

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова»
Национального исследовательского центра
«Курчатовский институт»

На правах рукописи

Голомидов Илья Михайлович

**ИЗУЧЕНИЕ РАННИХ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ ПРИ
НАСЛЕДСТВЕННОЙ ФОРМЕ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА И
ПОИСК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ АГЕНТОВ ДЛЯ ТЕРАПИИ
ЗАБОЛЕВАНИЯ НА МОДЕЛИ *DROSOPHILA MELANOGASTER***

1.5.7. Генетика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Саранцева Светлана Владимировна

Гатчина – 2022

Оглавление

Список сокращений	4
ВВЕДЕНИЕ	6
1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ИСТОЧНИКОВ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ.....	14
1.1. Развитие диагностики болезни Паркинсона	14
1.2. α -синуклеин в патогенезе болезни Паркинсона.....	20
1.3. Функции α -синуклеина.....	26
1.4. Альтернативные гены, участвующие в патогенезе БП	30
1.5. Моделирование болезни Паркинсона	36
1.5.1. Моделирование болезни Паркинсона на <i>Drosophila melanogaster</i> ..	39
1.6. Терапия Болезни Паркинсона.....	49
1.7. Выводы по разделу.....	56
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	58
2.1. Линии <i>D. melanogaster</i>	58
2.2. Получение линий мух с гиперэкспрессией гена <i>SNCA</i> человека дикого типа и его форм с мутациями	60
2.2. Приготовление препаратов личинки <i>D. melanogaster</i> для лазерной конфокальной микроскопии	68
2.3. Анализ количества дофаминергических нейронов, меченных GFP, в мозге <i>D. melanogaster</i>	69
2.4. Вестерн-блот анализ.....	69
2.5. Анализ уровня дофамина.....	70
2.6. Выделение РНК	71
2.7. Обратная транскрипция	71
2.8. ПЦР в реальном времени	72
2.9. Оценка локомоторной активности	73
2.10. Используемые фуллеренолы.....	74
2.11. Анализ окислительного стресса	74
2.12. Анализ количества дофаминергических нейронов в мозге <i>D.</i> <i>melanogaster</i> методом иммуногистохимического окрашивания	74

2.13. Фармакологические шапероны глюкоцеребозидазы.....	75
2.14. Анализ продолжительности жизни <i>D. melanogaster</i>	76
2.15. Статистическая обработка данных.....	76
3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	77
3.1. Морфологический и функциональный анализ нервно–мышечных соединений личинки <i>D. melanogaster</i> при экспрессии гена <i>SNCA</i> человека дикого типа и его форм с мутациями.....	77
3.2. Подавление экспрессии гена <i>SNCA</i> человека и его форм с мутациями способствует замедлению развития ранней нейропатологии при БП на модели <i>D. melanogaster</i>	86
3.3. Анализ нейропротекторной активности «красного пигмента» (КП) дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i> на модели БП на <i>D. melanogaster</i>	111
3.4. Исследование нейропротекторной активности фуллеренолов $C_{60}(OH)_{30}$ и $C_{70}(OH)_{30}$ на модели БП на <i>D. melanogaster</i>	120
3.5. Анализ нейропротекторных свойств фармакологических шаперонов глюкоцеребозидазы на модели БГ на <i>D. melanogaster</i>	132
ВЫВОДЫ.....	140
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	141

Список сокращений

AADC – декарбоксилаза ароматических аминокислот

DLS – метод динамического светорассеяния

ERAD – клеточный путь, который нацелен на неправильно свернутые белки эндоплазматического ретикула для их убиквитинирования и последующего разрушения протеасомой

Gapdh2 – ген, кодирующий глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназу 2 дрозофилы

GBA1 – ген глюкоцереброзидазы человека

GCase – глюкоцереброзидаза человека

GFP – ген, кодирующий зеленый флуоресцентный белок

GluRs – рецепторы глутамата

GWAS – полногеномный поиск ассоциаций

L-DOPA – леводопа

LIMP2 – лизосомный интегральный мембранный белок-2

LRKK2 – ген обогащенной лейциновыми повторами киназы человека 2 типа

MPP – N-метил-4-фенилпиридиний

NAC (non-amyloid component) – неамилоидный компонент α -синуклеина

nSyb – ген нейронального синаптобревина дрозофилы

PARK7 – ген белковой дегликазы DJ-1 человека

PINK1 – ген PTEN-индуцированной киназы человека 1 типа

PLK2 (Polo-like kinase 2) – ген, кодирующий киназу из семейства серин / треониновых протеинкиназ

PRKN – ген, кодирующий E3 убиквитин лигазу

PSAP – белок просапозин

RpL32 – ген, кодирующий рибосомальный протеин L32 дрозофилы

SANS – метод малоуглового рассеяния нейтронов

SAPC – белок сапозин C

SCARB2 – ген, кодирующий белок LIMP2

SN – черная субстанция (Substantia nigra).

SNCA – ген α -синуклеина человека

SNCA.A30P – ген α -синуклеина человека с мутацией A30P
SNCA.A53T – ген α -синуклеина человека с мутацией A53T
SNCA.WT – ген α -синуклеина человека дикого типа
Syt1 – ген синаптотагмина-1 дрозофилы
TARGET – система экспрессии, контролируемая во времени
VMAT2 – везикулярный переносчик моноаминов 2
A β – амилоидный пептид β
АИР – 5-фосфат-рибозил-аминоимидазол
АФК – активные формы кислорода
БГ – болезнь Гоше
БП – болезнь Паркинсона
ГЭБ – гематоэнцефалический барьер
ДН – дофаминергические нейроны
КОМТ – катехол-О-метилтрансфераза
КП – «красный пигмент» дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*
МАО-В – моноаминоксидаза В
МРТ – магнитно – резонансная томография
МтМП – мембранный потенциал митохондрий
НМС – нервно-мышечное соединение
ОФЭКТ – однофотонная эмиссионная компьютерная томография
ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография
ТЛ – тельце Леви
ТН – тирозингидроксилаза
ЦНС – центральная нервная система
ЭР – эндоплазматический ретикулум

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования.

Болезнь Паркинсона (БП) является одним из наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний, диагностика которого проводится на основании анализа моторных нарушений и обычно наблюдается у людей старше 60 лет. В Европе показатель распространенности данного заболевания оценивается примерно в два случая на тысячу [Balestrino et al., 2020] и увеличивается с 0,1% до 3% в возрастных группах от 70 до 90 лет [Pringsheim et al., 2014]. Однако этиология данного заболевания у большинства пациентов остается во многом неизвестной, хотя на сегодняшний день был выявлен ряд генетических причин возникновения заболевания. Семейные формы БП составляют порядка 15% случаев, однако их исследование позволяет значительно расширить представление о патогенезе заболевания. БП характеризуется гибелью дофаминергических нейронов (ДН) в черной субстанции (*Substantia nigra*) (SN). Дегенерация ДН приводит к уменьшению дофамина в стриатуме, что в свою очередь ведет к развитию двигательных нарушений, таких как брадикинезия, акинезия, тремор покоя, ригидность мускулатуры. Патологоанатомическое обследование часто выявляет наличие интранейрональных включений, получивших название телец Леви, преимущественно состоящих из белка α -синуклеина. На сегодняшний день считается, что именно склонность α -синуклеина к формированию агрегатов различной структуры является ключевым патоморфологическим фактором БП. Однако до сих пор нет однозначного представления, какие факторы приводят к нарушению фолдинга белка и стабилизации токсичных для клеток форм.

Но не только α -синуклеин играет существенную роль в патогенезе БП. Так, важную роль играет ген *GBA1*, кодирующий фермент – глюкоцереброзидазу, гомозиготные и компаундные гетерозиготные мутации в котором приводят к снижению активности фермента и развитию болезни Гоше (БГ). Наличие мутаций в гене *GBA1* в несколько раз увеличивают риск возникновения БП. Восстановление активности данного фермента различными терапевтическими

методами может использоваться не только для предотвращения БГ, но и для снижения риска возникновения БП.

На сегодняшний день компенсация дефицита дофамина достигается применением леводопы (L-DOPA). Она почти всегда сочетается с карбидопой или бенсеразидом – ингибиторами декарбоксилазы ароматических кислот. Побочные эффекты леводопы включают в себя тошноту, рвоту, ортостатическую гипотензию, спутанность сознания, нарушение сна, галлюцинации и дискинезии. Из-за беспокойства по поводу развития моторных осложнений, связанных с применением леводопы, многие пациенты неохотно начинают терапию этим препаратом, даже если испытывают неприятные симптомы, но все же данный препарат остается основополагающим при терапии БП. Однако эффект леводопы со временем снижается, поэтому можно говорить, что на сегодняшний день нет методов лечения, способных полностью избавить от данного заболевания.

По мере увеличения продолжительности жизни населения и отсутствия эффективной терапии, БП становится одной из главных медицинских и экономических проблем, с которыми сталкивается современное общество. Было предсказано, что в 2030 году БП затронет почти 9 миллионов человек по всему миру [Dorsey et al., 2007].

Представленные выше аргументы позволяют говорить о высокой **актуальности и перспективности** исследований, направленных на изучение патогенеза заболевания и поиск перспективных агентов, способных оказать нейропротекторное действие.

Степень разработанности темы.

Ген альфа–синуклеина человека (*SNCA*) был первым геном, идентифицированным с семейными формами заболевания. В 1997 году М. Н. Polymeropoulos и его коллеги сообщили о мутации, соответствующей замене G209A в гене *SNCA*, что привело к изменению аминокислоты аланин на треонин в позиции 53 (A53T). Впоследствии группы под руководством R. Kruger в 1998 и J. J. Zarranz в 2004 году идентифицировали еще две мутации, приводящих к изменениям аминокислот аланина на пролин в позиции 30 (A30P) и глутаминовой

кислоты на лизин в позиции 46 (E46K), которые оказались связаны с аутосомно-доминантными формами БП. На сегодняшний день известно порядка шести мутаций в гене *SNCA*, связанных с аутосомно-доминантным наследованием БП. После открытия генов, связанных с данным заболеванием, были предприняты попытки создать модели на животных, которые бы адекватно отражали патогенез БП. Первая трансгенная модель БП на мыши при экспрессии гена *SNCA* человека была создана E. Masliah в 2000 году. А первая модель БП на дрозофиле с использованием системы *UAS-GAL4* при экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями была описана M. B. Feany и W. W. Bender в 2000 году. Эти модели положили начало активного изучения α -синуклеина и его функциональной роли в развитии нейропатологии. Рядом исследователей, в частности J. Diao, R. Nixon, F. Fornai и другими, было показано, что α -синуклеин играет важную роль в процессе высвобождения синаптических везикул. Однако разнообразность функций α -синуклеина до сих пор не определена окончательно, и в современных исследованиях открываются все больше новых взаимодействий α -синуклеина с другими белками, регулирующими синаптическую функцию.

Структура α -синуклина представляла большой интерес для исследователей. V. Uversky и его коллеги посвятили большое количество работ роли α -синуклеина в патогенезе заболевания, а также изучению многогранной структуры данного белка. Помимо этого, изучались различия в функциональной активности, токсичности, а также фолдинге α -синуклеина дикого типа и его форм с мутациями. Такими исследованиями занимались группы K. A. Conway, A. M. Cuervo, Y. Nagai и др. Благодаря своей способности принимать различные конформации, при неправильном фолдинге, α -синуклеин может терять свою синаптическую активность, образовывать агрегаты различной структуры и приводить к гибели клеток. Поскольку до сих пор нет определенной концепции в том, какие формы α -синуклеина представляют наибольшую опасность для клетки, изучение вопроса токсичности различных конформационных состояний α -синуклеина поднималось в работах D. P. Karpinar, A. L. Mougenot, L. Pieri, M. M. Tompkins и др.

Также исследователями проводится обширный скрининг различных соединений, как целенаправленно синтезированных, так и природной структуры, способных оказать положительное влияние как на симптомы заболевания на поздних стадиях, так и на раннем этапе, когда значительные двигательные нарушения отсутствуют.

Поскольку большинство работ было направлено на изучение механизмов заболевания на поздних этапах его развития, мы исследовали ранние нейродегенеративные процессы, протекающие при гиперэкспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями, на модели БП на *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*), а также провели анализ нейропротекторной активности ряда соединений, одни из которых являются веществами природного происхождения, другие – целенаправленно созданы методами химического синтеза.

Целью работы является изучение на модели *Drosophila melanogaster* ранних нейродегенеративных процессов при наследственной форме болезни Паркинсона и поиск потенциальных агентов для разработки терапии заболевания.

Задачи:

1. Провести морфологический и функциональный анализ нервно–мышечных соединений на личинке *D. melanogaster* при экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его формы с мутацией, приводящей к замене А30Р и формы с мутацией, приводящей к замене А53Т.
2. Проанализировать влияние подавления экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями на нейродегенеративные процессы на *D. melanogaster*
3. Исследовать нейропротекторную активность «красного пигмента» дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на модели БП на *D. melanogaster*.
4. Исследовать нейропротекторную активность фуллеренолов $C_{60}(OH)_{30}$ и $C_{70}(OH)_{30}$ на модели БП на *D. melanogaster*.
5. Проанализировать нейропротекторные свойства фармакологических шаперонов глюкоцереброзидазы на модели болезни Гоше на *D. melanogaster*.

Научная новизна.

В работе впервые показано, что гиперэкспрессия гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями влияет на формирование синаптических контактов дрозофилы, а также на распределение синаптических белков в синаптическом бутоне. Также впервые продемонстрировано, что подавление экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями замедляет развитие нейропатологии, а наличие растворимых форм α -синуклеина связано с прогрессированием нейродегенерации. В системе *in vivo* на модели БП на *D. melanogaster* показана нейропротекторная активность «красного пигмента» дрожжей *S. cerevisiae* и нейропротекторные свойства фуллеренолов $C_{60}(OH)_{30}$ и $C_{70}(OH)_{30}$. Показано, что применение фармакологических шаперонов глюкоцереброзидазы, относящихся к классу аллостерических активаторов, может влиять на скорость развития нейродегенерации на модели болезни Гоше на *D. melanogaster*.

Теоретическая и практическая значимость работы.

В работе показана роль α -синуклеина в формировании и поддержании синаптических контактов, а также его влияние на распределение синаптического белка синаптотагмина. Была установлена связь между развитием ранней нейропатологии и продолжительностью экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями. А также показано влияние гиперэкспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями на уровень экспрессии других синаптических генов.

Практическая значимость работы обусловлена исследованием «красного пигмента» дрожжей *S. cerevisiae* и фуллеренолов $C_{60}(OH)_{30}$ и $C_{70}(OH)_{30}$ в качестве соединений, обладающих возможным нейропротекторным эффектом. В работе показана эффективность данных веществ в отношении замедления развития нейродегенерации. Также исследован новый класс низкомолекулярных шаперонов глюкоцереброзидазы, направленных на терапию БГ, но опосредованно способных влиять на снижение риска развития БП. Была продемонстрирована

эффективность данного класса соединений в отношении развития нейродегенерации на модели БГ на *D. melanogaster*. Как итог – некоторые из исследованных веществ в дальнейшем могут найти применение для разработки терапии БП.

Положения, выносимые на защиту.

1. Гиперэкспрессия гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями в моторных нейронах личинок *D. melanogaster* приводит к нарушению формирования синаптических контактов, а также влияет на локализацию синаптотагмина.
2. Подавление экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями у *D. melanogaster* приводит к уменьшению растворимых форм белка α -синуклеина и замедлению развития нейропатологии.
3. «Красный пигмент» дрожжей *S. cerevisiae* обладает нейропротекторной активностью на модели БП на *D. melanogaster*.
4. Использование фуллеренолов $C_{60}(OH)_{30}$ и $C_{70}(OH)_{30}$ способствует замедлению нейродегенеративных процессов на модели БП на *D. melanogaster*.
5. Фармакологические шапероны глюкоцереброзидазы, относящиеся к классу аллостерических активаторов, замедляют развитие нейродегенерации на модели БГ на *D. melanogaster*.

Степень достоверности результатов. Достоверность экспериментальных результатов и сделанных на их основе выводов подтверждается согласующимися между собой данными, полученными различными и независимыми современными генетическими и биохимическими методами.

Апробация работы. Материалы диссертации представлены на следующих конференциях и конгрессах: Международная конференция «Дрозофила в генетике и медицине» (Гатчина, Россия, 2020 г.), XVI International Interdisciplinary Congress «Neuroscience for medicine and psychology» (Судак, Россия, 2020 г.), Международный конгресс «VII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров» (Санкт-Петербург, Россия, 2019 г.), XIV Internstional

Interdisciplinary Congress «Neuroscience for medicine and psychology» (Судак, Россия, 2018 г.) и других.

Связь с проектами. Полученные результаты были достигнуты в рамках работы по грантам РФФИ № 12-04-00898 «Дисфункция синапсов и болезнь Паркинсона», №15-04-99647 «Фуллерены в терапии нейродегенеративных заболеваний» и РНФ № 17-75-20159 «Анализ нейропротекторных свойств фармакологических шаперонов глюкоцереброзидазы».

Публикации. По теме исследования опубликовано 4 статьи в журналах, включенных в международные базы данных Scopus и Web of Science, а также 20 тезисов в сборниках российских и международных конференций, входящих в РИНЦ.

1. Golomidov I. M., Latypova E. M., Ryabova E. V., Bolshakova O. I., Komissarov A. E., Sarantseva S. V. Reduction of the α -synuclein expression promotes slowing down early neuropathology development in the Drosophila model of Parkinson's disease // J. Neurogenet. 2022. № 36 (1). P. 1 – 10.
2. Golomidov I., Bolshakova O., Komissarov A., Sharoyko V., Slepneva E., Slobodina A., Latypova E., Zherybyateva O., Tennikova T., Sarantseva S. The neuroprotective effect of fullerlenols on a model of Parkinson's disease in Drosophila melanogaster // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2020. № 523 (2). P. 446 – 451.
3. Bolshakova O., Borisenkova A., Suyasova M., Sedov V., Slobodina A., Timoshenko S., Varfolomeeva E., Golomidov I., Lebedev V., Aksenov V., Sarantseva S. In vitro and in vivo study of the toxicity of fullerlenols C60, C70 and C1200 obtained by an original two step method // Materials Science & Engineering C. 2019. №. 104. P. 109945.
4. Nevzglyadova O.V., Mikhailova E.V., Artemov A.V., Ozerova Y.E., Ivanova P.A., Golomidov I.M., Bolshakova O.I., Zenin V.V., Kostyleva E.I., Soidla T.R., Sarantseva S.V. Yeast red pigment modifies cloned human α -synuclein pathogenesis in Parkinson disease models in Saccharomyces cerevisiae and Drosophila melanogaster // Neurochemistry international. 2018. №. 120. P. 172 – 181

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 175 страницах текста и состоит из следующих разделов: Оглавление, Список сокращений, Введение, Аналитический обзор, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Выводы, Список литературы. Список литературы включает 311 источников. Работа иллюстрирована четырьмя таблицами и 33 рисунками.

1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ИСТОЧНИКОВ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

1.1. Развитие диагностики болезни Паркинсона

В 1817 году Джеймс Паркинсон опубликовал «Эссе о Трясущемся параличе» [Lees, 2007]. В этой монографии он рассмотрел историческую подоплеку описываемого им состояния, его признаки и симптомы, дифференциальную диагностику и этиологию заболевания, путем индивидуального наблюдения за шестью пациентами. Он описал тремор покоя, постуральную неустойчивость и шаркающую походку. Д. Паркинсон специально не объяснял брадикинезию или ригидность, поскольку в соответствии с термином «паралич», считал пациентов слабыми, хотя и признавал, что нарушения зависят не от общей слабости, а от нарушения нервного воздействия в пораженных частях тела.

За пределами Англии первым человеком, обратившим внимание на вклад Д. Паркинсона, был Жан-Мартен Шарко – главный клинический невролог XIX века. Его официальные лекции и неофициальные презентации привлекали большую международную аудиторию врачей и стажеров, и поэтому его аудитория стала ключевым местом для коммуникации по неврологической тематике. Ж.-М. Шарко добавил существенные детали к наблюдениям Д. Паркинсона, определив брадикинезию и ригидность как ключевые особенности заболевания. Он признал, что тремор был типичным, но не существенным диагностическим признаком и оспаривал использование термина «паралич» в качестве дескриптора, потому что пациенты явно не обладали слабостью. В знак уважения к Д. Паркинсону, он предложил, чтобы данное заболевание носило название «болезнь Паркинсона». Международный авторитет Ж.-М. Шарко и широкие исследования БП сыграли ключевую роль в ее установлении в качестве новой неврологической нозологии.

Другой человек, чье имя неразрывно связано с БП – немецкий невролог Фриц Генрих Леви. В 1912 году Ф. Г. Леви выполнил вскрытие пациента, страдающего БП, и сообщил о наличии специфичного нейронального включения, которое сегодня носит его имя – тельце Леви (ТЛ). Эти цитоплазматические агрегаты были первым патологическим признаком заболевания и в настоящее

время используются для посмертного подтверждения диагноза БП. ТЛ не являются уникальными для БП и могут быть связаны с другими патологиями, включая болезнь Альцгеймера или даже синдром Дауна. ТЛ обычно описывают как интрацитоплазматические включения размером 2-5 мкм с плотным ядром и прозрачным ореолом (Рисунок 1).



Рисунок 1 – Тельце Леви (коричневое пятно) в нейроне чёрного вещества при болезни Паркинсона. Коричневый цвет придаёт окрашенный белок α -синуклеин [Spillantini et al., 1998].

Они также могут наблюдаться в нейритах, но редко – во внеклеточном пространстве. Их структура очень неоднородна и, как было показано, включает различные составляющие [Kuusisto et al., 2003]. Точный биохимический состав ТЛ остается неясным, но было показано, что помимо других нерастворимых белков, их основным компонентом является α -синуклеин [Spillantini et al., 1997]. Включения α -синуклеина обычно обнаруживаются в местах гибели крупных клеток, в частности, в черной субстанции мозга. Посмертные исследования, проведенные на пациентах с БП, показали, что ТЛ впервые появляются в спинном двигательном ядре блуждающего нерва и переднем обонятельном пучке [Braak et al., 2006]. На поздних стадиях заболевания ТЛ могут поражать кору, начиная с передне-медиально-височной части мезокортекса, постепенно распространяясь на неокортекс. Было высказано предположение, что присутствие ТЛ в блуждающем нерве на ранних стадиях заболевания может способствовать

развитию вегетативных симптомов, таких как бессонница, тревожность, нарушение пищеварения, которые предшествуют моторной дисфункции.

Спустя несколько лет после открытия телец Леви невропатолог Константин Николаевич Третьяков предположил, что *Substantia Nigra* является основной областью мозга, которая поражается при БП и отвечает за проявление симптомов заболевания. В 1938 году немецкий патологоанатом Рольф Хасслер подтвердил гибель нейронов в черной субстанции у пациентов с БП. Таким образом, обширная дегенерация дофаминергических нейронов, наряду с присутствием телец Леви стали основным признаком заболевания и остаются ими по сей день. В середине 50-х годов Герберт Эрингер и Олег Горникевич исследовали влияние дофамина на центральную нервную систему и, в частности, на ядра базальных ганглиев, и пришли к заключению о том, что дофамин является «ключевым игроком» в патогенезе БП.

До сегодняшнего дня диагностика БП основывается на наблюдении моторных симптомов, описанных Д. Паркинсоном в 1817 г. Классическим симптомом является тремор покоя, который проявляется, когда часть тела не участвует в целенаправленном движении и является изначально односторонним, но по мере развития заболевания, прогрессирует в двусторонний тремор. Он является основным симптомом, однако клинически, у каждого четвертого пациента с БП, тремор никогда не развивается [Helmich et al., 2012], а у 30% может наблюдаться тремор губ, челюсти или даже языка [Jankovic, 2008; Baumann, 2012]. Тремор головы и голоса встречаются нечасто, и в таких случаях при дифференциальной диагностике следует учитывать эссенциальный тремор. Брадикинезия или замедленность движений часто описывается пациентами как усталость или слабость и обусловлена поражением экстрапирамидной системы [Berardelli, 2001]. Из всех основных признаков брадикинезия имеет наиболее сильную корреляцию со степенью дефицита дофамина [Vingerhoets et al., 1997]. Олигокинезия – сложный симптом, заключающийся в затруднении инициации произвольных движений и неспособности развивать адекватное усилие по темпу и амплитуде [Угрюмов, 2010]. Ригидность наблюдается почти у всех пациентов с

БП. Когда исследуется диапазон движений, пациенты с БП часто демонстрируют жесткость «зубчатого колеса». На более поздних стадиях заболевания у пациентов с БП, скорее всего, будет наблюдаться постуральная неустойчивость с повышенным риском падения. Это нарушение ставит под угрозу способность сохранять осанку [Kim et al., 2013]. Другим проявлением может быть «шаркающая походка», когда пациенты делают гораздо более быстрые и короткие шаги. Помимо «классических» моторных симптомов, описанных выше, наблюдаются и другие моторные проявления. К ним относятся маскированное выражение лица (гипомимия), снижение частоты моргания, затуманенное зрение, дистония, сутулость. Патологические и нейровизуализационные исследования показывают, что моторные признаки БП развиваются только тогда, когда гибнут порядка 50-70% нейронов черной субстанции [Postuma et al., 2010].

БП также имеет множество немоторных симптомов, которые могут предшествовать постановке диагноза или проявиться после постановки диагноза, основанного на двигательных нарушениях. Немоторные симптомы включают в себя: психоневрологические симптомы (депрессия, когнитивные дисфункции и деменция), нарушения сна (бессонница, нарушения быстрых движений глаз, яркие сновидения) и вегетативные симптомы (нарушения мочеиспускания, ортостатическая гипотензия, эректильная дисфункция) [Chaudhuri et al., 2009]. Когнитивные нарушения и деменция регистрируются у 80% пациентов с БП после 15–20 лет прогрессирования заболевания [Aarsland et al., 2010]. Тяжелые когнитивные нарушения в значительной степени связаны с моторными и вегетативными дисфункциями у пациентов с БП [Verbaan et al., 2007]. Депрессивные расстройства распространены среди 50% пациентов с БП. Данные на сегодняшний день указывают на то, что патология при БП приводит не только к дегенерации дофаминергических нейронов, но и к дискретной потере серотонергических и норадренергических нейронов [Buddhala et al., 2015]. Это говорит о том, что нарушение регуляции нейронных цепей, связанных с регуляцией настроения, является вероятной причиной депрессивных расстройств [Aarsland et al., 2012]. Нарушения сна наблюдаются у 25% пациентов с БП. Как

правило, бессонница (недостаточная продолжительность сна) имеет более высокую распространенность (до 90%) среди пациентов с БП [Videnovic et al., 2013]. Желудочно-кишечные расстройства включают дисфагию (затрудненное глотание) из-за нарушения работы рта, глотки и пищевода, а также дисфункцию кишечника. В дополнение к вышеуказанным немоторным проявлениям, значительный процент (от 40% до 60%) пациентов с многолетним течением БП страдает ортостатической гипотензией (снижение систолического артериального давления на 20 мм рт. ст. и диастолического артериального давления на 10 мм рт. ст. в течение 3 мин после стояния [Low, 2008]), возможно, из-за недостаточного выделения норэпинефрина [Isaacson et al., 2014].

Клиническая картина БП представляет собой связь четырех основных компонентов: двигательных симптомов, когнитивных изменений, поведенческих/нейропсихиатрических изменений и симптомов, связанных с нарушениями вегетативной нервной системы. Однако, при этом не должно проявляться маркеров, указывающих на альтернативную причину паркинсонизма, включая другие нейродегенеративные заболевания, такие как: прогрессирующий надъядерный паралич, множественная системная атрофия и кортикобазальная дегенерация. Для постановки клинического диагноза используются критерии Банка мозга Британского общества по борьбе с болезнью Паркинсона [Hughes et al., 1992]. Хотя стандартом диагностики БП и является невропатологическая оценка, общепринятых стандартных патологических диагностических критериев БП не существует. В целом, постановка диагноза БП зависит от наличия умеренной или тяжелой потери нейронов в *SN* с обнаружением телец Леви в оставшихся нейронах и отсутствия признаков других заболеваний, вызывающих паркинсонизм.

Для обеспечения возможности диагностировать заболевание на ранней стадии, даже до появления двигательных симптомов, разрабатываются стратегии обнаружения различных биомаркеров БП. Ожидается, что использование новых лекарственных средств, способных изменить течение заболевания, будет наиболее эффективным, если начинать лечение в продромальный премоторный период.

Потенциальные клинические маркеры включают в себя: обонятельные нарушения, измеряемые тестом по идентификации запаха Университета Пенсильвании и нарушения поведения во сне с быстрым движением глаз, диагностируемое с помощью полисомнографии [American Academy of Sleep Medicine, 2005]. К одним из самых эффективных методов визуализации специфических маркеров относятся позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) и однофотонная эмиссионная компьютерной томографии (ОФЭКТ) – это методы оценки плотности пресинаптических дофаминергических окончаний в полосатом теле по следующим показателям:

- Активность декарбоксилазы ароматических аминокислот с F-допа ПЭТ
- Доступность пресинаптических переносчиков дофамина с I-2 β -карбометокси-3 β -(4-йодофенил)-тропаном (I-CIT) ОФЭКТ или I-2 β -карбометокси-3 β -(4-йодофенил)-N-(3-фторпропил)-нортропан (I-FP-CIT) ОФЭКТ
- Количество везикулярного переносчика моноаминов (VMAT2) с C-дигидротетрабеназином (C-DTBZ) ПЭТ или с F-дигидротетрабеназином (F-DTBZ) ПЭТ.

Эти технологии визуализации предполагалось использовать для дифференциации БП с двигательными симптомами от нарушений без потери нейронов в *SN* (например, эссенциального тремора). Однако после нескольких результатов клинических испытаний [Parkinson Study Group PRECEPT Investigators, 2007; Whone et al., 2003] способность данных методов отличать БП на ранних стадиях была поставлена под сомнение, поскольку изображения, получаемые с ПЭТ или ОФЭКТ, отклоняются от нормы только при значительной потере дофаминергических нейронов в *SN*. Одних методов визуализации дофамина недостаточно для диагностики БП, потому что они не позволяют надежно отличить БП от других паркинсонических синдромов. Стандартная магнитно-резонансная томография (МРТ) играет посредственную роль в диагностике БП, но МРТ в высоком и сверхвысоком поле в сочетании с передовыми методами, такими как диффузионно-тензорная визуализация,

исследуются для ранней диагностики БП [Cochrane et al., 2013; Lehericy et al., 2014].

Фосфорилированный α -синуклеин как в соматических, так и в вегетативных нервных клетках был идентифицирован при биопсии кожи пациентов с симптоматической БП, что дает возможность использовать этот подход в диагностике заболевания на продромальных стадиях. Концентрация α -синуклеина, DJ-1, тау и β -амилоида, а также активность β -глюкоцереброзидазы в спинномозговой жидкости исследуются как потенциальные биохимические маркеры раннего начала заболевания [Hong et al., 2010; Parnetti et al., 2013]. По мере того, как генетические исследования становятся дешевле, конкретные генетические сигнатуры, вероятно, будут применяться в качестве генетических биомаркеров для диагностики БП. Однако этого также может быть недостаточно для точной и ранней диагностики такого сложного заболевания. Для этого может потребоваться комбинация визуализирующих, биохимических и генетических маркеров.

1.2. α -синуклеин в патогенезе болезни Паркинсона

α -синуклеин первоначально был идентифицирован как пресинаптический белок в электрическом органе *Torpedo californica* [Maroteaux et al., 1998]. Последующие работы подтвердили его синаптическую и ядерную локализацию, что объясняет его название «Синуклеин» (SYNapse + NUCLEus, synuclein) [Maroteaux et al., 1998; Clayton et al., 1998]. В последующие годы S. Najafo и его коллеги выделили данный белок из мозга крупного рогатого скота и определили его молекулярную массу в 14 кДа [Najafo et al., 1990].

α -синуклеин человека представляет собой небольшой белок из 140 аминокислотных остатков, кодируемый геном *SNCA*, расположенным на 4 хромосоме (Рисунок 2).

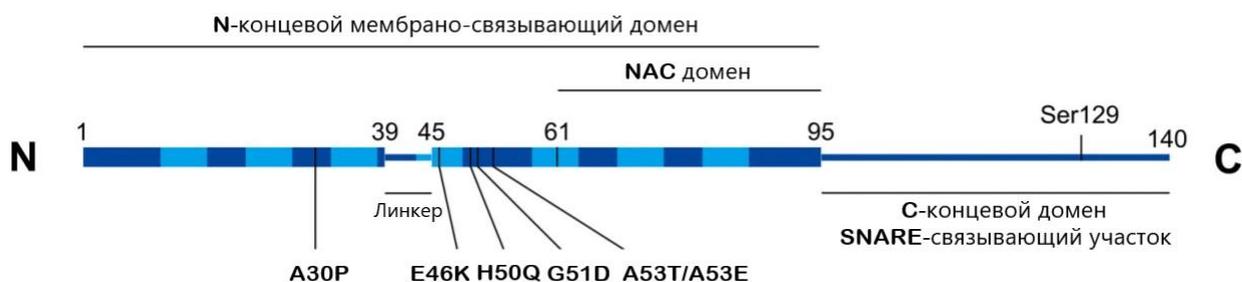


Рисунок 2 – Структурная схема α -синуклеина. Семь повторов (остатки 10–15, 21–26, 32–37, 43–48, 58–63, 69–74 и 80–85) в N-концевой области изображены более светлым синим оттенком. Нумерация на рисунке относится к аминокислотам. Указаны БП-ассоциированные миссенс-мутации. Ser-129 является сайтом фосфорилирования. С-концевая область содержит высокую плотность заряженных остатков (не показано) [Wang et al., 2015].

N-концевой участок включает сайты аутосомно-доминантных наследственных мутаций, вызывающих БП: A30P, E46K, H50Q, G51D, A53T, A53E. Также он содержит семь мембрано-связывающих повторов и может взаимодействовать с мембранами, образуя длинную спираль или «сломанную спираль», состоящую из двух спиралей, соединенных линкером [Bartels et al., 2010]. Было показано, что липидное окружение стимулирует образование спиральных структур α -синуклеина, а также ускоряет его агрегацию [Lee et al., 2002a]. Центральный гидрофобный участок (основания 66–95) включает последовательность NAC (non-amyloid component), склонную к агрегации и впервые обнаруженную в амилоидных бляшках при болезни Альцгеймера. α -синуклеин был также выделен из амилоидных скоплений фронтальной зоны коры людей с типичными клиническими нейропатологическими проявлениями болезни Альцгеймера [Uéda et al., 1993]. И лишь затем было обнаружено, что α -синуклеин является основным компонентом телец Леви при БП. С-концевой участок белка (основания 96–140) отрицательно заряжен за счет кислых аминокислот. В этом регионе локализованы несколько сайтов фосфорилирования (Tyr-125, -133, -136 и Ser-129), а также домен, отвечающий за шаперонную активность α -синуклеина (основания 125–140) [Recchia et al., 2004].

Конформационное поведение α -синуклеина в различных условиях было тщательно исследовано. Было показано, что структура α -синуклеина чрезвычайно чувствительна к окружающей среде и может быть определена изменением условий. Список известных конформаций α -синуклеина включает:

1. Развернутое мономерное состояние – является состоянием α -синуклеина в физиологических условиях *in vitro* [Uversky et al., 2001b] и *in vivo* [McNulty et al., 2006].
2. Состояние расплавленной глобулы, является преобладающим состоянием α -синуклеина при таких условиях как: низкий pH, высокая температура [Uversky et al., 2001].
3. Взаимодействие α -синуклеина с везикулами, содержащими кислые фосфолипиды, сопровождается увеличением содержания α -спиральных структур [Perrin et al., 2000].
4. Различные органические растворители увеличивают содержание упорядоченной вторичной структуры α -синуклеина [Munishkina et al., 2003].
5. Димеры [Uversky et al., 2001a].
6. Олигомеры [Lashuel et al., 2002].
7. Нерастворимые агрегаты. Было показано, что α -синуклеин собирается в большие нерастворимые агрегаты с двумя различными морфологиями – аморфными агрегатами и фибриллами. В большинстве случаев основными нерастворимыми формами являются амилоидоподобные фибриллы.

Подробное описание специфических особенностей структуры α -синуклеина, имеет важное значение для потенциального объяснения его восприимчивости к патологическому фолдингу и агрегации. Например, исследования, направленные на то, чтобы раскрыть структурные свойства нативного α -синуклеина в клетках мозга, дают четкое представление о том, как различия в структуре могут способствовать спонтанному неправильному фолдингу и агрегации белка. Существует две основные теории о природе эндогенного α -синуклеина. Подавляющее большинство исследователей определило его как нативно развернутый мономер с молекулярным весом порядка

14 кДа, приобретающего α -спиральную вторичную структуру только при связывании с липидными везикулами [Recchia et al., 2004; Fauvet et al., 2012]. Напротив, в 2011 году T. Bartels и его коллеги [Bartels et al., 2011] сообщили, что эндогенный α -синуклеин встречается в основном в виде стабильно сложенного тетрамера с молекулярным весом около 58 кДа. Аналитическое ультрацентрифугирование и электронная микроскопия показали, что нативный α -синуклеин обладает α -спиральной структурой без взаимодействия с везикулами. Таким образом, было сделано предположение, что неправильному фолдингу и агрегации α -синуклеина на самом деле предшествует дестабилизация спирально свернутых тетрамеров [Bartels et al., 2011]. Однако, в 2013 году мономерное состояние нативного α -синуклеина в мозге было подтверждено J. Burre и его коллегами [Burre et al., 2013]. Они продемонстрировали, что нативный α -синуклеин является в значительной степени неструктурированным мономером, который агрегирует с течением времени. Авторы определили молекулярную массу белка порядка 63 кДа. Она была близка к предсказанной для сложенного тетрамера, но анализ, проведенный методом эксклюзионной хроматографии в сочетании с многоугловым рассеянием лазерного света (SEC-MALS), противоречил сложенной мультимерной конформации [Burre et al., 2013].

Эти результаты подтверждают теорию, согласно которой лабильное, а не стабильное конформационное состояние – это то, что делает α -синуклеин гораздо более склонным к агрегации. В неупорядоченном, развернутом состоянии α -синуклеин подвергается множеству динамических изменений, различных посттрансляционных модификаций, которые играют решающую роль в регуляции его функциональной активности и конформационной пластичности. С-конец и N-конец, которые содержат большое количество заряженных остатков, были идентифицированы как две основные области, особенно чувствительные к ацетилированию, фосфорилированию, окислению, нитрованию, убиквитинированию и усечению [Iyer et al., 2016].

Интересно, что как нитрованные, так и фосфорилированные формы α -синуклеина присутствуют в мозге пациентов с БП, что позволяет предположить,

что эти модификации могут способствовать развитию заболевания. В мозге здоровых людей только ~4% общего α -синуклеина фосфорилируется по остатку Ser-129. Напротив, в тельцах Леви, обнаруживаемых при БП, наиболее распространена (~90%) посттрансляционная модификация α -синуклеина с фосфорилированием по остатку Ser-129 [Fujiwara et al., 2002; Neumann et al., 2002]. Фосфорилирование α -синуклеина в положении Ser-129 может способствовать накоплению олигомерного α -синуклеина *in vitro* [Anderson et al., 2006] и ускорять образование включений α -синуклеина [Smith, 2005; Sugeno et al., 2008]. Кроме того, наличие фосфорилированного по положению Ser-129 α -синуклеина, ускоряло потерю нейронов как у дрозофилы, так и у трансгенных мышей [Chen et al., 2005; Wakamatsu et al., 2007; Schell et al., 2009]. Хотя функция фосфорилированного α -синуклеина до конца неясна, многие данные свидетельствуют о том, что фосфорилирование по Ser-129 вовлечено в процесс развития заболевания. Фосфорилирование и дефосфорилирование α -синуклеина регулируется протеинкиназами и фосфопротеинфосфатазами соответственно. До сих пор неясно, какие киназы фосфорилируют α -синуклеин по Ser-129 при патогенных условиях. Однако нейropатологический анализ мозга приматов показал, что уровни экспрессии гена *PLK2* (Polo-like kinase 2 – киназа, является членом семейства серин / треониновых протеинкиназ, которые играют роль в нормальном делении клеток) были повышены и коррелировали с увеличением фосфорилированного α -синуклеина Ser-129 [McCormack et al., 2012]. Трансгенные мыши с гиперэкспрессией гена *SNCA* человека, демонстрируют значительно более высокие уровни *PLK2* по сравнению с контролем. Кроме того, *PLK2* колокализовался с фосфорилированным α -синуклеином [Mbefo et al., 2010]. Фосфопротеинфосфатаза 2A (PP2A) является цитоплазматической серин / треонин фосфатазой и составляет более 50% общей активности серин / треонин фосфатазы мозга [Strack et al., 1997]. PP2A важна для дефосфорилирования α -синуклеина в положении Ser-129. Присутствие агрегатов α -синуклеина может снижать активность PP2A, а гиперэкспрессия гена *SNCA* и образование телец Леви приводит к нарушению активности PP2A в головном мозге [Wu et al., 2012].

Эти данные свидетельствуют о том, что модуляция активности PP2A имеет важное значение при развитии заболевания.

Процессы нитрования и окисления α -синуклеина вовлечены в патогенез БП, тем не менее, неясно, являются ли они причиной, приводящей к образованию агрегатов α -синуклеина, или они возникают при взаимодействии активных форм азота с предварительно сформированными фибриллами. α -синуклеин содержит четыре тирозина: Y39, Y125, Y133 и Y136, причем Y125 и Y39 являются основными мишенями нитрования [Takahashi et al., 2002; Danielson et al., 2009]. Считается, что нитрование α -синуклеина индуцирует его олигомеризацию, что может послужить основой для образования более крупных агрегатов белка [Giasson et al., 2000]. В то же время нитрование ингибирует образование фибрилл α -синуклеина [Norris et al., 2003] и связывание α -синуклеина с липидными везикулами [Sevcsik et al., 2011].

В свою очередь, исследования наследственных форм БП позволили определить, что одной мутации в гене α -синуклеина человека достаточно, чтобы вызвать развитие патологии. Важно отметить, что точечные мутации A30P и A53T, как было показано, ускоряют агрегацию, но не обязательно приводят к образованию фибрилл α -синуклеина [Li et al., 2002; Conway et al., 1998; Narhi et al., 1999; Giasson et al., 1999; Conway et al., 2006; Conway et al., 2000; Li et al., 2001]. Анализ склонности к образованию β -структур или α -спирали для α -синуклеина дикого типа и его форм с мутациями A30P и A53T показал, что обе мутации снижают гидрофобность на участке вблизи аминокислотной замены. Склонность к образованию α -спиральной структуры в N-концевой области у обеих форм α -синуклеина с мутациями была снижена, в то время как предрасположенность к образованию β -структур была повышена [Li et al., 2001]. В соответствии с этими наблюдениями было показано, что мутация A30P нарушает взаимодействия между аминокислотными остатками в области, ответственной за формирование спиральной структуры, которая существует в белке дикого типа [Eliezer et al., 2001], в то время как мутация A53T приводит к формированию более развернутой конформации в небольшой области вокруг

сайта мутации [Bussell et al., 2001]. В результате мутантные формы α -синуклеина демонстрируют более высокую скорость фибрилляции (α -синуклеин с мутацией A53T) или аморфной агрегации (α -синуклеин с мутацией A30P).

В дополнение сообщалось, что некоторые условия способствуют конформационным модификациям и управляют патологическим каскадом превращения из мономерного α -синуклеина в олигомеры и нерастворимые фибриллы [Kanaan et al., 2012]. Они варьируются от факторов окружающей среды, таких как низкий pH, присутствие АФК, до связывания или взаимодействия с молекулярными партнерами [Uversky et al., 2002], включая дофамин [Duce et al., 2017]. Также показано, что олигомеры и протофибриллы могут ускорять образование агрегатов α -синуклеина [Luk et al., 2009].

1.3. Функции α -синуклеина

Хотя α -синуклеин накапливается в различных частях клетки, значительная его часть сосредоточена в синапсе и транспортируется в синаптические везикулы посредством различных механизмов переноса и взаимодействия со специфическими липидами [Fortin et al., 2004]. При этом α -синуклеин с большей вероятностью будет взаимодействовать с синаптическими пузырьками малой формы, структурами с высокой кривизной мембраны и заряженными липидными группами [Pranke et al., 2011]. α -синуклеин взаимодействует с пресинаптической терминалью и регулирует синаптическую передачу, а также может играть важную роль в цикличности синаптических везикул, модулируя размер пула везикул, их мобилизацию и эндоцитоз [Bendor et al., 2013].

α -синуклеин также взаимодействует с белком CSPalpha (cysteine-string protein-alpha) [Chandra et al., 2005], действуя как шаперон для потенцирования сборки SNARE комплекса [Burre et al., 2010]. α -синуклеин способен стимулировать SNARE-опосредованное слияние синаптических пузырьков. В то же время олигомеры α -синуклеина ингибируют слияние пузырьков [Choi et al., 2015], однако и нативная форма α -синуклеина способна ингибировать данный процесс при более высоких концентрациях [Lai et al., 2014]. В некоторых

условиях взаимодействие α -синуклеина с липидами, способно ингибировать SNARE-опосредованное слияние пузырьков [DeWitt et al., 2013]. Поскольку эта функция требует взаимодействия между α -синуклеином и мембранами, особую роль играет N-концевая область белка, из-за ее известных липид-связывающих свойств. Мутации, расположенные в этой области белка, препятствуют связыванию α -синуклеина с мембранами, что приводит к ограничению подвижности синаптических пузырьков и ослаблению процессов экзо/эндоцитоза [Wang et al., 2014]. Кроме того, мутации могут ускорять агрегацию α -синуклеина *in vitro*, а при гиперэкспрессии гена *SNCA* человека в *SN* мышей проявляется повышенная токсичность для клеток и моторные нарушения [Burge et al., 2015]. Мономеры α -синуклеина могут являться переходной конформацией, пока белок не взаимодействует с мембранами и не мультимеризуется для выполнения своей клеточной функции. Поскольку все известные мутации, связанные с БП, расположены в липид-связывающем домене, возможно, что они изменяют гомеостаз, необходимый для взаимодействия мембраны с белком и его преобразования в соответствующую конформацию, тем самым нарушая физиологическую функцию α -синуклеина. Синаптическая функциональность α -синуклеина сильно зависит от его конформационного состояния.

α -синуклеин был также обнаружен в ядре, но это открытие до сих пор остается спорным [Goers et al., 2003; Huang et al., 2011]. Механизмы, которые лежат в основе транспорта α -синуклеина в ядро, остаются до конца не изученными, но, оказавшись внутри ядра, он может играть определенную роль в регуляции транскрипции. До сих пор нет единого мнения о том, посредством какого механизма α -синуклеин может регулировать транскрипцию, но сообщалось, что он может связываться с промотором PGC1alpha, важнейшим фактором транскрипции митохондрий, что оказывает негативное воздействие на функциональную активность митохондрий [Desplats et al., 2012; Siddiqui et al., 2012]. Также было показано, что α -синуклеин взаимодействует с гистонами и может оказывать влияние на их функцию через циклы ацетилирования – деацетилирования [Kontopoulos et al., 2006; Liu et al., 2011].

Особое внимание было уделено потенциальной роли α -синуклеина в качестве регулятора биосинтеза и высвобождения дофамина. В некоторых исследованиях использовали нокауты генов α - и/или β -синуклеина мыши для исследования нарушения гомеостаза и регуляции уровня дофамина [Chandra et al., 2004]. Было показано, что α -синуклеин взаимодействует с тирозингидроксилазой (ТН), снижая ее фосфорилирование, что затем приводит к снижению синтеза дофамина. В свою очередь агрегаты α -синуклеина теряют способность взаимодействовать с тирозингидроксилазой и как следствие, увеличивается ее фосфорилирование, и повышается выработка L-ДОФА-декарбоксилазы (AADC) [Alerte et al., 2008], что приводит к уменьшению количества VMAT2 в синаптических везикулах [Chen et al., 2008], нарушению оборота и повторного захвата синаптических пузырьков [Fountaine et al., 2008]. Это ведет к общему увеличению цитозольного дофамина, который быстро окисляется с образованием токсичных аддуктов – хинонов и активных форм кислорода [Asanuma et al., 2003], что может в дальнейшем способствовать преобразованию растворимых форм α -синуклеина в нерастворимые агрегаты и приводить к окончательной потере функций α -синуклеина и нарушению функций взаимодействующих с ним белков [Perez et al., 2004].

Многие исследования в настоящее время подтвердили, что часть α -синуклеина находится в митохондриях и что он вызывает подавление активности комплекса I. Предполагается, что α -синуклеин, в форме небольших олигомеров, вызывает фрагментацию митохондрий [Loeb et al., 2010; Nakamura et al., 2011]. α -синуклеин дикого типа и его формы с мутациями, возможно, через тот же механизм фрагментации, также вызывают избыточную митофагию, которая приводит к удалению митохондрий и гибели нейронов [Choubey et al., 2011]. Благодаря такому воздействию на митохондрии, и особенно ингибированию комплекса I, α -синуклеин может потенциально индуцировать продукцию АФК, окислительный стресс и, как следствие, гибель нейронов. Есть некоторые доказательства того, что гиперэкспрессия α -синуклеина может индуцировать продукцию АФК, и что их нейтрализация с помощью молекулярных или

фармакологических средств может иметь нейропротекторный эффект у млекопитающих [Liu et al., 2011].

α -синуклеин может также влиять на динамику цитоскелета. Многие исследования предполагают наличие связи α -синуклеина с микротрубочками. Было показано взаимодействие α -синуклеина с тубулином – в результате гиперэкспрессии гена *SNCA* человека снижается уровень полимеризации тубулина [Zhou et al., 2010]. Кроме того, деполимеризация тубулина может привести к нарушению созревания протофибрилл α -синуклеина в зрелые фибриллы, что может способствовать усилению нейротоксичности [Lee et al., 2002b]. Другим важным фактором является взаимосвязь α -синуклеина с белком тау, которая, вероятно, важна в патогенезе спорадических форм заболевания, поскольку в GWAS два соответствующих гена являются генами, демонстрирующими наибольшую связь с БП [Nalls et al., 2011]. Хотя тауопатия не является характерной чертой БП, в некоторых случаях она проявляется [Kotzbauer, 2004]. В таких случаях патология, связанная с аномальной агрегацией α -синуклеина и тау может происходить в одной и той же клетке, но образующиеся агрегаты являются отдельными. Фактически, каждый из этих двух белков имеет тенденцию провоцировать агрегацию друг друга [Giasson et al., 2003]. Кроме того, α -синуклеин может препятствовать полимеризации актина и таким образом, косвенно влиять на клеточный транспорт и синаптическую функцию.

Другим процессом, который подвержен воздействию изменений в функциональной активности α -синуклеина и может быть связан с влиянием на цитоскелет, является аксонный транспорт. Показано, что часть α -синуклеина транспортируется посредством быстрого аксонного транспорта, который основан на движении везикулярных структур по микротрубочкам. Наличие мутации A30P в α -синуклеине приводит к нарушению связывания белка с везикулами и как следствие, к его накоплению в определенных компартментах клетки [Henning, 2001]. Также недавно продемонстрировано, что гиперэкспрессия гена *SNCA* человека с мутацией A53T у мышей приводила к изменениям в количестве белка

динеина – основного моторного белка при ретроградном аксонном транспорте, что в свою очередь вело к развитию моторных нарушений [Liu et al., 2014].

1.4. Альтернативные гены, участвующие в патогенезе БП

К настоящему времени было идентифицировано более 70 вариантов локусов, связанных с риском развития БП [Senkevich et al., 2021]. Информация о клинических данных, связанных с различными генами и мутациями доступна в онлайн базе данных «International Parkinson and Movement Disorder Society». В течение последних двух десятилетий были разработаны многочисленные экспериментальные модели на животных, основанные на экспрессии различных генов с известными мутациями, связанными с риском развития БП. Такие модели имеют первостепенное значение для понимания молекулярных механизмов, лежащих в основе развития заболевания.

Ген глюкоцереброзидазы (*GBA1*)

Значимым открытием в патогенезе БП стало обнаружение мутаций в гене *GBA1*, которые значительно увеличивают риск возникновения БП. Ген *GBA1* кодирует лизосомный белок глюкоцереброзидазу (GCase), который гидролизует гликолипид глюкозилцерамид с образованием глюкозы и церамида, а глюкозилсфингозин до сфингозина и глюкозы [Chen et al., 2020]. Гомозиготные и компаундные гетерозиготные мутации в гене *GBA1* вызывают легкую или тяжелую форму БГ, при которой из-за низкой активности фермента в органах накапливается его субстрат. БГ характеризуется накоплением глюкозилцерамида по большей части в макрофагах периферической крови человека. В гене *GBA1* было выявлено более 495 мутаций ассоциированных с БГ [Chen et al., 2020], большая часть из них – миссенс-мутации, хотя также были обнаружены мутации сайта сплайсинга, делеции и рекомбинантные аллели [Hruska et al., 2008].

GCase представляет собой 497-аминокислотный мембраносвязанный белок, с 39-аминокислотной лидерной последовательностью и пятью сайтами гликозилирования [Mistry et al., 2017]. Белок синтезируется в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) и гликозилируется, но фермент становится активным только при

переносе в кислую среду лизосомы. В отличие от других лизосомных белков, которые доставляются к лизосоме путем связывания с маннозо-6-фосфатным рецептором, GCase транспортируется из эндоплазматического ретикулула специальным транспортером – лизосомным интегральным мембранным белком-2 (LIMP2), кодируемым геном *SCARB2* [Reczek et al., 2007]. Оказавшись в лизосоме, фермент взаимодействует с другим, активирующим его белком – сапозинем С (SAPC) [Tamargo et al., 2012], который представляет собой субъединицу белка–предшественника, просапозина (PSAP). При этом было показано, что варианты глюкоцереброзидазы с наличием мутаций подвергаются ЭР–ассоциированной деградации (ERAD) и более того, что существует зависимость между степенью протеасомной деградации и тяжестью заболевания [Ron et al., 2005]. Современные данные также указывают на то, что мутации в гене *GBA1*, чаще всего N370S и L444P, приводят клеточному ответу и ЭР–стрессу [Maor et al., 2013].

Ассоциация между мутациями в гене *GBA1* и БП была обнаружена клинически путем скрининга 57 пациентов с патологически подтвержденной спорадической формой БП [Goker-Alpan, 2004]. Последующие исследования подтвердили, что у пациентов с БП частота мутаций в гене *GBA1* варьируется в зависимости от популяции: например, поскольку носителей мутаций в гене *GBA1* намного выше среди евреев–ашкенази, более 15% пациентов данной группы с БП несут, по крайней мере, одну распространенную мутацию в гене *GBA1* [Sidransky, 2005; Sidransky et al., 2009]. По различным оценкам, частота мутаций в гене *GBA1* у пациентов с БП составляет от 5 до 10%, а риск развития БП у носителей мутаций оценивается в 20% в возрасте старше 70 лет [Scharif, 2015]. Эта ассоциация может быть связана с мутациями в гене *GBA1*, которые способствуют агрегации α –синуклеина и накоплению глюкозилцерамида из–за потери функции фермента, что влияет на пути аутофагии, активность лизосом и фолдинг α –синуклеина [Sidransky et al., 2012]. Также, было показано, что мутации в гене *GBA1* и последующая потеря функциональной активности фермента, вызывают накопление α –синуклеина, что дополнительно препятствует доставке глюкоцереброзидазы к лизосоме. Ингибирование активности

глюкоцереброзидазы на моделях *in vitro*, а также на модели *in vivo* на мышах демонстрирует повышенное накопление α -синуклеина и липидов из-за нарушения функционирования лизосом [Mazzulli et al., 2011]. Было продемонстрировано, что остаточная активность GCase с гомозиготными мутациями N370S, V394L, R463C составляет 20–35% от активности фермента дикого типа, в то время как остаточная активность фермента с мутацией L444P составляет 5–10% и даже полностью отсутствует в варианте с мутацией 84dupG. Существуют также полиморфные варианты гена E326K и T369M, которые приводят к снижению активности GCase до 50%, однако они не приводят к развитию БГ в гомозиготном состоянии [Senkevich et al., 2021; Alcalay et al., 2015]. Кроме того, исследования показали, что пациенты с БП с мутациями в гене *GBA1* имеют более ранний возраст начала и более быстрое прогрессирование заболевания, а также более высокую частоту немоторных симптомов, таких как: расстройство поведения, расстройство сна, вегетативная дисфункция, галлюцинации и снижение когнитивных функций по сравнению с теми, у кого БП не связана с *GBA1* [Gan-Or et al., 2018].

В последние несколько лет были предприняты большие усилия, чтобы попытаться выяснить патогенную роль мутаций в гене *GBA1* при БП, и было сформулировано много различных гипотез [Blandini et al., 2019]. Связь между БП и нарушением функций лизосом уже установлена генетическими и функциональными исследованиями [Robak et al., 2017; Ysselstein et al., 2019]. Кроме того, многочисленные гены, связанные с активностью лизосом и путями аутофагии, были связаны с БП, подчеркивая центральную роль лизосомно-аутофагического пути в заболевании. Эти системы имеют решающее значение для деградации α -синуклеина, накопление которого является одним из отличительных признаков БП. Глюкоцереброзидаза играет важную роль в этих процессах и, в частности, во взаимодействии с α -синуклеином [Mazzulli et al., 2011].

У *D. melanogaster* имеется 2 ортолога гена *GBA1* человека, расположенных на 3 хромосоме: *CG31414 (Gbalb)* и *CG31148 (Gba1a)*, кодирующие белки на 50%

и 31% соответственно гомологичные белку человека [Maor et al., 2016]. Было показано, что вставка мобильного элемента *Minos* в *CG31414* вызывает накопление α -гидроксиглюкозилцерамида во всем теле дрозофилы, а также вызывает снижение локомоторной активности, нарушение сна и сокращение продолжительности жизни при нормальных условиях. α -гидроксиглюкозилцерамид также накапливается у мышей с БГ 2-го типа [Doering et al., 1999]. Таким образом, накопление α -гидроксиглюкозилцерамида может быть связано с отклонениями в поведении и сокращением продолжительности жизни мух *CG31414Mi*. Нарушение двигательной активности является одинаково важным маркером в моделях БГ [Suzuki et al., 2013], а также в моделях БП.

Ген обогащенной лейциновыми повторами киназы 2 (*LRRK2*)

Наследование гена *LRRK2*, как и гена *SNCA*, при БП происходит по аутосомно-доминантному типу. *LRRK2* – это ген, кодирующий большой цитоплазматический белок, содержащий несколько консервативных доменов, включая домен ГТФазы и домен киназы, который, как полагают, играет роль в образовании патологических агрегатов, увеличении окислительного стресса и активных форм кислорода, что приводит к нейрональной аутофагии [Pirkevi et al., 2009].

Мутации в гене *LRRK2* являются наиболее часто связанными с БП [Kumari et al., 2009]. Одна из распространенных мутаций – G2019S, обнаруживается в 5–7% семейных и 0.6–1.6% спорадических случаев [Pchelina et al., 2014]. Поскольку ген *LRRK2* кодирует сложный мультидоменный белок, любые изменения в данном гене потенциально могут вызывать множество патогенных эффектов. Хотя до сих пор точная физиологическая функция белка *LRRK2* не ясна, на сегодняшний день считается, что патогенные мутации либо увеличивают киназную активность (мутация G2019S), либо уменьшают ГТФазную активность [Esteves et al., 2014]. Ген *Lrrk D. melanogaster* является уникальным гомологом *LRRK2* человека, в котором отсутствуют определенные N-концевые повторяющиеся последовательности. У мух, с экспрессией гена *LRRK2* человека с мутацией G2019S, наблюдалась возрастная потеря дофаминергических нейронов,

нарушение локомоторной активности, а также снижение продолжительности жизни [Lin et al., 2010], что не противоречит представлениям о том, что наличие мутаций, ведущих к увеличению киназной активности белка, провоцируют развитие БП. В то же время, мухи без мутаций в данном гене, имеют нормальную жизнеспособность и дегенерация дофаминергических нейронов отсутствует [Wang et al., 2008].

LRRK2 фосфорилирует эндофилин А, центральный компонент эндоцитоза синаптических везикул, что влияет на его способность связываться с мембраной. Наличие мутаций, которые приводят как к снижению, так и к усилению функции LRRK2 у мух приводило к нарушению рециркуляции синаптических пузырьков [Matta et al., 2012]. Интересно, что Эндофилин А имеет тесную функциональную связь с синаптоянином [Verstreken et al., 2003], который связан с рецессивной формой БП. Также сообщалось, что мутация G2019S в LRRK2 вызывает дегенерацию в зрительной системе дрозофилы [Hindle et al., 2013]. Связь с внутриклеточным транспортом везикул в дальнейшем позволила идентифицировать роль гена *LRRK2/Lrrk* в Rab7–зависимом созревании эндолизосом. Было показано, что *Lrrk* физически взаимодействует с Rab5, Rab7 и Rab9 (в поздних эндосомах и лизосомах), но не взаимодействует с Rab5 в ранних эндосомах. Потеря функциональной активности *Lrrk* приводила к накоплению заметно увеличенных лизосом и их аномальному расположению [Dodson et al., 2014]. В совокупности эти данные позволяют предположить, что патогенные мутации в гене *Lrrk* могут нарушать эндосомальный перенос путем изменения взаимодействия с эндосомальными белками.

Также LRRK2 взаимодействует с α -синуклеином, что позволяет предположить, что изменение в функциональной активности одного из этих белков может оказывать влияние на другой [Guerreiro et al., 2013]. Формирование префибриллярных агрегатов α -синуклеина тесно коррелирует с нарушением функций комплекса Гольджи и микротрубочек. LRRK2 связывается с микротрубочками и влияет на их ацетилирование [Caesar et al., 2013]. Наличие мутаций в LRRK2 способствует его усиленному связыванию с микротрубочками

и вызывает избыточное деацетилирование, что в свою очередь приводит к угнетению аксонного транспорта в нейронах дрозофилы и млекопитающих, а также снижению локомоторной активности [Godena et al., 2014].

Ген Паркин (*PRKN*)

Мутации в гене *PRKN* являются наиболее частой причиной аутосомно-рецессивного паркинсонизма. Ген *PRKN* кодирует E3 убиквитин лигазу, что первоначально позволило сделать предположение о том, что он будет регулировать уровень субстратов, склонных к агрегации. Однако, именно благодаря изучению дрозофилы с мутациями в гене *park*, было показано, что данный белок играет важную роль в гомеостазе митохондрий. Муши, у которых отсутствует паркин, характеризуются сниженной продолжительностью жизни, дегенерацией дофаминергических нейронов, локомоторной дисфункцией, обусловленной апоптотической дегенерацией мускулатуры и мужским бесплодием [Greene et al., 2003].

Ультраструктурные исследования показали, что наиболее ранняя потеря целостности митохондрий проявляется во время мышечной дегенерации [Greene et al., 2003]. В настоящее время именно нарушение функции митохондрий является основным признаком, характерным для многих организмов, связанным с мутациями в гене *PRKN*.

В совокупности эти наблюдения показали, что нарушение функции митохондрий является важным фактором, способствующим гибели дофаминергических нейронов у пациентов с нарушенной функцией паркина.

Ген РТЕН-индуцированной киназы 1 типа (*PINK1*)

Мутации в гене *PINK1*, который кодирует серин-треонин киназу митохондрий, являются редкой причиной рецессивного паркинсонизма. Но изучение этого гена позволило понять несколько важных моментов о возможных патогенных механизмах развития БП. Основная роль гена *PINK1* – поддержание целостности митохондрий, была вновь установлена анализом ортолога у дрозофилы – *Pink1* [Park et al., 2006]. Наличие мутаций в гене *Pink1* приводит к фрагментации митохондриальных крист, увеличенной восприимчивости к

окислительному стрессу, а также потере дофаминергических нейронов и уменьшению продолжительности жизни. Мутации в гене *Pink1* приводят к развитию сходства фенотипа с мутантами по гену *park*. При этом негативное влияние, спровоцированное наличием мутаций в гене *Pink1*, может быть частично скомпенсировано гиперэкспрессией гена *park*. Но в то же время, гиперэкспрессия гена *Pink1* не оказывает влияния на фенотип, проявляющийся из-за наличия мутаций в гене *park* [Park et al., 2006]. Эти данные продемонстрировали, что оба белка действуют по общему пути, который регулирует гомеостаз митохондрий. Кроме того, у дрозофилы *Pink1* непосредственно фосфорилирует паркин и контролирует его перемещение в митохондрии [Kim et al., 2008].

Ген *PARK7 (DJ-1)*

Ген *PARK7* кодирует белковую дегликазу DJ-1 – это высоко консервативный небольшой белок с до конца неопределенной функцией с гомологией к протеазам, киназам и небольшим белкам теплового шока. У дрозофилы есть два гена, гомологичных гену *DJ-1* человека: *dj-1 β* и *DJ-1 α* . Потеря активности одного или обоих генов (*dj-1 β* и/или *DJ-1 α*) не приводит к снижению жизнеспособности, плодовитости или потере дофаминергических нейронов. Однако мутации в генах *dj-1 β* и *DJ-1 α* , приводят к развитию чувствительности к агентам, вызывающим окислительный стресс, таких как паракват и ротенон [Meulener et al., 2005]. Как и у позвоночных, *dj-1 β* модифицируется сульфонированием консервативного остатка цистеина при окислительном стрессе. При этом, при добавлении в корм различных антиоксидантов, включая витамин С и витамин Е, продолжительность жизни мух с мутацией в гене *dj-1 β* значительно увеличивается [Lavara-Culebras et al., 2010], что указывает на терапевтическую пользу антиоксидантов.

1.5. Моделирование болезни Паркинсона

Открытие замены аланина на треонин (A53T) в гене *SNCA* [Polymeropoulos, 1997] и замены аланина на пролин (A30P) [Krüger et al., 1998], которые ответственны за развитие аутосомно-доминантной формы БП, привело к

созданию первых моделей БП на животных. Первая генетическая модель БП на мышах была опубликована в 2000 году E. Masliah, вскоре после открытия вовлеченности гена *SNCA* человека в семейные формы БП. Гиперэкспрессия гена *SNCA* человека дикого типа, под контролем промотора β -фактора роста тромбоцитов, индуцировала образование включений α -синуклеина [Masliah, 2000]. Интересно, что наблюдаемые эффекты, зависели от уровня экспрессии α -синуклеина. Таким образом, полученные исследователями данные хорошо отражают ситуацию, когда дупликация, трипликация или четырехкратная репликация гена *SNCA* достаточны для того, чтобы вызвать БП у человека, что также позволяет предположить, что уровень экспрессии гена *SNCA* может быть критическим фактором, определяющим прогресс заболевания [Singleton, 2003]. В том же 2000 году M. V. Feany и W.W. Bender опубликовали свою модель БП на дрозофиле. Трансгенные мухи экспрессировали ген *SNCA* человека дикого типа и его формы с мутациями A30P и A53T. В этой модели использовалась бинарная система экспрессии *UAS-GAL4*, которая обеспечивает промотор-зависимую клеточную или тканеспецифичную экспрессию трансгена. У дрозофилы гиперэкспрессия гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями с использованием системы *UAS-GAL4* приводит к возрастной и селективной потере дофаминергических нейронов в дорсомедиальных кластерах мозга, а также к дегенерации фоторецепторных клеток в сетчатке [Feany et al., 2000].

С тех пор было разработано большое количество трансгенных моделей на животных с использованием различных промоторов для экспрессии гена *SNCA* человека. В этих моделях накопление α -синуклеина или отсутствие включений сильно зависит от различных факторов:

1. Типа промотора, который управляет экспрессией трансгена [Kuo et al., 2010].
2. Клеточной специфичности и уровня экспрессии трансгена.
3. Экспрессируемой формы гена *SNCA* человека.

Помимо моделей на животных, основанных на экспрессии гена *SNCA* человека, было разработано множество моделей с экспрессией других генов, участвующих в патогенезе БП. Так, гиперэкспрессия гена *LRRK2* (ген

обогащенной лейциновыми повторами киназы 2) дикого типа у трансгенных ВАС (bacterial artificial chromosome) мышей вызывает повышенное высвобождение дофамина в стриатуме и моторную гиперактивность, тогда как гиперэкспрессия гена с мутацией G2019S вызывает возрастное снижение содержания дофамина в стриатуме, тем самым предполагая роль LRRK2 в трансмиссии дофамина [Li et al., 2007]. Аналогично, у ВАС мышей с гиперэкспрессией гена *LRRK2* человека с мутацией R1441G была обнаружена сниженная локомоторная активность, прогрессирующая со временем и приводящая к почти полной неподвижности к 10-месячному возрасту. Данные проявления значительно напоминают акинезию у пациентов с прогрессирующей БП, развитие которой можно значительно замедлить с помощью дофаминергических агентов. Наличие мутаций в LRRK2 может приводить к его патологическому взаимодействию с α -синуклеином, вызывая агрегацию и фосфорилирование последнего [Kumar et al., 2011; Qing et al., 2009]. Однако, гиперэкспрессия гена *LRRK2* дикого типа или его форм с мутациями не вызывает гибели нейрональных клеток. Мыши с нокаутом *Lrrk2* жизнеспособны и не демонстрируют серьезных отклонений или повышенной чувствительности к МРТР.

Мыши с нокаутом гена *Pink1* (ген РТЕН-индуцированной киназы 1 типа) проявляют повышенную восприимчивость к окислительному стрессу и продукции активных форм кислорода (АФК) [Gautier et al., 2008]. Также наблюдалось возрастное уменьшение уровня дофамина и снижение двигательной активности [Gispert et al., 2009]. Однако у таких мышей не было обнаружено образования ТЛ или нигростриальной дегенерации в возрасте до 18 месяцев, но присутствовали нарушения в функционировании митохондрий.

У мышей с нокаутом гена *Prkn* не наблюдалось гибели дофаминергических нейронов, но развивались моторные и когнитивные нарушения [Itier et al., 2003]. У таких мышей проявлялась более высокая чувствительность к нейротоксинам и развитие воспалительных процессов, что позволяет предположить, что мутации в гене *Prkn* могут повышать чувствительность дофаминергических нейронов к клеточным повреждениям. В то же время, у трансгенных мышей с

гиперэкспрессией гена *PRKN* с мутацией Q311X развивались моторные нарушения и возрастная нигростриальная дегенерация, а также наблюдалось нарушение фолдинга α -синуклеина, что дает возможность предположить, что продукт экспрессии гена *PRKN* с мутацией Q311X может действовать как доминантно–негативный модулятор [Lu et al., 2009].

Мыши с нокаутом гена *Park7* (белковая дегликаза DJ-1) становятся более чувствительны к токсинам и окислительному стрессу, но, как и мыши с нокаутом генов *Prkn* и *Pink1* не проявляют серьезных нейрональных аномалий.

Помимо анализа генов, непосредственно связанных с патогенезом заболевания, существуют модели, в которых нарушается экспрессия гена или экспрессируется форма гена с мутациями, являющихся фактором риска развития БП, например: *GBA1*, *MAPT*, и *GAK*. Последние данные указывают на то, что у носителей мутаций в гене глюкоцереброзидазы (*GBA1*) повышен риск развития БП и что у 5-10% пациентов с БП наблюдается мутация в *GBA1* [Schipira et al., 2013].

1.5.1. Моделирование болезни Паркинсона на *Drosophila melanogaster*

D. melanogaster – один из распространенных модельных биологических объектов для исследования широкого круга различных заболеваний. Высокая степень функционального сродства с позвоночными делает ее отличным объектом для моделирования нейродегенеративных заболеваний. Расшифровка генома человека и дрозофилы показала, что 77% генов наследственных болезней человека имеют гомологов у дрозофилы [Adams, 2000]. Нервная система дрозофилы состоит из сложно устроенного мозга, брюшной нервной цепочки и периферических нервов [Hirth, 2010]. В развитии нервной системы участвует большое количество генов, мутации в которых приводят к различным нарушениям [Ou et al., 2008; Röttgen et al., 1998; Reuter et al., 2003]. Состояние нервной системы дрозофилы можно анализировать различными специфичными методами, такими как: изучение морфологии глаз и структуры сетчатки с помощью световой микроскопии; анализ степени вакуолизации центрального

мозга с помощью гистологического окрашивания; анализ продолжительности жизни и уровня двигательной активности, оценка морфологии нервно–мышечных соединений для определения потенциальных синаптических аномалий; анализ количества нейронов при помощи иммуногистохимического окрашивания [McGurk et al., 2015; Gevedon et al., 2019].

Возможность создавать трансгенных *D. melanogaster*, с экспрессией генов человека, позволяет использовать их для изучения влияния конкретного гена на патогенез заболевания. Одним из самых больших преимуществ использования дрозофилы для исследования механизмов заболевания является способность проводить идентификацию генов, которые могут влиять на фенотип заболевания. Этот подход также может определять клеточные факторы, которые влияют на патогенные процессы. Более того, супрессоры, идентифицированные из таких скринингов, представляют собой потенциальные мишени для лекарственных препаратов.

Для того чтобы иметь возможность проводить аналогию между процессами, протекающими в моделях БП на животных, с заболеваниями человека необходимо присутствие основных признаков заболевания, а именно: наличие нейродегенеративного процесса, а также изменение уровня локомоторной активности. Хотя анатомическое расположение дофаминергических нейронов во взрослом мозге дрозофилы имеет значительные отличия от мозга позвоночных, в недавней работе подчеркивалась древняя функциональная гомология этих систем [Strausfeld et al., 2013]. Дрозофила обладает сложной дофаминергической нейронной системой, содержащей кластеры дофаминергических нейронов. На стадии личинки дрозофилы присутствуют семь кластеров дофаминергических нейронов: DM1a, DM1b, DM2, DL1a, DL1b, DL2a и DL2b [Blanco et al., 2011]. На взрослой стадии дофаминергические нейроны расположены в девяти основных кластерах: PAM, PAL, PPM1, PPM2, PPM3, PPL1, PPL2ab, PPL2c и VUM (Рисунок 3) [Nassel et al., 1992; Mao, 2009].

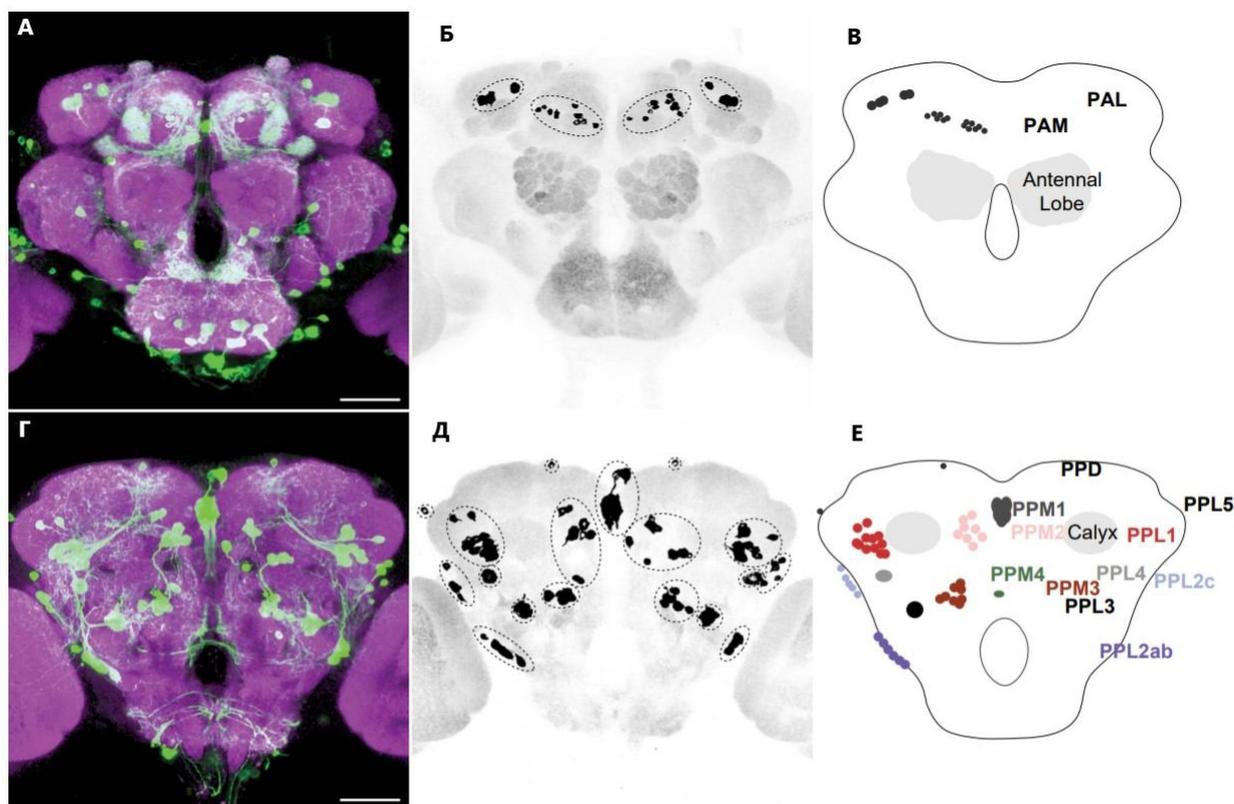


Рисунок 3 – Визуализация дофаминергических нейронов в мозге *D. melanogaster*. (А–В) Вид спереди. (Г–Е) Вид сзади. (А, Г) Дофаминергические нейроны окрашены зеленым цветом с помощью TH-GAL4&3x0003E;UAS-mCD8::GFP, мозг окрашен в пурпурный цвет с помощью антител против pc82. Масштаб 50 мкм. (Б, Д) Идентификация дофаминергических нейронов в мозге, полученных с помощью изображений (А) и (Г). Пунктирные линии объединяют группу клеток. (В, Е) Схема, указывающая название, местоположение и типичное количество кластеров дофаминергических нейронов [Мао, 2009].

Помимо сходства некоторых основных функций нервной системы, сходное протекание у человека и дрозофилы имеют основные биологические процессы, такие как регуляция клеточной гибели [Jennings, 2011]. Эта функциональная гомология дает уверенность в том, что анализ целостности дофаминергических нейронов у дрозофилы имеет, отношение к нейронам, которые преимущественно восприимчивы к гибели при БП.

Исследования на *D. melanogaster* также дают возможность изучать влияние генетических и экологических факторов на процессы старения и наоборот,

оценивать влияние старения на интересующий биологический процесс. Она представляет собой удобную модель для анализа нейродегенеративных процессов на протяжении всей жизни, включая предсимптоматическую фазу прогрессирования заболевания, которая важна для понимания ранних процессов нейродегенерации.

Модели БП на дрозофиле характеризуются снижением уровня локомоции, дегенерацией ДН, дисфункцией митохондрий, окислительным стрессом, а также агрегацией α -синуклеина [Whitworth, 2011]. На *D. melanogaster* было разработано множество моделей БП, основанных как на экспрессии ортологов генов человека с мутациями, участвующих в патогенезе заболевания, так и трансгенных моделях с экспрессией генов человека. Также существуют модели, основанные на воздействии различных токсичных веществ (Таблица 1).

Таблица 1 – модели БП на *D. melanogaster*

Ген, ассоциируемый с БП	Анализируемая стадия <i>D. melanogaster</i>	Анализируемые признаки
<i>Модели БП на дрозофиле с мутациями в ортологах генов человека</i>		
Мутации в гене <i>park</i>	имаго	Количество ДН, уровень локомоторной активности [Whitworth et al., 2005]
Мутации в гене <i>Pink1</i> ; нокдаун <i>Pink1</i> в ДН	имаго	Продолжительность жизни, количество ДН, уровень дофамина, уровень экспрессии транспортеров дофамина, уровень локомоторной активности [Clark et al., 2006; Molina-Mateo et al., 2017; Park et al., 2006; Yang et al., 2006]
Мутации в <i>Lrrk</i>	имаго	Количество ДН, уровень локомоторной активности [Lee et

		al., 2007]
Двойной нокаут <i>dj-1β</i> и <i>DJ-1α</i> сопряженный с воздействием параквата, ротенона и перекиси водорода	имаго	Продолжительность жизни, количество ДН [Meulener et al., 2005]
Двойные гетерозиготные мутанты по <i>Gba1b</i> и <i>Gba1a</i> (CG31414 и CG31148)	имаго	Продолжительность жизни, количество ДН, уровень локомоторной активности [Maor et al., 2016]
<i>Трансгенные модели, экспрессирующие гены человека</i>		
Одновременная экспрессия <i>MAPT</i> и <i>SNCA</i>	Личинка, имаго	Морфология нервно-мышечных соединений, морфология сетчатки, количество ДН [Roy et al., 2014]
Экспрессия во всех клетках нервной системы и клеточно-специфичная экспрессия <i>SNCA</i> дикого типа и его форм с мутациями А30Р и А53Т	имаго	Количество ДН, визуализация включений α -синуклеина и телец Леви, уровень локомоторной активности, окраска срезов сетчатки [Feany et al., 2000]
Экспрессия во всех клетках нервной системы, а также клеточно-	имаго	Продолжительность жизни, морфология фоторецепторных клеток, количество ДН [Liu et al., 2008]

специфичная экспрессия <i>LRRK2</i> и <i>LRRK2-G2019S</i>		
Экспрессия <i>PRKN</i> в ДН	имаго	Количество ДН [Yang et al., 2003]
Модели на основе воздействия токсинов		
Ротенон	имаго	Количество ДН, локомоторная активность [Coulom, 2004]
Паракват	имаго	Количество ДН, локомоторная активность, продолжительность жизни, уровень дофамина [Shukla et al., 2016; Chaudhuri et al., 2007]

Хорошо зарекомендовавшим себя подходом к изучению экспрессии или нокдауну специфических генов на дрозофиле является система *UAS-GAL4* [Brand et al., 1993]. *GAL4* – это фактор транскрипции дрожжей, который используется для контроля экспрессии целевых генов и направляет экспрессию в конкретные клетки или ткани. *GAL4* представляет собой белок, состоящий из ДНК-связывающего домена и домена, активирующего транскрипцию. *UAS* (upstream-activating sequence), с которым связывается *GAL4*, представляет собой CGG-N₁₁-CCG, где N может быть любым основанием. Хотя *GAL4* является дрожжевым белком, обычно не присутствующим в других организмах, было показано, что он действует как активатор транскрипции в различных организмах, в частности у *D. melanogaster*. Для исследований на дрозофиле ген *GAL4* помещается под контроль энхансера гена-драйвера, в то время как последовательность *UAS* контролирует экспрессию целевого гена. *GAL4* экспрессируется только в клетках или тканях, где обычно активен ген-драйвер. В свою очередь, *GAL4* должен активировать транскрипцию гена только там, где была введена последовательность *UAS*. Таким образом, одна из родительских линий дрозофилы содержит в геноме *GAL4*. Другая линия несет исследуемый ген под контролем последовательности *UAS*, с

которой связывается GAL4. Когда две линии скрещиваются, у их потомков запускается экспрессия трансгена в определенных тканях или клетках, управляемых системой *UAS-GAL4*. Принцип работы системы *UAS-GAL4* изображен на Рисунке 4 [Phelps et al., 1998].

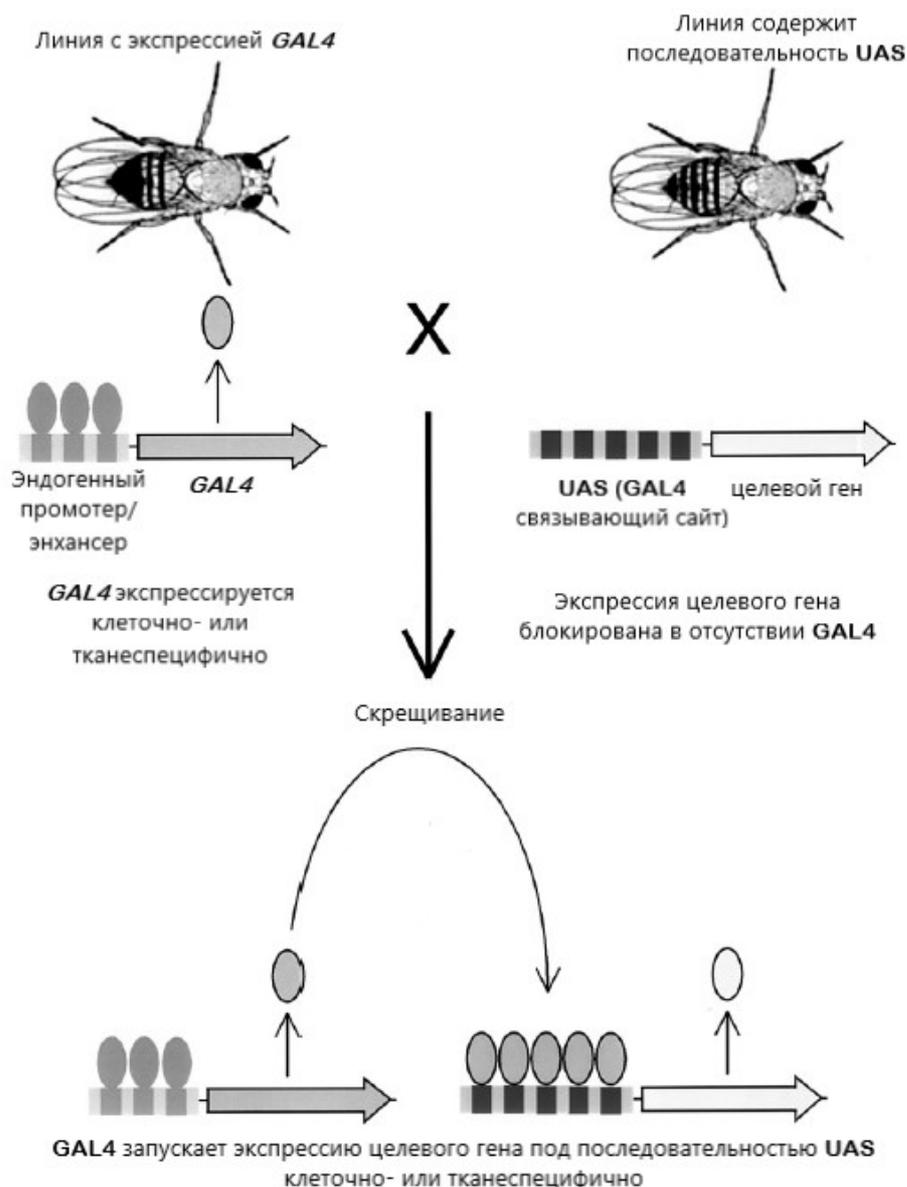


Рисунок 4 – Принцип работы системы экспрессии *UAS-GAL4* [Phelps et al., 1998]

В сочетании с РНК-интерференцией (RNAi) также возможно осуществить нокаун специфических генов путем экспрессии двухцепочечных РНК, нацеленных на специфические мРНК, с использованием системы *UAS-GAL4*.

Исследования на этих моделях позволили получить важные данные о патогенезе БП. Кроме того, дрозофила также рассматривалась в качестве модели для скрининга соединений, которые могут помочь разработать терапевтические стратегии для лечения БП и других синуклепатий [Whitworth et al., 2006].

У дрозофилы нет ортолога *SNCA*, но были разработаны многочисленные трансгенные модели с гиперэкспрессией гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями. В модели БП на дрозофиле проявляется прогрессирующее снижение уровня локомоторной активности на стадии имаго при гиперэкспрессии гена *SNCA* человека дикого типа или его форм с мутациями, а также гибель дофаминергических нейронов [Feany et al., 2000]. Исследования на дрозофиле также продемонстрировали зависимость уровня двигательной активности от уровня дофамина [Riemensperger et al., 2013]. Поскольку БП является мультисистемным расстройством, помимо нарушения локомоторной функции, оно сопровождается немоторными признаками. Немоторные симптомы при БП возникают на протяжении всего времени течения заболевания – либо на ранней, либо на поздней стадии. У дрозофилы экспрессия гена *SNCA* человека с мутациями приводит к выраженным немоторным расстройствам, таким как: изменение циркадных ритмов и нарушение сна [Gajula Balija et al., 2011].

Нервно–мышечные соединения личинки (НМС) *D. melanogaster* как модель для исследования синаптогенеза

Раннее нейрональное развитие часто характеризуется избыточным количеством синаптических связей, однако затем следует процесс их избирательного устранения. Это явление впервые наблюдалось у позвоночных [Zhang et al., 2001] и было широко изучено в зрительной системе и на нервно–мышечных соединениях. У дрозофилы нейроны и глия в эмбриональной центральной нервной системе (ЦНС) образуются из нейробластов, которые, в результате ассиметричного деления, приводят к образованию различных типов клеток [Goodman et al., 1993]. Нервно–мышечное соединение личинки дрозофилы является хорошо охарактеризованной модельной системой, которая используется для изучения синаптического развития и нейротрансмиссии [Koh et al., 2000].

Помимо этого, нервно–мышечные соединения личинки структурно и функционально схожи с центральными синапсами позвоночных [Schwarz, 2006], но в отличие от них НМС неизменны от личинки к личинке и проявляют последовательные нейрофизиологические реакции (Рисунок 5).

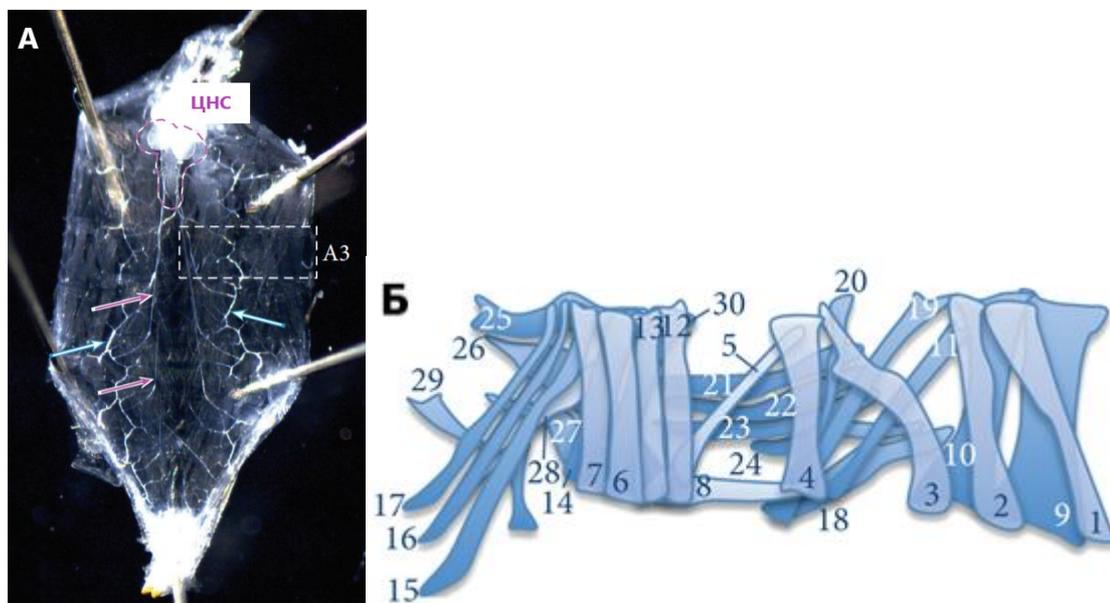


Рисунок 5 – (А) План тела вскрытых личинок дрозофилы третьего возраста, состоящий из 14 сегментов: 3 из которых соответствуют области головы и рта, 3 грудных сегмента (Т1–Т3) и 8 брюшных сегментов (А1–А8; сегмент А3 обозначен белой пунктирной линией). (Б) Брюшные сегменты А2–А7 состоят из двух двусторонне симметричных полусегментов, состоящих из 30 различных мышц [West et al., 2015].

Область контакта между моторным нейроном и целевой мышцей – это нервно–мышечное соединение. Пресинаптические терминали НМС личинок дрозофилы состоят из разветвленных цепей, состоящих из синаптических бутонов. Различают 3 типа синаптических бутонов: I, II и III. Они различаются по форме и размеру, выделяемому нейротрансмиттеру, субсинаптическому ретикулуму, который их окружает, и составу субъединиц глутаматных рецепторов, с которыми они связаны. Бутоны первого типа являются глутаматергическими и делятся на два вида: 1b (большие) и 1s (маленькие).

Бутоны второго и третьего типов являются модулирующими и используют другие нейромедиаторы (Таблица 2).

Таблица 2 – Классификация синаптических бутонов по типу медиатора

Тип бутона		Медиатор
Тип I	1b	L-Глутамат
	1s	
Тип II		Октопамин/ L-глутамат
Тип III		Инсулиноподобные пептиды

Количество моторных нейронов, иннервирующих определенную мышцу, варьируется, однако наиболее распространенной является тройная иннервация, при которой первая происходит от моторного нейрона с бутонами типа 1b, вторая – от моторного нейрона с бутонами типа 1s, а третья – от моторного нейрона II типа [Hoang et al., 2001]. Большинство мышц группы ISN (дистальная область нервно-мышечной системы, которая включает в себя 10 мышц (1, 2, 3, 4, 9, 10, 11, 18, 19, и 20) и одну нервную ветвь IN) и SNa (латеральная нервно-мышечная область, которая содержит шесть мышц (5, 8, 21, 22, 23, и 24) и одну нервную ветвь SNa), а также мышц 13, 14 и 30 в группе SNb имеют тройную иннервацию. Наконец, три мышцы получают иннервацию от четвертого моторного нейрона. В дополнение к трем типам моторных нейронов, перечисленным выше, мышцы 15 и 16 иннервируются моторным нейроном «I типа» (т.е. размер бутона, по-видимому, представляет собой гибрид между типами 1b и 1s), в то время как мышца 12 иннервируется моторным нейроном III типа [Hoang et al., 2001].

У личинки третьего возраста НМС на каждой мышце имеет порядка 20–50 бутонов первого типа. Большинство исследований проводят на НМС четвертой, шестой, седьмой и двенадцатой мышцах [Ruiz-Cañada et al., 2006]. Однако

механизмы, регулирующие различные стадии формирования, развития и поддержания бутона, на сегодняшний день до конца не изучены.

1.6. Терапия Болезни Паркинсона

Принятие решения о времени начала медикаментозной терапии является индивидуальным для каждого пациента и обычно обуславливается наличием характерных признаков и симптомов БП, которые уже существенно влияют на повседневную деятельность. Основой лечения БП являются препараты, которые имитируют воздействие на рецепторы дофамина. Наиболее эффективным лекарственным средством является леводопа в сочетании с карбидопой, которая служит для уменьшения побочных эффектов и увеличения терапевтической эффективности леводопы. Альтернативными препаратами для начала терапии заболевания являются агонисты дофамина, ингибиторы моноаминоксидазы–В (МАО-В) и в некоторых случаях антихолинергические средства. Выбор оптимальной стратегии для начала лечения БП требует совместного принятия решения врача с пациентом, чтобы учесть все преимущества и риски. Применение леводопы приводит к функциональным улучшениям, но увеличивает риски возникновения дискинезии, особенно при высоких дозировках. Однако тяжелые дискинезии встречаются достаточно редко [Turcano et al., 2018]. Ингибиторы МАО-В и агонисты дофамина менее эффективны, но в то же время имеют более низкие риски возникновения дискинезии. Основным аргументом в пользу раннего начала применения леводопы заключается в том, что другие препараты имеют побочные эффекты и менее эффективны, чем леводопа, и что возникновение двигательных осложнений связано с длительностью заболевания и величиной дозы леводопы, а не с длительностью ее воздействия [Matarazzo et al., 2018; Cilia et al., 2014]. Это дает возможность начинать терапию леводопой на ранних стадиях, применяя ее в минимальных дозировках.

Начало терапии препаратом леводопа/карбидопа начинается с таблетки, содержащей 25 мг карбидопы и 100 мг леводопы, принимаемой не менее 3 раз в день. Со временем людям с БП требуется более частое применение леводопы

(например, каждые 2-3 часа), а также более высокие дозировки препарата. По мере прогрессирования заболевания у людей уменьшается продолжительность ответа на дофаминергические препараты, а их эффект в моменте снижается из-за связанных с заболеванием патофизиологических изменений в головном мозге. Мозг начинает терять способность накапливать дополнительный дофамин для последующего использования [Chou et al., 2018]. Также проявляются побочные эффекты, такие как галлюцинации, бред и двигательные осложнения. По мере увеличения дозировки препарата существует возможность того, что карбидопа может проникнуть в мозг и снизить эффективность леводопы.

Увеличение количества ежедневных доз леводопы также увеличивает количество пиков и спадов концентрации лекарства в организме. Исходя из этого, были разработаны препараты леводопы длительного действия. Препарат с пролонгированным высвобождением действующего вещества обеспечивает более длительный эффект с меньшим изменением концентрации леводопы. Одним из таких препаратов является лекарственное средство Rytary, зарегистрированное компанией Impax Laboratories и одобренное FDA в 2015 году [Greig et al., 2016]. Капсулы с пролонгированным действием генерируют пиковую концентрацию препарата в плазме крови в разное время после приема. Однако терапия этим препаратом затруднена его высокой стоимостью и осложнениями в определении оптимальной дозы.

Агонисты дофамина имитируют действие дофамина на рецепторы. Различают два основных класса рецепторов дофамина: D1 (подгруппы D1 и D5) и D2 (подгруппы D2, D3, D4). D2–рецепторы широко распространены в нигростриарных, мезолимбических и мезокортикальных путях. Терапевтический эффект агонистов дофамина в отношении ригидности, гипокинезии и тремора, связывают со стимуляцией именно D2–рецепторов. Одними из известных препаратов агонистов дофамина являются Pramipexole и Ropinirole, одобренных для медицинского применения в США в 1997 году [Pramipexole marketed for Parkinson's disease, 1997; Ropinirole approved for Parkinson's disease, 1997], а также Rotigotine, одобренный Европейским агентством по лекарственным средствам

(EMA) в 2006 году и FDA в 2007 году [Baldwin et al., 2007]. Применение этих препаратов на ранней стадии может отсрочить необходимость применения леводопы и как следствие развитие дискинезии [Connolly et al., 2014]. Но, к сожалению, как было сказано выше, эти препараты недостаточно эффективны, а также вызывают ряд побочных эффектов: периферический отек, ортостатическую гипотензию, раздражение кожи, психоз, сонливость, а также синдром отмены препарата [Julius et al., 2016]. Агонисты дофамина могут быть успешно использованы для начальной терапии тех пациентов, кто желает реже принимать лекарства и способен переносить побочные эффекты. Они могут играть важную роль в периоды перерыва в употреблении леводопы, например, ночью и уменьшать их последствия. Добавление агонистов дофамина способно уменьшить потребность в более высоких дозировках или более частых приемах леводопы [Talati et al., 2009].

Лекарственные средства на основе ингибиторов катехол-О-метилтрансферазы (КОМТ), в частности, препарат Entacapone (торговое название «Comtan» Novartis), являются селективным и обратимым ингибиторами фермента катехол-О-метилтрансферазы. Уровень леводопы и дофамина может снижаться в результате метилирования под воздействием фермента КОМТ. Процесс метилирования происходит в желудочно-кишечном тракте, кровеносном русле и головном мозге. Ингибиторы КОМТ снижают уровень неактивных метаболитов леводопы в кровеносном русле и головном мозге, увеличивая ее биодоступность. Торможение метилирования путем назначения ингибиторов КОМТ является перспективным направлением в терапии БП. При приеме вместе с леводопой и карбидопой Entacapone способствует общему увеличению уровня леводопы, оставшейся в головном мозге и организме [Nutt et al., 1994].

Препараты группы ингибиторов моноаминоксидазы–В включают ряд лекарственных средств: Selegiline (одобрен FDA в 1989 году [Calesnick, 1990]), Rasagiline (одобрен EMA в 2005 году и FDA в 2006 году [Oldfield et al., 2007]), Safinamide (одобрен EMA в 2015 году и FDA в 2017 году [Mospan et al., 2017]) и др. Они необратимо ингибируют MAO-B путем его ковалентного связывания. Эти

препараты оказывают воздействие путем блокирования распада дофамина, тем самым повышая его активность.

Амантадин – препарат, обладающий мягким антипаркинсоническим эффектом, но чаще используемый для уменьшения дискинезии, вызванной леводопой. Механизм его противопаркинсонического действия плохо изучен. Амантадин является слабым антагонистом глутаматного рецептора NMDA-типа, увеличивает высвобождение дофамина и блокирует обратный захват дофамина [Blanpied, 2005]. В 2017 году препарат Gocovri с пролонгированным высвобождением амантадина был одобрен для использования в лечении дискинезии, вызванной леводопой.

Антихолинергические препараты, в частности Trihexyphenidyl, чаще всего используются для лечения тремора при БП и их применение ограничено побочными эффектами [Olanow et al., 1998], которые включают в себя: спутанность сознания, галлюцинации, запор, тахикардию, сухость во рту, сниженное потоотделения, расстройство желудочно-кишечного тракта. Поэтому он редко используется для терапии пожилых пациентов. Однако, несмотря на эти недостатки, Trihexyphenidyl может оказать положительное влияние на лечение тремора, если терапия леводопой не оказала желаемого эффекта. Он может использоваться в комбинации с другими агентами, что может уменьшить потребность в более высоких дозах леводопы.

В итоге, для терапии заболевания большинство людей используют комплексный подход: ограничивая дозу препарата, при этом используя лекарства из разных классов для достижения большей эффективности.

Новые стратегии лечения БП

Уменьшение уровня агрегации α -синуклеина

Как упоминалось ранее, агрегация α -синуклеина является одним из отличительных признаков БП, и существует ряд процессов, которые могут быть целью терапевтических препаратов, направленных на снижение эффектов токсичности α -синуклеина:

1. Уменьшение уровня синтеза α -синуклеина.

Основной целью при таком подходе является мРНК α -синуклеина. В моделях *in vitro* было показано, что нокдаун гена *SNCA* с помощью siRNA придает устойчивость к нейротоксину N-метил-4-фенилпиридинию (MPP (+)), а также, что подавление экспрессии гена *SNCA* снижает транспорт дофамина, уменьшает максимальную скорость его поглощения и поверхностную плотность переносчиков дофамина до 50% [Fountaine et al., 2007]. Также при прямой инфузии siRNA в гиппокамп мышей наблюдалось уменьшение количества α -синуклеина [Lewis et al., 2008]. Однако стоит отметить, что манипуляции с уровнем экспрессии гена *SNCA* не всегда приводят к однозначно интерпретируемым результатам. В частности, РНК-интерференция не вызывала воспаления тканей и не изменяла количество и фенотип нигральных дофаминергических нейронов, концентрацию дофамина и его метаболитов в полосатом теле приматов [McCormack et al., 2010], однако F. P. Manfredsson и его коллеги продемонстрировали, что использование вирусных векторов способствующих снижению уровня α -синуклеина в черной субстанции крыс и нечеловеческих приматов до менее чем 10% приводит к дегенерации нигростриальной системы [Kanaan et al., 2012].

2. Снижение накопления α -синуклеина (за счет увеличения его деградации).

Разрабатываются новые подходы для усиления деградации α -синуклеина, среди них активация путей аутофагии. Одним из вариантов увеличения деградации α -синуклеина является увеличение активности фермента глюкоцереброзидазы. В настоящее время проводятся клинические испытания второй фазы с препаратом Амброксол, усиливающим активность глюкоцереброзидазы, для оценки безопасности, переносимости и фармакодинамики этого препарата (идентификатор ClinicalTrial.gov: NCT02941822).

3. Снижение уровня агрегации и регуляция фолдинга α -синуклеина.

Существует ряд исследований, в которых предпринята попытка уменьшить степень неправильного фолдинга и агрегации α -синуклеина. Модулятор образования олигомеров 3-(1,3-бензодиоксол-5-ил)-5-(3-бромфенил)-1H-пиразол,

который непосредственно связывается со структурно-зависимым эпитопом α -синуклеина приводит к ингибированию олигомеризации белка *in vitro* и *in vivo*. Это соединение обладает хорошей пероральной биодоступностью и способно преодолевать гематоэнцефалический барьер [Wagner et al., 2013], поэтому оно является хорошим кандидатом для клинических испытаний. Кроме того, J. Pujols с коллегами недавно описали одну из новейших малых молекул, способных уменьшить агрегацию α -синуклеина, под названием SynuClean-D [Pujols et al., 2018]. Это соединение значительно снижает уровень агрегации α -синуклеина *in vitro* в клетках нейроглиомы и в моделях БП на *Caenorhabditis elegans*. Наиболее многообещающей характеристикой этой молекулы является ее способность не только уменьшать агрегацию α -синуклеина, но и предотвращать гибель дофаминергических нейронов, индуцированную α -синуклеином. Кроме того, некоторые другие соединения, которые предотвращают агрегацию α -синуклеина, проходят клинические испытания.

4. Блокирование передачи α -синуклеина от клетки к клетке.

Наконец, подходы, направленные на уменьшение распространения α -синуклеина связаны с пассивной (использование антител против белка) или активной (на основе вакцинации с использованием полноразмерного белка или коротких пептидов) иммунизации. Например, антитела против C-усеченного α -синуклеина или белка дикого типа *in vitro* и в моделях α -синуклеопатии на мышцах снижают его распространение и предотвращают токсичные эффекты α -синуклеина [Games et al., 2014].

Сохранение функциональной активности митохондрий и снижение уровня окислительного стресса.

Как упомянуто ранее, при БП изменяется активность митохондрий и это связано с агрегацией α -синуклеина, которая может влиять на структуру и функцию этой органеллы, а также с мутациями, связанными с БП, в генах *PINK1*, *PRKN* и *PARK7*, которые изменяют процессы митофагии и повышают чувствительность к окислительному стрессу. Существует ряд способов, с помощью которых возможно повлиять на изменения в митохондриях, что в свою

очередь может положительно сказаться на уровне нейродегенерации при БП. Недавно было показано, что VG-12 (диметилфумарат) увеличивает митохондриальный биогенез у мышей и пациентов с рассеянным склерозом за счет активации фактора транскрипции [Hayashi et al., 2017].

Также важно упомянуть, что окислительный стресс связан с функцией митохондрий не только потому, что митохондрии продуцируют АФК, но также и потому, что эти реакционные частицы могут ухудшать функциональную активность митохондрий. По этой причине снижение уровня окислительного стресса с помощью антиоксидантных препаратов может также обеспечить защиту митохондрий. Увеличение активности митохондрий наблюдалось в нескольких доклинических исследованиях с использованием митохондриально-направленных антиоксидантов, таких как: витамин E, коэнзим Q10 (coQ10). Однако недавние клинические испытания креатина и коэнзима Q10 не продемонстрировали положительного терапевтического эффекта у пациентов с БП [Beal et al., 2014]. Другим примером является положительный эффект антиоксиданта MitoQ, редокс-активного убихинона, нацеленного на митохондрии, который был изучен на животных моделях БП. Однако клинические испытания MitoQ у пациентов с БП показали, что это соединение не замедляет прогрессию заболевания [Snow et al., 2010].

Изменение эффективности аутофагии.

Изменение эффективности процесса аутофагии является важной патогенной характеристикой БП, и она связана с агрегацией α -синуклеина. Усиление эффективности аутофагии может оказать нейропротекторное действие при БП. Однако чтобы успешно применить эту стратегию, важно знать, какая фаза процесса аутофагии изменяется при заболевании. Причиной этого является то, что недостаточная эффективность аутофагии на ранней стадии может быть компенсирована индукторами аутофагии, но на более поздних стадиях, эти индукторы могут оказывать вредное воздействие, вызывая перегрузку системы разрушения клеток. Одним из многообещающих способов восстановления эффективности аутофагии является модулирование экспрессии или активности

транскрипционного фактора EB, кодируемого геном *TFEB*. Он регулирует экспрессию генов, участвующих в аутофагии и синтезе лизосом [Settembre et al., 2011], и его активность изменяется при нарушении активности α -синуклеина [Awad et al., 2015]. В связи с этим, некоторые исследования показали, что генетическая или фармакологическая стимуляция TFEB обладает нейропротекторным эффектом на моделях БП *in vitro* и *in vivo*. В дополнение этот фактор транскрипции также участвует в механизмах контроля качества митохондрий, способствуя устранению нефункциональных митохондрий.

Важно сказать, что изменение эффективности аутофагии может быть опасным, учитывая, что этот процесс может иметь как полезные, так и вредные последствия в зависимости от конкретного случая.

1.7. Выводы по разделу

Сегодня изучению БП посвящены многочисленные исследования, направленные на определение точных причин и механизмов возникновения заболевания. Многие из этих вопросов остаются до сих пор открытыми. Как и вопрос о токсичности α -синуклеина. По-прежнему остается неясным, какие именно формы α -синуклеина наиболее токсичны и провоцируют каскад нарушений, приводящих к дегенерации нейронов и развитию заболевания. Также стоит отметить, что α -синуклеин обладает большим спектром функциональных взаимодействий с различными элементами клеток, что делает его исключительно важным компонентом в регуляции многих процессов, участвующих не только в синаптической передаче, но и в регуляции экспрессии генов. Изучение патогенеза заболевания как на предсимптомной фазе, так и в фазе видимых двигательных нарушений имеют большое значение, поскольку понимание факторов, приводящих к нарушениям на той или иной стадии заболевания, может помочь с определением стратегии терапии БП, которая может принести максимальную эффективность.

Также хочется отметить, что до сих пор, ни одно лекарственное средство не останавливает, а только лишь замедляет, прогрессию заболевания. Проводятся

тесты различных веществ, обладающих нейропротекторными свойствами. И становится все более ясным, что для терапии данного заболевания будет необходим комплексный подход, направленный как на изменение уровня агрегации α -синуклеина, регуляцию его экспрессии, так и на восстановление активности митохондрий и уменьшение уровня окислительного стресса.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Линии *D. melanogaster*, использованные в работе

В работе использовались следующие линии *D. melanogaster*. Линии получены из Bloomington Stock Center (США).

$P\{w^{+mW.hs}=GawB\}elav^{C155}$ – линия содержит вставку Р-элемента с геном транскрипционного фактора GAL4, который находится под специфическим для нейронов промотором (далее – *elav*, #458 BDSC, USA), I хромосома;

w^* ; $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.F\}5B$ – линия содержит вставку гена *SNCA* человека дикого типа (далее – *SNCA.WT*, #8146 BDSC, USA), III хромосома;

w^* ; $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A30P\}40.1$ – линия содержит вставку гена *SNCA* человека, приводящей к замене А30Р (далее – *SNCA.A30P*, #8147 BDSC, USA), III хромосома;

w^* ; $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A53T\}CG7900^{15.3}$ – линия содержит вставку гена *SNCA* человека, приводящей к замене А53Т (далее – *SNCA.A53T*, #8148 BDSC, USA), III хромосома;

w^* ; $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}D42$ – линия содержит вставку Р-элемента с геном транскрипционного фактора GAL4, который находится под специфическим для моторных нейронов промотором (далее – *D42*, #8816 BDSC, USA), III хромосома;

$y^1 w^*$; $P\{w^{+mC}=UAS-mCD8::GFP.L\}LL5$ – линия содержит вставку Р-элемента с генетической конструкцией, которая запускает экспрессию химерного гена *mCD8::GFP*, кодирующего флуоресцирующий белок, встраивающийся в мембрану клетки (далее – *CD8*, #5137 BDSC, USA), II хромосома;

w^* ; $P\{w^{+mC}=UAS-syt.eGFP\}2$ – линия с экспрессией гена *Syt1* совместно с *eGFP* (далее – *Syt1*, #6925 BDSC, USA), II хромосома;

w^{1118} ; $P\{w^{+mC}=UAS-mito-HA-GFP.AP\}2/CyO$ – линия с экспрессией гена *GFP* который кодирует флуоресцирующий белок, встраивающийся в мембрану митохондрий (далее – *mito*, #8442 BDSC, USA), II хромосома;

w^* ; $P\{w^{+mC}=ple-GAL4.F\}3$ – линия содержит вставку Р-элемента с геном транскрипционного фактора GAL4, который находится под специфическим для

дофаминергических нейронов промотором (далее – *ple*, #8848 BDSC, USA), III хромосома;

$y^1 w^*$; $P\{w^{+mC}=UAS-mCD8::GFP.L\}Ptp4E^{LL4}$ – линия содержит вставку Р-элемента с генетической конструкцией химерного гена *mCD8::GFP*, который кодирует флуоресцирующий белок, встраивающийся в мембрану клетки (далее – *CD8*, получена из #5136 BDSC, USA), I хромосома;

w^* ; $P\{w^{+mC}=tubP-GAL80^{ts}\}20; TM2/TM6B, Tb^1$ – линия несет инсерцию температурно-зависимого аллеля *GAL80*, экспрессирующегося под промотором α -Tub84B (далее – *GAL80*, #7019 BDSC, USA), II хромосома;

w^* ; $P\{w^{+mC}=ChaT-GAL4.7.4\}19B \quad P\{w^{+mC}=UAS-GFP.S65T\}Myo31DF^{T2}$ – линия, содержащая вставку Р-элемента с геном транскрипционного фактора *GAL4*, который находится под специфическим для холинергических нейронов промотором (далее – *cha*, #6793 BDSC, USA), II хромосома;

w^{1118} ; $Mi\{GFP^{E.3xP3}=ET1\}Gbalb^{MB03039}/TM6C, Sb^1$ – линия несет вставку мобильного элемента *Minos* в ген *CG31414* дрозофилы. Инсерция приводит к преждевременному прекращению синтеза белка (далее – *Gbalb*, #23602 BDSC, USA), III хромосома;

w^{1118} ; $Mi\{GFP^{E.3xP3}=ET1\}Gbala^{MB02296}$ – линия несет вставку мобильного элемента *Minos* в ген *CG31148* дрозофилы. Инсерция приводит к преждевременному прекращению синтеза белка (далее – *Gbala*, #23435 BDSC, USA), III хромосома;

Также в работе были использованы линия мух дикого типа *CantonS* и линия мух с мутацией *white* – *white*¹¹¹⁸.

В ходе эксперимента по анализу нервно-мышечных соединений личинки дрозофилы и мухи содержались при температуре 25°C при 12 часовом световом дне, на среде, содержащей: 0,4% агара (w/v), 2,5% дрожжей (w/v), 4% сахарного песка (w/v), 3,5% манная крупа (w/v).

В экспериментах, проводимых при помощи системы *UAS-GAL4/GAL80*, до вылета мухи содержались при 18°C, для депрессии синтеза целевого белка, затем

при 29°C, чтобы активировать белковый синтез на среде, содержащей: 0,4% агара (w/v), 2,5% дрожжей (w/v), 4% сахарного песка (w/v), 3,5% манная крупа (w/v).

В ходе эксперимента по определению нейропротекторной активности «красного пигмента» дрожжей до достижения возраста в 30 дней мухи содержались на среде с составом: 1,1% агара, 5% сахарного песка с добавлением инактивированных красных или белых дрожжей *S. cerevisiae* в концентрации 20%. «Красный» штамм 23Sr и «белый» изогенный штамм 23Sw дрожжей выращивали на твердых стандартных средах (YEFD) в течение 5 дней и использовали для кормления дрозофилы.

В ходе эксперимента по определению нейропротекторной активности фуллеренолов C₆₀(OH)₃₀ и C₇₀(OH)₃₀, а также молекулярных шаперонов глюкоцереброзидазы, на протяжении всей жизни, либо до достижения возраста в 30 дней (в зависимости от исследуемого показателя) мухи содержались на среде с составом: 1,1% агара, 5% сахарного песка с добавлением инактивированных дрожжей в концентрации 20%, содержащими, либо не содержащими фуллеренолы или молекулярные шапероны глюкоцереброзидазы.

2.2. Получение линий мух с гиперэкспрессией гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями

Для исследования влияния экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями, приводящими к заменам A30P и A53T, на развитие нервно–мышечных соединений личинок третьего возраста использовали трансгенную линию, содержащую генетическую конструкцию с экспрессией *GAL4* в моторных нейронах. Скрещивания проводили по Схемам 1 – 9:

Схема 1. Индукция гиперэкспрессии гена *SNCA* человека дикого типа в моторных нейронах.

Р: ♀♀ $P\{w^{+mC}=UAS-mCD8::GFP.L\}LL5/P\{w^{+mC}=UAS-mCD8::GFP.L\}LL5;$
 $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}D42/P\{w^{+mW.hs}=GawB\}D42$ x ♂♂ $+/+;$ $P\{w^{+mC}=UAS-$
 $Hsap\SNCA.F\}5B/P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.F\}5B$

F1: ♀♀, ♂♂ $P\{w^{+mC}=UAS-mCD8::GFP.L\}LL5/+;$ $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}D42/$
 $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.F\}5B$

Схема 2. Индукция гиперэкспрессии гена *SNCA* человека с мутацией A30P в моторных нейронах.

P: ♀♀ $P\{w^{+mC}=UAS-mCD8::GFP.L\}LL5/P\{w^{+mC}=UAS-mCD8::GFP.L\}LL5;$
 $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}D42/P\{w^{+mW.hs}=GawB\}D42$ x ♂♂ $+/+;$ $P\{w^{+mC}=UAS-$
 $Hsap\SNCA.A30P\}40.1 / P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A30P\}40.1$

F1: ♀♀, ♂♂ $P\{w^{+mC}=UAS-mCD8::GFP.L\}LL5/+;$ $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}D42/$
 $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A30P\}40.1$

Схема 3. Индукция гиперэкспрессии гена *SNCA* человека с мутацией A53T в моторных нейронах.

P: ♀♀ $P\{w^{+mC}=UAS-mCD8::GFP.L\}LL5/P\{w^{+mC}=UAS-mCD8::GFP.L\}LL5;$
 $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}D42/P\{w^{+mW.hs}=GawB\}D42$ x ♂♂ $+/+;$ $P\{w^{+mC}=UAS-$
 $Hsap\SNCA.A53T\}CG7900^{15.3} / P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A53T\}CG7900^{15.3}$

F1: ♀♀, ♂♂ $P\{w^{+mC}=UAS-mCD8::GFP.L\}LL5/+;$ $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}D42/$
 $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A53T\}CG7900^{15.3}$

Схема 4. Индукция экспрессии гена *Syt1-eGFP* при гиперэкспрессии гена *SNCA* человека дикого типа в моторных нейронах.

P: ♀♀ $P\{w^{+mC}=UAS-syt.eGFP\}2 / P\{w^{+mC}=UAS-syt.eGFP\}2;$ $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}D42 /$
 $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}D42$ x ♂♂ $+/+;$ $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.F\}5B / P\{w^{+mC}=UAS-$
 $Hsap\SNCA.F\}5B$

F1: ♀♀, ♂♂ $P\{w^{+mC}=UAS-syt.eGFP\}2/+;$ $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}D42 / P\{w^{+mC}=UAS-$
 $Hsap\SNCA.F\}5B$

Схема 5. Индукция экспрессии гена *Syt1-eGFP* при гиперэкспрессии гена *SNCA* человека с мутацией A30P в моторных нейронах.

P: ♀♀ $P\{w^{+mC}=UAS-syt.eGFP\}2 / P\{w^{+mC}=UAS-syt.eGFP\}2;$ $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}D42 /$
 $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}D42$ x ♂♂ $+/+;$ $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A30P\}40.1/P\{w^{+mC}=UAS-$
 $Hsap\SNCA.A30P\}40.1$

F1: ♀♀, ♂♂ $P\{w^{+mC}=UAS-syt.eGFP\}2/+;$ $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}D42 / P\{w^{+mC}=UAS-$
 $Hsap\SNCA.A30P\}40.1$

Схема 6. Индукция экспрессии гена *Syt1-eGFP* при гиперэкспрессии гена *SNCA* человека с мутацией A53T в моторных нейронах.

P: ♀♀ $P\{w^{+mC}=UAS-syt.eGFP\}2 / P\{w^{+mC}=UAS-syt.eGFP\}2; P\{w^{+mW.hs}=GawB\}D42 / P\{w^{+mW.hs}=GawB\}D42$ x ♂♂ $+/+; P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A53T\}CG7900^{15.3} / P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A53T\}CG7900^{15.3}$

F1: ♀♀, ♂♂ $P\{w^{+mC}=UAS-syt.eGFP\}2/+; P\{w^{+mW.hs}=GawB\}D42 / P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A53T\}CG7900^{15.3}$

Схема 7. Индукция экспрессии гена *mito-GFP* при гиперэкспрессии гена *SNCA* человека дикого типа в моторных нейронах.

P: ♀♀ $P\{w^{+mC}=UAS-mito-HA-GFP.AP\}2/CyO; P\{w^{+mW.hs}=GawB\}D42 / P\{w^{+mW.hs}=GawB\}D42$ x ♂♂ $+/+; P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.F\}5B / P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.F\}5B$

F1: ♀♀, ♂♂ $P\{w^{+mC}=UAS-mito-HA-GFP.AP\}2/+; P\{w^{+mW.hs}=GawB\}D42 / P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.F\}5B$

♀♀, ♂♂ $CyO/+; P\{w^{+mW.hs}=GawB\}D42 / P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.F\}5B$

Для анализа моторных нейронов брали дрозophil, не несущих маркерных мутаций *Cy*.

Схема 8. Индукция экспрессии гена *mito-GFP* при гиперэкспрессии гена *SNCA* человека с мутацией A30P в моторных нейронах.

P: ♀♀ $P\{w^{+mC}=UAS-mito-HA-GFP.AP\}2/CyO; P\{w^{+mW.hs}=GawB\}D42 / P\{w^{+mW.hs}=GawB\}D42$ x ♂♂ $+/+; P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A30P\}40.1 / P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A30P\}40.1$

F1: ♀♀, ♂♂ $P\{w^{+mC}=UAS-mito-HA-GFP.AP\}2/+; P\{w^{+mW.hs}=GawB\}D42 / P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A30P\}40.1$

♀♀, ♂♂ $CyO/+; P\{w^{+mW.hs}=GawB\}D42 / P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A30P\}40.1$

Для анализа моторных нейронов брали дрозophil, не несущих маркерных мутаций *Cy*.

Схема 9. Индукция экспрессии гена *mito-GFP* при гиперэкспрессии гена *SNCA* человека с мутацией A53T в моторных нейронах.

P: ♀♀ $P\{w^{+mC}=UAS-mito-HA-GFP.AP\}2/CyO$; $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}D42/$
 $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}D42$ x ♂♂ $+/+$; $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A53T\}CG7900^{15.3}$
 $/ P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A53T\}CG7900^{15.3}$

F1: ♀♀, ♂♂ $P\{w^{+mC}=UAS-mito-HA-GFP.AP\}2/+$; $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}D42/$
 $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A53T\}CG7900^{15.3}$

♀♀, ♂♂ $CyO/+$; $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}D42/ P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A53T\}CG7900^{15.3}$

Для анализа моторных нейронов брали дрозофил, не несущих маркерных мутаций *Cy*.

Для исследования влияния продолжительности экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями A30P и A53T на нейродегенеративные процессы использовали трансгенную линию, содержащую генетическую конструкцию с экспрессией *GAL4/GAL80* в дофаминергических нейронах, а также во всех типах нейронов. Скрещивания проводили по Схемам 10 – 15:

Схема 10. Индукция гиперэкспрессии гена *SNCA* человека дикого типа в дофаминергических нейронах.

P: ♀♀ $P\{w^{+mC}=UAS-mCD8::GFP.L\}Ptp4E^{LL4}/P\{w^{+mC}=UAS-mCD8::GFP.L\}Ptp4E^{LL4}$;
 $P\{w^{+mC}=tubP-GAL80^{ts}\}20/P\{w^{+mC}=tubP-GAL80^{ts}\}20$; $P\{w^{+mC}=ple-GAL4.F\}3 /$
 $P\{w^{+mC}=ple-GAL4.F\}3$ x ♂♂ $+/+$; $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.F\}5B / P\{w^{+mC}=UAS-$
 $Hsap\SNCA.F\}5B$

F1: ♀♀ $P\{w^{+mC}=UAS-mCD8::GFP.L\}Ptp4E^{LL4}/+$; $P\{w^{+mC}=tubP-GAL80^{ts}\}20/+$;
 $P\{w^{+mC}=ple-GAL4.F\}3/P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.F\}5B$

♂♂ $P\{w^{+mC}=UAS-mCD8::GFP.L\}Ptp4E^{LL4}$; $P\{w^{+mC}=tubP-GAL80^{ts}\}20/+$;
 $P\{w^{+mC}=ple-GAL4.F\}3 / P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.F\}5B$

Схема 11. Индукция гиперэкспрессии гена *SNCA* человека с мутацией A30P в дофаминергических нейронах.

P: ♀♀ $P\{w^{+mC}=UAS-mCD8::GFP.L\}Ptp4E^{LL4}/P\{w^{+mC}=UAS-mCD8::GFP.L\}Ptp4E^{LL4};$
 $P\{w^{+mC}=tubP-GAL80^{ts}\}20/P\{w^{+mC}=tubP-GAL80^{ts}\}20;$ $P\{w^{+mC}=ple-GAL4.F\}3$ /
 $P\{w^{+mC}=ple-GAL4.F\}3$ x ♂♂ +; +/+; $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A30P\}40.1/$
 $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A30P\}40.1$

F1: ♀♀ $P\{w^{+mC}=UAS-mCD8::GFP.L\}Ptp4E^{LL4}/+;$ $P\{w^{+mC}=tubP-GAL80^{ts}\}20/+;$
 $P\{w^{+mC}=ple-GAL4.F\}3/ P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A30P\}40.1$

♂♂ $P\{w^{+mC}=UAS-mCD8::GFP.L\}Ptp4E^{LL4};$ $P\{w^{+mC}=tubP-GAL80^{ts}\}20/+;$ $P\{w^{+mC}=ple-$
 $GAL4.F\}3 / P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A30P\}40.1$

Схема 12. Индукция гиперэкспрессии гена *SNCA* человека с мутацией A53T в дофаминергических нейронах.

P: ♀♀ $P\{w^{+mC}=UAS-mCD8::GFP.L\}Ptp4E^{LL4}/P\{w^{+mC}=UAS-mCD8::GFP.L\}Ptp4E^{LL4};$
 $P\{w^{+mC}=tubP-GAL80^{ts}\}20/P\{w^{+mC}=tubP-GAL80^{ts}\}20;$ $P\{w^{+mC}=ple-GAL4.F\}3$ /
 $P\{w^{+mC}=ple-GAL4.F\}3$ x ♂♂ +; +/+; $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A53T\}CG7900^{15.3}/$
 $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A53T\}CG7900^{15.3}$

F1: ♀♀ $P\{w^{+mC}=UAS-mCD8::GFP.L\}Ptp4E^{LL4}/+;$ $P\{w^{+mC}=tubP-GAL80^{ts}\}20/+;$
 $P\{w^{+mC}=ple-GAL4.F\}3/ P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A53T\}CG7900^{15.3}$

♂♂ $P\{w^{+mC}=UAS-mCD8::GFP.L\}Ptp4E^{LL4};$ $P\{w^{+mC}=tubP-GAL80^{ts}\}20/+;$ $P\{w^{+mC}=ple-$
 $GAL4.F\}3 / P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A53T\}CG7900^{15.3}$

Схема 13. Индукция гиперэкспрессии гена *SNCA* человека дикого типа во всех типах нейронов.

P: ♀♀ $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}elav^{C155}$ / $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}elav^{C155};$ $P\{w^{+mC}=tubP-$
 $GAL80^{ts}\}20$ / $P\{w^{+mC}=tubP-GAL80^{ts}\}20;$ +/+ x ♂♂ +; +/+; $P\{w^{+mC}=UAS-$
 $Hsap\SNCA.F\}5B$ / $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.F\}5B$

F1: ♀♀ $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}elav^{C155}/+;$ $P\{w^{+mC}=tubP-GAL80^{ts}\}20/+;$ +/ $P\{w^{+mC}=UAS-$
 $Hsap\SNCA.F\}5B$

♂♂ $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}elav^{C155};$ $P\{w^{+mC}=tubP-GAL80^{ts}\}20/+;$ +/ $P\{w^{+mC}=UAS-$
 $Hsap\SNCA.F\}5B$

Схема 14. Индукция гиперэкспрессии гена *SNCA* человека с мутацией А30Р в дофаминергических нейронах.

P: ♀♀ $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}elav^{C155}/P\{w^{+mW.hs}=GawB\}elav^{C155}; P\{w^{+mC}=tubP-GAL80^{ts}\}20/ P\{w^{+mC}=tubP-GAL80^{ts}\}20; +/+ \times \text{♂♂} +; +/+; P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A30P\}40.1/ P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A30P\}40.1$

F1: ♀♀ $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}elav^{C155}/+; P\{w^{+mC}=tubP-GAL80^{ts}\}20/+; +/ P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A30P\}40.1$

♂♂ $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}elav^{C155}; P\{w^{+mC}=tubP-GAL80^{ts}\}20/+; +/P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A30P\}40.1$

Схема 15. Индукция гиперэкспрессии гена *SNCA* человека с мутацией А53Т в дофаминергических нейронах.

P: ♀♀ $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}elav^{C155}/P\{w^{+mW.hs}=GawB\}elav^{C155}; P\{w^{+mC}=tubP-GAL80^{ts}\}20/ P\{w^{+mC}=tubP-GAL80^{ts}\}20; +/+ \times \text{♂♂} +/+; P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A53T\}CG7900^{15.3}/ P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A53T\}CG7900^{15.3}$

F1: ♀♀ $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}elav^{C155}/+; P\{w^{+mC}=tubP-GAL80^{ts}\}20/+; +/ P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A53T\}CG7900^{15.3}$

♂♂ $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}elav^{C155}; P\{w^{+mC}=tubP-GAL80^{ts}\}20/+; +/P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A53T\}CG7900^{15.3}$

Для исследования нейропротекторных свойств «красного пигмента» дрожжей *S. Cerevisiae*, а также фуллеренолов $C_{60}(OH)_{30}$ и $C_{70}(OH)_{30}$ при экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями А30Р и А53Т использовали трансгенную линию, содержащую генетическую конструкцию с экспрессией *GAL4* во всех типах нейронов, а также с экспрессией *GAL4* только в дофаминергических или холинергических нейронах. Скрещивания проводили по Схемам 16 – 24:

Схема 16. Индукция гиперэкспрессии гена *SNCA* человека дикого типа в дофаминергических нейронах.

P: ♀♀ $P\{w^{+mC}=UAS-mCD8::GFP.L\}LL5 / P\{w^{+mC}=UAS-mCD8::GFP.L\}LL5; P\{w^{+mC}=ple-GAL4.F\}3 / P\{w^{+mC}=ple-GAL4.F\}3 \times \text{♂♂} +/+; P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.F\}5B / P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.F\}5B$

F1: ♀♀, ♂♂ $P\{w^{+mC}=UAS-mCD8::GFP.L\}LL5/+;$ $P\{w^{+mC}=ple-GAL4.F\}3$ / $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.F\}5B$

Схема 17. Индукция гиперэкспрессии гена *SNCA* человека с мутацией А30Р в дофаминергических нейронах.

P: ♀♀ $P\{w^{+mC}=UAS-mCD8::GFP.L\}LL5$ / $P\{w^{+mC}=UAS-mCD8::GFP.L\}LL5;$ $P\{w^{+mC}=ple-GAL4.F\}3$ / $P\{w^{+mC}=ple-GAL4.F\}3$ x ♂♂ $+/+;$ $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A30P\}40.1$ / $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A30P\}40.1$

F1: ♀♀, ♂♂ $P\{w^{+mC}=UAS-mCD8::GFP.L\}LL5/+;$ $P\{w^{+mC}=ple-GAL4.F\}3$ / $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A30P\}40.1$

Схема 18. Индукция гиперэкспрессии гена *SNCA* человека с мутацией А53Т в дофаминергических нейронах.

P: ♀♀ $P\{w^{+mC}=UAS-mCD8::GFP.L\}LL5$ / $P\{w^{+mC}=UAS-mCD8::GFP.L\}LL5;$ $P\{w^{+mC}=ple-GAL4.F\}3$ / $P\{w^{+mC}=ple-GAL4.F\}3$ x ♂♂ $+/+;$ $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A53T\}CG7900^{15.3}$ / $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A53T\}CG7900^{15.3}$

F1: ♀♀, ♂♂ $P\{w^{+mC}=UAS-mCD8::GFP.L\}LL5/+;$ $P\{w^{+mC}=ple-GAL4.F\}3$ / $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A53T\}CG7900^{15.3}$

Схема 19. Индукция гиперэкспрессии гена *SNCA* человека дикого типа в холинергических нейронах.

P: ♀♀; $P\{w^{+mC}=ChAT-GAL4.7.4\}19B$ $P\{w^{+mC}=UAS-GFP.S65T\}Myo31DF^{T2}$ / $P\{w^{+mC}=ChAT-GAL4.7.4\}19B$ $P\{w^{+mC}=UAS-GFP.S65T\}Myo31DF^{T2};$ $+/+$ x ♂♂ $+/+;$ $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.F\}5B$ / $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.F\}5B$

F1: ♀♀, ♂♂ $P\{w^{+mC}=ChAT-GAL4.7.4\}19B$ $P\{w^{+mC}=UAS-GFP.S65T\}Myo31DF^{T2}$ / $+$; $P\{w^{+mC}=ple-GAL4.F\}3/+$

Схема 20. Индукция гиперэкспрессии гена *SNCA* человека с мутацией А30Р в холинергических нейронах.

P: ♀♀; $P\{w^{+mC}=ChAT-GAL4.7.4\}19B$ $P\{w^{+mC}=UAS-GFP.S65T\}Myo31DF^{T2}$ / $P\{w^{+mC}=ChAT-GAL4.7.4\}19B$ $P\{w^{+mC}=UAS-GFP.S65T\}Myo31DF^{T2};$ $+/+$ x ♂♂ $+/+;$ $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A30P\}40.1$ / $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A30P\}40.1$

F1: ♀♀, ♂♂ $P\{w^{+mC}=ChAT-GAL4.7.4\}19B$ $P\{w^{+mC}=UAS-GFP.S65T\}Myo31DF^{T2}$ / $+$; $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A30P\}40.1/+$

Схема 21. Индукция гиперэкспрессии гена *SNCA* человека с мутацией A53T в холинергических нейронах.

P: ♀♀; $P\{w^{+mC}=ChAT-GAL4.7.4\}19B$ $P\{w^{+mC}=UAS-GFP.S65T\}Myo31DF^{T2}$ /
 $P\{w^{+mC}=ChAT-GAL4.7.4\}19B$ $P\{w^{+mC}=UAS-GFP.S65T\}Myo31DF^{T2}$; +/+ x
♂♂ +/+; $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A53T\}CG7900^{15.3}$ / $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A53T\}CG7900^{15.3}$

F1: ♀♀, ♂♂ $P\{w^{+mC}=ChAT-GAL4.7.4\}19B$ $P\{w^{+mC}=UAS-GFP.S65T\}Myo31DF^{T2}$ / +;
 $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A53T\}CG7900^{15.3}$ /+

Схема 22. Индукция гиперэкспрессии гена *SNCA* человека дикого типа во всех типах нейронов.

P: ♀♀ $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}elav^{C155}$ / $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}elav^{C155}$; +/+ x
♂♂ +; $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.F\}5B$ / $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.F\}5B$

F1: ♀♀, $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}elav^{C155}$ / +; $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.F\}5B$ / +
♂♂, $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}elav^{C155}$; $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.F\}5B$ / +

Схема 23. Индукция гиперэкспрессии гена *SNCA* человека с мутацией A30P во всех типах нейронов.

P: ♀♀ $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}elav^{C155}$ / $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}elav^{C155}$; +/+ x
♂♂ +; $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A30P\}40.1$ / $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A30P\}40.1$

F1: ♀♀, $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}elav^{C155}$ / +; $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A30P\}40.1$ / +
♂♂, $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}elav^{C155}$; $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A30P\}40.1$ / +

Схема 24. Индукция гиперэкспрессии гена *SNCA* человека с мутацией A53T во всех типах нейронов.

P: ♀♀ $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}elav^{C155}$ / $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}elav^{C155}$; +/+ x
♂♂ +; $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A53T\}CG7900^{15.3}$ / $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A53T\}CG7900^{15.3}$

F1: ♀♀, $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}elav^{C155}$ / +; $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A53T\}CG7900^{15.3}$ / +
♂♂, $P\{w^{+mW.hs}=GawB\}elav^{C155}$; $P\{w^{+mC}=UAS-Hsap\SNCA.A53T\}CG7900^{15.3}$ / +

Для исследования нейропротекторных свойств фармакологических шаперонов глюкоцереброзидазы использовали линию, содержащую вставку мобильного элемента *Minos* в ген *CG31414* или *CG31148* дрозофилы. Скрещивания проводили по Схеме 25:

Схема 25. Индукция экспрессии гена *CG31414* дрозофилы с преждевременной депрессией синтаза белка.

P: ♀♀ $Mi\{GFP^{E.3xP3}=ETI\}Gba1b^{MB03039}/TM6C$ x ♂♂
 $Mi\{GFP^{E.3xP3}=ETI\}Gba1b^{MB03039}/TM6C$

F1: ♀♀, ♂♂ $Mi\{GFP^{E.3xP3}=ETI\}Gba1b^{MB03039}/Mi\{GFP^{E.3xP3}=ETI\}Gba1b^{MB03039}$
 ♀♀, ♂♂ $Mi\{GFP^{E.3xP3}=ETI\}Gba1b^{MB03039}/TM6C$

Для исследования показателей нейродегенерации отбирали дрозофил, не несущих маркерных мутаций *TM6C*.

2.2. Приготовление препаратов личинки *D. melanogaster* для лазерной конфокальной микроскопии

Личинки третьего возраста препарировались в свежеприготовленном растворе HL3 (110 мм NaCl, 5 мм KCl, 10 мм NaHCO₃, 5 мм HEPES, 30 мм сахарозы, 5 мм трегалозы, 10 мм MgCl₂, pH 7,2), затем фиксировались в 4% формальдегиде (Sigma Aldrich, США) в течение 15 мин, промывались фосфатным буфером (PBS, Sigma Aldrich, США) и помещались в смесь глицерина и PBS (1:1).

Образцы анализировали на лазерном конфокальном микроскопе LeicaTCS SP5 (Leica, Germany) со встроенными 35-мВт аргоновым и гелий-неоновым лазерами при $\lambda=488$ и 543 нм через сутки после их приготовления. Для получения изображений использовали следующие параметры съемки: разрешение изображений 1024x1024, частота 400 Гц, формат сканирования – XYZ, толщина оптического среза 2 мкм. В ходе работы были использованы 40x и 63x объективы.

Синаптические бутоны, митохондрии в НМС и в аксоне, а также распределение синаптотагмина-1 визуализировали путем анализа флуоресценции eGFP с последующей количественной оценкой с помощью программного обеспечения ImageJ (version 1.38a). Было проанализировано не менее 8 личинок

мух каждого генотипа. Каждый эксперимент проводился в не менее чем трех биологических повторах.

2.3. Анализ количества дофаминергических нейронов, меченных GFP, в мозге *D. melanogaster*

Головы мух отделяли от тел и переносили в свежий раствор фосфатного буфера (PBS, Sigma Aldrich, США). Головы дрозофил фиксировали в 4% параформальдегиде (Sigma-Aldrich, США) в течение 40 мин при комнатной температуре. После фиксации головы промывали PBST (PBS, 0.1% Tween20) и изолировали мозг. Подготовленный мозг погружали в среду Vecta Shield (Vector Laboratories).

Образцы анализировали на лазерном конфокальном микроскопе LeicaTCS SP5 (Leica, Germany) со встроенными 35-мВт аргоновым и гелий-неоновым лазерами при $\lambda=488$ и 543 нм через сутки после их приготовления. Для получения изображений использовали следующие параметры съемки: разрешение изображений 1024x1024, частота 400 Гц, формат сканирования – XYZ, толщина оптического среза 2 мкм. В ходеработы использовался 40х объектив.

Подсчет дофаминергических нейронов был проведен на микрофотографиях конфокальных срезов в программе ImageJ (version 1.38a), согласно методике из статьи J. A. Botella с соавторами [Botella et al., 2008]. Было проанализировано не менее 6 мозгов мух каждого генотипа. Каждый эксперимент проводился в не менее чем трех биологических повторах.

2.4. Вестерн-блот анализ

Для каждого эксперимента 100 голов дрозофил замораживали в жидком азоте и гомогенизировали. Лизирующий буфер N1 [TBS, 1% Triton-X100, 1% SDS с ингибиторами протеаз (Roche, Penzberg, Upper Bavaria, Germany)] добавляли к гомогенизированным головам для проведения лизиса и выделения тотальной белковой фракции. Далее гомогенат центрифугировали при 120000g в течение 30 мин при +4 °C, отбирали супернатант и использовали для оценки растворимой

фракции α -синуклеина. Осадок дважды промывали в TBS, затем ресуспендировали в лизирующем буфере N2 [TBS, 8 М мочевины, 5% SDS] и смесь инкубировали при 55 °С в течение 1 часа. После центрифугировали при 120000g в течение 30 мин при +4 °С, отбирали супернатант и использовали для детекции нерастворимой фракции α -синуклеина. Концентрацию общего белка определяли по методу Бредфорда с использованием реактивов Sarstedt и нанофотометра IMPLLEN P330.

Белки разделяли в денатурирующих восстанавливающих условиях в 12% SDS-PAGE. Далее белки переносились на мембрану PVDF (Thermo Fisher Scientific, Prod # 88520, США) при помощи камеры для «мокрого» переноса Bio Rad Mini Trans-Blot. После переноса мембраны инкубировались в течение 1 часа в блокирующем буфере BlockPRO™ Blocking Buffer (Visual Protein) при комнатной температуре. Далее мембраны инкубировали в течение ночи при температуре +4 °С с первичными кроличьими антителами anti α -synuclein antibody [MJFR1] (Abcam Cat # ab138501, RRID: AB_2537217) или мышинными моноклональными антителами anti β -tubulin antibody (Santa Cruz Biotechnology Cat # sc 365791, RRID: AB_10841919) с последующей инкубацией со вторичными козьими антителами к кроличьим IgG-H&L (HRP) (AbcamCat # ab6721, RRID: AB_955447) или козьими антителами к мышинным IgG-H&L (HRP) (AbcamCat # ab97023, RRID: AB_10679675). Мембраны проявляли на рентгеновской пленке с использованием набора ECL Pierce Fast Western Blot Kit (Thermo Fisher Scientific). Относительная интенсивность полос определялась с помощью программы ImageJ. Фоновое окрашивание вычиталось из сигналов образцов, интенсивность полос α -синуклеина была нормирована на интенсивность полос тубулина. Каждый эксперимент проводился в не менее чем трех биологических повторах.

2.5. Анализ уровня дофамина

Уровень дофамина измеряли в головах мух. 100 голов дрозофилы замораживали в жидком азоте и гомогенизировали в буфере 150 мм NaCl, 50 мм Tris-HCl, 2 мм EDTA, 1% Triton-X100, 0,1% SDS, pH 8,0 с ингибиторами протеаз

(Roche, Penzberg, UpperBavaria, Germany). Гомогенат центрифугировали в течение 5 мин при 10000g и +4 °C. Супернатант отбирали и хранили при температуре -80 °C. Концентрацию общего белка определяли по методу Бредфорда с использованием реагентов Sarstedt и нанофотометра IMPLEN P330. Уровень дофамина определяли с помощью набора ИФА (ImmuSmol Dopamine ELISA kit) в соответствии с инструкцией производителя. Реакцию останавливали путем добавления в реакцию стоп-раствора; оптическую плотность измеряли спектрофотометром Multiskan FC (Thermo Scientific) на длине волны 450 нм. Каждый эксперимент проводился в не менее чем трех биологических повторах.

2.6. Выделение РНК

Для выделения РНК использовался коммерческий набор «Zymo Research ZR Tissue & Insect RNA MicroPrep™». РНК выделяли из 100 голов мух необходимого генотипа, согласно протоколу производителя. Дополнительно к протоколу, образцы обрабатывали 5 ед. ДНКазой-I (Thermo Scientific) для предотвращения контаминации РНК геномной ДНК.

2.7. Обратная транскрипция

Все работы с РНК и реактивами для обратной транскрипции проводились при 4 °C. Для проведения процесса обратной транскрипции была подготовлена смесь: 1 мкг выделенной РНК; 0.5 мкг праймеров Fermentas Oligo (dT) 18 Primer (100пМ); 6 мкл воды MilliQ, которую икубировали 5 минут при температуре 70°C, после чего пробирку помещали на лёд. К смеси последовательно добавляли: RiboLock RNase Inhibitor Fermentas (конечная концентрация – 20 ЕА); 5X Reaction Buffer for RT Fermentas (конечные концентрации компонентов: 4мМ MgCl₂, 50мМ Tris-HCl, 50мМ KCl, 10мМ DTT, pH8.3); 10мМ dNTP Mix Fermentas (конечная концентрация каждого нуклеотида - 1мМ). Полученную смесь инкубировали 5 минут при 37°C, после чего добавили обратную транскриптазу RevertAid M-MuLV RT (40ЕА) Fermentas и продолжали инкубировать при 37°C в течение часа.

Для остановки процесса обратной транскрипции смесь инкубировали 10 минут при 70°C.

2.8. ПЦР в реальном времени

Для определения уровня экспрессии генов *Syt1* и *nSyb* использовался метод количественной ПЦР в режиме реального времени с флуоресцентными зондами TaqMan. Используемые в методе праймеры и зонды были разработаны в программе PrimerExpress. В качестве референсных генов были использованы ген *Gapdh2* (глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа 2) и *RpL32* (рибосомальный протеин L32). В качестве флуоресцентной метки зондов для кДНК генов *RpL32* и *Gapdh2* использовался краситель R6G, зондов для кДНК генов *Syt1* и *nSyb* – FAM. Подобранные последовательности праймеров и зондов приведены в Таблице 3 и были произведены фирмами «Бигль» (Санкт-Петербург) и «Синтол» (Москва).

Таблица 3 - Нуклеотидные последовательности используемых праймеров и зондов

<i>Syt1</i>	Прямой праймер	5' - CCTGGTCAGCGTTGAAGGA -3'
	Обратный праймер	5' - GCAGCGAGAAGCAGATATCT -3'
	Зонд	FAM-AGGGCGGACAGGAAA-RTQ1
<i>nSyb</i>	Прямой праймер	5' - GGCGGCGTGTAAGCAATC -3'
	Обратный праймер	5' - CCCGCTGAAGGAGCACACTA -3'
	Зонд	FAM-CGCTGCCAGGACGAAAGTTTCTCGA-RTQ1
<i>Gapdh2</i>	Прямой праймер	5' - TGGCCAAGGTGATCAACGACAA -3'
	Обратный праймер	5' - ACAACTTGCCGGAAGGTCCAT -3'
	Зонд	R6G-TGATGACCACCGTTCATGCCACCACCGCT-BHQ1

<i>RpL32</i>	Прямой праймер	5' - AGCACTTCATCCGCCACC -3'
	Обратный праймер	5' - CGACGCACTCTGTTGTTCG -3'
	Зонд	R6G-CTAAGCTGTCGCACAAATGGCG- BHQ1

Состав реакционной смеси для проведения ПЦР в реальном времени: 67мМ Tris-HCl (pH 8.8), 16.6мМ (NH₄)₂SO₄, 0.1% TritonX-100, 2.5мМ MgCl₂; 5 мкл dNTP mix; 1,5pМ каждого праймера, 2.5pМ флуоресцентного зонда; 5ед. термостабильной высокопроцессивной рекомбинантной Taq ДНК полимеразы, 1 мкл кДНК. Полимеразную цепную реакцию проводили с использованием прибора CFX96 (Bio-Rad). Перед амплификацией реакционная смесь инкубировалась при 50°C в течение 2-х минут, после чего следовала денатурация при 95°C в течение 10 минут. Цикл амплификации состоял из денатурации при 95°C в течение 15 секунд и отжига при 60°C в течение 1 минуты. Цикл повторялся 50 раз. Каждый образец был амплифицирован в трех повторах. Для всех исследуемых и референсных генов строилась стандартная кривая, используя следующие разведения контрольной кДНК: 1, 1/8, 1/16. Каждый эксперимент проводился в не менее чем трех биологических повторах.

2.9. Оценка локомоторной активности

Локомоторная активность мух определялась посредством теста на отрицательный геотаксис. По 20-25 мух помещались в пробирку, мягко стряхивались на дно. Учитывалось количество мух, способных подняться на 5 см вверх по стенке пробирки в течение 15 секунд. Результаты представлены в процентах от всех мух, находящихся в стакане. Уровень локомоторной активности определялся у не менее чем 100 особей. Каждый эксперимент проводился в не менее чем трех биологических повторах.

2.10. Используемые фуллеренолы

Фуллеренолы $C_{60}(OH)_{30}$ и $C_{70}(OH)_{30}$ были получены в НИЦ «Курчатовский институт» ФГБУ ПИЯФ согласно патенту В. П. Седова и А. А. Сжогиной [Sedov et al, 2014]. Этот метод позволяет получать фуллеренолы высокой чистоты, не загрязненные ионами Na^+ . В предварительных тестах исследовали влияние различных концентраций фуллеренолов на продолжительность жизни и уровень локомоторной активности дрозофилы. Конечная концентрация препаратов в экспериментах составила 0,2 мг/мл. Каждые 2 дня мух перемещали на свежую питательную среду с фуллеренолами.

2.11. Анализ окислительного стресса

Для приготовления лизата использовалось 20 голов дрозофил определённого возраста, собранных при заморозке в жидком азоте. Головы гомогенизировали в растворе 10мМ Tris-HCl, 3 мкл ингибитора протеаз, pH=7.4, объемом 100мкл. Смесь центрифугировали в течение 10 минут при 10000 об/мин, затем отбирали супернатант и помещали в морозильную камеру $-20^{\circ}C$ для хранения.

В лунку добавляли по 5 мкл лизата и 60 мкл 5мкМ H₂DCF-DA (диацетат дихлордигидрофлуоресцеина) и инкубировали 60 минут при $37^{\circ}C$ [Trindade de Paula et al., 2016]. Считывание сигнала проводили на планшетном анализаторе при $\lambda_{воз}=490$ нм, $\lambda_{эм}=530$ нм и $h=4,7$ мм. Таким образом, количество сигнала флюоресценции соответствует уровню АФК в пробе. Далее проводили стандартизацию сигнала, варьирующегося между пробами, по концентрации белка, измеряемой методом Бредфорда. Каждый эксперимент проводился в не менее чем трех биологических повторах.

2.12. Анализ количества дофаминергических нейронов в мозге *D.*

melanogaster методом иммуногистохимического окрашивания

Головы мух отделяли от тел и переносили в свежий раствор фосфатного буфера (PBS, Sigma Aldrich, США). Головы дрозофил фиксировали в 4%

параформальдегиде (Sigma-Aldrich, США) в течение 40 мин при комнатной температуре. После фиксации головы промывали PBST (PBS, 0.1% Tween20) и изолировали мозг. Окраска первичными антителами anti-tyrosine Hydroxylase (Millipore Cat.AB152) в буфере BlockPRO Blocking Buffer (Visual ProteinCat. BP01-1L) в соотношении 1:80 осуществлялась в течение ночи при +4⁰C. Отмывка препарата от первичных антител осуществлялась буфером PBST (3 раза по 5 минут). Окраска вторичными антителами осуществлялась с помощью антител Goat anti-rabbit AlexaFluor 594 (Abcam Cat. #ab150080) разведенных в буфере BlockPRO Blocking Buffer в соотношении 1:200 при комнатной температуре в течение 2 часов. Затем снова осуществлялась промывка буфером PBST и препараты заключались в среду Vectashield.

Образцы анализировали на лазерном конфокальном микроскопе LeicaTCS SP5 (Leica, Germany) со встроенными 35-мВт аргоновым и гелий-неоновым лазерами при $\lambda=594$ и 643нм через сутки после их приготовления. Для получения изображений использовали следующие параметры съемки: разрешение изображений 1024x1024, частота 400 Гц, формат сканирования – XYZ, толщина оптического среза 2 мкм. В ходеработы использовался 40x объектив.

Подсчет дофаминергических нейронов был проведен на микрофотографиях конфокальных срезов в программе ImageJ (version 1.38a), согласно методике из статьи J. A. Botella с соавторами [Botella et al., 2008]. Было проанализировано не менее 6 мозгов мух каждого генотипа. Каждый эксперимент проводился в не менее чем трех биологических повторах.

2.13. Фармакологические шапероны глюкоцереброзидазы

Молекулярные шапероны были получены в НИЦ «Курчатовский институт». Вещество N58 представляет собой N-(4-этинилфенил)-5,7-диметилпиразоло[1,5-a]пиримидин-3-карбоксамид. Вещество VI представляет собой N-(1,2,3,6-тетрагидро-2,6-дикетопиримидин-4-ацетил)-4-метил анилид. Конечная концентрация шаперонов составляла 4 μ M. Каждые 2 дня мух перемещали на свежую питательную среду с препаратом.

2.14. Анализ продолжительности жизни *D. melanogaster*

Каждые 2-3 дня мухи перемещались на свежую питательную среду в течение всего периода жизни и регистрировался уровень смертности. Результаты представлены в виде гистограммы в процентном отношении от изначального количества мух.

2.15. Статистическая обработка данных

Статистическая обработка данных была проведена в программах KyPlot 5.0, Past v.4.07b и Jasp v.0.16.0.0. Для проверки соответствия распределения выборки нормальному распределению использовали критерий Шапиро-Уилка. Оценка равенства дисперсий выборок проводилась с использованием критерия Левина (для трех и более независимых количественных выборок). При нормальном распределении данных и равенстве дисперсий выборок проводился однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). В рамках апостериорного анализа проводили попарное множественное сравнение исследуемых групп с использованием теста Тьюки для равных объемов выборок, либо теста Бонферрони, если объемы выборок различались. Для выборок, распределение которых отличается от нормального, использовался критерий Краскела–Уоллиса с последующим попарным сравнением выборок при помощи критерия Данна.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Морфологический и функциональный анализ нервно–мышечных соединений личинки *D. melanogaster* при экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями

Для исследования синаптической функции α -синуклеина мы провели морфологический и функциональный анализ нервно–мышечных соединений на личинке *D. melanogaster*. Анализ нервно–мышечных соединений позволяет оценивать развитие и функциональную активность синапсов [Collins et al., 2007; Sun et al., 2012]. В отличие от центральных синапсов позвоночных у личинки дрозофилы каждый отдельный пресинаптический моторный нейрон и постсинаптическая мышечная клетка единичны и легко различаются. Кроме того, такая модель позволяет сочетать различные типы исследований. Оценка функциональной активности и морфологии нервно–мышечных соединений, является одним из наиболее распространенных способов изучения нейродегенеративных процессов у дрозофилы [Chee et al., 2005; Sen et al., 2011].

Каждая мышца личинки *D. melanogaster* иннервируется мотонейронами с двумя видами синаптических окончаний, обозначаемых как 1b (большие, диаметром 3–5 мкм) и 1s (маленькие, диаметром 1–1.5 мкм), которые соответствуют определенным типам моторных нейронов в мозге личинки. Также выделяют сателлитные бутоны, которые отпочковываются как от уже сформировавшихся бутонов, так и от самой межбуточной аксонной связки, соединяющей два соседних бутона [Budnik et al., 2006; Torroja et al., 1999].

Для определения влияния экспрессии гена *SNCA* на морфологию и структуру нервно–мышечных соединений мы использовали трансгенную линию *CD8;D42*, мембраны моторных нейронов личинок которой мечены GFP. У потомков от скрещиваний этой линии с линиями, несущими вставку гена *SNCA* человека дикого типа или его мутантных форм методом конфокальной микроскопии были проанализированы нервно–мышечные соединения на 4–ой

мышце 3–его абдоминального сегмента личинки (терминологию см. [Budnik et al., 2006]).

Мы провели подсчет числа больших и сателлитных бутонов в контрольной линии и линиях с экспрессией гена *SNCA*. Как следует из Рисунка 6, количество больших синаптических бутонов в нервно–мышечных соединениях личинок линий, экспрессирующих ген *SNCA* человека дикого типа и его мутантных форм, не уменьшалось по сравнению с контролем (Рисунок 6 А, Б). Однако, все линии с экспрессией *SNCA.WT/SNCA.A30P/SNCA.A53T* имели сниженное количество сателлитных бутонов по сравнению с контрольной линией без экспрессии гена *SNCA* (Рисунок 6 А, В) [Schuvalova et al., 2014].

Экспрессия гена *SNCA* человека, как дикого типа, так и его форм с мутациями, в моторных нейронах *D. melanogaster* также уменьшала площадь нервно–мышечных соединений по сравнению с контрольной линией без экспрессии гена *SNCA* человека (Рисунок 6 Г) [Schuvalova et al., 2014].

Оценка числа и распределения активных зон в синаптических бутонах нервно–мышечных соединений была проведена по визуализации белка Bruchpilot (BRP), гомолога белка ELKS, являющегося белком активных зон позвоночных. Анализ распределения активных зон в нервно–мышечных соединениях личинок мух линий с гиперэкспрессией гена *SNCA*, как дикого типа, так и двух его мутантных форм не выявил различий по сравнению с контролем. Надо отметить, что активные зоны также располагались и на сателлитных бутонах (Рисунок 7).

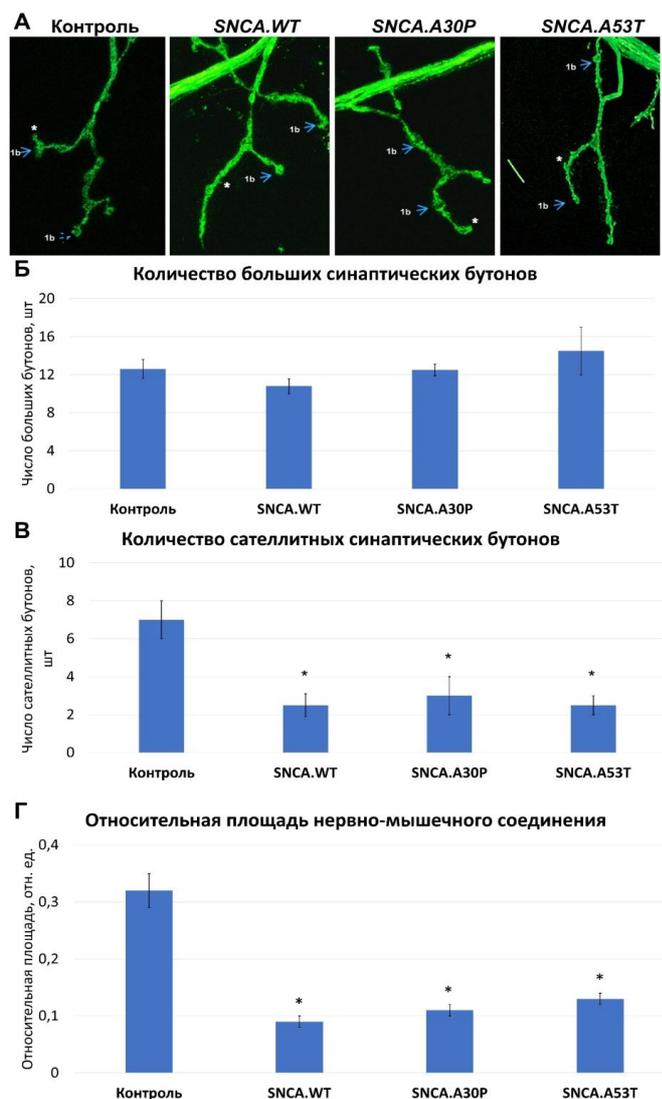


Рисунок 6 – Морфологический анализ нервно-мышечных соединений четвертой мышцы третьего брюшного сегмента личинок *D. melanogaster* с экспрессией гена *SNCA* человека дикого типа (*SNCA.WT*) и его форм с мутациями А30Р (*SNCA.A30P*) и А53Т (*SNCA.A53T*). А – Конфокальные изображения нервно-мышечных соединений. Стрелки указывают на большие синаптические бутоны 1b. Звездочка (*) обозначает сателлитные бутоны. Масштаб 25 мкм. Б – Число больших синаптических бутонов. В – Число сателлитных синаптических бутонов. Г – Относительная площадь нервно-мышечного соединения (абсолютная площадь нервно-мышечного соединения делится на площадь соответствующей мышцы) личинки *D. melanogaster*. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего, * $p < 0.05$, $n \geq 8$, $N \geq 3$, однофакторный дисперсионный анализ.

Наши результаты показывают, что экспрессия как гена *SNCA* человека, как дикого типа, так и его форм с мутациями у *D. melanogaster* приводит к уменьшению количества сателлитных бутонов, но не больших бутонов типа 1b. Поскольку сателлитные бутоны содержали активные зоны, они, по-видимому, содержат функциональные синапсы [Menon et al., 2013].

Далее мы исследовали распределение белка синаптоагмина-1 в нервно-мышечных соединениях личинки дрозофилы [Zhang et al., 2002]. Синаптоагмин-1 является интегральным мембранным гликопротеином синаптических везикул и считается основным кальциевым сенсором, запускающим экзоцитоз нейротрансмиттеров [Koh et al., 2003; Südhof, 2004].

На Рисунке 8 показано, что в контрольной линии синаптоагмин-1 локализовался внутри синаптических бутонов, ближе к мембране, в то время как в линиях с гиперэкспрессией гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями, синаптоагмин-1 большей частью был распределен внутри синаптического бутона [Schuvalova et al., 2014].

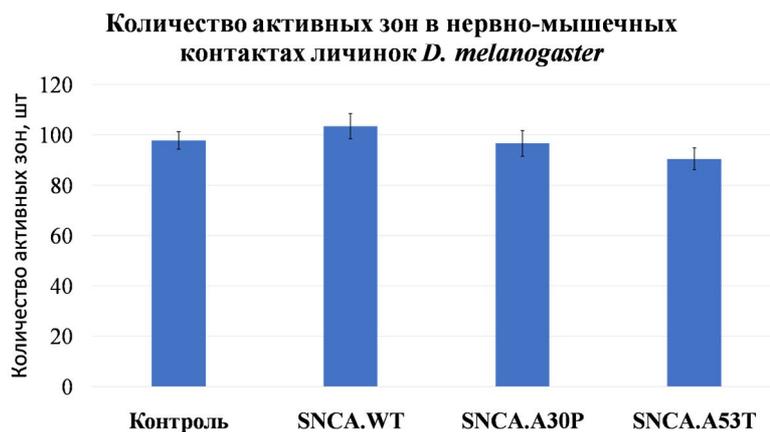
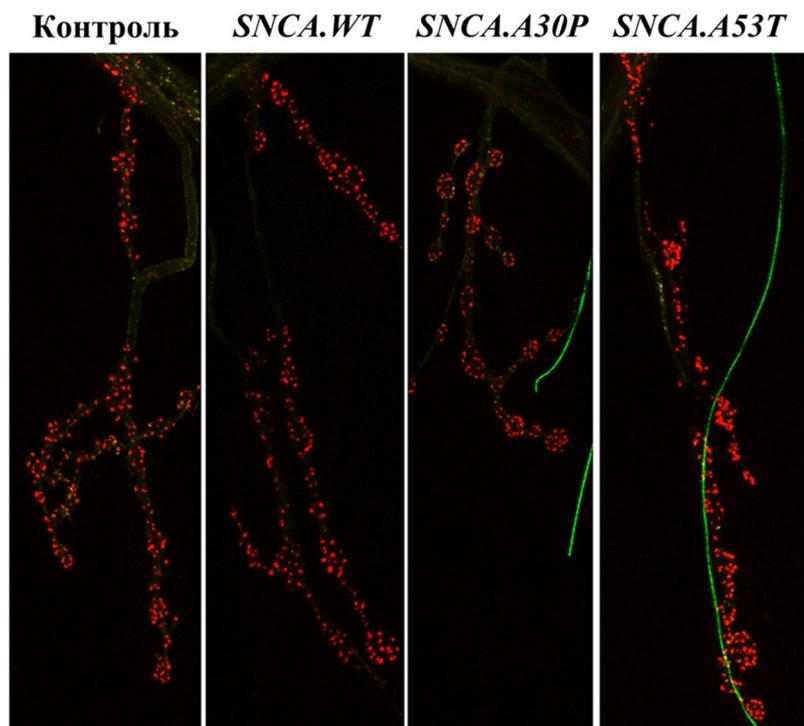


Рисунок 7 – Оценка числа и распределения активных зон в синаптических бутонах нервно-мышечных соединений *D. melanogaster* при экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями А30Р и А53Т. А – Конфокальные изображения активных зон в синаптических бутонах нервно-мышечных соединений. Масштаб 25 мкм. Б – Число активных зон в нервно-мышечных контактах личинки *D. melanogaster*.

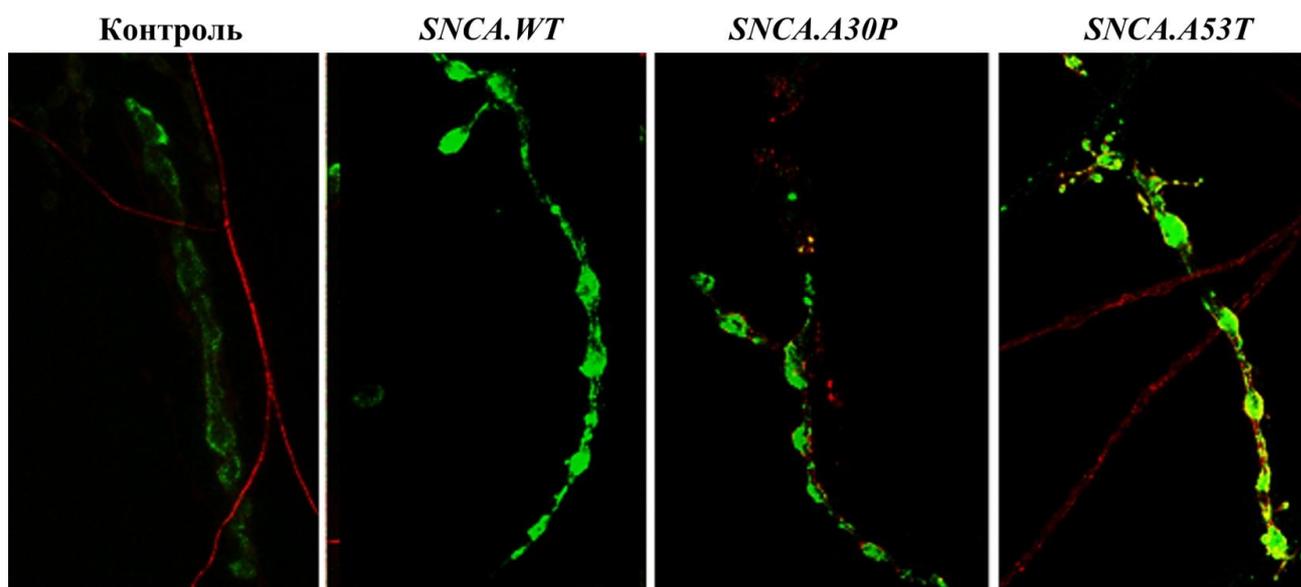


Рисунок 8 - Распределение синаптотагмина–1 в нервно–мышечных соединениях личинок *D. melanogaster* с экспрессией гена *SNCA* и его форм с мутациями А30Р и А53Т. Конфокальная микроскопия. Масштаб 25 мкм.

Нарушение в распределении синаптотагмина–1 может оказать влияние на секрецию нейромедиаторов. Расположение данного белка непосредственно у мембраны синаптического бутона имеет важное значение, поскольку в дополнение к образованию Ca^{2+} –зависимых комплексов с фосфолипидами, синаптотагмин–1 также связывается с комплексами SNARE. Сборка SNARE комплекса приводит к тому, что мембраны синаптических везикул и плазматическая мембрана находятся в непосредственной близости друг от друга. Синаптотагмин–1 связывается с комплексом SNARE в отсутствие ионов Ca^{2+} , но переключается на фосфолипидную мембрану, как только поступают ионы Ca^{2+} . Приток ионов Ca^{2+} дестабилизирует промежуточное связывание SNARE и синаптических везикул, вызывая частичную вставку С2–доменов синаптотагмина–1 в фосфолипиды. Предполагается, что это действие вызывает механическое возмущение, которое открывает поры мембраны и позволяет выйти медиатору в синаптическую щель [Südhof, 2004]. Нарушение распределения синаптотагмина–1 может послужить дестабилизации белковых комплексов с синаптическими везикулами, а также развитию синаптической дисфункции.

Поскольку функции митохондрий являются критическими для нормальной синаптической трансмиссии, мы исследовали митохондрии в нервно–мышечных контактах (НМК). Для идентификации митохондрий использовали линию *mito;D42*, у особей которой мембраны митохондрий мечены GFP. Трансгенные линии дрозофил с экспрессией гена *SNCA* человека, как дикого типа, так и его форм с мутациями, характеризовались уменьшением количества митохондрий в нервно–мышечных соединениях по сравнению с контрольной линией без экспрессии гена *SNCA* человека (Рисунок 9) [Schuvalova et al., 2014].

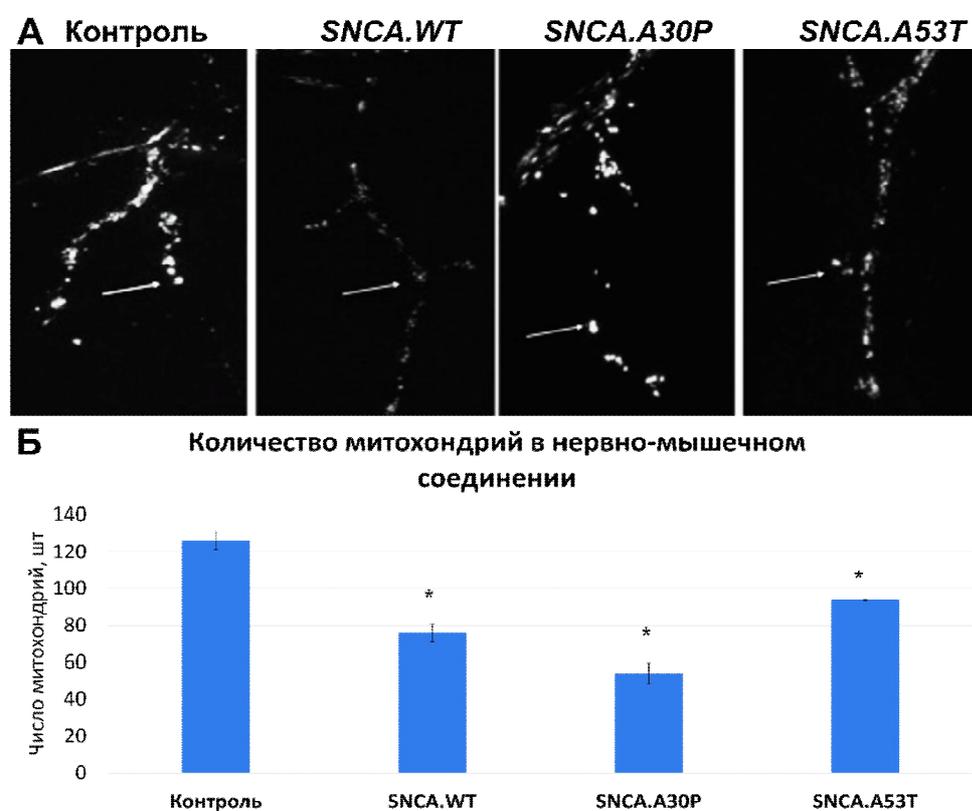


Рисунок 9 – Визуализация митохондрий в НМК четвертой мышцы третьего брюшного сегмента личинок *D. melanogaster* с экспрессией гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями. А – Конфокальные изображения митохондрий в нервно-мышечном соединении. Стрелки указывают на кластеры митохондрий. Масштаб 25 мкм. Б – Число митохондрий в нервно–мышечном соединении. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего, * $p < 0.05$, $n \geq 8$, $N \geq 3$, однофакторный дисперсионный анализ.

В то же время снижение количества митохондрий в аксоне по сравнению с контрольной линией без экспрессии гена *SNCA* человека, наблюдалось только у линий дрозофилы с экспрессией *SNCA.WT* и *SNCA.A30P*. В линии с экспрессией *SNCA.A53T* статистически значимых различий в количестве митохондрий по сравнению с контролем выявлено не было (Рисунок 10) [Schuvalova et al., 2014].

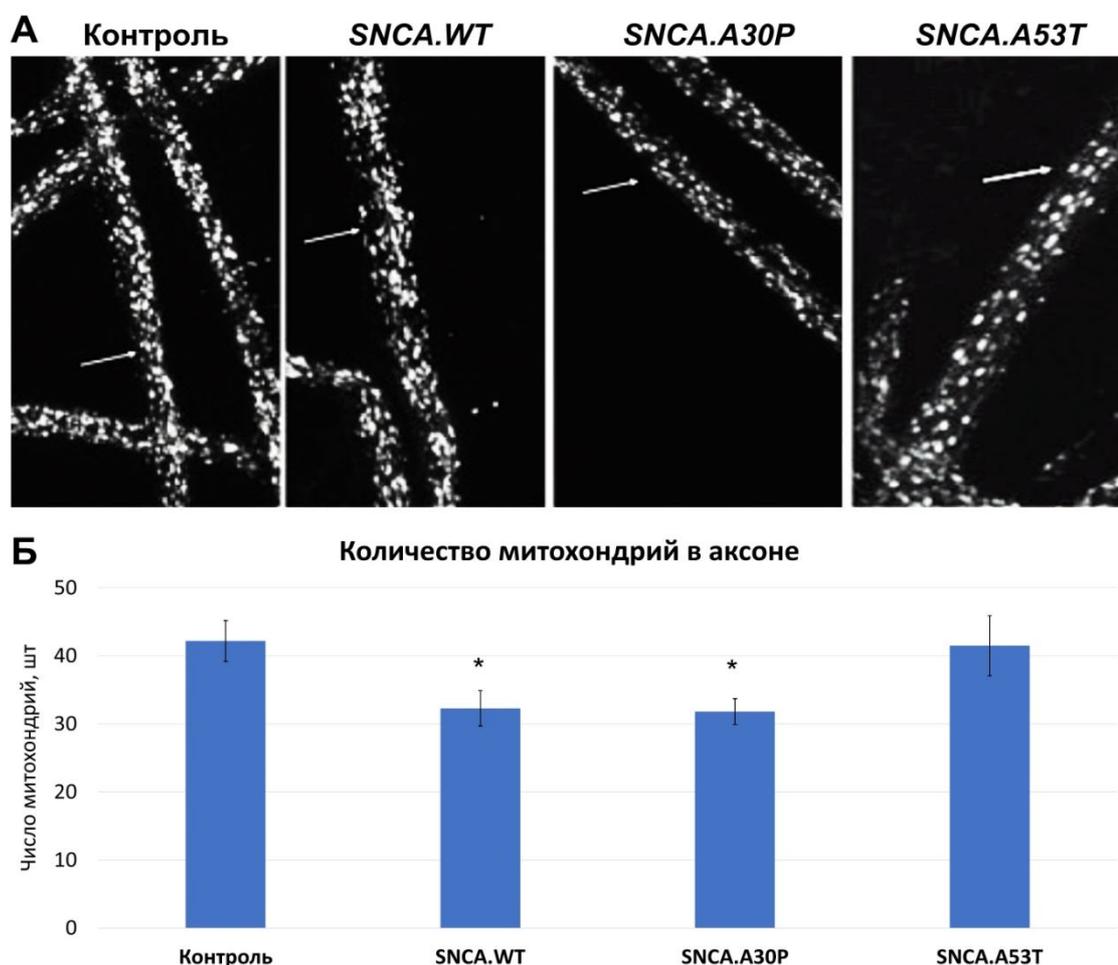


Рисунок 10 – Визуализация митохондрий в аксоне личинок *D. melanogaster* с экспрессией гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями A30P и A53T. А – Конфокальные изображения митохондрий в аксоне. Стрелки указывают на кластеры митохондрий. Масштаб 25 мкм. Б – количество митохондрий, подсчитанное вдоль аксона на 200 мкм. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего, * $p < 0.05$, $n \geq 5$, $N \geq 3$, однофакторный дисперсионный анализ.

Впоследствии многочисленные исследования подтвердили влияние гиперэкспрессии гена *SNCA* и образования патологических агрегатов α -синуклеина на нарушение функциональной активности митохондрий и их фрагментацию, как *in vitro*, так и *in vivo*. Нарушение функций митохондрий включают в себя: нарушения динамики митохондрий, ингибирование комплекса I цепи переноса электронов и увеличение активных форм кислорода. Кроме того, образование именно промежуточных агрегатов α -синуклеина (олигомеры и префибриллярные формы), но не мономерных или фибриллярных форм белка, уменьшают задержку ионов Ca^{2+} в митохондриях, что приводит к Ca^{2+} -зависимому нарушению функций митохондрий, которая включает потерю мембранного потенциала митохондрий (МтМП) и окисление NADH путем нарушения функций комплекса I митохондрий [Luth et al., 2014]. Мы впервые показали, что снижение количества митохондрий на ранней стадии развития заболевания происходит именно в нервно-мышечных соединениях, что напрямую будет оказывать влияние на процессы синаптической передачи.

Накопление и агрегация α -синуклеина является определяющей патогенетической особенностью БП и связано с синаптическими нарушениями и последующей синаптопатией [Caminiti et al., 2017]. Однако механизмы, лежащие в основе развития синаптопатии и последующей нейродегенерации, изучены недостаточно.

Заключение по разделу.

Мы оценили степень влияния гиперэкспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями A30P и A53T на ранние процессы развития синаптической патологии на нервно-мышечных соединениях личинки *D. melanogaster*. Нами показано, что развитие синаптической дисфункции под влиянием экспрессии *SNCA.WT/SNCA.A30P/SNCA.A53T* является комплексным процессом – уменьшается количество сателлитных синаптических бутонов и площадь синаптических контактов, нарушается распределение пресинаптического белка синаптотагмина-1, одного из главных участников процесса высвобождения нейромедиаторов, а также снижается количество митохондрий непосредственно в

нервно–мышечном соединении. Полученные данные позволяют говорить о начале развития синаптической патологии уже на самой ранней стадии развития, которая в дальнейшем будет приводить к гибели нейронов, однако эти процессы долгое время могут оставаться незамеченными ввиду различных механизмов компенсации организма.

Таким образом, мы продемонстрировали, что гиперэкспрессия гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями модулирует формирование и поддержание синаптических контактов и способствует развитию синаптической патологии.

3.2. Подавление экспрессии гена *SNCA* человека и его форм с мутациями способствует замедлению развития ранней нейропатологии при БП на модели *D. melanogaster*.

Возможность контролировать экспрессию трансгенов в системе *UAS–GAL4* при помощи температуры была положена в основу системы экспрессии, контролируемой во времени (temporal and regional gene expression targeting, TARGET). TARGET система основана на способности дрожжевого белка GAL80 подавлять активатор экспрессии GAL4. У мух, несущих как аллели *GAL4*, так и аллели *GAL80*, она позволяет вызвать индукцию или блокирование экспрессии целевого гена (в нашем случае, гена *SNCA* человека), либо конкретно в отдельных группах нейронов, либо во всей нервной системе, путем образования или распада комплекса белка GAL80 с доменом GAL4, активирующим транскрипцию. Совместная экспрессия *UAS–GAL4* и температурно–зависимого аллеля *GAL80* приводит к сильному подавлению экспрессии целевого гена при 18 °С и запуску его экспрессии при 29 °С (Рисунок 11). Следовательно, мы можем контролировать экспрессию генов–мишеней на протяжении всей жизни трансгенной дрозофилы.

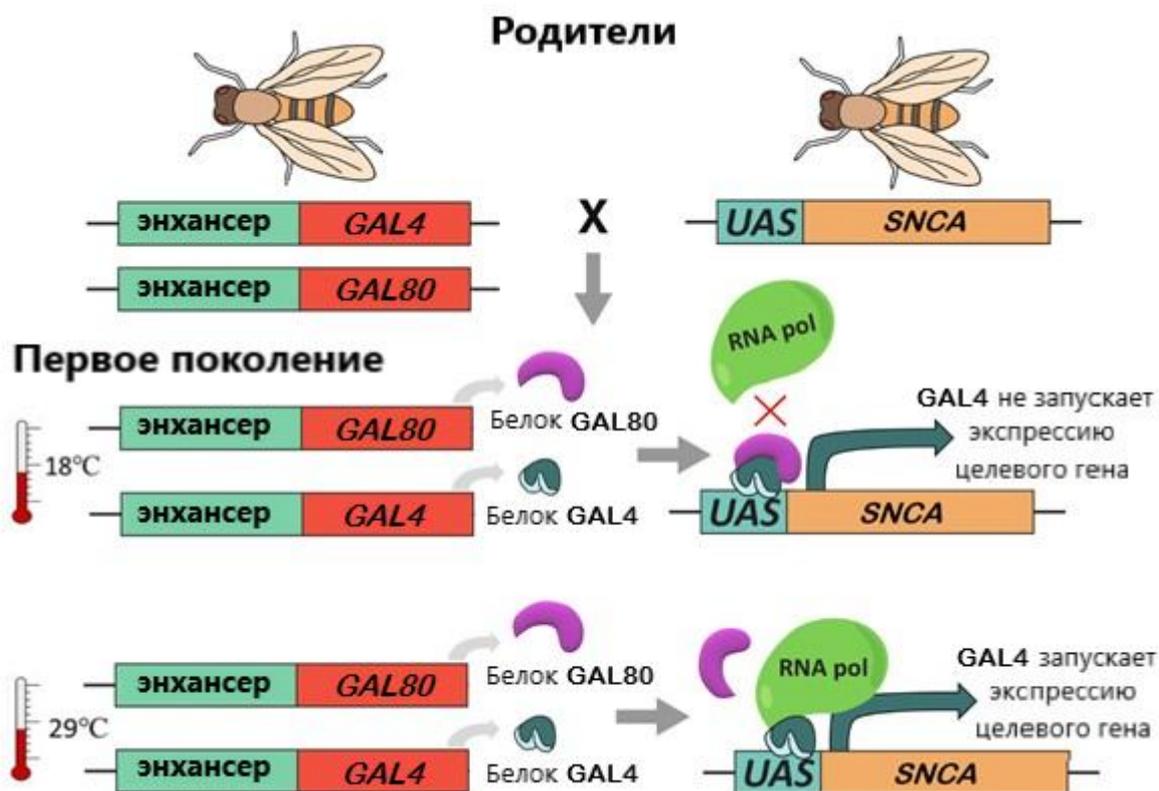


Рисунок 11 – Схема работы системы экспрессии *UAS-GAL4/GAL80*

Для исследования эффектов влияния запуска и подавления экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями на нейродегенеративные процессы у *D. melanogaster*, использовались линии дрозофилы, содержащие генетические конструкции с экспрессией *GAL4/GAL80* как в дофаминергических нейронах, так и во всех типах нейронов.

Немногие модели млекопитающих, как было сказано ранее, должным образом отражают типичные признаки БП – нарушение моторных функций и прогрессирующую потерю дофаминергических нейронов [Hewitt et al., 2017], что делает *D. melanogaster* удобной моделью для исследования патогенеза БП. В геноме дрозофилы отсутствует ортолог гена *SNCA* человека. Следовательно, для изучения механизмов, приводящих к нейродегенерации, используются трансгенные линии дрозофилы, экспрессирующие дикие или мутантные формы гена *SNCA* человека во всей нервной системе или в определенной группе нейронов [Feany et al., 2000]. Такие мухи демонстрируют типичные аномалии БП:

образование включений Леви, дегенерацию дофаминергических нейронов и нарушение моторных функций [Feany et al., 2000]. Тем не менее, в классических моделях экспрессия гена *SNCA* человека, управляемая системой *UAS-GAL4*, начинается с эмбриогенеза. Это приводит к тому, что возникают трудности интерпретации роли генов в патогенезе заболевания в зрелом возрасте. В нашей работе, для моделирования характерных особенностей БП на стадии имаго *D. melanogaster*, мы запускали экспрессию *SNCA.WT / SNCA.A30P / SNCA.A53T* при помощи системы *UAS-GAL4/GAL80*. Ранее эта система использовалась в работе L. Dabool с коллегами, где было показано, что непрерывная экспрессия гена *SNCA* человека дикого типа у дрозофилы на стадии имаго приводила к характерным признакам БП: гибели дофаминергических нейронов и снижению локомоторной активности [Dabool et al., 2019]. В нашем исследовании мы оценили роль супрессии экспрессии гена *SNCA* человека не только дикого типа, но и его форм *SNCA.A30P / SNCA.A53T* в течение стадии имаго, а также зависимость степени развития нейродегенерации от уровня различных форм α -синуклеина.

Мы использовали преимущества этой системы для экспрессии гена *SNCA.WT / SNCA.A30P / SNCA.A53T* человека только в течение определенного периода жизни дрозофилы (в течение одной или двух недель на стадии имаго). Затем, в течение оставшегося периода жизни (до четвертой недели жизни), экспрессия генов была подавлена. Были проанализированы следующие показатели: уровень белка α -синуклеина, количество дофаминергических нейронов, уровень дофамина в клетках мозга *D. melanogaster* и локомоторная активность мух. В нашей системе экспрессия *SNCA.WT / SNCA.A30P / SNCA.A53T* запускалась в различных типах тканей для анализа определенных показателей нейропатологии: для оценки сохранения количества дофаминергических нейронов экспрессия осуществлялась только в дофаминергических клетках, в то время как для исследования остальных показателей экспрессия запускалась во всех нейронах дрозофилы (Рисунок 12) [Golomidov et al., 2022].

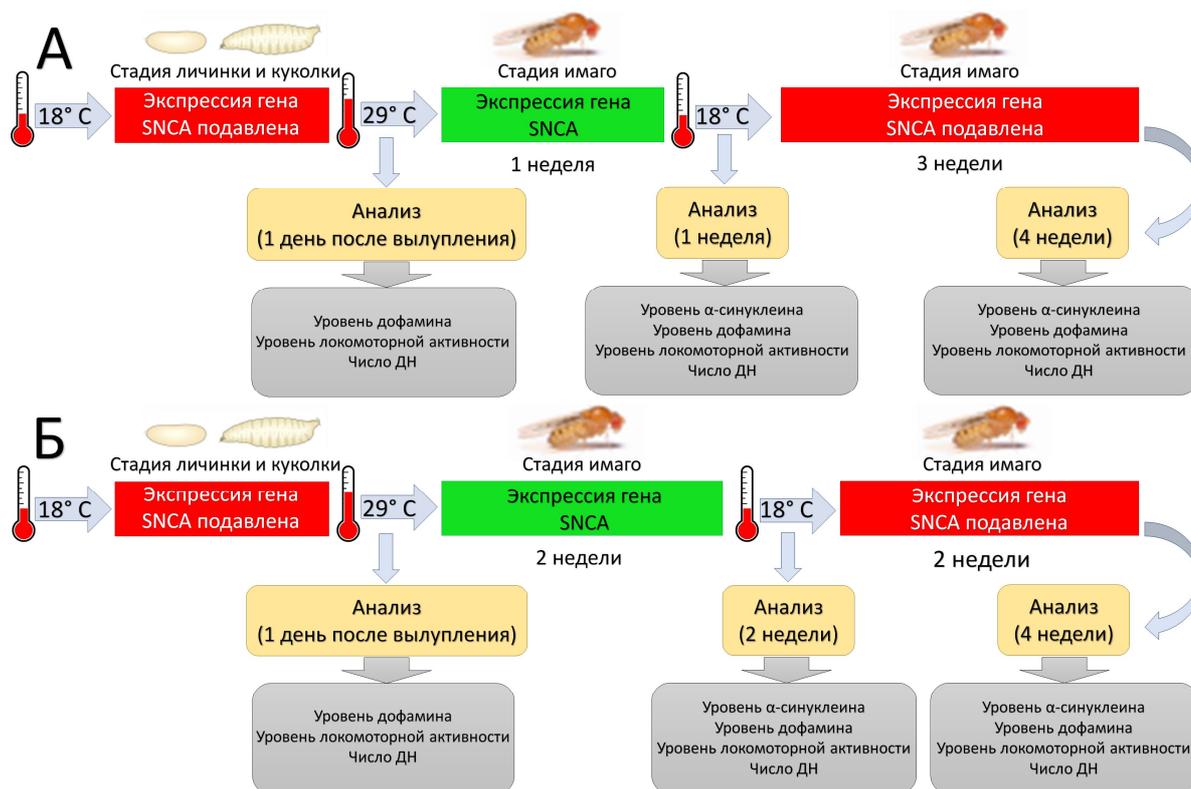


Рисунок 12 – Схема проведения эксперимента. А – До вылета мух содержали при температуре 18 °С, что приводило к подавлению экспрессии *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T*. После этого мух перемещали в термостат и содержали при температуре 29 °С в течение одной недели для экспрессии целевого гена. Затем, вплоть до 28-го дня жизни (4 недели), мух снова перемещали в термостат и содержали при температуре 18 °С, чтобы подавить экспрессию целевого гена. Б – Схема эксперимента аналогична схеме, показанной в (А), за исключением периодов времени: экспрессия *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T* запускалась в течение двух недель, а подавление экспрессии осуществлялось до 28-го дня жизни. В точках, обозначенных как "анализ", измеряли уровень α-синуклеина, уровень дофамина, уровень локомоторной активности и количество дофаминергических нейронов. Кроме того, первые три параметра были измерены при экспрессии *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T* во всех нейронах (*elav*), а степень дегенерации нейронов определяли при экспрессии *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T* в дофаминергических нейронах (*ple*) дрозофилы.

В литературе описано большое разнообразие префибриллярных олигомерных форм α -синуклеина, которые различаются по структуре, молекулярной массе и морфологии [Lashuel et al., 2002]. Большинство олигомеров α -синуклеина растворимы, в отличие от нерастворимых фибрилл, однако некоторые из них с течением времени образуют фибриллы, а другие, в итоге, образуют аморфные агрегаты. Как было показано ранее, в том числе и нашими исследованиями, участие α -синуклеина в различных физиологических процессах и его функциональная активность делают его важным регулятором синаптических взаимодействий. Известно, что агрегация и неправильный фолдинг этого белка происходит под влиянием различных внешних (окислительный стресс, влияние дофамина) или внутренних (высокая концентрация белка, гиперэкспрессия гена, наличие мутаций) факторов [Feng et al., 2010]. При патологических состояниях неправильный фолдинг белка приводит к структурным изменениям в его мономерном состоянии, при этом сначала образуются небольшие растворимые аморфные олигомеры, затем образуются олигомеры с преобладанием β -структур, протофибриллы и, наконец, образуются нерастворимые амилоидные фибриллы.

Мы провели вестерн-блот анализ, с помощью которого попытались оценить уровни растворимых в Triton / SDS и нерастворимых в Triton / SDS (растворимых в мочевины) фракций α -синуклеина после последовательной экстракции. Triton / SDS растворимая фракция, содержащая как растворимую цитозольную форму, так и растворимые липид-ассоциированные формы белка, в дальнейшем называется нами «растворимой фракцией α -синуклеина». В этой работе мы не разделяем различные формы α -синуклеина, которые содержатся в «растворимой фракции» (мономеры, димеры, олигомеры и т.д.), но отделяем их от фибриллярных агрегатов. Фракция, которая нерастворима в Triton / SDS, но растворима в буфере с мочевиной, содержит белковые агрегаты и в дальнейшем называется нами «нерастворимой фракцией α -синуклеина». Когда ген *SNCA* человека дикого типа и его формы с мутациями экспрессировались в течение 1 недели во всех нейронах, мы наблюдали небольшое накопление белка α -синуклеина как дикого

типа, так и его форм с мутациями, в основном растворимой фракции, в клетках мозга дрозофилы (Рисунок 13) [Golomidov et al., 2022].

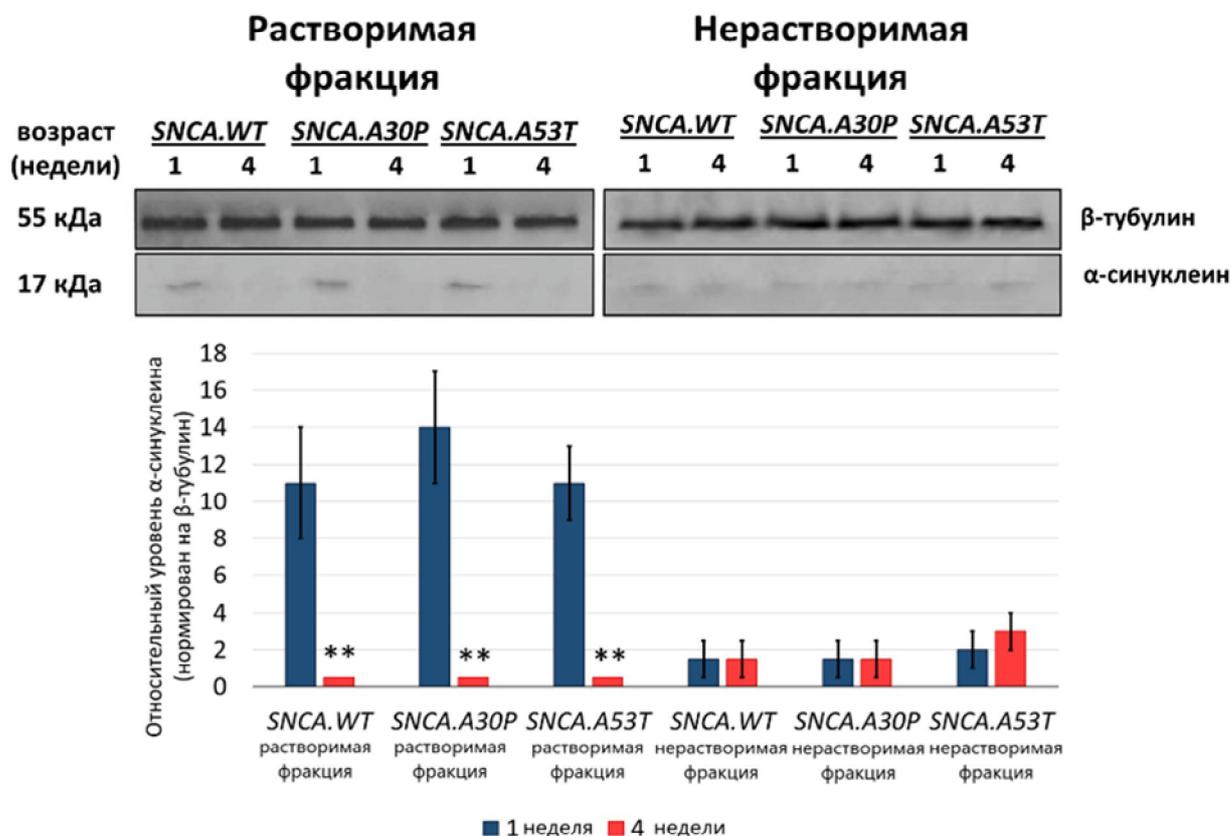


Рисунок 13 – Экспрессия *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T* во всех нейронах дрозофилы в течение одной недели с использованием системы *UAS-GAL4/GAL80* приводит к накоплению различного уровня α -синуклеина в растворимой и нерастворимой фракциях. Репрезентативный вестерн-блот показывает уровни растворимого и нерастворимого α -синуклеина в цельных лизатах мозга *D. melanogaster*. Гистограмма показывает снижение относительного уровня α -синуклеина после подавления экспрессии *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T* в растворимой, но не в нерастворимой фракции α -синуклеина (измерено на 4 неделе жизни). Данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего, $**p < 0.005$, 100 голов/генотип, $N \geq 3$, однофакторный дисперсионный анализ.

После блокирования экспрессии *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T* человека в течение следующих 3 недель растворимая фракция белка α -синуклеина была удалена из клеток, в то время как уровень белка нерастворимой фракции оставался на том же, незначительно определяемом уровне (измеренном на 4-ой неделе).

При экспрессии гена *SNCA* человека и его форм с мутациями в течение двух недель во всей нервной системе, мы наблюдали значительно более высокие уровни белка α -синуклеина как растворимой, так и нерастворимой фракции (Рисунок 14) [Golomidov et al., 2022].

После подавления экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями у дрозофилы уровень растворимой фракции белка α -синуклеина значительно снизился к 4-ой неделе. Между тем уровень нерастворимой фракции белка α -синуклеина оставался на прежнем уровне. Но, стоит отметить, что уровень нерастворимой фракции α -синуклеина к 4-й неделе у мух с генотипом *SNCA.A53T* находился на более высоком уровне по сравнению с нерастворимой фракцией белка у мух с экспрессией *SNCA.WT* и *SNCA.A30P*.

Вопрос о том, какие формы α -синуклеина более токсичны – олигомеры или фибриллы, остается предметом интенсивного обсуждения. Однозначное решение этого вопроса осложняется тем, что как олигомеры, так и фибриллы имеют множество различных структурных форм, которые обладают разной степенью токсичности.

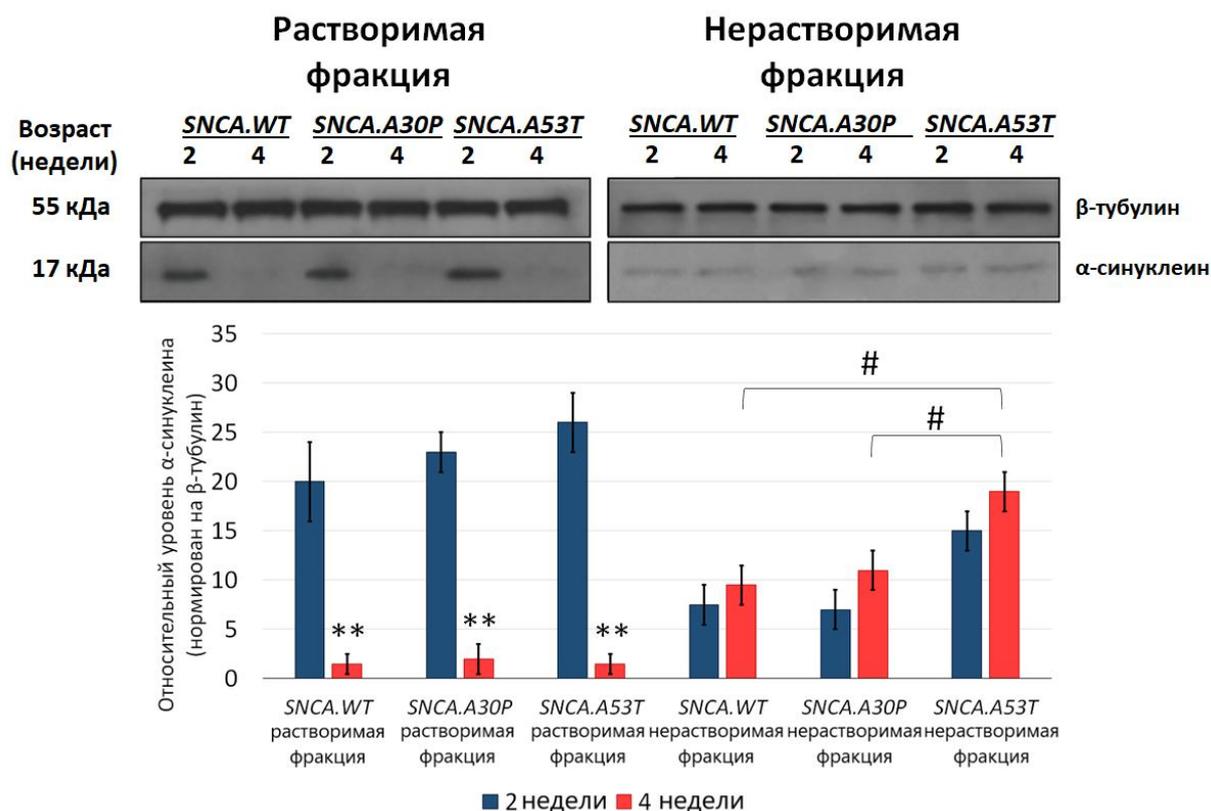


Рисунок 14 – Экспрессия *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T* человека в течение 2 недель с использованием системы *UAS-GAL4/GAL80* приводит к различному уровню накопления α-синуклеина в растворимой и нерастворимой фракциях. Репрезентативный вестерн-блот показывает уровни растворимого и нерастворимого α-синуклеина в цельных лизатах мозга *D. melanogaster*. Гистограмма показывает снижение относительного уровня белка α-синуклеина после подавления экспрессии *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T* человека в растворимой, но не в нерастворимой фракции α-синуклеина (измерено на 4 неделе жизни). Звездочка (*) – характеризует изменения в пределах одного генотипа. Решетка (#) – характеризует изменения между различными генотипами. Данные представлены в виде среднего ± стандартная ошибка среднего, #*p* < 0.05, ***p* < 0.005, 100 голов/генотип, N≥3, однофакторный дисперсионный анализ.

Ранее было показано, что α-синуклеин с мутациями A30P и A53T более стабилен и устойчив к деградации, чем белок дикого типа [Cuervo, 2014]. В наших экспериментах подавление экспрессии гена *SNCA* человека и его форм с

мутациями приводило к значительному снижению растворимых форм белка, в то же время нерастворимая фракция не удалялась из клеток к четвертой неделе. Более того, у мух с экспрессией гена *SNCA* человека с точечной мутацией, приводящей к замене A53T уровень нерастворимых форм α -синуклеина на 4 неделе был выше, чем уровень нерастворимой фракции α -синуклеина у мух с экспрессией *SNCA.WT* и *SNCA.A30P*. Это может быть объяснено тем, что данная мутация увеличивает тенденцию α -синуклеина полимеризоваться в фибриллярные структуры. Ускоренное образование фибрилл при наличии мутации A53T было отмечено ранее К. А. Conway с коллегами [Conway et al., 1998].

Ранее многочисленными исследованиями на дрозофиле было показано развитие нейродегенеративных процессов, приводящих к гибели дофаминергических нейронов, а также нарушению локомоторной активности, как при экспрессии как гена *SNCA* человека дикого типа, так и различных его форм с мутациями. Такие исследования проводились как при помощи системы *UAS-GAL4* [Feany et al., 2000; Nevzglyadova et al., 2018], запускающей экспрессию с эмбриогенеза, так и при помощи системы *UAS-GAL4/GAL80* [Dabool et al., 2019], позволяющей контролировать уровень экспрессии гена в течение жизни. Для количественного определения дофаминергических нейронов дрозофилы в основном используются два метода: метод иммуноокрашивания и флуоресцентный метод, на основе экспрессии *GFP*. Оба метода в большинстве случаев дают сопоставимые результаты, и поддающиеся количественной оценке снижение сигнала иммуноокрашивания или уровня сигнала *GFP* интерпретируется как потеря дофаминергических нейронов [Barone et al., 2013; Song et al., 2017; Trinh et al., 2008; White et al., 2010]. Кроме того, количественное снижение сигнала *GFP* в дофаминергических нейронах, хорошо коррелирует с другими обнаруженными фенотипами, связанными с БП, и может надежно использоваться в качестве признака нейродегенеративного процесса при моделировании на дрозофиле [Burr et al., 2014; Maitra et al., 2019; Navarro et al., 2014]. Также, ранее было показано, что экспрессия гена *SNCA* человека не влияет

на экспрессию гена *GFP* [Nevzglyadova et al., 2018], а экспрессия гена *GFP*, в свою очередь, не приводит к гибели дофаминергических нейронов или снижению продолжительности жизни трансгенных мух [Botella et al., 2008].

ДН у дрозофилы расположены в двусторонних кластерах спереди и сзади в надпищеводных (головной мозг) и подпищеводных ганглиях [Botella et al., 2008]. Для того чтобы сделать кластеры визуально различимыми, мы запускали экспрессию *GFP* в мембранах дофаминергических нейронов, с последующим количественным анализом GFP-позитивных клеток при помощи конфокальной микроскопии, согласно методу J. A. Botella [Botella et al., 2008].

Мозг контрольной линии и линии мух с экспрессией гена *SNCA* человека дикого типа и его мутантных форм анализировали в определенные промежутки времени: после вылета, после активации экспрессии гена *SNCA.WT / SNCA.A30P / SNCA.A53T* в течение определенного периода времени (после одной или двух недель) и в конце четвертой недели жизни (через 3 или 2 недели после подавления экспрессии гена соответственно). Экспрессия *SNCA.WT* и *SNCA.A53T* в течение одной недели не приводила к статистически достоверной гибели дофаминергических нейронов, однако у линии с экспрессией гена *SNCA.A30P* мы обнаружили развитие начальных признаков нейродегенерации, выраженное в небольшой (отличие от контроля не более чем на 15%), но статистически достоверной гибели ДН (Рисунок 15А, 15Б, 16А) [Golomidov et al., 2022]. После блокирования экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями мы не наблюдали, статистически достоверной разницы в снижении количества дофаминергических нейронов у мух всех генотипов между первой и четвертой неделями жизни.

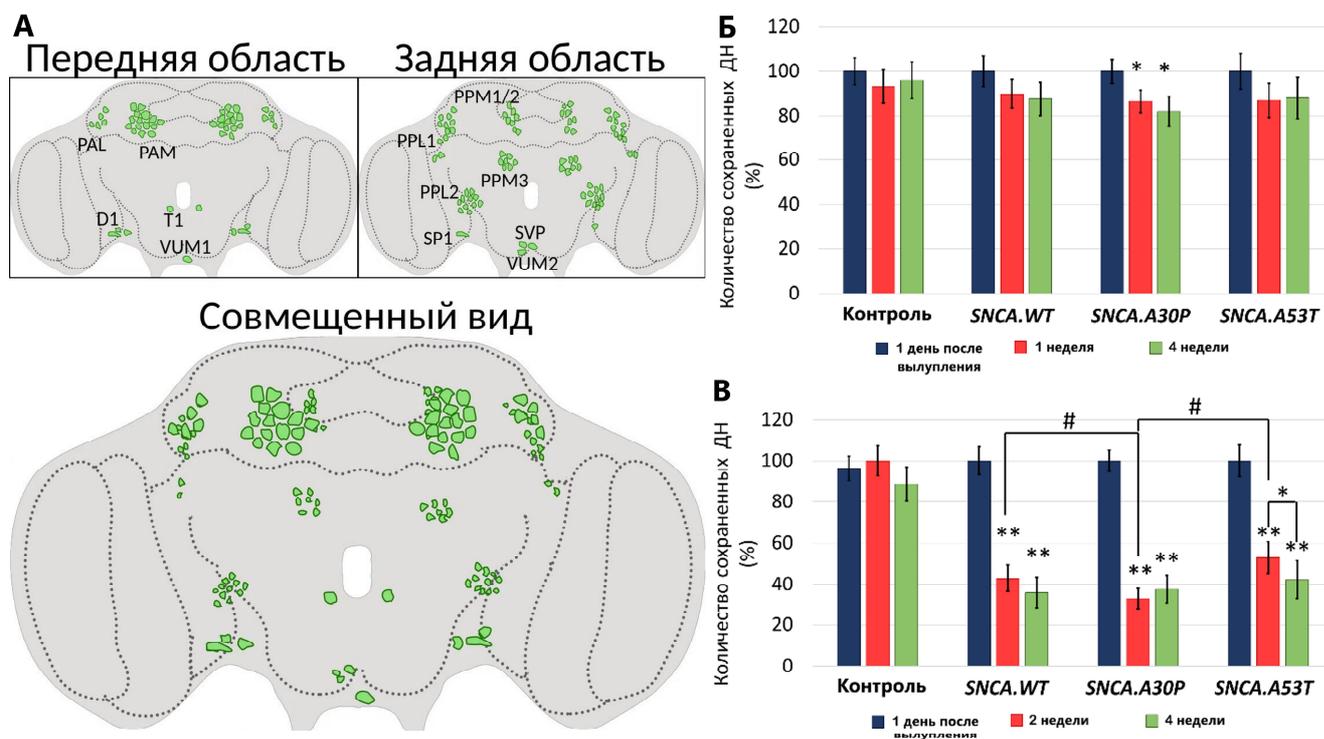


Рисунок 15 – А – Схема расположения кластеров дофаминергических нейронов в мозге *D. melanogaster*. Б – Гистограмма количества дофаминергических нейронов после 1 недели экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями с последующим подавлением экспрессии гена в течение 3 недель. В – Гистограмма количества дофаминергических нейронов после 2 недель экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями с последующим подавлением экспрессии гена в течение 2 недель. Звездочка (*) характеризует изменения в пределах одного генотипа. Решетка (#) характеризует изменения между различными генотипами. Данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего, # $p < 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, $n \geq 8$ голов/ генотип, $N \geq 3$, однофакторный дисперсионный анализ.

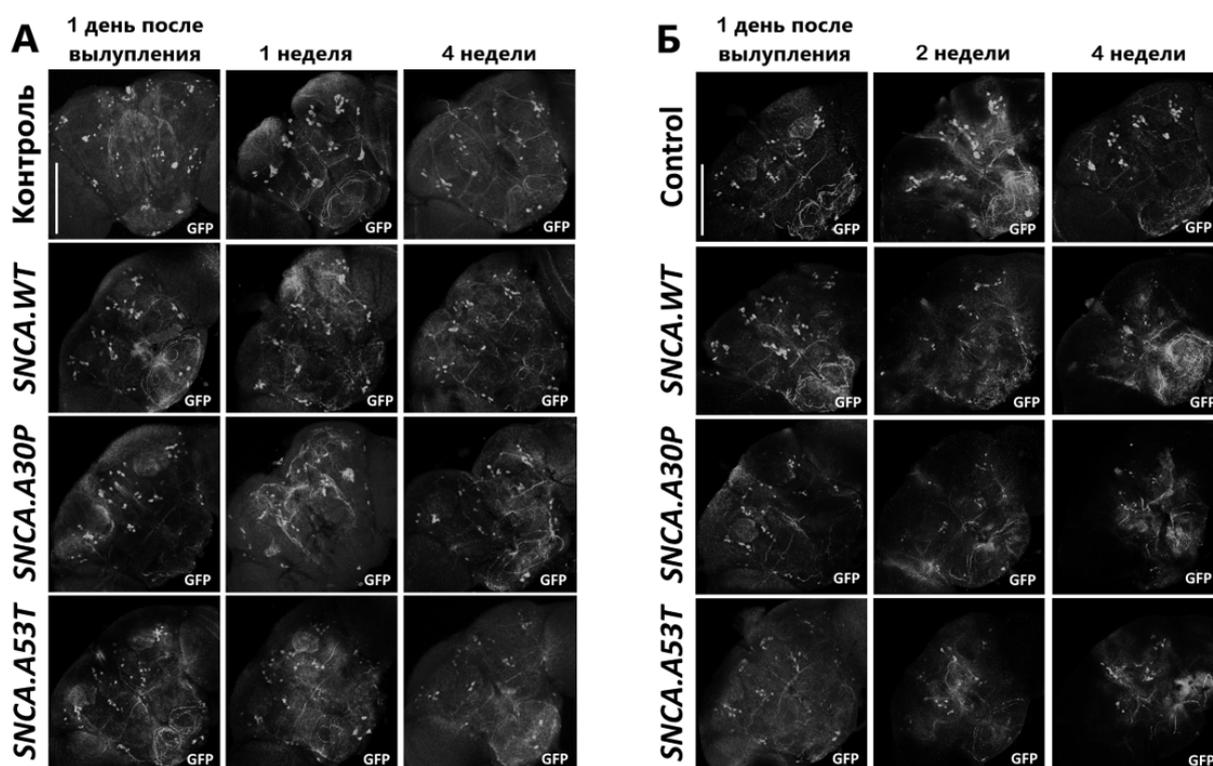


Рисунок 16 – Кластеры дофаминергических нейронов с экспрессией *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T* и с экспрессией *GFP* (*UAS-CD8-GFP*) в мембране ДН с использованием системы *UAS-GAL4/GAL80*. Конфокальная проекция мозга дрозофилы, вид сзади. Масштаб 100 мкм. А – Дофаминергические нейроны после 1 недели экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями с последующим подавлением экспрессии гена в течение 3 недель. Б – дофаминергические нейроны после 2 недель экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями с последующим подавлением экспрессии гена в течение 2 недель.

Экспрессия у дрозофилы *SNCA.WT* в течение 2 недель приводила к потере более чем 50% дофаминергических нейронов. Этот эффект также наблюдался при экспрессии *SNCA* с мутациями А30Р и А53Т. На том же временном интервале у контрольных мух не наблюдалось потери ДН. После подавления экспрессии *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* мы не наблюдали статистически значимых различий в количестве ДН между второй и четвертой неделей. Однако мы наблюдали статистически достоверное уменьшение количества ДН к четвертой неделе у мух

с экспрессией *SNCA.A53T*, но стоит отметить, что гибель ДН в этот временной промежуток была значительно меньше, чем в первые 2 недели, когда экспрессия гена не была подавлена (Рисунок 15А, 15В, 16Б) [Golomidov et al., 2022]. Интересно, что гибель ДН сопровождалась накоплением как растворимых, так и нерастворимых форм α -синуклеина, в то время как к четвертой неделе снижение уровня растворимой и присутствие по большей части нерастворимой формы α -синуклеина не усиливало нейродегенерацию. Этот факт может указывать на то, что именно растворимые формы α -синуклеина участвуют в инициации патологии.

Точечные мутации, связанные с семейными формами БП, приводят к раннему началу развития патологии. Мы наблюдали наиболее сильные нейродегенеративные процессы у мух, экспрессирующих ген *SNCA* человека с мутацией А30Р. Это может быть связано с влиянием этой мутации на способность белка связываться с везикулами [Jensen et al., 1998]. Таким образом, в нервных клетках нарушается перенос α -синуклеина с мутацией А30Р посредством быстрого аксонного транспорта. Перераспределение белка из-за потери его связывающей активности может быть одним из основных последствий мутации. Со временем это приводит к накоплению белка в отдельных частях клетки и образованию олигомерных и фибриллярных форм. Конформационная лабильность α -синуклеина делает его более склонным к агрегации и может ускорить превращение мономерного α -синуклеина в олигомеры или протофибриллы [Luk et al., 2009]. Известно, что многие патогенные эффекты в клетках развиваются под действием растворимых форм, в частности олигомеров α -синуклеина [Campioni et al., 2010]. Олигомеры α -синуклеина также способствуют увеличению продукции активных форм кислорода и снижению синаптической активности [Choi et al., 2013]. После остановки экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями мы наблюдали, что уровень нейродегенерации значительно замедлялся к четвертой неделе, при этом присутствовала в большей степени нерастворимая форма α -синуклеина. Мы не обнаружили различий между количеством дофаминергических нейронов у мух с

экспрессией *SNCA.WT* и *SNCA.A30P* к четвертой неделе по сравнению со второй неделей жизни, но мы наблюдали более длительную дегенерацию нейронов у мух с генотипом *SNCA.A53T*. Наличие мутации A53T характеризуется не только повышенной тенденцией к фибрилляции α -синуклеина, но и образованием агрегатов различной структуры [Li et al., 2001], что может привести к более быстрому образованию олигомеров и усилению его токсичного действия на клетки. Некоторые исследования также показали, что присутствие α -синуклеина в форме фибрилл влияет на уровень нейродегенерации и образование новых агрегатов α -синуклеина [Mougenot et al., 2012]. Однако стоит отметить, что процент нейронов, подвергшихся дегенерации в этот период, значительно меньше, чем в первые две недели жизни дрозофилы.

Взаимосвязь между α -синуклеином и дофамином была установлена многими исследованиями. Показано, что сверхэкспрессия гена *SNCA* человека дикого типа снижает нейротрансмиссию дофамина, экспрессию и активность тирозингидроксилазы (ТН) и везикулярного переносчика моноаминов 2 (VMAT2), уменьшает опосредованное переносчиками поглощение дофамина и увеличивает опосредуемый переносчиками отток дофамина. Это ведет к снижению внутриклеточных и внеклеточных уровней дофамина, что в конечном итоге снижает дофаминергическую нейротрансмиссию в головном мозге [Cabin et al., 2002; Butler et al., 2017].

Мы проанализировали влияние экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями в течение одной или двух недель на уровень дофамина в клетках мозга *D. melanogaster*, приняв уровень дофамина в первый день после вылета мух в линии определенного генотипа за 100%. Экспрессия гена *SNCA* человека дикого типа или его форм с мутациями в течение одной недели после вылета не привела к изменениям уровня дофамина в клетках мозга дрозофилы (Рисунок 17А) [Golomidov et al., 2022]. Мы также обнаружили, что у мух всех генотипов не было статистически значимой разницы в уровнях дофамина между первой и четвертой неделями после подавления экспрессии *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T*. Однако мы обнаружили, что экспрессия *SNCA* человека

как дикого типа, так и его форм с мутациями, в течение двух недель привела к значительному снижению уровня дофамина. Наиболее сильный эффект в снижении уровня дофамина к четвертой неделе наблюдался у мух с экспрессией гена *SNCA* с точечными мутациями *A30P* и *A53T* (Рисунок 17Б), однако средние значения по отношению к уровню дофамина в линии *SNCA.WT* в аналогичный период времени не имеют статистически значимых отличий [Golomidov et al., 2022]. Сравнивая значения между второй и четвертой неделями всех генотипов мух, мы обнаружили, что после подавления экспрессии гена *SNCA* человека как дикого типа, так и его форм с мутациями, уровень дофамина далее не снижался.

Недавнее исследование показало, что контролируемая AAV1/2 гиперэкспрессия гена *SNCA* человека с мутацией A53T в черной субстанции крыс и обезьян, индуцировала дегенерацию нигральных дофаминергических нейронов и снижала уровни дофамина и тирозингидроксилазы в стриатуме, одновременно увеличивая оборот дофамина [Ip et al., 2017]. В нашей работе мы также наблюдаем четкую связь между гибелью дофаминергических нейронов и снижением уровня дофамина. Известно, что потеря активности α -синуклеина приводит к нарушению оборота дофамина [Alerte et al., 2008] и повторному захвату синаптических везикул [Fountain et al., 2008]. В дальнейшем это может привести к увеличению цитозольного дофамина, который окисляется с образованием токсичных аддуктов, хинонов и активных форм кислорода [Asanuma et al., 2003]. В какой-то момент это может вызвать каскад превращения растворимой мономерной формы α -синуклеина в различные протофибриллярные и фибриллярные формы, что в итоге приведет к потере функциональной активности α -синуклеина и регулируемых им белковых взаимодействий [Perez et al., 2004].

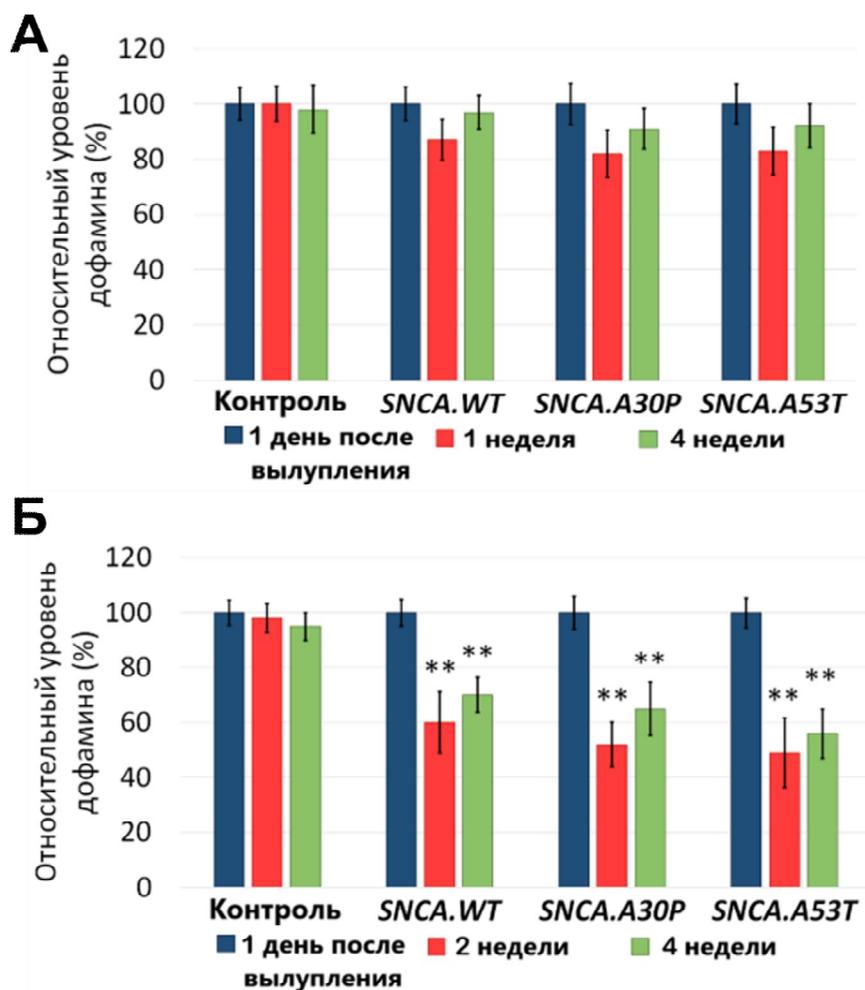


Рисунок 17 – Уровень дофамина у *D. melanogaster* с экспрессией *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T*. А – Экспрессия *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T* в течение одной недели, затем, вплоть до 4 недели, экспрессия генов была подавлена. Б – Экспрессия *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T* в течение двух недель, затем, вплоть до 4 недели, экспрессия генов была подавлена. Данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего, $**p < 0.005$; 100 голов/генотип, $N \geq 3$, однофакторный дисперсионный анализ.

Мы не наблюдали статистически значимых различий между уровнем дофамина в системе с экспрессией *SNCA* человека как дикого типа, так и его форм с мутациями, в течение одной недели, как по отношению к контролю, так и по сравнению с контрольной точкой – четыре недели (три недели, в течение которых экспрессия гена *SNCA* была подавлена). В то же время, когда ген *SNCA* человека и его форм с мутациями экспрессировался в течение двух недель, мы наблюдали

значительное снижение уровня дофамина, которое связано с гибелью дофаминергических нейронов, а также с образованием значительного уровня растворимых форм α -синуклеина. После прекращения экспрессии гена *SNCA* человека и его форм с мутациями мы не обнаружили статистически значимого изменения уровня дофамина относительно контрольной точки – 4 недели (две недели, в течение которых экспрессия гена *SNCA* была подавлена), что может быть связано со снижением растворимых форм α -синуклеина. Сохранение уровня дофамина после подавления экспрессии *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T* является важным фактором замедления нейродегенеративных процессов. Поддержание уровня дофамина может быть следствием деградации α -синуклеина, возможно, за счет увеличения активности лизосомного пути, что в свою очередь, влияет на весь каскад образования токсичных форм α -синуклеина, а также на действие различных механизмов клеточной компенсации уровня дофамина. Механизмы компенсации, которые возникают при БП, включают повышение доступности и чувствительности клеток к оставшемуся дофамину. При БП часто встречаются повышенные уровни ферментов, ответственных за синтез дофамина – тирозингидроксилазы и декарбоксилазы. Следовательно, любой оставшийся дофамин используется более эффективно и его оборот увеличивается. Кроме того, после входа в синапс, эффекты дофамина могут уменьшаться дольше, поскольку он может выводиться медленнее из-за снижения уровня транспортеров дофамина в каждом сохраненном нейроне. Эти изменения в дофаминергической системе могут происходить при прогрессировании нейродегенеративного процесса достаточно поздно, примерно во время появления симптомов, когда недофаминергические или структурные дофаминергические механизмы компенсации не сработали.

Учитывая, наблюдаемые признаки нейропатологии, такие как накопление α -синуклеина, дегенерацию дофаминергических нейронов и снижение уровня дофамина, мы провели анализ двигательной дисфункции. Локомоторная активность в значительной степени сохраняется у молодых мух. Однако, как было показано ранее, у трансгенных дрозофил с экспрессией *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* /

SNCA.A53T, развивается нарушение двигательной активности [Feany et al., 2000]. В нормальном физиологическом состоянии *D. melanogaster* обладает реакцией отрицательного геотаксиса, которая может быть использована для оценки локомоторной активности мух (Рисунок 18А).

Мы не выявили изменений в локомоторной активности у мух при экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа или его форм с мутациями в течение одной недели по сравнению с контролем (Рисунок 18Б), в то время как у мух с экспрессией *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T* в течение двух недель, было отмечено снижение двигательной активности на 60% к 14-му дню (Рисунок 18В) [Golomidov et al., 2022]. Наибольшее снижение двигательной активности наблюдалось у мух с генотипом *SNCA.A30P*. Однако после подавления экспрессии *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T*, к четвертой неделе жизни, статистических значимых отличий от уровня локомоторной активности на второй неделе выявлено не было [Golomidov et al., 2022].

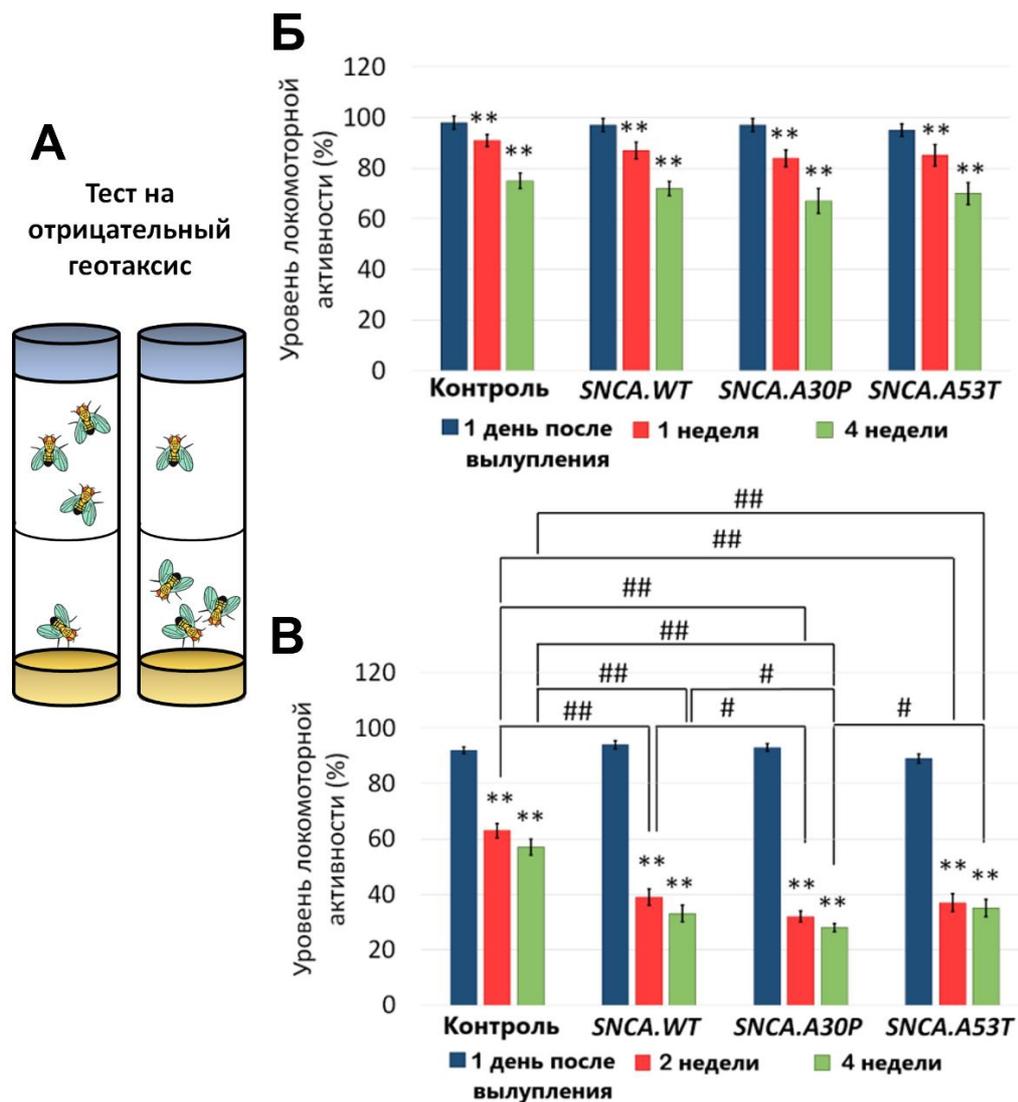


Рисунок 18 – Локомоторная активность *D. melanogaster*. А – Схема теста на реакцию отрицательного геотаксиса. Б – Локомоторная активность мух после одной недели экспрессии *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T* и после трех недель, в течение которых экспрессия гена была подавлена. В – Локомоторная активность мух после двух недель экспрессии *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T* и после двух недель, в течение которых экспрессия гена была подавлена. Звездочка (*) – характеризует изменения внутри одного генотипа. Решетка (#) – характеризует изменения между различными генотипами. Данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего, ** $p < 0.005$, # $p < 0.05$, ## $p < 0.005$, $N \geq 3$, однофакторный дисперсионный анализ.

У мух, с экспрессией гена *SNCA* человека с мутацией A30P, наблюдалось наиболее сильное снижение локомоторной активности по сравнению с контролем. Как мы показали ранее, наличие этой мутации приводит к самой быстрой потере дофаминергических нейронов. Весь каскад нейродегенеративных процессов, начиная с накопления α -синуклеина, гибели дофаминергических нейронов и снижения уровня дофамина, приводит к характерным моторным нарушениям. Прогрессирующее снижение двигательной активности идет параллельно со всеми нейродегенеративными процессами. В то же время, после подавления экспрессии *SNCA.WT / SNCA.A30P / SNCA.A53T*, уровень локомоторной активности остается на прежнем уровне, что может также свидетельствовать о замедлении развития нейропатологии.

В нашей работе мы наблюдали взаимосвязь между уровнем растворимых форм α -синуклеина и уровнем нейродегенерации. Ранее было показано, что убиквитин-протеасомный и аутофагосомно-лизосомный пути являются двумя путями, которые играют важную роль в деградации α -синуклеина [Ebrahimi-Fakhari et al., 2011]. Растворимые олигомеры α -синуклеина ингибируют активность 20S и 26S протеасом, что приводит к нарушению каскада деградации белка [Emmanouilidou et al., 2010]. Лизосомный путь также участвует в деградации α -синуклеина, в том числе олигомеров и протофибрилл, однако зрелые фибриллы и ТЛ мало чувствительны к данному типу деградации [Lee et al., 2004]. Наличие мутаций в гене *SNCA* также может ухудшить процесс деградации белка и активировать в качестве компенсации макроавтофагию [Cuervo, 2004]. Однако, как было показано в ряде исследований, сверхэкспрессия гена *SNCA* ухудшает макроавтофагию, посредством ингибирования Rab1a, что ведет к неправильной локализации белка аутофагии Atg9 и уменьшению образования омегасом [Winslow et al., 2010]. Это может привести к более длительному пребыванию α -синуклеина в клетке. Некоторые данные указывают на то, что блокирование лизосомного пути ведет к накоплению олигомеров α -синуклеина и в итоге к гибели клеток [Lee et al., 2004]. Ингибирование активности лизосом, наличие олигомерных форм амилоидогенных белков и их неполная

деградация способствует дальнейшему формированию агрегатов и увеличению токсичности [Lee et al., 2004].

Показано, что α -синуклеин участвует в контроле высвобождения нейротрансмиттеров через взаимодействие с членами семейства SNARE. Несмотря на то, что роль α -синуклеина в сборке SNARE-комплекса все еще остается противоречивой, несколько исследований были сосредоточены на определении роли α -синуклеина в качестве шаперона SNARE при действии в комбинации с другими белками. Например, было показано, что α -синуклеин взаимодействует с белком цистеиновой цепочки (CSP α), синаптическим везикулярным белком с шаперонной активностью. Этот пресинаптический шаперон необходим для высвобождения нейромедиаторов и сохранения нейронов [Sharma et al., 2011].

В главе 3.1 мы показали зависимость распределения синаптотагмина-1 при экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями. В данной части работы мы анализируем, как гиперэкспрессия гена *SNCA* человека дикого типа, а также его форм с мутациями влияет на уровень экспрессии синаптических генов *Syt1* и *nSyb* в клетках мозга трансгенных *D. melanogaster*. Поскольку развитие нейродегенеративного процесса мы наблюдали только при экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями в течение двух недель, то влияние экспрессии *SNCA.WT / SNCA.A30P / SNCA.A53T* на уровень экспрессии генов *Syt1* и *nSyb* определялось на аналогичном временном промежутке (Рисунок 19).

Благодаря температурно-зависимому характеру экспрессии целевого гена мы смогли оценить, как подавление экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями отразится на уровне экспрессии синаптических генов *Syt1* и *nSyb*.

На сегодняшний день известно, что α -синуклеин участвует во взаимодействиях с различными белками, участвующими в поддержании гомеостаза кальция. Как мы показали ранее (см. раздел 3.1.), α -синуклеин влияет на локализацию синаптотагмина-1, являющегося кальциевым сенсором, который

участвует в последних стадиях высвобождения нейромедиатора в синаптическую щель. Синаптотагмин-1 состоит из N-концевого трансмембранного домена, связывающего элемента и двух C2 доменов (C2A и C2B), связывающих кальций. Он связывается с SNAP-25, осуществляя удержание секреторной везикулы у пресинаптической мембраны, и участвует в выбросе нейромедиатора за счёт регуляции SNARE комплекса при увеличении содержания кальция. У *D. melanogaster* было выделено 7 различных изоформ белка синаптотагмина, из которых только синаптотагмин-1 обнаруживается в большом количестве в синапсах. Мы проанализировали как гиперэкспрессия *SNCA.WT / SNCA.A30P / SNCA.A53T* будет влиять на уровень экспрессии гена *Syt1*.

Мы показали, что уровень экспрессии гена *Syt1* снижался после запуска экспрессии *SNCA* как дикого типа, так и его форм с мутациями в течение 2 недель. Также было продемонстрировано снижение экспрессии *Syt1* уже после подавления экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями к 4 неделе жизни трансгенной дрозофилы (Рисунок 19А). Данные результаты указывают на значительное влияние, которое оказывает гиперэкспрессия *SNCA.WT / SNCA.A30P / SNCA.A53T* на экспрессию *Syt1*. Нарушение регуляции Ca^{2+} может привести к гибели нейрональных клеток [Zaichick et al., 2017]. Например, протонная АТФаза V-типа (V-АТФаза) поддерживает постоянный уровень pH, поэтому связывание олигомеров α -синуклеина с V-АТФазой может нарушить подкисление лизосом и привести к аномальному гомеостазу Ca^{2+} [Nixon, 2013]. Аналогичным образом, связывание α -синуклеина с нарушенной функциональной активностью с синаптотагмином-1 может нарушить регуляцию гомеостаза ионов кальция и привести к негативным последствиями. Снижение экспрессии синаптотагмина-1 на более чем 40% при клинической стадии БП было показано в ряде других исследований на модельных объектах [Mingazov et al., 2016] и также коррелирует с результатами патологоанатомических исследований [Simunovic et al., 2009]. Причиной снижения уровня экспрессии гена *Syt1* при моделировании нейродегенеративных процессов БП может служить уменьшение

высвобождения дофамина и, как следствие, являться одной из причин нарушения двигательной функции [Mingazov et al., 2016].

Мономерный α -синуклеин также регулирует слияние синаптических пузырьков и высвобождение нейромедиаторов путем связывания с синаптобrevином [Diao et al., 2013]. Синаптобrevин – небольшой трансмембранный белок секреторных везикул. Синаптобrevин вместе с синтаксином и белком SNAP25 формирует SNARE комплекс, состоящий из 4 α -спиралей. Одна из этих α -спиралей принадлежит синаптобrevину. Этот комплекс осуществляет кальций-регулируемый выброс нейромедиатора в синапс. Функция синаптобrevина регулируется также и другими белками клетки. У *D. melanogaster* было выделено 2 изоформы белка синаптобrevина. Первый, получивший название *synaptobrevin*, образуется в организме повсеместно. Второй изоформой синаптобrevина является нейрональный синаптобrevин (*nSyb*) и он обнаруживается в больших количествах исключительно в синапсах. Мы проанализировали как гиперэкспрессия *SNCA.WT / SNCA.A30P / SNCA.A53T* будет влиять на уровень экспрессии гена *nSyb*.

По нашим данным, уровень экспрессии гена *nSyb* снижался только при экспрессии *SNCA.A30P* и *SNCA.A53T* и оставался стабильным после подавления экспрессии генов. В то же время экспрессия гена *SNCA* человека дикого типа не оказала влияния на уровень экспрессии гена *nSyb* (Рисунок 19Б). В последующих исследованиях было также показано снижение уровня синаптобrevина в зависимости от продолжительности развития нейропатологии [Allortigara et al., 2016]. Изменение мономерного состояния α -синуклеина способно изменить его взаимодействие с синаптобrevином может ингибировать его функциональные взаимодействия с другими белками, которые важны для синаптической передачи, таким образом, препятствуя межнейрональной передаче сигналов. Поскольку нейрональный синаптобrevин и α -синуклеин являются партнерами и тесно взаимодействуют друг с другом [Burre et al., 2010], то любые мутации, способные изменить конформационное состояние α -синуклеина будут оказывать критическое значение.

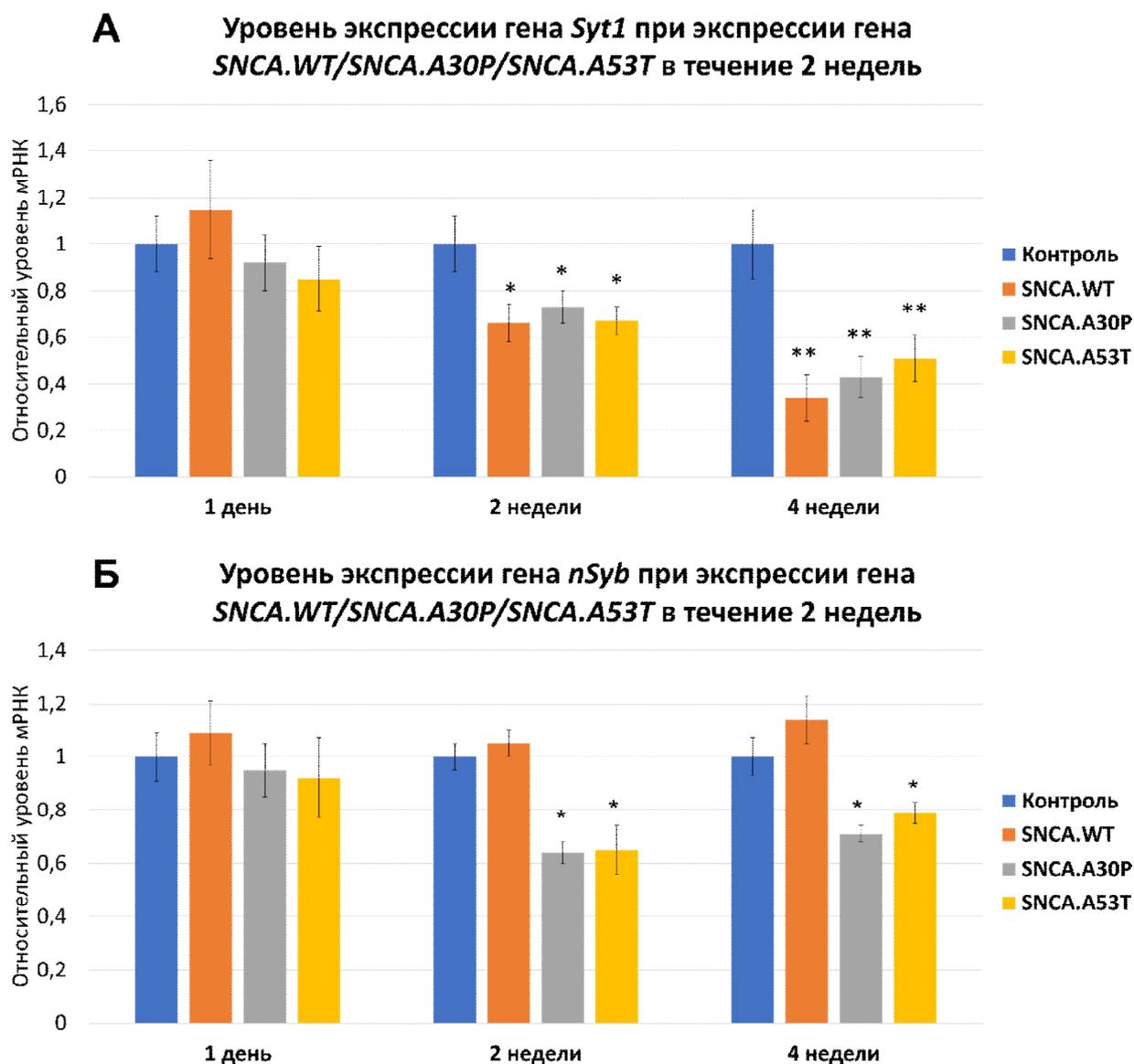


Рисунок 19 – Уровень экспрессии синаптических генов в клетках мозга *D. melanogaster* при экспрессии *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями A30P и A53T в течение 2 недель и подавлении его экспрессии в течение последующих 2 недель, при использовании системы экспрессии *UAS/GAL4-GAL80*. А – Относительный уровень м-РНК *Syt1*. Б – Относительный уровень м-РНК *nSyb*. Данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего, * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$, $N \geq 6$, критерий Краскела-Уоллиса.

Как видно из полученных результатов, уровень экспрессии гена *nSyb* значительно снижен именно при экспрессии *SNCA.A30P / SNCA.A53T*. Ускоренное нарушение мономерного состояния α -синуклеина при наличии мутаций A30P и A53T может способствовать образованию олигомеров, которые в свою очередь, как было показано ранее, могут связываться с синаптобrevином на везикулах, вызывая их кластеризацию и дальнейшее нарушение во взаимодействии с пресинаптической терминалью [Allortigara et al., 2016].

Заключение по разделу.

Многие исследования показали, что олигомеры α -синуклеина токсичны, как *in vitro*, так и *in vivo* и существует зависимость между присутствием в клетках олигомеров α -синуклеина и гибелью нейронов и расстройствами поведения [Karpinar et al., 2009]. Исследование и характеристика олигомеров чрезвычайно сложна из-за их гетерогенной природы. Что касается токсичности фибрилл α -синуклеина, то ситуация довольно неоднозначна. Сообщалось как о токсичных [Pieri et al., 2012], так и о нетоксичных [Tompkins et al., 1997] свойствах фибриллярных структур α -синуклеина. Однако стоит отметить, что фибриллы α -синуклеина обладают одним уникальным свойством: способностью распространяться и увеличивать агрегацию эндогенного α -синуклеина [Pieri et al., 2012]. Также было отмечено, что фибриллярные формы α -синуклеина могут способствовать развитию нейродегенерации, провоцируя воспалительные процессы [Gribaudo et al., 2019]. Индукция образования новых фибрилл уже сформированными агрегатами подтверждается широко развитой гипотезой о прионном распространении α -синуклеина, которая получает все больше доказательств [Mehra et al., 2019]. Однако некоторые исследования предполагают, что прионоподобное распространение фибрилл α -синуклеина от одной клетки к другой должно быть связано с образованием промежуточных токсичных форм α -синуклеина, чему может послужить диссоциация фибрилл на мелкие агрегаты или это может быть процесс, путем которого образуется больше новых протофибриллярных структур и олигомеров [Mehra et al., 2019].

Основываясь на полученных данных, мы предполагаем, что растворимая форма α -синуклеина, в отличие от нерастворимых агрегатов, вносит больший вклад в патогенез БП на ранних стадиях развития нейропатологии. Впоследствии все большее количество олигомерных структур может генерироваться ранее сформированными фибриллами, и на более поздних стадиях развития заболевания токсичность будет проявляться как в присутствии олигомерных форм, так и фибрилл α -синуклеина. Также гиперэкспрессия гена *SNCA* человека и его форм с мутациями у дрозофилы способствует изменению уровня экспрессии других синаптических генов, играющих ключевую роль в процессах синаптической передачи.

Таким образом, мы изучили фенотипические проявления запуска и подавления экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями. Проведение подобных исследований необходимо для понимания начала и прогрессирования патологических изменений при БП и других синуклеопатиях, а также для определения временных интервалов «терапевтических окон», когда развивающиеся дегенеративные изменения еще обратимы, а применяемая терапия наиболее эффективна.

3.3. Анализ нейропротекторной активности «красного пигмента» (КП) дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на модели БП на *D. melanogaster*

В настоящее время не разработано эффективных терапевтических подходов к лечению заболеваний, связанных с амилоидами, поэтому изучение молекулярного механизма амилоидогенеза, а также поиск новых факторов, способных влиять на образование амилоидов и предотвращать цитотоксическое действие как уже сформированных амилоидных фибрилл, так и промежуточных продуктов амилоидогенеза – олигомеров, являются оправданными и необходимыми.

Перспективной группой веществ, препятствующих образованию амилоидных фибрилл, являются производные имидазола. Одно из таких соединений – 5-фосфат-рибозил-аминоимидазол (АИР) лежит в основе полимера,

образующегося в клетках дрожжей *S. cerevisiae* при мутациях в генах *ADE-1* и/или *ADE-2*, ответственных за биосинтез аденина и придающего колониям дрожжевых клеток характерный красный цвет, поэтому этот полимер получил название «красный пигмент».

Ранее эффективность «красного пигмента» в отношении снижения уровня агрегации белка была продемонстрирована на фибриллах инсулина [Nevzglyadova et al., 2011]. В определенных условиях мономеры инсулина способны агрегировать и образовывать фибриллы. Уровень фибриллярных форм оценивали при помощи тиофлавина Т. Было показано, что добавление «красного пигмента» снижало уровень флуоресценции красителя, что свидетельствует об уменьшении фибриллярных форм белка. Также ранее была продемонстрирована эффективность «красного пигмента» дрожжей в отношении уменьшения агрегации амилоидного пептида β ($A\beta$). Штаммы дрожжей, накапливающие красный пигмент (красные дрожжи), содержали меньше амилоида и имели лучшие показатели жизнеспособности по сравнению с изогенными штаммами без накопления красного пигмента (белые дрожжи), которые содержали больше агрегатов $A\beta$ [Nevzglyadova et al., 2015]. Поскольку α -синуклеин также входит в семейство амилоидных белков, а нарушение его конформации – одна из важнейших причин, приводящих к нейродегенерации, в том числе и БП, данные свойства «красного пигмента» предполагают его нейропротекторную эффективность, то есть способность привести к защите, восстановлению или регенерации нервной системы. Для оценки потенциальной нейропротекторной активности «красного пигмента» особей трансгенных *D. melanogaster* с экспрессией *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T* (для экспрессии трансгенов использовалась система *UAS-GAL4*) кормили красными или белыми дрожжами *S. cerevisiae*. Далее оценивались такие показатели как: число дофаминергических и холинергических нейронов в мозге дрозофилы, уровень белка α -синуклеина, а также уровень локомоторной активности мух.

Для визуализации кластеров дофаминергических и холинергических нейронов, мы запускали экспрессию *GFP* в мембране нейронов, с последующим

количественным анализом GFP-позитивных клеток при помощи конфокальной микроскопии на 17–ый и 30–ый дни жизни мух, согласно методу J. A. Botella с соавторами [Botella et al., 2008]. В мозге трансгенных мух с экспрессией гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями наблюдалась возрастная потеря дофаминергических нейронов при получении в пищу белых дрожжей *S. cerevisiae*, в то время как при получении в пищу красных дрожжей количество дофаминергических нейронов сохранялось на более высоком уровне как на 17–ый, так и на 30–ый день жизни мух (Рисунок 20) [Nevzglyadova et al., 2018].

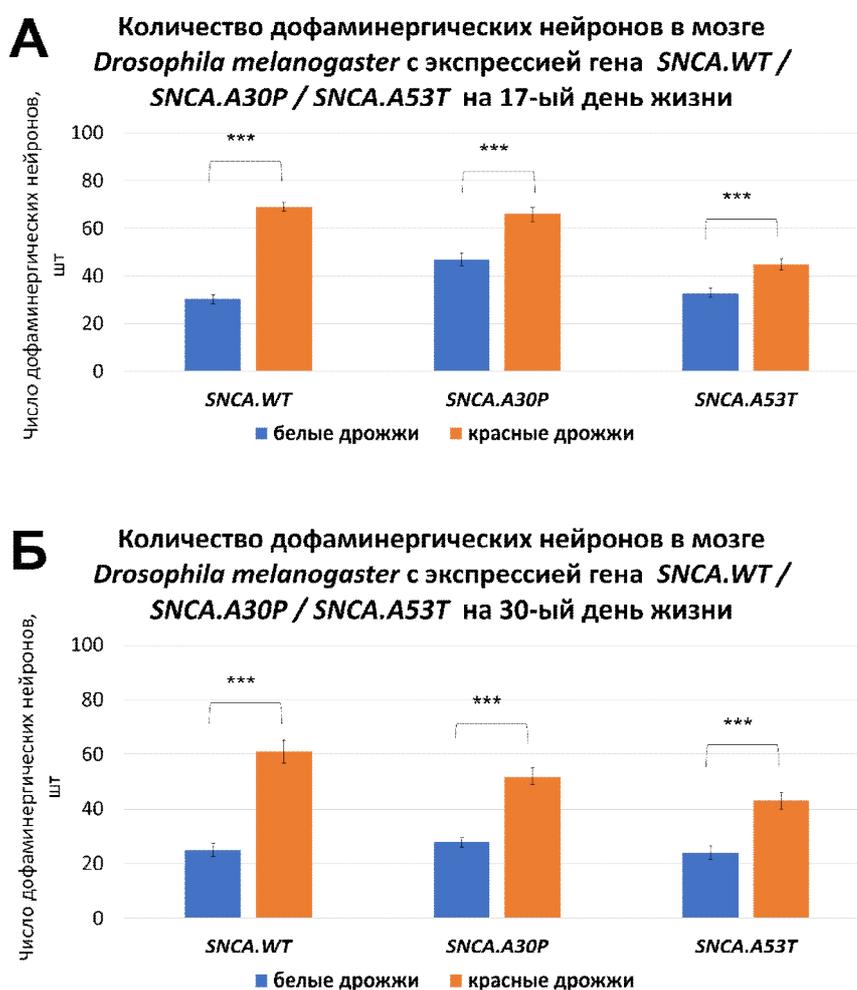


Рисунок 20 – Число дофаминергических нейронов в мозге *D. melanogaster* с экспрессией *SNCA.WT / SNCA.A30P / SNCA.A53T* при помощи системы *UAS–GAL4* на 17–ый (А) и 30–ый (Б) дни жизни. Мух кормили красными или белыми дрожжами *S. cerevisiae* в течение всего периода жизни. Данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего, *** $p < 0.001$, $n \geq 6$, $N \geq 3$, однофакторный дисперсионный анализ.

Мы также проанализировали количество холинергических нейронов в мозге мух с экспрессией *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T*, поскольку известно, что изменения в холинергической системе играют важную роль в развитии нарушений двигательной и обонятельной систем, наблюдаемых при БП. Было показано, что кормление мух красными дрожжами *S. cerevisiae* не оказывало влияние на количество холинергических нейронов ни на 17–ый, ни на 30–ый день жизни дрозофил (Рисунок 21) [Nevzglyadova et al., 2018].

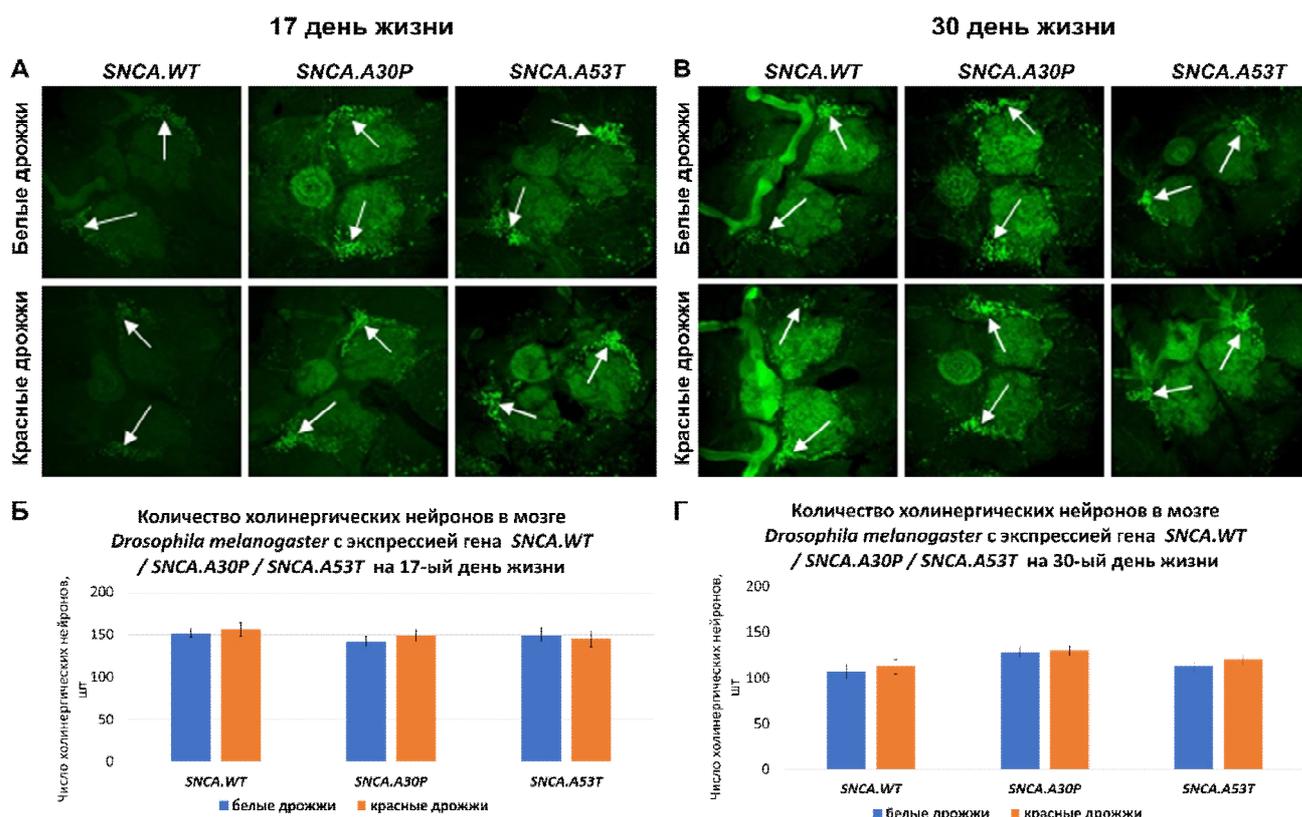


Рисунок 21 – Число холинергических нейронов в мозге *D. melanogaster* с экспрессией *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T* при помощи системы *UAS-GAL4* на 17–ый (А, Б) и 30–ый (В, Г) дни жизни. Мух кормили красными или белыми дрожжами *S. cerevisiae* в течение всего периода жизни. Данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего, $n \geq 6$, $N \geq 3$, однофакторный дисперсионный анализ.

В работах, исследовавших свойства «красного пигмента», было показано, что он способствует подавлению накопления активных форм кислорода в клетках и участвует в реакции на окислительный стресс [Nevzglyadova et al., 2022].

Поскольку именно увеличение окислительного стресса является одной из причин гибели нейронов, можно предположить, что снижение уровня АФК в клетках будет способствовать сохранению ДН. Однако, это не единственное свойство КП: он также способен связываться с амилоидами и, как предполагается, препятствовать образованию фибриллярных структур и предотвращать распространение прионов [Nevzglyadova et al., 2022]. В связи с предполагаемыми свойствами КП мы провели оценку уровня α -синуклеина в клетках мозга трансгенных *D. melanogaster*.

Мы проанализировали уровень растворимой и нерастворимой фракции α -синуклеина в клетках мозга трансгенных мух с экспрессией *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T* при помощи системы *UAS-GAL4*, потребляющих в пищу красные или белые дрожжи, аналогичным способом, как в п. 3.2. Показано, что у мух, употреблявших в пищу красные дрожжи был снижен уровень как нерастворимой, так и растворимой фракции α -синуклеина, по сравнению с уровнями α -синуклеина в клетках мозга мух, употреблявших в пищу белые дрожжи (Рисунок 22) [Nevzglyadova et al., 2018].

Влияние «красного пигмента» дрожжей на амилоидные белки было продемонстрировано рядом исследований, показавшим его способность обратимо связываться с участками на фибриллах и ингибировать флуоресценцию тиофлавина Т. Предполагается, что красный пигмент блокирует определенные участки на протофибриллах, что препятствует формированию как зрелых фибриллярных структур, так и нарушению взаимодействия с шаперонами, а также снижает прионную активность, что делает «красный пигмент» эффективным не только в отношении ингибирования агрегации белков, но и в отношении подавления распространения белков прионоподобным способом [Nevzglyadova et al., 2011; Nevzglyadova et al., 2015].

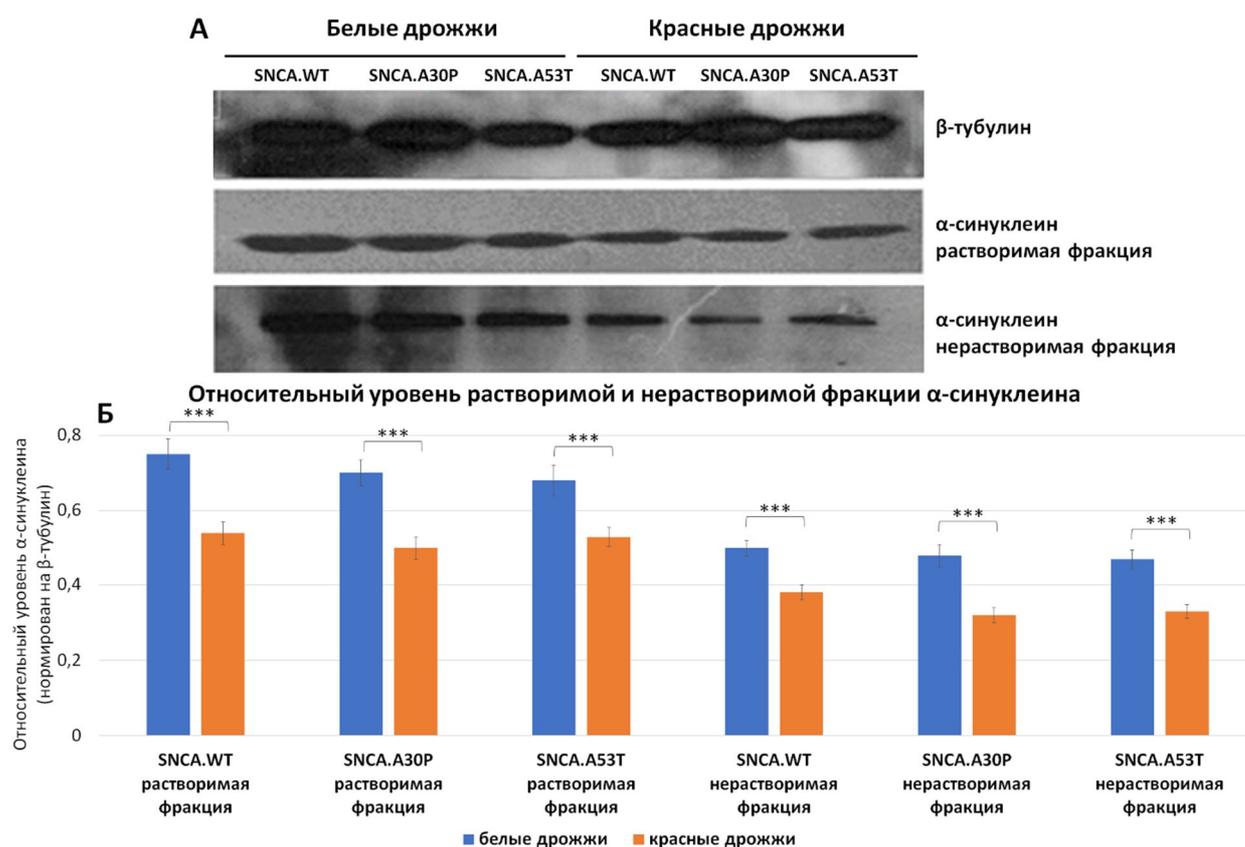


Рисунок 22 – Экспрессия *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T* человека с использованием системы *UAS-GAL4* приводит к различному уровню накопления растворимой и нерастворимой формы α-синуклеина в клетках мозга мух, при получении в пищу красных и белых дрожжей на 30-й день жизни. А – Репрезентативный вестерн-блот показывает уровни растворимого и нерастворимого α-синуклеина в цельных лизатах мозга *D. melanogaster*. Б – Гистограмма показывает снижение относительного уровня как растворимой, так и нерастворимой фракции белка α-синуклеина в клетках мозга мух, при употреблении в пищу красных дрожжей по отношению к уровню α-синуклеина, образовавшемуся у мух, получавших в пищу белые дрожжи. Данные представлены в виде среднего ± стандартная ошибка среднего, *** $p < 0.001$, $N \geq 3$, однофакторный дисперсионный анализ.

Мы наблюдали снижение уровня нерастворимой фракции α-синуклеина к 30-му дню жизни трансгенных мух с экспрессией *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T*, при кормлении красными дрожжами, что хорошо согласуется с предполагаемым

механизмом взаимодействия «красного пигмента» с амилоидными протофибриллярными структурами и препятствованию формированию зрелых фибрилл. Снижение же растворимой формы α -синуклеина может быть следствием того, что «красный пигмент» также оказывает влияние на образование АФК и развитие окислительного стресса, который в свою очередь может препятствовать деградации агрегатов α -синуклеина путем нарушения путей аутофагии [Zhou et al., 2021]. Высокая эффективность аутофагосомно-лизосомного пути деградации α -синуклеина имеет важное значение, поскольку именно этот путь вовлечен в процесс очистки клеток от патологических агрегатов α -синуклеина.

Далее мы провели оценку двигательной активности дрозофил при экспрессии *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T* человека как одного из важнейших показателей проявления нейродегенеративного процесса при БП.

Оценка двигательной активности мух с экспрессией гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями была проведена при помощи анализа на реакцию отрицательного геотаксиса (Таблица 4) [Nevzglyadova et al., 2018]. Уровень локомоторной активности оценивался как при экспрессии *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T* человека в дофаминергических нейронах, так и в холинергических нейронах.

Было показано, что у мух с экспрессией *SNCA.WT*, *SNCA.A30P* добавление в корм красных дрожжей приводит к сохранению двигательной активности на более высоком уровне по сравнению с мухами, получавшими в пищу исключительно белые дрожжи. В то же время мы не наблюдали статистической разницы в уровне локомоторной активности у трансгенных дрозофил с экспрессией *SNCA.A53T* [Nevzglyadova et al., 2018]. Различный эффект красных дрожжей на уровень двигательной активности, по-видимому, заключается в различных процессах, которые возникают при экспрессии гена *SNCA* человека либо дикого типа, либо его форм с мутациями. Экспрессия *SNCA.A53T* приводит к образованию белка с несколько измененными свойствами по сравнению с белками дикого типа и с наличием мутации А30Р. Это проявляется в более

быстром преобразовании протофибрилл в зрелые фибриллы, нарушению в регуляции биосинтеза дофамина, а также усилении окислительного стресса.

Таблица 4 – Уровень локомоторной активности *D. melanogaster* при экспрессии *SNCA.WT* / *SNCA.A30P* / *SNCA.A53T* в дофаминергических (*ple-Gal4*) и холинергических (*Cha-Gal4*) нейронах на 2 и 30 день жизни. Данные выражены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, *N* \geq 6, однофакторный дисперсионный анализ.

Линия	Уровень локомоторной активности, %	
	2 Дня	30 Дней
<i>Ple-Gal4/SNCA.WT</i> белые дрожжи	92,7 \pm 0,8	33,7 \pm 2,0
<i>Ple-Gal4/SNCA.WT</i> красные дрожжи	93,4 \pm 0,8	64,4 \pm 1,5 ***
<i>Ple-Gal4/SNCA.A30P</i> белые дрожжи	95,6 \pm 4,4	43,9 \pm 2,0
<i>Ple-Gal4/SNCA.A30P</i> красные дрожжи	94,8 \pm 4,4	47,3 \pm 2,2 **
<i>Ple-Gal4/SNCA.A53T</i> белые дрожжи	90,2 \pm 1,1	43,3 \pm 2,0
<i>Ple-Gal4/SNCA.A53T</i> красные дрожжи	92,3 \pm 0,9	45,5 \pm 2,3
<i>Cha-Gal4/SNCA.WT</i> белые дрожжи	94,0 \pm 0,7	50,3 \pm 3,8
<i>Cha-Gal4/SNCA.WT</i> красные дрожжи	97,7 \pm 0,3	47,1 \pm 3,3
<i>Cha-Gal4/SNCA.A30P</i> белые дрожжи	96,3 \pm 0,5	57,1 \pm 4,1
<i>Cha-Gal4/SNCA.A30P</i> красные дрожжи	95,9 \pm 0,7	52,9 \pm 2,9
<i>Cha-Gal4/SNCA.A53T</i> белые дрожжи	98,1 \pm 0,4	51,2 \pm 2,7
<i>Cha-Gal4/SNCA.A53T</i> красные дрожжи	96,8 \pm 0,6	52,8 \pm 1,4

Проведенные ранее нами эксперименты с использованием очищенного «красного пигмента» показали, что именно он оказывает нейропротекторный эффект, при этом, не оказывая токсичного эффекта, однако ввиду его трудоемкого получения и очистки было принято решение использовать в качестве корма для дрозофил именно красные дрожжи *S. cerevisiae*. Используя модель трансгенной *D. melanogaster* с экспрессией гена *SNCA* человека и его форм с мутациями, мы получили данные в пользу потенциальной терапевтической активности «красного пигмента» дрожжей при БП. При потреблении в пищу мухами красных дрожжей, мы наблюдали снижение уровня α -синуклеина как нерастворимой, так и растворимой формы, что может быть следствием влияния «красного пигмента» на

перераспределение α -синуклеина между различными агрегационными формами в клетках, а также сохранение большего количества дофаминергических нейронов, при этом «красный пигмент» не оказывал влияния на холинергические нейроны. Также следует отметить улучшение двигательной активности у мух. Положительные эффекты «красного пигмента» дрожжей *S. cerevisiae* наблюдались также при оценке жизнеспособности дрожжевых культур при экспрессии α -синуклеина. Было показано, что штаммы дрожжей VSY72 и VSY73 в присутствии «красного пигмента» имели более высокую жизнеспособность по сравнению с контролем [Nevzglyadova et al., 2018].

Заключение по разделу.

На сегодняшний день разрабатывается много стратегий терапии БП, направленных на самые разные ее этапы (см. раздел 1.7.) Однако все больше исследователей сходятся во мнении, что лечение БП должно носить комплексный характер, одной из важнейших частей которого, должен быть элемент, направленный на снижение уровня образуемых патологических агрегатов α -синуклеина. Изучение «красного пигмента» дрожжей *S. cerevisiae* позволило обнаружить не только его свойства препятствовать образованию фибрилл различных белков, но и препятствовать распространению прионных белков [Nevzglyadova et al., 2011; Nevzglyadova et al., 2015]. Эти два его свойства, безусловно, имеют большое значение, поскольку теория о прионном распространении α -синуклеина получает сейчас все больше доказательств.

В своих исследованиях мы показали, что «красный пигмент» действительно обладает нейропротекторными свойствами на модели БП на *D. melanogaster* с экспрессией гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями. Использование в качестве корма красных дрожжей позволило значительно замедлить развитие нейропатологии, что выражалось в сохранении большего числа дофаминергических нейронов, а также уровня локомоторной активности на более высоком уровне.

Таким образом, «красный пигмент» оказывает нейропротекторное действие и может иметь гораздо более широкий спектр возможных терапевтических применений, чем производные 2-аминоимидазола.

3.4. Исследование нейропротекторной активности фуллеренолов $C_{60}(OH)_{30}$ и $C_{70}(OH)_{30}$ на модели БП на *D. melanogaster*

Как было отмечено ранее, на сегодняшний день лечение БП нельзя считать эффективным. Существующие терапевтические стратегии заключаются в назначении агонистов дофамина, которые при длительном применении могут оказаться неэффективными или даже иметь негативный эффект. Поэтому наряду с анализом причин, приводящих к заболеванию, большое значение имеет скрининг веществ, способных замедлить или облегчить течение болезни. В этом плане гидроксильированные производные фуллеренов – фуллеренолы, имеют большие перспективы. Во-первых, они обладают антиоксидантными свойствами благодаря способности поглощать и деактивировать кислородсодержащие свободные радикалы [Yamakoshi et al., 2003], при этом действуя более эффективно, чем традиционные антиоксиданты [Trajković et al., 2007]. Во-вторых, исследования эффективности фуллеренолов на растворах амилоидных белков на модели болезни Альцгеймера показали уменьшение степени их агрегации [Bednarikova et al., 2016]. Поскольку окислительный стресс и нарушение конформации белков – одни из важнейших причин, приводящих к нейродегенерации, в том числе и при БП, данные свойства фуллеренолов предполагают их нейропротекторную эффективность, то есть способность привести к защите, восстановлению или регенерации нервной системы.

С момента идентификации фуллеренов как класса соединений и их синтеза они активно изучались в области биомедицины. Фуллерены плохо растворимы в воде, однако их производные, в частности, фуллеренолы ($C_{60}(OH)_n$, $n = 2 - 48$), в последнее время стали предметом многочисленных исследований, касающихся их антиоксидантных и прооксидантных свойств в биологических системах. Небольшая часть этих исследований была сосредоточена на возможном

использовании C_{60} и $C_{60}(OH)_n$ в терапии таких патологий, как деменция, образование β -амилоида (A β) и БП [Bednarikova et al., 2016].

Вопрос о токсичности фуллеренов и их производных изучался во многих исследованиях как *in vitro*, так и *in vivo*. Однако, имеющиеся на сегодняшний день данные достаточно противоречивы, ввиду достаточно больших различий в используемых препаратах фуллеренов и их производных. Как было показано О. И. Большаковой с соавторами, токсичность препаратов фуллеренов может напрямую зависеть как от способа их получения, так и от наличия различных функциональных групп [Bolshakova et al., 2022a].

Для дальнейших исследований нейропротекторных свойств нами были выбраны 2 фуллеренола: $C_{60}(OH)_{30}$ и $C_{70}(OH)_{30}$, которые были получены методом, разработанным в НИЦ «Курчатовский институт», с использованием водного раствора перекиси водорода в качестве агента гидроксирования [Bolshakova et al., 2019]. Полученные фуллеренолы были проанализированы различными методами, в частности: методом малоуглового рассеяния нейтронов (SANS), динамического светорассеяния (DLS), а также атомно-силовой микроскопии, для подтверждения их высокой чистоты и качества [Bolshakova et al., 2019]. Чтобы убедиться в безопасности и отсутствии токсичности фуллеренолов *in vivo*, мы провели анализ продолжительности жизни, а также уровня локомоторной активности *D. melanogaster*, при добавлении в корм фуллеренолов $C_{60}(OH)_{30}$ и $C_{70}(OH)_{30}$ в концентрации – 2 мг/мл. Такая концентрация является достаточно большой, по сравнению с другими, применяемыми *in vivo* концентрациями фуллеренов, что позволит в полной мере оценить их влияние на исследуемые показатели.

Полученные данные показали, что исследуемые соединения в выбранной нами концентрации не вызывали уменьшения продолжительности жизни и не изменяли форму кривой выживания у мух линии *Canton-S* (Рисунок 23) [Bolshakova et al., 2019].

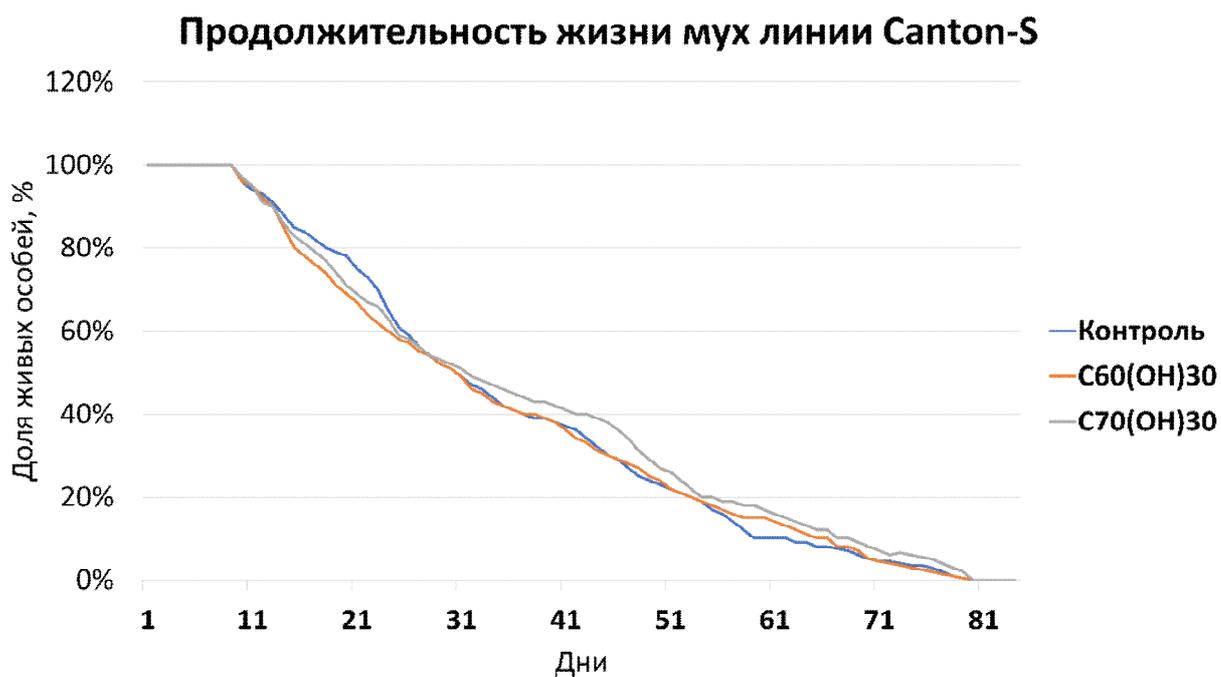


Рисунок 23 – Влияние фуллеренолов $C_{60}(OH)_{30}$ и $C_{70}(OH)_{30}$ на продолжительность жизни *D. melanogaster* линии *Canton-S*. Мухи содержались на дрожжах с фуллеренолами в течение всей жизни. Продолжительность жизни не отличается между контрольной и экспериментальной группой. $N \geq 3$.

Уровень локомоторной активности анализировали на 30-й день жизни дрозофилы, при этом мы не наблюдали каких-либо нарушений этого показателя для мух, в корм которых были добавлены фуллеренолы $C_{60}(OH)_{30}$ и $C_{70}(OH)_{30}$ (Рисунок 24) [Bolshakova et al., 2019].

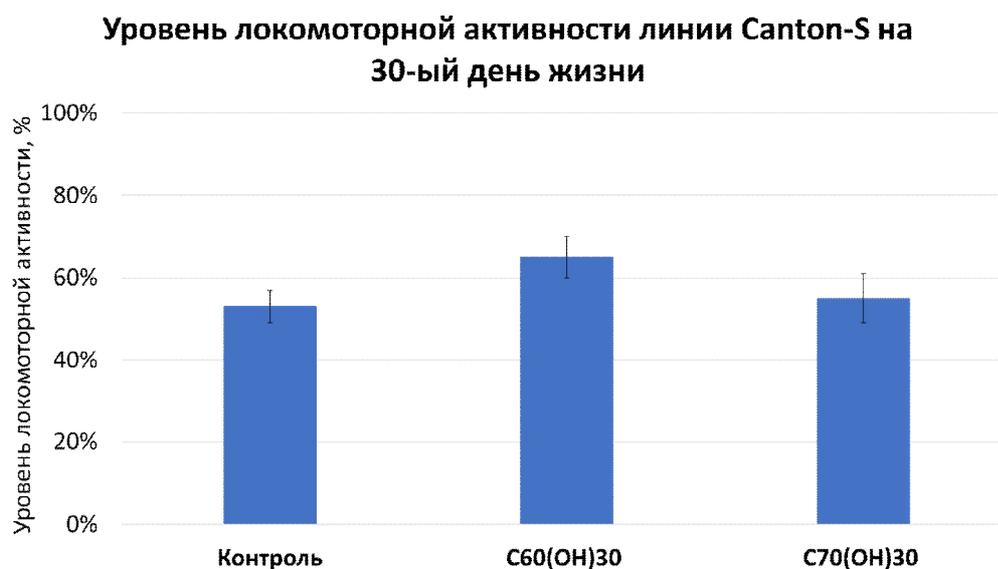


Рисунок 24 – Влияние фуллеренолов $C_{60}(OH)_{30}$ и $C_{70}(OH)_{30}$ на уровень локомоторной активности *D. melanogaster* линии *Canton-S* на 30 день жизни. Данные выражены в виде среднего \pm стандартное отклонение, $N \geq 6$, однофакторный дисперсионный анализ.

Таким образом, мы показали, что синтезированные фуллеренолы не токсичны как *in vivo*, так и *in vitro*, что дает возможность использовать их в дальнейших экспериментах [Bolshakova et al., 2019].

Одним из перспективных направлений возможной терапии БП является снижение уровня α -синуклеина в организме или предотвращение его агрегации и образования различных протофибриллярных структур. Свойства фуллеренов препятствовать формированию агрегатов амилоидных белков были продемонстрированы в различных исследованиях при их взаимодействии с амилоидным пептидом β . Механизм, при помощи которого фуллерены препятствовали образованию амилоидных фибрилл, заключался в установлении сильного гидрофобного взаимодействия между фуллереном и фенилаланином, которое в дальнейшем нарушало взаимодействие между аминокислотными остатками внутри пептида, необходимое для формирования β -слоев [Bolshakova et al., 2022b]. α -синуклеин также относится к семейству амилоидных белков, что

дает возможность предполагать, что применение фуллеренолов будет эффективно в отношении образования агрегатов α -синуклеина различной структуры.

Мы провели вестерн-блот анализ нерастворимой фракции α -синуклеина дикого типа и его форм с мутациями у мух с экспрессией *SNCA.WT / SNCA.A30P / SNCA.A53T* в течение 30 дней при помощи системы *UAS-GAL4* при добавлении в корм фуллеренолов $C_{60}(\text{OH})_{30}$ или $C_{70}(\text{OH})_{30}$ в дозе 0,2 мг/мл (Рисунок 25) [Golomidov et al., 2020].

В том случае, если мухи на протяжении 30 дней получали вместе с пищей фуллеренолы, уровень нерастворимых форм α -синуклеина в мозге был достоверно снижен относительно контроля, которым считали уровень нерастворимого α -синуклеина в мозге мух, получавших обычную пищу.

Антиагрегационная активность фуллеренов и их производных уже была продемонстрирована в ряде исследований [Bednarikova et al., 2016; Xie et al., 2014]. α -синуклеин содержит участок, получивший название NAC-домен, который, как предполагается, ответственен за агрегацию белка. В недавнем исследовании Y. Sun с соавторами было показано, что фуллеренол $C_{60}(\text{OH})_n$, где n (количество гидроксильных групп) варьировалось от 4 до 20, проявлял значительное ингибирующее действие на агрегацию амилоидогенной области NAC-домена α -синуклеина. Предполагается, что взаимодействие между фуллеренолами (их гидроксильными группами) и NAC-областью α -синуклеина может препятствовать образованию β -структур, путем ослабления связей между пептидными группами за счет гидрофобных взаимодействий. При увеличении содержания гидроксильных групп в молекуле фуллеренола до 40 он становится высокогидрофильным, что приводит к снижению потенциала связывания с пептидами и как следствие, снижению действия на препятствование агрегации амилоида [Sun et al., 2019].

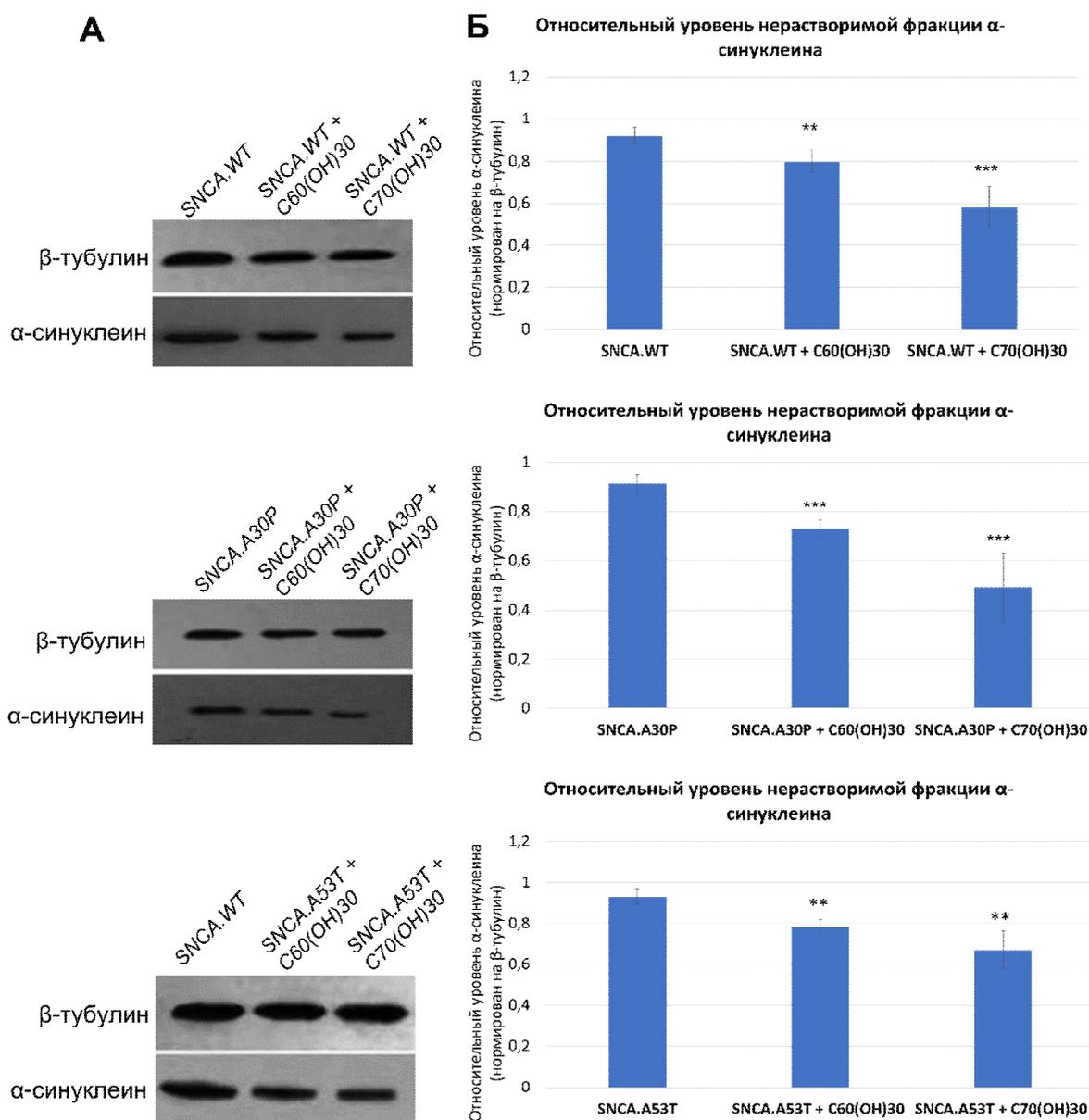


Рисунок 25 – Относительный уровень нерастворимой фракции α -синуклеина в клетках мозга *D. melanogaster* при экспрессии *SNCA.WT* / *SNCA.A53T* / *SNCA.A30P* при добавлении в корм мух фуллеренолов $C_{60}(OH)_{30}$ и $C_{70}(OH)_{30}$ на 30-ый день жизни. А – Репрезентативный вестерн-блот показывает уровни нерастворимого α -синуклеина в цельных лизатах мозга *D. melanogaster*. Б – Гистограмма показывает снижение относительного уровня нерастворимой фракции белка α -синуклеина в клетках мозга мух, при добавлении в корм мух фуллеренолов $C_{60}(OH)_{30}$ и $C_{70}(OH)_{30}$. Данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего, ** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$, $N \geq 3$, однофакторный дисперсионный анализ.

Помимо агрегации α -синуклеина, повышение уровня окислительного стресса считается общим и основным механизмом, который приводит к нарушению клеточных функций и гибели клеток. Окислительный стресс возникает тогда, когда нарушается баланс между наличием АФК и клеточной антиоксидантной активностью. АФК способны вызывать повреждение клеточных мембран, фрагментацию ДНК, инактивацию транспортных белков и ингибирование выработки энергии митохондриями [Bolshakova et al., 2022b]. Также дофамин может быть окислен до реакционно-способных хинонов, что способствует повышению уровня окислительного стресса. Токсичность, вызванная дофамином, наблюдалась в нескольких моделях *in vitro* и *in vivo* [Hastings et al., 1996].

Мы сравнили уровень окислительного стресса в клетках мозга трансгенных дрозофил с экспрессией *SNCA.WT / SNCA.A53T / SNCA.A30P* с помощью системы *UAS-GAL4* при добавлении в корм мух фуллеренолов $C_{60}(OH)_{30}$ и $C_{70}(OH)_{30}$ на 30-ый день жизни (Рисунок 26) [Golomidov et al., 2020].

Показано, что к 30-му дню жизни мух, уровень АФК был повышен во всех исследуемых линиях, с экспрессией *SNCA.WT / SNCA.A53T / SNCA.A30P*. Кроме того, стоит отметить, что у линии с экспрессией гена *SNCA* человека с мутацией А53Т уровень АФК был повышен уже на 5-ый день жизни, по сравнению с другими линиями, что может быть следствием наличия мутации в гене *SNCA* и ее влияния на активность α -синуклеина и как следствие на уровень окислительного стресса в клетках мозга мух.

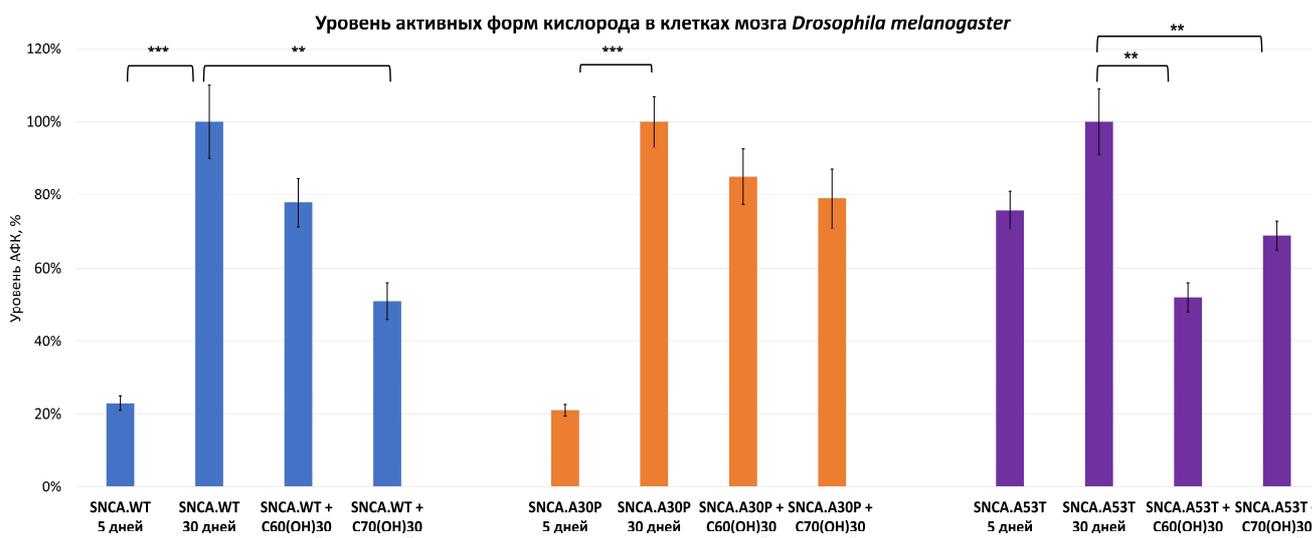


Рисунок 26 – Уровень активных форм кислорода в клетках мозга *D. melanogaster* при экспрессии *SNCA.WT* / *SNCA.A53T* / *SNCA.A30P* с помощью системы *UAS-GAL4* при добавлении в корм мух фуллеренолов $C_{60}(OH)_{30}$ и $C_{70}(OH)_{30}$ на 5–ый и 30–ый день жизни. Данные выражены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего, * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$, $N \geq 6$, однофакторный дисперсионный анализ.

Содержание мух на среде с фуллеренолами, статистически значимо приводило к уменьшению уровня АФК у линии дрозофилы с экспрессией гена *SNCA* человека с мутацией A53T при использовании фуллеренолов $C_{60}(OH)_{30}$ и $C_{70}(OH)_{30}$ и у линии с экспрессией гена *SNCA* дикого типа, однако только при использовании фуллеренола $C_{70}(OH)_{30}$. При этом мы не наблюдали статистически достоверных различий в уровне АФК у линии дрозофилы с экспрессией гена *SNCA.A30P* при использовании фуллеренолов $C_{60}(OH)_{30}$ и $C_{70}(OH)_{30}$. Таким образом, мы показали, что в зависимости от того, какая форма гена *SNCA* человека (*SNCA.WT* / *SNCA.A53T* / *SNCA.A30P*) экспрессируется у дрозофилы, различается антиоксидантная способность фуллеренолов. Ранее было показано, что фуллеренолы более эффективно поглощают свободные радикалы, чем традиционные антиоксиданты [Yamakoshi et al., 2003]. Также на модели БП *in vitro* было показано, что фуллеренол $C_{60}(OH)_{24}$ препятствует нарушению функциональной активности митохондрий, снижает уровень АФК и увеличивает

жизнеспособность клеток [Burg et al., 2014]. Однако данные *in vivo* исследований не так однозначны. На данный момент антиоксидантная и нейропротекторная активность фуллеренов и их производных активно изучается на модельных животных, так например, использование карбоксифуллерена C₃ на модели БП на приматах улучшило двигательные показатели, а также привело к увеличению уровня дофамина в полосатом теле животных, при этом не было обнаружено доказательств токсичности препарата [Dugan et al., 2014].

Характерной особенностью БП является гибель дофаминергических нейронов, вызываемая целым рядом причин, основными из которых являются наличие в клетке токсичных форм α-синуклеина и чрезмерный уровень окислительного стресса, который вызывает перекисное окисление липидов, повреждение ДНК и окисление белков. Как было показано ранее, в том числе и нашими исследованиями (см. п. 3.1.), накопление и агрегация α-синуклеина приводит к нарушению синаптической активности, а накопление свободных радикалов вызывает нарушение функциональной активности митохондрий, что в совокупности может привести к гибели нейронов. Мы проанализировали число дофаминергических нейронов в мозге трансгенных *D. melanogaster* с экспрессией гена *SNCA.WT / SNCA.A30P / SNCA.A53T* с помощью системы *UAS-GAL4* при добавлении в корм мух фуллеренолов C₆₀(OH)₃₀ и C₇₀(OH)₃₀. Для визуализации кластеров дофаминергических нейронов, мы запускали экспрессию *GFP* в мембранах дофаминергических нейронов, с последующим количественным анализом GFP-позитивных клеток при помощи конфокальной микроскопии на 30-ый день жизни мух, согласно методу J. A. Botella с соавторами [Botella et al., 2008].

Мы показали, что на 30-ый день жизни мух число дофаминергических нейронов (сигналов GFP) в мозге было достоверно снижено у всех линий дрозофилы с экспрессией гена *SNCA.WT / SNCA.A30P / SNCA.A53T*. Добавление в пищу мух фуллеренолов C₆₀(OH)₃₀ и C₇₀(OH)₃₀ способствовало сохранению большего числа дофаминергических нейронов у мух с экспрессией гена *SNCA.A53T*. При этом анализ показал отсутствие достоверных различий в

количестве нейронов у мух с экспрессией генов *SNCA.WT* и *SNCA.A30P* (Рисунок 27) [Golomidov et al., 2020].

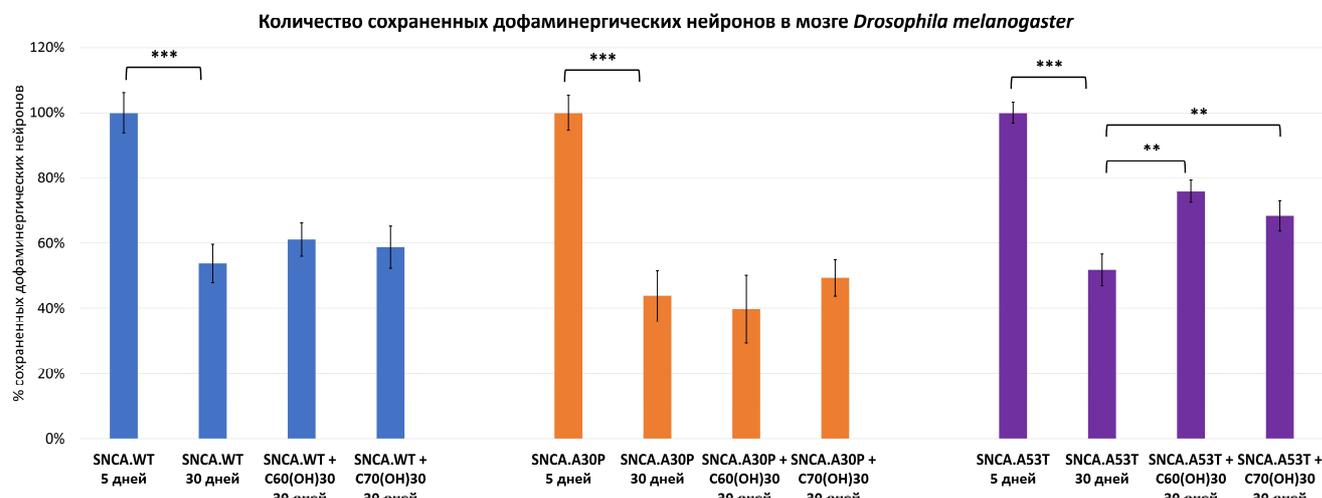


Рисунок 27 – Число дофаминергических нейронов в мозге *D. melanogaster* при экспрессии гена *SNCA.WT* / *SNCA.A53T* / *SNCA.A30P* с помощью системы *UAS-GAL4* на 5–ый и 30–ый день жизни при добавлении в корм мух фуллеренолов $C_{60}(OH)_{30}$ и $C_{70}(OH)_{30}$. Данные выражены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего, ** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$, $N \geq 6$, однофакторный дисперсионный анализ.

Гибель дофаминергических нейронов является следствием целого ряда факторов и нарушений, который происходят при БП. В нашем случае мы наблюдали сохранение большего числа дофаминергических нейронов в трансгенной модели *D. melanogaster* с экспрессией гена *SNCA* человека с мутацией *A53T*. Именно в этой модели мы обнаружили значительно большее присутствие АФК, начиная с 5–го дня жизни. И как было уже сказано ранее, фуллеренолы обладают сильной способностью поглощать свободные радикалы, что может ослабить влияние окислительного стресса на быстрое прогрессирование нейродегенерации на раннем этапе. Однако, все же, основную роль в устранении АФК будут играть антиоксидантные ферменты (*SOD1*, *SOD2*, *Grx-1* и т.д.) и активность этих белков будет иметь первостепенное значение, а

получение экзогенных антиоксидантов способно несколько замедлить развитие нейродегенерации, особенно при определенном генотипе.

Есть данные о том, что α -синуклеин модулирует мембранный оборот ряда нейроспецифических переносчиков, вовлеченных в повторный захват нейротрансмиттеров из синаптических щелей, в частности дофамина [Sidhu et al., 2004]. Присутствие α -синуклеина в синапсе ускоряет кинетику экзоцитоза, а наличие мутаций у α -синуклеина, характерных для БП, вызывает нарушение этих процессов. В клетках млекопитающих и *in vitro* системах, α -синуклеин облегчает сборку комплекса SNARE [Burge et al., 2010] и действует как молекулярный шаперон. Все эти данные подчеркивают важность α -синуклеина в поддержании синаптической функции. Также большая роль отводится α -синуклеину в качестве регулятора биосинтеза и высвобождения дофамина.

В своей работе мы также провели на 30-ый день жизни анализ уровня дофамина в клетках мозга трансгенных *D. melanogaster* с экспрессией гена *SNCA.WT* / *SNCA.A53T* / *SNCA.A30P* в нейронах при добавлении в корм мух фуллеренолов $C_{60}(OH)_{30}$ и $C_{70}(OH)_{30}$ (Рисунок 28) [Golomidov et al., 2020].

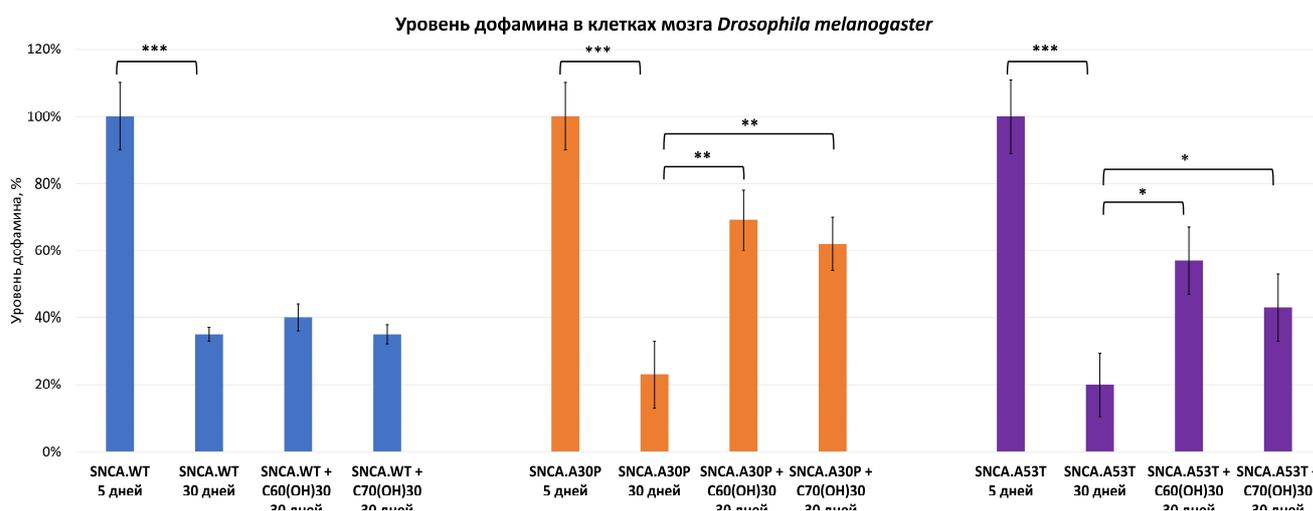


Рисунок 28 – Уровень дофамина в клетках мозга *D. melanogaster* при экспрессии гена *SNCA.WT* / *SNCA.A53T* / *SNCA.A30P* с помощью системы *UAS-GAL4* на 30-ый день жизни при добавлении в корм мух фуллеренолов $C_{60}(OH)_{30}$ и $C_{70}(OH)_{30}$. Данные выражены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего, * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$, $N \geq 6$, однофакторный дисперсионный анализ.

В экспериментах мы наблюдали значительное снижение уровня дофамина к 30-му дню у всех трансгенных мух с экспрессией генов *SNCA.WT* / *SNCA.A53T* / *SNCA.A30P*, по сравнению с уровнем дофамина на 5-ый день жизни (контроль). Добавление в пищу мух фуллеренолов $C_{60}(OH)_{30}$ и $C_{70}(OH)_{30}$ способствовало сохранению большего уровня дофамина у мух с экспрессией генов *SNCA.A53T* и *SNCA.A30P*. При этом у линии дрозофилы с экспрессией гена *SNCA* дикого типа сохранение уровня дофамина на большем уровне отмечено не было. Сохранение дофамина на более высоком уровне у мух с экспрессией *SNCA.A53T* может быть следствием совокупности факторов: снижения уровня АФК в клетках мозга дрозофилы, уменьшения количества агрегатов α -синуклеина, а также сохранения большего числа дофаминергических нейронов. Влияние фуллеренолов $C_{60}(OH)_{30}$ и $C_{70}(OH)_{30}$ на уровень дофамина в клетках мозга мух с экспрессией *SNCA.A30P* интерпретировать достаточно сложно, однако за счет свойства α -синуклеина с мутацией А30Р наиболее долго полимеризоваться в зрелые фибриллы, он может продолжительное время находится в виде различных токсичных для клетки префибриллярных структур. Поэтому свойства фуллеренолов препятствовать образованию агрегатов и формированию β -структур может способствовать сохранению функциональной активности α -синуклеина и участию его в модулировании оборота дофамина.

В настоящее время существует ряд исследований, демонстрирующих нейропротекторные свойства различных производных фуллеренов на моделях БП [Lotharius et al., 1999; Cai et al., 2008; Dugan et al., 2014]. По нашим данным, фуллеренолы действительно обладают нейропротекторной активностью. Они снижают уровень окислительного стресса и уровень нерастворимых форм α -синуклеина, а также способствуют сохранению большего количества дофаминергических нейронов и более высокого уровня дофамина. Однако на результат действия фуллеренолов значительно влияет генотип, обуславливающий признаки заболевания. Положительное влияние на сохранение дофаминергических нейронов наблюдалось только тогда, когда фуллеренолы корректировали все исследуемые параметры. Механизм этого явления неясен,

однако В. Wang с коллегами также было продемонстрировано, что эффекты препаратов могут зависеть от генотипа мух, пола и дозы препарата [Wang et al., 2018]. В наших предварительных исследованиях мы также наблюдали зависимость эффекта от дозы фуллеренолов, в ходе которых получили данные о том, что большая доза (2 мг/мл) была менее эффективной. Мы не наблюдали значительной разницы между эффектами фуллеренолов $C_{60}(OH)_{30}$ и $C_{70}(OH)_{30}$, которые отличаются друг от друга числом атомов углерода, но содержат одинаковое количество гидроксильных групп. $C_{70}(OH)_{30}$ имел меньшую тенденцию к агрегации и образовывал меньшие кластеры в растворе [Golomidov et al., 2020], но это не влияло на его нейропротекторную активность. Следует отметить, что оба фуллеренола проходят через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) дрозофилы, что также было показано в предварительных экспериментах.

Таким образом, оба исследованных фуллеренола, независимо от количества атомов углерода в молекуле, проявляли сходную нейропротекторную активность в моделях БП на дрозофиле. В одной модели фуллеренолы были эффективны во всех экспериментах, в то время как в других эффекты наблюдались только в отдельных тестах. Это является еще одним подтверждением того, что в будущем будет необходим индивидуальный подход к лечению заболевания.

3.5. Анализ нейропротекторных свойств фармакологических шаперонов глюкоцереброзидазы на модели БГ на *D. melanogaster*

Как было сказано в главе 1.6, носители мутаций в гене *GBA1* имеют повышенный риск развития БП. Поскольку данный фермент принимает активное участие в лизосомно–аутофагическом пути деградации различных белков, поддержание его функционального состояния является важным этапом регулирования метаболизма α -синуклеина.

Существуют 2 линии *D. melanogaster*, которые содержат вставку мобильного элемента *Minos* в гены *Gbalb* (CG31414) и *Gbala* (CG31148). В каждом случае инсерция приводит к преждевременному прекращению синтеза

белка. В результате, мутантные белки CG31414 и CG31148 на 133 и 33 аминокислоты короче, чем белок дикого типа (Рисунок 29).

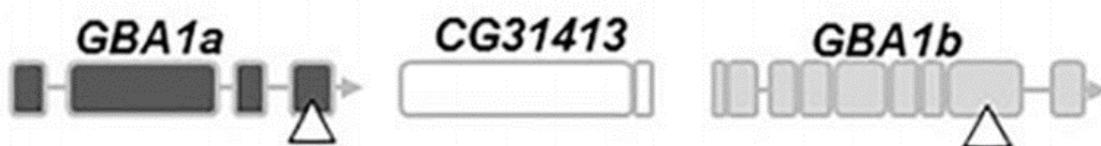


Рисунок 29 – Схематичное представление локуса генов *Gbala* и *Gbalb* у дрозофилы. Гены *Gbala* и *Gbalb* располагаются на расстоянии 2kb друг от друга и разделены нерелевантным геном *dCG31413*. Треугольник показывает сайт вставки элемента *Minos* в каждом гене [Cabasso et al., 2019].

Следует отметить, что две каталитические аминокислоты, определяющие активность глюкоцереброзаиды, идентичны между человеком и дрозофилой (E340 и E235 в глюкоцереброзаиде человека и E259 и E366 в кодируемой глюкоцереброзаиде *Gbala* и *Gbalb* дрозофилы соответственно) [Dvir et al., 2003]. То же самое соответствует и для пяти из шести аминокислот, которые стабилизируют субстрат в активном центре глюкоцереброзаиды (F128, W179, F246, Y313 и W381 в GCase человека; и F154, W206, F272, Y339 и W408, в обоих кодируемых белках дрозофилы). Было показано, что вставка элемента *Minos* в ген *Gbalb* приводит к потере одной из аминокислот (W408), стабилизирующей субстрат в активном центре фермента. Группой Н. Kawasaki было показано, что линия *CG31414Mi* проявляет более сильные признаки нейродегенерации, чем линия *CG31148Mi*. Это проявляется в снижении уровня локомоторной активности, а также сокращении продолжительности жизни [Kawasaki et al., 2017]. Накопление избыточного глюкозилцерамида в клетках моноцитномикрофаговой системы у больных БГ приводит к физическому набуханию лизосом в этих клетках, что приводит к увеличению объема цитоплазмы [Bessler et al., 1979]. Также показано значительное увеличение как размера клеток, так и лизосомного сигнала в гемолимфе дрозофилы *CG31414Mi* [Cabasso et al., 2019]. Эти данные могут говорить о том, что экспрессия гена *CG31414* в мозге

дрозофилы может быть необходима для нормального поведения насекомых и уровня продолжительности жизни [Maor et al., 2016].

На сегодняшний день ферменто–заместительная терапия является эффективным методом лечения БГ I типа, однако данные вещества не способны преодолеть гематоэнцефалический барьер. Более привлекательным подходом является использование низкомолекулярных шаперонов, которые могут преодолевать гематоэнцефалический барьер, связываться с GCase и способствовать его правильному фолдингу и доставке в лизосомы. На сегодняшний день основными соединениями, рассматриваемыми в качестве шаперонов глюкоцереброзидазы, являются конкурентные ингибиторы, связывающиеся с активным центром фермента. Они способствуют правильному фолдингу, доставке фермента к сайту связывания лизосом, а также увеличению активности фермента. Достоинство таких соединений – высокая константа связывания с активным центром GCase, однако из-за их низкой селективности, в высоких дозах, они способны ингибировать другие липазы, что приводит к различным побочным действиям. Поэтому, применение конкурентных ингибиторов глюкоцереброзидазы делает проблематичным их использование в клинической практике. Одними из таких шаперонов являются изофагомин и амброксол. Было показано, что амброксол, способен связываться GCase и улучшать его доставку к лизосоме в фибробластах при БГ [Maegawa et al., 2009]. Также сообщалось, что амброксол может увеличивать активность GCase в фибробластах при БГ.

Ранее группой под руководством E. Sidransky был проведен скрининг соединений для поиска перспективных малых молекул для терапии БГ с использованием глюкоцереброзидазы с мутацией N370S из тканей пациентов [Goldin et al., 2012]. Был идентифицирован новый класс молекул – неингибирующих шаперонов [Patnaik et al., 2012]. Было показано, что лидерное соединение из этого скрининга – NCGC00188758 (пиразоло [1,5-а]пиримидин [N-(4-этинилфенил)-5,7-диметилпиразоло[1,5-а] пиримидин-3 - карбоксаимид]), продемонстрировало эффективность при транспортировке глюкоцереброзидазы в

лизосомы [Patnaik et al., 2012], а также в восстановлении активности глюкоцереброзидазы в фибробластах у пациентов с БГ [Aflaki et al., 2014]. Также было показано, что NCGC00188758 (N58) может повышать активность глюкоцереброзидазы и уменьшать накопление гликолипидов в макрофагах, полученных от пациентов с БГ с различными генотипами.

Сотрудниками лаборатории молекулярной генетики человека НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ (руководитель лаборатории д.б.н. С. Н. Пчелина) были предложены химические модификации соединения N58, направленные на повышение его растворимости в воде, за счёт уменьшения количества гидрофобных химических групп либо их замены на полярные группы. В лаборатории медицинской и биоорганической химии НИЦ «КИ» ПИЯФ, под руководством Ф. М. Ибатуллина, был синтезирован ряд веществ, являющихся производными N58. Данные соединения были исследованы на способность формировать стабильные комплексы с сайтом связывания GCase методами молекулярного докинга и молекулярной динамики. Соединение VI, которое представляет собой N-(1,2,3,6-тетрагидро-2,6,-дикетопиримидин-4-ацетил)-4-метил анилид (Рисунок 30), показало наименьшую энергию связывания, а также наибольшее количество водородных связей, образуемых с GCase.

Нумерация соединения	Структура соединения	Химическое название соединения	Дополнение
N58		N-(4-этилфенил)- 5,7-диметилпиразоло[1,5-а]пиримидин- 3-карбоксамид	C17H14N4O Exact Mass: 290,12 Molecular Weight: 290,32
VI		N-(1,2,3,6-тетрагидро- 2,6,-дикетопиримидин-4-ацетил)- 4-метил анилид	C13H13N3O3 Exact Mass: 259,10 Molecular Weight: 259,26

Рисунок 30 – структура соединения VI в сравнении с соединением N58

В данной работе проведена оценка эффективности действия фармакологического шаперона глюкоцереброзидазы – соединения VI на нейродегенеративные процессы при модели БГ на *D. melanogaster*.

Эксперименты проводились на линии *D. melanogaster* CG31414Mi, которые были получены из Bloomington Stock Center (USA).

Для подтверждения результатов группы Н. Kawasaki мы провели анализ продолжительности жизни линий *D. melanogaster* CG31414Mi и CG31148Mi в сравнении с контрольной линией w^{1118} (Рисунок 31).

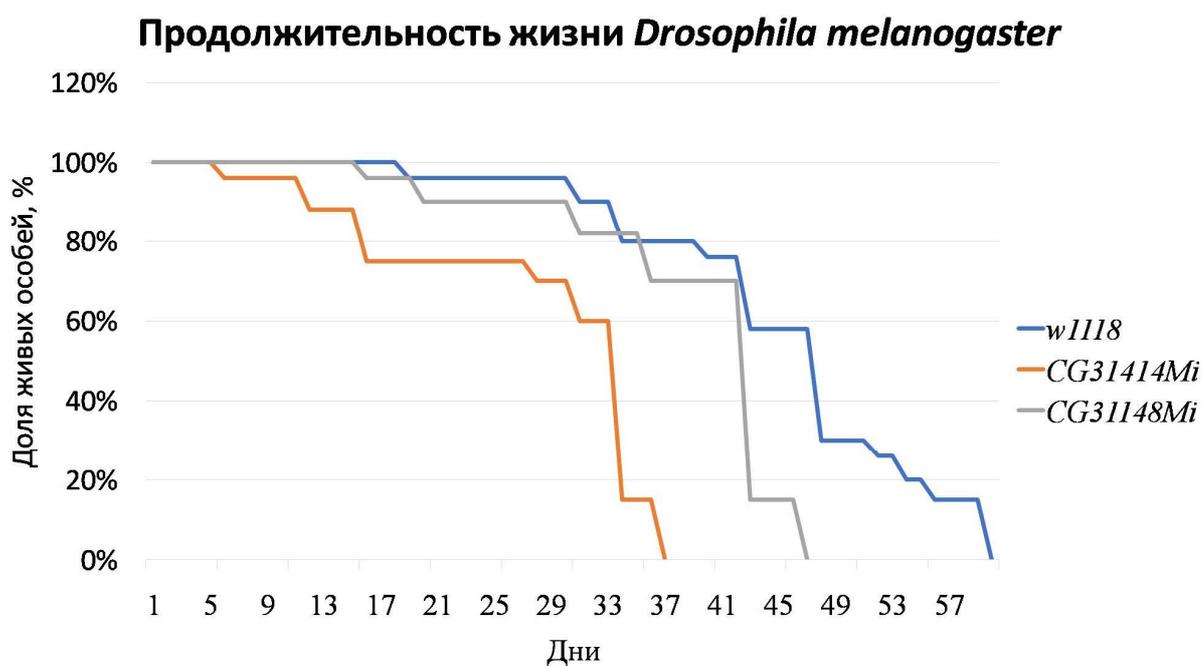


Рисунок 31 – Продолжительность жизни *D. melanogaster* линий CG31414Mi и CG31148Mi. В качестве контроля использована линия w^{1118} . Мухи содержались на стандартной дрожжевой среде в течение всей жизни. $N \geq 3$.

Показано, что продолжительность жизни линии *D. melanogaster* CG31414Mi значительно снижена, по сравнению с контрольной линией w^{1118} . Данные полностью согласуются с данными, полученными группой Н. Kawasaki [Kawasaki et al., 2017], о более сильном проявлении патологии в линии CG31414Mi.

Далее, был проведен анализ числа дофаминергических нейронов в мозге *D. melanogaster* линии CG31414Mi на 30–ый день жизни при добавлении в корм мух соединения VI, в сравнении с линией CG31414Mi, в корм которой соединение VI не добавлялось, а также контрольной линией w^{1118} . Анализ проводился методом конфокальной микроскопии (Рисунок 32).

Конечная концентрация соединения VI в корме мух составляла 4 μ M. Данная дозировка была подобрана, исходя из проведенных в лаборатории молекулярной генетики человека НИЦ «КИ» ПИЯФ тестов *in vitro*, в которых модифицированные соединения не оказывали токсичного действия на макрофаги.

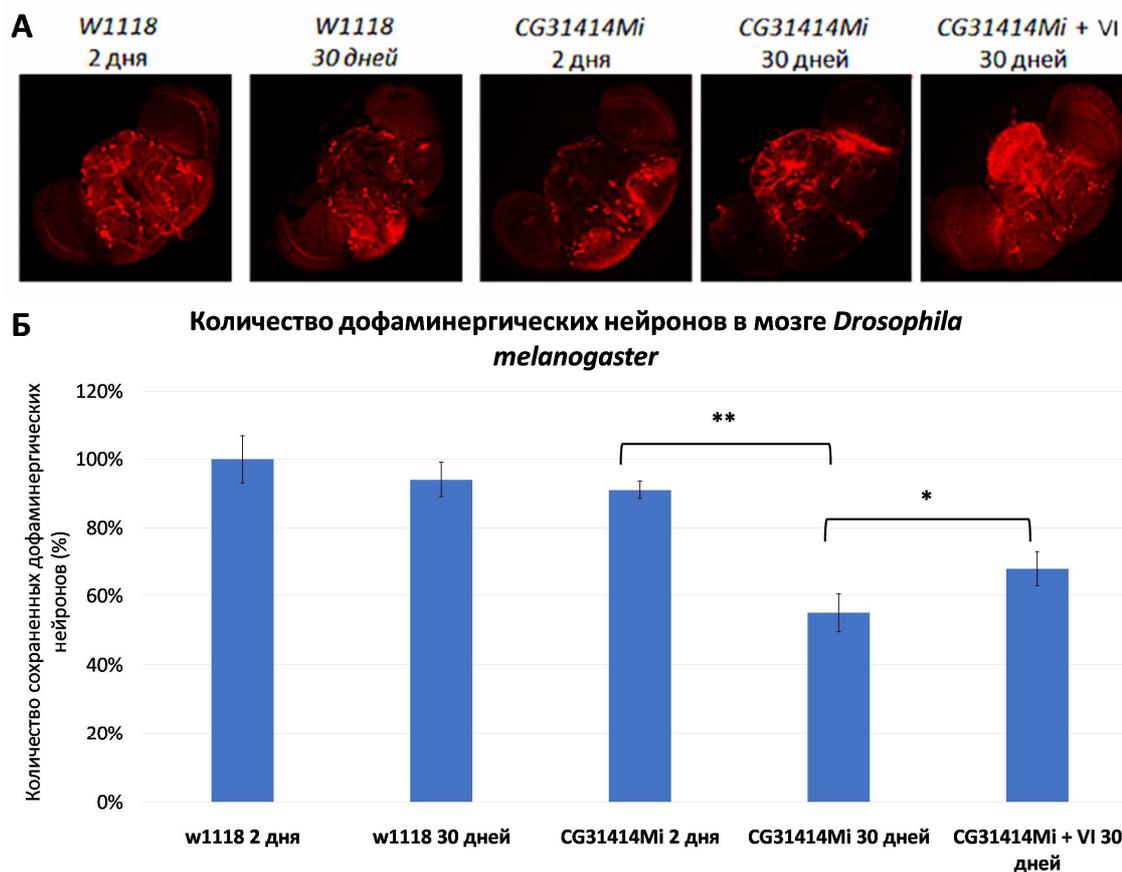


Рисунок 32 - Количество дофаминергических нейронов в мозге *D. melanogaster*. А – Конфокальные изображения спроецированной z-серии мозга линий *D. melanogaster w¹¹¹⁸* и *CG31414Mi* на 2–ой и 30–ый дни жизни в отсутствии и при добавлении в корм соединения VI. Б – Общее количество дофаминергических нейронов в клетках мозга линий *D. melanogaster CG31414Mi* на 2–ой и 30–ый дни жизни в отсутствии и при добавлении в корм соединения VI. Данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, $n \geq 6$, $N \geq 3$, однофакторный дисперсионный анализ.

Мы показали, что у линии *D. melanogaster CG31414Mi* развивается нейродегенерация, которая характеризуется гибелью дофаминергических

нейронов к 30–му дню жизни дрозофилы. При этом мы не наблюдали гибели дофаминергических нейронов в контрольной линии. Также можно отметить, что при добавлении в корм соединения VI к 30–му дню жизни у дрозофил линии *CG31414Mi* наблюдалось сохранение большего числа дофаминергических нейронов в сравнении с линией *CG31414Mi* не получавшей с кормом фармакологические шапероны глюкоцереброзидазы.

Нарушение двигательной активности является одинаково важным маркером в моделях БГ, а также в моделях БП. Мы определили уровень двигательной активности *D. melanogaster CG31414Mi* при использовании соединения VI на 30–ый день жизни в сравнении с линией *CG31414Mi* не получающей с кормом данного соединения, а также с контрольной линией *w¹¹¹⁸* (Рисунок 33).

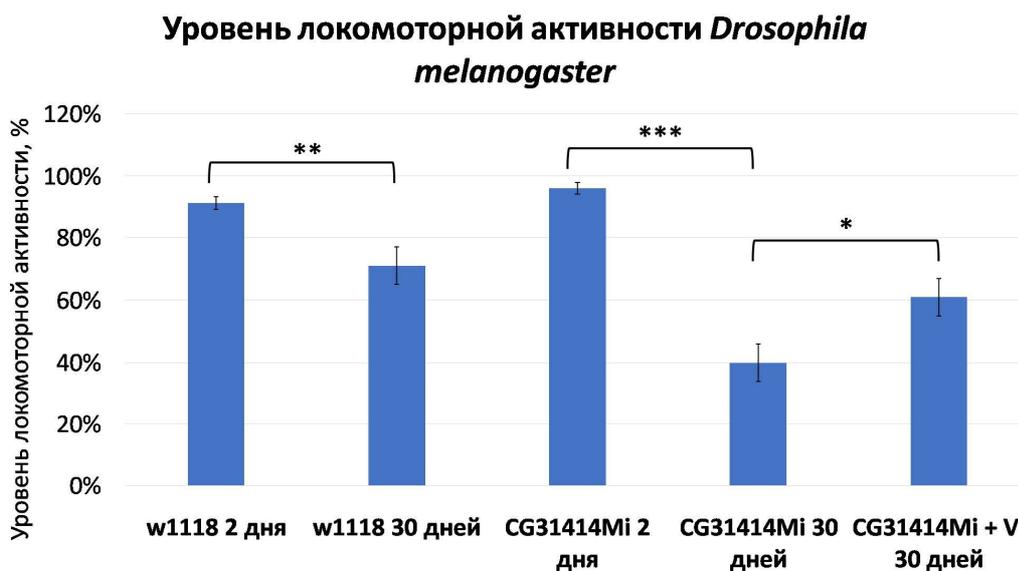


Рисунок 33 – Уровень локомоторной активности *D. melanogaster CG31414Mi* при использовании соединения VI. В качестве контроля использована линия *w¹¹¹⁸*. Мушки содержались на стандартной дрожжевой среде в течение всей жизни. Данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, $N \geq 6$, однофакторный дисперсионный анализ.

Показано, что уровень локомоторной активности у линии *D. melanogaster CG31414Mi* значительно снижен к 30–му дню по сравнению с контрольной

линией w^{1118} . При этом добавление в корм соединения VI способствует сохранению двигательной активности на более высоком уровне.

Исследованные нами новые фармакологические шапероны относятся к классу аллостерических активаторов. Эти соединения связываются с ферментами на участке его поверхности, не входящим в состав активного центра. Такое связывание способно улучшить доставку фермента к лизосоме, увеличить активность фермента, а также способствовать его правильному фолдингу. Молекулярные механизмы влияния аллостерических активаторов на формирование пространственной структуры белка на сегодняшний день плохо изучены. Данные соединения являются производными пирозолопиримидинов, влияние которых на активность мутантных форм глюкоцереброзидазы было показано ранее [Patnaik et al., 2012].

Заключение по разделу.

Многочисленные исследования направлены на изучение взаимосвязи между развитием БП и БГ. Поскольку нарушение в функциональной активности глюкоцереброзидазы приводит не только к развитию БГ, но и в целом влияет на лизосомный путь деградации белков, поддержание его активности является важным фактором, который служит для снижения риска возникновения других заболеваний, в частности БП. На сегодняшний день нет эффективного лечения БГ, только пожизненная ферментозаместительная терапия, поэтому непрерывно ведется разработка молекул, способных увеличить активность GCase. Полученные нами данные могут свидетельствовать об эффективности использования новых фармакологических шаперонов глюкоцереброзидазы на модели БГ на *D. melanogaster CG31414Mi*. При использовании соединения VI у дрозофилы сохранялось большее количество дофаминергических нейронов, а также сохранялась повышенная двигательная активность, по сравнению с контрольной линией, не получающей данные вещества. Исходя из этого, можно предположить, что новый класс соединений может быть перспективен как для терапии БГ, так и для снижения риска возникновения БП, путем поддержания активности глюкоцереброзидазы.

ВЫВОДЫ

1. Экспрессия гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями влияет на формирование синаптических контактов *D. melanogaster*, приводя к уменьшению количества сателлитных бутонов, площади нервно–мышечного контакта и числа митохондрий непосредственно в нервно–мышечном соединении.
2. Подавление экспрессии гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями замедляет развитие нейропатологии. Наличие растворимых форм α -синуклеина ассоциировано с усилением нейродегенеративных процессов.
3. «Красный пигмент» дрожжей *S. cerevisiae* замедляет развитие патологического процесса, вызванного экспрессией гена *SNCA* человека дикого типа и его форм с мутациями на модели болезни Паркинсона на *D. melanogaster*.
4. Фуллеренолы $C_{60}(OH)_{30}$ и $C_{70}(OH)_{30}$ обладают нейропротекторной и антиоксидантной активностью и способствуют замедлению развития нейродегенерации на модели болезни Паркинсона на *D. melanogaster*.
5. Фармакологические шапероны глюкоцереброзидазы, относящиеся к классу аллостерических активаторов, обладают нейропротекторными свойствами на модели болезни Гоше на *D. melanogaster*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Угрюмов М. В. Нейродегенеративные Заболевания: Фундаментальные и Прикладные Аспекты / М. В. Угрюмов. – М.: Наука, 2010 – 447 с.

Aarsland D., Kurz M. W. The epidemiology of dementia associated with Parkinson disease // J. Neurol. Sci. 2010. № 289 (1-2). P. 18 – 22.

Aarsland D., Pålhagen S., Ballard C. G. et al. Depression in Parkinson disease — epidemiology, mechanisms and management // Nat. Rev. Neurol. 2012. № 8 (1). P. 35 – 47.

Adams M. D. The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster* // Science. 2000. № 287 (5461). P. 2185 – 2195.

Aflaki E., Stubblefield B. K., Maniwang E. et al. Macrophage Models of Gaucher Disease for Evaluating Disease Pathogenesis and Candidate Drugs // Sci. Transl. Med. 2014. № 6 (240). 240ra73

Alcalay R. N., Levy O. A., Waters C. H. et al. Glucocerebrosidase activity in Parkinson's disease with and without GBA mutations // Brain. 2015. № 138(9). P. 2648 – 2658.

Alerte T. N. M., Akinfolarin A. A., Friedrich E. E. et al. α -Synuclein aggregation alters tyrosine hydroxylase phosphorylation and immunoreactivity: Lessons from viral transduction of knockout mice // Neurosci. Lett. 2008. № 435 (1). P. 24 – 29.

Allortigara J., Whitfield D., Quelch W. et al. Decreased Levels of VAMP2 and Monomeric Alpha-Synuclein Correlate with Duration of Dementia // J. Alzheimers Dis. 2016. № 50 (1). P. 101 – 110.

American Academy of Sleep Medicine. International classification of sleep disorders: diagnostic and coding manual, 2nd edn. Westchester, IL: American Academy of Sleep Medicine, 2005.

Anderson J. P., Walker D. E., Goldstein J. M. et al. Phosphorylation of Ser-129 Is the Dominant Pathological Modification of α -Synuclein in Familial and Sporadic Lewy Body Disease // *J. Biol. Chem.* 2006. № 281 (40). P. 29739-29752.

Asanuma M., Miyazaki I., Ogawa N. Dopamine- or L-DOPA-induced neurotoxicity: the role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease // *Neurotox. Res.* 2003. № 5 (3). P. 165 – 176.

Awad O., Sarkar C., Panicker L. M. et al. Altered TFEB-mediated lysosomal biogenesis in Gaucher disease iPSC-derived neuronal cells // *Hum. Mol. Genet.* 2015. № 24 (20). 5775 – 5788.

Baldwin C. M., Keating G. M. Rotigotine Transdermal Patch: A Review of its Use in the Management of Parkinson's Disease // *CNS Drugs.* 2007. № 21 (12). P. 1039 – 1055.

Balestrino R., Schapira A. H. V. Parkinson disease // *Eur. J. Neurol.* 2020. № 27 (1). P. 27 – 42.

Barone M. C., Bohmann D. Assessing neurodegenerative phenotypes in *Drosophila* dopaminergic neurons by climbing assays and whole brain immunostaining // *Journal of Visualized Experiments.* 2013. № 24 (74). e50339.

Bartels T., Ahlstrom L. S., Leftin A. et al. The N-Terminus of the Intrinsically Disordered Protein α -Synuclein Triggers Membrane Binding and Helix Folding // *Biophys J.* 2010. № 99 (7). P. 2116 – 2124.

Bartels T., Choi J. G., Selkoe D. J. α -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation // *Nature.* 2011. № 477 (7362). P. 107 – 110.

Baumann C. R. Epidemiology, diagnosis and differential diagnosis in Parkinson's disease tremor // *Parkinsonism Relat. Disord.* 2012. № 18. P. 90 – 92.

Beal M. F., Oakes D., Shoulson I. et al. A Randomized Clinical Trial of High-Dosage Coenzyme Q10 in Early Parkinson Disease: No Evidence of Benefit // *JAMA Neurol.* 2014. № 71 (5). P. 543.

Bednarikova Z., Huy P. D. Q., Mocanu M-M. et al. Fullerenol C₆₀(OH)₁₆ prevents amyloid fibrillization of Aβ₄₀-in vitro and in silico approach // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2016. № 18 (28). P. 18855 – 18867.

Bendor J. T., Logan T. P., Edwards R. H. The Function of α-Synuclein // *Neuron.* 2013. № 79 (6). P. 1044 – 1066.

Berardelli A. Pathophysiology of bradykinesia in Parkinson's disease // *Brain.* 2001. № 124 (11). P. 2131-2146.

Bessler H., Djaldetti M., Fishman P. The Surface Ultrastructure of Gaucher Cells // *Am. J. Clin. Pathol.* 1979. № 71. P. 146–150.

Blanco J., Pandey R., Wasser M. et al. Orthodenticle is necessary for survival of a cluster of clonally related dopaminergic neurons in the *Drosophila* larval and adult brain // *Neural Develop.* 2011. № 6 (1). P. 34.

Blandini F., Cilia R., Cerri S., et al. Glucocerebrosidase mutations and synucleinopathies: Toward a model of precision medicine // *Mov. Disord.* 2019. № 34 (1). P. 9 – 21.

Blanpied T. A. Amantadine Inhibits NMDA Receptors by Accelerating Channel Closure during Channel Block // *J. Neurosci.* 2005. № 25 (13). P. 3312 – 3322.

Bolshakova O. I., Slobodina A. D., Sarantseva S. V. Carbon Nanoparticles as Promising Neuroprotectors: Pro et Contra. I. Functionalization and Toxicity // *Nanobiotechnology Reports.* 2022a. № 17 (2). P. 132–140.

Bolshakova O. I., Slobodina A. D., Sarantseva S. V. Carbon Nanoparticles as Promising Neuroprotectors: Pro et Contra. II. Application of Carbon Nanoparticles in

Neurobiology and Neurology // Nanobiotechnology Reports. 2022b. № 17 (2). P. 141 – 154.

Bolshakova O., Borisenkova A., Suyasova M. et al. In vitro and in vivo study of the toxicity of fullerenols C₆₀, C₇₀ and C₁₂₀O obtained by an original two step method // Mater. Sci. Eng. C. 2019. № 104. P. 109945.

Botella J. A., Bayersdorfer F., Schneuwly S. Superoxide dismutase overexpression protects dopaminergic neurons in a Drosophila model of Parkinson's disease // Neurobiol. Dis. 2008. № 30 (1). P. 65 – 73.

Braak H., Müller C. M., Rüb U. et al. Pathology associated with sporadic Parkinson's disease — where does it end? // J. Neural Transm. Suppl. 2006. № 70. P. 89 – 97.

Brand A. H., Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes // Dev. Camb. Engl. 1993. № 118 (2). P. 401 – 415.

Buddhala C., Loftin S. K., Kuley B. M. et al. Dopaminergic, serotonergic, and noradrenergic deficits in Parkinson disease // Ann. Clin. Transl. Neurol. 2015. № 2 (10). P. 949 – 959.

Budnik V., Ruiz-Canada C. The Fly Neuromuscular Junction: Structure and Function; Second Ed. // Int. Rev. Neurobiol. 2006. P. 424.

Burr A. A., Tsou W. L., Ristic G. et al. Using membrane-targeted green fluorescent protein to monitor neurotoxic protein-dependent degeneration of Drosophila eyes // Journal of Neuroscience Research. 2014. № 92 (9). P. 1100 – 1109.

Burre J., Sharma M., Sudhof T. C. Definition of a Molecular Pathway Mediating α -Synuclein Neurotoxicity // J. Neurosci. 2015. № 35 (13). P. 5221 – 5232.

Burre J., Sharma M., Tsetsenis T. et al. α -synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro // Science. 2010. № 329. P. 1663 – 1667.

Burre J., Vivona S., Diao J. et al. Properties of native brain α -synuclein // Nature. 2013. № 498 (7453). P. 4 – 6.

Bussell R., Eliezer D. Residual Structure and Dynamics in Parkinson's Disease-associated Mutants of α -Synuclein // J. Biol. Chem. 2001. № 276 (49). P. 45996 – 46003.

Butler B., Sambo D., Khoshbouei H. Alpha-synuclein modulates dopamine neurotransmission // J. Chem. Neuroanat. 2017. № 83 – 84. P. 41 – 49.

Cabasso O., Paul S., Dorot O. et al. Drosophila melanogaster Mutated in its GBA1b Ortholog Recapitulates Neuronopathic Gaucher Disease // J. Clin. Med. 2019. № 8 (9). P. 1420.

Cabin D. E., Shimazu K., Murphy D. et al. Synaptic Vesicle Depletion Correlates with Attenuated Synaptic Responses to Prolonged Repetitive Stimulation in Mice Lacking α -Synuclein // J. Neurosci. 2002. № 22 (20). P. 8797 – 8807.

Caesar M., Zach S., Carlson C. B. et al. Leucine-rich repeat kinase 2 functionally interacts with microtubules and kinase-dependently modulates cell migration // Neurobiol. Dis. 2013. № 54. P. 280 – 288.

Cai X., Jia H., Liu Z. et al. Polyhydroxylated fullerene derivative C(60)(OH)(24) prevents mitochondrial dysfunction and oxidative damage in an MPP(+)-induced cellular model of Parkinson's disease // J. Neurosci. Res. 2008. № 86 (16). P. 3622 – 3634.

Calesnick B. Selegiline for Parkinson's disease // Am. Fam. Physician. 1990. № 41 (2). P. 589 – 591.

Caminiti S. P., Presotto L., Baroncini D. et al. Axonal damage and loss of connectivity in nigrostriatal and mesolimbic dopamine pathways in early Parkinson's disease // NeuroImage Clin. 2017. № 14. P. 734 – 740.

Campioni S., Mannini B., Zampagni M. et al. A causative link between the structure of aberrant protein oligomers and their toxicity // Nat. Chem. Biol. 2010. № 6 (2). P. 140 – 147.

Chandra S., Fornai F., Kwon H. B. et al. Double-knockout mice for alpha- and beta-synucleins: effect on synaptic functions // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. № 101 (41). P. 14966 – 14971.

Chandra S., Gallardo G., Fernández-Chacón R. et al. α -Synuclein Cooperates with CSP α in Preventing Neurodegeneration // Cell. 2005. № 123 (3). P. 383 – 396.

Chaudhuri A., Bowling K., Funderburk C. et al. Interaction of Genetic and Environmental Factors in a Drosophila Parkinsonism Model // J. Neurosci. 2007. № 27 (10). P. 2457 – 2467.

Chaudhuri K. R., Schapira A. H. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment // Lancet Neurol. 2009. № 8 (5). P. 464 – 474.

Chee F. C., Mudher A., Cuttle M. F. et al. Over-expression of tau results in defective synaptic transmission in Drosophila neuromuscular junctions // Neurobiol. Dis. 2005. № 20 (3). P. 918 – 928.

Chen L., Feany M. B. α -Synuclein phosphorylation controls neurotoxicity and inclusion formation in a Drosophila model of Parkinson disease // Nat. Neurosci. 2005. № 8 (5). P. 657 – 663.

Chen M-K., Kuwabara H., Zhou Y. et al. VMAT2 and dopamine neuron loss in a primate model of Parkinson's disease // J. Neurochem. 2008. № 105 (1). P. 78 – 90.

Chen Y., Sam R., Sharma P. et al. Glucocerebrosidase as a therapeutic target for Parkinson's disease // Expert Opin Ther Targets. 2020. № 24 (4). P. 287 – 294.

Choi B-K., Choi M-G., Kim J-Y. et al. Large α -synuclein oligomers inhibit neuronal SNARE-mediated vesicle docking // Proc. Natl. Acad. Sci. 2013. № 110 (10). P. 4087 – 4092.

Choi B-K., Kim J-Y., Cha M-Y. et al. β -Amyloid and α -Synuclein Cooperate To Block SNARE-Dependent Vesicle Fusion // Biochemistry. 2015. № 54 (9). P. 1831 – 1840.

Chou K. L., Stacy M., Simuni T. et al. The spectrum of “off” in Parkinson’s disease: What have we learned over 40 years? // *Parkinsonism Relat. Disord.* 2018. № 51. P. 9 – 16.

Choubey V., Safiulina D., Vaarmann A. et al. Mutant A53T α -Synuclein Induces Neuronal Death by Increasing Mitochondrial Autophagy // *J. Biol. Chem.* 2011. № 286 (12). P. 10814 – 10824.

Cilia R., Akpalu A., Sarfo F. S. et al. The modern pre-levodopa era of Parkinson’s disease: insights into motor complications from sub-Saharan Africa // *Brain.* 2014. № 137 (10). P. 2731 – 2742.

Clark I. E., Dodson M. W., Jiang C. et al. *Drosophila pink1* is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin // *Nature.* 2006. № 441 (7097). P. 1162 – 1166.

Clayton D. F., George J. M. The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease // *Trends Neurosci.* 1998. № 21 (6). P. 249 – 254.

Cochrane C. J., Ebmeier K. P. Diffusion tensor imaging in parkinsonian syndromes: a systematic review and meta-analysis // *Neurology.* 2013. № 80. P. 857– 864.

Collins C. A., DiAntonio A. Synaptic development: insights from *Drosophila* // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2007. № 17 (1). P. 35 – 42.

Connolly B. S., Lang A. E. Pharmacological Treatment of Parkinson Disease: A Review // *JAMA.* 2014. № 311 (16). P. 1670.

Conway K. A., Harper J. D., Lansbury P. T. Accelerated in vitro fibril formation by a mutant α -synuclein linked to early-onset Parkinson disease // *Nat. Med.* 1998. № 4 (11). P. 1318 – 1320.

Conway K. A., Lee S. J., Rochet J. C. et al. Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-

onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. № 97 (2). P. 571 – 576.

Conway K. A., Lee S-J., Rochet J-C., et al. Accelerated Oligomerization by Parkinson's Disease Linked α -Synuclein Mutants // Ann. NY Acad. Sci. 2006. № 920 (1). P. 42 – 45.

Coulom H. Chronic Exposure to Rotenone Models Sporadic Parkinson's Disease in *Drosophila melanogaster* // J. Neurosci. 2004. № 24 (48). P. 10993 – 10998.

Cuervo A. M. Impaired Degradation of Mutant α -Synuclein by Chaperone-Mediated Autophagy // Science. 2004. № 305 (5688). P. 1292 – 1295.

Dabool L., Juravlev L., Hakim-Mishnaevski K. et al. Modeling Parkinson's disease in adult *Drosophila* // J. Neurosci. Methods. 2019. № 311. P. 89 – 94.

Danielson S. R., Held J. M., Schilling B. et al. Preferentially Increased Nitration of α -Synuclein at Tyrosine-39 in a Cellular Oxidative Model of Parkinson's Disease // Anal. Chem. 2009. № 81 (18). P. 7823 – 7828.

Desplats P., Spencer B., Crews L. et al. α -Synuclein Induces Alterations in Adult Neurogenesis in Parkinson Disease Models via p53-mediated Repression of Notch1 // J. Biol. Chem. 2012. № 287 (38). P. 31691 – 31702.

DeWitt D. C., Rhoades E. α -Synuclein Can Inhibit SNARE-Mediated Vesicle Fusion through Direct Interactions with Lipid Bilayers // Biochemistry. 2013. № 52 (14). P. 2385 – 2387.

Diao J., Burre J., Vivona S. et al. Native α -synuclein induces clustering of synaptic-vesicle mimics via binding to phospholipids and synaptobrevin-2/VAMP2 // eLife. 2013. № 2. e00592.

Dodson M. W., Leung L. K., Lone M. et al. Novel alleles of the *Drosophila* LRRK2 homolog reveal a crucial role in endolysosomal functions and autophagy in vivo // Dis. Model. Mech. 2014. № 7 (12). P. 1351 – 1363.

Doering T., Proia R. L., Sandhoff K. Accumulation of protein-bound epidermal glucosylceramides in β -glucocerebrosidase deficient type 2 Gaucher mice // FEBS Lett. 1999. № 447 (2-3). P. 167 – 170.

Dorsey E. R., Constantinescu R., Thompson J. P. et al. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030 // Neurology. 2007. № 68 (5). P. 384 – 386.

Duce J. A., Wong B. X., Durham H. et al. Post translational changes to α -synuclein control iron and dopamine trafficking; a concept for neuron vulnerability in Parkinson's disease // Mol. Neurodegener. 2017. № 12 (1). P. 45.

Dugan L. L., Tian L., Quick K. L. et al. Carboxyfullerene neuroprotection postinjury in Parkinsonian nonhuman primates: C 3 Neuroprotection // Ann. Neurol. 2014. № 76 (3). P. 393 – 402.

Dvir H., Harel M., McCarthy A. A. et al. X - ray structure of human acid - β - glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease // EMBO Rep. 2003. № 4 (7). P. 704 – 709.

Ebrahimi-Fakhari D., Cantuti-Castelvetri I., Fan Z. et al. Distinct Roles In Vivo for the Ubiquitin-Proteasome System and the Autophagy-Lysosomal Pathway in the Degradation of α -Synuclein // J. Neurosci. 2011. № 31 (41). P. 14508 – 14520.

Eliezer D., Kutluay E., Bussell R. et al. Conformational properties of α -synuclein in its free and lipid-associated states // J. Mol. Biol. 2001. № 307 (4). P. 1061 – 1073.

Emmanouilidou E., Stefanis L., Vekrellis K. Cell-produced α -synuclein oligomers are targeted to, and impair, the 26S proteasome // Neurobiol. Aging. 2010. № 31 (6). P. 953 – 968.

Esteves A. R., Swerdlow R. H., Cardoso S. M. LRRK2, a puzzling protein: Insights into Parkinson's disease pathogenesis // Exp. Neurol. 2014. № 261. P. 206 – 216.

Fauvet B., Mbefo M. K., Fares M-B. et al. α -Synuclein in Central Nervous System and from Erythrocytes, Mammalian Cells, and Escherichia coli Exists Predominantly as Disordered Monomer // J. Biol. Chem. 2012. № 287 (19). P. 15345 – 15364.

Feany M. B., Bender W. W. A Drosophila model of Parkinson's disease // Nature. 2000. № 404 (6776). P. 394 – 398.

Feng L. R., Federoff H. J., Vicini S. et al. α -Synuclein mediates alterations in membrane conductance: a potential role for α -synuclein oligomers in cell vulnerability: Synuclein forms pores leading to cell vulnerability // Eur. J. Neurosci. 2010. № 32 (1). P. 10 – 17.

Fortin D. L. Lipid Rafts Mediate the Synaptic Localization of α -Synuclein // J. Neurosci. 2004. № 24 (30). P. 6715 – 6723.

Fountaine T. M., Venda L. L., Warrick N. et al. The effect of α -synuclein knockdown on MPP⁺ toxicity in models of human neurons // Eur. J. Neurosci. 2008. № 28 (12). P. 2459 – 2473.

Fountaine T. M., Wade-Martins R. RNA interference-mediated knockdown of alpha-synuclein protects human dopaminergic neuroblastoma cells from MPP⁽⁺⁾ toxicity and reduces dopamine transport // J. Neurosci. Res. 2007. № 85 (2). P. 351 – 363.

Fujiwara H., Hasegawa M., Dohmae N. et al. α -Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions // Nat. Cell Biol. 2002. № 4 (2). P. 160 – 164.

Gajula Baliya M. B., Griesinger C., Herzig A. et al. Pre-Fibrillar α -Synuclein Mutants Cause Parkinson's Disease-Like Non-Motor Symptoms in Drosophila // PLoS ONE. 2011. № 6 (9). e24701.

Games D., Valera E., Spencer B. et al. Reducing C-Terminal-Truncated Alpha-Synuclein by Immunotherapy Attenuates Neurodegeneration and Propagation in Parkinson's Disease-Like Models // J. Neurosci. 2014. № 34 (28). P. 9441 – 9454.

- Gan-Or Z., Liong C., Alcalay R. N. GBA-Associated Parkinson's Disease and Other Synucleinopathies // *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2018. № 18 (8). P. 44.
- Gautier C. A., Kitada T., Shen J. Loss of PINK1 causes mitochondrial functional defects and increased sensitivity to oxidative stress // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. № 105 (32). P. 11364 – 11369.
- Gevedon O., Bolus H., Lye S. H. et al. In Vivo Forward Genetic Screen to Identify Novel Neuroprotective Genes in *Drosophila melanogaster* // *J. Vis. Exp.* 2019. № 149.
- Giasson B. I. Oxidative Damage Linked to Neurodegeneration by Selective alpha-Synuclein Nitration in Synucleinopathy Lesions // *Science.* 2000. № 290 (5493). P. 985 – 989.
- Giasson B. I., Forman M. S., Higuchi M. et al. Initiation and synergistic fibrillization of tau and alpha-synuclein // *Science.* 2003. № 300 (5619). P. 636 – 640.
- Giasson B. I., Uryu K., Trojanowski J. Q. et al. Mutant and Wild Type Human α -Synucleins Assemble into Elongated Filaments with Distinct Morphologies in Vitro // *J. Biol. Chem.* 1999. № 274 (12). P. 7619 – 7622.
- Gispert S., Ricciardi F., Kurz A. et al. Parkinson phenotype in aged PINK1-deficient mice is accompanied by progressive mitochondrial dysfunction in absence of neurodegeneration // *PLoS One.* 2009. № 4 (6). e5777.
- Godena V. K., Brookes-Hocking N., Moller A. et al. Increasing microtubule acetylation rescues axonal transport and locomotor deficits caused by LRRK2 Roc-COR domain mutations // *Nat. Commun.* 2014. № 5 (1). P. 5245.
- Goers J., Manning-Bog A. B., McCormack A. L. et al. Nuclear Localization of α -Synuclein and Its Interaction with Histones // *Biochemistry.* 2003. № 42 (28). P. 8465 – 8471.
- Goker-Alpan O. Parkinsonism among Gaucher disease carriers // *J. Med. Genet.* 2004. № 41 (12). P. 937 – 940.

Goldin E., Zheng W., Motabar O. et al. High Throughput Screening for Small Molecule Therapy for Gaucher Disease Using Patient Tissue as the Source of Mutant Glucocerebrosidase // PLoS ONE. 2012. № 7 (1). e29861.

Golomidov I. M., Latypova E. M., Ryabova E. V. et al. Reduction of the α -synuclein expression promotes slowing down early neuropathology development in the Drosophila model of Parkinson's disease // J. Neurogenet. 2022. № 36 (1). P. 1 – 10.

Golomidov I., Bolshakova O., Komissarov A. et al. The neuroprotective effect of fullerenols on a model of Parkinson's disease in Drosophila melanogaster // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2020. № 523 (2). P. 446 – 451.

Goodman C. S., Doe C. Q. Embryonic development of the Drosophila nervous system // The Development of Drosophila melanogaster. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1993. P. 1091 – 1131.

Greene J. C., Whitworth A. J., Kuo I. et al. Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in Drosophila parkin mutants // Proc. Natl. Acad. Sci. 2003. № 100 (7). P. 4078 – 4083.

Greig S.L., McKeage K. Carbidopa/Levodopa ER Capsules (Rytary®, Numient™): A Review in Parkinson's Disease // CNS Drugs. 2016. № 30 (1). P. 79 – 90.

Gribaudo S., Tixador P., Bousset L. et al. Propagation of α -Synuclein Strains within Human Reconstructed Neuronal Network // Stem Cell Rep. 2019. № 12 (2). P. 230 – 244.

Guerreiro P. S., Huang Y., Gysbers A. et al. LRRK2 interactions with α -synuclein in Parkinson's disease brains and in cell models // J. Mol. Med. 2013. № 91 (4). P. 513 – 522.

Hastings T. G., Lewis D. A., Zigmond M. J. Role of oxidation in the neurotoxic effects of intrastriatal dopamine injections // Proc. Natl. Acad. Sci. 1996. № 93 (5). P. 1956 – 1961.

- Hayashi G., Jasoliya M., Sahdeo S. et al. Dimethyl fumarate mediates Nrf2-dependent mitochondrial biogenesis in mice and humans // *Hum. Mol. Genet.* 2017. № 26 (15). P. 2864 – 2873.
- Helmich R. C., Hallett M., Deuschl G. et al. Cerebral causes and consequences of parkinsonian resting tremor: a tale of two circuits? // *Brain.* 2012. № 135 (11). P. 3206 – 3226.
- Henning Jensen P. Functional Defect Conferred by the Parkinson's Disease-Causing α -Synuclein (Ala30Pro) Mutation // *Methods Mol. Med.* 2001. № 62. P. 67 – 72.
- Hewitt V. L., Whitworth A. J. Mechanisms of Parkinson's Disease // *Current Topics in Developmental Biology.* 2017. № 121. P. 173 – 200.
- Hindle S., Afsari F., Stark M. et al. Dopaminergic expression of the Parkinsonian gene LRRK2-G2019S leads to non-autonomous visual neurodegeneration, accelerated by increased neural demands for energy // *Hum. Mol. Genet.* 2013. № 22 (11). P. 2129 – 2140.
- Hirth F. On the Origin and Evolution of the Tripartite Brain // *Brain Behav. Evol.* 2010. № 76 (1). P. 3 – 10.
- Hoang B., Chiba A. Single-cell analysis of *Drosophila* larval neuromuscular synapses // *Dev. Biol.* 2001. № 229 (1). P. 55 – 70.
- Hong Z., Shi M., Chung K. A. et al. DJ-1 and α -synuclein in human cerebrospinal fluid as biomarkers of Parkinson's disease // *Brain.* 2010. № 133. P. 713– 726.
- Hruska K. S., LaMarca M. E., Scott C. R. et al. Gaucher disease: mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA) // *Hum Mutat.* 2008. № 29 (5). P. 567 – 583.
- Huang Z., Xu Z., Wu Y. et al. Determining nuclear localization of alpha-synuclein in mouse brains // *Neuroscience.* 2011. № 199. P. 318 – 332.

Hughes A. J., Daniel S. E., Kilford L., Lees A. J. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 1992. № 55 (3). P. 181 – 184.

Ip C. W., Klaus L-C., Karikari A. A. et al. AAV1/2-induced overexpression of A53T- α -synuclein in the substantia nigra results in degeneration of the nigrostriatal system with Lewy-like pathology and motor impairment: a new mouse model for Parkinson's disease // Acta Neuropathol. Commun. 2017. № 5 (1). P. 11.

Isaacson S., Skettini J. Neurogenic orthostatic hypotension in Parkinson's disease: evaluation, management, and emerging role of droxidopa // Vasc. Health Risk Manag. 2014. № 10. P. 169 – 176.

Itier J. M., Ibanez P., Mena M. A. et al. Parkin gene inactivation alters behaviour and dopamine neurotransmission in the mouse // Hum. Mol. Genet. 2003. № 12 (18). P. 2277 – 2291.

Iyer A., Roeters S. J., Schilderink N. et al. The Impact of N-terminal Acetylation of α -Synuclein on Phospholipid Membrane Binding and Fibril Structure // J. Biol. Chem. 2016. № 291 (40). P. 21110 – 21122.

Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 2008. № 79. P. 368 – 376.

Jennings B. H. Drosophila – a versatile model in biology & medicine // Mater Today. 2011. № 14 (5). P. 190 – 195.

Jensen P. H., Nielsen M. S., Jakes R. et al. Binding of α -Synuclein to Brain Vesicles Is Abolished by Familial Parkinson's Disease Mutation // J. Biol. Chem. 1998. № 273 (41). P. 26292 – 26294.

Julius A., Longfellow K. Movement Disorders // Med. Clin. North. Am. 2016. № 100 (4). P. 733 – 761.

- Kanaan N. M., Manfredsson F. P. Loss of functional alpha-synuclein: a toxic event in Parkinson's disease? // *J. Park. Dis.* 2012. № 2 (4). P. 249 – 267.
- Karpinar D. P., Baliya M. B. G., Kügler S. et al. Pre-fibrillar α -synuclein variants with impaired β -structure increase neurotoxicity in Parkinson's disease models // *EMBO J.* 2009. № 28 (20). P. 3256 – 3268.
- Kawasaki H., Suzuki T., Ito K. et al. Minos-insertion mutant of the *Drosophila* GBA gene homologue showed abnormal phenotypes of climbing ability, sleep and life span with accumulation of hydroxy-glucocerebroside // *Gene.* 2017. № 614. P. 49 – 55.
- Kim S. D., Allen N. E., Canning C. G. et al. Postural Instability in Patients with Parkinson's Disease: Epidemiology, Pathophysiology and Management // *CNS Drugs.* 2013. № 27 (2). P. 97-112.
- Kim Y., Park J., Kim S. et al. PINK1 controls mitochondrial localization of Parkin through direct phosphorylation // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. № 377 (3). P. 975 – 980.
- Koh T-W., Bellen H. J. Synaptotagmin I, a Ca^{2+} sensor for neurotransmitter release // *Trends Neurosci.* 2003. № 26 (8). P. 413 – 422.
- Koh Y. H., Gramates L. S., Budnik V. *Drosophila* larval neuromuscular junction: molecular components and mechanisms underlying synaptic plasticity // *Microsc. Res. Tech.* 2000. № 49 (1). P. 14 – 25.
- Kontopoulos E., Parvin J. D., Feany M. B. α -synuclein acts in the nucleus to inhibit histone acetylation and promote neurotoxicity // *Hum. Mol. Genet.* 2006. № 15 (20). P. 3012 – 3023.
- Kotzbauer P. Fibrillization of α -synuclein and tau in familial Parkinson's disease caused by the A53T α -synuclein mutation // *Exp. Neurol.* 2004. № 187 (2). P. 279 – 288.
- Krüger R., Kuhn W., Müller T. et al. Ala30Pro mutation in the gene encoding α -synuclein in Parkinson's disease // *Nat. Genet.* 1998. № 18 (2). P. 106 – 108.

Kumar A., Cookson M. R. Role of LRRK2 kinase dysfunction in Parkinson disease // *Expert Rev. Mol. Med.* 2011. № 13. e20.

Kumari U., Tan E. K. LRRK2 in Parkinson's disease: genetic and clinical studies from patients: Genetic and clinical studies of LRRK2 // *FEBS J.* 2009. № 276 (22). P. 6455 – 6463.

Kuo Y-M., Li Z., Jiao Y. et al. Extensive enteric nervous system abnormalities in mice transgenic for artificial chromosomes containing Parkinson disease-associated α -synuclein gene mutations precede central nervous system changes // *Hum. Mol. Genet.* 2010. № 19 (9). P. 1633 – 1650.

Kuusisto E., Parkkinen L., Alafuzoff I. Morphogenesis of Lewy Bodies: Dissimilar Incorporation of α -Synuclein, Ubiquitin, and p62 // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2003. № 62 (12). P. 1241 – 1253.

Lai Y., Kim S., Varkey J. et al. Nonaggregated α -Synuclein Influences SNARE-Dependent Vesicle Docking via Membrane Binding // *Biochemistry.* 2014. № 53 (24). P. 3889 – 3896.

Lashuel H. A., Petre B. M., Wall J. et al. α -Synuclein, Especially the Parkinson's Disease-associated Mutants, Forms Pore-like Annular and Tubular Protofibrils // *J. Mol. Biol.* 2002. № 322 (5). P. 1089 – 1102.

Lavara-Culebras E., Muñoz-Soriano V., Gómez-Pastor R. et al. Effects of pharmacological agents on the lifespan phenotype of *Drosophila* DJ-1 β mutants // *Gene.* 2010. № 462 (1-2). P. 26 – 33.

Lee H.-J., Khoshaghideh F., Patel S. et al. Clearance of alpha-synuclein oligomeric intermediates via the lysosomal degradation pathway // *J. Neurosci.* 2004. № 24 (8). P. 1888 – 1896.

Lee H-J., Choi C., Lee S-J. Membrane-bound α -Synuclein Has a High Aggregation Propensity and the Ability to Seed the Aggregation of the Cytosolic Form // J. Biol. Chem. 2002a. № 277 (1). P. 671 – 678.

Lee H-J., Shin S. Y., Choi C. et al. Formation and Removal of α -Synuclein Aggregates in Cells Exposed to Mitochondrial Inhibitors // J. Biol. Chem. 2002b. № 277 (7). P. 5411 – 5417.

Lee S. B., Kim W., Lee S. et al. Loss of LRRK2/PARK8 induces degeneration of dopaminergic neurons in *Drosophila* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007. № 358 (2). P. 534 – 539.

Lees A. J. Unresolved issues relating to the shaking palsy on the celebration of James Parkinson's 250th birthday // Mov Disord. 2007. № 17. P. 327 – 334.

Lehéricy S., Bardinet E., Poupon C. et al. 7 tesla magnetic resonance imaging: a closer look at substantia nigra anatomy in Parkinson's disease // Mov. Disord. 2014. № 29. P. 1574 – 1581.

Lewis J., Melrose H., Bumcrot D. et al. In vivo silencing of alpha-synuclein using naked siRNA // Mol. Neurodegener. 2008. № 3 (1). P. 19.

Li J., Uversky V. N, Fink A. L. Effect of familial Parkinson's disease point mutations A30P and A53T on the structural properties, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein // Biochemistry. 2001. № 40 (38). P. 11604 – 11613.

Li J., Uversky V. N., Fink A. L. Conformational Behavior of Human α -Synuclein is Modulated by Familial Parkinson's Disease Point Mutations A30P and A53T // NeuroToxicology. 2002. № 23 (4-5). P. 553 – 567.

Li X., Tan Y. C., Poulou S. et al. Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2)/PARK8 possesses GTPase activity that is altered in familial Parkinson's disease R1441C/G mutants // J. Neurochem. 2007. № 103 (1). P. 238 – 247.

- Lin C-H., Tsai P-I., Wu R-M. et al. LRRK2 G2019S Mutation Induces Dendrite Degeneration through Mislocalization and Phosphorylation of Tau by Recruiting Autoactivated GSK3 // *J. Neurosci.* 2010. № 30 (39). P. 13138 – 13149.
- Liu X., Lee Y. J., Liou L-C. et al. Alpha-synuclein functions in the nucleus to protect against hydroxyurea-induced replication stress in yeast // *Hum. Mol. Genet.* 2011. № 20 (17). P. 3401 – 3414.
- Liu Y., Yuan Y. H., Sun J. D. et al. Nigrostriatal dynein changes in A53T alpha-synuclein transgenic mice // *F1000Res.* 2014. № 3. P. 68.
- Liu Z., Wang X., Yu Y. et al. A *Drosophila* model for LRRK2-linked parkinsonism // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008. № 105 (7). P. 2693 – 2698.
- Liu Z., Yu Y., Li X. et al. Curcumin protects against A53T alpha-synuclein-induced toxicity in a PC12 inducible cell model for Parkinsonism // *Pharmacol. Res.* 2011. № 63 (5). P. 439 – 444.
- Loeb V., Yakunin E., Saada A. et al. The Transgenic Overexpression of α -Synuclein and Not Its Related Pathology Associates with Complex I Inhibition // *J. Biol. Chem.* 2010. № 285 (10). P. 7334 – 7343.
- Lotharius J., Dugan L. L., O'Malley K. L. Distinct mechanisms underlie neurotoxin-mediated cell death in cultured dopaminergic neurons // *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 1999. № 19 (4). P. 1284 – 1293.
- Low P. A. Prevalence of orthostatic hypotension // *Clin. Auton. Res.* 2008. № 18 (S1). P. 8 – 13.
- Lu X. H., Fleming S. M., Meurers B. et al. Bacterial artificial chromosome transgenic mice expressing a truncated mutant parkin exhibit age-dependent hypokinetic motor deficits, dopaminergic neuron degeneration, and accumulation of proteinase K-resistant alpha-synuclein // *J. Neurosci.* 2009. № 29 (7). P. 1962 – 1976.

- Luk K. C., Song C., O'Brien P. et al. Exogenous α -synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2009. № 106 (47). P. 20051 – 20056.
- Luth E.S., Stavrovskaya I. G., Bartels T. et al. Soluble, prefibrillar α -synuclein oligomers promote complex I-dependent, Ca^{2+} -induced mitochondrial dysfunction // *J. Biol. Chem.* 2014. № 289. P. 21490–21507.
- Maegawa G. H. B., Tropak M. B., Buttner J. D. et al. Identification and Characterization of Ambroxol as an Enzyme Enhancement Agent for Gaucher Disease // *J. Biol. Chem.* 2009. № 284 (35). P. 23502 – 23516.
- Maitra U., Scaglione M. N., Chtarbanova S. et al. Innate immune responses to paraquat exposure in a *Drosophila* model of Parkinson's disease // *Scientific Reports*. 2019. № 9 (1). P. 12714.
- Mao Z. Eight different types of dopaminergic neurons innervate the *Drosophila* mushroom body neuropil: anatomical and physiological heterogeneity // *Front Neural Circuits*. 2009. № 3. P. 5.
- Maor G., Cabasso O., Krivoruk O. et al. The contribution of mutant GBA to the development of Parkinson disease in *Drosophila* // *Hum. Mol. Genet.* 2016. № 25 (13). P. 2712 – 2727.
- Maor G., Rencus-Lazar S., Filocamo M. et al. Unfolded protein response in Gaucher disease: from human to *Drosophila* // *Orphanet. J. Rare Dis.* 2013. № 8. P. 140
- Maroteaux L., Campanelli J., Scheller R. Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal // *J Neurosci.* 1988. № 8 (8). P. 2804 – 2815.
- Maslah E. Dopaminergic Loss and Inclusion Body Formation in α -Synuclein Mice: Implications for Neurodegenerative Disorders // *Science*. 2000. № 287 (5456). P. 1265 – 1269.

- Matarazzo M., Perez-Soriano A., Stoessl A. J. Dyskinesias and levodopa therapy: why wait? // *J. Neural. Transm.* 2018. № 125 (8). P. 1119 – 1130.
- Matta S., Van Kolen K., da Cunha R. et al. LRRK2 Controls an EndoA Phosphorylation Cycle in Synaptic Endocytosis // *Neuron.* 2012. № 75 (6). P. 1008 – 1021.
- Mazzulli J. R., Xu Y-H., Sun Y. et al. Gaucher Disease Glucocerebrosidase and α -Synuclein Form a Bidirectional Pathogenic Loop in Synucleinopathies // *Cell.* 2011. № 146 (1). P. 37 – 52.
- Mbefo M. K., Paleologou K. E., Boucharaba A. et al. Phosphorylation of Synucleins by Members of the Polo-like Kinase Family // *J. Biol. Chem.* 2010. № 285 (4). P. 2807 – 2822.
- McCormack A. L., Mak S. K., Di Monte D. A. Increased α -synuclein phosphorylation and nitration in the aging primate substantia nigra // *Cell Death Dis.* 2012. № 3 (5). e315.
- McCormack A. L., Mak S. K., Henderson J. M. et al. Alpha-synuclein suppression by targeted small interfering RNA in the primate substantia nigra // *PLoS One.* 2010. № 5. e12122.
- McGurk L., Berson A., Bonini N. M. *Drosophila* as an In Vivo Model for Human Neurodegenerative Disease // *Genetics.* 2015. № 201 (2). P. 377 – 402.
- McNulty B. C., Young G. B., Pielak G. J. Macromolecular Crowding in the *Escherichia coli* Periplasm Maintains α -Synuclein Disorder // *J. Mol. Biol.* 2006. № 355 (5). P. 893 – 897.
- Mehra S., Sahay S., Maji S. K. α -Synuclein misfolding and aggregation: Implications in Parkinson's disease pathogenesis // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics.* 2019. № 1867 (10). P. 890 – 908.

Menon K. P., Carrillo R. A., Zinn K. Development and plasticity of the *Drosophila* larval neuromuscular junction: Development and plasticity of the neuromuscular junction // Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol. 2013. № 2 (5). P. 647 – 670.

Meulener M., Whitworth A. J., Armstrong-Gold C. E. et al. *Drosophila* DJ-1 Mutants Are Selectively Sensitive to Environmental Toxins Associated with Parkinson's Disease // Curr Biol. 2005. № 15 (17). P. 1572 – 1577.

Mingazov E. R., Ugrumov M. V. Gene expression of proteins of the vesicle cycle in dopaminergic neurons in modeling of Parkinson's disease // Dokl. Biochem. Biophys. 2016. № 468 (1). P. 206 – 208.

Mistry P. K., Lopez G., Schiffmann R. et al. Gaucher disease: Progress and ongoing challenges // Mol. Genet. Metab. 2017. № 120 (1–2). P. 8–21.

Molina-Mateo D., Fuenzalida-Uribe N., Hidalgo S. et al. Characterization of a presymptomatic stage in a *Drosophila* Parkinson's disease model: Unveiling dopaminergic compensatory mechanisms // Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis. 2017. № 1863 (11). P. 2882 – 2890.

Mospan G., Mospan C., Vance S. et al. Drug updates and approvals: 2017 in review // Nurse Pract. 2017. № 42 (12). P. 8 – 16.

Mougenot A-L., Nicot S., Bencsik A. et al. Prion-like acceleration of a synucleinopathy in a transgenic mouse model // Neurobiol. Aging. 2012. № 33 (9). P. 2225 – 2228.

Munishkina L. A., Phelan C., Uversky V. N., Fink A. L. Conformational Behavior and Aggregation of α -Synuclein in Organic Solvents: Modeling the Effects of Membranes // Biochemistry. 2003. № 42 (9). P. 2720 – 2730.

Nakajo S., Omata K., Aiuchi T. et al. Purification and Characterization of a Novel Brain-Specific 14-kDa Protein // J. Neurochem. 1990. № 55 (6). P. 2031 – 2038.

Nakamura K., Nemani V. M., Azarbal F. et al. Direct Membrane Association Drives Mitochondrial Fission by the Parkinson Disease-associated Protein α -Synuclein // *J. Biol. Chem.* 2011. № 286 (23). P. 20710 – 20726.

Nalls M. A., Plagnol V., Hernandez D. G. et al. Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies // *Lancet.* 2011. № 377 (9766). P. 641 – 649.

Narhi L., Wood S. J., Steavenson S. et al. Both familial Parkinson's disease mutations accelerate alpha-synuclein aggregation // *J. Biol. Chem.* 1999. № 274 (14). P. 9843 – 9846.

Nassel D. R., Elekes K. Aminergic neurons in the brain of blowflies and *Drosophila*: dopamine- and tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons and their relationship with putative histaminergic neurons // *Cell Tissue Res.* 1992. № 267 (1). P. 147 – 167.

Navarro J. A., Hebner S., Yenissetti S. C. et al. Analysis of dopaminergic neuronal dysfunction in genetic and toxin-induced models of Parkinson's disease in *Drosophila* // *Journal of Neurochemistry.* 2014. № 131 (3). P. 369–382.

Neumann M., Kahle P. J., Giasson B. I. et al. Misfolded proteinase K-resistant hyperphosphorylated α -synuclein in aged transgenic mice with locomotor deterioration and in human α -synucleinopathies // *J. Clin. Invest.* 2002. № 110 (10). P. 1429 – 1439.

Nevzglyadova O. V., Kuznetsova I. M., Mikhailova E. V. et al. The effect of red pigment on the amyloidization of yeast proteins // *Yeast.* 2011. № 28 (7). P. 505 – 526.

Nevzglyadova O. V., Mikhailova E. V., Amen T. R. et al. Yeast red pigment modifies Amyloid beta growth in Alzheimer disease models in both *Saccharomyces cerevisiae* and *Drosophila melanogaster* // *Amyloid.* 2015. № 22 (2). P. 100 – 111.

Nevzglyadova O. V., Mikhailova E. V., Artemov A. V. et al. Yeast red pigment modifies cloned human α -synuclein pathogenesis in Parkinson disease models in

Saccharomyces cerevisiae and Drosophila melanogaster // Neurochem. Int. 2018. № 120. P. 172 – 181.

Nevzglyadova O. V., Mikhailova E. V., Soidla T. R. Yeast red pigment, protein aggregates, and amyloidoses: a review // Cell Tissue Res. 2022. № 388 (2). P. 211 – 223.

Nixon R. A. The role of autophagy in neurodegenerative disease // Nat. Med. 2013. № 19 (8). P. 983 – 997.

Norris E. H. , Giasson B. I., Ischiropoulos H. et al. Effects of Oxidative and Nitrate Challenges on α -Synuclein Fibrillogenesis Involve Distinct Mechanisms of Protein Modifications // J. Biol. Chem. 2003. № 278 (29). P. 27230 – 27240.

Nutt J. G., Woodward W. R., Beckner R. M. et al. Effect of peripheral catechol-O-methyltransferase inhibition on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of levodopa in parkinsonian patients // Neurology. 1994. № 44 (5). P. 913.

Olanow C. W., Koller W. C. An algorithm (decision tree) for the management of Parkinson's disease: Treatment guidelines // Neurology. 1998. № 50 (3). P.1.

Oldfield V., Keating G. M., Perry C. M. Rasagiline: A Review of its Use in the Management of Parkinson's Disease // Drugs. 2007. №67 (12). P. 1725 – 1747.

Ou Y., Chwalla B., Landgraf M. et al. Identification of genes influencing dendrite morphogenesis in developing peripheral sensory and central motor neurons // Neural Develop. 2008. № 3 (1). P. 16.

Park J., Lee S. B., Lee S. et al. Mitochondrial dysfunction in Drosophila PINK1 mutants is complemented by parkin // Nature. 2006. № 441 (7097). P. 1157 – 1161.

Parkinson Study Group PRECEPT Investigators. Mixed lineage kinase inhibitor CEP-1347 fails to delay disability in early Parkinson disease // Neurology. 2007. № 69. P. 1480 – 1490.

Parnetti L., Castrioto A., Chiasserini D. et al. Cerebrospinal fluid biomarkers in Parkinson disease // *Nat. Rev. Neurol.* 2013. № 9. P. 131– 140.

Patnaik S., Zheng W., Choi J. H., et al. Discovery, Structure–Activity Relationship, and Biological Evaluation of Noninhibitory Small Molecule Chaperones of Glucocerebrosidase // *J. Med. Chem.* 2012. № 55 (12). P. 5734 – 5748.

Pchelina S. N., Emel'ianov A. K., Usenko T. S. [Molecular basis of Parkinson's disease linked with mutations in the LRRK2 gene] // *Mol. Biol. (Mosk)*. 2014. № 48 (1). P. 3 – 14.

Perez R. G., Hastings T. G. Could a loss of alpha-synuclein function put dopaminergic neurons at risk? // *J. Neurochem.* 2004. № 89 (6). P. 1318 – 1324.

Perrin R. J., Woods W. S., Clayton D. F. et al. Interaction of Human α -Synuclein and Parkinson's Disease Variants with Phospholipids // *J. Biol. Chem.* 2000. № 275 (44). P. 34393 – 34398.

Phelps C. B., Brand A. H. Ectopic Gene Expression in *Drosophila* using GAL4 System // *Methods*. 1998. № 14 (4). P. 367 – 379.

Pieri L., Madiona K., Bousset L. et al. Fibrillar α -Synuclein and Huntingtin Exon 1 Assemblies Are Toxic to the Cells // *Biophys. J.* 2012. № 102 (12). P. 2894 – 2905.

Pirkevi C., Lesage S., Brice A. et al. From Genes to Proteins in Mendelian Parkinson's Disease: An Overview // *Anat. Rec. Adv. Integr. Anat. Evol. Biol.* 2009. № 292 (12). P. 1893 – 1901.

Polymeropoulos M. H. Mutation in the α -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease // *Science*. 1997. № 276 (5321). P. 2045 – 2047.

Postuma R. B., Gagnon J. F., Montplaisir J. Clinical prediction of Parkinson's disease: planning for the age of neuroprotection // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 2010. № 81 (9). P. 1008-1013.

Pramipexole marketed for Parkinson's disease // *Am. J. Health. Syst. Pharm.* 1997. № 54 (17). P. 1922.

Pranke I. M., Morello V., Bigay J. et al. α -Synuclein and ALPS motifs are membrane curvature sensors whose contrasting chemistry mediates selective vesicle binding // *J. Cell Biol.* 2011. № 194 (1). P. 89 – 103.

Pringsheim T., Jette N., Frolkis A., Steeves T. D. L. The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis: PD PREVALENCE // *Mov. Disord.* 2014. № 29 (13). P. 1583 – 1590.

Pujols J., Peña-Díaz S., Lázaro D. F. et al. Small molecule inhibits α -synuclein aggregation, disrupts amyloid fibrils, and prevents degeneration of dopaminergic neurons // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2018. № 115 (41). P. 10481 – 10486.

Qing H., Wong W., McGeer E. G. et al. Lrrk2 phosphorylates alpha synuclein at serine 129: Parkinson disease implications // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009. № 387 (1). P. 149 – 152.

Recchia A., Debetto P., Negro A. et al. α - Synuclein and Parkinson's disease // *FASEB J.* 2004. № 18 (6). P. 617 – 626.

Reczek D., Schwake M., Schroder J. et al. LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase // *Cell.* 2007. № 131 (4). P. 770– 783.

Reuter J. E., Nardine T. M., Penton A. et al. A mosaic genetic screen for genes necessary for *Drosophila* mushroom body neuronal morphogenesis // *Development.* 2003. № 130 (6). P. 1203 – 1213.

Riemensperger T., Issa A-R., Pech U. et al. A Single Dopamine Pathway Underlies Progressive Locomotor Deficits in a *Drosophila* Model of Parkinson Disease // *Cell Rep.* 2013. № 5 (4). P. 952 – 960.

Robak L. A., Jansen I. E., van Rooij J. et al. Excessive burden of lysosomal storage disorder gene variants in Parkinson's disease // *Brain*. 2017. № 140 (12). P. 3191 – 3203.

Ron I., Horowitz M. ER retention and degradation as the molecular basis underlying Gaucher disease heterogeneity // *Hum. Mol. Genet.* 2005. № 14 (16). P. 2387 – 2398.

Ropinirole approved for Parkinson's disease // *Am. J. Health. Syst. Pharm.* 1997. № 54 (23). P. 2655.

Röttgen G., Wagner T., Hinz U. A genetic screen for elements of the network that regulates neurogenesis in *Drosophila* // *Mol. Gen. Genet. MGG*. 1998. № 257 (4). P. 442 – 451.

Roy B., Jackson G. R. Interactions between Tau and α -synuclein augment neurotoxicity in a *Drosophila* model of Parkinson's disease // *Hum. Mol. Genet.* 2014. № 23 (11). P. 3008 – 3023.

Ruiz-Cañada C., Budnik V. Introduction on the use of the *Drosophila* embryonic/larval neuromuscular junction as a model system to study synapse development and function, and a brief summary of pathfinding and target recognition // *Int. Rev. Neurobiol.* 2006. № 75. P. 1 – 31.

Schapira A. H. V. Glucocerebrosidase and Parkinson disease: Recent advances // *Mol. Cell Neurosci.* 2015. № 66. P. 37 – 42.

Schapira A. H. V., Gegg M. E. Glucocerebrosidase in the pathogenesis and treatment of Parkinson disease // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2013. № 110 (9). P. 3214 – 3215.

Schell H., Hasegawa T., Neumann M. et al. Nuclear and neuritic distribution of serine-129 phosphorylated α -synuclein in transgenic mice // *Neuroscience*. 2009. № 160 (4). P. 796 – 804.

Schuvalova P., Ryabova E., Golomidov I. et al. Overexpression of human SNCA gene in *Drosophila* motor neurons causes morphological and functional abnormalities in

larval neuromuscular junction // *Visnyk of L'viv Univ. Biology Series*. 2014. № 66. P. 105 – 111.

Schwarz T. L. Transmitter Release at the Neuromuscular Junction // *International Review of Neurobiology*. 2006. № 75. P. 105 – 144.

Sedov V.P., Szhogina A.A. «Method of Producing Highly Water-Soluble Fullerenols» Patent. RU20140113248. 2014.04.04.

Sen A., Yokokura T., Kankel M. W. et al. Modeling spinal muscular atrophy in *Drosophila* links *Smn* to FGF signaling // *J. Cell Biol.* 2011. № 192 (3). P. 481 – 495.

Senkevich K. A., Kopytova A. E., Usenko T. S. et al. Parkinson's Disease Associated with GBA Gene Mutations: Molecular Aspects and Potential Treatment Approaches // *Acta Naturae*. 2021. № 13 (2). P. 70 – 78.

Settembre C., Di Malta C., Polito V. A. et al. TFEB Links Autophagy to Lysosomal Biogenesis // *Science*. 2011. № 332 (6036). P. 1429 – 1433.

Sevcsik E., Trexler A. J., Dunn J. M. et al. Allostery in a Disordered Protein: Oxidative Modifications to α -Synuclein Act Distally To Regulate Membrane Binding // *J. Am. Chem. Soc.* 2011. № 133 (18). P. 7152 – 7158.

Sharma M., Burre J., Südhof T. C. CSP α promotes SNARE-complex assembly by chaperoning SNAP-25 during synaptic activity // *Nat. Cell Biol.* 2011. № 13 (1). P. 30 – 39.

Shukla A. K., Ratnasekhar Ch., Pragya P. et al. Metabolomic Analysis Provides Insights on Paraquat-Induced Parkinson-Like Symptoms in *Drosophila melanogaster* // *Mol. Neurobiol.* 2016. № 53 (1). P. 254 – 269.

Siddiqui A., Chinta S. J., Mallajosyula J. K. et al. Selective binding of nuclear α -synuclein to the PGC1 α promoter under conditions of oxidative stress may contribute to losses in mitochondrial function: Implications for Parkinson's disease // *Free Radic. Biol. Med.* 2012. № 53 (4). P. 993 – 1003.

Sidhu A., Wersinger C., Vernier P. α -Synuclein regulation of the dopaminergic transporter: a possible role in the pathogenesis of Parkinson's disease // FEBS Lett. 2004. № 565 (1-3). P. 1 – 5.

Sidransky E. Gaucher disease and parkinsonism // Mol. Genet. Metab. 2005. № 84 (4). P. 302 – 304.

Sidransky E., Lopez G. The link between the GBA gene and parkinsonism // Lancet Neurol. 2012. № 11 (11). P. 986 – 998.

Sidransky E., Nalls M. A., Aasly J. O. et al. Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease // N. Engl. J. Med. 2009. № 361 (17). P. 1651– 1661.

Simunovic F., Yi M., Wang Y. et al. Gene expression profiling of substantia nigra dopamine neurons: further insights into Parkinson's disease pathology // Brain. 2009. № 132 (7). P. 1795 – 1809.

Singleton A. B. α -Synuclein Locus Triplication Causes Parkinson's Disease // Science. 2003. № 302 (5646). P. 841 – 841.

Smith W. W. α -Synuclein Phosphorylation Enhances Eosinophilic Cytoplasmic Inclusion Formation in SH-SY5Y Cells // J. Neurosci. 2005. № 25 (23). P. 5544 – 5552.

Snow B. J., Rolfe F. L., Lockhart M. M. et al. A double-blind, placebo-controlled study to assess the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ as a disease-modifying therapy in Parkinson's disease // Mov. Disord. 2010. № 25 (11). P. 1670 – 1674.

Song L., He Y., Ou J. et al. Auxilin underlies progressive locomotor deficits and dopaminergic neuron loss in a drosophila model of Parkinson's disease // Cell Reports. 2017. № 18 (5). P. 1132–1143.

Spillantini M. G., Crowther R. A., Jakes R. et al. Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies // Proc. Natl. Acad. Sci. 1998. № 95 (11). P. 6469 – 6473.

Spillantini M. G., Schmidt M. L., Lee V. M-Y., et al. α -Synuclein in Lewy bodies // Nature. 1997. № 388 (6645). P. 839 – 840.

Strack S., Westphal R. S., Colbran R. J. et al. Protein serine/threonine phosphatase 1 and 2A associate with and dephosphorylate neurofilaments // Mol. Brain Res. 1997. № 49 (1-2). P. 15 – 28.

Strausfeld N. J., Hirth F. Homology versus Convergence in Resolving Transphyletic Correspondences of Brain Organization // Brain Behav. Evol. 2013. № 82 (4). P. 215 – 219.

Südhof T. C. The synaptic vesicle cycle // Annu. Rev. Neurosci. 2004. № 27 (1). P. 509 – 547.

Sugeno N., Takeda A., Hasegawa T. et al. Serine 129 Phosphorylation of α -Synuclein Induces Unfolded Protein Response-mediated Cell Death // J. Biol. Chem. 2008. № 283 (34). P. 23179 – 23188.

Sun M., Xie W. Cell adhesion molecules in Drosophila synapse development and function // Sci. China Life Sci. 2012. № 55 (1). P. 20 – 26.

Sun Y., Kakinen A., Zhang C. et al. Amphiphilic surface chemistry of fullerenols is necessary for inhibiting the amyloid aggregation of alpha-synuclein NACore // Nanoscale. 2019. № 11 (24). P. 11933 – 11945.

Suzuki T., Shimoda M., Ito K. et al. Expression of Human Gaucher Disease Gene GBA Generates Neurodevelopmental Defects and ER Stress in Drosophila Eye // PLoS ONE. 2013. № 8 (8). e69147.

Takahashi T., Yamashita H., Nakamura T. et al. Tyrosine 125 of α -synuclein plays a critical role for dimerization following oxidative stress // Brain Res. 2002. № 938 (1-2). P. 73 – 80.

Talati R., Baker W. L., Patel A. A. et al. Adding a dopamine agonist to preexisting levodopa therapy vs. levodopa therapy alone in advanced Parkinson's disease: a meta analysis // *Int. J. Clin. Pract.* 2009. № 63 (4). P. 613 – 623.

Tamargo R. J., Velayati A., Goldin E., Sidransky E. The role of saposin C in Gaucher disease // *Mol. Genet. Metab.* 2012. № 106 (3). P. 257 – 263.

Tompkins M. M., Hill W. D. Contribution of somal Lewy bodies to neuronal death // *Brain Res.* 1997. № 775 (1-2). P. 24-29.

Torroja L., Packard M., Gorczyca M. et al. The *Drosophila* β -Amyloid Precursor Protein Homolog Promotes Synapse Differentiation at the Neuromuscular Junction // *J Neurosci.* 1999. № 19 (18). P. 7793 – 7803.

Trajković S., Dobrić S., Jaćević V. et al. Tissue-protective effects of fullereneol C₆₀(OH)₂₄ and amifostine in irradiated rats // *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* 2007. № 58 (1). P. 39 – 43.

Trindade de Paula M., Poetini Silva M. R. High-fat diet induces oxidative stress and MPK2 and HSP83 gene expression in *Drosophila melanogaster*// *Oxidative medicine and cellular longevity.* 2016. № 26. P. 161 – 182.

Trinh K., Moore K., Wes P.D. et al. Induction of the phase II detoxification pathway suppresses neuron loss in *Drosophila* models of Parkinson's disease // *The Journal of Neuroscience.* 2008. № 28 (2). P. 465–472.

Turcano P., Mielke M. M., Bower J. H. et al. Levodopa-induced dyskinesia in Parkinson disease: A population-based cohort study // *Neurology.* 2018. № 91 (24). P. 2238 – 2243.

Uéda K., Fukushima H., Masliah E. et al. Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993. № 90 (23). P. 11282 – 11286.

- Uversky V. N., Cooper E. M., Bower K. S. et al. Accelerated alpha-synuclein fibrillation in crowded milieu // FEBS Lett. 2002. № 515 (1-3). P. 99 – 103.
- Uversky V. N., Lee H-J., Li J. et al. Stabilization of Partially Folded Conformation during α -Synuclein Oligomerization in Both Purified and Cytosolic Preparations // J. Biol. Chem. 2001a. № 276 (47). P. 43495 – 43498.
- Uversky V. N., Li J., Fink A. L. Evidence for a Partially Folded Intermediate in α -Synuclein Fibril Formation // J. Biol. Chem. 2001b. № 276 (14). P. 10737 – 10744.
- Verbaan D., Marinus J., Visser M. et al. Cognitive impairment in Parkinson's disease // J. Neurol. Neurosurg. Amp. Psychiatry. 2007. № 78 (11). P. 1182 – 1187.
- Verstreken P., Koh T-W., Schulze K. L. et al. Synaptojanin Is Recruited by Endophilin to Promote Synaptic Vesicle Uncoating // Neuron. 2003. № 40 (4). P. 733 – 748.
- Videnovic A., Golombek D. Circadian and sleep disorders in Parkinson's disease // Exp. Neurol. 2013. № 243. P. 45 – 56.
- Vingerhoets F. J. G., Schulzer M., Calne D. B. et al. Which clinical sign of Parkinson's disease best reflects nigrostriatal lesion? // Ann. Neurol. 1997. № 41. P. 58 – 64.
- Wagner J., Ryazanov S., Leonov A. et al. Anle138b: a novel oligomer modulator for disease-modifying therapy of neurodegenerative diseases such as prion and Parkinson's disease // Acta Neuropathol. (Berl). 2013. № 125 (6). P. 795 – 813.
- Wakamatsu M., Ishii A., Ukai Y. et al. Accumulation of phosphorylated α -synuclein in dopaminergic neurons of transgenic mice that express human α -synuclein // J. Neurosci. Res. 2007. № 85 (8). P. 1819 – 1825.
- Wang B., Su C-J., Liu T-T. et al. The Neuroprotection of Low-Dose Morphine in Cellular and Animal Models of Parkinson's Disease Through Ameliorating Endoplasmic Reticulum (ER) Stress and Activating Autophagy // Front. Mol. Neurosci. 2018. № 11. P. 120.

Wang D., Tang B., Zhao G. et al. Dispensable role of *Drosophila* ortholog of LRRK2 kinase activity in survival of dopaminergic neurons // *Mol. Neurodegener.* 2008. № 3 (1). P. 3.

Wang L., Das U., Scott D. A. et al. α -Synuclein Multimers Cluster Synaptic Vesicles and Attenuate Recycling // *Curr. Biol.* 2014. № 24 (19). P. 2319 – 2326.

Wang T., Hay J. C. Alpha-synuclein Toxicity in the Early Secretory Pathway: How It Drives Neurodegeneration in Parkinsons Disease // *Front Neurosci.* 2015. № 9. P. 433.

West R. J., Furmston R., Williams C. A. et al. Neurophysiology of *Drosophila* models of Parkinson's disease // *Parkinsons Dis.* 2015. № 2015. P. 381281.

White K. E., Humphrey D. M., Hirth F. The dopaminergic system in the aging brain of *Drosophila* // *Frontiers in Neuroscience.* 2010. № 4 (205). P. 205.

Whitworth A. J. *Drosophila* Models of Parkinson's Disease // *Advances in Genetics.* 2011. № 73. P. 1 – 50.

Whitworth A. J., Theodore D. A., Greene J. C. et al. Increased glutathione S-transferase activity rescues dopaminergic neuron loss in a *Drosophila* model of Parkinson's disease // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005. № 102 (22). P. 8024 – 8029.

Whitworth A. J., Wes P. D., Pallanck L. J. *Drosophila* models pioneer a new approach to drug discovery for Parkinson's disease // *Drug Discov. Today.* 2006. № 11 (3-4). P. 119 – 126.

Whone A. L., Watts R. L., Stoessl A. J. et al. Slower progression of Parkinson's disease with ropinirole versus levodopa: The REAL-PET study // *Ann. Neurol.* 2003. № 54. P. 93 – 101.

Winslow A. R., Chen C. W., Corrochano S. et al. α -Synuclein impairs macroautophagy: implications for Parkinson's disease // *J. Cell Biol.* 2010. № 190 (6). P. 1023 – 1037.

Wu J., Lou H., Alerte T. N. M. et al. Lewy-like aggregation of α -synuclein reduces protein phosphatase 2A activity in vitro and in vivo // *Neuroscience*. 2012. № 207. P. 288 – 297.

Xie L., Luo Y., Lin D. et al. The molecular mechanism of fullerene-inhibited aggregation of Alzheimer's β -amyloid peptide fragment // *Nanoscale*. 2014. № 6 (16). P. 9752 – 9762.

Yamakoshi Y., Umezawa N., Ryu A. et al. Active oxygen species generated from photoexcited fullerene (C60) as potential medicines: O₂-* versus 1O₂ // *J. Am. Chem. Soc.* 2003. № 125 (42). P. 12803 – 12809.

Yang Y., Gehrke S., Imai Y. et al. Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of *Drosophila* Pink1 is rescued by Parkin // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006. № 103 (28). P. 10793 – 10798.

Yang Y., Nishimura I., Imai Y. et al. Parkin Suppresses Dopaminergic Neuron-Selective Neurotoxicity Induced by Pael-R in *Drosophila* // *Neuron*. 2003. № 37 (6). P. 911 – 924.

Ysselstein D., Shulman J. M., Krainc D. Emerging links between pediatric lysosomal storage diseases and adult parkinsonism // *Mov. Disord.* 2019. № 34 (5). P. 614 – 624.

Zaichick S. V., McGrath K. M., Caraveo G. The role of Ca²⁺ signaling in Parkinson's disease // *Dis. Model. Mech.* 2017. № 10 (5). P. 519 – 535.

Zhang L. I., Poo M. M. Electrical activity and development of neural circuits // *Nat. Neurosci.* 2001. № 4. P. 1207 – 1214.

Zhang Y. Q., Rodesch C. K., Brodie K. Living synaptic vesicle marker: Synaptotagmin-GFP // *Genesis*. 2002. № 34 (1-2). P. 142 – 145.

Zhou J., Li X. Y., Liu Y. J. et al. Full-coverage regulations of autophagy by ROS: from induction to maturation // *Autophagy*. 2021. № 18 (6). P. 1240 – 1255.

Zhou R. M., Huang Y. X., Li X. L. et al. Molecular interaction of α -synuclein with tubulin influences on the polymerization of microtubule in vitro and structure of microtubule in cells // Mol. Biol. Rep. 2010. № 37 (7). P. 3183 – 3192.