах, таких как окислительный стресс и воспаление.

НАДФН-оксидаза имеет несколько подтипов (например, NOX1, NOX2, NOX4 и др.), каждый из которых может активироваться различными путями и играть роль в клеточных процессах [126,127]. Например, NOX2 активируется при фагоцитозе и играет важную роль в генерации АФК в фагоцитах для уничтожения патогенов, в то время как NOX4 часто ассоциируется с регуляцией сигнальных путей и реакцией на клеточное микроокружение [128]. NOX 1 (НАДФН-оксидаза 1) широко распространена в гладкомышечных клетках и клетках эндотелия; участвует в регуляции сосудистого тонуса, пролиферации клеток и реакциях на окислительный стресс [110]. NOX1 активируется факторами роста и гормонами. NOX 2 (НАДФН-оксидаза 2) преимущественно экспрессируется в фагоцитах, таких как нейтрофилы и

макрофаги и играет ключевую роль в иммунном ответе организма на инфекции путем генерации супероксидных радикалов, которые участвуют в уничтожении патогенов [127]. Дефицит NOX 2 может привести к иммунодефицитным состояниям. NOX 3 (НАДФН-оксидаза 3) обнаружен в сенсорных клетках уха и сосудистых клетках. Играет роль в формировании органов слуха и равновесия. NOX3 активируется механическими раздражителями [129]. NOX 4 (НАДФН-оксидаза 4) широко распространен в различных тканях, включая печень, почки и сердце, участвует в регуляции клеточного роста, апоптоза и реакциях на окислительный стресс и имеет важное значение для поддержания окислительно-восстановительного баланса [130]. NOX 5 (НАДФН-оксидаза 5) обнаружена в гладкомышечных клетках, некоторых нейронах и некоторых видов лимфоцитов [110]. Участвует в регуляции тонуса сосудов и роста клеток. NOX 5 отличается от других форм НАДФН-оксидазы тем, что содержит кальций-зависимый N-конечный домен.

Активация НАДФН-оксидаз происходит в результате специфических стимулов, таких как воздействие факторов роста, цитокинов, бактериальных компонентов, окисленных липидов и других сигнальных молекул [129]. Процесс активации НАДФН-оксидазы обычно включает в себя сборку ферментного комплекса и сопровождается образованием супероксид аниона и других АФК.

Активация НАДФН-оксидаз связана с развитием различных НДЗ, например БА, БП и др. Увеличенная продукция АФК может способствовать повреждению нейронов и прогрессированию заболевания. Некоторые исследования связывают увеличенную активацию НАДФН-оксидаз с развитием рака и его метастазированием. Повышенная продукция АФК может способствовать изменениям в клетках, способствующим их превращению в злокачественные и ускоренному распространению раковых клеток в организме. Исследования также указывают на то, что НАДФН-оксидаза может влиять на формирование и накопление агрегированных белков, таких как А β и

α -синуклеин, которые играют важную роль в патогенезе БА и БП соответственно [131–134].

Однако избыточная активация НАДФН-оксидаз и чрезмерная генерация супероксид аниона может привести к развитию окислительного стресса и представлять опасность для клеток и тканей, вызывая воспаление, повреждение ДНК, липидов и белков, и способствуя развитию различных заболеваний, таких как атеросклероз, диабет, нейродегенеративные и онкологические заболевания. Это привело к изучению ингибиторов НАДФН-оксидазы в качестве потенциального терапевтического средства при этих заболеваниях [135,136]. Значимость НАДФН-оксидаз в контексте НДЗ, особенно при БА и БП, была дополнительно выделена, что также подчеркивает необходимость создания специфических ингибиторов НАДФН-оксидазы [11,31,110,137].

Изучение НАДФН-оксидазы включает в себя разнообразные методики, предназначенные для анализа ее структуры, функций и влияния на клеточные процессы. Некоторые из основных методов включают в себя использование иммуноблоттинга для обнаружения белков НАДФН-оксидазы, изучение продукции АФК для оценки ее активности, а также генетические методы для анализа влияния мутаций на ее функционирование [129]. Для более детального изучения структуры НАДФН-оксидазы и ее взаимодействия с другими молекулами широко применяются методы кристаллографии и структурного моделирования. Эти подходы позволяют получить трехмерное представление о белке и исследовать механизмы его работы на молекулярном уровне. Кроме того, методы фармакологического блокирования позволяют исследовать влияние НАДФН-оксидазы на клеточные процессы путем использования специфических ингибиторов [129,138]. Такие подходы помогают понять роль данного фермента в различных патологических состояниях и развитии заболеваний.

Ингибирование НАДФН-оксидазы представляет собой потенциально важную стратегию в контексте нейродегенерации. Ингибируя данный

фермент, можно снизить уровень продукции АФК в клетках и тем самым снизить окислительный стресс и связанные с ним негативные последствия [126,127]. Это может помочь предотвратить дальнейшее повреждение нейронов и снизить прогрессирование НДЗ.

Несколько небольших молекул использовались и до сих пор используются в качестве прямых ингибиторов НАДФН-оксидазы. Хотя многие из этих предлагаемых веществ ингибируют активность НАДФН-оксидазы, большинство из них неспецифичны из-за нескольких нецелевых эффектов или ингибирования особенностей НАДФН-оксидаз, которые не являются уникальными для данного фермента, но также встречаются в других ферментах [129]. Эти неспецифические ингибиторы включают наиболее часто используемые ингибиторы НАДФН-оксидазы, дифениленйодоний (DPI) и апоцинин. DPI действует как общий ингибитор флавопротеинов, а также ингибирует эндотелиальную синтазу оксида азота, КО и белки ЭТЦ [129,130]. Другие предлагаемые ингибиторы, такие как АЕBSF (4-(2-аминоэтил) гидрохлорид бензолсульфонил фторид) или плюмбагин, используются реже. АЕBSF ингибирует сериновые протеазы, а плюмбагин действует как антиоксидант и оказывает ряд других неспецифических эффектов, таких как ингибирование NF-κB и бактерицидное действие [129,139]. Ни один из упомянутых здесь ингибиторов не проявляет значительной селективности ни в отношении одной из изоформ NOX 1–5. Некоторые ингибиторы препятствуют обнаружению АФК. Однако, в настоящее время был создан GSK2795039 [140] – новый низкомолекулярный селективный ингибитор NOX2. Воздействуя на NOX2, GSK2795039 ингибирует выработку АФК, которые играют ключевую роль в процессах окислительного стресса и воспаления [140]. Доклинические исследования показали многообещающие результаты для GSK2795039 в снижении окислительного повреждения и воспаления при различных моделях заболеваний. Ингибирование NOX2 с помощью GSK2795039 может иметь терапевтический потенциал при состояниях, связанных с окислительным стрессом, таких как сердечно-

сосудистые заболевания, воспалительные расстройства и нейродегенеративные заболевания.

1.6 Ксантиноксидаза

К важным ферментам из класса оксидаз, поддерживающим общий метаболизм клеток, относится ксантиноксидаза. Granger et al. [87] предположили, что оксидазная форма фермента ксантиноксиредуктазы, КО является важным биологическим источником АФК и что эти оксиданты играют важную роль в повреждении тканей. В течение следующего десятилетия произошел настоящий взрыв в литературе – вышло более 3000 публикаций, которые характеризовали продукцию АФК с помощью КО [141,142] и функцию КО-производных оксидантов [143,144] в хемотаксисе, регуляции оксида азота [145] и в этиологии патологических процессов [141,146–148].

КО — это фермент комплекса ксантиноксидоредуктазы, который генерирует АФК, катализирует окисление гипоксантина до ксантина и далее катализирует окисление ксантина до мочевой кислоты [149,150]. Она генерирует АФК, катализируя окисление ксантина и гипоксантина в процессе метаболизма пуринов и участвует в реакции восстановления НАД⁺ до НАДН и кислорода до супероксид аниона или перекиси водорода [151–153]. КО уменьшает количество молекулярного кислорода, что приводит к образованию супероксид аниона и H₂O₂. В сосудистой системе КО может производить большое количество АФК в патофизиологических условиях, таких как атеросклероз и ишемическое повреждение [142].

Этот фермент экспрессируется не только в сосудистых и эндотелиальных клетках, но и циркулирует в плазме крови. Активность сосудистого КО регулируется НАДФН-оксидазой, поскольку генерация H₂O₂ под действием НАДФН-оксидазы стимулирует активность КО. Таким образом, клеточная генерация АФК из одного ферментативного источника приводит к образованию АФК другим. Роль КО как сосудистого источника АФК при

гипертонии была предположена на основании снижающего артериальное давление действия ингибиторов КО, аллопуринола и оксипуринола, а также обнаружения того, что активность оксидазы повышена у крыс линии SHR [169]. Сосудистые АФК, создаваемые КО, могут быть особенно важны в условиях, связанных с дисфункцией эндотелия. Предполагается, что повышенная активность КО связана с астмой, воспалением, активацией эндотелия, активацией лейкоцитов, регуляцией сосудистого тонуса и различными патофизиологическими состояниями [153,154].

Изначально считалось, что в мозге практически отсутствует активность КО, поэтому не уделялось внимания участию этого фермента в индуцированном свободными радикалами повреждении ишемизированного мозга [152,155,156].

Несмотря на многолетние исследования, до сих пор мало известно о физиологических функциях КО. В качестве основных функций КО можно указать участие в метаболизме пуринов, генерацию оксидантов и антиоксидантов, передачу сигналов и метаболизм лекарственных препаратов [142,157–159].

Основная важная функция ксантиноксидоредуктазы - выступать в роли регулятора, контролирующего два последних этапа деградации пуринов: превращение гипоксантина в ксантин и ксантина в мочевую кислоту [160]. Этапы, катализируемые ксантиноксидоредуктазой в пурине, определяют, могут ли пуриновые нуклеотиды быть вновь синтезированы из пуриновых оснований или пуриновые основания будут необратимо потеряны. Утрата в ходе эволюции уратоксидазы, которая деградирует мочевую кислоту до аллантаина, приводит к тому, что мочевая кислота становится конечным продуктом пуринового обмена у человека. В результате уровень мочевой кислоты в плазме крови человека может достигать 500 мкМ. Помимо пуринов, ксантиноксидоредуктаза способна окислять различные птеридины, другие гетероциклические соединения и альдегиды [161].

Мочевая кислота играет важную роль как физиологически значимый антиоксидант в плазме [162,163]. Она подвергается окислению различными активными веществами до относительно стабильных продуктов окисления. Она эффективно защищает биологические молекулы-мишени от окисления гидроксильным радикалом ($\cdot\text{OH}$), хлорноватистой кислотой (HOCl) и пероксинитритом. При окислении мочевой кислоты в плазме образуются её продукты окисления (аллантиин и парабановая кислота), которые могут служить показателями продукции окислителей. Физиологические концентрации мочевой кислоты существенно ингибируют активность ксантиноксидоредуктазы и образование $\text{O}_2^{\cdot-}$ в крови человека [163]. У новорожденных также наблюдается подавление активности ксантиноксидоредуктазы мочевой кислотой, причём подавление образования $\text{O}_2^{\cdot-}$ оказывается даже более сильным, чем у взрослых.

Помимо своих основных функций, недавно было обнаружено, что КО также участвует в передаче разнообразных физиологических сигналов [31,71,152]. Передача сигналов между нейронами включает в себя использование ионотропных рецепторов, которые являются мембранными лигандозависимыми каналами.

Таким образом, недавние данные показывают, что основной целью КО является не выработка цитотоксических оксидантов, а скорее участие в различных физиологических процессах, включая пуриновый метаболизм, образование антиоксидантов, передачу сигнала и метаболизм некоторых лекарств [142]. Однако при определенных патологических состояниях КО может вызывать избыточное образование оксидантов и приводить к обширному повреждению клеток и тканей.

1.7 Ферменты метаболизма катехоламинов

Катехоламины (адреналин, норадреналин, дофамин) метаболизируются множеством ферментов, среди которых интерес в рамках участия в деградации дофамина представляют Катехол-О-метилтрансфераза (COMT), которая

участвует в метилировании, и МАО, которая катализирует окисление арилалкиламиновых нейротрансмиттеров, являются основным путем расщепления дофамина.

Катехол-О-метилтрансфераза (СОМТ) — ключевой фермент, играющий важную роль в метаболизме катехоламинов, таких как дофамин, адреналин и норадреналин. Основная функция СОМТ заключается в катализе переноса метильной группы из S-аденозилметионина на катехоламины, что способствует выведению избытка этих веществ из организма и преобразованию их в менее токсичные соединения. Наблюдение за тем, что норадреналин и адреналин метаболизируются до соответствующих метиламинов норметанефрина и метанефрина, побудило к поиску О-метилирующего фермента [164]. СОМТ, впервые описанная в печени крысы [165], нуждается в S-аденозилметионине в качестве донора метила, а также в двухвалентном катионе, таком как Mg^{++} .

СОМТ широко распространена в органах, где эти катехоламины выполняют свои функции, включая мозг и почки [164–166]. Ген СОМТ человека (и других млекопитающих) кодирует две формы белка: мембраносвязанную и растворимую форму [167,168]. Обе формы широко распространены в мозге и других органах [169]. В мозге высокие уровни СОМТ присутствуют в части мозга, ответственной за высшие психические функции.

Основной областью терапевтического применения ингибиторов СОМТ является лечение БП и связанных с ней патологий. Ингибиторы, не проникающие через гематоэнцефалический барьер, используются для увеличения биодоступности L-диоксифенилаланина (L-ДОФА), препарата-предшественника дофамина [167,170]. Ингибирование СОМТ также предотвращает патологическое накопление гомоцистеина, образующегося при метилировании L-ДОФА СОМТ, и связанное с этим развитие периферической нейропатии [171].

Помимо фермента СОМТ, распад катехоламинов также происходит под влиянием фермента МАО. Данный фермент относится к семейству оксидоредуктаз и играет важную роль в метаболизме моноаминов, таких как серотонин, норадреналин и дофамин, в центральной нервной системе и других тканях [172,173]. МАО отвечает за расщепление избыточных нейротрансмиттеров, которые высвобождаются в межсинаптическое пространство, предотвращая накопление этих молекул и поддерживая баланс нейротрансмиттеров. МАО обнаруживается в различных областях мозга, включая кору головного мозга, полосатое тело и гиппокамп [174,175]. Кроме того, внутриклеточное распределение МАО варьируется, данный фермент обнаруживается в разных клеточных компартментах [173,174,176,177].

Изучение МАО началось с его открытия в 1928 году и с тех пор привлекало внимание исследователей различных научных дисциплин. Немецкий фармаколог Книппер и его коллега Вогт впервые обнаружили фермент МАО в тканях печени и кишечника с использованием техники химического анализа [174,178]. В течение десятилетий ученые проводили многочисленные исследования, чтобы понять роль МАО в физиологии и патологии. В начале 1930-х исследователи начали изучать функции и механизмы действия МАО в организме [179,180]. Исследования нейротрансмиттеров дофамина, серотонина и норадреналина привели к более глубокому пониманию роли МАО в их метаболизме. Было выявлено, что МАО играет ключевую роль в разрушении этих моноаминов в организме. В течение дальнейших 20 лет были проведены более подробные исследования по роли МАО в метаболизме нейротрансмиттеров и его связи с различными психическими расстройствами. Идентификация двух изоформ МАО (МАО-А и МАО-Б) и их различная специфичность к различным моноаминам стала важным этапом в исследовании МАО [173,181]. Исследования по МАО стали активно включать в себя изучение генетических аспектов этого фермента и его связь с различными заболеваниями [182–184]. Были разработаны и внедрены ингибиторы МАО в клиническую практику для лечения депрессии и других

психических расстройств [185,186]. В последние десятилетия ученые также обращают внимание на генетические аспекты МАО и их связь с различными заболеваниями. Новейшие исследования направлены на разработку более эффективных ингибиторов МАО и на индивидуализированный подход к лечению на основе генетического профиля пациентов.

Взаимосвязь между МАО и нейротрансмиттерами сложна и двунаправлена. С одной стороны, МАО отвечает за расщепление избыточных нейротрансмиттеров. С другой стороны, активность МАО также может влиять на уровень нейротрансмиттеров в мозге. Например, повышенная активность МАО связана со снижением уровня дофамина и серотонина [187,188]. Эта взаимосвязь имеет серьезные последствия для психического здоровья и нейродегенеративных расстройств, поскольку дисбаланс уровней нейротрансмиттеров связан с различными психиатрическими и неврологическими состояниями [187,189].

Структурно МАО представляют собой димер, то есть каждая изоформа фермента состоит из двух субъединиц: α и β , которые неоднородны по размерам и молекулярным массам [175]. Они обладают активным центром, содержащим флавинмононуклеотид, который является кофактором фермента и участвует в катализе окислительных реакций.

Функции МАО включают в себя катализ окислительной деградации моноаминов, снижение их уровня в синаптическом пространстве и тем самым регулирование нейротрансмиттерных систем [174,190]. Существует два основных изофермента МАО: МАО-А и МАО-Б, которые различаются по своей специфичности в отношении моноаминов. Моноаминоксидаза типа А (МАО-А) обычно ассоциируется с метаболизмом нейромедиаторов, таких как серотонин, норадреналин и дофамин [183]. Этот изофермент находится в высоких концентрациях в клетках нервной ткани, а также в кишечнике и плаценте. МАО-А преимущественно катализирует окисление аминов, содержащих ароматическую структуру. Моноаминоксидаза типа В (МАО-Б) обычно отвечает за метаболизм аминов, таких как фенилэтиламин и тирамина

[185]. Этот изофермент более распространен в клетках печени. В отличие от МАО-А, МАО-Б не так сильно ассоциирован с метаболизмом нейромедиаторов, но играет важную роль в метаболизме других аминов [191,192].

Исследования показали, что МАО типов А и Б играет разную роль НДЗ, причем МАО-Б связана с гибелью нейронов, а МАО-А потенциально выполняет нейропротекторную функцию [193]. Например, низкий уровень МАО может быть связан с депрессией, в то время как высокий уровень МАО может считаться фактором риска для некоторых неврологических заболеваний. Кроме того, МАО играют роль в регуляции эмоционального поведения, настроения, агрессии, аппетита и когнитивных функций.

МАО была определена как значительный источник АФК в различных условиях, включая экспериментальный диабет [194] нейровоспаление и нейродегенерацию [195,196]. Это связано с наличием редокс-активного дисульфида в каталитическом центре как МАО-А, так и МАО-Б [197]. Физико-химические свойства фермента, такие как его сродство к кислороду и амину, также играют роль в генерации АФК [48,198]. К тому же кальциевая сигнализация в астроцитах инициируется метаболизмом дофамина именно МАО, что приводит к стимуляции активации фосфолипазы С и высвобождение кальция, что говорит о важной роли МАО в регуляции окислительно-восстановительной сигнализации клеток мозга [199].

Дисрегуляция МАО связана с различными психическими расстройствами, в частности с большим депрессивным расстройством [190,200]. Однако последние исследования показали сложность функций МАО, которые выходят за рамки его каталитической активности и зависят от таких факторов, как посттрансляционные модификации, эпигенетические влияния и взаимодействие с другими белками [201]. Ферменты МАО играют центральную роль в патогенезе БА [202]. Было обнаружено значительное увеличение активности МАО-А и -Б, а также более высокие уровни экспрессии матричной РНК МАО в тканях лобной коры пациентов с БА [182,203].

Активность и функция МАО-А могут зависеть от его физического взаимодействия с определенными вариантами пресенилина-1, связанными с БА, которые ответственны за перепроизводство А β при семейных формах БА [204,205]. Активированная МАО индуцирует экспрессию β -секретазы и γ -секретазы с последующим увеличением генерации А β и последующим образованием олигомеров и протофибрилл А β , которые играют ключевую роль в нейродегенеративных процессах при БА [202,206]. Все эти исследования предполагают наличие сильной связи между гиперактивностью МАО и фибриллогенезом А β при БА, а также обоснованность изучения на экспериментальных моделях БА нейропротекторной эффективности ингибиторов МАО — класса антидепрессантов, используемых в настоящее время для лечения БА [207]. Ингибиторы МАО представляют собой класс фармакологических средств, используемых в медицине для подавления активности ферментов МАО-А и -Б. В частности, было установлено, что ингибиторы МАО-Б, такие как селегилин и разагилин, защищают нейроны в моделях нейродегенерации [208]. Было высказано предположение, что эти ингибиторы могут замедлить, остановить или даже обратить вспять нейродегенерацию при БП и БА [209]. В клеточных моделях селегилин и разагилин увеличивали различные классы нейротрофических факторов, нейротрофины (фактор роста нервов, нейротрофический фактор головного мозга, нейротрофин 3) и лиганды нейротрофического фактора, полученного из глиальной клеточной линии, соответственно [184]. Исследования на нечеловекоподобных приматах и пациентах с болезнью Паркинсона дополнительно подтвердили индукцию этих специфических нейротрофических факторов [210]. Ожидается, что селегилин и разагилин проявят различную фармацевтическую активность в селективных нейрональных системах посредством индукции различных нейротрофических факторов, а затем активации их собственных рецепторов и киназных систем.

Однако для полного понимания механизмов и потенциала ингибиторов МАО в лечении НДЗ необходимы дальнейшие исследования. В настоящее

время изучаются нейропротекторные свойства ингибиторов МАО, позволяющие рассматривать их в качестве новых многообещающих препаратов для лечения когнитивных нарушений при БА и других видов деменции [172,205,210,211]. Было высказано предположение, что нейропротекторная активность ингибиторов МАО может быть независимой от ингибирования ими МАО [212], и в настоящее время изучаются двойные ингибиторы, сочетающие антиацетилхолинэстеразную активность и активность МАО в одной молекулярной структуре [213], хотя ни в одном исследовании еще не проверяли, могут ли ингибиторы МАО предотвращать агрегацию А β и уменьшать образование фибрилл.

1.8 Характеристика отдельных заболеваний, сопровождающихся митохондриальными нарушениями

Дефекты в МХ могут привести к дисфункции клеток и, в случае нервных и мышечных клеток, это может быть особенно разрушительным из-за их высокого энергопотребления. Митохондриальная дисфункция, возникшая вследствие мутаций или естественного старения организма, может привести к накоплению повреждений в нервной ткани и в итоге к дегенеративным изменениям, характерным для НДЗ и связанным патологиям.

НДЗ, включая БП и БА, болезнь двигательных нейронов и прионную болезнь, имеют несколько общих черт, таких как накопление аномально агрегированных белков, и участие окислительного стресса и дисфункции МХ в патогенезе [214–216]. Успехи в изучении механизмов таких нарушений позволили выявить ряд генов, ассоциированных с наследственными формами данных заболеваний, а также ряд токсинов и факторов риска, запускающих спорадические и токсические формы этих заболеваний. Несмотря на разницу в повреждении определённых областей мозга и в этиологии болезней, было обнаружено значительное сходство в механизмах НДЗ, включая нарушение фолдинга определенных белков, митохондриальная дисфункция, окислительный стресс и нарушение передачи кальциевого сигнала в нейронах

и астроцитах. Комбинации этих факторов могут быть триггером гибели нейронов при некоторых патологиях. Исходом развития НДЗ нередко является синдром деменции – стойкое угнетение высшей нервной деятельности, которому, по современным оценкам, подвержено 37 миллионов человек [217].

Многие из генов, ассоциированных с БА, БАС или атаксией, связаны с МХ. Все агрегированные аномально свернутые белки, которые участвуют в нейродегенеративных нарушениях (А β , тау, α -синуклеин и хантингтин), ингибируют митохондриальную функцию и вызывают окислительный стресс [18]. Важно отметить, что мутации в митохондриальной ДНК приводят не только к митохондриальной миопатии, энцефалопатии, лактоацидозу и эпизодам, похожим на инсульт, или миоклонической эпилепсии, но также к БП. Участие окислительного стресса в механизме потери нейронов установлено для большинства нейродегенеративных расстройств [14,67,214]. Однако антиоксидантная терапия не показала клинического эффекта для большинства из этих болезней [15,120,218].

Основными гистопатологическими признаками БА, описанной более 100 лет назад, являются внеклеточные сенильные бляшки (в основном образованные агрегированными молекулами А β , внутриклеточные нейрофибриллярные глобулы (образованные тау-белком), а также наблюдается утрата холинергических нейронов в базальных ядрах [219]. Основные исследования БА сосредоточены на выявлении эффектов различных форм А β или гиперфосфорилированного и/или агрегированного тау-белка, изучении трансгенных животных с мутациями в APP, PSEN1, PSEN2 или других генах, повышающими генетический риск заболевания, например, APOE. Тем не менее, патогенез БА до конца неясен, при этом современные концепции предполагают ключевую роль митохондриальной дисфункции, нарушения кальциевого метаболизма и окислительного стресса в развитии нейропатологии [220].

Болезнь Паркинсона (БП) является вторым по распространенности НДЗ и характеризуется прогрессирующей потерей дофаминергических нейронов в

черной субстанции [132,216,221–223]. БП является одной из наиболее распространенных форм двигательных расстройств у человека и одной из самых частых патологий среди первичных хронических нейродегенеративных заболеваний. Распространенность БП в общей популяции составляет до 140 случаев на 100 000 населения. Около 5–7% случаев имеют прямую наследственную основу. Семейный характер заболевания по данным разных авторов и перспективных исследований встречается у 15%–23% больных. Риск развития заболевания повышается с возрастом. Возраст, в котором, как правило, начинается заболевание - старше 50 лет [224]. БП диагностируется по изнурительным двигательным симптомам (тремор, брадикинезия, ригидность и поструральная неустойчивость), хотя немоторные симптомы, такие как депрессия и галлюцинации, также затрагивают людей, живущих с БП [225]. Основным признаком этого заболевания является образование внутринейрональных белковых включений, называемых тельцами Леви и нейритами. Одним из компонентов этих включений является α -синуклеин [226–228], который в патологических условиях может образовывать токсичные и передающиеся от клетки к клетке амилоидные структуры. Учитывая такую тесную связь с заболеванием, важно понять роль данного белка в нормальном функционировании дофаминергических нейронов, чтобы узнать, как его дисфункция способствует нейродегенерации.

Метаболизм пуринов жизненно важен для всех живых организмов, так как он отвечает за синтез и разложение сложных соединений, необходимых для образования ДНК и РНК. Пуриновые нуклеотиды синтезируются преимущественно путем пуринового окисления [159], где один из ключевых ферментов это HPRT1 (EC.2.4.2.8), отвечает за производство инозинмонофосфата из гипоксантина и гуанозинмонофосфата из гуанина [20,229,230]. HPRT1 – фермент, который катализирует превращение гипоксантина в инозинмонофосфат и гуанина в гуанозинмонофосфат путем переноса 5-фосфорибозильной группы из 5-фосфорибозил 1-пирофосфата. Он кодируется одним структурным геном на хромосоме Xq26 [231]. Мутации

данного гена приводят к гиперурикемии, гиперурикозурии и нейродегенерации. Неврологические проявления включают тяжелую дистонию, хореоатетоз, баллизм, когнитивные нарушения и дефицит внимания, а также самоповреждающее поведение. Тяжесть патологии зависит от активности фермента, которая значительно изменяется при заболевании. Полное отсутствие каталитической активности HPRT1 проявляется в развитии всех перечисленных симптомов и классифицируется как СЛН [231,232]. В случае частичного снижения активности фермента (синдром Келли-Сигмиллера) основным симптомом является гиперурикемия, но могут возникать и некоторые неврологические состояния. Поскольку ген HPRT1 локализован на X-хромосоме, клинические симптомы развиваются почти исключительно у мужчин, в то время как гетерозиготные женщины являются бессимптомными носителями [231].

Если этиология симптомов, связанных с повышенным образованием мочевой кислоты, изучена сравнительно хорошо, то связь между нарушениями метаболизма пуриновых оснований и развитием неврологических расстройств остается малоизученной. Известно, что в тканях центральной нервной системы уровень HPRT1 значительно выше, чем в остальном организме. Максимальная активность фермента показана для базальных ганглиев, характеризующихся наименьшей интенсивностью синтеза пуринов *de novo*. Различными исследователями на моделях СЛН показана дисфункция дофаминергической нейромедиаторной системы. В наибольшей степени это проявляется в базальных ганглиях, где наблюдается снижение уровня дофамина на 70–90%, а также увеличение содержания серотонина и 5-гидроксииндолацетата. Снижение уровня дофамина на 60% было также показано в коре, гиппокампе и стриатуме мышинной модели с нокаутом HPRT1 [229].

Основные принципы терапии данного синдрома включают профилактику и лечение мочекаменной болезни и подагры (у взрослых) и коррекцию неврологических проявлений. Однако мероприятия по снижению

дисбаланса мочевой кислоты, даже начатые с рождения, не уменьшают самоповреждения и тяжелые двигательные нарушения у пациентов с СЛН [232,233], что позволяет предположить независимые механизмы неврологических нарушений.

Помимо НДЗ, которые тесно связаны с нарушением окислительно-восстановительной сигнализации и окислительным стрессом, старение организма приводит к накоплению повреждений в других клетках и органах, помимо головного мозга [234]. Постепенное ухудшение антиоксидантной защиты и увеличение окислительных процессов в клетках всего организма способствуют развитию различных возрастных патологий, таких как сердечно-сосудистые заболевания, онкологические заболевания и неврологические расстройства.

Мышцы – самый большой и самый энергозатратный орган человеческого тела. На скелетные мышцы приходится 40-50% сухой массы тела [235–237]. Мышцы играют важную роль в поддержании положения тела, переносимости физических нагрузок и терморегуляции. Высокий уровень потребления субстрата, а также выработка и высвобождение метаболитов определяют мышцы как важный регулятор метаболизма [236,238].

Около 30% энергозатрат организма в состоянии покоя и почти 100% энергозатрат всего организма при физической нагрузке расходуется скелетными мышцами и сердцем [237,239]. К наиболее энергоемким процессам, обеспечивающим сокращение мышц, относятся транспорт ионов (главным образом Ca^{2+} -транспорт в эндо- и саркоплазматический ретикулум с помощью специального насоса и $\text{Na} / \text{K}^{++}$ -транспорт с помощью АТФаз) и хемомеханическая трансдукция взаимодействия миозин-актин (миозиновая АТФаза) [7,240]. Внутриклеточной концентрации АТФ (5-8 мМ) достаточно для обеспечения нескольких секунд физической активности, и ее истощение может быть быстро компенсировано креатинкиназной реакцией, которая является вторичным источником АТФ, в то время как комбинация гликолиза и окислительного фосфорилирования в основном генерирует АТФ, используя в

качестве субстратов внутриклеточный гликоген или циркулирующую в крови глюкозу и образующиеся в результате гликолиза пируват, жирные кислоты или аминокислоты [7,238,241].

Баланс между гликолизом и окислительным фосфорилированием зависит от возраста, типа и физиологии фибрилл и миоцитов, а также от вида физической активности [241,242]. Если в мышечных клетках плода преобладает гликолиз, то в более поздние периоды резко возрастает роль окислительного фосфорилирования [243]. Как было показано на гладкомышечных клетках артерий, эти два пути дают примерно одинаковый стабильный уровень АТФ, но различаются по резервной емкости – увеличение в 1,25 раза для гликолиза и в 3,5 для окислительного фосфорилирования [244]. Анаэробный гликолиз является предпочтительным биоэнергетическим путем в быстро сокращающихся волокнах с более высокой утомляемостью, силой сокращения и более низкой окислительной способностью [245]. Следует отметить, что возрастные изменения приводят к значительному снижению резервных возможностей, особенно в случае окислительного фосфорилирования [7].

Влияние МХ на биоэнергетику мышечных клеток представляется очень важным компонентом регуляции клеточного метаболизма. Так, АМФ-активируемая протеинкиназа, АМФК, ключевой игрок в поддержании энергообеспечения, влияет на функции МХ, биогенез, митофагию и процессы митохондриальной динамики [60]. С другой стороны, вырабатывая АФК, МХ могут активировать АМФК или увеличивать инсулиннезависимое потребление глюкозы. Кроме того, увеличение количества митохондриальных АФК в период после тренировки приводит к адаптации к физической нагрузке. Правильная работа МХ является важным условием для восстановления мышц, поскольку повышается потребность в энергии для дифференцировки миобластов. Эта же причина определяет необходимость здоровых МХ в процессе активации мышечных стволовых клеток, который может быть

отсрочен путем ингибирования аутофагии, включая селективную утилизацию МХ [246].

Мышечная слабость и нарастающая атрофия мышц, обусловленные биоэнергетическими нарушениями, являются признаками ряда заболеваний и метаболических расстройств, а также могут быть связаны со старением. Нарушение биоэнергетического статуса, клеточного цикла и повышенный уровень апоптоза были показаны для миобластов и миосимпластов пациентов с врожденной мышечной дистрофией типа 1А и синдромом Лея [242]. Сдвиг биоэнергетического профиля гладкомышечных клеток может приводить к дедифференцировке и повышенной пролиферации клеток с последующим повышением риска сосудистых заболеваний [244]. Клетки скелетных мышц у пациентов с синдромом хронической усталости характеризуются дисфункцией окисления глюкозы [247]. В мышечных волокнах доноров, страдающих ожирением, по сравнению с мышечными волокнами здоровых доноров, наблюдалась регрессия гликолитического, апоптотического и гипоксического путей с увеличением поглощения глюкозы, аминокислот и жирных кислот, а также снижение регрессии пентозофосфатного пути и окисления жирных кислот [238]. Мышцы пожилого человека характеризуются более высоким уровнем утомления по сравнению с молодыми из-за снижения производства АТФ и большего увеличения концентрации протонов и неорганического фосфата. Митохондриальные изменения, приводящие к перепроизводству АФК, являются частью механизма мышечной атрофии через катаболические пути во время хронического мышечного истощения [248].

Усиленная потеря мышечной массы и функции являются основными признаками саркопении [29]. Преимущественно саркопения поражает людей пожилого возраста и может быть ускорена генетическими факторами и образом жизни. Она составляет от 5 до 50 % в зависимости от пола, возраста, патологических состояний, а также диагностических критериев и при отсутствии лечения влечет к значительным нагрузкам на систему здравоохранения и снижению качества жизни людей [30,249]. Окислительный

стресс играет важную роль в развитии саркопении, так как повреждение клеток мышц и недостаточное их восстановление приводят к прогрессивной потере мышечной массы и силы [28] Это, в свою очередь, ухудшает качество жизни пациентов и приводит к увеличению риска возникновения заболеваний опорно-двигательного аппарата, сердечно-сосудистых и метаболических расстройств. Хотя саркопения признана заболеванием [23], отсутствует консенсус в отношении ее клинической идентификации [250,251]. Многофакторный патогенез этого заболевания включает усиление экспрессии ингибиторов мышечного роста и окислительного стресса, дисфункцию нервно-мышечных соединений, нарушение функции мышечных стволовых клеток, снижение биогенеза и функции МХ, уменьшение синтеза мышечного белка, активацию катаболических путей и развитие инсулинорезистентности. Эти признаки приводят к реорганизации мышечных волокон, дегенерации миофибрилл и гибели миоцитов, что подробно описано в ряде обзоров [26,252–255].

Исследования показывают, что эффективная борьба с окислительным стрессом может помочь замедлить старение и предотвратить или замедлить развитие патологий, связанных с ним, включая саркопению [27,28,256]. Увеличение потребления антиоксидантов через питание и применение специальных добавок может снизить уровень улучшить функцию клеток и тканей, а также повысить качество жизни. Кроме того, физическая активность и регулярные упражнения могут способствовать образованию антиоксидантов в организме и улучшить обмен веществ в мышцах, что поможет предотвратить саркопению и снизить риск возникновения патологий, связанных с окислительным стрессом и старением [30,252].

Прием диетических добавок может рассматриваться как один из способов предотвращения мышечной атрофии. Было показано, что бетаин может способствовать дифференцировке мышечных волокон и увеличению размера миофибрилл, что приводит к снижению утомляемости [257]. Прием глутамина стимулирует пролиферацию сателлитных клеток с последующей

дифференцировкой в миобласты и слиянием с миофибриллами [258]. Сукцинат повышает выносливость, экспрессию тяжелой цепи миозина I, активность аэробных ферментов, потребление кислорода и биогенез МХ в скелетных мышцах мыши, что связано с ремоделированием мышечных волокон от быстро- к медленно сокращающимся [259]. Но в то же время некоторые добавки, содержащие сукцинат, могут привести к ухудшению гликолиза в тканях и угнетению метаболизма [260]. Для пациентов, страдающих саркопенией, разработано несколько диетических стратегий. Наиболее важными компонентами в них являются незаменимые аминокислоты, средне- или длинноцепочечные триглицериды, углеводы, витамины (особенно витамин D), L- карнитин, креатин, минералы и клетчатка [30].

1.9 Белки семейства синуклеинов: характеристика структуры, распределения в организме и роли в физиологии и патологии

Как было сказано выше, одним из компонентов телец Леви является агрегированная форма α -синуклеина. Но помимо α -синуклеина, в организме млекопитающих содержатся и другие типы белков синуклеинов.

Синуклеины (α , β и γ) представляют собой семейство высококонсервативных белков, специфичных для позвоночных, которые концентрируются в пресинаптических терминалях нейронов и, как считается, участвуют в регуляции везикулярного высвобождения и рециркуляции нейротрансмиттеров. α -синуклеин был назван в честь его локализации на синаптических везикулах и на ядерных оболочках, выделенных из электрического органа ската Торпедо [227,261]. Параллельно α -синуклеину был идентифицирован как неамилоидный β -компонент (Non-Amyloid- β Component, NAC) [262], обнаруженный в амилоидных бляшках пациентов с болезнью Альцгеймера [263].

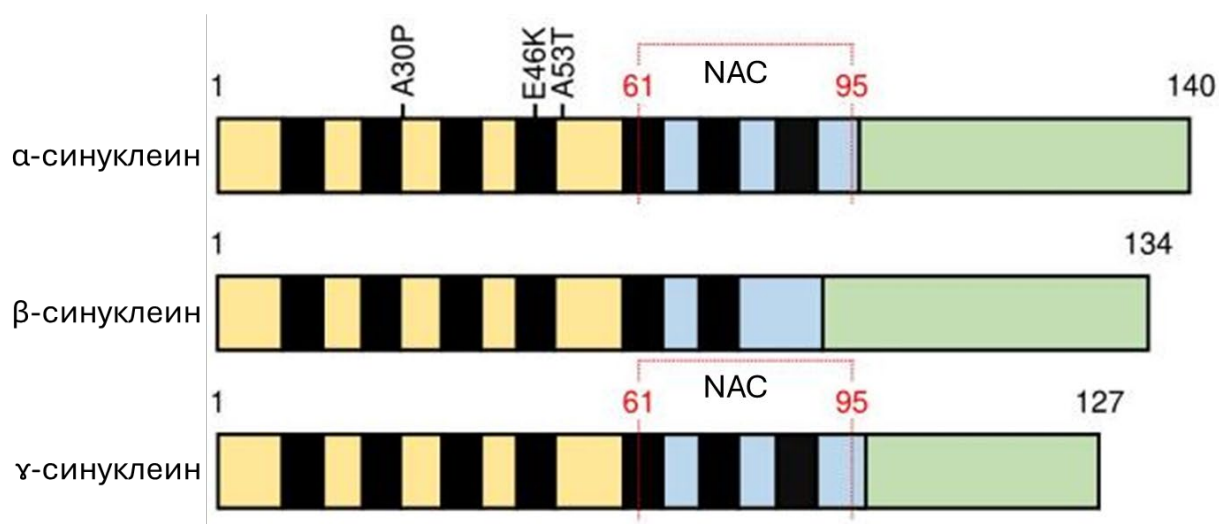


Рисунок 3 – Схема строения белков синуклеинов (α , β и γ) с выделением участка, соответствующему неамилоидному компоненту (NAC). Рисунок адаптирован на основе работы [264]

Конкретная биологическая функция α -синуклеина остается неясной. Тем не менее, многочисленные исследования предложили множество функций для локализации α -синуклеина в зрелом ядре нейрона, МХ и нервных терминалях. Среди предложенных физиологических функций α -синуклеина – регуляция синаптической передачи, регуляция кальция, АТФ-синтазы, шаперонная активность и предотвращение окисления ненасыщенных липидов [265–267]. Несмотря на то, что митохондриальные аномалии также считаются общим признаком для всех НДЗ, появляющиеся данные о генах, вызывающих БП, указывают на то, что значительное число этих генов (11 из 15 генов) вовлечены в регуляцию митохондриальной функции [268]. Кроме того, многочисленные доказательства свидетельствуют о том, что накопление α -синуклеина в МХ нарушает функцию комплекса I ЭТЦ в дофаминергических нейронах.

В настоящее время существуют данные о том, что мыши, лишённые α -синуклеина, устойчивы не только к МРТР, но также к малонату и 3-нитропропионовой кислоте, и что у них снижено образование АФК. Это позволяет предположить, что дефицит α -синуклеина приводит к нейропротекции за счет снижения окислительного стресса. Это согласуется с наблюдениями, что высокая экспрессия α -синуклеина увеличивает

окислительный стресс [269]. Повышенный уровень α -синуклеина может ингибировать протеасому, что затем приводит к окислительному повреждению *in vitro* [270,271].

В культивируемых нейронах гиппокампа другой линии мышей с нокаутом α -синуклеина было обнаружено меньше синаптических везикул, чем у контрольных мышей, особенно в резервной области, популяции неактивных везикул, которые рекрутируются во время периодов повторяющейся стимуляции. Более того, у этих мышей наблюдались дефекты синаптической передачи после длительной высокочастотной стимуляции. Эти данные показывают, что одной из физиологических функций α -синуклеина может быть регулирование цикла синаптических везикул, что может влиять на уровень цитоплазматического дофамина [272].

За открытием α -синуклеина вскоре последовала идентификация его близких гомологов β - и γ -синуклеина [273,274]. На аминокислотном уровне γ -синуклеин имеет 60% сходства с α -синуклеином, а на структурном уровне все три типа абсолютно идентичны [275]. α - и β - экспрессируются в таламусе, substantia nigra, хвостатом ядре, миндалине и гиппокампе. γ -синуклеин присутствует в спинном мозге и сенсорных ганглиях. Интересно, что он более широко распространен в цитоплазме нейронов, чем α - и β -синуклеин, присутствуя в телах клеток и аксонах. Наличие синуклеинов было обнаружено и в других типах клеток: α -синуклеин был найден в тромбоцитах, а γ -синуклеин присутствует в эпидермисе и в метастатической ткани рака молочной железы. К тому же, согласно литературе, подобно α -синуклеину [276], неамилоидный компонент (non-amyloid component, NAC), присутствует и у γ -синуклеина, но отсутствует у β -синуклеина. Исходя из этого существует концепция что NAC влияет на агрегационные свойства, так как α - и γ -синуклеины могут образовывать агрегаты, а β -синуклеин не агрегирует.

β -синуклеин — это пресинаптический фосфопротеин, который содержится в мозге и является гомологом α -синуклеина [277,278]. β -синуклеин, тесно связанный с α -синуклеином, экспрессируется в мозге

млекопитающих в той же степени, что и α -синуклеин в соотношении 1:1 в синаптических бутонах мозга грызунов [279]. Оба белка были охарактеризованы на основе их нативных развернутых структур, но β -синуклеин отличается от α тем, что в нем отсутствует большая часть гидрофобного компонента NAC амилоидной области БА [280]. Из-за наличия этого высокоамилоидогенного компонента NAC α -синуклеин склонен к самоагрегации и образованию токсичных протофибрилл, тогда как β -синуклеин менее склонен к образованию нерастворимых агрегатов [262,281–284]. Несколько доказательств указывают на то, что β -синуклеин может играть защитную роль против α -синуклеинопатий [281,285,286]. В противовес этому мнению было показано, что β -синуклеин способен к агрегации в бесклеточных анализах из-за вытеснения макромолекул и взаимодействия с ионами металлов и пестицидами [286], а также из-за кислого pH [287] и взаимодействия с липидными везикулами при повышенных температурах [288]. Исследования на культивируемых недофаминергических нейронах показали, что общий механизм нейродегенерации, вызываемой β -синуклеином, сводится к повышению проницаемости внешней митохондриальной мембраны с последующей активацией каспазы, опосредованной цитохромом C [289]. Однако до сих пор остается неизвестным, может ли дофамин и его метаболизм влиять на нейропатологический профиль β -синуклеина. Если да, то это поставит β -синуклеин в центральное положение при попытке понять причины преимущественной дегенерации нейронов нигральной зоны при БП.

γ -синуклеин, также называемый персином или специфическим геном рака молочной железы-1 (BCSG-1) [290–292], экспрессируется в головном мозге, но наиболее многочислен в периферической нервной системе [290,293]. В отличие от α - и β -синуклеинов, γ -синуклеин распределен по всему цитозолу нейронов, где он может участвовать в поддержании структуры цитоскелета [294]. Кроме того, антитела к γ -синуклеину обнаруживают поражения в аксонах зубчатого молекулярного слоя гиппокампа [293]. Бычий ортолог γ -синуклеина, синоретин, в основном локализован в ядерной и синаптической

областях клеток сетчатки и также обнаруживается в цитоплазме [295]. Наконец, антитела против синоретина распознают отложения в зрительном нерве пациентов с НДЗ [296]. Хотя нормальные клеточные функции этих белков до конца не изучены, ряд наблюдений позволяет предположить, что синуклеины могут служить для интеграции пресинаптической сигнализации и мембранного транспорта.

На сегодняшний день α , β и γ -синуклеины были клонированы и охарактеризованы из тканей человека и млекопитающих [263,278,290,296–298] но до сих пор остается неясной их физиологическая функция в организмах.

В нормальных условиях при укладке белка цепочка аминокислот образует α -спирали и β -складки, которые в дальнейшем формируют функционирующий белок [299,300]. В определенных случаях, например для формирования амилоидов, белок из β -складок переходит в олигомерную форму. Олигомеры белков, это комплексы, объединяющие две или более подъединицы белков для формирования структурных или функциональных соединений. Образование олигомеров является распространенным явлением в клетке и играет важную роль в биологических процессах. Структура олигомеров различается в зависимости от числа субъединиц в комплексе, включая димеры, тримеры, тетрамеры и т.д. Взаимодействия между мономерами обеспечивают устойчивую трехмерную структуру олигомера. Образование олигомеров повышает стабильность молекулы белка и может существенно влиять на его функциональную активность. Некоторые белки проявляют активность только как часть олигомерного комплекса, что обеспечивает эффективное выполнение их биологических функций. Но с другой стороны образование олигомеров может приводить к возникновению патологических процессов, как например в случае БА происходит образование $A\beta$ или в случае БП и таупатий – агрегатов α -синуклеина [301–304].

По своей структуре все синуклеины являются белками, не имеющими стабильной вторичной структуры в растворах [280]. Они имеют высококонсервативную N-концевую область и переменную C-концевую

область. Предполагается, что N-концевые домены этих белков могут быть вовлечены в ряд общих функций, в то время как C-концевые домены, напротив, участвуют в обеспечении процессов, специфичных для каждого из синуклеинов. Обычный белок в нормальных условиях находится в равновесии с промежуточными состояниями разворачивания (I-состояниями), которые в свою очередь могут переходить к полностью развернутым (D-состояниям). Промежуточные состояния могут быть разделены на более нативные и более развернутые конформации, последние известны как «расплавленные глобулы». Нарушение этой формы может негативно сказаться на клеточных процессах, приводя к образованию амилоидов – структур, токсичных для организма. Исследования показывают, что промежуточные состояния играют роль предшественников агрегации белков из-за их большей гибкости и выявленных гидрофобных участков. Белковая агрегация – это процесс, при котором белки объединяются в более крупные структуры, является важным аспектом в биологии [305–307]. Это может привести к нежелательным эффектам, таким как потеря биологической активности белка, возможная иммуногенность или другие побочные явления.

Агрегация белков чаще происходит в присутствии гидрофобных областей на поверхности белка и в частично развернутой конформации, чем в полностью развернутом или нативном состоянии. Взаимодействие этих промежуточных форм может привести к формированию белковых агрегатов. Термин «белковые агрегаты» может включать любые ненативные структуры белков, размеры которых значительно превышают размеры нативного белка. Процесс образования агрегатов может переходить от аморфной агрегации к фибрилляции.

Исходные белковые агрегаты начинают как растворимые, но постепенно становятся нерастворимыми по мере увеличения размеров и превышения пределов растворимости, проходя в состояние осаждения. Это осаждение может принимать форму аморфных выпадений или упорядоченных фибрилл.

Из-за различных путей агрегации рассматриваются как неупорядоченные и упорядоченные процессы.

По данным литературы изучено, что α -синуклеин имеет большую склонность к агрегации, чем β - и γ -синуклеины [308,309] что отрицательно коррелирует со способностью N-конца закручиваться в спираль [310]. Сама по себе агрегация синуклеинов – это многоступенчатый процесс, который происходит от накопления мономерных форм синуклеинов до образования растворимых олигомеров и крупных нерастворимых фибрилл [310]. Считается, что растворимые олигомерные виды α -синуклеина нейротоксичны, как и крупные фибриллы, которые могут быть источником данных олигомеров [310–313]. Также считается, что на динамику агрегации α -синуклеина может влиять β -синуклеин, который может действовать как агент против α -синуклеина и еще более эффективно против $A\beta$, непосредственно связывая мономеры или олигомеры на ранних стадиях и предотвращая их дальнейший рост [314–317]. Однако, в некоторых условиях сам β -синуклеин может вести себя как амилоидогенный белок и способствовать развитию нейродегенерации [318,319].

Одним из способов изучения нормальной физиологической функции генов, кодирующих экспрессию белков синуклеинов, является их генетическая инактивация. Генетическая инактивация (нокаут) [320] – это молекулярно-генетический метод, при котором в нуклеотидную последовательность гена вносятся изменения, направленные на его инактивацию. Нокаутированные организмы или просто нокауты используются для изучения функции генов, обычно путем исследования эффекта потери гена. Линии нокаутных мышей по генам α -, β - и γ -синуклеина, используются как для изучения функций генов семейства синуклеинов [11,321,322], а также как модель истощения нормальной функции прионоподобных белков (в силу их агрегационных свойств).

Впоследствии исследования геномных ассоциаций показали, что α -синуклеин является наиболее значимым геном в случаях идиопатической БП.

Это привело к созданию многочисленных животных моделей БП [34,321,323], основанных на мутации или оверэкспрессии α -синуклеина. Кроме того, α -синуклеин играет важную роль в регуляции и оптимизации ключевых этапов оборота дофамина.

Согласно данным литературы, нарушение работы α -синуклеина может вызывать окислительный стресс, однако данный процесс также может привести к олигомеризации белков [324] и вызывать ферроптоз [325] и нарушать работу ЭТЦ [326]. Было установлено, что АФК и железо усугубляют дисфункцию белка, поскольку α -синуклеин способен вызывать состояние повышенной генерации АФК из-за дисфункции МХ. У трансгенных мышей α -синуклеин снижает активность комплекса I митохондриальной ЭТЦ в дофаминергических нейронах [327]. Неактивность комплекса I увеличивает количество электронов, утекающих из ЭТЦ, что увеличивает продукцию АФК [328].

К тому же, набор данных, полученных в серии независимых исследований, позволил выявить связь α -синуклеина с синтезом и содержанием дофамина как в культуре клеток, так и в животных моделях. При нокауте α -синуклеина наблюдаются меньшее количество синаптических везикул и возникают дефекты синаптической передачи [329], что может влиять на уровень цитоплазматического дофамина [272]. Захват дофамина также зависит от функционирования β -синуклеина, где при отсутствии β -, но не α - и γ -синуклеинов, наблюдается снижение поглощения дофамина синаптическими пузырьками и возможно связано с особым строением β -синуклеина [330].

Эти данные указывают так же на то, что комбинация факторов, таких как изменение уровня α -синуклеина и старение, влияет на уровень дофамина в стриатуме и, что более важно, вызывает синаптическую дисфункцию в нигростриатной системе стареющих животных. В подтверждение, мыши, лишённые α -синуклеина, демонстрировали патологические изменения синаптических ответов гиппокампа на длительную стимуляцию, которая, как

известно, истощает мобилизационный и резервный пул везикул, а также нарушает пополнение мобилизационного из резервного пула везикул. Таким образом, данные прямо указывали на то, что синуклеины не влияют на DAT-зависимый захват дофамина через плазматическую мембрану пресинапса, но способствуют более эффективному VMAT-2-зависимому захвату дофамина через мембрану синаптических везикул [264].

1.10 Рецепторы продуктов конечного гликирования белков: роль в функционировании клеток головного мозга.

В контексте заболеваний, связанных со старением организма, например БА и БП, процессы связанные с неферментативным гликированием могут способствовать накоплению токсичных форм белков, что негативно сказывается на клеточных функциях. Неферментативное гликирование – это реакция, протекающая между карбонильной группой глюкозы и других редуцирующих сахаров со свободными аминогруппами, в которой посредством N-гликозидного связывания образуется сахар-протеиновый комплекс через серию химических реакций, описанных химиком Л. К. Майяром [331]. Гликирование белков происходит по остаткам лизина и аргинина, а также остатков гистидина, триптофана и цистеина [331,332]. В ходе дальнейших внутримолекулярных перестроек, реакций дегидрирования и окисления образуется гетерогенная по химическому строению группа соединений, получивших название конечных продуктов гликирования (AGE) [333]. Выявлены два фактора, которые влияют на скорость реакции гликирования – уровень гликемии и период полужизни белков, вступающих в реакцию. В условиях гипергликемии интенсивность гликирования значительно усиливается. В физиологических условиях реакция протекает медленно, поэтому наиболее подвержены гликированию долгоживущие белки, такие как коллаген и кристаллин. В качестве специфических рецепторов AGE-модифицированных белков рассматриваются различные белки. Среди рецепторов, располагающихся на клеточной поверхности, можно выделить

рецептор фагоцитов, галектин-3 и рецептор конечных продуктов гликирования (RAGE) [334–336].

Рецептор конечных продуктов гликирования представляет собой трансмембранный иммуноглобулин-подобный рецептор, который существует в нескольких изоформах и связывается с разнообразным набором эндогенных внеклеточных лигандов и внутриклеточных эффекторов. Полноразмерный RAGE человека (рисунок 4) [336] состоит из внеклеточного (аминокислотные остатки 23-342), гидрофобного трансмембранного (остатки 343-363) и цитоплазматического доменов (остатки 364-404) [335,337]. Внеклеточную структуру RAGE можно дополнительно разделить на три иммуноглобулиноподобных домена: варибельный (V) домен (остатки 23-116) и два константных домена C1 (остатки 124-221) и C2 (остатки 227-317) [336,338,339]. Структура домена V состоит из восьми цепей (A', B, C, C', D, E, F и G), соединенных шестью петлями, образующими два β -слоя, соединенных дисульфидным мостиком между Cys38 (цепь B) и Cys99 (нить F). Домен C1 сворачивается в классический домен Ig C-типа [338,340]. Молекулярная поверхность доменов V и C1 покрыта гидрофобной полостью и большими положительно заряженными участками. Между доменами V и C1 формируется несколько водородных связей и гидрофобных взаимодействий, образующих интегрированную структурную единицу [338,341,342]. Рентген-кристаллография, ЯМР-спектроскопия, а также исследования *in vitro* и *in vivo* продемонстрировали, что объединенный эктодомен VC1 участвует во взаимодействии с широким спектром лигандов RAGE кислотного (отрицательно заряженного) характера, таких как AGE, семейство S100/калгранулин. белки, блок группы 1 с высокой подвижностью (HMGB1) и A β [343]. Кроме того, RAGE может подвергаться управляемой лигандом мультимодальной димеризации или олигомеризации, опосредованной самоассоциацией доменов V–V или C1–C1 [343]. Стабильность этого разнообразного олигомеризованного комплекса VC1-лиганд может объяснить

его аффинность/специфичность в отношении широкого круга белковых лигандов и результирующую передачу сигнала [338,343].

В головном мозге RAGE локализован в мембранах нейронов, астроцитов и клеток микроглии [335]. Активация RAGE лигандами инициирует сложный внутриклеточный сигнальный каскад, приводящий к продукции АФК, иммуновоспалительным эффектам, клеточной пролиферации или апоптозу с сопутствующей активацией самого RAGE. Лиганды RAGE представляют собой преимущественно отрицательно заряженные молекулы [335,344]. Они характеризуются сильным отрицательным суммарным зарядом, который может распространяться на один домен, как в HMGB1, или на всю молекулу, как в нативных белках S100 или в КПП-модифицированных белках.

На сегодняшний день исследования в основном сосредоточены на корреляции между активностью RAGE и патологическими состояниями, такими как рак, диабет, сердечно-сосудистые заболевания, саркопения и нейродегенерация [345,346]. Поскольку RAGE играет роль во многих патологических расстройствах, он стал рассматриваться в качестве потенциальной мишени для разработки ингибиторов во внеклеточном и внутриклеточном доменах.

Поскольку многочисленные нейродегенеративные расстройства, такие как БА [134], БП [347,348], болезнь Хантингтона [349] и БАС [111], связаны с нейровоспалением, во многих исследованиях предпринимались попытки выяснить роль RAGE в их развитии.

При НДЗ RAGE вовлечен в амилоидогенный путь, а также в независимые нейротоксические иммуновоспалительные каскады [111,215,350,351]. Связывание эндогенных лигандов, таких как AGE, S100 или A β , с физиологически экспрессируемым RAGE приводит к его высокой экспрессии в нейронах, микроглии, астроцитах и сосудистой сети гематоэнцефалического барьера [111,351].

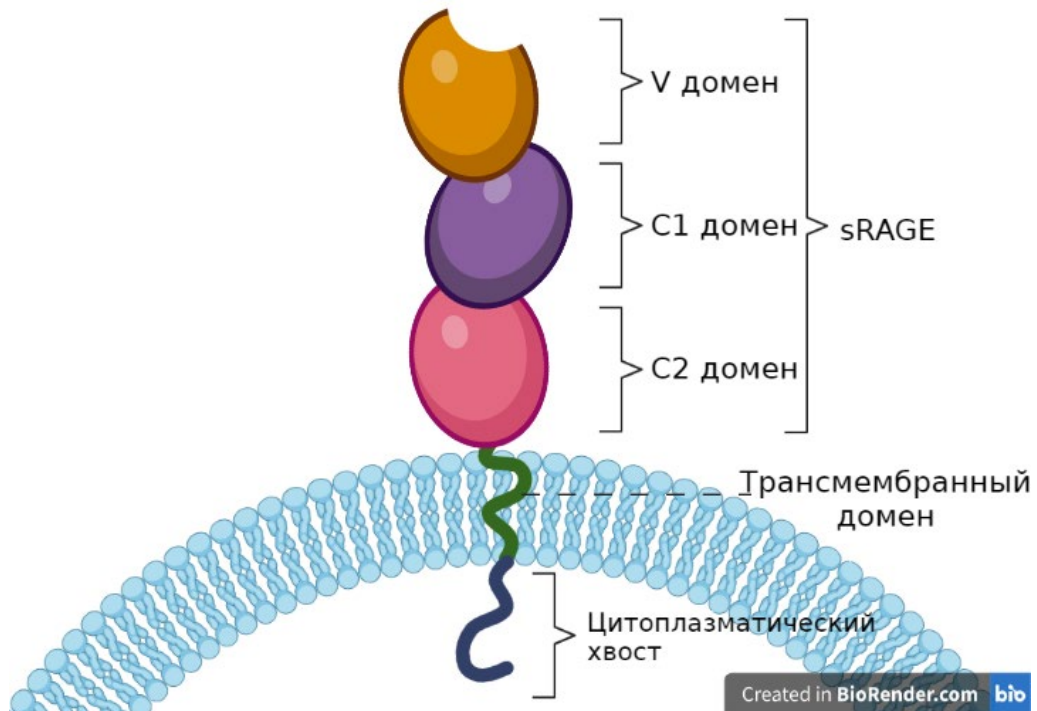


Рисунок 4 – Структурная организация RAGE. Внеклеточный домен включает три домена: V, C1 и C2. Через плазматическую мембрану проходит один домен рецептора, за которым следует внутриклеточный цитоплазматический хвост. Внеклеточная область без трансмембранного рецептора и цитоплазматического хвоста называется растворимым RAGE (sRAGE). Рисунок адаптирован на основе работы [336] с использованием интернет-ресурса <http://Biorender.com>.

Иммуногистохимические исследования тканей головного мозга человека показали, что уровень RAGE повышены у пациентов с БА по сравнению с контрольной группой [352]. У пациентов с БА экспрессия RAGE присутствует на эндотелиальных клетках головного мозга, астроцитах и нейронах гиппокампа, энторинальной коры и верхней лобной извилине, но отсутствует в мозжечке [352,353].

Все больше исследований описывают взаимодействие между RAGE и различными формами A β , особенно пептидами A β ₁₋₄₀ и A β ₁₋₄₂, что приводит к нейродегенерации и снижению когнитивных функций [350,354,355]. Молекулярная модель димерного A β и V-домена RAGE предполагает образование ионных взаимодействий между кислой отрицательно заряженной поверхностью A β и положительно заряженными остатками V-домена [356].

Трансгенная модель БА на мышах показала, что А β связывается с RAGE, что приводит к транспорту А β из кровотока через гематоэнцефалический барьер в центральную нервную систему, в то время как ингибирование RAGE подавляет накопление А β в головном мозге [356]. Взаимодействие А β с RAGE в нейрональных и эндотелиальных клетках вызывает окислительный стресс [357].

Несмотря на то, что патогенез БП остается во многом неясным, однако было предложено несколько потенциальных молекулярных факторов, таких как RAGE [358–360]. Иммуногистохимический анализ, показал, что уровни AGE и RAGE были повышены в лобной коре пациентов с БП по сравнению с контрольной группой [115]. Также, согласно литературе, исследования на мышах с моделью БП, показали, что делеция RAGE снижает токсичность, связанную с МРТР на клетках, и уменьшает провоспалительное воздействие RAGE на пораженные клетки, замедляя прогрессирование заболевания [358]. Аналогичная публикация, посвященная роли S100B (одного из провоспалительных лигандов RAGE), показала, что дефицит S100B положительно коррелирует со снижением концентрации и активации RAGE и TNF- α у мышей с моделью БП, что прерывает сигнальный путь RAGE, пагубно влияющий на прогрессирование БП [361]. Еще одно исследование, проведенное группой китайских ученых с участием пациентов с БП, выявило еще одну тенденцию, раскрывающую вероятное участие RAGE в патогенезе заболевания. Их исследование показало, что определенный полиморфизм гена RAGE связан с повышенной вероятностью развития БП, что указывает на то, что RAGE может играть роль в патогенезе БП на генетическом уровне [359].

RAGE, по-видимому, не является абсолютно необходимым рецептором для нормальной физиологии клеток [362]. RAGE-отрицательные мыши, генетически лишенные рецептора, демонстрировали нормальное макроскопическое и микроскопическое строение тканей. Такие животные также демонстрировали нормальную инициацию и поддержание воспаления в моделях, направленных преимущественно на адаптивный иммунный ответ. В

то же время мутантная группа мышей была защищена от эффектов сепсиса, который во многом зависит от врожденного иммунного ответа [362,363]. Эти результаты свидетельствуют о тесной связи между RAGE и врожденным иммунитетом.

Экспрессия RAGE была описана в нейронах, астроцитах и микроглии из различных областей мозга. Хотя показано, что RAGE участвует в развитии БП [364,365], БА, инсульта и нейровоспаления, также была продемонстрирована важная роль этого рецептора в физиологических процессах. Например, экспрессия RAGE в эндотелиальных клетках капилляров гематоэнцефалического барьера необходима и достаточна для транспортировки окситоцина в мозг [366]. Хотя окситоцин связывает растворимый и, предположительно, мембранный RAGE, он не индуцирует и не ингибирует внутриклеточные сигналы, о которых сообщается для лигандов RAGE. Предположительно, это может быть связано со способностью экзогенного RAGE служить переносчиком пептидов через гематоэнцефалический барьер. Также, существуют данные о том, что RAGE также регулирует ряд важнейших клеточных процессов, таких как пролиферация, дифференцировка нейронов и аутофагия [367].

Несмотря на свое структурное разнообразие, большинство лигандов RAGE связываются с V- и C1-доменами рецептора [368,369]. Это связывание, скорее всего, начинает продолжительный период клеточной активации, опосредованной рецептор-зависимой передачей сигналов, что приводит к воспалению. Предполагается, что активация RAGE в значительной степени ответственна за патогенность AGE [350,370]. Среди большого числа лигандов RAGE можно выделить и пептид A β , который, как известно, связан с БА [369].

Наиболее токсичный олигомерный A β связывает V-домен, а менее токсичный агрегированный A β связывает C2-домен [371]. В плазме крови человека была обнаружена растворимая изоформа sRAGE, которая не связана с клеточной мембраной. Концентрация sRAGE значительно снижена в плазме крови пациентов с БА или легкими когнитивными нарушениями [372,373].

sRAGE может предотвращать эффекты RAGE-сигнализации путем связывания с лигандами RAGE и, как следствие, оказывает защитное действие при большом количестве RAGE-ассоциированных расстройств [372,374]. Более того, введение sRAGE мышам, в качестве одной из моделей БА, приводило к защите клетки нейронов от дегенерации и уменьшению амилоидных бляшек, в основном за счет связывания с A β в плазме крови и предотвращения его переноса через гематоэнцефалический барьер [374].

Синтетические фрагменты RAGE использовались в различных экспериментах для раскрытия механизма активации/ингибирования рецепторов и для разработки стратегии защиты клеток [369,375–379]. В соответствии с данными литературы можно предположить, что пептидные фрагменты sRAGE демонстрируют биологическую активность, способную предотвратить развитие патологии, связанной с БА.

Особый интерес представляет синтетический фрагмент (60–76), имеющий аминокислотную последовательность, идентичную последовательности экспонированных неструктурных петель V-домена RAGE, который защищает пространственную память мышей с экспериментально индуцированной формой БА и снижает уровень A β мозга у экспериментальных животных [369,378]. Также было выявлено, что данный фрагмент RAGE может защищать первичные культуры нейронов и астроцитов от токсичности A β путем его связывания [375]. Подобное воздействие рецептора имеет жизненно важное значение в физиологии ЦНС и в патогенезе нейродегенерации. Особый интерес вызывает локализация отдельного структурного фрагмента, ответственного за терапевтическое действие на астроциты и нейроны.

Активация RAGE опосредована влиянием множества факторов, поэтому дальнейшие исследования механизмов действия фрагментов рецептора стоит начать с определения влияния на скорость продукции АФК и оценки антиоксидантной системы клеточной культуры. Несмотря на то, что перечень возможных лигандов RAGE обширен, большинство из них характеризуется

комплексным воздействием на метаболизм, который связан не только с активацией RAGE. Поэтому использование уже описанных фрагментов [364,378,380], обладающих специфической активацией кальциевой сигнализации и нейропротекторным воздействием являются перспективным подходом к исследованию.

Подводя итог проведенному анализу литературы, можно сделать вывод о том, что система окислительно-восстановительной сигнализации занимает центральное место в физиологии, поскольку она отвечает за продукцию различных сигнальных молекул, включая активные формы кислорода и азота, через внутренние механизмы, включая ферменты-источники, рецепторы и разнообразные антиоксиданты. Нарушение этого баланса может привести к окислительному стрессу, который существенно влияет на процессы старения и развитие связанных с ними заболеваний, таких как нейродегенеративные расстройства и возрастная саркопения. В дополнение к основным ферментам, таким как НАДФН-оксидаза, MAO и КО, в регуляции окислительно-восстановительного баланса также важную роль могут играть различные белки — например, синуклеины и HPRT, а также RAGE, которые в некоторых случаях могут способствовать нормализации, а в других – нарушению этого баланса. На основании выводов, сделанных в ходе данного обзора литературы, были сформулированы цели исследования и ключевые задачи данной диссертационной работы.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на базе лаборатории клеточной физиологии и патологии Орловского государственного университета имени И.С. Тургенева с применением конфокальной микроскопии с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 900 с системой Airyscan 2. Данный прибор оснащен модулем источников возбуждающего излучения с набором лазерных источников: 405, 488, 561, 640 нм, а также объективами различного увеличения (63X, масляный иммерсионный, числовая апертура 1,4; 20X, числовая апертура 0,8; 10X, числовая апертура 0,3). Все эксперименты проводились при контролируемой температуре 27-28 °С.

В экспериментах по оценке уровня НАДН и относительного уровня АТФ использовали установку на основе инвертированного микроскопа Olympus IX73P1F (Olympus Corporation, Япония). Возбуждающее излучение ксеноновой лампы после прохождения через монохроматор Optoscan P130/ELE/450 (Cairn Research Ltd., Великобритания) воздействовало на клетки, после чего флуоресцентное излучение проходило через длинноволновый фильтр 455 нм и регистрировалось с помощью охлаждаемой CCD-камеры.

Также для исследования дыхания МХ методом полярографии был использован кислородный электрод Кларка Oxytherm+R (Hansatech Instruments, Великобритания).

2.1 Используемые реактивы

Рабочий раствор HBSS (мМ): 138 NaCl, 1,3 CaCl₂, 0,4 MgSO₄, 0,5 MgCl₂, 5,3 KCl, 0,45 KH₂PO₄, 4 NaHCO₃, 0,3 Na₂HPO₄, 10 глюкозы, 20 HEPES (при температуре 37°C, pH=7,4 и при температуре +4°C, pH=7,4)

Ростовая среда для первичной нейрон-глиальной культуры: Neurobasal A, содержащую 2% бессывороточной добавки B27 supplement (для культивирования нейрональных культур), пенициллин 100 Ед/мл и

стрептомицин 100 мкг/мл (PenStrep), и 0,25% 100x GlutaMAX (раствор L-аланил-L-глутамин).

Среда для проведения исследований на МХ (mM): Среда для проведения исследований на МХ: 135 mM KCl, 10 mM NaCl, 20 mM HEPES, 0,5 mM K_2HPO_4 , 1 mM MgCl_2 и 5 mM трилон Б (pH 7,1 при 25°C). В качестве субстратов дыхания применяли 5 mM глутамат + 2,5 mM малат, а также 5 mM сукцинат + 5 мкМ ротенон.

2.2 Используемые модели животных

В рамках данной работы были использованы различные клетки и ткани, полученные от лабораторных животных. Объектом экспериментального исследования являлись первичная нейрон-глиальная культура 0–3 дневных крыс и мышей, срезы мышечной ткани крыс, а также переживающие срезы различных частей головного мозга мышей контрольной группы и с моделированной патологией. Животных содержали в условиях 12-часового светового дня и неограниченного доступа к еде и питью. Все манипуляции с животными были одобрены Этическим комитетом Орловского государственного университета (протокол № 18 от 21.02.2020) в соответствии с законодательством Российской Федерации.

Крыса Wistar – один из наиболее часто используемых в биомедицинских исследованиях пород крыс-альбиносов. Они широко используются во многих областях исследований, включая онкологию, старение, фармакологию, токсикологию и метаболизм. Кроме того, клеточные культуры, полученные из тканей крыс, используются в различных сферах в качестве моделей инфекционных, нейродегенеративных и онкологических заболеваний.

CRISPR-изированные мыши с делецией TCG в первом экзоне (HPRT1del8Val), служащие моделью СЛН, были ранее получены в Институте биологии гена РАН. Мутация, обнаруженная у 9-летнего пациента, страдающего классической СЛН, была введена в мышей CBAxС57В16J с помощью системы CRISPR/Cas9 [233]. В экспериментальные группы вошли 2-

месячные мыши (исследования с переживающими срезами мозга и измерение потребления кислорода) и 3-дневные детеныши (для получения первичных культур) на фоне животных CBAxС57В16J. Группы включали животных HPRT1del8Val и контрольные группы дикого типа (ДТ).

В рамках экспериментального исследования функции белков-синуклеинов использовали самцов и самок мышей с генетической инактивацией генов синуклеинов: одиночный нокаут по гену α -, β - и γ -синуклеина, двойной нокаут по α - и γ -синуклеину (функциональный только β -синуклеин), тройной нокаут по генам α -, β - и γ -синуклеину. В качестве контрольной группы были выбраны мыши линии C57В1/6J без генетических модификаций, полученные при разработке линий нокаутов синуклеинов.

2.3 Клеточные культуры

Получение первичной нейрон-глиальной культуры (рисунок 5 А) осуществляли по стандартной методике [20,381]. После декапитации из головного мозга выделяли кору и область среднего мозга, которые помещали в отдельные охлаждаемые в ледяной бане пробирки со стерильным раствором Версена. В ламинарном боксе раствор Версена заменяли на 0,1% раствор трипсина, после чего образцы термостатировали при температуре 37°C в течение 15 минут, после чего центрифугировали при 2000 об/мин (700 g) в течение 5 минут. Затем отбирали надосадочную жидкость и добавляли ростовую среду для клеточных культур. Полученную суспензию центрифугировали, после чего отбирали надосадочную жидкость и приливали свежую порцию среды. Промывку проводили еще один раз. Затем фрагменты ткани измельчали последовательным пипетированием с использованием наконечников объемом 100-1000 мкл и 10-200 мкл, после чего проводили центрифугирование для осаждения клеток. Полученный осадок клеток мозга суспендировали в необходимом количестве питательной среды и наносили в чашки Петри на покровные стекла, предварительно обработанные при 200°C в сушильном шкафу и покрытые полиэтиленгликолем (PEG). После 2-часового

выдерживания к клеткам приливали свежую ростовую среду на основе Neurobasal A. Культуру клеток выращивали в увлажненной атмосфере с 5 % CO₂ при температуре 37°C. Дважды в неделю половину ростовой среды заменяли на свежую. Все эксперименты с первичной нейрон-глиальной культурой были проведены между 11 и 14 днями после посадки культуры.

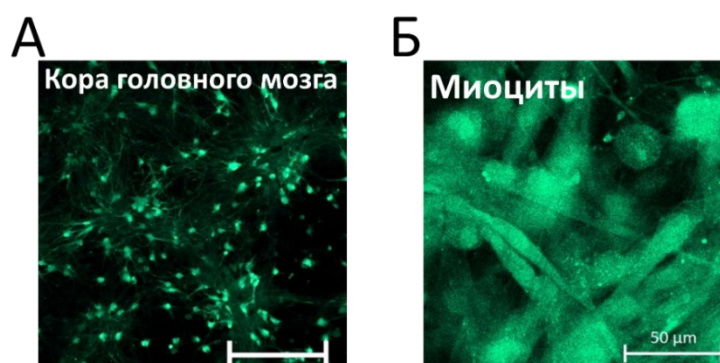


Рисунок 5 –Изображение первичной культуры головного мозга (А) и мышц (Б), полученное на конфокальном микроскопе с добавлением флуоресцентного красителя МСВ, чья флуоресценция зависит от уровня восстановленного глутатиона

Первичная культура скелетных мышц (рисунок 5 Б) была получена из крыс линии Wistar. Для приготовления смешанных культур скелетных миоцитов и клеток фибробластов были взяты задние лапы крысят постнатального возраста 2-5 дней, с удалением кожи и жировой ткани [60]. Мышечные ткани затем выдерживали в 0,2% растворе коллагеназы при 37°C в течение 30-40 минут. Реакцию останавливали добавлением 2–3 мл FBS, и суспензию тканей центрифугировали при 2010 об/мин в течение 10 минут. Затем клетки ресуспендировали в предварительно подогретой ростовой среде (DMEM, содержащей 20% FBS, 100 МЕ/мл пенициллина и 200 МЕ/мл стрептомицина) и помещали на 22 мм покровные стекла, предварительно покрытые 0,2% желатином, на 1 час при 37°C. Затем клетки культивировали в увлажненном CO₂ инкубаторе (5% CO₂ в воздухе) при 37°C. Через 2-3 дня среду меняли на среду с низким содержанием FBS (DMEM, содержащую 10% FBS без антибиотиков), которую в дальнейшем меняли каждые 3-4 дня. Все эксперименты проводились между 5-11 днями культивирования.

2.4 Получение переживающих срезов

В связи со сложной организацией мозга, которая зависит от комплексного взаимодействия между нейронами и глией, для изучения процессов, связанных с функционированием рецепторов, в качестве объекта исследования ученые часто используют переживающие срезы мозга [382].

При получении переживающих срезов отделов головного мозга проводили эвтаназию животных методом цервикальной дислокации. После выделения головной мозг помещали в охлажденную среду Хэнкса (HBSS) (4°C, pH=7,4). Затем при помощи одноразового стерильного скальпеля проводилось предварительное разделение головного мозга на полушария. Коронарные срезы коры и среднего мозга [383] толщиной 300 мкм были изготовлены на вибрационном микротоме Campden 700smz в соответствии со стандартными процедурами [348,384] и выдержаны перед экспериментами не менее 30 минут при 37 °С.

Жизнеспособность срезов оценивалась по способности их отвечать на физиологические активаторы такие как глутамат и АТФ после загрузки кальций-зависимыми флуоресцентным зондом Fluo-4 AM. Данный краситель зависит от концентрации кальция внутри живых клеток. Также, показателем жизнеспособности среза выступает наличие флуоресценции при инкубации с зондом МСВ, чья флуоресценция зависит от уровня восстановленного глутатиона.

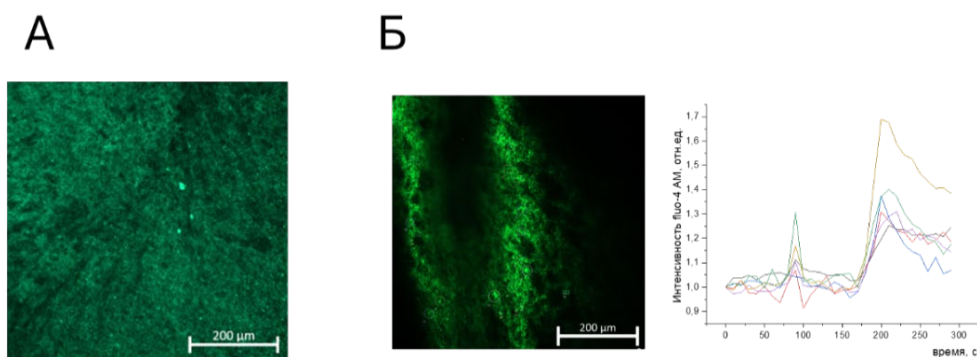


Рисунок 6 –Пример среза, полученного на конфокальном микроскопе с добавлением флуоресцентного красителя МСВ (А) и Fluo-4 AM (Б)

Образцы срезов мозга были помещены в стоящие в термостате при температуре 37°C бюксы, заполненные на 1/2 объема HBSS (37°C, pH=7,4). Каждые 10 минут проводилось оксигенирование образцов барботированием воздухом с помощью шприца.

При получении переживающих срезов мышц проводили эвтаназию животных методом цервикальной дислокации. После выделения мышечной ткани из задней лапы образец помещался в охлажденный раствор HBSS (4°C, pH=7,4). Поперечные срезы мышц толщиной 300 мкм были изготовлены на вибрационном микротоме Campden 700smz и выдерживались в растворе HBSS с флуоресцентным красителем в течение 30 минут до начала измерения.

Большинство флуоресцентных измерений были проведены в 2-3 клеточных слоях от поверхности, чтобы избежать возможного влияния гипероксии или гипоксии в более глубоких слоях. Перед проведением измерения срез помещался в ячейку, куда затем добавлялось 250 мкл HBSS (37°C, pH=7,4).

2.5 Синтетические пептиды RAGE

В качестве потенциальных активаторов RAGE-рецептора использовали пептиды – синтетические фрагменты участка, состоящего из 17 аминокислотных остатков и входящего в структуру V-домена рецептора, полученные из лаборатории внесинаптической передачи Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН [378], информация о которых приведена в таблице 1.

Таблица 1 – Первичная структура фрагментов RAGE

Пептид	Фрагмент белка	АК-последовательность
П1	60-76	AWKVLSPQGGGPWDSVA
П2	60-70	AWKVLSPQGGG
П3	60-62	AWK

Пептид	Фрагмент белка	АК-последовательность
П4	60-65-G	AWKVLS-G
П5	65-76	SPQGGGPWDSVA
П6	Ac-60-76-NH ₂	Ac-AWKVLSPQGGGPWDSVA-NH ₂

Синтез пептидов был осуществлен твердофазным методом [378]. Пептиды 2 и 4 имеют в качестве С-концевой аминокислоты глицин, что связано с удобством проведения твердофазного синтеза. Пептид 7 является модифицированным аналогом пептида 1, но с защищенными N- и С-концевыми функциональными группами.

2.6 Измерение скорости продукции АФК

Исследование скорости продукции цитозольных АФК проводили с использованием флуоресцентного зонда дигидроэтидий (HEt) с рабочей концентрацией 5 мкМ без предварительного инкубирования клеток и с предварительным инкубированием срезов в течение 5 минут. Зонд HEt обладает собственной голубой флуоресценцией; в цитозоле клетки при взаимодействии с супероксид анионом образует продукт, который интеркалирует с ДНК, приобретая при этом красную флуоресценцию (максимум поглощения – 500 нм, максимум эмиссии – 590 нм). Оценку скорости окисления проводили на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Zeiss LSM 900 после добавления к клеткам флуоресцентного зонда HEt (без инкубирования для минимизации токсического эффекта продуктов окисления зонда). После добавления зонда HEt регистрировали кинетику изменения флуоресценции в течение 3-5 минут для определения скорости окисления зонда, зависящую от скорости продуцирования супероксид аниона. Контроль скорости образования окисленной формы зонда проводили на микроскопе с использованием длины волны возбуждения флуоресценции 561 нм и регистрации сигнала в области выше 565 нм.

Изучение продукции АФК в МХ проводили на микроскопе ZEISS LSM900 с применением митохондриально-направленного зонда MitoTracker Red CM-H2XRos, который не обладает собственной флуоресценцией, но при переходе в окисленную форму приобретает способность к флуоресценции с максимумом возбуждения на длине волны 579 нм. При проведении исследований объект исследования инкубировали в течение 10 минут в растворе флуоресцентного зонда (500 нМ) с последующим измерением интенсивности флуоресценции при использовании лазера с длиной волны 561 нм. Регистрировали кинетику изменения флуоресценции в течение 3-5 минут для определения скорости окисления зонда, зависящую от скорости продуцирования митохондриальных АФК.

2.7 Получение суспензии митохондрий

В качестве объекта исследования выступала суспензия интактных МХ, полученная из ткани мозга исследуемых животных. Для обеспечения максимального сохранения функциональности полученных органелл все манипуляции по выделению МХ производили в охлажденной среде.

Исследуемую ткань измельчали и суспензировали в 7-кратном объеме среды для выделения [385,386]. Затем суспензию измельченной ткани переносили в предварительно охлажденные центрифужные пробирки. Центрифугирование проводили при температуре +1°C, 700 g в течение 10 минут. Супернатант осторожно декантировали (сливали с осадка) в чистую охлажденную центрифужную пробирку. Затем производили повторное центрифугирование при 7000g в течение 20 минут. Супернатант осторожно сливали, а осадок суспендировали в среде для исследования дыхания МХ. Полученную суспензию помещали на ледяную баню на 30-60 минут до исследования, для того чтобы за это время МХ со слегка поврежденными мембранами восстановили свою целостность.

2.8 Измерение дыхания митохондрий

Определение параметров дыхания и фосфорилирующей способности МХ проводили по поглощению ими кислорода, концентрацию которого в среде исследования регистрировали полярографическим методом с применением кислородного электрода Кларка Oxytherm+R (Hansatech Instruments, Великобритания). МХ в течение всего эксперимента находились в среде, состав которой указан выше. Содержание белка в суспензии МХ определяли по методу Брэдфорд.

В качестве оцениваемых использовали следующие параметры: V_3 – скорость дыхания МХ при окислительном фосфорилировании. При этом происходит окисление субстратов с транспортом протонов в межмембранное пространство с последующим возвратом последних в матрикс через АТФ-синтазу и синтезом АТФ; V_4 – скорость дыхания МХ в присутствии субстратов окисления и ортофосфата, но в отсутствие АДФ. В этом состоянии МХ энергизованы, но дыхание подавлено, поскольку в отсутствие АДФ высокий $\Delta\Psi_m$ останавливает перенос протонов через мембрану и, следовательно, перенос электронов по ЭТЦ; V_3/V_4 – дыхательный контроль, характеризующий уровень сопряжения окислительного фосфорилирования в МХ; АДФ/О – отношение количества фосфорной кислоты, использованной на фосфорилирование АДФ, к поглощенному при этом в ходе дыхания кислороду. С помощью параметров дыхания можно оценить работу комплексов ЭТЦ, а также эффективность образования АТФ.

Для изучения работы I комплекса использовали раствор для исследования, содержащий глутамат (5 мМ) и малат (2,5 мМ). Для изучения работы II комплекса использовали раствор для исследования, содержащий ротенон (5 мкМ), который является ингибитором комплекса I ЭТЦ, и сукцинат (5 мМ), являющийся субстратом для сукцинатдегидрогеназы (комплекса II).

2.9 Оценка мембранного потенциала

Для оценки величины $\Delta\Psi_m$ клетки инкубировали в 25 нМ растворе TMRM в течение 45 минут при 37°C. В режиме послойной съемки

изображений получали 6–8 оптических срезов отдельных клеток. Для анализа использовали оптический срез с наибольшей интенсивностью флуоресценции, величину которой использовали для сравнительной оценки $\Delta\Psi_m$ в клетках. Для изучения способности к поддержанию $\Delta\Psi_m$ загруженные TMRM клетки исследовали в режиме непрерывной съемки с записью базового сигнала с последующим добавлением олигомицина (2 мкг/мл), ротенона (3 мкМ) и FCCP (2 мкМ) (интервал между добавками составлял 1-2 минуты). Во всех экспериментах использовали длину волны возбуждающего излучения 561 нм. Мощность излучения составляла 0,1% от максимума лазера.

2.10 Измерение уровня НАДН и ФАД

Общее содержание окисленной и восстановленной формы никотинамиддинуклеотида, а также долю НАДН от этого параметра (редокс-индекс НАДН) определяли по уровню автофлуоресценции. Для получения минимального сигнала, соответствующего полному переходу восстановленной формы кофермента в окисленную, в ходе эксперимента в измерительную ячейку вносили FCCP (2 мкМ). При последующем внесении NaCN (2 мМ) происходило увеличение автофлуоресценции с выходом на максимальное значение, соответствующее 100%-ное нахождение кофермента в восстановленной форме. В экспериментах использовали установку на основе инвертированного микроскопа Olympus IX73P1F (Olympus Corporation, Япония).

Автофлуоресценция ФАД была измерена на микроскопе Zeiss LSM 900 с возбуждением при 488 нм и эмиссией выше 495 нм. В ходе эксперимента в измерительную ячейку вносили 1 мкМ FCCP для получения сигнала, при полном переходе кофермента в окисленную форму (что соответствует повышению автофлуоресценции ФАД к максимальным значениям). В дальнейшем в ячейку вносили 2 мМ NaCN, что приводит к переходу кофермента в восстановленную форму ФАДН₂ (что соответствует снижению автофлуоресценции к минимальным значениям).

2.11 Измерение относительного уровня АТФ

Для оценки относительного уровня АТФ, которые коррелируют с высвобождением Mg^{2+} при деградации комплекса АТФ-Mg, $[Mg^{2+}]$ регистрировали с помощью двухволнового ратиометрического флуоресцентного зонда Mag-Fura2 AM по стандартному протоколу [387]. Mag-Fura-2 AM использовался в концентрации 5 мкМ и загружался вместе с 0,005% Pluronic P-123 на 30 минут при комнатной температуре с последующим двукратным промыванием HBSS. Измерения флуоресценции проводили с помощью микроскопа Olympus с CCD-камерой. Флуоресценцию Mag-Fura возбуждали при 340 нм и 380 нм. Излучаемая флуоресценция проходила через длинноволновый фильтр 515 нм на ПЗС-камеру. Изображения анализировали с помощью программного обеспечения MetaFluor imaging software и получали график зависимости отношения интенсивности флуоресценции зонда при возбуждении длинами излучением с длинами волн 340 нм и 380 нм от времени.

2.12 Измерение уровня восстановленного глутатиона

Для оценки содержания GSH был использован флуоресцентный зонд monochlorobimane (MCB), который в результате взаимодействия с тиогруппой приобретает способность к флуоресценции.

Исследуемый объект (клеточная культура или переживающие срезы, полученные по описанной ранее методике) выдерживался в течение 30 мин в HBSS, содержащим MCB в концентрации 50 мкМ, после чего объект исследования переносился измерительную ячейку, куда добавлялся свежий HBSS [20].

В трех точках объекта проводили фиксацию уровня флуоресценции. Измерения проводились в режиме послойной записи изображений, который позволяет фиксировать несколько фокальных срезов, с использованием лазера с длиной волны 405 нм. При обработке полученных данных в расчет брались максимальные значения уровня флуоресценции в выбранной области, которая соответствовала области клетки или скопления клеток в переживающем срезе.

2.13 Морфометрический анализ мышечных волокон

Морфометрию мышечных волокон на переживающих срезах проводили с использованием флуоресцентного красителя Fluo-4 AM, с рабочей концентрацией 5 мкМ. Fluo-4 AM является кальций-чувствительным флуоресцентным зондом с двумя хлорными субстратами, замененными на фтор, что приводит к усилению возбуждения флуоресценции при 488 нм и, соответственно, к более высокому уровню флуоресцентного сигнала.

При проведении исследований объект исследования окрашивался в растворе флуоресцентного зонда с последующим измерением интенсивности флуоресценции при использовании лазера с длиной волны 488 нм. В пяти точках объекта проводили фиксацию уровня флуоресценции. Измерения проводились в режиме послойной записи изображений, который позволяет фиксировать несколько фокальных срезов. При обработке полученных данных в расчет брались параметры среднего диаметра мышечных волокон.

2.14 Измерение содержания некротических клеток в культуре

Анализ содержания в культуре некротических клеток проводили с использованием метода двойного окрашивания флуоресцентными красителями Hoechst 33342 и йодида пропидия.

Клетки инкубировали с 5 мкМ Hoechst 33342 и 20 мкМ йодида пропидия в течение 30 мин при 37°C. Исследование проводили с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 900 с использованием лазера с длинами волн 405 нм и 561 нм. Клетки в двух каналах подсчитывали в программе ImageJ с использованием плагина Cell Counter.

Hoechst свободно проникает в ядра клеток в любом физиологическом состоянии и связывается с ДНК, позволяя оценить морфологию ядра и осуществить подсчет общего количества клеток. Напротив, плазмалемма интактных клеток непроницаема для йодида пропидия, который проникает в поврежденные или фиксированные клетки. При наличии колокализации сигнала от Hoechst и йодида пропидия, свидетельствующей о нарушении

барьерной функции плазмалеммы, клетки рассматривались как некротические. Данные представляли в виде процента нежизнеспособных клеток от общего числа клеток в поле зрения.

2.15 Определение скорости перекисного окисления липидов в клеточной культуре

Относительный уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) в мембранах клеток измеряли по интенсивности флуоресценции двухволнового флуоресцентного зонда 11-BODIPY 581/591 (5 мкМ). Перекисное окисление липидов – окислительная деградация липидов, происходящая, в основном, под действием свободных радикалов. Перед проведением эксперимента клетки инкубировались в растворе HBSS с зондом в рабочей концентрации 5 мкМ в течение 30 минут при 37 °С в темном месте, затем промывались рабочим раствором HBSS.

Исследования проводились с использованием лазерного сканирующего микроскопа LSM 900 с возбуждением лазерами 488 нм и 561 нм и детекцией от 505 нм до 550 нм и выше 580 нм. Окисление зонда оценивалось на основе изменений в интенсивности флуоресценции BODIPY 581/591, возбужденной лазером с длиной волны 561 нм, и увеличения флуоресценции продукта окисления, возбужденной лазером с длиной волны 488 нм. Относительную скорость ПОЛ определяли путем измерения скорости увеличения отношения интенсивности эмиссии флуоресценции при волнах возбуждения 488 нм и 561 нм.

2.16 Статистическая обработка

Анализ скорости продукции АФК проводился в программах ZEN Microscopy Software. После выгрузки первичных кривых изменения скорости продукции АФК из программы проводилось построение графика зависимости значения интенсивности флуоресценции красителя от времени. Расчет параметра скорости окисления красителя проводился путем вычисления

углового коэффициента прямой (наклон) изменения флуоресценции (рисунок 7). Полученные данные анализировались в программе OriginPro с последующим построением диаграмм размаха и расчета статистической разницы между группами.

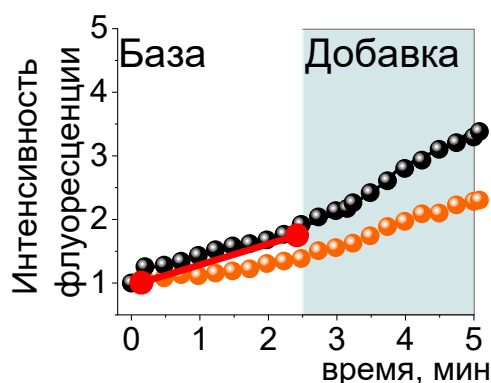


Рисунок 7 – Пример кривой изменения скорости окисления красителя, зависящего от продукции АФК. Расчет углового коэффициента проводился по наклону красной линии

На представленных в работе диаграммах размаха центральная линия является медианой, края бокса – нижний и верхний квартили (1-й и 3-й). Для расчета статистически значимых различий между параметрами был выбран U-критерий Манна-Уитни, который используется для оценки различий между двумя независимыми выборками, не имеющими нормальное распределение данных в уровне признака, измеряемого количественно. Уровень статистической рассчитывался относительно базового уровня для каждого типа объектов без внесения добавок, принятого за 100%.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 RAGE вызывает физиологическую активацию НАДФН-оксидазы в нейронах и астроцитах и нейропротекцию

В рамках первой задачи данной работы выступало изучение роли активации RAGE. В данном разделе мы рассмотрим, как взаимодействие коротких фрагментов RAGE и внутренних механизмов регуляции в клетках головного мозга влияет на окислительно-восстановительный баланс и значение активации рецептора для поддержания жизнеспособности в токсической модели.

3.1.1 Два пептида RAGE вызывают активацию выработки АФК в переживающих срезах мозга

Скорость продукции АФК оценивалась с использованием дигидроэтидия (HEt), который после окисления супероксид анионом превращается во флуоресцентный этидий с возбуждением при длине волны 530 нм. Для определения возможности активации выработки АФК после регистрации базового увеличения флуоресценции вносили раствор пептидов RAGE П1-П6 в концентрации 10 мкМ (рисунок 8 А-Е). Степень активации продукции АФК пептидами рассчитывали в процентах от базального уровня (рисунок 8 Ж).

Как видно из рисунка 4, пептиды RAGE (60-76) (П1) и Ac-(60-76)-NH₂ (П6) характеризуются значительным увеличением скорости окисления HEt (221±76%, n = 3 срезов, p = 0.002 и 487±55%, n = 3 среза, p = 0,001 соответственно) по сравнению с другими пептидами П2-П5.

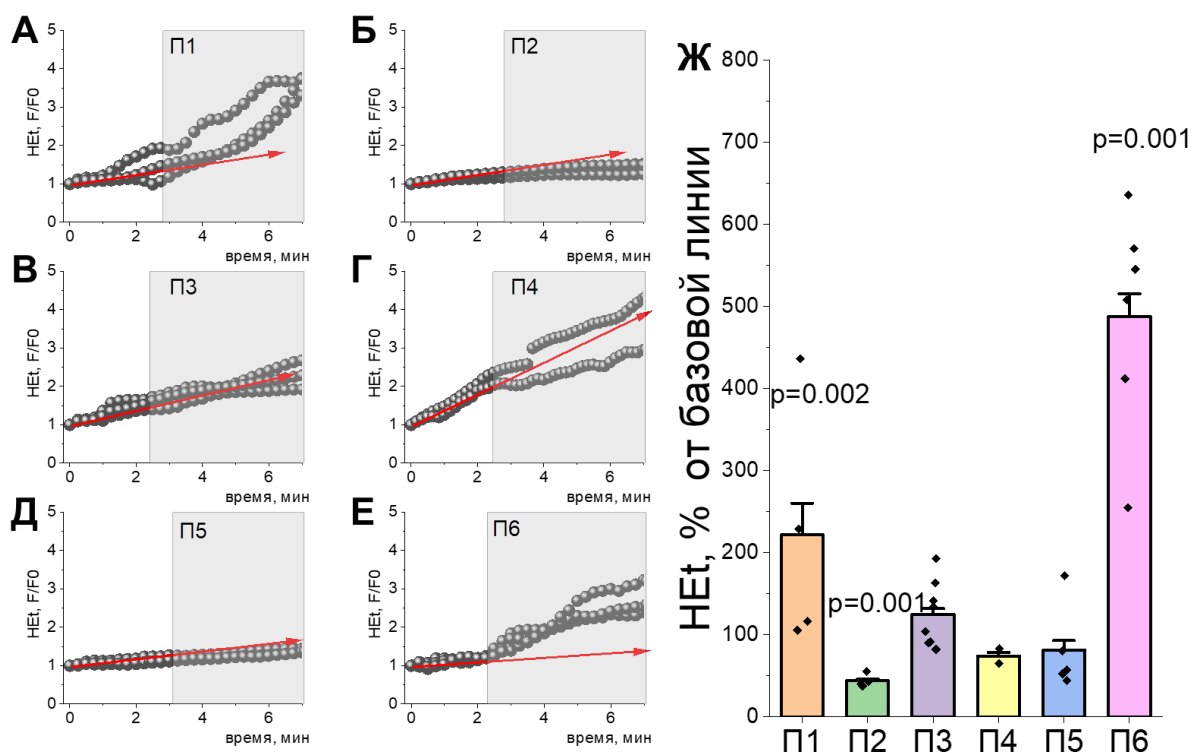


Рисунок 8 – Влияние фрагментов RAGE на скорость окисления HEt в срезах коры головного мозга крыс: А-Е – репрезентативные кривые увеличения интенсивности флуоресценции окисленной формы HEt; Ж – результаты статистической обработки данных изменения скорости окисления HEt при внесении пептидов. На диаграмме размаха центральная линия является медианой, границы – нижний и верхний квартили (1-й и 3-й)[388]

3.1.2 Два пептида RAGE вызывают активацию продукции АФК в первичной нейрон-глиальной культуре

Для того чтобы убедиться, что стимулирующий эффект пептидов может быть зарегистрирован в культуре клеток, проводилась оценка процесса окисления HEt в присутствии пептидов RAGE в первичных нейрон-глиальных клетках коры головного мозга (рисунок 9).

Как можно судить из представленных данных (рисунок 9 А-Е), в наибольшей степени изменение скорости роста флуоресценции окисленной формы HEt происходило под влиянием пептидов 1 и 6. В полном соответствии с представленными выше данными, П1 и П6 демонстрируют 1,7-кратную ($p < 0,001$) и 1,8-кратную ($p < 0,001$) активацию продукции АФК, тогда как в

случае остальных фрагментов значительного изменения скорости окисления HEt не отмечено (рисунок 9 Ж). Стоит отметить, что оба пептида представляют собой полноразмерные фрагменты. В случае П6 имеет место химическая модификация функциональных групп С- и N-конца.

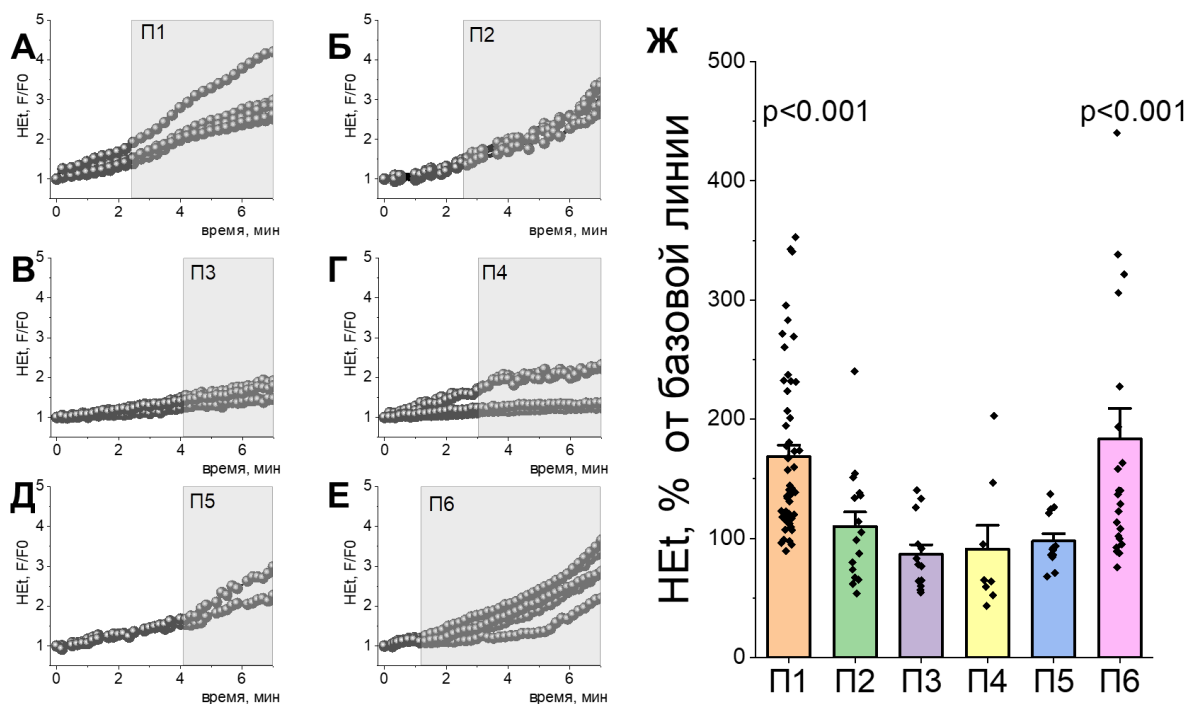


Рисунок 9 – Влияние фрагментов RAGE на скорость окисления HEt в клетках первичной нейроглиальной культуры коры головного мозга крыс: А-Е – репрезентативные кривые увеличения интенсивности флуоресценции окисленной формы HEt ; Ж – результаты статистической обработки данных изменения скорости окисления HEt при внесении пептидов. На диаграмме размаха центральная линия является медианой, границы – нижний и верхний квартили (1-й и 3-й) [388]

Таким образом, для дальнейшего исследования были выбраны два наиболее активных пептида - П1 и П6. Неактивный короткий пептид П3 был использован в качестве отрицательного контрольного пептида.

3.1.3 Индуцированное фрагментом RAGE увеличение АФК опосредовано активацией НАДФН-оксидазы

Определение источника продукции АФК, который может активироваться пептидами RAGE, требует проведения комплекса экспериментов *in vitro* с использованием ряда селективных ингибиторов. Взаимодействие между AGE и RAGE приводит к инициации многочисленных сигнальных путей, например путь через НАДФН-оксидазу, который в итоге приводит к образованию АФК [110,127]. АФК, генерируемые семейством НАДФН-оксидаз, действуют как вторичные мессенджеры, регулирующие повреждение клеток, а повышение активности НАДФН-оксидазы приводит к усилению образования продуктов окислительного стресса, что в итоге приводит к снижению способности организма нейтрализовать его последствия [104].

Среди внутриклеточных источников АФК наиболее вероятной причиной стимуляции пептидными фрагментами окисления H₂O₂ в цитозоле представляется активация НАДФН-оксидазы или КО. Для определения роли этих ферментов в изменении редокс-баланса под влиянием пептидных фрагментов RAGE первичную нейрон-глиальную культуру клеток инкубировали в течение 30 мин с ингибитором НАДФН-оксидазы DPI (0,5 мкМ) и ингибитором КО оксипуринолом (20 мкМ) перед экспериментами с окислением H₂O₂ (рисунок 10).

Проведенные расчеты показали отсутствие увеличения продукции АФК в присутствии DPI в случае пептидов П1 и П6, а также контроля П3, и после воздействия активатора протеинкиназы С – форбол 12-миристат 13-ацетата (РМА). В то же время ингибирование КО оксипуринолом не оказывало влияния на способность пептида RAGE (60–76) П1 и П6 активировать скорость роста флуоресценции этидия (рисунок 10 E).

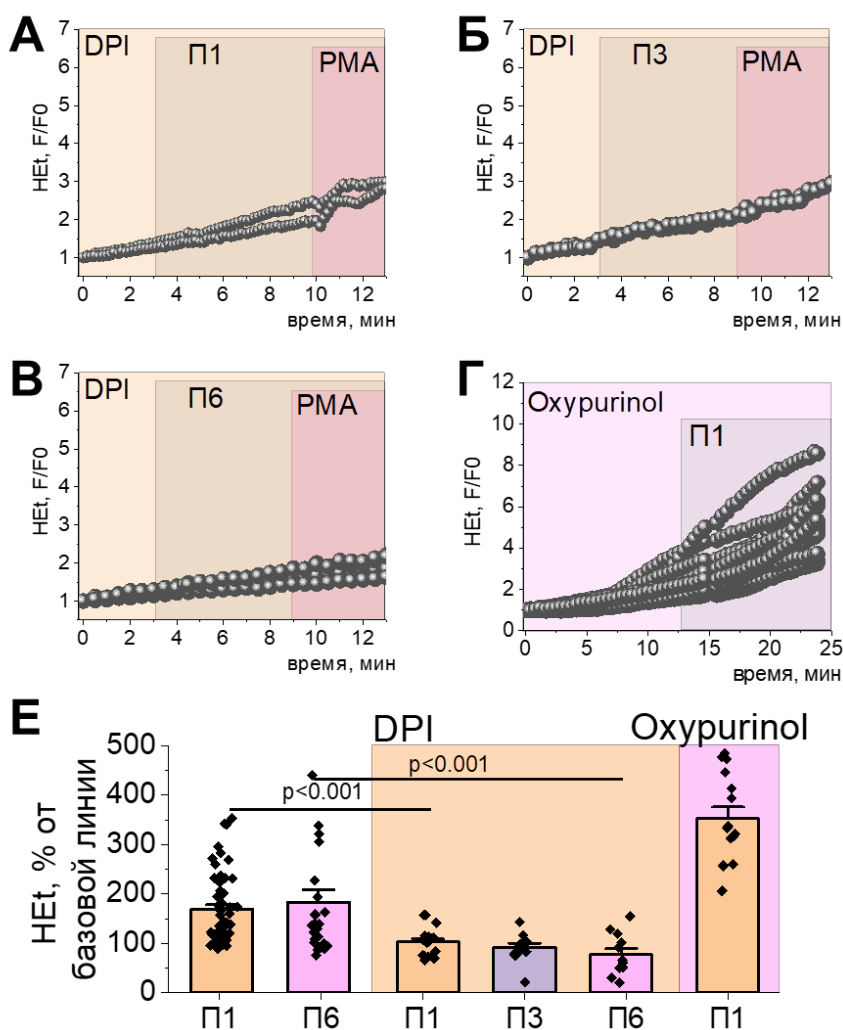


Рисунок 10 – Влияние фрагментов пептида RAGE на скорость окисления HEt при предварительном инкубировании клеток первичной нейроглиальной культуры коры головного мозга крыс в присутствии ингибитора НАДФН-оксидаз: репрезентативные кривые. Д – Результаты статистической обработки данных изменения скорости окисления HEt при внесении пептидов 1–7 при предварительном инкубировании клеток первичной нейроглиальной культуры коры головного мозга крыс в присутствии ингибитора НАДФН-оксидаз. На диаграмме размаха центральная линия является медианой, границы – нижний и верхний квартили (1-й и 3-й) [388]

3.1.4 Пептиды (60–76) и Ac-(60–76)-NH₂ увеличивают продукцию АФК через прямую активацию RAGE

Основанное на работе НАДФН-оксидазы увеличение продукции АФК после воздействия пептидов RAGE может быть результатом прямой активации RAGE или опосредовано другими внутриклеточными сигнальными путями. Целью данного этапа был поиск ответа на вопрос, является ли увеличение

продукции АФК НАДФН-оксидазой результатом взаимодействия пептидов именно с RAGE. Предварительная инкубация клеток с селективным антагонистом, блокатором опосредованного лигандом связывания V-домена RAGE, FPS-ZM1 (1 мкМ) (рисунок 11 А-В), эффективно блокировала увеличение продукции АФК, индуцированное пептидами П1 и П6, и не влияла на стимулирующий эффект РМА.

Ранее было показано, что П1 может активировать глутаматные рецепторы в нейронах, которые также могут активировать НАДФН-оксидазу [364]. Предварительная инкубация (20 мин) нейронов и астроцитов с CNQX (10 мкМ) и МК-801 (10 мкМ), ингибиторами АМРА/каинатных и NMDA-рецепторов, не изменила эффекта активации RAGE НАДФН-оксидазой, а применение П1 привело к двукратному ($n = 3$ стекла, $N = 39$ клеток, $p < 0.001$) и четырехкратному ($n = 3$ стекла, $N = 16$ клеток, $p < 0,001$) увеличению скорости окисления HEt в присутствии ингибиторов АМРА/каинатных, а также NMDA-рецепторов, соответственно (рисунок 11 Г-Д). Следует отметить, что как CNQX, так и МК-801 не влияли на П6-индуцированное увеличение продукции АФК в нейронах и астроцитах (рисунок 11 Е).

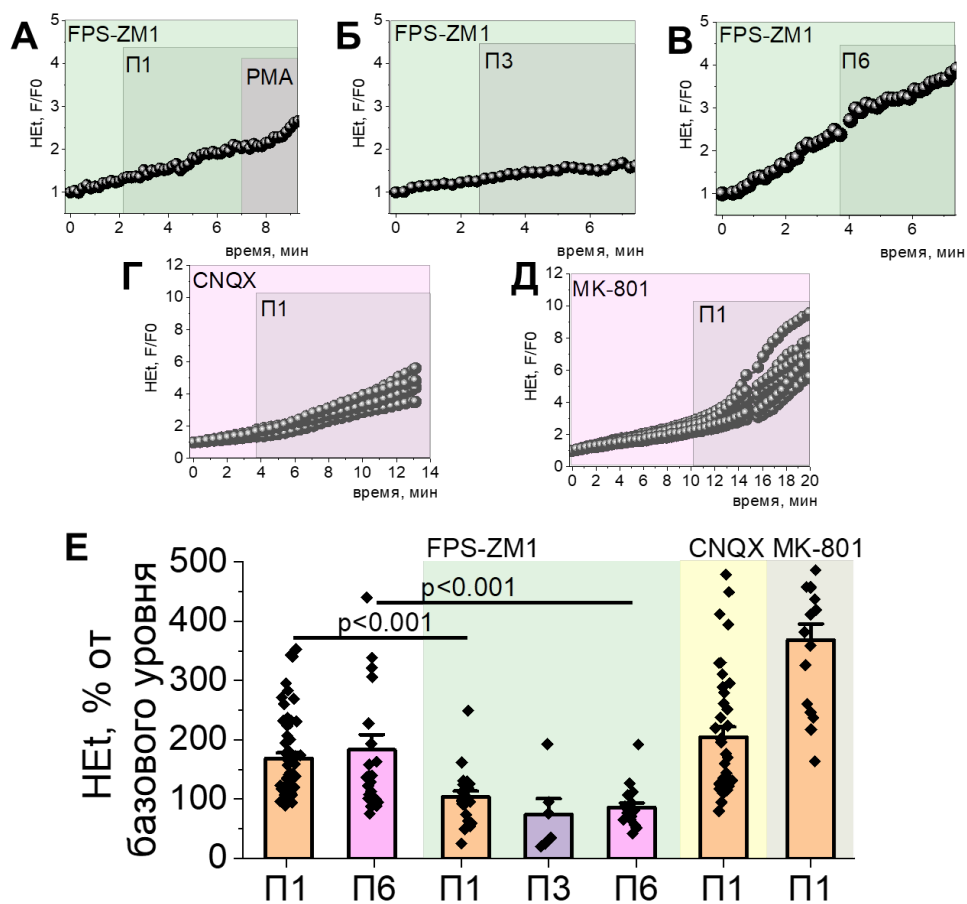


Рисунок 11 – Влияние фрагментов пептида RAGE на скорость окисления HEt при предварительном инкубировании клеток первичной нейроглиальной культуры коры головного мозга крыс в присутствии антагониста RAGE. А-Д – репрезентативные кривые увеличения интенсивности флуоресценции окисленной формы HEt; Е – результаты статистической обработки данных изменения скорости окисления HEt при внесении пептидов 1, 3 и 6. На диаграмме размаха центральная линия является медианой, границы – нижний и верхний квартили (1-й и 3-й) [388]

3.1.5 Активация RAGE индуцирует продукцию АФК, но не окислительный стресс и не вызывает гибели клеток в первичной нейроглиальной культуре

Чтобы выявить возможные изменения окислительно-восстановительного баланса после активации RAGE пептидом, было исследовано влияние пептидов на уровень GSH (рисунок 12) и скорость ПОЛ (рисунок 13).

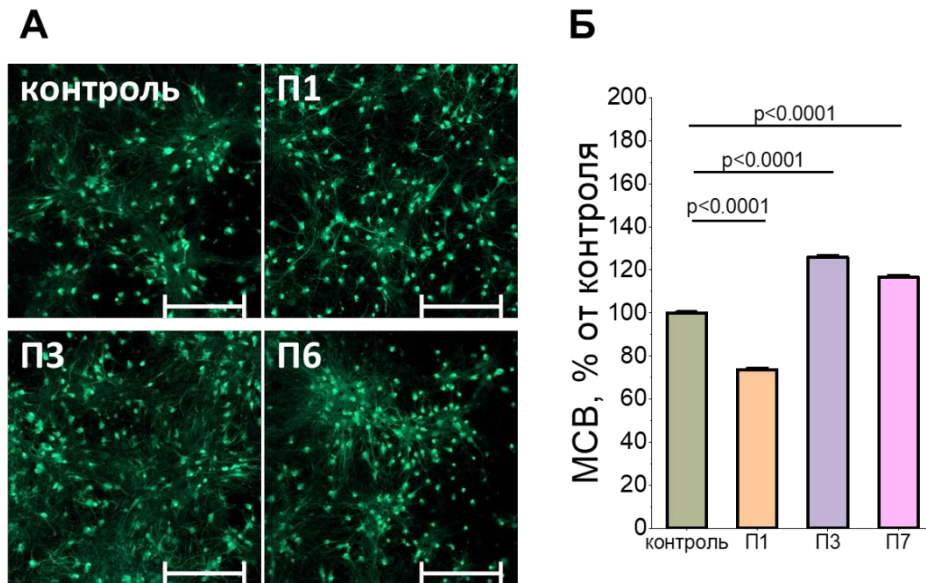


Рисунок 12 – Активация RAGE приводит к снижению уровня восстановленного глутатиона. Репрезентативные изображения флуоресценции МСВ (А) первичной нейрон-глиальной культуры коры головного мозга (без воздействия-контроль и после инкубации с пептидом П1, П3 и П6). Б – интенсивность флуоресценции МСВ в клетках коры головного мозга после прединкубации с пептидами нормированная на уровень клеток контрольной группы без инкубации. [388]

Двухчасовая инкубация первичной совместной культуры кортикальных астроцитов и нейронов с П1 привела к незначительному снижению содержания GSH ($73,7 \pm 0,7\%$ от контрольных клеток, $n = 3$ стекла, $N = 2800$ клеток, $p < 0.0001$) (рисунок 12 А) и увеличению скорости ПОЛ ($187 \pm 23\%$ от базального уровня, $n = 3$ стекла, $N = 27$ клеток, $p = 0,01$) (рисунок 13 А, Ж), которые также могут быть заблокированы DPI (рисунок 13 Г-Е). В клетках П3 и П6 не наблюдается снижения содержания восстановленного глутатиона (рисунок 12 Б) и ускорения ПОЛ (рисунок 13 Б, В, Ж). Однако незначительные изменения уровня GSH и ПОЛ на П1 и отсутствие изменений на П6 не свидетельствуют о развитии окислительного стресса, приводящего к гибели клеток.

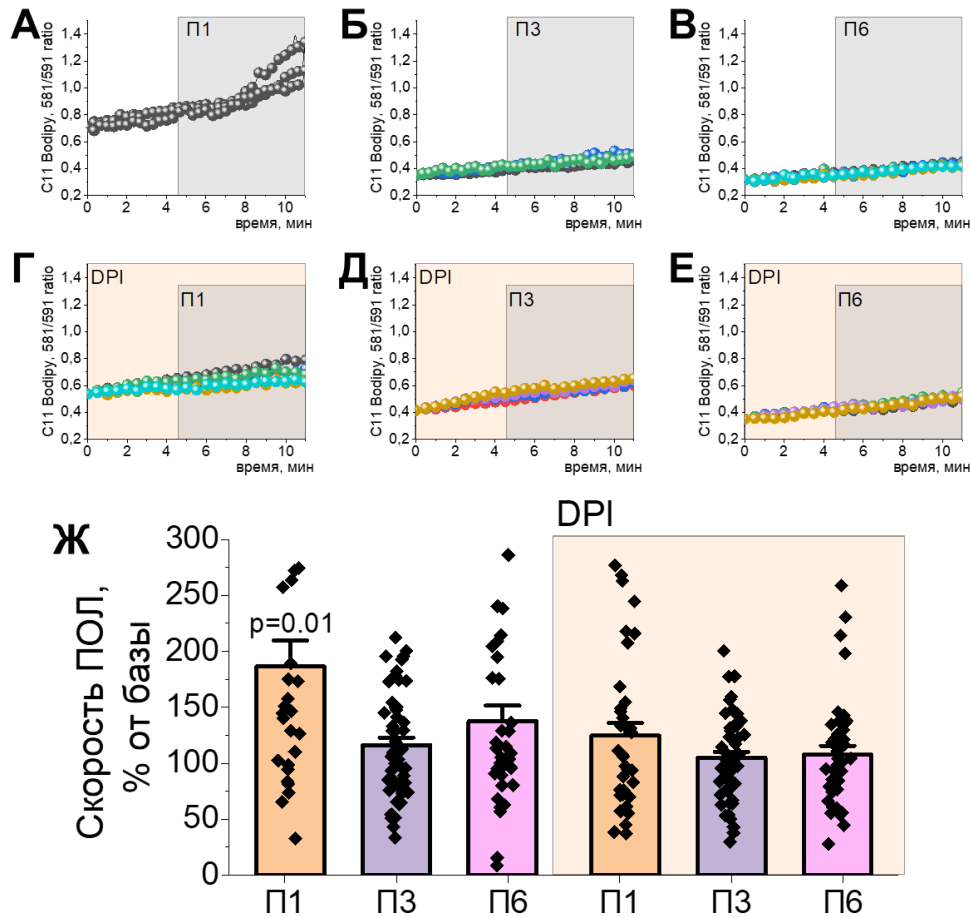


Рисунок 13 – Активация RAGE увеличивает скорость ПОЛ в клетках коры головного мозга. Изменение скорости окисления C-11 BODIPY 581/591 после добавления только пептидов и после предварительной инкубации с ингибитором DPI (0,5 мкМ). Данные нормализованы к базовому уровню ПОЛ, принятому за 100%. Данные представлены как среднее значение±стандартная ошибка. [388]

П1 не увеличивал процент пропидий йодид (PI) -позитивных клеток ($8,0 \pm 1,4\%$, $n = 3$ стекла, $N = 21$ поле зрения) по сравнению с клетками без воздействия ($12,8 \pm 1,7\%$, $n = 3$ стекла, $N = 47$ полей зрения) (рисунок 14). Уровень мертвых клеток в культуре, обработанной П6, был выше, чем в контрольном эксперименте ($19,3 \pm 2,6\%$, $n = 3$ стекла, $N = 31$ поле зрения, $p = 0,003$), но равным уровню в культуре, инкубированной с П3 ($19,6 \pm 2,6\%$, $n = 3$ стекла, $N = 21$ поле зрения). Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии патологических последствий активации продукции АФК фрагментами RAGE.

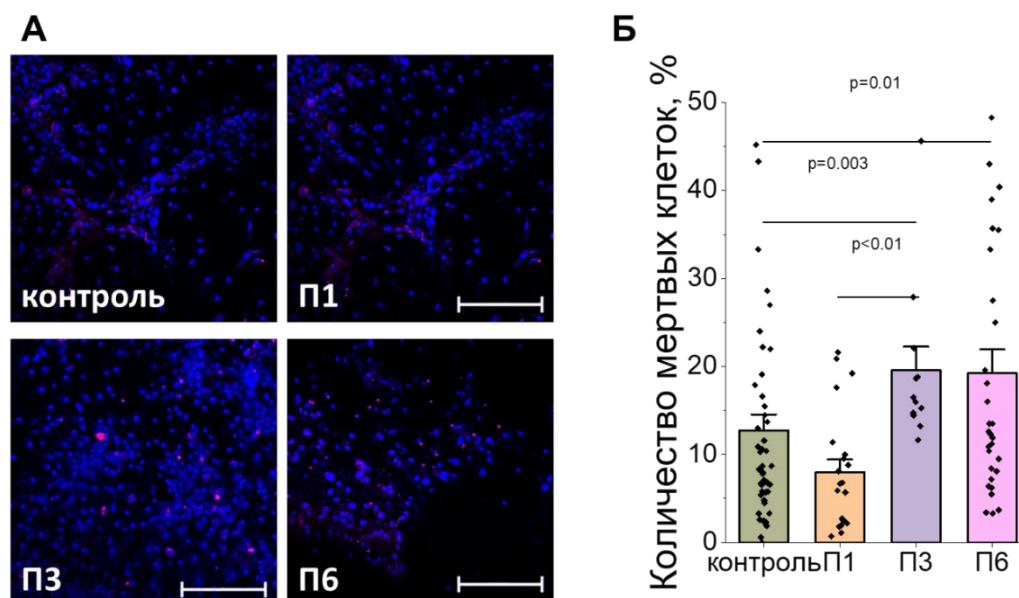


Рисунок 14 – Активация RAGE защищает клетки коры головного мозга от клеточной гибели. Репрезентативные изображения Hoechst 33342- и PI-окрашенных клеток (А) коры головного мозга клеток (без предварительной обработки-контроль и после инкубации с пептидом П1, П3 и П6 в течение 24 ч). Б – доля PI-позитивных клеток, нормированная на долю мертвых клеток в контрольной группе без инкубации с пептидом. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка [388]

3.1.6 Активация RAGE пептидами (60–76) и Ac-(60–76)-NH₂ защищает клетки от A β -индуцированной гибели

Значительное ускорение внутриклеточной продукции АФК под действием НАДФН-оксидазы является одним из патологических процессов, приводящих к токсичности БА. Двукратное снижение ($p < 0,007$) A β -индуцированной активации окисления H₂O₂ после инкубации клеток с FPS-ZM1 (рисунок 15 А-Б) указывает на то, что токсичность A β связана со связыванием A β с RAGE.

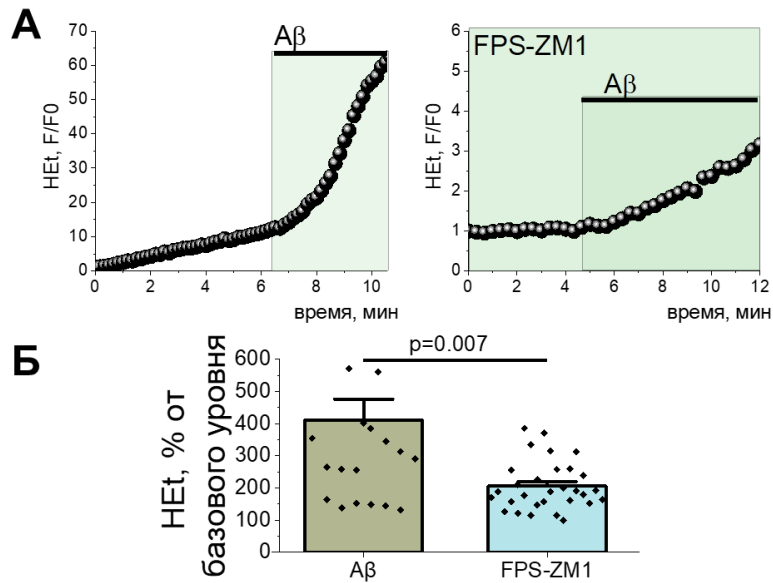


Рисунок 15 – Активация RAGE защищает от нейротоксичности Aβ. А – репрезентативные кривые активации продукции АФК в присутствии Aβ и антагониста RAGE. Б – результаты статистической обработки данных изменения скорости окисления HEt. На диаграмме размаха центральная линия является медианой, границы – нижний и верхний квартили (1-й и 3-й) [388]

Инкубация клеток первичной нейрон-глиальной культуры с Aβ и П1 приводит к статистически значимому снижению уровня PI-позитивных клеток по сравнению с экспериментом только с Aβ ($14,8 \pm 9,7\%$, $n = 3$ стекла, $N = 21$ поле зрения и $26,2 \pm 16,8\%$, $n = 3$ стекла, $N = 58$ полей зрения соответственно) (рисунок 16). Применение контроля П3, а также П6 не показало значительного снижения процента мертвых клеток ($19,5 \pm 2,8\%$, $n = 3$ стекла, $N = 11$ полей зрения и $32,6 \pm 16,7\%$, $n = 3$ стекла, $N = 31$ поле зрения соответственно) (рисунок 16 Б).

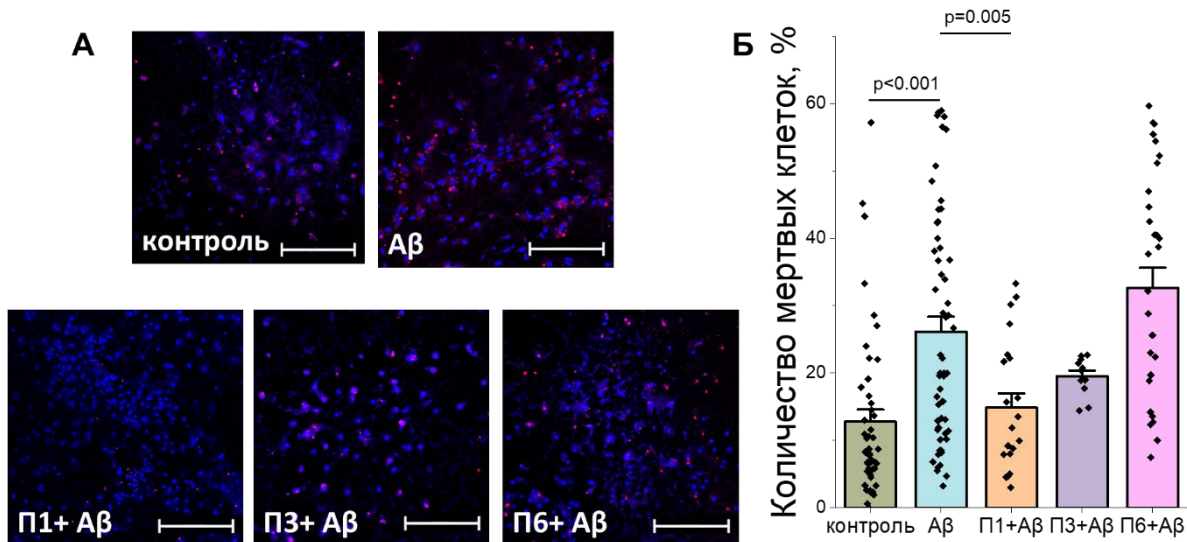


Рисунок 16 – Влияние $A\beta$ и пептидов на выживаемость клеток. А – репрезентативные изображения первичной нейрон-глиальной культуры, инкубированных с Hoechst 33324 и PI (без дополнительного воздействия и после прединкубации с $A\beta$, смесью $A\beta$ с П1, $A\beta$ с П3 и $A\beta$ с П6); Б – количественное определение доли PI-позитивных клеток после различных условий воздействия, нормированной на долю мертвых клеток в контрольной группе без инкубации. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка. [388]

Можно говорить о том, что фрагмент пептида 1 обладает нейропротекторными свойствами на основании его способности при активации продукции АФК сохранять окислительный баланс клеток и защищать от патологического действия $A\beta$. Механизм защитного воздействия П1 может быть основан как на связывании с $A\beta$ на ранней стадии формирования олигомеров, либо на нейтрализации $A\beta$ на более поздних стадиях.

Высокая степень активации продукции АФК, вызываемая пептидом 6 (рисунок 8, 9), которая на 40% превышает аналогичный параметр для П1, а также низкий уровень содержания GSH в клетках, обработанных П6, могут говорить об отрицательном воздействии данного фрагмента на редокс-баланс клеточной культуры и развитии окислительного стресса. В подтверждение этого факта также говорят данные о содержании некротических клеток.

Пептид 6 по химическому строению подобен пептиду 1, но имеет защитную группу. Исходя из данных по скорости окисления HEt (рисунок 8, 9), активация продукции АФК пептидами 1 и 6 статистически не отличается, однако наличие пептида 6 также снижает антиоксидантную защиту клетки и приводит к патологическому снижению общей жизнеспособности клеток в присутствии Аβ. Возможно, наличие защитной группы лишает пептид возможности нейтрализовать действие Аβ на ранних этапах его олигомеризации и активирует механизмы, включающие состояние окислительного стресса в клетках.

3.2 Дефицит HPRT1 вызывает изменение энергетического метаболизма митохондрий в головном мозге

В первом разделе результатов была рассмотрена вовлеченность RAGE в физиологию окислительно-восстановительных реакций и его потенциальная роль в регуляции баланса. Учитывая, что одной из потенциальных патологий, связанных с изменением окислительно-восстановительного баланса в организме, может быть мутация в гене белка HPRT1, который контролирует активность КО, одной из задач работы стало определение влияния делеции HPRT1 на организм. Сама активность КО зависит от энергетического метаболизма и синтеза мочевой кислоты и в рамках исследований проводилась оценка изменений в окислительно-восстановительном балансе и энергетическом метаболизме организма с мутацией в гене HPRT1, приводящей к СЛН.

3.2.1 Мутация HPRT1 снижает уровень $\Delta\Psi_m$ в нейронах и астроцитах и изменяет механизм поддержания $\Delta\Psi_m$

$\Delta\Psi_m$ является показателем функции МХ и может быть использован для выявления возможного влияния мутации гена HPRT1 на митохондриальный метаболизм. Мы использовали флуоресцентный потенциал-зависимый зонд

TMRM для измерения $\Delta\Psi_m$ в первичной нейрон-глиальной культуре мышей ДТ и мутантной групп (рисунок 17).

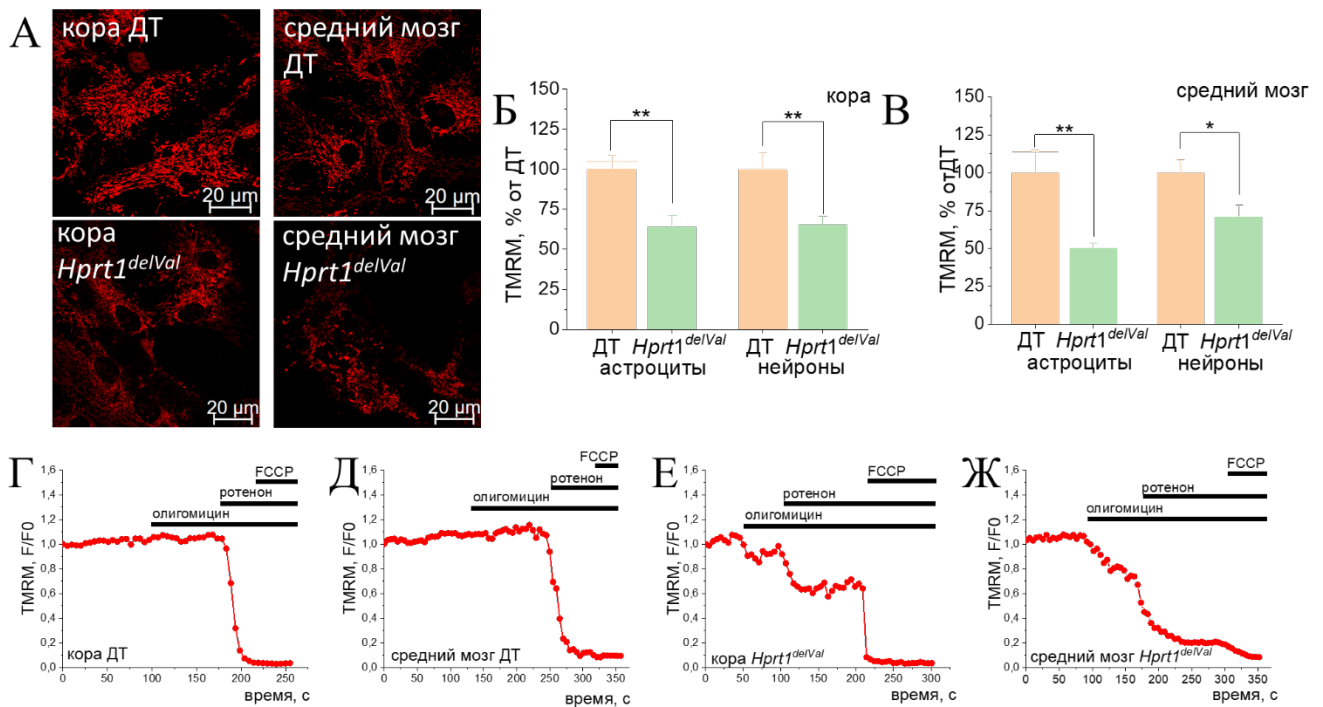


Рисунок 17 – Дефицит *HPRT1* снижает мембранный потенциал МХ в нейронах и астроцитах и изменяет механизм поддержания $\Delta\Psi_m$. А – репрезентативные изображения нейрон-глиальных культур, инкубированных с TMRM. Б, В – $\Delta\Psi_m$ в клетках мозга мутантных и ДТ мышей ($n = 5$ стекла на область мозга; $N = 32-67$ астроцитов или нейронов на область мозга). Данные по $\Delta\Psi_m$ мутантных клеток нормализованы к интенсивности флуоресценции TMRM астроцитов и нейронов ДТ. Нормализованная интенсивность флуоресценции TMRM в клетках коры (Г) и среднего мозга (Д) ДТ и в клетках коры (Е) и среднего мозга (Ж) *HPRT1*^{del8Val} после применения олигомицина (2 мкг/мл), ротенона (3 мкМ) и FCCP (2 мкМ). Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ и *** $p < 0,0001$. [20]

Было обнаружено, что нейроны и астроциты коры и среднего мозга с мутацией *HPRT1* характеризуются более низким $\Delta\Psi_m$ по сравнению с астроцитами и нейронами ДТ (рисунок 17 Б, В). Так, максимальное снижение $\Delta\Psi_m$ наблюдалось в астроцитах среднего мозга (на ~50%; рисунок 17 В) при меньшем снижении в соседних нейронах (на 29,1%; рисунок 17 Б). В астроцитах и нейронах коры головного мозга значение $\Delta\Psi_m$ было снижено на

35,9 и 34,7 % соответственно (рисунок 17 Б). Таким образом, мутация HPRT1 снижает $\Delta\Psi_m$ независимо от клеточных регионов и типа клеток.

$\Delta\Psi_m$ поддерживается в основном за счет функционирования комплексов ЭТЦ. Снижение $\Delta\Psi_m$ в мутантных клетках может быть результатом изменения функции ЭТЦ вследствие функционального подавления активности гена HPRT1. Добавление ингибитора АТФ-синтазы F0-F1 олигомицина (2 мкг/мл) к нейронам коры среднего мозга и астроцитам ДТ демонстрирует типичное для контроля отсутствие эффекта на $\Delta\Psi_m$ или индукцию небольшой гиперполяризации (рисунок 17 Г, Д). Последующее применение ингибитора комплекса I ротенона (3 мкМ) вызывало почти полную деполяризацию в этих клетках, что подтверждалось отсутствием реакции на митохондриальный разобщитель FCCP (2 мкМ). Клетки коры и среднего мозга с мутацией HPRT1 демонстрируют снижение интенсивности флуоресценции TMRM после добавления олигомицина (рисунок 17 Е, Ж), что убедительно свидетельствует о том, что этот фермент работает в обратном режиме для поддержания $\Delta\Psi_m$ путем перекачки протонов с помощью АТФ. Следует отметить, что в мутантных клетках коры и среднего мозга ротенон вызывает лишь частичное снижение флуоресценции TMRM по сравнению с контрольными клетками ДТ. Последующее применение FCCP к этим клеткам вызывает ~20–30% снижение общего сигнала TMRM, что в отсутствие какого-либо другого донора электронов может быть только активностью комплекса II. Таким образом, $\Delta\Psi_m$ в клетках с мутацией HPRT1 частично поддерживается комплексами II и АТФ-азным режимом комплекса V из-за снижения функции комплекса I.

3.2.2 Мутация HPRT1 приводит к снижению потребления НАДН в митохондриях

Митохондриальный метаболизм в живых клетках и в тканях можно также оценить с помощью измерения митохондриального окислительно-восстановительного индекса. Для этого мы измерили автофлуоресценцию НАДН в переживающих срезах мозга из коры и среднего мозга. Для отделения

митохондриального НАДН от НАДФН и немитохондриального НАДН использовали протонофор FCCP (для максимального увеличения скорости дыхания и потребления НАДН, принимается за 0) и ингибитор комплекса IV NaCN (для блокирования дыхания и потребления НАДН, принимается за 100) (рисунок 18). Эти измерения позволили оценить 3 характеристики, связанные с НАДН: содержание митохондриального НАДН, редокс-индекс (соотношение между производством и потреблением НАДН в МХ) и скорость производства НАДН в цикле Кребса, определяемую по скорости увеличения автофлуоресценции после NaCN (рисунок 18 А) [102,389]. Митохондриальный уровень НАДН в срезах коры и среднего мозга мышей с мутацией HPRT1 был в 1,3 и 3,2 раза выше по сравнению с ДТ (рисунок 18 В). Кортикальные срезы мутантных мышей характеризовались практически одинаковым редокс-индексом НАДН по сравнению с ДТ ($25,4 \pm 2,9\%$ в срезах животных с мутацией HPRT1 и $29,3 \pm 2,2\%$ в срезах ДТ), тогда как в срезах среднего мозга было обнаружено значительное снижение редокс-индекса НАДН в срезах HPRT1 ($12,5 \pm 1,8\%$ и $26,3 \pm 1,7\%$ у мутантных и ДТ животных, соответственно) (рисунок 18 Г). В соответствии с более высоким уровнем НАДН в мозге HPRT1, скорость образования НАДН в цикле Кребса была значительно выше как в коре (в срезах мозга мутантных мышей $0,5 \pm 0,04$, ДТ- $0,2 \pm 0,01$), так и в среднем мозге (в срезах мозга мутантных животных $0,3 \pm 0,03$, ДТ- $0,2 \pm 0,02$) (рисунок 18 Д). Таким образом, более высокий уровень митохондриального уровня НАДН и повышенная скорость продукции НАДН в МХ срезов мозга с мутацией HPRT1 позволяют предположить, что наблюдаемое в экспериментах с измерениями $\Delta\Psi_m$ ингибирование активности комплекса I не связано с ограничением НАДН в качестве митохондриального субстрата.

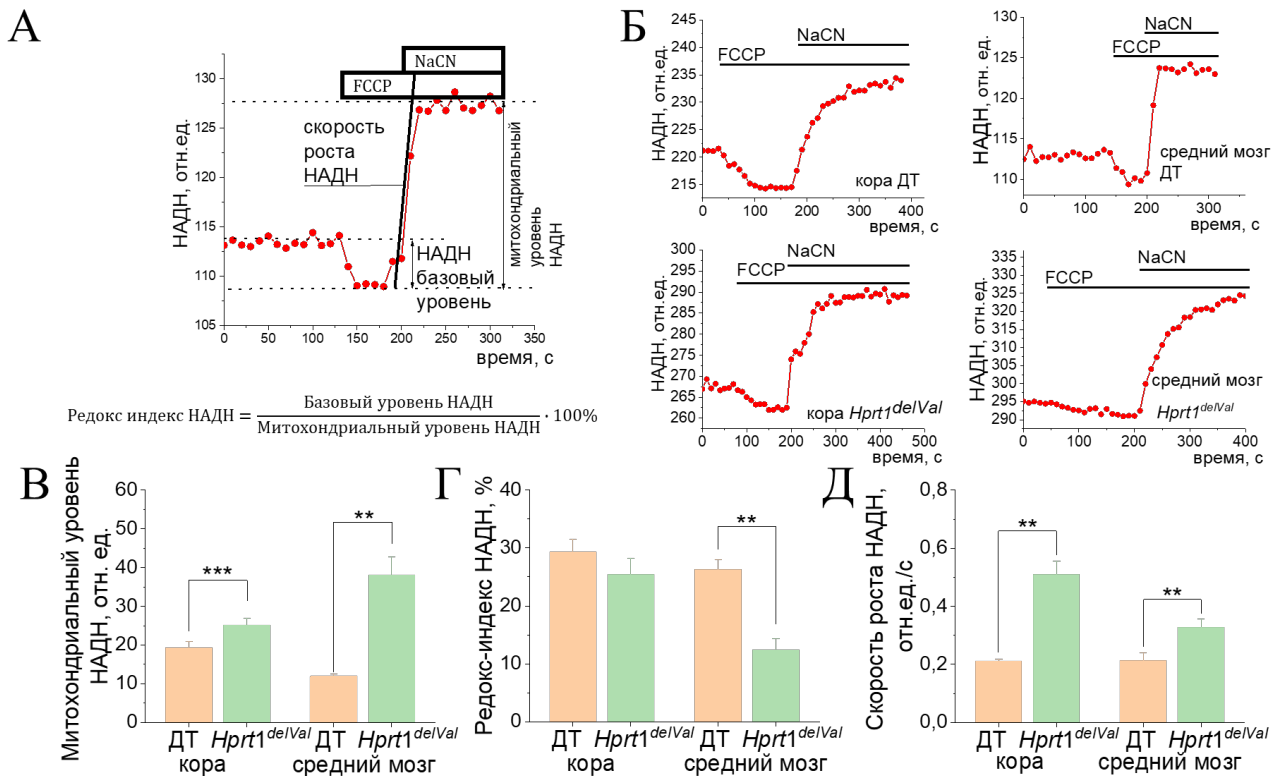


Рисунок 18 – Уровень и продукция митохондриального НАДН в клетках мозга, лишенных HPRT1. А Репрезентативный график изменения автофлуоресценции НАДН с объяснением расчета митохондриального уровня НАДН, редокс-индекса НАДН и скорости производства НАДН. В Репрезентативные кривые автофлуоресценции НАДН после применения FCCP (2 мкМ) и NaCN (2 мМ). Митохондриальный уровень НАДН (С), редокс-индекс НАДН (D) и скорость продукции НАДН (E) в переживающих срезах мозга мышей ДТ и HPRT1 KD (n = 3 животных, N = 12 переживающих срезов каждой области мозга). Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка. **p < 0,001; ***p < 0,05 [20]

3.2.3 Мутация HPRT1 приводит к ингибированию митохондриального дыхания, связанного с комплексом I

Электрод Кларка был использован для оценки скорости потребления кислорода в изолированных МХ мозга. Для оценки параметров дыхания в качестве субстратов комплекса I использовали глутамат (5 мМ) и малат (1 мМ). МХ мозга мутантных мышей HPRT1 имели значительно более низкую скорость АДФ-зависимого (V3, на 30,2%) и в меньшей степени АДФ-независимого дыхания (рисунок 19 А).

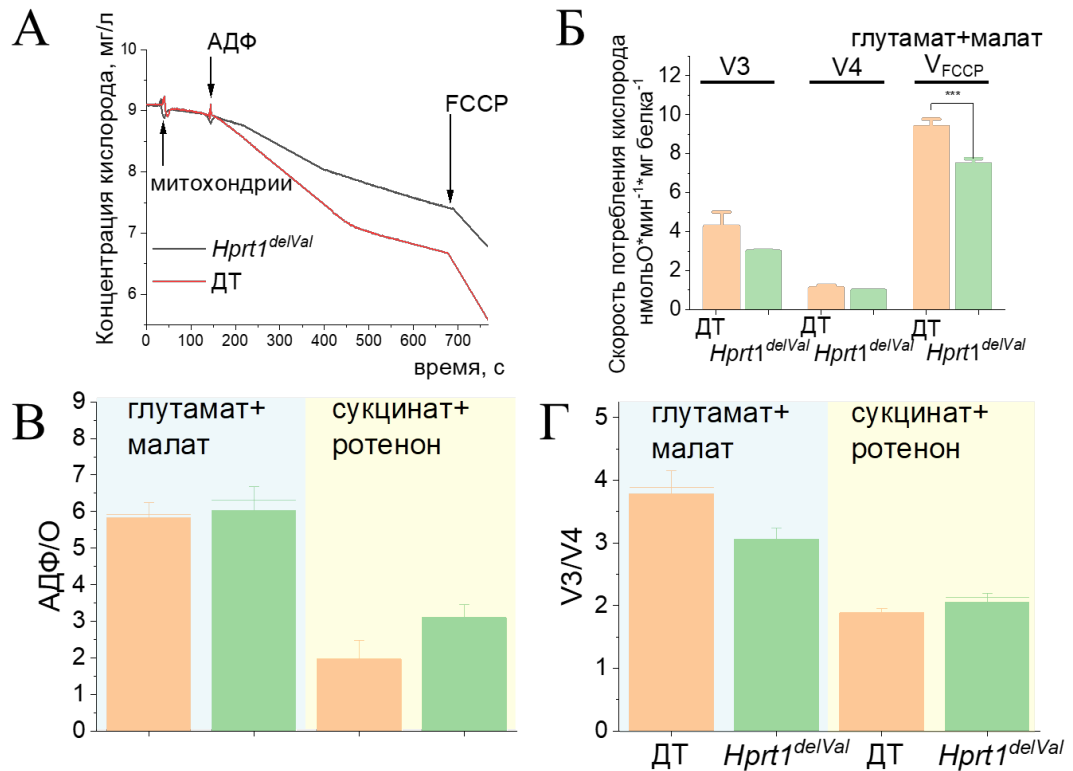


Рисунок 19 – Дефицит *HPRT1* вызывает ингибирование связанного с комплексом I дыхания МХ мозга. А – репрезентативные кривые потребления кислорода в МХ мозга ДТ и *HPRT1*-дефицитных мышей; V3, V4 и V_{FCCP} (Б), дыхательный контроль (V3/ V4) (В) и отношение АДФ/О (Г) МХ мозга мышей ДТ и *HPRT1.del8Val* в среде глутамат (5 мМ)+малат (5 мМ) или сукцинат (5 мМ)+ротенон (5 мкМ) (n = 2 мыши, N = 8 независимых экспериментов). Данные представлены как среднее±стандартная ошибка. ***p<0.05 [20]

В результате дыхательный коэффициент был снижен на 18,4% (рисунок 19 Б). АДФ/О в МХ мутантных мышей составлял $7,1 \pm 1,1$, а в МХ ДТ – $5,0 \pm 0,6$ (рисунок 19 В). Важно отметить, что максимальная скорость дыхания МХ, индуцированного 0,5 мкМ FCCP, была значительно ниже у мутантных мышей *HPRT1* по сравнению с контрольными МХ, что подтверждает ингибирование комплекса I-зависимого дыхания. Напротив, максимальное FCCP-индуцированное дыхание МХ мозга мышей *HPRT1del8Val* было сходно с контролем в среде, содержащей 5 мМ сукцинат+ротенон (5 мкМ), что свидетельствует о том, что отсутствие *HPRT1* не влияет на активность комплекса II (рисунок 19 Б). Следует отметить, что мутация *HPRT1* не

вызывала изменений в соотношении дыхательного контроля (рисунок 19 В, Г) или ADP/O (рисунок 19 Г) в среде, содержащей сукцинат+ротенон.

3.2.4 Ингибирование комплекса I в HPRT1 приводит к увеличению продукции митохондриальных АФК

Фармакологическое или молекулярное ингибирование комплекса I может приводить к увеличению продукции митохондриальной АФК [12,390]. Чтобы выяснить, увеличивает ли ингибирование комплекса I в клетках мозга мышей с мутацией HPRT1del8Val продукцию митохондриальной АФК, был использован MitoTracker Red ROS в качестве флуоресцентного индикатора АФК в МХ (рисунок 20 А-Б).

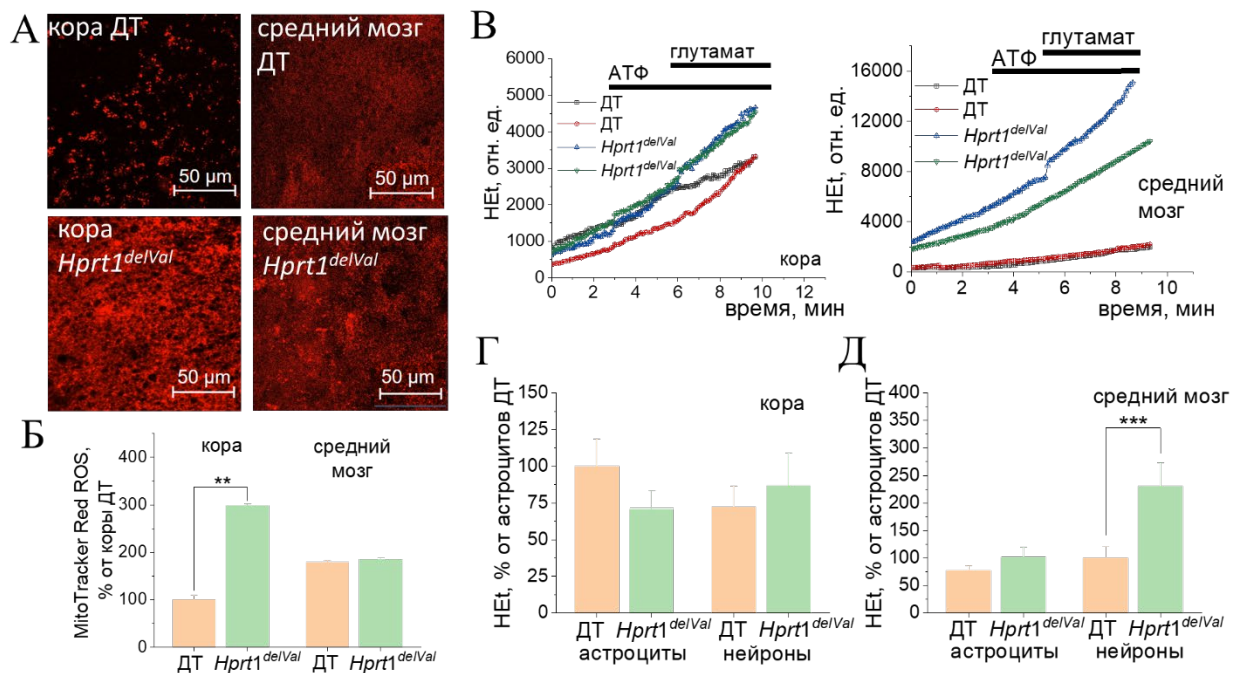


Рисунок 20 – Дефицит HPRT1 приводит к увеличению продукции АФК в МХ и цитозоле клеток мозга. А – репрезентативные изображения срезов коры и среднего мозга мышей ДТ и мышей с мутацией, загруженные MitoTracker Red CM-H2Xros. Б – интенсивность флуоресценции MitoTracker Red ROS в срезах мозга, нормализованная к уровню срезов коры ДТ ($n = 3$ мыши, $N = 9$ срезов каждой области мозга). В – репрезентативные кривые флуоресценции HEt в клетках коры и среднего мозга мышей ДТ и HPRT1. Внесение АТФ (100 мкМ) и глутамата (10 мкМ) использовали для дифференциации сигнала от астроцитов и нейронов, соответственно. Г, Д – скорость увеличения флуоресценции HEt в астроцитах и нейронах коры и среднего мозга мышей ДТ и мутантов, нормализованная к уровню астроцитов коры ДТ ($n = 4$ стекла на

*область мозга; N = 27–51 астроцитов или нейронов на область мозга). Данные представлены как среднее±стандартная ошибка. *** $p < 0.05$ [20]*

Было обнаружено, что мутация HPRT1 значительно увеличивает скорость продукции митохондриальных АФК в первичных нейронах и астроцитах (рисунок 20 А, Б). Следует отметить, что эффект мутации HPRT1 на митохондриальные АФК был в 3 раза выше в кортикальных нейронах и астроцитах в переживающих срезах мозга мутантных мышей по сравнению со срезами мозга ДТ (рисунок 20 Б).

3.2.5 Скорость продукции АФК увеличена в астроцитах и нейронах клеток среднего мозга мышей экспериментальной группы

Для оценки скорости образования АФК использовали флуоресцентный зонд дигидроэтидий (HEt). Для дифференциации сигнала от разных типов клеток в первичных нейрон-глиальных культурах в ходе эксперимента использовали АТФ (для астроцитов) и глутамат (для нейронов) (рисунок 20 В). Все данные по скорости продукции АФК сравниваются со скоростью продукции АФК в кортикальных астроцитах ДТ. Отмечено снижение уровня базальной продукции АФК в астроцитах коры мутантных мышей ($70,7 \pm 12,8\%$ от ДТ астроцитов), в то время как скорость продукции АФК в нейронах несколько повышена ($86,8 \pm 22,2\%$ и $72,1 \pm 14,3\%$ в клетках мутантов и ДТ, соответственно) (рисунок 20 Г). В среднем мозге обнаружено увеличение скорости окисления HEt (на $32,0\%$ в астроцитах и на $129,9\%$ в нейронах по сравнению с клетками ДТ) (рисунок 20 Д).

3.2.6 Высокий уровень восстановленного глутатиона защищает клетки с мутацией HPRT1 от окислительного стресса

Повышенная продукция АФК может привести к повреждению липидов мембран, белков и ДНК, и развитию окислительного стресса [391]. Однако это происходит в случае дисбаланса между продукцией АФК и их нейтрализацией клеточной антиоксидантной системой. Содержание GSH в клетках определяли

с помощью монохлорбимана (MCB), который образует флуоресцентные конъюгаты в реакции с GSH (рисунок 21). Содержание GSH в клетках коры головного мозга мутантных мышей было более чем в 2 раза выше по сравнению с клетками коры головного мозга ДТ, принятыми за 100% (рисунок 21 Б). Статистически значимой разницы в содержании GSH между клетками среднего мозга животных с мутацией HPRT1 и клетками среднего мозга ДТ не было ($119,9 \pm 4,9\%$ и $123,3 \pm 3,7\%$, соответственно) (рисунок 21 Б). Таким образом, для клеток мозга мутантов характерен баланс между продукцией и нейтрализацией АФК и не выявлен окислительный стресс.

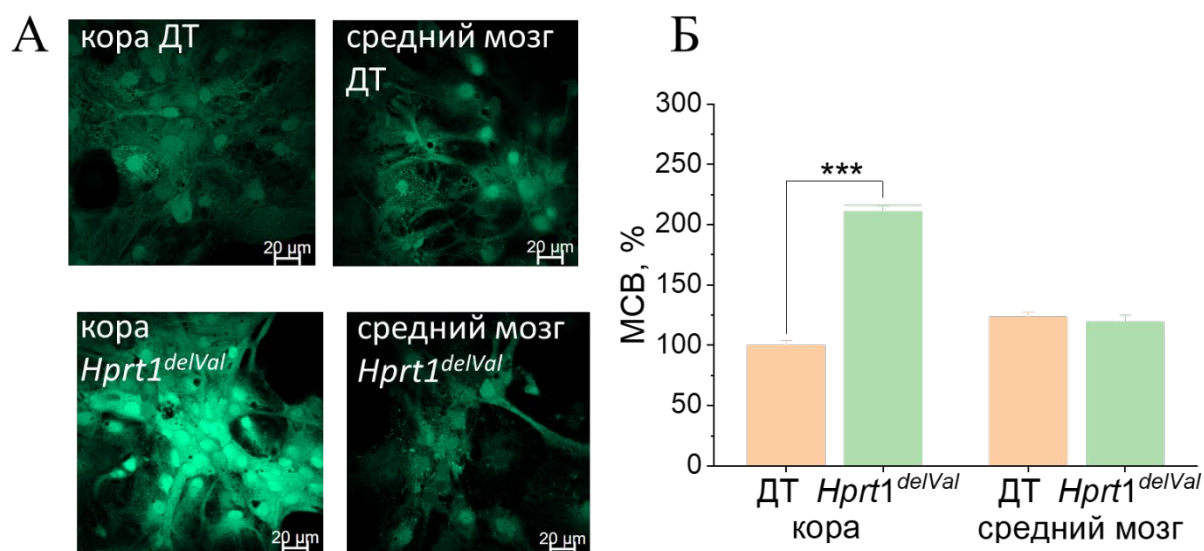


Рисунок 21 – Дефицит HPRT1 повышает уровень глутатиона. А – репрезентативные изображения первичных нейрон-глиальных культур, загруженных MCB. В – интенсивность флуоресценции MCB в клетках мозга ДТ и HPRT1-мутантных мышей, нормализованная к уровню клеток коры ДТ ($n = 6$ стекла на область мозга; $N = 44-81$ клеток на область мозга). Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка. $***p < 0.001$ [20]

Данные, полученные в нашей лаборатории [20], свидетельствуют о том, что дефицит HPRT1 приводит к ингибированию митохондриального комплекса I, что было подтверждено в экспериментах с изолированными МХ мозга, снижению потребления митохондриального НАДН и уменьшению мембранного потенциала.

В данном разделе показано, что дефицит HPRT1 приводит к изменениям в митохондриальном метаболизме, что приводит к снижению $\Delta\Psi_m$ в нейронах и астроцитах. При этом изменяется не только величина $\Delta\Psi_m$, но и механизм поддержания потенциала, который обеспечивается частично обратным режимом работы комплекса V (рисунок 21). Следует отметить, что подобный тип компенсации $\Delta\Psi_m$ в нейронах показан для многих патологий, включая нейродегенерацию и другие патологии комплекса I ЭТЦ [390,392].

Полученные данные свидетельствуют о том, что дефицит HPRT1 приводит к ингибированию митохондриального комплекса I, что было подтверждено в экспериментах с изолированными МХ мозга, и снижению потребления митохондриального НАДН. Можно предположить, что митохондриальная дисфункция в нейронах и астроцитах при дефиците HPRT1 индуцируется более сложным эффектом, чем изменениями внутриклеточной или внеклеточной концентрации мочевой кислоты. Это также подтверждается результатами, полученными на первичных нейронах и астроцитах, на которые не действовала внеклеточная мочевая кислота. Было также показано, что скорость выработки НАДН была выше в клетках с дефицитом HPRT1, что говорит о том, что ингибирование комплекса I в этих клетках не вызвано недостатком субстратов, и что в нейронах и астроцитах не нарушен метаболизм глюкозы, который может быть даже выше за счет более высокой гликолитической активности для производства АТФ.

3.3 Регуляция окислительно-восстановительной сигнализации белками-синуклеинами и её взаимодействие с другими компонентами внутриклеточной сигнализации

Для НДЗ существует глубокая взаимосвязь между изменениями в состоянии тканей и функциональной активности ряда белков. С одним из таких заболеваний – БП – тесно связана олигомерная форма белка α -синуклеина. Как было сказано ранее, одним из способов изучения нормальной физиологической функции генов, кодирующих экспрессию белков

синуклеинов, является их генетическая инактивация. Поэтому для дальнейшего анализа была выбрана модель животных с генетической инактивацией генов. Для формирования экспериментальных групп использовали самцов линии мышей с генетической инактивацией генов синуклеинов: одиночный нокаут по гену α -, β - и γ -синуклеина (a-KO, b-KO, g-KO), двойной нокаут по α - и γ -синуклеину (ag-KO, функциональный только β -синуклеин), тройной нокаут по генам α -, β - и γ -синуклеину (abg-KO), а в качестве контрольной группы были выбраны мыши линии C57Bl/6J без генетических модификаций, полученные при становлении линий нокаутов синуклеинов (ДТ).

Эксперименты были проведены на нейрон-глиальной культуре клеток среднего мозга мышей и на переживающих срезах головного мозга (*ex vivo*), что позволяет получить более физиологически релевантные данные по сравнению с изолированными клетками и гомогенатами.

3.3.1 Вовлеченность синуклеинов в поддержание уровня восстановленного глутатиона в срезах головного мозга

Одной из главных характеристик окислительно-восстановительного баланса в головном мозге является уровень эндогенного антиоксиданта – GSH. Для того, чтобы оценить возможные изменения в окислительно-восстановительном балансе при отсутствии определенных синуклеинов мы измеряли уровень GSH используя флуоресцентный индикатор MCB.

Было обнаружено, что уровень различных синуклеинов напрямую связан с уровнем GSH. Согласно данным, представленным на рисунке 22, недостаток α -синуклеина приводит к значительному снижению (до 40%) от значений уровня GSH контрольной группы. Следует отметить, что все комбинации недостатка α -синуклеина – как тройной нокаут (abg-KO) или двойной нокаут (ag-KO) – снижали уровень глутатиона до 60%. Не изменял уровень GSK только нокаут по γ -синуклеину. Таким образом, можно сделать вывод о том, что отсутствие синуклеинов влияет на окислительно-

восстановительный баланс, позволяя предположить, что сами белки семейства синуклеинов регулируют синтез основных антиоксидантов или продукцию АФК в этих клетках.

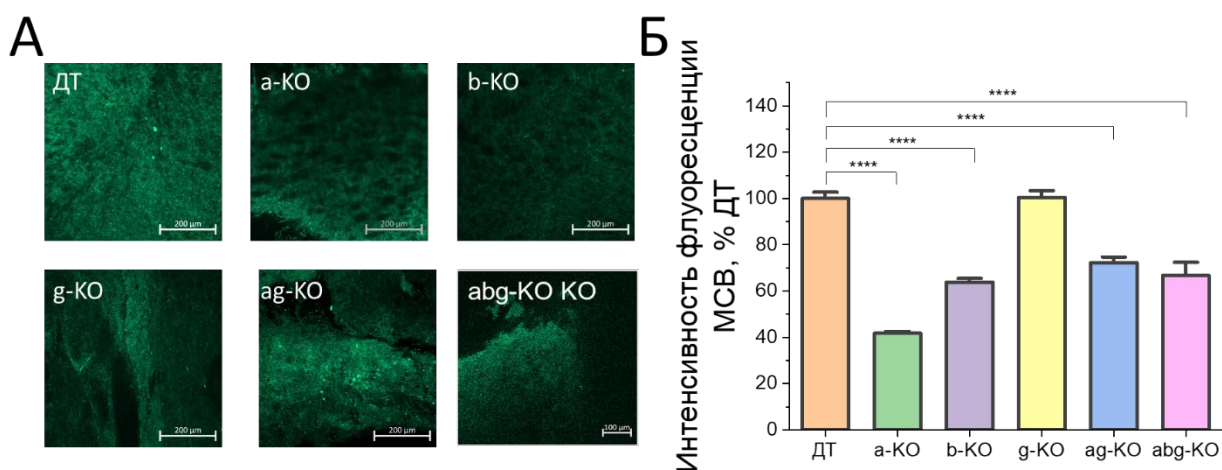


Рисунок 22 – Влияние синуклеинов на уровень восстановленного глутатиона. Примеры изображений флуоресценции MCV (А) в срезах головного мозга животных контрольной и экспериментальных групп. Б – интенсивность флуоресценции MCV в срезах головного мозга, нормированная на уровень флуоресценции в группе ДТ. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка **** $p = 0,0001$

Для определения возможного влияния на источники АФК в клетках головного мозга мы использовали предобработку срезов ингибиторами НАДФН-оксидазы (DPI 0,5 мкМ) и MAO (селегилин (20 мкМ)). Данная концентрация селегилина была выбрана в связи с тем, что именно в такой концентрации он блокирует MAO-A и MAO-B. Результаты статистической обработки показаны на рисунке 23.

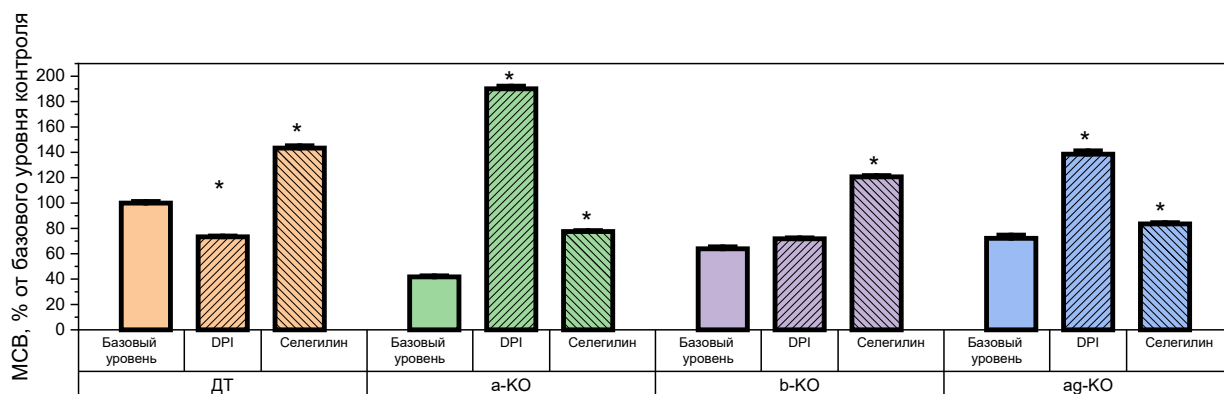


Рисунок 23 – Влияние синуклеинов в присутствии ингибитора MAO на уровень GSH различно. Представлена интенсивность флуоресценции MCB в срезах головного мозга нормированная на уровень флуоресценции в группе ДТ. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка * $p = 0,001$

Было обнаружено, что обработка ингибитором НАДФН-оксидазы имела достаточно небольшой эффект на ткани животных ДТ и лишенных β -синуклеина. Но при этом ингибирование НАДФН-оксидазы приводило к значительному повышению уровню GSH в срезах групп нокаута по α -синуклеину (a-KO) и нокаута по α - и γ -синуклеину (ag-KO). Важно, что предобработка селегилином повышала уровень глутатиона как в срезах ДТ, так и в срезах группы b-KO. Что предполагает влияние β -синуклеина на продукцию АФК в MAO, а α -синуклеина в НАДФН-оксидазе.

Подводя итоги, можно сказать о том, что в случае нокаута α -, или β -синуклеинов или тройного нокаута снижение скорости продукции АФК положительно коррелирует с изменением содержания восстановленной формы глутатиона. Большую роль синуклеины играют в работе НАДФН-оксидазы, MAO и регуляции митохондриальных АФК. Несмотря на то, что в рамках изучения БП более интересен α -синуклеин, результаты показали, что работа всех белков взаимосвязана. Особый интерес представляет β -синуклеин, который является гомологичным α -синуклеину, и при его отсутствии также определяется окислительный стресс, как в случае нокаута α -синуклеина.

3.4 Активация митохондриальными субстратами стимулирует продукцию АФК, энергетический метаболизм и увеличивает диаметр мышечного волокна крысы

Нарушения окислительно-восстановительной сигнализации и окислительный стресс, которые становятся более выраженными с возрастом, оказывают особенно негативное влияние на ткани, активно потребляющие энергию, такие как головной мозг и мышцы. Одним из наиболее заметных проявлений таких изменений является саркопения, которая характеризуется потерей мышечной массы и силы. Повреждение мышечных клеток, наряду с недостаточным процессом их восстановления, приводит к прогрессирующей утрате функциональности мышц, что значительно ухудшает качество жизни пациентов. Это также увеличивает риск развития различных заболеваний опорно-двигательного аппарата и метаболических расстройств, что подчеркивает важность понимания данных процессов в контексте старения. Использование митохондриальных субстратов является перспективным подходом для повышения качества жизни, особенно у людей, страдающих от возрастных изменений и нарушений окислительно-восстановительного баланса. В данном разделе было проведено изучение влияния субстратов I и II комплексов ЭТЦ и цикла Кребса на основные показатели биоэнергетики.

3.4.1 Митохондриальные субстраты изменяют $\Delta\Psi_m$ миофибрилл

Основной показатель функционального состояния МХ, $\Delta\Psi_m$, поддерживается преимущественно за счет работы ЭТЦ митохондрий [100]. Для оценки $\Delta\Psi_m$ в культуре миоцитов мы использовали TMRM в качестве флуоресцентного индикатора. Применение митохондриального разобщителя FCCP (2 мкМ) вызывало деполяризацию МХ, и разница между базальным уровнем TMRM и флуоресценцией после добавления протонофора принималась за меру $\Delta\Psi_m$ в разных клетках (рисунок 24). В качестве митохондриальных субстратов помимо глутамата, малата и сукцината были использованы соединения дихолина сукцината (ДС) и никотинамида (НАМ).

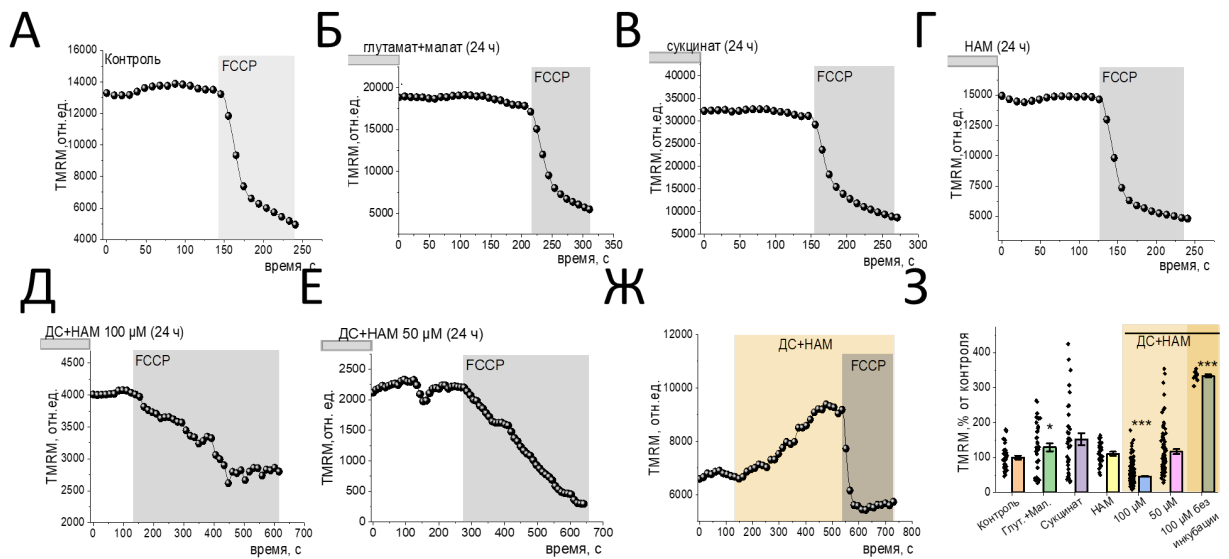


Рисунок 24 – Влияние митохондриальных субстратов и их комбинации на $\Delta\Psi_m$ миотрубочек. Инкубация клеточной культуры миотрубочек с 10 мМ/5 мМ глутамат+малат (Б), 10 мМ сукцинатом (В), 10 мМ НАМ (Г) изменяет $\Delta\Psi_m$ (З). Комбинация митохондриальных субстратов 100 мкМ ДС+НАМ (Д) снижает митохондриальный потенциал, но меньшая доза 50 мкМ (Е) увеличивает потенциал по сравнению с контролем (З). Добавление 100 мкМ ДС+НАМ приводит к немедленному значительному увеличению $\Delta\Psi_m$ (З). Для калибровки сигнала добавлено 2 мкМ FCCP, и данные в З представляют собой разницу во флуоресценции TMRM в миотрубочках до и после применения FCCP. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$.

Влияние митохондриальных субстратов изучали после 24-часовой инкубации. В скелетных миотрубочках 24-часовая инкубация с 5 мМ глутамата (Глут.) + 5 мМ малата (Мал.), 5 мМ сукцината или никотинамида только глутамат+малат значительно повышала $\Delta\Psi_m$ ($129,5 \pm 11,4$ % от контроля; $p < 0,05$ рисунок 24 А-Г). Комбинация митохондриальных субстратов ранее показала свою эффективность в нейронах – ДС+НАМ в концентрациях 100 мкМ и 50 мкМ снижали $\Delta\Psi_m$ после 24- часовой инкубации (рисунок 24 Д, Е, З) ($46,4 \pm 1,5$ % от контроля; $p < 0,0001$). Однако применение 100 мкМ ДС+НАМ без предварительной инкубации вызвало значительное увеличение $\Delta\Psi_m$ миотрубочек ($333,8 \pm 4,4$ % от контроля; $p < 0,0001$) (рисунок 24 Ж, З).

3.4.2 Соединение на основе дихолина сукцината и никотинамида увеличивает обеспечение ЭТЦ субстратами

Одним из способов оценки митохондриального метаболизма в живых клетках и тканях является измерение митохондриального окислительно-восстановительного индекса [102,393]. Это можно сделать с помощью измерения автофлуоресценции НАДН или ФАД (рисунок 25).

Такая комбинация позволяет оценить две редокс-характеристики: относительное содержание (пул) НАДН в МХ и редокс-индекс (баланс между производством и потреблением НАДН в МХ интактных клеток (рисунок 25 Е, Ж)). Добавление ДС+НАМ к клеточной культуре в двух концентрациях (100 мкМ и 50 мкМ) приводило к увеличению редокс-индекса ($63,5 \pm 6,2\%$; $72,4 \pm 3,6\%$, $p < 0,05$) и митохондриального пула НАДН по сравнению с контролем ($150,2 \pm 7,0\%$ от контроля, $p < 0,05$; $241,4 \pm 7,7\%$ от контроля, $p < 0,0001$) (рисунок 25 А, Б).

Эксперименты с митохондриальными субстратами – холином, сукцинатом и НАМ – показали снижение пула НАДН ($71,7 \pm 7,6\%$, $p < 0,05$; $74,9 \pm 8,2\%$, $p < 0,05$; $84,0 \pm 6,7\%$) и редокс-индекса ($59,8 \pm 2,6\%$; $49,7 \pm 6,4\%$; $59,1 \pm 4,4\%$) по сравнению с условиями использования комплекса веществ (рисунок 25 В, Г, Д). Совместное применение ДС и НАМ показало существенное большую эффективность, чем отдельное применение субстратов (рисунок 25 Е, Ж).

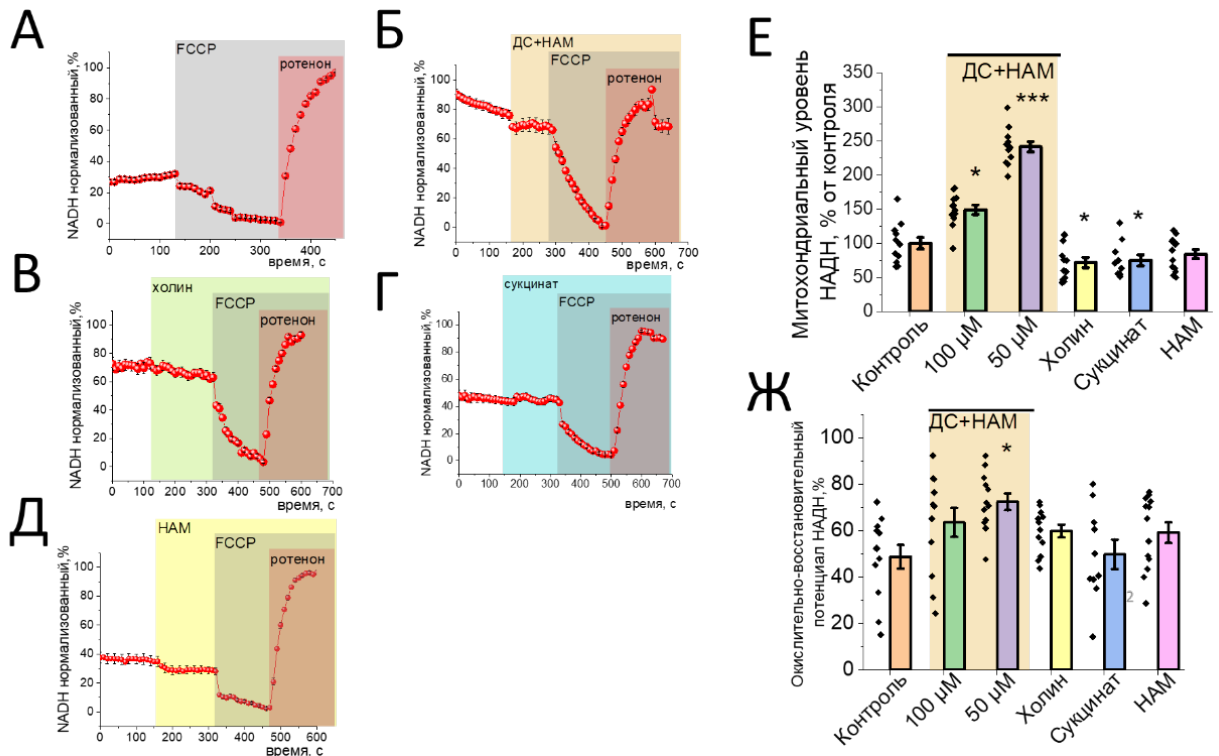


Рисунок 25 – ДС+НАМ повышает уровень митохондриального НАДН в скелетных миотрубочках. А-Д – Репрезентативные кривые автофлуоресценции НАДН после применения 1 мкМ FCCP и 5 мкМ ротенона в: (А) контроле; (Б) применении 50 мкМ ДС+НАМ; (В) добавлении 50 мкМ холина, (Г) добавлении 50 мкМ сукцината, и (Д) 50 мкМ НАМ. Изменения митохондриального пула НАДН (Е) или редокс-индекса НАДН (Ж) в клетках после введения различных субстратов. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$.

Таким образом, сочетание митохондриальных субстратов в виде ДС+НАМ в двух различных концентрациях вызывало увеличение уровня НАДН и окислительно-восстановительного потенциала НАДН, в отличие от экспериментов, в которых применялся только один митохондриальный субстрат. Полученные данные могут свидетельствовать об активации энергетического метаболизма в миотрубочках при добавлении ДС+НАМ.

ФАДН₂ входит в состав флавопротеинов, играющих важную роль донора электронов и субстрата митохондриального комплекса II. Таким образом, уровень ФАДН также свидетельствует о функциональности МХ (рисунок 26 А).

ФАД⁺⁺ обладает способностью к флуоресценции, которую мы использовали для оценки митохондриального пула ФАД и редокс-индекса. 2 мкМ FCCP и 2 мМ KCN использовали для максимальной активации потребления ФАДН и его блокировки так же, как и при исследовании автофлуоресценции НАДН, за исключением того, что ответы зеркально отражали эффекты НАДН, поскольку ФАД автофлуоресцирует, а ФАДН₂ – нет (рисунок 26 А).

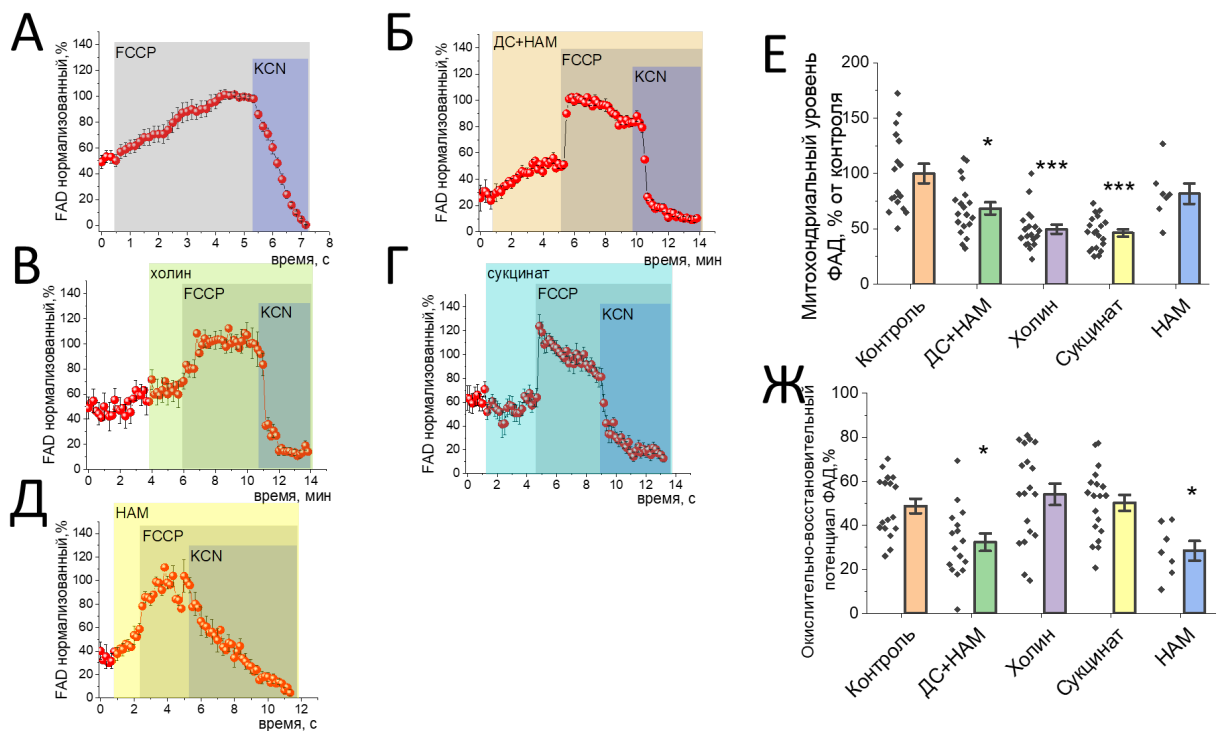


Рисунок 26 – Влияние митохондриальных субстратов на уровень ФАД и окислительно-восстановительный индекс в скелетных миотрубочках. (А-Д) - Репрезентативные кривые автофлуоресценции ФАД после применения 2 мкМ FCCP и 2 мМ KCN: (А) контроль; (Б) эффект применение 50 мкМ DC+НАМ; (В) 50 мкМ холина; (Г) 50 мкМ сукцината; (Д) 50 мкМ НАМ. Изменения пула ФАД (Е) или окислительно-восстановительного индекса ФАД (Ж) в миотрубочках. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$.

Полученные данные позволили оценить биоэнергетическое состояние клеток по содержанию кофермента ФАД в миотрубочках. При добавлении DC+НАМ наблюдалось снижение уровня ФАД ($68,5 \pm 5,5 \%$, $p < 0,05$) и

окислительно-восстановительного индекса ($32,3 \pm 4,0 \%$, $p < 0,05$) по сравнению с контрольным экспериментом (рисунок 26 А-Б).

Добавление митохондриальных субстратов холина и сукцината показало статистически значимое снижение пула ($49,7 \pm 4,2\%$, $p < 0,0001$; $46,3 \pm 3,2\%$, $p < 0,0001$), но при этом редокс-индекс ($54,1 \pm 4,9\%$; $50,3 \pm 3,6\%$) не меняется при добавлении субстратов (рисунок 26 В-Г). Однако НАМ, являющийся предшественником кофермента комплекса I, приводит к статистически значимому снижению редокс-индекса ($28,4 \pm 4,5\%$, $p < 0,05$), тогда как уровень ФАД ($81,8 \pm 9,2\%$) остается на уровне, сопоставимом с контролем (рисунок 26 Д).

Таким образом, комбинация митохондриальных субстратов в виде ДС+НАМ снижает уровень и окислительно-восстановительный индекс ФАД (рисунок 26 Е, Ж).

3.4.3 Комбинация митохондриальных субстратов увеличивает время до истощения АТФ

Энергетическая емкость клетки определялась нами как время между прекращением производства АТФ и моментом энергетического коллапса из-за полного истощения АТФ (рисунок 27 А) и неспособности поддерживать гомеостаз кальция [49,387]. Для оценки относительного базового уровня АТФ первичной культуры миоцитов использовали визуализацию живых клеток с помощью флуоресцентного зонда MagFura-2 AM. АТФ находится в клетках в виде магниевой соли. При гидролизе АТФ из комплекса Mg^{2+} - АТФ высвобождается Mg^{2+} , поэтому измерение изменений в клеточном свободном магнии с помощью Mg^{2+} чувствительного флуоресцентного зонда MagFura-2 может быть использовано в качестве косвенного репортера скорости потребления АТФ [387]. Применение ингибиторов гликолиза и/или окислительного фосфорилирования блокирует производство АТФ в клетках, что приводит к утилизации имеющегося в клетке АТФ и последующему высвобождению Mg^{2+} . Помимо связывания с Mg^{2+} , зонд MagFura-2 также

является низкоаффинным индикатором Ca^{2+} , что позволяет обнаружить момент резкого подъема цитозольного кальция в момент лизиса клетки и определения времени энергетического коллапса, вызванного полным истощением АТФ в клетке и неспособностью клетки поддерживать гомеостаз Ca^{2+} . Это позволяет оценить энергетическую емкость клетки.

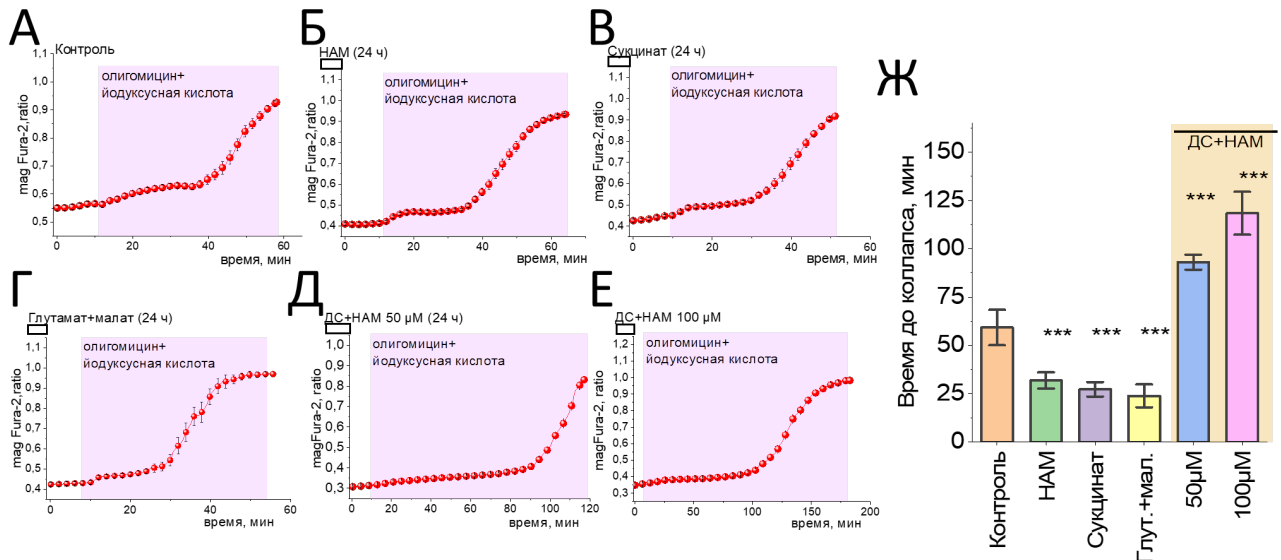


Рисунок 27 – Инкубация митотрубочек с субстратами митохондриального метаболизма изменяет энергетическую емкость клеток. Репрезентативные кривые изменения соотношения magFura-2 в первичных клетках митотрубочек после применения 2 мкг/мл олигомицина + 20 мкМ йодоуксусной кислоты в контрольных клетках (А) и клетках после 24 часов инкубации с 10 мМ НАМ (Б), 10 мМ сукцината (В), 10 мМ/5 мМ глутамат+малат (Г), 50 мкМ ДС+НАМ (Д) и 100 мкМ ДС+НАМ (Е). (Ж) Время от введения олигомицина и йодоуксусной кислоты до коллапса митотрубочек. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$.

В наших экспериментах 24-часовая инкубация митотрубочек с митохондриальными субстратами: НАМ, сукцинатом, глутаматом и малатом (рисунок 27 Б-Г) неожиданно снизила энергетическую емкость митотрубочек ($31,9 \pm 0,8$ мин, $27,2 \pm 0,8$ мин, $23,9 \pm 1,2$ мин, $p < 0,0001$ для всех экспериментов) по сравнению с контролем (рисунок 27 А) ($59,2 \pm 1,8$ мин, $p < 0,0001$). Однако 24-часовая инкубация митотрубочек с комплексом митохондриальных субстратов ДС+НАМ в двух концентрациях (50 мкМ и 100 мкМ) увеличивала время коллапса клеток ($93,1 \pm 0,8$ мин, $118,5 \pm 2,2$ мин,

$p < 0,0001$ для экспериментов) (рисунок 27 Д-Ж), что убедительно свидетельствует о повышении энергетической емкости этих клеток по сравнению с необработанными клетками. Таким образом, введение в клетки комбинации ДС+НАМ для энергетического метаболизма повышало уровень АТФ и увеличивало энергетическую емкость миотрубочек.

3.4.4 Комбинация митохондриальных субстратов увеличивает продукцию АФК митохондриями

Генерация АФК в МХ зависит от потенциала митохондриальной мембраны и метаболического состояния клеток [48]. Учитывая глубокое влияние митохондриальных субстратов на $\Delta\Psi_m$ митохондрий в миотрубочках, мы предположили, что они могут оказывать влияние и на продукцию АФК в МХ. В контрольных миоцитах применение ингибитора митохондриального комплекса I ротенона (5 мкМ) вызывало увеличение скорости продукции митохондриальной АФК (рисунок 28 А, Г). Добавление ДС+НАМ к клеткам миотрубочек в ходе эксперимента привело к увеличению скорости продукции АФК в МХ миотрубочек при концентрации 100 мкМ ($163,0 \pm 36,5$ % от базального уровня; $p < 0,05$; рисунок 28 Б, Г) и еще большему увеличению продукции АФК при концентрации 50 мкМ ДС+НАМ ($263,5 \pm 49,1$ % от базального уровня; $p < 0,05$; рисунок 28 В, Г). Последующее применение ротенона к этим клеткам вызвало дальнейшее увеличение скорости продукции АФК при 100 мкМ ДС+НАМ ($381,9 \pm 154,5$ % от базального уровня по сравнению с контролем $148,7 \pm 14,2$ %; $p < 0,05$) и в меньшей степени при 50 мкМ ДС+НАМ ($175,0 \pm 42,7$ % от базального уровня) (рисунок 28 А-Г).

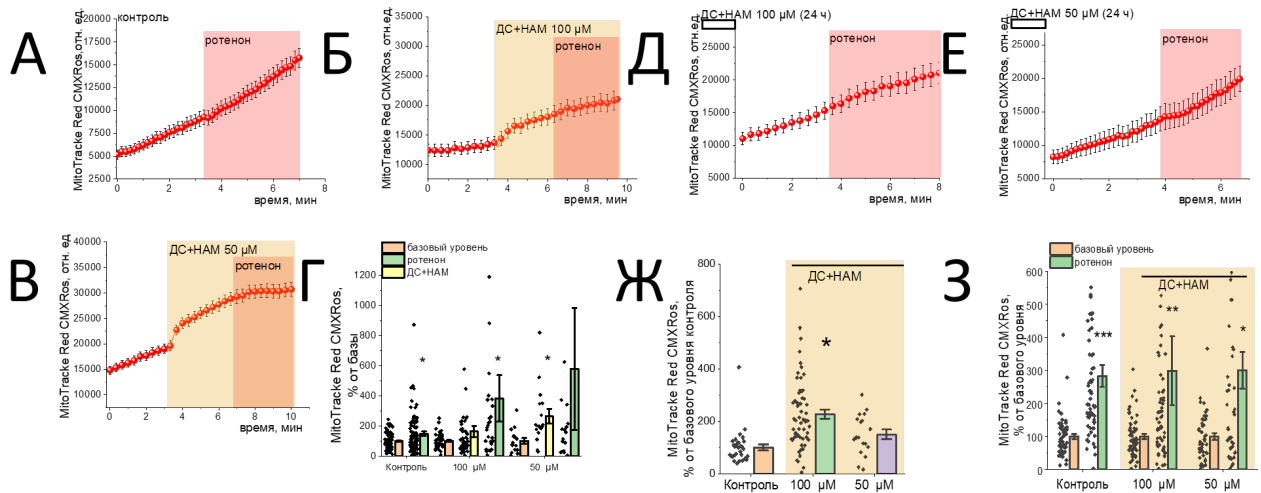


Рисунок 28 – ДС+НАМ увеличивает продукцию митохондриальной АФК в скелетных мышечных трубочках. Репрезентативные кривые экспериментов со средним сигналом флуоресценции MitoTracker Red CMXRos, в контрольных клетках (А) и клетках после добавления ДС+НАМ в двух концентрациях 100 мкМ (Б) и 50 мкМ (В). Ротенон (5 мкМ), добавленный в конце эксперимента, увеличивает продукцию митохондриальных АФК в экспериментах с добавлением ДС+НАМ и в контрольном эксперименте (Г). Длительная 24-часовая инкубация с ДС+НАМ (100 мкМ и 50 мкМ) (Д, Е) также увеличивает скорость продукции митохондриальных АФК и индуцированной ротеноном продукции АФК (Ж, З). Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$.

24-часовая инкубация миотрубочек с ДС+НАМ также приводит к увеличению скорости продукции АФК в МХ в концентрации 100 мкМ ($227,5 \pm 17,6\%$ от контроля без обработки; $p < 0,05$) или 50 мкМ ($150,1 \pm 18,4\%$ от контроля) (рисунок 28 Д, Е, Ж). Длительная инкубация клеток с ДС+НАМ также усиливала ротенон-индуцированную продукцию АФК в МХ при концентрациях 100 мкМ ($299,0 \pm 104,9\%$ от контроля; $p < 0,001$) и 50 мкМ ($300,3 \pm 55,9\%$ от контроля; $p < 0,05$) (рисунок 28 Д, Е, Ж, З).

3.4.5 Влияние митохондриальных субстратов на скорость продукции цитозольных АФК

Митохондрии могут производить АФК не только в матриксе этой органеллы, но и за ее пределами. Кроме того, митохондриальные субстраты

могут влиять на АФК-продуцирующие ферменты в цитозоле. Для оценки скорости продукции цитозольных АФК использовали флуоресцентный индикатор дигидроэтидиум (HEt). Для определения возможности активации выработки АФК добавляли комплекс ДС+НАМ в концентрациях 50 мкМ и 100 мкМ после регистрации базового уровня флуоресценции HEt (рисунок 29 А, Б). Степень активации продукции АФК рассчитывали в процентах от базового уровня флуоресценции (рисунок 29 В). Применение ДС+НАМ в обоих случаях приводит к снижению уровня флуоресценции HEt. Причем статистически значимое снижение скорости продукции АФК наблюдается при концентрации 100 мкМ ($47,7 \pm 4,8$ % от базального уровня, $p < 0,0001$).

Однако 24-часовая инкубация миотрубочек с ДС+НАМ привела к противоположному эффекту (рисунок 29 Г, Д, Е). Скорость продукции АФК увеличивалась при использовании ДС+НАМ в концентрации 50 мкМ ($144,5 \pm 4,5$ % от контроля, $p < 0,0001$) и 100 мкМ ($145,3 \pm 5,2$ % от контроля, $p < 0,0001$) по сравнению с контрольными клетками (рисунок 29 Ж).

3.4.6 24-часовая инкубация мышечных клеток с комбинацией субстратов приводит к снижению уровня восстановленного глутатиона

Глутатион – один из важнейших компонентов клеточной антиоксидантной системы. Содержание восстановленной формы глутатиона в миотрубочках определяли с помощью монохлорбимана (MCB), который приобретает способность к флуоресценции при взаимодействии с GSH (рисунок 29 З, И, К). Клетки инкубировали с ДС+НАМ в течение 24 часов, затем измеряли уровень GSH. Инкубация миотрубочек с ДС+НАМ в течение 24 часов снижала уровень восстановленного глутатиона: как при концентрации 50 мкМ ($94,5 \pm 3,2$ % от контроля, $p < 0,001$), так и при концентрации 100 мкМ ($80,6 \pm 2,6$ % от контроля, $p < 0,0001$) (рисунок 29 Л). Таким образом, инкубация скелетных миотрубочек с энергетическими субстратами индуцирует продукцию АФК в МХ и цитозоле, но с минимальным влиянием на эндогенный антиоксидант GSH.

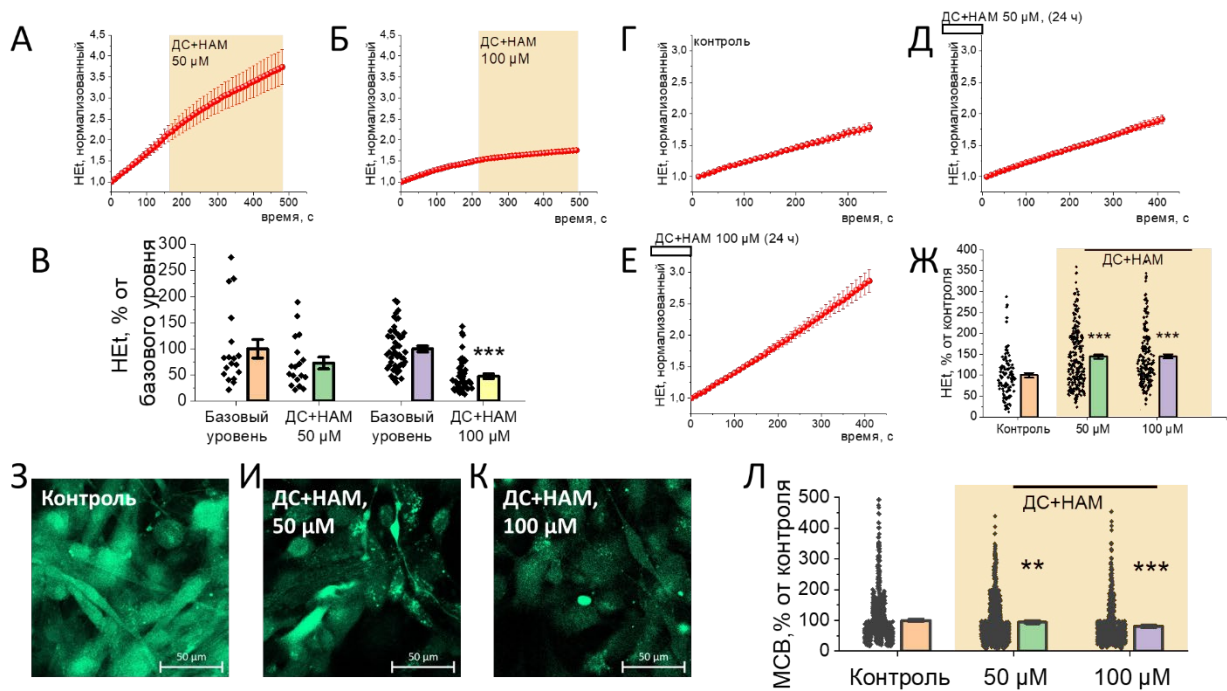


Рисунок 29 – Влияние ДС+НАМ на окислительно-восстановительный баланс скелетных миотрубочек. А, Б - Репрезентативные кривые увеличения интенсивности флуоресценции HEt до и после добавления ДС+НАМ (50 мкМ и 100 мкМ). Количественная оценка изменений в скорости окисления HEt (В) (данные приведены в процентах от базового уровня скорости увеличения флуоресценции HEt до добавления ДС+НАМ). Г, Д, Е- Репрезентативные кривые увеличения интенсивности флуоресценции HEt в контрольных клетках и после 24-часовой инкубации с 50 мкМ и 100 мкМ ДС+НАМ Ж - Количественная оценка изменений в скорости окисления HEt после 24-часовой инкубации с различными концентрациями ДС+НАМ (данные приведены в процентах от контроля). З, И, К - Репрезентативные конфокальные изображения миотрубочек, нагруженных МСВ. Масштабная линейка 50 мкм. Л - Количественная оценка интенсивности флуоресценции GSH-МСВ в миотрубочках. Инкубация с ДС+НАМ в течение 24 часов снижает уровень глутатиона. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$.

3.4.7 Комбинация субстратов увеличивает диаметр мышечных волокон

Систематическая интенсивная работа мышц способствует увеличению массы мышечной ткани. Это явление называется мышечной гипертрофией. В основе гипертрофии лежит увеличение массы цитоплазмы мышечных волокон, что приводит к увеличению диаметра каждого волокна.

Одновременно с этим в мышцах активизируется синтез нуклеиновых кислот и белков, увеличивается содержание веществ, доставляющих энергию, используемую при сокращении мышц – аденозинтрифосфата и креатинфосфата, а также гликогена. В результате увеличивается сила и скорость сокращения гипертрофированной мышцы. Для оценки возможности митохондриальных субстратов снижать степень мышечной атрофии использовалась возрастная модель саркопении [394].

Животные получали ДС+НАМ через питьевую воду *ad libitum* в концентрации 100 мкМ в течение 7 дней. Для анализа диаметра мышечных волокон переживающие срезы поперечнополосатых мышц задних лап инкубировали в физиологическом растворе в присутствии флуоресцентного зонда Fluo-4 AM в течение 30 минут (рисунок 30).

Мы наблюдали, что у животных в возрастной группе (рисунок 30 В) диаметр мышечных волокон уменьшился по сравнению с молодой группой (рисунок 30 А). С возрастом мышечная масса уменьшается, что приводит к саркопении (рисунок 30 Д). В среднем диаметр мышечных волокон у 1-летних (молодая группа) крыс составил $90,2 \pm 0,5$ мкм, что выше, чем в группе пожилых (1,5- летних, старая группа) животных $87,2 \pm 0,5$ мкм ($p < 0,05$).

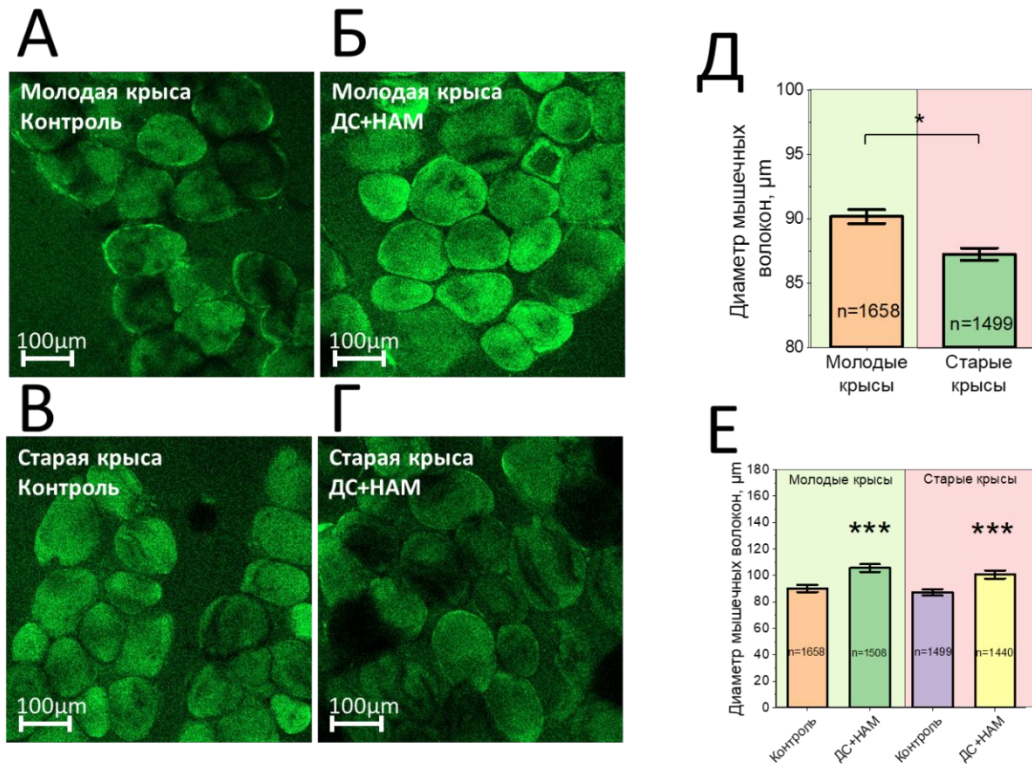


Рисунок 30 – Комбинация ДС+НАМ увеличивает диаметр мышечных волокон у пожилых и молодых животных. Диаметр мышечных волокон из тканей полосатых мышц анализировали методом конфокальной микроскопии с использованием флуоресцентного датчика Fluo-4 (5 мкМ) и 0,005 % плюроновой кислоты. Пример конфокального изображения среза ткани из группы молодых животных, интактных (А) и обработанных ДС+НАМ в течение 7 дней (Б). Пример конфокального изображения среза ткани из группы старых животных, интактных (В) и получавших ДС+НАМ в течение 7 дней (Г). Масштабная линейка 100 мкм. Д - Статистически значимая разница между диаметром мышечных волокон в двух группах. Е - Изменение диаметра мышечных волокон при лечении ДС+НАМ в питьевой воде *ad libitum* в концентрации 100 мкМ в течение 7 дней. Диаметр мышечных волокон статистически значимо увеличился в группах старых и молодых животных. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка. Непарный (Манна-Уитни) *t*-тест, * $p < 0,05$

В группах, получавших смесь субстратов, наблюдалось увеличение диаметра мышечных волокон по сравнению с контрольной группой до $105,6 \pm 0,6$ мкм и $100,7 \pm 0,6$ мкм для молодых (рисунок 30 Б) и пожилых групп (рисунок 30 Г), соответственно ($p < 0,0001$ для всех экспериментов) что показано на рисунке 30 Е.

ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Активация продукции АФК является важным аспектом клеточного метаболизма и играет ключевую роль в патогенезе различных заболеваний. АФК в большинстве представлены в качестве побочных продуктов метаболических процессов, особенно в результате работы МХ [50]. Будучи как потенциальными патогенами, так и необходимыми сигнальными молекулами, АФК способны влиять на клеточные функции в зависимости от концентрации и условий воздействия [72]. Окислительный стресс, вызванный избыточной продукцией АФК, приводит к повреждению клеток, в особенности нейронов, и нарушению их функций. Кроме того, АФК имеют прямое отношение к метаболическому синдрому, где их высокий уровень связан с инсулинорезистентностью и воспалением [395,396]. АФК могут как способствовать канцерогенезу, вызывая мутации ДНК, так и инициировать апоптоз опухолевых клеток, проявляя свою двусмысленную природу [397]. Понимание механизма их действия может помочь в разработке новых подходов к лечению заболеваний, связанных с окислительным стрессом и метаболическими нарушениями.

Обсуждение возможной регуляции НАДФН-оксидазы в клетках мозга путем активации RAGE ведется уже давно, учитывая увеличение продукции АФК в ответ на повреждающие и патоген-ассоциированные молекулы [116,350]. Однако большинство повреждающих и патогенных молекул, способных активировать RAGE, способны индуцировать АФК в НАДФН-оксидазе через различные механизмы, исключая RAGE, но в то же время ингибиторы этого фермента оказывают протекторное действие в случае RAGE-патологий [388,398]. В настоящем исследовании мы использовали короткие пептиды из V-домена RAGE, которые не способны вызывать гибель клеток в первичных культурах нейронов и астроцитов (рисунок 14-15). В то же время эти пептиды стимулируют RAGE-индуцированную продукцию АФК в НАДФН-оксидазе. Эти результаты подтверждают, что фермент НАДФН-

оксидаза в клетках мозга может быть активирован RAGE и что продукция АФК этим ферментом играет роль в окислительно-восстановительной сигнализации, а не в индукции патологии и гибели клеток. Было показано ранее, что пептид 60-76 (P1) может вызывать RAGE-зависимую активацию высвобождения глутамата из астроцитов, которая индуцирует кальциевый сигнал в нейронах [364]. Однако RAGE-индуцированная активация АФК не зависела от антагонистов глутамата (рисунок 11), хотя нельзя исключить возможный эффект генерации АФК на высвобождение глутамата в астроцитах. Известно, что А β вызывает массивную продукцию АФК в НАДФН-оксидазе, и этот эффект может быть вызван даже при наномолярной концентрации олигомеров [388,398,399]. Эффекты пептид-RAGE-индуцированной активации НАДФН-оксидазы значительно меньше по сравнению с эффектами А β (рисунок 15). Также было показано, что фрагменты V-домена RAGE защищают нейроны от А β -индуцированного апоптоза и некроза (рисунок 16). Эти защитные эффекты могут быть вызваны связыванием пептида с А β и/или прямым связыванием пептида с RAGE. Активация НАДФН-оксидазы через RAGE в наших экспериментах приводила к снижению уровня GSH и активации ПОЛ, что может быть принято за окислительный стресс. Однако эта активация приводила к базовому снижению гибели клеток и защите от гибели клеток А β . Окислительно-восстановительный баланс в мозге значительно различается между нейронами и астроцитами, что предполагает разные механизмы для запуска окислительного стресса. Перекисное окисление липидов необходимо для активации фосфолипазозависимой кальциевой сигнализации, а RAGE-индуцированная активация НАДФН-оксидазы и ПОЛ (рисунок 13) может быть частью физиологического сигнального каскада, включая влияние на запасы кальция [364,388]. Защитный эффект короткого пептида проявляется через связывание с возможным агонистом RAGE (включая А β) и активацию RAGE после активации сигнального каскада и НАДФН-оксидазы, что менее вероятно при применении полного экзогенного пептида RAGE.

Также было показано, что дефицит HPRT1 приводит к изменениям в митохондриальном метаболизме, что приводит к снижению нейронов и астроцитов. При этом изменяется не только величина $\Delta\Psi_m$, но и механизм поддержания потенциала за счет частичной компенсации дисфункции ЭТЦ обратным режимом комплекса V (рисунок 17). Следует отметить, что подобная компенсация $\Delta\Psi_m$ в нейронах показана при многих патологиях, включая нейродегенерацию и в нейронах с патологией комплекса I [390,392]. По нашим данным, дефицит HPRT1 приводит к ингибированию митохондриального комплекса I, что было подтверждено в экспериментах с изолированными МХ мозга (с более выраженным эффектом в АДФ-зависимом дыхании), снижению потребления митохондриального НАДН (основного субстрата и донора электронов для комплекса I). Интересно, что скорость производства НАДН была выше в клетках с дефицитом HPRT1, что позволяет предположить, что ингибирование комплекса I в этих клетках не вызвано недостатком субстратов и что метаболизм глюкозы в нейронах и астроцитах не нарушен и может быть даже выше за счет более высокой гликолитической активности для производства АТФ. Сходство эффектов на МХ в срезах мозга взрослых мышей, в первичных нейронах и астроцитах, полученных от молодых мышей, и в изолированных МХ взрослых животных позволяет предположить, что ингибирование комплекса I индуцируется эндогенными процессами в нейронах и астроцитах (включая изменение биосинтеза пурина или генерации NO), но не индуцируется метаболитами (включая мочевую кислоту), которые производятся в других тканях, кроме мозга.

Скорость энергетического метаболизма и окислительно-восстановительного баланса в разных областях мозга неодинакова [389]. Однако мы обнаружили более выраженное влияние дефицита HPRT1 на МХ клеток среднего мозга по сравнению с нейронами коры и астроцитами, что согласуется с патологией HPRT1, связанной со средним мозгом, и гораздо меньшим эффектом в других областях мозга [229,400]. Учитывая это, можно предположить, что влияние HPRT1 на комплекс I-зависимое

митохондриальное дыхание может проявляться в МХ, селективно выделенных из области среднего мозга, но не из всего мозга, который мы имели.

Гиперпродукция митохондриальных АФК в HPRT1-дефицитных клетках типична для клеток с ингибированием комплекса I [12,48] и осуществляется в ЭТЦ несколькими потенциальными механизмами, включая обратный поток электронов. Цитозольная продукция АФК в HPRT1-дефицитных кортикальных нейронах и астроцитах (рисунок 20) может быть потенциально связана с повышенным уровнем ксантина, который приводит к продукции супероксид аниона в КО, аналогично тому, как он образуется в нейронах при ишемии [87]. Несмотря на относительно высокую продукцию АФК в МХ и цитозоле HPRT1-дефицитных клеток, она не вызывала снижения уровня GSH и дальнейшего окислительного стресса. Одним из возможных объяснений этого эффекта может быть способность мочевой кислоты утилизировать пероксинитрит и, возможно, супероксид анион, что в некоторых исследованиях приводило к нейропротекции от гипоксии [87]. Он также может быть вызван повышением уровня НАДФН, что было показано при дефиците HPRT1, который может привести к увеличению синтеза GSH [21]. Таким образом, нарушение энергетического метаболизма нейронов и астроцитов среднего мозга, вызванное дефицитом HPRT1, потенциально может привести к энергетическому голоданию в условиях потребления АТФ (например, при чрезмерном воздействии глутамата или ишемии [401]) и стать основным пусковым механизмом развития патологии.

Семейство синуклеинов стало объектом особого интереса среди нейробиологов с тех пор, как была выявлена мутантная форма α -синуклеина в нескольких семьях, страдающих от аутосомно-доминантной формы БП [402]. В ходе дальнейших исследований было установлено, что α -синуклеин играет ключевую роль в формировании характерных для БП гистопатологических включений, известных как тельца Леви, которые наблюдаются как в наследственных, так и в спорадических случаях заболевания. Кроме того, в других нейродегенеративных расстройствах агрегированные формы белка α -

синуклеина также были идентифицированы в качестве основных компонентов патологических структур, что подчеркивает его значимость в этих состояниях [275,403,404]. Но до сих пор не до конца известна функция α синуклеина, а также других белков семейства в регуляции окислительно-восстановительного баланса. Совокупность полученных данных об уровне GSH в тканях исследованных групп модельных животных позволяет говорить о весьма сложной регуляции окислительно-восстановительного баланса с участием синуклеинов и высокой взаимосвязи между их функциями, в результате чего связанные с мутациями отсутствие или дисфункция одного из синуклеинов может привести к компенсации со стороны другого или, наоборот, стать причиной патологических процессов, приводящих к нарушениям состояния клеток [405]. Как например в случае отсутствия только γ -синуклеина (рисунок 22), регуляция окислительно-восстановительного баланса не нарушается, что может говорить об отсутствии его вклада в работу, связанную с продукцией и утилизацией АФК. Однако в данные процессы вовлечены α - и β -синуклеины. При отсутствии хотя бы одного из них в организме происходит снижение уровня GSH. Это может свидетельствовать как об изменении продукции АФК, так и о нарушении работы антиоксидантной системы/ Эффект двойного нокаута α - и γ синуклеина, вероятно, связан с нарушениями обеспечения антиоксидантной системы клеток, что выражается в превалировании образования АФК над их нейтрализацией. Более детальное изучение механизмов, в которые вовлечены α -и β -синуклеин показывают влияние данных белков на работу основных источников продукции АФК – НАДФН-оксидазы и MAO (рисунок 23). Вовлеченность α -синуклеина в работу НАДФН-оксидазы, а β -синуклеина – MAO указывает на сложные процессы внутриклеточной регуляции, связанные с компенсацией изменения продукции АФК антиоксидантной системой.

Помимо клеток головного мозга, мышечная ткань также требует высокого уровня энергообеспечения. Отсутствие движения или естественное старение организма могут привести к потере мышечной массы и

возникновению саркопении. Данная патология определяется как прогрессирующее и генерализованное заболевание скелетных мышц, связанное с ускоренной потерей мышечной массы и функций, которое ассоциируется с увеличением неблагоприятных исходов, включая падения, функциональный упадок, хрупкость и смертность [249]. В данной работе мы показываем, что всего за семь дней поддерживающего питания животных с ДС+НАМ увеличивается диаметр волокон как у крыс среднего возраста, так и у пожилых крыс, предотвращая возрастную саркопению. Следует отметить, что хотя ДС+НАМ увеличивает диаметр миотрубочек обоих возрастов, наиболее важным является вывод о том, что возрастная саркопения может быть вызвана недостатком энергии и может быть частично восстановлена с помощью энергетических субстратов.

Интересно, что комбинация субстратов энергетического метаболизма (ДС+НАМ) гораздо эффективнее по сравнению с использованием отдельных компонентов или других субстратов. Вероятно, это можно объяснить более низкой проницаемостью плазматических мембран для сукцината. Следует отметить, что влияние ДС+НАМ на большинство оцениваемых параметров зависит от концентрации. Более выраженный эффект 50 мкМ смеси субстратов был выявлен при остром применении (исключая измерения $\Delta\Psi_m$), в то время как после 24-часовой инкубации 100 мкМ ДС+НАМ оказывали более стимулирующее действие, особенно в случае времени до коллапса клеток при блокировании гликолиза и окислительного фосфорилирования (рисунок 27 Ж), указывающего на энергетическую емкость АТФ. Сравнение полученных данных с результатами аналогичных исследований с нейронами [406] показывает более высокую чувствительность миотрубочек к добавке ДС+НАМ, что связано с высокой метаболической пластичностью мышечных клеток [407]. Хотя в наших экспериментах усиление энергетического метаболизма приводило к увеличению продукции АФК в МХ и цитозоле миотрубочек, это может оказывать регулирующее влияние на энергетический метаболизм и активность миотрубочек [408].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, несмотря на невозможность установить на сегодняшний день конкретный этиологический фактор для каждого заболевания, наблюдается выраженное сходство в механизмах их прогрессии. Это позволяет рассматривать описанные патогенетические звенья – митохондриальную дисфункцию, окислительно-восстановительную сигнализацию – как возможные мишени для патогенетической терапии. Несмотря на то, что в настоящее время разрабатывается множество терапевтических стратегий при лечении различных НДЗ, причем некоторые из них также направлены на отдельные механизмы патогенеза, в настоящий момент не существует доказанных лекарственных препаратов, которые значимо замедляли бы развитие нейродегенерации, за единичными исключениями [409–411].

Среди ферментов, участвующих в окислительно-восстановительной сигнализации и способствующих образованию АФК, важную роль играют НАДФН-оксидаза, MAO и КО. НАДФН-оксидаза, которая присутствует в клеточных мембранах, генерирует супероксид анион в процессе метаболизма глюкозы и других субстратов, что увеличивает уровень окислительного стресса. MAO участвует в образовании АФК посредством катализирования окисления аминов, что сопровождается образованием пероксида водорода. КО, отвечающая за распад пуринов, также способствует образованию АФК, что особенно актуально при повышенных уровнях мочевой кислоты, связанной с различными метаболическими расстройствами. Эти ферменты могут усугублять клеточные повреждения, нарушая баланс окислительных и восстановительных процессов в нейронах.

Таким образом, взаимодействие между метаболизмом пуринов и образованием АФК представляет собой сложную сеть регуляторных путей, способствующих развитию НДЗ. Понимание этих взаимосвязей позволяет выявить новые молекулярные мишени для терапии и разработки стратегий профилактики, направленных на замедление или остановку прогрессирования

этих тяжелых заболеваний. Изучение роли ферментов, отвечающих за регуляцию окислительного стресса и нарушений в метаболизме пуринов, создаёт перспективы для создания эффективных лечебных подходов, способных улучшить качество жизни пациентов с нейродегенеративными расстройствами.

Одним из компонентов, сопутствующих возникновению окислительного стресса, является активация рецептора RAGE, который играет значительную роль в патогенезе ряда заболеваний, включая БА и БП. Конечные продукты гликирования и другие провоспалительные молекулы, взаимодействуя с RAGE, могут инициировать каскады воспалительных реакций и усиливать окислительный стресс. Эти процессы приводят к нарушению клеточной функции, апоптозу нейронов и прогрессированию нейродегенерации. Но, с другой стороны, рецептор связывается с несколькими лигандами, включая продукты окислительного стресса, такие как A β и S100-белки. Механизм действия RAGE заключается в активации внутриклеточных сигналов, что приводит к усилению воспалительных процессов в организме. Связывание RAGE с его лигандами инициирует активность ключевых сигнальных путей, таких как MAPK и NF- κ B, что способствует выработке про-воспалительных цитокинов, таких как IL-6 и TNF- α . Это, в свою очередь, может способствовать развитию хронического воспаления, характерного для НДЗ.

Изучение роли активации RAGE фрагментами предоставляет новые перспективы для разработки терапевтических подходов. Таким образом, понимание механизма действия RAGE и его взаимодействия с другими молекулами в контексте болезни БА и БП является актуальной областью исследований, которая может привести к новым методам лечения и профилактики этих серьезных заболеваний.

Метаболизм пуринов имеет ключевое значение для всех живых организмов. Пуриновые нуклеотиды в основном синтезируются через восстановление пуринов, где важную роль играет фермент HPRT1. Фермент HPRT1 играет важную роль в пуриновом обмене. Его дефицит приводит к

избыточной продукции мочевой кислоты, что негативно сказывается на МХ и окислительно-восстановительном балансе клеток и может привести к подагре, артриту и неврологическим нарушениям, включая умственную отсталость и спастический церебральный паралич. Полное отсутствие активности HPRT1 связано с СЛН. Дефицит HPRT1 вызывает изменения в митохондриальном метаболизме, приводящие к изменению $\Delta\Psi_m$ и ингибированию комплекса I митохондрий. Несмотря на повышенное производство НАДН, метаболизм глюкозы в нейронах и астроцитах, вероятно, не нарушен. Повышение АФК в HPRT1-дефицитных клетках возможно связано с увеличением уровня ксантина, но данные процессы не вызывают окислительного стресса. Потенциальной причиной может быть мочевая кислота, способствующая нейропротекции. Нарушение энергетического метаболизма вследствие данной патологии может привести к энергетическому голоданию и повышенной уязвимости клеток к негативным факторам.

В патогенезе БП ключевую роль играет потеря дофаминергических нейронов в черной субстанции. Несмотря на значительное внимание, уделенное этому вопросу, механизмы, лежащие в основе поражения этих нейронов, остаются недостаточно исследованными.

Многочисленные исследования установили, что нарушения структуры и метаболизма α -синуклеина ассоциированы как с наследственными, так и с идиопатическими формами болезни Паркинсона. Этот белок считается одним из основных факторов, способствующих нейродегенерации. Тем не менее степень вовлеченности других членов семейства синуклеинов, таких как β - и γ -синуклеины, в патологические механизмы заболевания остается значительно менее изученной. Несмотря на это, было доказано, что все три высокомолекулярных белка семейства способны к функциональному взаимозамещению, что может указывать на их возможную совместную роль в развитии болезни. β - и γ -синуклеины имеют схожую структуру и могут выполнять компенсаторные функции в клетках, однако их роли в патогенезе неврологических заболеваний еще не полностью выяснены. Исследования

показывают, что они могут участвовать в регуляции механизмов, связанных с транспортом нейротрансмиттеров, а также в поддержании синаптической функции и пластичности.

В ходе исследования было выявлено, что наличие или отсутствие различных синуклеинов существенно влияет на регуляцию окислительно-восстановительных процессов в клетках и тканях головного мозга. Отсутствие определенных синуклеинов коррелирует с изменениями в уровне АФК и нарушениями в дофаминергических путях, что может указывать на их роль в патогенезе НДЗ. В частности, зарегистрированные изменения в функции MAO и переработке моноаминов свидетельствуют о том, что синуклеины, в частности α - и β - могут оказывать влияние на уровень окислительного стресса и метаболизм нейромедиаторов. Данные результаты подчеркивают сложность взаимодействий между различными синуклеинами и их потенциальное значение для клеточной активности, а также необходимость дальнейших исследований для понимания механизмов, связанных с нейропатологиями.

Исследование продемонстрировало значительное влияние функционирования синуклеинов на регуляцию окислительно-восстановительных процессов и метаболизм нейромедиаторов в клетках и тканях мозга. Результаты указывают на сложные взаимодействия между синуклеинами, подчеркивая их важность для поддержания клеточной гомеостаза и функционирования нервной системы. Эти данные открывают новые перспективы для дальнейших исследований механизмов, связанных с патологиями нервной системы, и могут служить основой для разработки потенциальных терапевтических стратегий.

Также, в рамках данной работы показано, что митохондриальные субстраты способны увеличивать энергетический метаболизм в скелетных миотрубочках и происходит ли возникновение окислительного стресса. Мы обнаружили, что митохондриальные субстраты и комбинация ДС+НАМ повышают $\Delta\Psi_m$ и изменяют редокс-индексы НАДН и ФАД. Кроме того, это привело к увеличению энергетической емкости скелетных миотрубочек.

Важно отметить, что хотя митохондриальные субстраты увеличивали продукцию АФК в МХ и цитозоле миотрубочек, они не вызывали окислительного стресса и существенного снижения уровня GSH. Добавление комбинации ДС+НАМ к питьевой воде в течение 7 дней увеличивает диаметр миотрубочек у крыс среднего и пожилого возраста в качестве модели саркопении.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что активация RAGE в клетках мозга активирует НАДФН-оксидазу и продукцию АФК, играя важную роль в окислительно-восстановительной сигнализации. Короткие пептиды из V-домена RAGE способны стимулировать продукцию АФК, не вызывая гибели клеток, и проявляют защитные свойства против А β -токсичности. Активация НАДФН-оксидазы через RAGE может способствовать изменению окислительно-восстановительного баланса, приводя к снижению клеточной гибели, предполагая потенциальную физиологическую роль этой системы в нейропротекции.

2. Дефицит HPRT1 вызывает заметные изменения в митохондриальном метаболизме. Изменения затрагивают как величину $\Delta\Psi_m$, так и механизмы его поддержания, включая переход к частичной компенсации снижения активности ЭТЦ через использование АТФ, в основном образующегося в результате гликолиза. Также установлено, что перепроизводство АФК в HPRT1-дефицитных клетках происходит при ингибировании комплекса I, однако этот процесс не сопровождается снижением уровня GSH и окислительным стрессом, что может быть связано с защитными свойствами мочевой кислоты и повышением уровня НАДФН.

3. Впервые было показано, что генетическая инактивация генов, кодирующих α - и β -синуклеины, приводит к увеличению продукции АФК и уменьшению GSH в клетках и тканях среднего мозга. Ингибиторный анализ показал зависимость уровня GSH в клетках без α -синуклеина от НАДФН-оксидазы, а при отсутствии β -синуклеина – от моноаминоксидазы

4. Было показано, что применение как отдельных компонентов митохондриальных субстратов (глутамат, сукцинат, никотинамид), так и в комбинации (дихолина сукцината и никотинамида) улучшает энергетический метаболизм мышечных клеток. Увеличение $\Delta\Psi_m$, изменение редокс-индекса НАДН и ФАД приводит к повышению энергетической емкости скелетных

миоцитов. Помимо этого, сопутствующее увеличение продукции АФК в митохондриях и цитозоле не приводило к значительному снижению уровня GSH и, напротив, при длительном применении на группах животных приводило к увеличению диаметра мышечных волокон.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- AGE – Конечные продукты гликирования
- GSH – Восстановленный глутатион
- GSSG – Окисленный глутатион
- HBSS – Сбалансированный солевой раствор Хэнкса
- HEt – Флуоресцентный зонд дигидроэтидий
- HPRT1 – гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансфераза 1
- MCB – Флуоресцентный зонд monochlorobimane
- MPTP – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин
- NAC – Неамилоидный- β компонент
- NOX1-5 – НАДФН-оксидаза 1-5
- RAGE – Рецептор конечных продуктов гликирования
- A β – Бета-амилоид
- АТФ – Аденозинтрифосфат
- АФК – Активные формы кислорода
- БА – Болезнь Альцгеймера
- БП – Болезнь Паркинсона
- ДС – Дихолин сукцинат
- КО – Ксантинооксидаза
- МАО – Моноаминоксидаза
- $\Delta\Psi_m$ – Митохондриальный мембранный потенциал
- МХ – митохондрии
- НАМ – Никотинамид
- НДЗ – Нейродегенеративные заболевания
- ПОЛ – перекисное окисление липидов
- СЛН – синдром Леши-Нихена
- СОД – Супероксиддисмутаза
- ЭТЦ – Электрон-транспортная цепь, дыхательная цепь переноса электронов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Forman H.J., An overview of mechanisms of redox signaling / Forman H.J., Ursini F., Maiorino M. // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Academic Press. - 2014. - Vol. 73. - P. 2–9.
2. Forman H.J. Redox signaling: An evolution from free radicals to aging / Forman H.J. // *Free Radical Biology and Medicine*. Pergamon. - 2016. - Vol. 97. - P. 398–40.
3. Collins Y. Mitochondrial redox signalling at a glance / Collins Y., Chouchani E.T., James A.M. et al. // *Journal of Cell Science*. - 2012. - Vol. 125.
4. Allen J.F. Control of gene expression by redox potential and the requirement for chloroplast and mitochondrial genomes / Allen J.F. // *J Theor Biol*. - 1993. - Vol. 165. - № 4. - P. 609–631.
5. Pillay C.S. Quantitative measures for redox signaling / Pillay C.S., Eagling B.D., Driscoll S.R., Rohwer J.M. // *Free Radical Biology and Medicine*. - 2016. - Vol. 96. - P. 290-303
6. Mann V.M., Brain, skeletal muscle and platelet homogenate mitochondrial function in parkinson's disease / Mann V.M., Cooper J.M., Krige D., et al. // *Brain*. - 1992. - Vol. 115. - №2. - P. 333-342
7. Westerblad H. Skeletal muscle: Energy metabolism, fiber types, fatigue and adaptability / Westerblad H., Bruton J.D., Katz A. // *Exp Cell Res*. - 2010. - Vol. 316. - № 18. - P. 3093–3099.
8. Mukherjee S.P. Endogenous hydrogen peroxide and peroxidative metabolism in adipocytes in response to insulin and sulfhydryl reagents / Mukherjee S.P., Lane R.H., Lynn W.S. // *Biochem Pharmacol*. - 1978. - Vol. 27. - № 22. - P. 2589–2594
9. Czech M.P. Differential effects of sulfhydryl reagents on activation and deactivation of the fat cell hexose transport system // *Journal of Biological Chemistry*. 1976. Vol. 251, № 4. P. 1164–1170.
10. Murphy J.K. Stimulation of the rat alveolar macrophage respiratory burst by extracellular adenine nucleotides / Murphy J.K., Livingston, F. R., Gozal, E et al. // *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol*. - 1993. - Vol. 9. - № 5. - P. 505–510.

11. Abramov A.Y. Interaction of oxidative stress and misfolded proteins in the mechanism of neurodegeneration / Abramov A.Y., Potapova E.V., Dremine V.V., Dunaev A.V. // *Life*. - 2020. - Vol. 10. - № 7. - P. 1–14.
12. Abramov A.Y. Cellular mechanisms of complex I-associated pathology / Abramov A.Y., Angelova P.R. // *Biochem Soc Trans. Portland Press Ltd.* - 2019. - Vol. 47. - № 6. - P. 1963–1969.
13. Sayre L.M., Oxidative stress and neurotoxicity / Sayre L.M., Perry G., Smith M.A. // *Chem Res Toxicol.* - 2008. - Vol. 21. - № 1. - P. 172–188.
14. Gandhi S. Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration / Gandhi S., Abramov A.Y. // *Oxid Med Cell Longev.* - 2012. - Vol. 2012. - P. 1–11.
15. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants / Sies H. // *Experimental Physiology: Translation and Integration.* – 1997. – Vol. 82. – №. 2. – P. 291-295.
16. Forman H. J., Cadenas E. Oxidative stress and signal transduction. – Springer Science & Business Media, 2012.
17. Forman H. J., Role of superoxide radical in mitochondrial dehydrogenase reactions/ Forman H. J., Kennedy J. A. // *Biochemical and biophysical research communications.* – 1974. – Vol. 60. – №. 3. – P. 1044-1050.
18. Angelova P.R. Alpha-synuclein and beta-amyloid – different targets, same players: calcium, free radicals and mitochondria in the mechanism of neurodegeneration / Angelova P.R., Abramov A.Y. // *Biochem Biophys Res Commun.* - 2017. - Vol. 483. - № 4. - P. 1110–1115.
19. Stout J.T. HPRT: gene structure, expression, and mutation / Stout J.T., Caskey C.T. // *Annual review of genetics.* - 1985. - Vol. 19. - № 1. - P. 127–148.
20. Vinokurov A.Y. HPRT1 Deficiency Induces Alteration of Mitochondrial Energy Metabolism in the Brain / Vinokurov A.Y., Soldatov V.O., Seregina E.S., et al. // *Molecular Neurobiology.* - 2023. - Vol. 60. - № 6. - P. 3147–3157.
21. Micheli V. NAD metabolism in HPRT-deficient mice / Micheli V., Jacomelli G., Di Marcello F., et al. // *Metab Brain Dis.* - 2009. - Vol. 24. - № 2. - P. 311–319.
22. Meek S. Reduced levels of dopamine and altered metabolism in brains of HPRT knock-out rats: a new rodent model of Lesch-Nyhan Disease / Meek S., Thomson

- A.J., Sutherland L., et al.// *Sci Rep. Nature Publishing Group.* - 2016. - Vol. 6. - № 1. - P. 25592.
23. Anker S.D. Welcome to the ICD-10 code for sarcopenia / Anker S.D., Morley J.E., von Haehling S. // *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* - 2016. - Vol. 7. - № 5. - P. 512–514.
24. Ohta Y. Female dominant association of sarcopenia and physical frailty in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease / Ohta Y., Nomura E., Hatanaka N., Osakada Y., Matsumoto N., et al.// *Journal of Clinical Neuroscience.* - 2019. - Vol. 70. - P. 96–101.
25. Ogawa Y. Sarcopenia and Muscle Functions at Various Stages of Alzheimer Disease / Ogawa Y., Kaneko Y., Sato T., et al.// *Front Neurol.* - 2018. - Vol. 9. - P. 710
26. Kalinkovich A. Sarcopenia - The search for emerging biomarkers / Kalinkovich A., Livshits G. // *Ageing research reviews.* - 2015. - Vol. 22. - P. 58–71.
27. Damiano S. Dual Role of Reactive Oxygen Species in Muscle Function: Can Antioxidant Dietary Supplements Counteract Age-Related Sarcopenia? / Damiano S., Muscariello E., La Rosa G., et al.// *Int J Mol Sci.* - 2019. - Vol. 20. - № 15. - P. 3815.
28. Fulle S. The contribution of reactive oxygen species to sarcopenia and muscle ageing / Fulle S., Protasi F., Di Tano G., et al.// *Experimental gerontology.* - 2004. - Vol. 39. - № 1. - P. 17–24.
29. Cruz-Jentoft A.J. Sarcopenia / Cruz-Jentoft A.J., Sayer A.A. // *The Lancet.* - 2019. - Vol. 393. - № 10191. - P. 2636–2646.
30. Papadopoulou S.K. Sarcopenia: A contemporary health problem among older adult populations / Papadopoulou S.K. // *Nutrients.* - 2020. - Vol. 12. - P. 1293.
31. Shekh-Ahmad T. Reactive oxygen species in status epilepticus / Shekh-Ahmad T., Kovac S., Abramov A.Y., Walker M.C. // *Epilepsy and Behavior.* - 2019. - Vol. 101. - P.106410

32. Fukai T. Superoxide dismutases: Role in redox signaling, vascular function, and diseases / Fukai T., Ushio-Fukai M. // *Antioxid Redox Signal.* - 2011. - Vol. 15. - № 6. - P. 1583–1606.
33. Liang J. Reactive oxygen species and ovarian diseases: Antioxidant strategies / Liang J., Gao Y., Feng Z., et al. // *Redox Biol. Elsevier.* - 2023. - Vol. 62. - P. 102659.
34. Ludtmann M.H.R. Mitochondrial calcium imbalance in Parkinson's disease / Ludtmann M.H.R., Abramov A.Y. // *Neurosci Lett.* - 2018. - Vol. 663. - P. 86–90.
35. Angelova P.R. Functional Oxygen Sensitivity of Astrocytes / Angelova P.R., Kasymov V., Christie I., et al. // *Journal of Neuroscience.* - 2015. - Vol. 35. - № 29. - P. 10460–10473.
36. Hahm E.R. Withaferin a-induced apoptosis in human breast cancer cells is mediated by reactive oxygen species / Hahm E.R., Moura M.B., Kelley E.E., et al. // *PLoS One.* - 2011. - Vol. 6. - № 8.
37. Fridovich I. Superoxide dismutases / Fridovich I. // *Annu Rev Biochem.* - 1975. - Vol. 44. - P. 147–159.
38. Crapo J.D. Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity / Crapo J.D., Tierney D.F. // *American Journal of Physiology.* - 1974. - Vol. 226. - № 6. - P. 1401–1407.
39. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system / Halliwell B. // *J. Neurochem.* - 1992. - Vol. 59. - № 5. - P. 1609–1623.
40. Wilson A.J. Reactive oxygen species signalling in the diabetic heart: Emerging prospect for therapeutic targeting / Wilson A.J., Gill E.K., Abudalo R.A., et al. // *Heart.* - 2018. - Vol. 104. - № 4. - P. 293-299
41. Neginskaya M. Reactive oxygen species produced by a photodynamic effect induced calcium signal in neurons and astrocytes / Neginskaya M., Berezhnaya E., Uzdensky A.B., Abramov A.Y. // *Mol Neurobiol.* - 2018. - Vol. 55. - № 1. - P. 96–102.
42. Liu L.Z. Reactive oxygen species regulate epidermal growth factor-induced vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-1 α expression through activation of AKT and P70S6K1 in human ovarian cancer cells / Liu L.Z.,

Hu X.W., Xia C., et al. // *Free Radic Biol Med.* - 2006. - Vol. 41. - № 10. - P. 1521–1533.

43. Pandey A.N. Reactive oxygen and nitrogen species during meiotic resumption from diplotene arrest in mammalian oocytes / Pandey A.N., Tripath, A., Premkumar K.V., et al.// *J Cell Biochem.* - 2010. - Vol. 111. - № 3. - P. 521–528.

44. Bobba A. Mitochondrial respiratory chain Complexes I and IV are impaired by β -amyloid via direct interaction and through Complex I-dependent ROS production, respectively / Bobba A., Amadoro G., Valenti D., et al.// *Mitochondrion.* - 2013. - Vol. 13. - № 4. - P. 298–311.

45. Parker W.D. Electron transport chain defects in alzheimer's disease brain / Parker W.D., Jr Parks J., Filley C.M., Kleinschmidt-DeMasters B.K. // *Neurology.* - 1994. - Vol. 44. - № 6. - P. 1090–1096.

46. Neary M.T.T. Hypoxia signaling controls postnatal changes in cardiac mitochondrial morphology and function / Neary M.T., Ng K.E., Ludtmann M.H., et al.// *J Mol Cell Cardiol.* - 2014. - Vol. 74. - P. 340–352.

47. Angelova P.R. Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration / Angelova P.R., Abramov A.Y. // *FEBS Lett.* Wiley Blackwell. - 2018. - Vol. 592. - № 5. - P. 692–702.

48. Angelova P.R. Functional role of mitochondrial reactive oxygen species in physiology / Angelova P.R., Abramov A.Y.// *Free Radic Biol Med.* - 2016. - Vol. 100. - P. 81–85.

49. Abramov A.Y. Three Distinct Mechanisms Generate Oxygen Free Radicals in Neurons and Contribute to Cell Death during Anoxia and Reoxygenation / Abramov A.Y., Scorziello A., Duchen M.R. // *The Journal of Neuroscience.* - 2007. - Vol. 27. - № 5. - P. 1129–1138.

50. Schieber M. ROS function in redox signaling and oxidative stress/ Schieber M., Chandel N. S. // *Current biology.* – 2014. – Vol. 24. – №. 10. – P. R453-R462.

51. Ling Y.H. Reactive Oxygen Species Generation and Mitochondrial Dysfunction in the Apoptotic Response to Bortezomib, a Novel Proteasome Inhibitor, in Human H460 Non-small Cell Lung Cancer Cells / Ling Y.H., Liebes L.,

Zou Y., Perez-Soler R. // *Journal of Biological Chemistry*. - 2003. - Vol. 278. - № 36. - P. 33714–33723.

52. Sokolovski S.G. Singlet oxygen stimulates mitochondrial bioenergetics in brain cells / Sokolovski S.G., Rafailov E.U., Abramov A.Y., Angelova P.R. // *Free Radic Biol Med*. - 2021. - Vol. 163. - P. 306–313.

53. Radi R. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant / Radi R. // *Journal of Biological Chemistry*. - 2013. - Vol. 288. - № 37. - P. 26464–26472.

54. Rubbo H., Nitric Oxide Regulation of Tissue Free Radical Injury / Rubbo H., Darley-Usmar V., Freeman B.A. // *Chem Res Toxicol*. - 1996. - Vol. 9. - № 5. - P. 809–820.

55. Rubbo H., Nitric oxide, peroxynitrite and lipoxygenase in atherogenesis: mechanistic insights / Rubbo H., Odonnell V. // *Toxicology*. - 2005. - Vol. 208. - № 2. - P. 305–317.

56. Kubes P. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion / Kubes P., Suzuki M., Granger D. N. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. - 1991. - Vol. 88. - № 11. - P. 4651-4655.

57. Moncada S. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance / Moncada S., Higgs E. A. // *European journal of clinical investigation*. - 1991. - Vol. 21. - № 4. - P. 361-374.

58. Kanner J. Nitric oxide as an antioxidant / Kanner J., Harel S., Rina G. // *Arch Biochem Biophys*. - 1991. - Vol. 289. - № 1. - P. 130–136.

59. Parks D.A. Multiple organ dysfunction syndrome: Role of xanthine oxidase and nitric oxide/ Parks D.A., Skinner K.A., Skinner H.B., Tan S. // *Pathophysiology*. - 1998. - Vol. 5. - № 1. - P. 49–66.

60. Ding S. Mild stress of caffeine increased mtDNA content in skeletal muscle cells: The interplay between Ca²⁺ transients and nitric oxide / Ding S., Riddoch-Contreras J., Abramov A.Y., et al. // *J Muscle Res Cell Motil*. - 2012. - Vol. 33. - № 5. - P. 327–337.

61. Cui W.L. Recent advances and perspectives in reaction-based fluorescent probes for imaging peroxynitrite in biological systems / Cui W.L., Wang M.H., Yang Y.H., et al. // *Coord Chem Rev.* - 2023. - Vol. 474. - P. 214848.
62. Blough N.V. Reaction of Superoxide with Nitric Oxide to Form Peroxynitrite in Alkaline Aqueous Solution / Blough N.V., Zafiriou O.C. // *Inorg Chem.* - 1985. - Vol. 24. - № 22. - P. 3502–3504.
63. Botti H. Distance-dependent diffusion-controlled reaction of $\bullet\text{NO}$ and $\text{O}_2\bullet^-$ at chemical equilibrium with ONOO^- / Botti H., Möller M.N., Steinmann D., et al. // *Journal of Physical Chemistry B.* - 2010. - Vol. 114. - № 49. - P. 16584–16593.
64. Ferrer-Sueta G. Biochemistry of Peroxynitrite and Protein Tyrosine Nitration / Ferrer-Sueta G., Campolo N., Trujillo M., et al. // *Chem Rev.* - 2018. - Vol. 118. - № 3. - P. 1338–1408.
65. Szabó C. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics / Szabó C., Ischiropoulos H., Radi R. // *Nat Rev Drug Discov.* - 2007. - Vol. 6 - № 8. - P. 662–680.
66. Torreilles F. Neurodegenerative disorders: the role of peroxynitrite / Torreilles F., Salman-Tabcheh S., Guérin M., Torreilles J. // *Brain Res Rev.* - 1999. - Vol. 30. - № 2. - P. 153–163.
67. Beal M.F. Oxidative Damage in Neurodegenerative Diseases / Beal M.F. // *The Neuroscientist.* - 1997. - Vol. 3. - № 1. - P. 21–27.
68. Maruyama W. Peroxynitrite induces neuronal cell death in aging and age-associated disorders: A review / Maruyama W., Kato Y., Yamamoto T., et al. // *Journal of the American Aging Association.* - 2001. - Vol. 24. - № 1. - P. 11–18.
69. Salvemini D. Therapeutic manipulations of peroxynitrite / Salvemini D., Jensen M. P., Riley D. P., Misko T. P. // *Drug News Perspect.* - 1998. - Vol. 11. - № 4. - P. 204–214.
70. Baev A. Y. Interaction of mitochondrial calcium and ROS in neurodegeneration / Baev A.Y., Vinokurov A.Y., Novikova I.N., et al. // *Cells.* – 2022. – Vol. 11. – №. 4. – P. 706.

71. Kovac S. Seizure activity results in calcium- and mitochondria-independent ROS production via NADPH and xanthine oxidase activation / Kovac S., Domijan A.M., Walker M.C., Abramov A.Y. // *Cell Death Dis.* - 2014. - Vol. 5. - № 10. - P. e1442–e1442.
72. Forman H. J. Signaling functions of reactive oxygen species/ Forman H. J., Maiorino M., Ursini F. // *Biochemistry.* – 2010. – Vol. 49. – №. 5. – P. 835-842.
73. Scherz-Shouval R. Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology/ Scherz-Shouval R., Elazar Z. // *Trends in biochemical sciences.* – 2011. – Vol. 36. – №. 1. – P. 30-38.
74. Lincoln T.M. Intracellular cyclic GMP receptor proteins / Lincoln T.M., Cornwell T.L. // *The FASEB Journal.* - 1993. - Vol. 7. - № 2. - P. 328–338.
75. Ignarro L.J. Haem-dependent activation of cytosolic guanylate cyclase by nitric oxide: a widespread signal transduction mechanism / Ignarro L.J. // *Biochem Soc Trans.* - 1992. - Vol. 20. - № 2. - P. 465–469.
76. Dee G. The modulation of ferryl myoglobin formation and its oxidative effects on low density lipoproteins by nitric oxide / Dee G., Rice-Evans C., Obeyesekera S., et al.// *FEBS Lett.* - 1991. - Vol. 294. - № 1–2. - P. 38–42.
77. Balez R. Increased Neuronal Nitric Oxide Synthase in Alzheimer’s Disease Mediates Spontaneous Calcium Signaling and Divergent Glutamatergic Calcium Responses / Balez R., Stevens C.H., Lenk K., et al. // *Antioxid Redox Signal.* - 2024. - Vol. 41. - № (4-6). - P. 255-277.
78. Goss S.P.A. The Antioxidant Effect of Spermine NONOate in Human Low-Density Lipoprotein / Goss S.P.A., Hogg N., Kalyanaraman B. // *Chem Res Toxicol.* - 1995. - Vol. 8. - № 5. - P. 800–806.
79. López G. V. Design, synthesis, and biological characterization of potential antiatherogenic nitric oxide releasing tocopherol analogs / López G.V., Batthyány C., Blanco F., et al.// *Bioorg Med Chem.* - 2005. - Vol. 13. - № 20. - P. 5787–5796.
80. Rubbo H. Nitric Oxide Reaction with Lipid Peroxyl Radicals Spares α -Tocopherol during Lipid Peroxidation / Rubbo H., Radi R., Anselmi D., et al.// *Journal of Biological Chemistry.* - 2000. - Vol. 275. - № 15. - P. 10812–10818.

81. Valko M. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease / Valko M., Leibfritz D., Moncol J., et al.// *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. - 2007. - Vol. 39. - № 1. - P. 44–84.
82. Skinner K.A. Free and protein-associated nitrotyrosine formation following rat liver preservation and transplantation / Skinner K.A., Crow J.P., Skinner H.B., et al.// *Arch Biochem Biophys*. - 1997. - Vol. 342. - № 2. - P. 282–288.
83. Saxena I. Nitric oxide (NO) in alleviation of heavy metal induced phytotoxicity and its role in protein nitration / Saxena I., Shekhawat G.S. // *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*. - 2013. - Vol. 32. - P. 13–20.
84. Akaike T. Pathogenesis of influenza virus-induced pneumonia: Involvement of both nitric oxide and oxygen radicals / Akaike T., Noguchi Y., Ijiri S., et al.// *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 1996. - Vol. 93. - № 6. - P. 2448–2453.
85. Yaman T. Respiratory Syncytial Virus Infection Induces Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase, CD3, and CD8 in Naturally Occurring Pneumonia in Lambs / Yaman T., Aydemir C. // *Acta Vet Brno*. - 2021. - Vol. 71. - № 2. - P. 170–188.
86. Nielsen V. G. Lung injury after hepatoenteric ischemia-reperfusion: role of xanthine oxidase/ Nielsen, V. G., Tan, S., Weinbroum, A., et al. // *American journal of respiratory and critical care medicine*. – 1996. – Vol. 154. – №. 5. – P. 1364-1369.
87. Granger D.N. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia / Granger D.N., Rutili G., McCord J.M. // *Gastroenterology*. - 1981. - Vol. 81. - № 1. - P. 22–29.
88. Ferrer-Sueta G. Chemical biology of peroxynitrite: Kinetics, diffusion, and radicals / Ferrer-Sueta G., Radi R. // *ACS Chem Biol*. - 2009. - Vol. 4. - № 3. - P. 161–177.
89. Ignarro L.J. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. / Ignarro L.J., Buga G.M., Wood K.S., et al.// *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 1987. - Vol. 84. - № 24. - P. 9265–9269.
90. Veeramachaneni S. Carotenoids and lung cancer prevention / Veeramachaneni S., Wang X.D. // *Frontiers in Bioscience - Scholar*. - 2009. - Vol. 1 S. - № 1. - P. 258–274.

91. Beckman J.S. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide / Beckman J.S., Beckman T.W., Chen J., et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 1990. - Vol. 87. - № 4. - P. 1620–1624.
92. McCafferty D.M. Peroxynitrite and inflammatory bowel disease / McCafferty D.M. // *Gut.* - 2000. - Vol. 46. - № 3. - P. 436–439.
93. Singh D.K. Oxidative stress in early diabetic nephropathy: fueling the fire / Singh D.K., Winocour P., Farrington K. // *Nat Rev Endocrinol.* - 2011. - Vol. 7. - № 3. - P. 176–184.
94. Vana L. Peroxynitrite-induced nitrative and oxidative modifications alter tau filament formation / Vana L., Kanaan N.M., Hakala K., et al. // *Biochemistry.* - 2011. - Vol. 50. - № 7. - P. 1203–1212.
95. Sies H. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents / Sies H., Jones D.P. // *Nat Rev Mol Cell Biol.* - 2020. - Vol. 21. - № 7. - P. 363–383.
96. Harris I.S. The Complex Interplay between Antioxidants and ROS in Cancer / Harris I.S., DeNicola G.M. // *Trends Cell Biol.* - 2020. - Vol. 30. - № 6. - P. 440–451.
97. Ramdial K., Cellular mechanisms of peroxynitrite-induced neuronal death / Ramdial K., Franco M.C., Estevez A.G. // *Brain Res Bull.* - 2017. - Vol. 133. - P. 4–11.
98. Angelova P.R. Mitochondria and lipid peroxidation in the mechanism of neurodegeneration: Finding ways for prevention / Angelova P.R., Esteras N., Abramov A.Y. // *Med Res Rev.* - 2021. - Vol. 41. - № 2. - P. 770–784.
99. Loschen G. Chance B. Respiratory chain linked H₂O₂ production in pigeon heart mitochondria. / Loschen G., Flohé L // *FEBS Lett.* - 1971. - Vol. 18. - № 2. - P. 261–264.
100. Zorova L.D. Mitochondrial membrane potential / Zorova L.D., Popkov V.A., Plotnikov E.Y., et al. // *Anal Biochem.* - 2018. - Vol. 552. - P. 50–59.

101. Abramov A. Y. Mechanisms underlying the loss of mitochondrial membrane potential in glutamate excitotoxicity / Abramov A. Y., Duchen M. R. // *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*. – 2008. – Vol. 1777. – №. 7-8. – P. 953-964.
102. Vinokurov A.Y. Assessment of Mitochondrial Membrane Potential and NADH Redox State in Acute Brain Slices / Vinokurov A.Y., Dremin V.V., Piavchenko G.A., et al.// *Methods in Molecular Biology*. - 2021. - Vol. 2276. - P. 193–202.
103. Dineley K. E. Zinc causes loss of membrane potential and elevates reactive oxygen species in rat brain mitochondria/ Dineley K. E., Richards L. L., Votyakova T. V., Reynolds I. J // *Mitochondrion*. – 2005. – Vol. 5. – №. 1. – P. 55-65.
104. Abramov A.Y. The role of an astrocytic NADPH oxidase in the neurotoxicity of amyloid beta peptides / Abramov A.Y., Duchen M.R. // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. - 2005. - Vol. 360. - № 1464. - P. 2309–2314.
105. Dworakowski R. Redox signalling involving NADPH oxidase-derived reactive oxygen species / Dworakowski R., Anilkumar N., Zhang M., Shah A.M. // *Biochemical Society Transactions*. - 2006. - Vol. 34. - № 5.
106. Brennan A.M. NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation / Brennan A.M., Suh S.W., Won S.J., et al.// *Nat Neurosci*. - 2009. - Vol. 12. - № 7. - P. 857–863.
107. Liu Q. NADPH oxidase-mediated generation of reactive oxygen species: A new mechanism for X-ray-induced HeLa cell death / Liu Q., He X., Liu Y., et al.// *Biochem Biophys Res Commun*. - 2008. - Vol. 377 - № 3. - P. 775–779.
108. Kovac S. Nrf2 regulates ROS production by mitochondria and NADPH oxidase / Kovac S., Angelova P.R., Holmström K.M., et al. // *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. - 2015. - Vol. 1850. - № 4. - P. 794–801.
109. Belarbi K. NADPH oxidases in Parkinson's disease: A systematic review / Belarbi K., Cuvelier E., Destée A., et al.// *Molecular Neurodegeneration*. - 2017. - Vol. 12. - № 1. - P. 84.

110. Tarafdar A. The role of NADPH oxidases and oxidative stress in neurodegenerative disorders / Tarafdar A., Pula G. // *International Journal of Molecular Sciences*. - 2018. - Vol. 19. - № 12. - P. 3824
111. Ray R. RAGE axis in neuroinflammation, neurodegeneration and its emerging role in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis / Ray R., Juranek J.K., Rai V. // *Neurosci Biobehav Rev*. - 2016. - Vol. 62. - P. 48–55.
112. Jiang X. RAGE and its emerging role in the pathogenesis of Parkinson's disease / Jiang X., Wang X., Tuo M., et al. // *Neurosci Lett*. - 2018. - Vol. 672. - P. 65–69.
113. Li J.J. / Li J.J., Voisin D., Quiquerez A.L., Bouras C. // *Brain Res*. - 1994. - Vol. 641. - № 2. - P. 285–288.
114. Dalfó E. Evidence of oxidative stress in the neocortex in incidental Lewy body disease / Dalfó E., Portero-Otín M., Ayala V., et al. // *J Neuropathol Exp Neurol*. - 2005. - Vol. 64. - № 9. - P. 816–830.
115. Guo Z.J. Advanced oxidation protein products activate vascular endothelial cells via a RAGE-mediated signaling pathway / Guo Z.J., Niu H.X., Hou F. F., et al. // *Antioxid Redox Signal*. - 2008. - Vol. 10. - № 10. - P. 1699–1712.
116. Wautier M.P. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE / Wautier M.P., Chappey O., Corda S., et al. // *Am J Physiol Endocrinol Metab*. - 2001. - Vol. 280. - № 5 - P. E685-94.
117. Piras S. RAGE Expression and ROS Generation in Neurons: Differentiation versus Damage / Piras S., Furfaro A.L., Domenicotti C., et al. // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. - 2016. - Vol. 2016.
118. Chen Y.H. AGE/RAGE-Induced EMP Release via the NOX-Derived ROS Pathway / Chen Y.H., Chen Z.W., Li H.M., et al. // *J Diabetes Res*. - 2018. - Vol. 2018.
119. Niu Y. Physiological and Biochemical Adaptations to High Altitude in Tibetan Frogs, *Nanorana parkeri* / Niu Y., Zhang X., Xu T., et al. // *Front Physiol*. - 2022. - Vol. 13.

120. Firuzi O. Antioxidant therapy: current status and future prospects. / Firuzi O., Miri R., Tavakkoli M., Saso L. // *Curr Med Chem. Netherlands.* - 2011. - Vol. 18. - № 25. - P. 3871–3888.
121. Forman H.J. Superoxide dismutase: A comparison of rate constants / Forman H.J., Fridovich I. // *Arch Biochem Biophys.* - 1973. - Vol. 158. - № 1. - P. 396–400.
122. Wang S. Investigating the thioredoxin and glutathione systems' response in lymphoma cells after treatment with [au(D2pype)₂]cl / Wang S., Lu Y., Woods K., et al.// *Antioxidants.* - 2021. - Vol. 10. - № 1. - P. 1–19.
123. Dringen R. Glutathione pathways in the brain / Dringen R., Hirrlinger J. // *Biol Chem.* - 2003. - Vol. 384. - № 4. - P. 505–516.
124. Lubos E. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities / Lubos E., Loscalzo J., Handy D.E. // *Antioxid Redox Signal.* - 2011. - Vol. 15. - № 7. - P. 1957–1997.
125. Agarwal A. The effects of oxidative stress on female reproduction: A review / Agarwal A., Aponte-Mellado A., Premkumar B.J., et al.// *Reproductive Biology and Endocrinology.* - 2012. - Vol. 10. - P. 1-31.
126. Lambeth J. D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen/ Lambeth J. D. // *Nature Reviews Immunology.* – 2004. – Vol. 4. – №. 3. – P. 181-189.
127. Arnold R. S. The Nox enzymes and the regulated generation of reactive oxygen species / Arnold R. S., Lambeth J. D. // *Signal Transduction by Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Pathways and Chemical Principles.* – Dordrecht : Springer Netherlands, 2003. – C. 102-118.
128. Lou Z. Upregulation of NOX2 and NOX4 mediated by TGF- β signaling pathway exacerbates cerebral ischemia/reperfusion oxidative stress injury/ Lou Z., Wang A. P., Duan X. M., et al. // *Cellular Physiology and Biochemistry.* – 2018. – Vol. 46. – №. 5. – P. 2103-2113.
129. Chocry M. The NADPH Oxidase Family and Its Inhibitors / Chocry M., Leloup L. // *Antioxidants and Redox Signaling.* - 2020. - Vol. 33. - № 5.

130. Serrander L. NOX4 activity is determined by mRNA levels and reveals a unique pattern of ROS generation / Serrander L., Cartier L., Bedard K., et al. // *Biochemical Journal*. - 2007. - Vol. 406. - № 1.
131. Gadhe L. Intermediates of α -synuclein aggregation: Implications in Parkinson's disease pathogenesis / Gadhe L., Sakunthala A., Mukherjee S., et al. // *Biophys Chem*. - 2022. - Vol. 281. - P. 106736.
132. Dolgacheva L.P. Alpha-Synuclein and Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease / Dolgacheva L.P., Fedotova E.I., Abramov A.Y., Berezhnov A.V. // *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*. - 2018. - Vol. 12. - № 1. - P. 10–19.
133. Hansson Petersen C.A. The amyloid β -peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae / Hansson Petersen C.A., Alikhani N., Behbahani H., et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 2008. - Vol. 105. - № 35. - P. 13145–13150.
134. Ballard C. Alzheimer's disease / Ballard C., Gauthier S., Corbett A., Brayne C., Aarsland D., Jones E. // *The Lancet*. - 2011. - Vol. 377. - № 9770. - P. 1019–1031.
135. Hou L. Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase and Neurodegenerative Diseases: Mechanisms and Therapy / Hou L., Zhang L., Hong J.S., et al. // *Antioxidants and Redox Signaling*. - 2020. - Vol. 33. - № 5. - P. 374-393
136. Ma M.W. NADPH oxidase in brain injury and neurodegenerative disorders / Ma M.W., Wang J., Zhang Q., et al. // *Molecular Neurodegeneration*. - 2017. - Vol. 12. - № 1. - P. 7
137. Shekh-Ahmad T. Combination antioxidant therapy prevents epileptogenesis and modifies chronic epilepsy / Shekh-Ahmad T., Lieb A., Kovac S., et al. // *Redox Biol*. - 2019. - Vol. 26.
138. Wind S. Comparative pharmacology of chemically distinct NADPH oxidase inhibitors/ Wind S., Beuerlein K., Eucker T., et al. // *British journal of pharmacology*. - 2010. - Vol. 161. - №. 4. - C. 885-898.

139. Pawate S. Redox regulation of glial inflammatory response to lipopolysaccharide and interferony / Pawate S., Shen Q., Fan F., Bhat N.R. // *J Neurosci Res.* - 2004. - Vol. 77. - № 4.
140. Hirano K. Discovery of GSK2795039, a novel small molecule NADPH oxidase 2 inhibitor / Hirano K., Chen W.S., Chueng A.L., et al.// *Antioxid Redox Signal.* - 2015. - Vol. 23. - № 5.
141. Weinbroum A. Liver ischemia-reperfusion increases pulmonary permeability in rat: Role of circulating xanthine oxidase / Weinbroum A., Nielsen V.G., Tan S., et al.// *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* - 1995. - Vol. 268. - № 6. -P. 31-6.
142. Parks D.A. Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. / Parks D.A., Granger D.N. // *Acta Physiol Scand Suppl.* - 1986. - Vol. 548. - № SUPPL. 548. - P. 87–99.
143. Kurose I. Evidence Implicating Xanthine Oxidase and Neutrophils in Reperfusion-Induced Microvascular Dysfunction / Kurose I., Granger D.N. // *Ann N Y Acad Sci.* - 1994. - Vol. 723. - № 1. - P. 158–179.
144. Yokoyama Y. Circulating xanthine oxidase: potential mediator of ischemic injury / Yokoyama Y., Beckman J.S., Beckman T.K., et al.// *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology.* - 1990. - Vol. 258. - № 4. - P. G564–G570.
145. Miyamoto Y. Potentiation of Nitric Oxide--Mediated Vasorelaxation by Xanthine Oxidase Inhibitors / Miyamoto Y., Akaike T., Yoshida M., et al.// *Exp Biol Med.* - 1996. - Vol. 211. - № 4. - P. 366–373.
146. White C.R. Circulating plasma xanthine oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits. / White C.R., Darley-Usmar V., Berrington W.R., et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* - 1996. - Vol. 93. - № 16. - P. 8745–8749.
147. Many A. Hyperuricemia and xanthine oxidase in preeclampsia, revisited / Many A., Hubel C.A., Roberts J.M. // *Am J Obstet Gynecol.* - 1996. - Vol. 174. - № 1. - P. 288–291.

148. Nielsen V.G. Xanthine oxidase inactivation attenuates postocclusion shock after descending thoracic aorta occlusion and reperfusion in rabbits / Nielsen V.G., McCammon A.T., Tan S., et al. // *J Thorac Cardiovasc Surg.* - 1995. - Vol. 110. - № 3. - P. 715–722.
149. Griot C. Selective Degeneration of Oligodendrocytes Mediated by Reactive Oxygen Species / Griot C., Vandeveld M., Richard A., et al. // *Free Radic Res Commun.* - 1990. - Vol. 11. - № 4–5. - P. 181–193.
150. Schmidt H.M. The impact of xanthine oxidase (XO) on hemolytic diseases / Schmidt H.M., Kelley E.E., Straub A.C. // *Redox Biol.* - 2019. - Vol. 21. - P. 101072.
151. Stirpe F. The Regulation of Rat Liver Xanthine Oxidase / Stirpe F., della Corte E., Lorenzoni E. // *Journal of Biological Chemistry.* - 1969. - Vol. 244. - № 14. - P. 3855–3863.
152. Al-Khalidi U. The species distribution of xanthine oxidase / Al-Khalidi U., Chaglassian T. // *Biochemical Journal.* - 1965. - Vol. 97. - № 1. - P. 318–320.
153. Masuoka N. Characterization of the xanthine oxidase inhibitory activity of alk(en)yl phenols and related compounds / Masuoka N., Kubo I. // *Phytochemistry.* - 2018. - Vol. 155. - P. 100–106.
154. Epstein F.H. Oxygen-Derived Free Radicals in Postischemic Tissue Injury / Epstein F.H., McCord J.M. // *New England Journal of Medicine.* - 1985. - Vol. 312. - № 3. - P. 159–163.
155. Schultz V. Purine nucleotide cycle. Evidence for the occurrence of the cycle in brain. / Schultz V., Lowenstein J.M. // *Journal of Biological Chemistry.* - 1976. - Vol. 251. - № 2. - P. 485–492.
156. Santos J.N. Nucleotide metabolism in rat brain / Santos J.N., Hempstead K.W., Kopp L.E., Miech R.P. // *J Neurochem.* - 1968. - Vol. 15. - № 5. - P. 367–376.
157. Schwartz M. D. Xanthine oxidase-derived oxygen radicals increase lung cytokine expression in mice subjected to hemorrhagic shock / Schwartz M. D., Repine J. E., Abraham E. // *American journal of respiratory cell and molecular biology.* - 1995. - Vol. 12. - №. 4. - P. 434-440.

158. Poss W. B. Regulation of xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activity by hypoxia/ Poss W. B., Huecksteadt T. P., Panus P. C., et al. //American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology. – 1996. – Vol. 270. – №. 6. – P. L941-L946.
159. Murray A.W. The Biological Significance of Purine Salvage / Murray A.W. // Annu Rev Biochem. - 1971. - Vol. 40 - № 1. - P. 811–826.
160. Bortolotti M. Xanthine oxidoreductase: One enzyme for multiple physiological tasks / Bortolotti M., Polito L., Battelli M. G., Bolognesi A. //Redox biology. – 2021. – Vol. 41. – P. 101882.
161. Kooij A. A re-evaluation of the tissue distribution and physiology of xanthine oxidoreductase/ Kooij A. //The Histochemical journal. – 1994. – Vol. 26. - № 12. – P. 889-915.
162. Cutler R. G. Uric acid enhances longevity and endurance and protects the brain against ischemia /Cutler R. G., Camandola S., Feldman N. H., et al.// Neurobiology of aging. – 2019. – Vol. 75. – P. 159-168.
163. Newaz M. A. Uric acid, xanthine oxidase and other risk factors of hypertension in normotensive subjects / Newaz M. A., Adeeb N. N., Muslim N., et al. //Clinical and experimental hypertension. – 1996. – Vol. 18. – №. 8. – P. 1035-1050.
164. Molinoff P.B. Biochemistry of Catecholamines / Molinoff P.B., Axelrod J. // Annu Rev Biochem. - 1971. - Vol. 40. - № 1. - P. 465–500.
165. Bakke O.M. O -Methylation of Simple Phenols in the Rat / Bakke O.M. // Acta Pharmacol Toxicol (Copenh). - 1969. - Vol. 28. - № 1. - P. 28–38.
166. Coyle J.T. Catecholamines in fetal and newborn rat brain / Coyle J.T., Henry D. // J Neurochem. - 1973. - Vol. 21. - № 1. - P. 61–67.
167. Semenova S. Distribution, properties, and inhibitor sensitivity of zebrafish catechol-O-methyl transferases (COMT) / Semenova S., Rozov S., Panula P. // Biochem Pharmacol. - 2017. - Vol. 145. - P. 147–157.
168. ULMANEN I. Cell-free synthesis of rat and human catechol O -methyltransferase / LMANEN I., LUNDSTRÖM K. // Eur J Biochem. - 1991. - Vol. 202. - № 3. - P. 1013–1020.

169. Myöhänen T.T. Distribution of catechol- O -methyltransferase (COMT) proteins and enzymatic activities in wild-type and soluble COMT deficient mice / Myöhänen T.T., Schendzielorz N., Männistö P.T. // *J Neurochem.* - 2010. - Vol. 113. - № 6. - P. 1632–1643.
170. Kaakkola S. Problems with the Present Inhibitors and a Relevance of New and Improved COMT Inhibitors in Parkinson's Disease / Kaakkola S. // *International Review of Neurobiology.* - 2010. - Vol. 95. - № C. - P. 207–225.
171. Cossu G. Levodopa and neuropathy risk in patients with Parkinson disease: Effect of COMT inhibition / Cossu G., Ceravolo R., Zibetti M., et al.// *Parkinsonism Relat Disord.* - 2016. - Vol. 27. - P. 81–84.
172. Edmondson D.E. Monoamine oxidases / Edmondson D.E., Binda C. // *Subcellular Biochemistry.* - 2018. - Vol. 87. - P. 117–139.
173. Shih J.C. Monoamine oxidase: from genes to behavior. / Shih J.C., Chen K., Ridd M.J. // *Annu Rev Neurosci.* - 1999. - Vol. 22. - P. 197–217.
174. Cesura A.M. Monoamine Oxidases / Cesura A.M. // *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference.* - 2007. - P. 1–5.
175. Finberg J.P.M. MAO — The Mother of all Amine Oxidases / Finberg J.P., Youdim M.B., Riederer P., Tipton K.F. // *Vienna: Springer Vienna, 1998. Vol. 52. 355 p.*
176. Newton-Vinson P. High-level expression of human liver monoamine oxidase B in *Pichia pastoris* / Newton-Vinson P., Hubalek F., Edmondson D.E. // *Protein Expr Purif.* - 2000. - Vol. 20. - № 2. - P. 334–345.
177. Son S.Y. Structure of human monoamine oxidase A at 2.2-Å resolution: The control of opening the entry for substrates/inhibitors / Son S.Y., Ma J., Kondou Y., et al.// *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2008. - Vol. 105. - № 15. - P. 5739–5744.
178. Hare M.L.C. Tyramine oxidase / Hare M.L.C. // *Biochemical Journal.* - 1928. - Vol. 22. - № 4. - P. 968–979.
179. Kobayashi S. Monoamine oxidase in frog liver and brain / Kobayashi S., Takahara K., Kamijo K. // *Comparative Biochemistry and Physiology.* - 1981. - Vol. 69. - № 2. - P. 179–183.

180. Salach J.I. Monoamine oxidase from beef liver mitochondria: Simplified isolation procedure, properties, and determination of its cysteinyl flavin content / Salach J.I. // *Arch Biochem Biophys.* - 1979. - Vol. 192. - № 1. - P. 128–137.
181. Dezsi L. Monoamine Oxidase B Inhibitors in Parkinson's Disease / Dezsi L., Vecsei L. // *CNS Neurol Disord Drug Targets.* - 2017. - Vol. 16. - № 4. - P. 425-439
182. Kennedy B.P. MAO A and B in Alzheimer's disease / Kennedy B.P., Ziegler M.G., Alford M., et al. // *J Neural Transm.* - 2003. - Vol. 110. - № 7. - P. 789–801.
183. Andres A. M. Positive selection in MAOA gene is human exclusive: determination of the putative amino acid change selected in the human lineage / Andres A. M., Soldevila M., Navarro A., et al. // *Human genetics.* – 2004. – Vol. 115. – P. 377-386.
184. Stern G. Neuroprotection by selegiline and other MAO inhibitors / Stern G. // *MAO—The Mother of all Amine Oxidases.* – 1998. – P. 99-107.
185. Carradori S. New Frontiers in Selective Human MAO-B Inhibitors / Carradori S., Silvestri R. // *J Med Chem.* - 2015. - Vol. 58. - № 17. - P. 6717–6732.
186. Balsa D. Inhibition of MAO by substituted tryptamine analogues/ Balsa D., Fernandez-Alvarez E., Tipton K.F., Unzeta M. // *J Neural Transm Suppl.* - 1990. - Vol. 32. - P. 103–105.
187. Prah A. How Monoamine Oxidase A Decomposes Serotonin: An Empirical Valence Bond Simulation of the Reactive Step / Prah A., Purg M., Stare J., et al. // *Journal of Physical Chemistry B.* - 2020. - Vol. 124. - № 38.
188. Ma J. Structure of rat monoamine oxidase A and its specific recognitions for substrates and inhibitors / Ma J., Yoshimura M., Yamashita E., et al. // *J Mol Biol.* - 2004. - Vol. 338. - № 1. - P. 103–114.
189. Segura-Aguilar J. Mechanisms of Dopamine Oxidation and Parkinson's Disease / Segura-Aguilar J., Paris I. // *Handbook of Neurotoxicity.* - 2014. - Vol. 2. - P. 865–883.
190. Tipton K.F. Enzymology of monoamine oxidase / Tipton K.F. // *Cell Biochem Funct.* - 1986. - Vol. 4. - № 2. - P. 79–87.

191. Westlund K. N. Localization of distinct monoamine oxidase A and monoamine oxidase B cell populations in human brainstem / Westlund K. N., Denney R. M., Rose R. M., Abell C. W. // *Neuroscience*. – 1988. – Vol. 25. – №. 2. – P. 439-456.
192. Robakis D. Defining the role of the monoamine oxidase-B inhibitors for Parkinson's disease / Robakis D., Fahn S. // *CNS drugs*. – 2015. – Vol. 29. – P. 433-441.
193. Naoi M. Type A and B Monoamine Oxidase in Age-Related Neurodegenerative Disorders: Their Distinct Roles in Neuronal Death and Survival / Naoi M., Maruyama W., Inaba-Hasegawa K. // *Curr Top Med Chem*. - 2013. - Vol. 12. - № 20.
194. Sturza A. Monoamine oxidases are novel sources of cardiovascular oxidative stress in experimental diabetes / Sturza A., Duicu O.M., Vaduva A., et al.// *Can J Physiol Pharmacol*. - 2015. - Vol. 93. - № 7. - P. 555–561.
195. Berezhnov A. V. Dopamine controls neuronal spontaneous calcium oscillations via astrocytic signal / Berezhnov A. V., Fedotova E.I., Sergeev A.I. et al.// *Cell Calcium*. Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290, Russian Federation: Elsevier Ltd, 2021. Vol. 94. P. 102359.
196. Fitzgerald J.C. Monoamine oxidase-A knockdown in human neuroblastoma cells reveals protection against mitochondrial toxins / Fitzgerald J.C., Ugun-Klusek A., Allen G., et al.// *FASEB Journal*. - 2014. - Vol. 28. - № 1. - P. 218–229.
197. Sablin S.O. Monoamine Oxidase Contains a Redox-active Disulfide / Sablin S.O., Ramsay R.R // *Journal of Biological Chemistry*. - 1998. - Vol. 273. - № 23. - P. 14074–14076.
198. Zeller E.A. On the physico-chemical characterization of monoamine oxidase (MAO) as a basis for the study of its role in physiological and pathological processes / Zeller E.A. // *J Psychiatr Res*. - 1974. - Vol. 11. - № C. - P. 329–332.
199. Vaarmann A. Dopamine Induces Ca²⁺ Signaling in Astrocytes through Reactive Oxygen Species Generated by Monoamine Oxidase / Vaarmann A., Gandhi S., Abramov A.Y. // *Journal of Biological Chemistry*. - 2010. - Vol. 285. - № 32. - P. 25018–25023.

200. Schwartz T.L. A neuroscientific update on monoamine oxidase and its inhibitors / Schwartz T.L. // *CNS Spectrums*. - 2013. - Vol. 18. - № SUPPL.1. - p. 22–33
201. Mousseau D.D. Recent Developments in the Regulation of Monoamine Oxidase Form and Function: Is the Current Model Restricting Our Understanding of the Breadth of Contribution of Monoamine Oxidase to Brain [dys]Function? / Mousseau D.D., Baker G.B. // *Curr Top Med Chem*. - 2013. - Vol. 12. - № 20. - P. 2163-2176
202. Caraci F. Neuroprotective effects of the monoamine oxidase inhibitor tranylcypromine and its amide derivatives against A β (1–42)-induced toxicity / Caraci F., Pappalardo G., Basile L., et al.// *Eur J Pharmacol*. - 2015. - Vol. 764. - P. 256–263.
203. Emilsson L. Increased monoamine oxidase messenger RNA expression levels in frontal cortex of Alzheimer's disease patients / Emilsson L., Saetre P., Balciuniene J., et al.// *Neurosci Lett*. - 2002. - Vol. 326. - № 1. - P. 56–60.
204. Pennington P.R. Alzheimer disease-related presenilin-1 variants exert distinct effects on monoamine oxidase-A activity in vitro / Pennington P.R., Wei Z., Rui L., et al.// *J Neural Transm*. - 2011. - Vol. 118. - № 7. - P. 987–995.
205. Wei Z. Monoamine oxidase-A physically interacts with presenilin-1(M146V) in the mouse cortex / Wei Z., Gabriel G.G., Rui L., et al.// *Journal of Alzheimer's Disease*. - 2012. - Vol. 28. - № 2. - P. 403–422.
206. Cai Z. Monoamine oxidase inhibitors: Promising therapeutic agents for Alzheimer's disease (Review) / Cai Z. // *Mol Med Rep*. - 2014. - Vol. 9. - № 5. - P. 1533–1541.
207. Shulman K.I. Current place of monoamine oxidase inhibitors in the treatment of depression / Shulman K.I., Herrmann N., Walker S.E. // *CNS Drugs*. - 2013. - Vol. 27. - № 10. - P. 789–797.
208. Naoi M. Monoamine Oxidase Inhibitors as Neuroprotective Agents in Age-Dependent Neurodegenerative Disorders / Naoi M., Maruyama W. // *Curr Pharm Des*. - 2012. - Vol. 16. - № 25. - P. 2799-2817

209. Youdim M.B.H. Monoamine oxidase: Isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness / Youdim M.B.H., Bakhle Y.S. // *British Journal of Pharmacology*. - 2006. - Vol. 147. - № SUPPL. 1. - P. S287-S296
210. Lees A. J. Comparison of therapeutic effects and mortality data of levodopa and levodopa combined with selegiline in patients with early, mild Parkinson's disease/ Lees A. J. // *Bmj*. - 1995. - Vol. 311. - №. 7020. - P. 1602-1607.
211. Binda C. Lights and Shadows on Monoamine Oxidase Inhibition in Neuroprotective Pharmacological Therapies / Binda C., Milczek E.M., Bonivento D., et al.// *Curr Top Med Chem*. - 2011. - Vol. 11. - № 22. - P. 2788–2796.
212. Al-Nuaimi S.K. Monoamine oxidase inhibitors and neuroprotection: A review / Al-Nuaimi S.K., MacKenzie E.M., Baker G.B. // *Am J Ther*. - 2012. - Vol. 19. - № 6. - P. 436–448.
213. Yanez M., Dual Inhibitors of Monoamine Oxidase and Cholinesterase for the Treatment of Alzheimer Disease / Yanez M., Vina D. // *Curr Top Med Chem*. - 2013. - Vol. 13. - № 14. - P. 1692–1706.
214. Andersen J. K. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? / Andersen J. K. // *Nature medicine*. - 2004. - Vol. 10. - № 7. - P. S18-S25.
215. Ramasamy R. Advanced glycation end products and RAGE: A common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation / Ramasamy R., Vannucci S.J., Yan S.S., et al.// *Glycobiology*. - 2005. - Vol. 15. - № 7. - P. 16R-28R.
216. Abramov A.Y. Different faces of neurodegeneration / Abramov A.Y. // *FEBS J*. - 2018. - Vol. 285. - № 19. - P. 3544–3546.
217. Ballard C. Neuropsychiatric symptoms in dementia: importance and treatment considerations / Ballard C., Day S., Sharp S., et al.// *International Review of Psychiatry*. - 2008. - Vol. 20. - №. 4. - P. 396-404.
218. Yang L. The role of oxidative stress and natural antioxidants in ovarian aging / Yang L., Chen Y., Liu Y., et al.// *Frontiers in Pharmacology*. - 2021. - Vol. 11. - P. 617843.

219. Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. / Hardy J., Selkoe D.J. // *Science*. - 2002. - Vol. 297. - № 5580. - P. 353–356.
220. Calvo-Rodriguez M. Mitochondria and Calcium in Alzheimer's Disease: From Cell Signaling to Neuronal Cell Death / Calvo-Rodriguez M., Bacsikai B.J // *Trends Neurosci*. - 2021. - Vol. 44. - № 2. - P. 136–151.
221. Manole A. Clinical, pathological and functional characterization of riboflavin-responsive neuropathy / Manole A., Jaunmuktane Z., Hargreaves I., et al. // *Brain*. - 2017. - Vol. 140. - № 11. - P. 2820–2837.
222. Abramov A.Y. Neurodegenerative disorders—Searching for targets and new ways of diseases treatment / Abramov A.Y., Bachurin S.O. // *Med Res Rev*. - 2021. - Vol. 41. - № 5. - P. 2603–2605.
223. Grünewald A. New insights into the complex role of mitochondria in Parkinson's disease / Grünewald A., Kumar K.R., Sue C.M. // *Prog Neurobiol*. - 2019. - Vol. 177. - P. 73–93.
224. Mullin S. The genetics of Parkinson's disease / Mullin S., Schapira A. // *Br Med Bull*. - 2015. - Vol. 114. - № 1. - P. 39–52.
225. Muzerengi S. Non-motor symptoms: Identification and management / Muzerengi S., Contrafatto D., Chaudhuri K.R. // *Parkinsonism Relat Disord*. - 2007. - Vol. 13. - № SUPPL. 3.
226. Pena-Díaz S. One ring is sufficient to inhibit α -synuclein aggregation / Pena-Díaz S., Ventura S. // *Neural Regen Res*. - 2022. - Vol. 17. - № 3. - P. 508–511.
227. Burchell V.S. Targeting mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disease: Part II / Burchell V.S., Gandhi S., Deas E., et al. // *Expert Opin Ther Targets*. - 2010. - Vol. 14. - № 4. - P. 369–385.
228. Jansen van Rensburg Z. Toxic Feedback Loop Involving Iron, Reactive Oxygen Species, α -Synuclein and Neuromelanin in Parkinson's Disease and Intervention with Turmeric. / Jansen van Rensburg Z., Abrahams S., Bardien S., Kenyon C. // *Mol Neurobiol*. - 2021. - Vol. 58. - № 11. - P. 5920-5936

229. Sculley D.G. A review of the molecular basis of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency / Sculley D.G., Dawson P.A., Emmerson B.T., Gordon R.B. // *Hum Genet.* Springer-Verlag. - 1992. - Vol. 90. - № 3. - P. 195–207.
230. Harris J.C. Lesch–Nyhan syndrome and its variants / Harris J.C. // *Curr Opin Psychiatry.* - 2018. - Vol. 31. - № 2. - P. 96–102.
231. Torres R.J. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency: Lesch-Nyhan syndrome / Torres R.J., Puig J.G. // *Orphanet J Rare Dis.* - 2007. - Vol. 2. - № 1. - P. 48.
232. Lesch M., A familial disorder of uric acid metabolism and central nervous system function / Lesch M., Nyhan W.L. // *Am J Med.* - 1964. - Vol. 36. - № 4. - P. 561–570.
233. Kalmykov V.A. New personalized genetic mouse model of Lesch-Nyhan syndrome for pharmacology and gene therapy/ Kalmykov V.A., Kusov P.A., Yablonskaia M.I., et al. // *Research Results in Pharmacology.* - 2018. - Vol. 4. - № 4. - P. 115–122.
234. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry / Harman D. // *J Gerontol.* – 1956. – Vol. 11. – №. 3. – P. 298-300
235. Sartori R. Mechanisms of muscle atrophy and hypertrophy: implications in health and disease / Sartori R., Romanello V., Sandri M. // *Nat Commun.* - 2021. - Vol. 12. - № 1. - P. 330.
236. Baskin K.K. Muscle as a “mediator” of systemic metabolism / Baskin K.K., Winders B.R., Olson E.N. // *Cell Metab.* - 2015. - Vol. 21. - № 2. - P. 237–248.
237. Frampton J. Short-chain fatty acids as potential regulators of skeletal muscle metabolism and function / Frampton J., Murphy K.G., Frost G., Chambers E.S. // *Nat Metab.* - 2020. - Vol. 2. - № 9. - P. 840–848.
238. Katare P.B. Energy metabolism in skeletal muscle cells from donors with different body mass index / Katare P.B., Dalmao-Fernandez A., Mengeste A.M., et al. // *Front Physiol.* - 2022. - Vol. 13. - № November. - P. 1–13.

239. Gallagher D. Organ-tissue mass measurement allows modeling of free and metabolically active tissue mass / Gallagher D., Belmonte D., Deurenberg P., et al. // *Am J Physiol Endocrinol Metab.* - 1998. - Vol. 275. - № 2. - P. E249–E258.
240. Sundberg C.W. Bioenergetic basis of skeletal muscle fatigue / Sundberg C.W., Fitts R.H. // *Curr Opin Psychol.* - 2019. - Vol. 10. - P. 118–127.
241. Hargreaves M. Skeletal muscle energy metabolism during exercise / Hargreaves M., Spriet L.L. // *Nat Metab.* - 2020. Vol. 2. - № 9. - P. 817–828.
242. Fontes-Oliveira C.C. Bioenergetic Impairment in Congenital Muscular Dystrophy Type 1A and Leigh Syndrome Muscle Cells / Fontes-Oliveira C.C., Steinz M., Schneiderat P., et al. // *Sci Rep.* - 2017. - Vol. 7. - P. 45272.
243. Persad K.L. Energy Metabolism on Mitochondrial Maturation and Its Effects on Cardiomyocyte Cell Fate / Persad K.L., Lopaschuk G.D. // *Front Cell Dev Biol.* - 2022. - Vol. 10. - P. 886393.
244. Yang M. Bioenergetic profile of human coronary artery smooth muscle cells and effect of metabolic intervention / Yang M., Chadwick A.E., Dart C., et al. // *PLoS One.* - 2017. - Vol. 12. - № 5. - P. e0177951.
245. Pereyra A.S. Skeletal muscle undergoes fiber type metabolic switch without myosin heavy chain switch in response to defective fatty acid oxidation / Pereyra A.S., Lin C.T., Sanchez D.M., et al. // *Mol Metab.* - 2022. - Vol. 59. - P. 101456.
246. Tang A.H. Induction of autophagy supports the bioenergetic demands of quiescent muscle stem cell activation / Tang A.H., Rando T.A. // *EMBO J.* - 2014. - Vol. 33. - № 23. - P. 2782–2797.
247. Tomas C. Substrate utilisation of cultured skeletal muscle cells in patients with CFS / Tomas C., Elson J.L., Newton J.L., Walker M. // *Sci Rep.* - 2020. - Vol. 10. - № 1. - P. 1–11.
248. Memme J.M. Mitochondrial bioenergetics and turnover during chronic muscle disuse / Memme J.M., Slavin M., Moradi N., Hood D.A. // *Int J Mol Sci.* - 2021. - Vol. 22. - № 10. - P. 5179.

249. Cruz-Jentoft A.J. Sarcopenia: Revised European consensus on definition and diagnosis / Cruz-Jentoft A.J., Bahat G., Bauer J., et al. // *Age and Ageing*. - 2019. - Vol. 48. - P. 16–31.
250. Marty E. A review of sarcopenia: Enhancing awareness of an increasingly prevalent disease / Marty E., Liu Y., Samuel A., et al. // *Bone*. - 2017. - Vol. 105. - P. 276–286.
251. Smith C. Sarcopenia definition: Does it really matter? Implications for resistance training? / Smith C., Woessner M.N., Sim M., Levinger I. // *Ageing Res Rev*. - 2022. - Vol. 78. - P. 101617.
252. Chhetri J.K. Chronic inflammation and sarcopenia: A regenerative cell therapy perspective / Chhetri J.K., de Souto Barreto P., Fougère B., et al. // *Exp Gerontol*. - 2018. - Vol. 103. - P. 115–123.
253. Larsson L. Sarcopenia: Aging-related loss of muscle mass and function / Larsson L., Degens H., Li M., et al. // *Physiol Rev*. - 2019. - Vol. 99. - P. 427–511.
254. Livshits G. Inflammaging as a common ground for the development and maintenance of sarcopenia, obesity, cardiomyopathy and dysbiosis / Livshits G., Kalinkovich A. // *Ageing Res Rev*. - 2019. - Vol. 56. - P. 100980.
255. Nishikawa H. Pathophysiology and mechanisms of primary sarcopenia (Review) / Nishikawa H., Fukunishi S., Asai A., et al. // *Int J Mol Med*. - 2021. - Vol. 48. - № 2. - P. 156.
256. Foreman N.A. Redox Signaling and Sarcopenia: Searching for the Primary Suspect / Foreman N.A., Hesse A.S., Ji L.L. // *Int J Mol Sci*. - 2021. - Vol. 22. - № 16. - P. 9045.
257. Senesi P. Betaine supplement enhances skeletal muscle differentiation in murine myoblasts via IGF-1 signaling activation / Senesi P., Luzi L., Montesano A., et al. // *J Transl Med*. - 2013. - Vol. 11. - № 1. - P. 1–12.
258. Zhao Y. Glutamine supplementation stimulates cell proliferation in skeletal muscle and cultivated myogenic cells of low birth weight piglets / Zhao Y., Albrecht E., Stange K., et al. // *Sci Rep*. - 2021. - Vol. 11. - № 1. - P. 1–15.

259. Wang T. Succinate induces skeletal muscle fiber remodeling via SUCNR1 signaling / Wang T., Xu Y.Q., Yuan Y.X., et al. // *EMBO Rep.* - 2019. - Vol. 20. - № 9. - P. 1–16.
260. Серёгина Е.С. Оценка влияния янтарной кислоты и соединений цинка на параметры метаболизма головного мозга крыс методом флуоресцентной спектроскопии / Серёгина Е.С., Стельмащук О.А., Пьявченко Г.А., и др. // *Технологии живых систем.* - 2018. - Vol. 15. - № 5. - P. 37–46.
261. Maroteaux L. Synuclein: A neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal / Maroteaux L., Campanelli J.T., Scheller R.H. // *Journal of Neuroscience.* - 1988. - Vol. 8. - № 8. - P. 2804–2815.
262. Giasson B.I. A Hydrophobic Stretch of 12 Amino Acid Residues in the Middle of α -Synuclein Is Essential for Filament Assembly / Giasson B.I., Murray I.V., Trojanowski J.Q., Lee V.M. // *Journal of Biological Chemistry.* - 2001. - Vol. 276. - № 4. - P. 2380–2386.
263. Ueda K. Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease / Ueda K., Fukushima H., Masliah E., Xia Y., et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993. - Vol. 90. - № 23. - P. 11282–11286.
264. Чапров К.Д. Исследование роли бета-синуклеина в регуляции дофаминовой трансмиссии синаптическими везикулами. / Чапров К.Д. // 2022. 150 с.
265. Abeliovich A. Mice Lacking α -Synuclein Display Functional Deficits in the Nigrostriatal Dopamine System / Abeliovich A., Schmitz Y., Fariñas I., et al. // *Neuron.* - 2000. - Vol. 25. - № 1. - P. 239–252.
266. Burré J. The Synaptic Function of α -Synuclein / Burré J. // *J Parkinsons Dis.* - 2015. - Vol. 5. - P. 699–713.
267. Sang M.P. Distinct roles of the N-terminal-binding domain and the C-terminal-solubilizing domain of α -synuclein, a molecular chaperone / Park S.M., Jung H.Y., Kim T.D., et al. // *Journal of Biological Chemistry.* - 2002. - Vol. 277. - № 32. - P. 28512–28520.

268. Perez R.G. A role for α -synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis / Perez R. G., Waymire J. C., Lin E., et al. // *Journal of Neuroscience*. - 2002. - Vol. 22. - № 8. - P. 3090–3099.
269. Orth M. G209A mutant alpha synuclein expression specifically enhances dopamine induced oxidative damage / Orth, M., Tabrizi, S. J., Tomlinson, C. et al. // *Neurochemistry international*. – 2004. – Vol. 45. – №. 5. – P. 669-676.
270. Klivenyi P. Mice lacking alpha-synuclein are resistant to mitochondrial toxins / Klivenyi, P., Siwek, D., Gardian, G., et al. // *Neurobiology of disease*. – 2006. – Vol. 21. – №. 3. – P. 541-548.
271. Sullivan P. G. Proteasome inhibition alters neural mitochondrial homeostasis and mitochondria turnover / Sullivan, P. G., Dragicevic, N. B., Deng, et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279. – №. 20. – P. 20699-20707.
272. Lotharius J. Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and α -synuclein / Lotharius J., Brundin P. Pathogenesis // *Nature Reviews Neuroscience*. – 2002. – Vol. 3. – №. 12. – P. 932-942.
273. Tanji K. Expression of β -synuclein in normal human astrocytes / Tanji K., Mori F., Nakajo S., et al. // *Neuroreport*. - 2001. - Vol. 12. - № 13. - P. 2845-2848
274. Burre J. α -Synuclein Promotes SNARE-Complex Assembly in Vivo and in Vitro / Burré J., Sharma M., Tsetsenis T., et al. // *Science* - 2010. - Vol. 329. - № 5999. - P. 1663–1667.
275. Goedert M. Synucleinopathies and Tauopathies / Goedert M., Spillantini M.G. // *Basic Neurochemistry*. - 2012. - P. 829–843.
276. Kasten M. The many faces of alpha-synuclein mutations / Kasten M., Klein C. // *Movement Disorders*. - 2013. - Vol. 28. - № 6. - P. 697–701.
277. Nakajo S. A new brain-specific 14-kDa protein is a phosphoprotein: Its complete amino acid sequence and evidence for phosphorylation / Nakajo S., Tsukada K., Omata K., et al. // *Eur J Biochem*. - 1993. - Vol. 217. - № 3. - P. 1057–1063.
278. Jakes R. Identification of two distinct synucleins from human brain / Jakes R., Spillantini M.G., Goedert M. // *FEBS Lett*. - 1994. - Vol. 345. - № 1. - P. 27–32.

279. Wilhelm B.G. Composition of isolated synaptic boutons reveals the amounts of vesicle trafficking proteins / Wilhelm B.G., Mandad S., Truckenbrodt S., et al. // *Science* - 2014. - Vol. 344. - № 6187. - P. 1023–1028.
280. Lavedan C. The synuclein family. / Lavedan C. // *Genome Res.* - 1998. - Vol. 8. - № 9. - P. 871–880.
281. Hashimoto M. An antiaggregation gene therapy strategy for Lewy body disease utilizing β -synuclein lentivirus in a transgenic model / Hashimoto M., Rockenstein E., Mante M., et al. // *Gene Ther.* - 2004. - Vol. 11. - № 23. - P. 1713–1723.
282. Fan Y. β -synuclein modulates α -synuclein neurotoxicity by reducing α -synuclein protein expression / Fan Y., Limprasert P., Murray I.V., et al. // *Hum Mol Genet.* - 2006. - Vol. 15. - № 20. - P. 3002–3011.
283. Park J.-Y. β -synuclein inhibits formation of α -synuclein protofibrils: A possible therapeutic strategy against Parkinson's disease / Park J.-Y., Lansbury Jr. P.T. // *Biochemistry.* - 2003. - Vol. 42. - № 13. - P. 3696–3700.
284. Uversky V.N. Biophysical properties of the synucleins and their propensities to fibrillate: Inhibition of α -synuclein assembly by β - and γ -synucleins / Uversky V.N., Li J., Souillac P., et al. // *Journal of Biological Chemistry.* - 2002. - Vol. 277. - № 14. - P. 11970–11978.
285. Brown J.W. β -Synuclein suppresses both the initiation and amplification steps of α -synuclein aggregation via competitive binding to surfaces / Brown J.W., Buell A.K., Michaels T.C., et al. // *Sci Rep.* - 2016. - Vol. 6.
286. Yamin G. Forcing nonamyloidogenic β -synuclein to fibrillate / Yamin G., Munishkina L.A., Karymov M.A., et al. // *Biochemistry.* - 2005. - Vol. 44. - № 25. - P. 9096–9107.
287. Moriarty G.M. A pH-dependent switch promotes β -synuclein fibril formation via glutamate residues / Moriarty G.M., Olson M.P., Atieh T.B., et al. // *Journal of Biological Chemistry.* - 2017. - Vol. 292. - № 39. - P. 16368–16379.
288. Brown J.W.P. Kinetic barriers to α -synuclein protofilament formation and conversion into mature fibrils / Brown J.W.P., Meisl G., Knowles T.P.J., et al. // *Chemical Communications.* - 2018. - Vol. 54. - № 56. - P. 7854–7857.

289. Tolö J. Pathophysiological consequences of neuronal α -synuclein overexpression: Impacts on ion homeostasis, stress signaling, mitochondrial integrity, and electrical activity / Tolö J., Taschenberger G., Leite K., et al. // *Front Mol Neurosci.* - 2018. - Vol. 11.
290. Buchman V.L. Persyn, a member of the synuclein family, has a distinct pattern of expression in the developing nervous system / Buchman V.L. // *Journal of Neuroscience.* - 1998. - Vol. 18. - № 22. - P. 9335–9341.
291. Ji H. Identification of a breast cancer-specific gene, BCSG1, by direct differential cDNA sequencing/ Ji, H., Liu, Y. E., Jia, T. et al. // *Cancer research.* – 1997. – Vol. 57. – №. 4. – P. 759-764.
292. Buchman V. Persyn, a member of the synuclein family, influences neurofilament network integrity / Buchman, V., Adu, J., Pinõn, L. et al. // *Nature neuroscience.* – 1998. – Vol. 1. – №. 2. – P. 101-103.
293. Lavedan C. Identification, localization and characterization of the human γ -synuclein gene / Lavedan C., Leroy E., Dehejia A., et al. // *Hum Genet.* - 1998. - Vol. 103. - № 1. - P. 106–112.
294. Surguchov A. Gamma synuclein: Subcellular localization in neuronal and non-neuronal cells and effect on signal transduction / Surguchov A., Palazzo R. E., Surgucheva I. // *Cell motility and the cytoskeleton.* – 2001. – Vol. 49. – №. 4. – P. 218-228.
295. Galvin J. E. Axon pathology in Parkinson's disease and Lewy body dementia hippocampus contains α -, β -, and γ -synuclein / Galvin J. E., Uryu K., Lee V. M. Y., Trojanowski J. Q. // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 1999. – Vol. 96. – №. 23. – P. 13450-13455.
296. Surguchov A. Synoretin—a new protein belonging to the synuclein family / Surguchov A., Surgucheva I., Solessio E., Baehr W. // *Molecular and Cellular Neuroscience.* – 1999. – Vol. 13. – №. 2. – P. 95-103.
297. Surguchov A. Synucleins in ocular tissues / Surguchov A., McMahan B., Masliah E., Surgucheva I. // *Journal of neuroscience research.* – 2001. – Vol. 65. – №. 1. – P. 68-77.

298. Clayton D. F. The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease / Clayton D. F., George J. M. // Trends in neurosciences. – 1998. – Vol. 21. – № 6. – P. 249-254.
299. Serpell L. Amyloid structure / Serpell L. // Essays Biochem / ed. Perrett S. - 2014. - Vol. 56. - P. 1–10.
300. Austin S. Proteins / Austin S. // Pharmacognosy. - 2024. - P. 531–557.
301. Dobson C.M. Protein folding and misfolding / Dobson C.M. // Nature. - 2003. - Vol. 426. - № 6968. - P. 884–890.
302. Chen S.W.W. Structural characterization of toxic oligomers that are kinetically trapped during α -synuclein fibril formation / Chen S.W., Drakulic S., Deas E., et al. // Proc Natl Acad Sci U S A. - 2015. - Vol. 112. - № 16. - P. E1994–E2003.
303. Deas E. Alpha-Synuclein Oligomers Interact with Metal Ions to Induce Oxidative Stress and Neuronal Death in Parkinson's Disease / Deas E., Cremades N., Angelova P.R., et al. // Antioxid Redox Signal. - 2016. - Vol. 24. - № 7. - P. 376–391.
304. Niewiadomska G. Tau Oligomers Neurotoxicity / Niewiadomska G., Niewiadomski W., Steczkowska M., Gasiorowska A. // Life. - 2021. - Vol. 11. - № 1. - P. 28.
305. Wang W. Protein aggregation—Pathways and influencing factors / Wang W., Nema S., Teagarden D. // Int J Pharm. - 2010. - Vol. 390. - № 2. - P. 89–99.
306. Chi E.Y. Physical stability of proteins in aqueous solution: Mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation / Chi E.Y., Krishnan S., Randolph T.W., Carpenter J.F. // Pharmaceutical Research. - 2003. - Vol. 20. - № 9.
307. Philo J. Mechanisms of Protein Aggregation / Philo J., Arakawa T. // Curr Pharm Biotechnol. - 2009. - Vol. 10. - № 4. - P. 348–351.
308. Uversky V.N. Synergistic Effects of Pesticides and Metals on the Fibrillation of α -Synuclein: Implications for Parkinson's Disease / Uversky V.N., Li J., Bower K., Fink A.L. // Neurotoxicology. - 2002. - Vol. 23. - № 4–5. - P. 527–536.

309. Williams J.K. Interactions between the Intrinsically Disordered Proteins β -Synuclein and α -Synuclein / Williams J.K., Yang X., Baum J. // *Proteomics*. - 2018. - Vol. 18. - № 21–22.
310. Barba L. Alpha and Beta Synucleins: From Pathophysiology to Clinical Application as Biomarkers / Barba L., Paolini Paoletti F., Bellomo G., et al.// *Movement Disorders*. - 2022. - Vol. 37. - № 4. - P. 669–683.
311. Kanaan N.M. Loss of Functional Alpha-Synuclein: A Toxic Event in Parkinson's Disease? / Kanaan N.M., Manfredsson F.P. // *J Parkinsons Dis*. - 2012. - Vol. 2. - № 4. - P. 249–267.
312. Kalia L.V. Parkinson's disease / Kalia L.V, Lang A.E. // *The Lancet*. - 2015. - Vol. 386. - № 9996. - P. 896–912.
313. Cascella R. The release of toxic oligomers from α -synuclein fibrils induces dysfunction in neuronal cells / Cascella R., Chen S.W., Bigi A., et al.// *Nat Commun*. - 2021. - Vol. 12. - № 1. - P. 1814.
314. Tsigelny I.F. Dynamics of α -synuclein aggregation and inhibition of pore-like oligomer development by β -synuclein / Tsigelny I.F., Bar-On P., Sharikov Y., et al.// *FEBS J*. - 2007. - Vol. 274. - № 7. - P. 1862–1877.
315. Yang X. Increased Dynamics of α -Synuclein Fibrils by β -Synuclein Leads to Reduced Seeding and Cytotoxicity / Yang X., Williams J.K., Yan R., et al.// *Sci Rep*. - 2019. - Vol. 9. - № 1. - P. 17579.
316. Souza J.M. Chaperone-like activity of synucleins / Souza J.M., Giasson B.I., Lee V.M., Ischiropoulos H. // *FEBS Lett*. - 2000. - Vol. 474. - № 1. - P. 116–119.
317. Lee D. β -Synuclein exhibits chaperone activity more efficiently than α -synuclein / Lee D., Paik S.R., Choi K.Y. // *FEBS Lett*. - 2004. - Vol. 576. - № 1–2. - P. 256–260.
318. Raina A. Dopamine promotes the neurodegenerative potential of β -synuclein / Raina A., Leite K., Guerin S., et al.// *J Neurochem*. - 2021. - Vol. 156. - № 5. - P. 674–691.

319. Evans T. Accumulation of beta-synuclein in cortical neurons is associated with autophagy attenuation in the brains of dementia with Lewy body patients / Evans T., Kok W.L., Cowan K., et al. // *Brain Res.* - 2018. - Vol. 1681. - P. 1–13.
320. Teplitz R.R. An Introduction to Genetic Analysis / Teplitz R.R. // *JAMA: The Journal of the American Medical Association.* - 1987. - Vol. 257. - № 16.
321. Hosford P.S. Synuclein deficiency results in age-related respiratory and cardiovascular dysfunctions in mice / Hosford P.S., Ninkina N., Buchman V.L., et al. // *Brain Sci.* - 2020. - Vol. 10. - № 9. - P. 1–16.
322. Greten-Harrison B. $\alpha\beta\gamma$ -Synuclein triple knockout mice reveal age-dependent neuronal dysfunction / Greten-Harrison B., Polydoro M., Morimoto-Tomita M., et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* - 2010. - Vol. 107. - № 45. - P. 19573–19578.
323. Tarasova T. V. The new line of genetically modified mice with constitutive knockout of the gene alpha synuclein to study pathogenetic aspects of differential loss of dopaminergic neurons / Tarasova T.V., Ustyugov A.A., Ninkina N.N., Skvortsova V.I. // *Patol Fiziol Eksp Ter.* - 2016. - Vol. 60. - № 3. - P. 4-9
324. Scudamore O. Increased oxidative stress exacerbates α -synuclein aggregation in vivo / Scudamore O., Ciossek T. // *J Neuropathol Exp Neurol.* - 2018. - Vol. 77. - № 6.
325. Angelova P.R. Alpha synuclein aggregation drives ferroptosis: an interplay of iron, calcium and lipid peroxidation / Angelova P.R., Choi M.L., Berezhnov A.V., et al. // *Cell Death Differ.* - 2020. - Vol. 27. - № 10. - P. 2781–2796.
326. Ludtmann M.H. Monomeric Alpha-Synuclein Exerts a Physiological Role on Brain ATP Synthase / Ludtmann M. H., Angelova P. R., Ninkina N. N., et al. // *The Journal of Neuroscience.* - 2016. - Vol. 36. - № 41. - P. 10510–10521.
327. Bender A. et al. TOM40 Mediates Mitochondrial Dysfunction Induced by α -Synuclein Accumulation in Parkinson's Disease / Bender A., Desplats P., Spencer B., et al. // *PLoS One.* 2013. Vol. 8, № 4.

328. Choi M.L. Pathological structural conversion of α -synuclein at the mitochondria induces neuronal toxicity / Choi M.L., Chappard A., Singh B.P., et al. // *Nat Neurosci.* - 2022. - Vol. 25. - № 9. - P. 1134–1148.
329. Cabin D.E. Synaptic Vesicle Depletion Correlates with Attenuated Synaptic Responses to Prolonged Repetitive Stimulation in Mice Lacking α -Synuclein / Cabin D.E., Shimazu K., Murphy D., et al. // *The Journal of Neuroscience.* - 2002. - Vol. 22. - № 20. - P. 8797–8807.
330. Ninkina N. β -synuclein potentiates synaptic vesicle dopamine uptake and rescues dopaminergic neurons from MPTP-induced death in the absence of other synucleins / Ninkina N., Millership S.J., Peters O.M., et al. // *Journal of Biological Chemistry.* - 2021. - Vol. 297. - № 6. - P. 101375.
331. Ансари Н.А. Неферментативное гликирование белков: от диабета до рака / Ансари Н.А., Рашид З. // *Биомедицинская химия.* - 2010. - Vol. 56. - № 2. - P. 168–178.
332. Емельянов В.В. Гликирование, антигликирование и дегликирование: роль в механизмах старения и геропротекции / Емельянов В.В. // *Успехи геронтологии.* - 2016. - Vol. 29. - № 3. - P. 407.
333. Thomas M.C. Advanced glycation end products / Thomas M.C. // *Contrib Nephrol.* - 2011. - Vol. 170. - P. 66–74.
334. Волкова Т.Д. Биологически активный фрагмент рецептора конечных продуктов гликирования (RAGE) способен ингибировать олигомеризацию бета-амилоида / Волкова Т. Д., Аветисян А. В., Короев Д. О., и др. // *Биоорганическая химия.* - 2022. - Vol. 48. - № 4. - P. 461–469.
335. Fritz G. RAGE: A single receptor fits multiple ligands / Fritz G. // *Trends Biochem Sci.* - 2011. - Vol. 36. - № 12. - P. 625–632.
336. Yue Q. Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE): A Pivotal Hub in Immune Diseases / Yue Q., Song Y., Liu Z., et al. // *Molecules.* - 2022. - Vol. 27 - № 15. - P. 4922.

337. Zhang I.Y. RAGE ablation attenuates glioma progression and enhances tumor immune responses by suppressing galectin-3 expression / Zhang I.Y., Liu S., Zhang L., et al. // *Neuro Oncol.* - 2022. - Vol. 25. - № 5. - P. 886-898.
338. Du C. Advanced Glycation End Products and Inflammation in Type 1 Diabetes Development / Du C., Whiddett R.O., Buckle I., et al.// *Cells.* - 2022. - Vol. 11. - № 21. -P. 3503
339. Успенская Ю.А. Рецепторы конечных продуктов гликирования белков RAGE: лиганды, биологические эффекты и роль в нейродегенерации / Успенская Ю.А., Горина Я.В., Салмин В.В., и др. // *Вестник Новосибирского государственного университета.* - 2014. - Vol. 12. - № 4. - P. 68–76.
340. Koch M. Structural Basis for Ligand Recognition and Activation of RAGE / Koch M., Chitayat S., Dattilo B.M., et al. // *Structure.* - 2010. - Vol. 18. - № 10. - P. 1342–1352.
341. Rao N.L. Receptor for Advanced Glycation End Product, Organ Crosstalk, and Pathomechanism Targets for Comprehensive Molecular Therapeutics in Diabetic Ischemic Stroke / Rao N.L., Kotian G.B., Shetty J.K., et al.// *Biomolecules.* - 2022. - Vol. 12. - № 11. - P. 1712.
342. Demirer B. Possible effects of dietary advanced glycation end products on maternal and fetal health: a review / Demirer B., Samur G. // *Nutr Rev.* - 2022.
343. Tolstova A.P. Docking and Molecular Dynamics-Based Identification of Interaction between Various Beta-Amyloid Isoforms and RAGE Receptor / Tolstova A.P., Adzhubei A.A., Mitkevich V.A., et al. // *Int J Mol Sci.* - 2022. - Vol. 23. - № 19. - P. 11816.
344. Logsdon C. D. RAGE and RAGE ligands in cancer / Logsdon C. D., Fuentes M. K., Huang E. H., Arumugam T. // *Current molecular medicine.* – 2007. – Vol. 7. – №. 8. – P. 777-789.
345. Bongarzone S. Targeting the Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE): A Medicinal Chemistry Perspective / Bongarzone S., Savickas V., Luzi F., Gee A.D. // *Journal of Medicinal Chemistry.* - 2017. - Vol. 60. - № 17. - P. 7213–7232.

346. Juranek J. Receptor for advanced glycation end-products in neurodegenerative diseases / Juranek J., Ray R., Banach M., Rai V. // *Reviews in the Neurosciences*. - 2015. - Vol. 26. - № 6. - P. 691–698.
347. Blesa J. Parkinson's disease: Animal models and dopaminergic cell vulnerability / Blesa J., Przedborski S. // *Front Neuroanat*. - 2014. - Vol. 8. - № DEC.
348. Серёгина Е.С. Роль синуклеинов в редокс сигнале клеток головного мозга / Серёгина Е.С., Ляхова О.В. // 25-ая Пущинская школа-конференция молодых ученых с международным участием «Биология – наука XXI века». - 2022. - P. 330.
349. Anzilotti S. Immunohistochemical localization of receptor for advanced glycation end (RAGE) products in the R6/2 mouse model of Huntington's disease / Anzilotti S., Giampà C., Laurenti D., et al. // *Brain Res Bull*. - 2012. - Vol. 87. - № 2–3.
350. Yan S. D. RAGE and amyloid- β peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease / Yan S.D., Chen X., Fu J., et al. // *Nature*. - 1996. - Vol. 382. - № 6593. - P. 685–691.
351. Ding Q. Evaluation of rage isoforms, ligands, and signaling in the brain / Ding Q., Keller J.N. // *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. - 2005. - Vol. 1746. - № 1.
352. Ahmad A. The Role of Neurovascular System in Neurodegenerative Diseases / Ahmad A., Patel V., Xiao J., Khan M.M. // *Molecular Neurobiology*. - 2020. - Vol. 57. - № 11. - P. 4373-4393.
353. Drake L.R. Strategies for PET imaging of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) / Drake L.R., Brooks A.F., Stauff J., et al. // *J Pharm Anal*. - 2020. - Vol. 10. - № 5. - P. 452-465.
354. Deane R. A multimodal RAGE-specific inhibitor reduces amyloid β -mediated brain disorder in a mouse model of Alzheimer disease / Deane R., Singh I., Sagare A.P., et al. // *Journal of Clinical Investigation*. - 2012. - Vol. 122. - № 4. - P. 1377–1392.
355. Hong Y. Effects of RAGE-Specific Inhibitor FPS-ZM1 on Amyloid- β Metabolism and AGEs-Induced Inflammation and Oxidative Stress in Rat

- Hippocampus / Hong Y., Shen C., Yin Q., et al.// *Neurochem Res.* - 2016. - Vol. 41. - № 5. - P. 1192–1199.
356. Chaney M.O. RAGE and amyloid beta interactions: Atomic force microscopy and molecular modeling / Chaney M.O., Stine W.B., Kokjohn T.A., et al.// *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* - 2005. - Vol. 1741. - № 1–2. - P. 199-205.
357. Yan S.D. RAGE- $\alpha\beta$ interactions in the pathophysiology of Alzheimer's disease / Yan S.D., Stern D., Kane M.D., et al.// *Restor Neurol Neurosci.* - 1998. - Vol. 12. - № 2–3. - P. 167-173.
358. Teismann P. Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) deficiency protects against MPTP toxicity / Teismann P., Sathe K., Bierhaus A., et al. // *Neurobiol Aging.* - 2012. - Vol. 33. - № 10. - P. 2478-2490.
359. Gao J. Association of RAGE gene polymorphisms with sporadic Parkinson's disease in Chinese Han population / Gao J., Teng J., Liu H., et al. // *Neurosci Lett.* - 2014. - Vol. 559.
360. Gasparotto J. Is it all the RAGE? Defining the role of the receptor for advanced glycation end products in Parkinson's disease / Gasparotto J., Somensi N., Girardi C.S., Bittencourt R.R., de Oliveira L.M., et al.// *Journal of Neurochemistry.* - 2023. - Vol. 168. - № 8. - P. 1608-1624.
361. Sathe K. S100B is increased in Parkinson's disease and ablation protects against MPTP-induced toxicity through the RAGE and TNF- α pathway / Sathe K., Maetzler W., Lang J.D., et al.// *Brain.* - 2012. - Vol. 135. - № 11. - P. 3336-3347.
362. Liliensiek B. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) regulates sepsis but not the adaptive immune response / Liliensiek B., Weigand M.A., Bierhaus A., et al.// *Journal of Clinical Investigation.* - 2004. - Vol. 113. - № 11. - P. 1641-1650.
363. Lutterloh E.C. Inhibition of the RAGE products increases survival in experimental models of severe sepsis and systemic infection / Lutterloh E.C., Opal S.M., Pittman D.D., et al.// *Crit Care.* - 2007. - Vol. 11. - № 6. - P. R122.

364. Kamynina A. Activation of RAGE leads to the release of glutamate from astrocytes and stimulates calcium signal in neurons / Kamynina A., Esteras N., Koroev D.O., et al. // *J Cell Physiol.* - 2021. - Vol. 236. - № 9. - P. 6496–6506.
365. Viana S.D. Regulation of striatal astrocytic receptor for advanced glycation end-products variants in an early stage of experimental Parkinson's disease / Viana S.D., Valero J., Rodrigues-Santos P., et al. // *J Neurochem.* - 2016. - Vol. 138. - № 4. - P. 598-609.
366. Yamamoto Y. Vascular RAGE transports oxytocin into the brain to elicit its maternal bonding behaviour in mice / Yamamoto Y., Liang M., Munesue S., et al. // *Commun Biol.* - 2019. - Vol. 2. - № 1.
367. Kim J. The role of receptor for advanced glycation end products (RAGE) in neuronal differentiation / Kim J., Wan C.K., J. O'Carroll S., et al. // *J Neurosci Res.* - 2012. - Vol. 90. - № 6. - P. 1136-1147.
368. Kislinger T. N(ε)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression / Kislinger T., Fu C., Huber B., et al. // *Journal of Biological Chemistry.* - 1999. - Vol. 274. - № 44. - P. 31740–31749.
369. Volpina O.M. Synthetic Fragment of Receptor for Advanced Glycation End Products Prevents Memory Loss and Protects Brain Neurons in Olfactory Bulbectomized Mice / Volpina O.M., Samokhin A.N., Koroev D.O., et al. // *Journal of Alzheimer's Disease.* - 2018. - Vol. 61. - № 3. - P. 1061–1076.
370. Hofmann M.A. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: A central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides / Hofmann M.A., Drury S., Fu C., et al. // *Cell.* - 1999. - Vol. 97. - № 7. - P. 889–901.
371. Sturchler E. Site-specific blockade of RAGE-Vd prevents amyloid-β oligomer neurotoxicity / Sturchler E., Galichet A., Weibel M., et al. // *Journal of Neuroscience.* - 2008. - Vol. 28. - № 20. - P. 5149–5158.
372. Ghidoni R. Decreased plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products in mild cognitive impairment / Ghidoni R., Benussi L., Glionna M., et al. // *J Neural Transm.* - 2008. - Vol. 115. - № 7. - P. 1047-1050.

373. Emanuele E. Circulating levels of soluble receptor for advanced glycation end products in Alzheimer disease and vascular dementia / Emanuele E., D'Angelo A., Tomaino C., et al. // Arch Neurol. - 2005. - Vol. 62. - № 11. - P. 1734-1736.
374. Walker D. Receptor for advanced glycation endproduct modulators: A new therapeutic target in Alzheimer's disease / Walker D., Lue L.F., Paul G., et al. // Expert Opinion on Investigational Drugs. - 2015. - Vol. 24. - № 3. - P. 393-399.
375. Kamynina A. V. Synthetic Fragments of Receptor for Advanced Glycation End Products Bind Beta-Amyloid 1–40 and Protect Primary Brain Cells From Beta-Amyloid Toxicity / Kamynina A.V., Esteras N., Koroev D.O., et al. // Front Neurosci. - 2018. - Vol. 12.
376. Volpina O.M. Proteolytic degradation patterns of the receptor for advanced glycation end products peptide fragments correlate with their neuroprotective activity in Alzheimer's disease models / Volpina O.M., Koroev D.O., Serebryakova M.V., et al. // Drug Dev Res. - 2021. - Vol. 82. - № 8. - P. 1217–1226.
377. Bobkova N.V. Immunization with either prion protein fragment 95–123 or the fragment-specific antibodies rescue memory loss and neurodegenerative phenotype of neurons in olfactory bulbectomized mice / Bobkova N.V., Medvinskaya N.I., Kamynina A.V., et al. // Neurobiol Learn Mem. - 2014. - Vol. 107. - P. 50–64.
378. Короев Д.О. Синтетический фрагмент 60–70 рецептора конечных продуктов гликозилирования проявляет терапевтическую активность в животной модели болезни Альцгеймера/ Короев Д.О., Вольпина О.М., Волкова Т.Д., и др. // Биоорганическая химия. - 2017. - Vol. 43. - № 2. - P. 174–179.
379. Вольпина О.М. Фрагмент рецептора конечных продуктов гликозилирования восстанавливает пространственную память животных в модели болезни Альцгеймера / Вольпина О.М., Короев Д.О., Волкова Т.Д. , и др. // Биоорганическая химия. - 2015. - Vol. 41. - № 6. - P. 709.
380. Avetisyan A. Synthetic fragment (60–76) of RAGE improves brain mitochondria function in olfactory bulbectomized mice / Avetisyan A., Balasanyants S., Simonyan R., et al. // Neurochem Int. - 2020. - Vol. 140. - P. 104799.

381. Фрешни Р. Культура животных клеток. Практическое руководство. 2018. 691 p.
382. Cho S. Brain Slices as Models for Neurodegenerative Disease and Screening Platforms to Identify Novel Therapeutics / Cho S., Wood A., Bowlby M. // *Curr Neuropharmacol.* - 2007. - Vol. 5. - № 1. - P. 19–33.
383. Allen. ALLEN Mouse Brain Atlas // *Gene Expr.* - 2007. - № November 2011. - P. 1–9.
384. Angelova P. Oxidative modulation of the transient potassium current IA by intracellular arachidonic acid in rat CA1 pyramidal neurons / Angelova P., Müller W. // *European Journal of Neuroscience.* - 2006. - Vol. 23. - № 9. - P. 2375–2384.
385. Панов А.В. Практическая функциональная митохондриология. / Панов А.В. // *Становление новых парадигм.* Новосибирск: СО РАН. - 2023. - 334 p.
386. Baev A.Y. Ecdysterone prevents negative effect of acute immobilization stress on energy metabolism of rat liver mitochondria / Baev A.Y., Charishnikova O.S., Khasanov F.A., et al. // *J Steroid Biochem Mol Biol.* - 2022. - Vol. 219. - P. 106066.
387. Leysens A. The relationship between mitochondrial state, ATP hydrolysis, $[Mg^{2+}]_i$ and $[Ca^{2+}]_i$ studied in isolated rat cardiomyocytes / Leysens A., Nowicky A.V., Patterson L., et al. // *Journal of Physiology.* - 1996. - Vol. 496. - № 1. - P. 111–128.
388. Seryogina E.S. RAGE induces physiological activation of NADPH oxidase in neurons and astrocytes and neuroprotection / Seryogina E.S., Kamynina A.V., Koroev D.O., et al. // *FEBS Journal.* - 2024. - P. 1–14.
389. Cheng X.P. Variability of mitochondrial energy balance across brain regions / Cheng X., Vinokurov A. Y., Zhrebtsov E. A., et al. // *J Neurochem.* - 2021. - Vol. 157. - № 4. - P. 1234–1243.
390. Abramov A.Y. Mechanism of neurodegeneration of neurons with mitochondrial DNA mutations / Abramov A.Y., Smulders-Srinivasan T.K., Kirby D.M., et al. // *Brain.* - 2010. - Vol. 133. - № 3. - P. 797–807.

391. Vinokurov A.Y. Brain region specificity in reactive oxygen species production and maintenance of redox balance / Vinokurov A.Y., Stelmashuk O.A., Ukolova P.A., et al. // *Free Radic Biol Med.* - 2021. - Vol. 174. - P. 195–201.
392. Esteras N. Nrf2 activation in the treatment of neurodegenerative diseases: A focus on its role in mitochondrial bioenergetics and function / Esteras N., Dinkova-Kostova A.T., Abramov A.Y. // *Biol Chem.* - 2016. - Vol. 397. - № 5. - P. 383–400.
393. Bryanskaya E.O. High levels of FAD autofluorescence indicate pathology preceding cell death / Bryanskaya E.O., Vinokurov A.Y., Dolgikh A.I., et al. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* - 2024. - Vol. 1868. - № 1. - P. 130520.
394. Xie W.Q. Mouse models of sarcopenia: classification and evaluation / Xie W.Q., He M., Yu D.J., et al. // *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* - 2021. - Vol. 12. - P. 538–554.
395. Yamato M. Determination of reactive oxygen species associated with the degeneration of dopaminergic neurons during dopamine metabolism / Yamato M., Kudo W., Shiba T., et al. // *Free radical research.* – 2010. – Vol. 44. – №. 3. – P. 249-257.
396. Furukawa S. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome/ Furukawa S., Fujita T., Shimabukuro M., et al. // *The Journal of clinical investigation.* – 2017. – Vol. 114. – №. 12. – P. 1752-1761.
397. Schumacker P. T. Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword / Schumacker P. T. // *Cancer cell.* – 2006. – Vol. 10. – №. 3. – P. 175-176.
398. Abramov A. Y. β -amyloid peptides induce mitochondrial dysfunction and oxidative stress in astrocytes and death of neurons through activation of NADPH oxidase / Abramov A. Y., Canevari L., Duchen M. R. // *Journal of Neuroscience.* – 2004. – Vol. 24. – №. 2. – P. 565-575.
399. Narayan P. Rare Individual Amyloid-Oligomers Act on Astrocytes to Initiate Neuronal Damage/ Narayan P, Holmström KM, Kim DH, et al. // *Biochemistry.* – 2014. - Vol. 53. - № 15. - P. 2442–2453.

400. Lloyd K. G. et al. Biochemical evidence of dysfunction of brain neurotransmitters in the Lesch-Nyhan syndrome/ Lloyd, K. G., Hornykiewicz, O., Davidson, L., et al.//New England Journal of Medicine. – 1981. – Vol. 305. – №. 19. – P. 1106-1111.
401. Abramov A. Y., Impaired mitochondrial bioenergetics determines glutamate-induced delayed calcium deregulation in neurons / Abramov A. Y., Duchen M. R.//Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. – 2010. – Vol. 1800. – №. 3. – P. 297-304.
402. Maguire-Zeiss K. A. Synuclein, dopamine and oxidative stress: co-conspirators in Parkinson's disease?/ Maguire-Zeiss K. A., Short D. W., Federoff H. J. //Molecular Brain Research. – 2005. – Vol. 134. – №. 1. – P. 18-23.
403. Goedert M. Filamentous nerve cell inclusions in neurodegenerative diseases: tauopathies and alpha-synucleinopathies/ Goedert M. //Philosophical transactions of the royal society of london. Series B: biological sciences. – 1999. – Vol. 354. – №. 1386. – P. 1101-1118.
404. Clayton D. F., George J. M. Synucleins in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders/ Clayton D. F., George J. M. //Journal of neuroscience research. – 1999. – Vol. 58. – №. 1. – P. 120-129.
405. Vorobyov V. Loss of the synuclein family members differentially affects baseline-and apomorphine-associated EEG determinants in single-, double-and triple-knockout mice/ Vorobyov V., Deev A., Sukhanova I., et al. //Biomedicines. – 2022. – Vol. 10. – №. 12. – P. 3128.
406. Vinokurov A. Energy substrate supplementation increases ATP levels and is protective to PD neurons / Vinokurov A.Y., Pogonyalova M.Y., Andreeva L., et al. // Current Research in Pharmacology and Drug Discovery. - 2024. - Vol. 6. - P. 100187.
407. Mounier R. Expanding roles for AMPK in skeletal muscle plasticity / Mounier R., Théret M., Lantier L., et al.// Trends in Endocrinology and Metabolism. - 2015. - Vol. 26. - № 6. - P. 275–286.
408. Al-Menhali A.S. Lipid peroxidation is involved in calcium dependent upregulation of mitochondrial metabolism in skeletal muscle / Al-Menhali A.S.,

Banu S., Angelova P.R., et al.// *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* - 2020. - Vol. 1864. - № 3.

409. Fish P. V. New approaches for the treatment of Alzheimer's disease / Fish P.V., Steadman D., Bayle E.D., Whiting P. // *Bioorg Med Chem Lett.* - 2019. - Vol. 29. - № 2. - P. 125–133.

410. Jankovic J. Parkinson's disease: etiopathogenesis and treatment / Jankovic J., Tan E.K. // *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* - 2020. - Vol. 91. - № 8. - P. 795–808.

411. Carrera-Juliá S. Antioxidant Alternatives in the Treatment of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Comprehensive Review / Carrera-Juliá S., Moreno M.L., Barrios C., et al.// *Front Physiol.* - 2020. - Vol. 11. - P. 63.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых периодических изданиях

1. **Seryogina, E.S.**, Kamynina, A. V., Koroev, D.O., Volpina, O.M., Vinokurov, A.Y., Abramov, A.Y. (2024) RAGE induces physiological activation of NADPH oxidase in neurons and astrocytes and neuroprotection. *FEBS Journal*, 1–14. <https://doi.org/10.1111/febs.17086>
2. Vinokurov, A.Y., Soldatov, V.O., **Seregina, E.S.**, Dolgikh, A.I., Tagunov, P.A., Dunaev, A. V. et al. (2023) HPRT1 Deficiency Induces Alteration of Mitochondrial Energy Metabolism in the Brain. *Molecular Neurobiology*, Springer. **60**, 3147–57. <https://doi.org/10.1007/s12035-023-03266-2>
3. **Серёгина, Е.С.**, Стельмашук, О.А., Пьявченко, Г.А., Алексеев, А.Г., Воробьёв, Е.В., Кузнецова, Е.А. и др. (2018) Оценка влияния янтарной кислоты и соединений цинка на параметры метаболизма головного мозга крыс методом флуоресцентной спектроскопии. *Технологии Живых Систем*, **15**, 37–46.

Статьи в сборниках конференций и тезисы докладов

4. **Серёгина, Е.С.**, Винокуров, А.Ю., Абрамов, А.Ю. (2023) Изучение роли рецептора RAGE в патогенезе нейродегенерации. *Современные Методы Исследования в Клеточной Биологии и Медицине: Сборник Трудов Всероссийской Конференции, г Орёл: ОГУ Имени ИС Тургенева*, с. 23.
5. Винокуров, А.Ю., **Серёгина, Е.С.**, Камынина, А.В. , Абрамов, А.Ю. (2023) Роль селективной активации рецептора конечных продуктов гликирования в изменении окислительно-восстановительного баланса и обеспечении жизнеспособности клеток головного мозга. *Нейрокампус 2023: Эволюция Нейротехнологии Будущего Тезисы Участников Конференции*, с. 36–40.
6. **Серёгина, Е.С.**, Винокуров, А.Ю., Чапров, К.Д. , Абрамов, А.Ю. (2023) Изучение вклада различных источников АФК в редокс-баланс клеток головного мозга мышей с нокаутом генов синуклеинов. *Рецепторы и Внутриклеточная Сигнализация Сборник Статей Том I*, с. 496–501.
7. **Серёгина, Е.С.**, Ляхова, О.Л. (2022) Роль синуклеинов в редокс-регуляции сигналов в тканях головного мозга. *Клеточные Технологии в Экспериментальной Медицине: Сборник Научных Трудов По Материалам II Международной Научно-Практической Конференции*, с. 63–5.
8. Долгих, А.И., Тагунов, П.А., **Серёгина, Е.С.**, Винокуров, А.Ю. (2022) Роль RAGE-рецепторов в клеточной смерти, индуцируемой β -амилоидом. *Клеточные Технологии в Экспериментальной Медицине: Сборник Научных Трудов По Материалам II Международной Научно-Практической Конференции*, с. 66–8.
9. **Серёгина, Е.С.**, Уколова, П.А., Палалов, А.А., Чапров, К.Д. , Дунаев, А.В. (2022) Роль синуклеинов в редокс сигнале клеток головного мозга. *25-Ая Пуцинская Школа-Конференция Молодых Ученых с Международным Участием «Биология – Наука XXI Века»*, с. 330.
10. Долгих, А.И., Тагунов, П.А., **Серёгина, Е.С.**, Винокуров, А.Ю. (2022) Роль RAGE-рецепторов в окислительно-восстановительном балансе клеток мозга. *Фундаментальная и Прикладная Медицина Материалы Всероссийской Конференции Молодых Ученых*, с. 98–9.
11. Kozlov, I.O., Serov, D.A., **Seryogina, E.S.**, Astashev, M.E., Tankanag, A. V., Chaprov, K.D. et al. (2022) Oscillation processes in synuclein-KO mouse skin microcirculation: a pilot study. In: Genina EA, , Tuchin V V., editors. *Optical Technologies for Biology and Medicine*, SPIE. p. 42. <https://doi.org/10.1117/12.2626412>

12. Palalov, A.A., Gorlin, P.M., **Seryogina, E.S.**, Gorbunova, M. V., Alekseev, A.G., Zherebtsov, E.A. et al. (2021) NADH growth rate evaluation in different rat brain regions by fluorescence spectroscopy. In: Tuchin V V., and Genina EA, editors. *Saratov Fall Meeting 2020: Optical and Nanotechnologies for Biology and Medicine*, SPIE. p. 44. <https://doi.org/10.1117/12.2590803>
13. **Серёгина, Е.С.**, Уколова, П.А., Винокуров, А.Ю., Дунаев, А.В., Абрамов, А.Ю. (2021) Перепродукция активных форм кислорода в фибробластах с мутацией PINK1. *Рецепторы и Внутриклеточная Сигнализация, Сборник Статей*, с. 141–5.
14. **Серёгина, Е.С.**, Волтов, А.А., Ветров, И.А., Шуплецов, В.В., Брянская, Е.О., Абрамов, А.Ю. (2020) Исследование содержания митохондриальных форм надн в тканях отделов головного мозга крыс. *Физика и Радиоэлектроника в Медицине и Экологии - ФРЭМЭ'2020 Труды XIV Международной Научной Конференции с Научной Молодежной Школой Им ИИИ Спиридонова*, с. 89–92.
15. Пьявченко, Г.А., Алексеев, А.Г., **Серёгина, Е.С.**, Стельмашук, О.А., Жеребцов, Е.А., Кузнецова, Е.А. et al. (2019) Оценка токсического действия сукцината цинка на крыс-самцов линии Wistar. *Сборник Статей Всероссийской Юбилейной Научно-Практической Конференции с Международным Участием Посвященной 100-Летию ОГУ Имени ИС Тургенева и 20-Летию Медицинского Института «Андреевские Чтения. Трансляционная Медицина»*, ФГБОУ ВО «ОГУ имени И.С. Тургенева», Орёл. с. 460–4.
16. **Серёгина, Е.С.**, Стельмашук, О.А., Пьявченко, Г.А., Воробьев, Е.В., Кузнецова, Е.А., Алексеев, А.Г. et al. (2018) Оценка влияния антиоксидантных веществ на метаболические процессы клеток головного мозга методом флуоресцентной спектроскопии. *Физика и Радиоэлектроника в Медицине и Экологии Труды XIII Международной Научной Конференции с Научной Молодежной Школой Имени ИИИ Спиридонова В 2-х Книгах*, с. 62–6.
17. **Серёгина, Е.С.**, Стельмашук, О.А., Пьявченко, Г.А., Алексеев, А.Г., Воробьев, Е.К., Кузнецова, Е.А. et al. (2018) Применение флуоресцентной спектроскопии для оценки влияния антиоксидантных веществ на метаболические процессы коры головного мозга. *БИОЛОГИЯ -НАУКА XXI ВЕКА: 22-я Международная Пуцинская Школа-Конференция Молодых Ученых, 23-27 Апреля 2018 г.*, с. 235.
18. **Серёгина, Е.С.**, Стельмашук, О.А., Пьявченко, Г.А. (2018) Оценка функционального состояния структур коры головного мозга при помощи флуоресцентной спектроскопии. *Труды VII Всероссийского Конгресса Молодых Ученых*.
19. **Seryogina, E.**, Stelmashchuk, O., Pivachenko, G. (2017) Fluorescence spectroscopy usage possibilities for the laboratory rats metabolism evaluation. *Summer School on Optics & Photonics 2017 - Book of Abstract (June 1-3)*.
20. **Серёгина, Е.С.**, Стельмашук, О.А. (2017) Возможности применения флуоресцентной спектроскопии для оценки метаболических процессов лабораторных крыс. *Труды Международной Научной Конференции Студентов, Аспирантов и Молодых Ученых «Ломоносов - 2017»*.