

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
ОРЛОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.С. ТУРГЕНЕВА

На правах рукописи

Федулина Анастасия Алексеевна

**Роль синуклеинов в митохондриальном метаболизме, окислительно-
восстановительном балансе и кальциевой сигнализации клеток головного
мозга**

1.5.2. Биофизика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

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

Орел – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	15
1.1 Белки семейства синуклеинов	15
1.1.1 Структурная организация и конформационные свойства α -, β - и γ -синуклеинов	15
1.1.2 Распределение синуклеинов в тканях организма и субклеточная локализация.....	19
1.1.3 Физиологические функции синуклеинов: участие в везикулярном транспорте и синаптической передаче.....	21
1.1.4 Взаимодействие синуклеинов с липидными мембранами	22
1.1.5 Роль синуклеинов в метаболизме дофамина и дофаминергической сигнализации.....	24
1.2 Роль синуклеинов в патологии нервной системы	26
1.3 Окислительно-восстановительная сигнализация в клетках мозга. Основные ферменты, производящие АФК в клетке.....	28
1.3.1 Понятие активных форм кислорода и их физиологическая роль в клеточной сигнализации.....	28
1.3.2 НАДФН-оксидаза: структура, изоформы, механизм активации	29
1.3.3 Ксантинооксидаза: связь с пуриновым метаболизмом	31
1.3.4 Моноаминоксидаза: изоформы А и В, различия и функции	31
1.3.5 Продукция АФК в митохондриях	32
1.3.6 Система эндогенной антиоксидантной защиты клеток мозга.....	34
1.3.7 Перекисное окисление липидов	36
1.3.8 Редокс-сигнализация и окислительный стресс	38
1.4 Энергетический метаболизм мозга	40
1.4.1 Структурная организация митохондрий.....	40
1.4.2 Митохондриальное дыхание и окислительное фосфорилирование	41

1.4.3 Особенности энергетического метаболизма в различных типах клеток мозга.....	43
1.4.4 Роль митохондриальной дисфункции в патологии мозга.....	44
1.5 Кальциевая сигнализация.....	45
1.5.1 Общие принципы кальциевой сигнализации в нейронах и астроцитах.....	45
1.5.2 Основные кальциевые каналы	46
1.5.3 Митохондриальный кальциевый транспорт	46
1.5.4 Взаимосвязь кальциевого сигнала, продукции АФК и энергетического метаболизма	47
1.5.5 Митохондриальная мегалопора и клеточная гибель.....	48
1.6 Передача сигнала в клетках мозга.....	49
1.6.1 Глутаматергическая передача сигнала	49
1.6.2 Дофаминергическая передача сигнала	51
1.6.3 Патологии, сопровождающиеся нарушениями баланса нейромедиаторов	53
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	55
2.1 Используемые реактивы и оборудование.....	55
2.2 Объекты исследования	55
2.2.1 Линии используемых животных.....	55
2.2.2 Приготовление переживающих срезов головного мозга	56
2.2.3 Получение первичной нейрон-глиальной культуры	57
2.2.4 Получение суспензии изолированных митохондрий мозга	58
2.3 Исследование энергетического метаболизма.....	59
2.3.1 Измерение митохондриального мембранного потенциала	59
2.3.2 Измерение уровня НАД(Ф)Н	60
2.3.3 Измерение относительного уровня АТФ и скорости потребления АТФ	61
2.4 Исследование продукции активных форм кислорода.....	62

2.4.1 Измерение продукции АФК в митохондриях	62
2.4.2 Измерение цитозольных АФК, преимущественно супероксид-аниона.....	63
2.4.3 Оценка уровня восстановленного глутатиона	64
2.5 Оценка внутриклеточной концентрации кальция	65
2.6 Оценка скорости перекисного окисления липидов	66
2.7 Оценка транспорта ионов Ca^{2+} в изолированных митохондриях	67
2.8 Обработка цифровых изображений	67
2.9 Статистическая обработка данных.....	68
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	69
3.1 Изменение энергетического метаболизма в клетках мозга при отсутствии синуклеинов	69
3.1.1 Митохондриальный мембранный потенциал при отсутствии синуклеинов	69
3.1.2 Уровень НАД(Ф)Н при отсутствии синуклеинов.....	72
3.1.3 Пул АТФ и скорость его потребления при отсутствии синуклеинов ..	74
3.1.4 Транспорт кальция в изолированных митохондриях мозга при отсутствии синуклеинов	76
3.2 Базовый уровень продукции АФК в отсутствие синуклеинов.....	77
3.3 Митохондриальная продукция АФК в отсутствие синуклеинов.....	79
3.4 Изменение вклада ксантиноксидазы в генерацию АФК в отсутствие синуклеинов	80
3.5 МАО-зависимая и дофамин-индуцированная продукция АФК	82
3.5.1 МАО-зависимое образование АФК при отсутствии синуклеинов	82
3.5.2 Влияние дофамина на редокс-сигнализацию при отсутствии синуклеинов	84
3.6 Продукция АФК в НАДФН-оксидазе при отсутствии синуклеинов.....	86
3.7 Уровень восстановленного глутатиона при отсутствии синуклеинов	87
3.8 Перекисное окисление липидов в отсутствие синуклеинов.....	90

3.9 Кальциевая сигнализация в отсутствие синуклеинов	92
3.9.1 Базовый уровень цитозольного кальция в отсутствие синуклеинов	92
3.9.2 Дофамин-индуцированный кальциевый сигнал в нейронах в отсутствие синуклеинов	93
3.9.3 Влияние отсутствия синуклеинов на глутамат-индуцированный кальциевый сигнал в нейронах	95
3.9.4 Дофаминовая модуляция глутамат-индуцированного кальциевого сигнала при отсутствии синуклеинов	96
3.9.5 Дофамин-индуцированный кальциевый сигнал в астроцитах в отсутствие синуклеинов	98
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	100
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	110
ВЫВОДЫ.....	113
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	115
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	118
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....	144
ПРИЛОЖЕНИЕ А	146

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования.

Синуклеинопатии – группа заболеваний, в патогенезе которых лежит неправильное сворачивание белков семейства синуклеинов. Их олигомерные агрегаты обладают токсическими свойствами и провоцируют гибель нейронов путем активации различных патологических механизмов (Villar-Piqué et al., 2016). Классическими синуклеинопатиями являются болезнь Паркинсона (БП), деменция с тельцами Леви (ДТЛ) и множественная системная атрофия (МСА) (Khedmatgozar et al., 2024; Meade et al., 2019; Peters et al., 2015). Тельца Леви, основу которых составляет агрегированный α -синуклеин, являются гистопатологической характеристикой БП, которая приводит к гибели дофаминергических нейронов и дефициту дофамина (Khedmatgozar et al., 2024; Meade et al., 2019; Vekrellis et al., 2024). Помимо этого, агрегированные формы синуклеинов обнаружены в ряде других заболеваний, не относящихся к синуклеинопатиям, таких как болезнь Альцгеймера (БА) (Oeckl et al., 2016), эпилепсия (Salem et al., 2025), боковой амиотрофический склероз (БАС) (Peters et al., 2015). Распространенность БП, ДТЛ и МСА и тяжесть их неврологического исхода определяют клиническую и социальную значимость синуклеинопатий и обуславливают необходимость изучения молекулярных основ физиологического функционирования белков семейства синуклеинов.

При запуске патологических процессов, ведущих к агрегации синуклеина, уменьшается количество мономерного синуклеина. Поэтому патологические процессы связывают как с токсическим действием олигомерного синуклеина, так и с возможной потерей функций нормальных мономерных форм (Kim et al., 2021). Оценить этот вклад можно, установив, какие клеточные процессы в норме зависят от эндогенных α -, β - и γ -синуклеинов.

Патогенез БП, ДТЛ и МСА включает митохондриальную дисфункцию, окислительный стресс и нарушение кальциевого гомеостаза нейронов и глии (Angelova et al., 2023; Cascella et al., 2021; Ludtmann et al., 2018). Митохондрии

обеспечивают основную часть АТФ-зависимых процессов в клетках мозга (Ludtmann et al., 2016). Согласно современной концепции редокс-биологии, низкий уровень продукции активных форм кислорода (АФК) выполняет сигнальную функцию, а избыток АФК вызывает окислительный стресс (Ahmed Selim & Wojtovich, 2025; Angelova et al., 2023). Астроциты – глиальные клетки мозга, являются активными регуляторами синаптической передачи, а их кальциевый ответ является основной характеристикой их функциональности (Bai et al., 2024). Ионы кальция являются ключевым вторичным посредником, связывающим синаптическую передачу с энергетическим и редокс-метаболизмом клеток мозга (Ahmed Selim & Wojtovich, 2025; Walkon et al., 2022; Zamponi et al., 2015). Оценка вклада эндогенных α -, β - и γ -синуклеинов в эти процессы позволит выяснить, участвует ли утрата функций мономерных форм в патогенезе синуклеинопатий.

Степень разработанности темы исследования.

Большая часть исследований сосредоточена на патологических свойствах агрегированных синуклеинов (Cascella et al., 2021; Ludtmann et al., 2018), тогда как вклад α -, β - и γ -синуклеинов в нормальные функции мозга описан заметно слабее. Наиболее изучено взаимодействие синуклеинов с липидными мембранами, необходимое для их участия в везикулярном транспорте и синаптической передаче, включая сборку SNARE-комплекса и поддержание резервного пула везикул (Burré et al., 2010; Greten-Harrison et al., 2010; Ramalingam & Dettmer, 2021). Однако физиологическая роль синуклеинов не ограничивается синапсами, в ряде исследований продемонстрировано их неравномерное распределение в клетке и различное воздействие на митохондрии, лизосомы, ядра и даже модуляцию комплексов процессинга (Р-тел) и стабильности мРНК в цитозоле (Hallaceli et al., 2022; Ludtmann et al., 2016). При отсутствии всех трех синуклеинов у мышей с тройным нокаутом развиваются возрастная нейрональная дисфункция, нигростриатальные изменения (Anwar et al., 2011) и возрастное снижение двигательной активности (Connor-Robson et al., 2016).

Влияние эндогенных синуклеинов на функцию митохондрий, поддержание мембранного потенциала, транспорт ионов кальция и синтез АТФ, показано

преимущественно для α -синуклеина. Мономерный α -синуклеин способен связываться с α -субъединицей АТФ-синтазы и повышает ее каталитическую эффективность (Ludtmann et al., 2016). Вклад β - и γ -синуклеина в поддержание $\Delta\psi_m$, работу АТФ-синтазы и митохондриальный транспорт ионов Ca^{2+} в литературе не описан.

Редокс-гомеостаз описан в большей части для олигомерной формы α -синуклеина. Изучено его влияние на перекисное окисление липидов, Ca^{2+} -зависимую нейротоксичность и открытие митохондриальной поры (Angelova et al., 2015; Ludtmann et al., 2018). Известно, что мономерный α -синуклеин влияет на продукцию АФК через активацию НАДФН-оксидазы и МАО при метаболизме дофамина (Connor-Robson et al., 2016), однако вклад других синуклеинов в митохондриальную, дофамин- и МАО-зависимую продукцию АФК не охарактеризован.

Влияние мономерных синуклеинов на кальциевую сигнализацию и на модуляцию индуцируемых глутаматом и дофамином сигналов в нейронах и астроцитах остается малоизученным. Показано участие α -синуклеина в высвобождении глутамата (Gureviciene et al., 2007), а МАО-зависимый кальциевый ответ астроцитов на дофамин описан без привязки к изоформам синуклеинов (Vaarmann et al., 2010). Роль синуклеинов в других типах клеток, кроме дофаминергических нейронов, в частности, в астроцитах, и их взаимная компенсаторная активность до сих пор не была систематически охарактеризована в рамках одной экспериментальной модели.

Комплексное изучение физиологической роли синуклеинов требует биофизических методов регистрации митохондриального потенциала, редокс-состояния и кальциевой динамики в генетически модифицированных моделях с отсутствием отдельных синуклеинов, что позволит оценить связь между молекулярными нарушениями и перестройкой клеточных процессов. Совокупность этих нерешенных вопросов обосновывает цель настоящей диссертации, направленной на характеристику вклада различных изоформ синуклеинов во взаимосвязанные пути энергетического метаболизма,

окислительно-восстановительной сигнализации, кальциевого гомеостаза и нейромедиаторной сигнализации.

Цель исследования: выяснить вклад мономерных форм α -, β - и γ -синуклеинов в поддержание энергетического митохондриального метаболизма, окислительно-восстановительного баланса и кальциевой сигнализации клеток головного мозга.

Основные задачи исследования:

1. Оценить роль синуклеинов в энергетическом метаболизме клеток мозга по митохондриальному потенциалу, уровню НАД(Ф)Н и энергетической емкости клеток.
2. Определить участие синуклеинов в митохондриальном транспорте ионов кальция по потенциал-зависимому захвату ионов Ca^{2+} , оттоку ионов Ca^{2+} и кальциевой емкости митохондрий.
3. Исследовать участие синуклеинов в поддержании окислительно-восстановительного баланса клеток головного мозга по продукции супероксид-аниона в цитозоле и митохондриях, производству АФК ферментами МАО, КСО и НАДФН-оксидазой, перекисному окислению липидов и уровню восстановленного глутатиона.
4. Установить роль синуклеинов в глутамат- и дофамин-индуцированной кальциевой сигнализации нейронов по амплитуде кальциевых ответов.
5. Определить роль синуклеинов в дофамин-индуцированной кальциевой сигнализации астроцитов по амплитуде кальциевого ответа.

Научная новизна работы.

Снижение митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\psi_m$) при нокауте гена α -синуклеина подтверждает роль мономерного белка в работе АТФ-синтазы (Ludtmann et al., 2016). Впервые показано, что отсутствие β -синуклеина снижает $\Delta\psi_m$ и базовую митохондриальную продукцию АФК и усиливает прирост $\Delta\psi_m$ в ответ на олигомицин. Снижение $\Delta\psi_m$ при тройном нокауте, усиленный ответ на олигомицин и падение редокс-индекса НАДН согласуются с данными Ludtmann et al. (2016).

Впервые показано, что при отсутствии γ -синуклеина снижаются потенциал-зависимый захват ионов Ca^{2+} в митохондриях и кальциевая емкость митохондрий при неизменной скорости оттока ионов Ca^{2+} .

Впервые установлено, что вклад в базовое производство АФК в клетках мозга ксантиноксидазы зависит от присутствия α - и γ -синуклеинов, моноаминоксидазы – от β - и γ -синуклеинов, НАДФН-оксидазы – от α - и β -синуклеинов. Сохранение ингибирующего эффекта селегилина, ингибитора МАО, у дикого типа и при отсутствии α -синуклеина согласуется с данными Kang et al. (2018). Выявлено, что базовая продукция супероксид-аниона в цитозоле снижается при отсутствии α -синуклеина. Это согласуется с данными о регуляции α -синуклеином ферментов-источников АФК (Jia et al., 2021; Kang et al., 2018). Впервые показано, что отсутствие синуклеинов снижает базовую скорость перекисного окисления липидов.

В отличие от данных о везикулярном захвате дофамина (Ninkina et al., 2019) и о роли α -синуклеина в высвобождении глутамата (Gureviciene et al., 2007), изоформ-специфические амплитуды Ca^{2+} -ответов нейронов и астроцитов ранее не сопоставлялись. Впервые показано, что в нейронах дофамин-индуцированный кальциевый сигнал снижен при отсутствии α - и γ -синуклеинов и повышен при отсутствии β -синуклеина. Впервые показано, что подавление дофамином глутамат-индуцированного сигнала блокируется при нокауте γ -синуклеина. Впервые показано повышение амплитуды дофамин-индуцированного кальциевого ответа астроцитов при отсутствии α -синуклеина.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Результаты, полученные в ходе данной работы, позволяют расширить понимание физиологической роли мономерных форм синуклеинов в энергетическом метаболизме митохондрий, окислительно-восстановительной и кальциевой сигнализации клеток головного мозга. Систематизация связей мономерных α -, β - и γ -синуклеинов с этими процессами дает основу для интерпретации той составляющей патогенеза синуклеинопатий, которая связана не с токсичностью агрегатов, а с утратой нормальных функций мономера, что дает

новое понимание механизмов патогенеза нейродегенераций, опосредованных синуклеинопатическими изменениями в мозге.

Выявленная изоформ-специфичная регуляция активности ксантиноксидазы, моноаминоксидазы и НАДФН-оксидазы мономерными синуклеинами позволяет рассматривать эти ферменты как потенциальные мишени для направленной коррекции редокс-баланса при синуклеинопатиях. Установленное участие γ -синуклеина в потенциал-зависимом накоплении ионов Ca^{2+} митохондриями может быть использовано при разработке подходов к защите митохондрий от кальциевой перегрузки. Восполнение пула мономерного α -синуклеина при состояниях, в которых агрегация снижает количество функционального белка, может быть использовано для разработки перспективных терапевтических и нейропротекторных подходов для сохранения нормальных функций митохондрий.

Методология и методы диссертационного исследования.

В данной диссертационной работе выясняется роль мономерных форм всех трех (α , β , γ) синуклеинов в процессах ферментативной активности ксантиноксидазы, моноаминоксидазы и НАДФН-оксидазы, окислительно-восстановительном балансе, кальциевой сигнализации и энергетическом метаболизме клеток головного мозга в рамках одной генетической модели животных с отсутствием синуклеинов в различных комбинациях, созданных на основе линии C57BL/6J с помощью генетических модификаций выключения генов, кодирующих синуклеины. Исследование было выполнено на переживающих срезах головного мозга, первичных нейрон-глиальных культурах и изолированных митохондриях из клеток головного мозга мышей. Исследования проводились с использованием биофизических методов конфокальной и флуоресцентной микроскопии с применением флуоресцентных зондов. Работа выполнена с помощью оборудования лаборатории клеточной физиологии и патологии Научно-технологического центра биомедицинской фотоники Орловского государственного университета имени И.С. Тургенева. Обработку цифровых изображений тканей и нейрон-глиальных культур проводили с помощью программ ZEN Microscopy Software и ImageJ. Для статистического анализа данных

использовались компьютерное программное обеспечение OriginPro (OriginLab Corp., США) и язык программирования Python (библиотека statsmodels).

Положения, выносимые на защиту:

1. α -Синуклеин – позитивный регулятор митохондриальной биоэнергетики нейрональных клеток: внесение экзогенного мономерного белка восстанавливает сниженный мембранный потенциал и энергетическую емкость в клетках с нокаутом α -синуклеина.

2. Нокаут гена γ -синуклеина снижает кальциевую емкость митохондрий и скорость потенциал-зависимого захвата Ca^{2+} при неизменной скорости его оттока.

3. α -, β - и γ -Синуклеины выступают в роли физиологических регуляторов базового окислительного метаболизма, и каждая изоформа модулирует работу определенного набора АФК-генерирующих ферментов: ксантинооксидаза модулируется α - и γ -синуклеинами, НАДФН-оксидаза – α - и β -синуклеинами, моноаминооксидаза – β - и γ -синуклеинами.

4. В нейронах α - и γ -синуклеины выступают в качестве позитивных модуляторов дофамин-индуцированной кальциевой сигнализации, тогда как β -синуклеин выступает в роли негативного модулятора: нокауты генов α - и γ -синуклеинов снижают амплитуду кальциевого ответа, а нокаут гена β -синуклеина ее повышает. γ -Синуклеин выступает в качестве позитивного модулятора глутамат-индуцированной кальциевой сигнализации в нейронах, поскольку нокаут гена γ -синуклеина снижает амплитуду кальциевого ответа.

5. γ -Синуклеин – необходимый компонент дофаминергической модуляции глутаматергического сигнала в нейронах: без него утрачивается способность дофамина подавлять глутамат-индуцированный кальциевый ответ.

6. α -Синуклеин – негативный модулятор дофамин-индуцированного кальциевого сигнала в астроцитах: нокаут гена α -синуклеина повышает амплитуду кальциевого ответа. Базовый уровень внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в астроцитах снижается только в случае тройного нокаута α -, β - и γ -синуклеинов, что указывает на кооперативный вклад изоформ в регуляцию кальциевого гомеостаза в этом типе клеток.

Личный вклад автора.

Автор принимал непосредственное участие во всех этапах выполнения работы: планировании исследования, анализе литературы, проведении экспериментов, анализе результатов, а также статистической обработке полученных данных. Разработка концепции, постановка цели и задач диссертационного исследования, обсуждение и интерпретация результатов, а также подготовка публикаций проведены совместно с научным руководителем. Исследуемые в работе переживающие срезы головного мозга приготовлены непосредственно автором. Отдельные этапы работы (получение первичных нейрон-глиальных культур и выделение изолированных митохондрий, а также флуоресцентные измерения исследуемых объектов с использованием конфокальной и флуоресцентной микроскопии) проводились в лаборатории клеточной физиологии и патологии НТЦ биомедицинской фотоники ФГБОУ ВО «ОГУ имени И.С. Тургенева» совместно с сотрудниками лаборатории.

Работа выполнена в рамках проекта «Механизм нейродегенерации: древняя молекула как необходимый элемент физиологии и патологии клеток мозга» (грант в форме субсидии в целях реализации научных проектов под руководством ведущего ученого, привлекаемых в образовательные организации высшего образования и научные организации Российской Федерации, Соглашение № 075-15-2025-011 от 27.02.2025).

Достоверность полученных результатов.

Работа проведена с помощью современных методов исследования, приборов, реактивов и программного обеспечения, которые соответствуют поставленным целям и задачам. Все полученные результаты имеют статистическую значимость и являются воспроизводимыми. Научные положения и выводы обоснованы, достоверны и напрямую вытекают из экспериментальных данных, полученных автором.

Апробация работы.

Материалы диссертационного исследования были представлены на международных и всероссийских конференциях: Всероссийской конференции с

международным участием «Нейрокампус Байкал 2025» (Пос. Большие Коты, оз. Байкал, 29 июня – 04 июля 2025 года); Международной конференции «Volga Neuroscience Meeting 2025» (Нижегородская обл., г. Дзержинск, п. Желнино, 25–29 августа 2025 года); Всероссийской конференции «Прогресс в биомедицине: от исследований до клинической практики (OrelBioMed)» (г. Орел, 11–13 сентября 2025 года).

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых научных журналах, индексируемых в международных базах данных WoS/Scopus и рекомендованных ВАК, а также 3 тезиса в сборниках материалов всероссийских и международных конференций.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Белки семейства синуклеинов

1.1.1 Структурная организация и конформационные свойства α -, β - и γ -синуклеинов

Семейство синуклеинов объединяет небольшие мономерные белки, преимущественно экспрессируемые в нервной ткани и участвующие в синаптической передаче и регуляции нейромедиаторов. Известно три вида синуклеинов: α -синуклеин (кодируемый геном SNCA), β -синуклеин (кодируемый геном SNCB) и γ -синуклеин (кодируемый геном SNCG), каждый из которых обладает значительной гомологией последовательностей в своих N-концевых доменах, но при этом демонстрирует различные структурные особенности и функциональные свойства (Lavedan, 1998). Роль этих белков в патогенезе нейродегенеративных заболеваний, прежде всего болезни Паркинсона, изучена значительно полнее, чем их физиологические функции в норме (Sulzer & Edwards, 2019).

Первый представитель семейства синуклеинов был идентифицирован в 1988 году Марото, Кампанелли и Шеллером, которые выделили нейрон-специфический белок, локализованный в пресинаптическом нервном окончании и ядерной оболочке (Maroteaux et al., 1988). Белок был назван «синуклеином» из-за его двойной локализации в синапсе и ядре, хотя ядерная локализация позже была объяснена перекрестной реактивностью антител. У человека впервые был идентифицирован домен α -синуклеина NAC как предшественник неамилоидного компонента «non-A β component» амилоидных бляшек при болезни Альцгеймера (БА) (Ueda et al., 1993). Комплексный анализ семейства синуклеинов, включая филогенетические связи и организацию генома, был представлен Лаведаном (Lavedan, 1998).

α -синуклеин – это белок, состоящий из 140 аминокислот, с молекулярной массой приблизительно 14 кДа, который относится к классу внутренне неупорядоченных белков. Его первичная последовательность организована в три

функционально различных домена (рис. 1). N-концевой регион (остатки 1-60) содержит четыре-пять из семи неполных повторов консенсусного мотива KTKEGV, которые образуют амфипатические альфа-спирали при взаимодействии с липидными мембранами. Этот домен является наиболее консервативным среди всех трех членов семейства синуклеинов и необходим для связывания с мембраной. Центральный гидрофобный домен, называемый неамилоидным компонентом (NAC, остатки 61-95), определяет склонность белка к агрегации в амилоидные фибриллы и связан с патологическими свойствами синуклеина. С-концевой хвост (остатки 96-140), обогащенный остатками глутамата и аспартата, остается в значительной степени неструктурированным и участвует в белок-белковых взаимодействиях, шапероноподобной активности и связывании ионов кальция. Соотношение длины и аминокислотного состава N-концевого, NAC- и С-концевого доменов определяет конформационные свойства синуклеинов. Смещение этого баланса в сторону агрегации NAC-домена коррелирует с переходом от физиологических мембраносвязанных форм к патологическим конформациям (Villar-Piqué et al., 2016). Накопленные за десятилетия данные о структурной организации этих белков позднее были сведены в единую схему, связывающую конформационное состояние α -синуклеина с патогенезом БП (Meade et al., 2019).

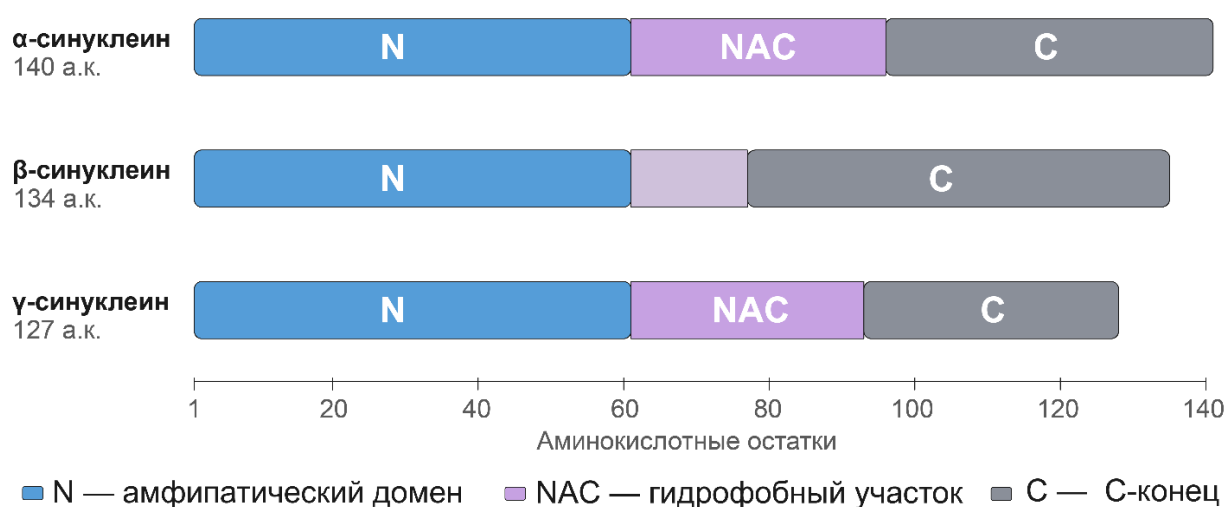


Рисунок 1 – Сравнительная доменная организация α -, β - и γ -синуклеинов. Адаптировано по (Goedert, Spillantini, 2012).

В своей мономерной форме в водном растворе α -синуклеин является внутренне неупорядоченным белком, не имея стабильной вторичной или третичной структуры. Благодаря внутренней неупорядоченности белок свободно взаимодействует с другими молекулами и принимает различные конформации. При взаимодействии с липидными мембранами, содержащими анионные фосфолипиды, N-концевой и NAC-регионы претерпевают конформационный переход в амфипатические альфа-спиральные структуры. По данным спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР), связанный с мицеллами α -синуклеин человека, формирует две антипараллельные спирали Val3-Val37 и Lys45-Thr92, соединенные линкером (Ulmer et al., 2005). Структурная пластичность α -синуклеина, способность переходить из неупорядоченного состояния в спиральные и бета-складчатые структуры, определяет его физиологическую активность и склонность к патологической агрегации.

В условиях повышенной концентрации белка, низкого pH, высокой ионной силы или присутствия двухвалентных ионов металлов (Cu^{2+} , Fe^{3+}) и окислительного стресса α -синуклеин может принимать конформации, богатые бета-складчатыми структурами, которые инициируют образование амилоидных фибрилл (Deas et al., 2016). Флуоресцентная микроскопия отдельных молекул позволила проследить превращение мономерных и олигомерных форм в токсичные соединения: ранние олигомерные промежуточные формы переходят из изначально неупорядоченных компактных состояний в более организованные, богатые бета-складчатыми структурами олигомеры с заметно повышенной цитотоксичностью (Cremades et al., 2012; Villar-Piqué et al., 2016). Цитотоксичность α -синуклеина коррелирует с конформационным превращением ранних олигомеров в более компактные, обогащенные β -структурой формы, а не с накоплением зрелых фибрилл. Зрелые фибриллы при этом могут служить резервуаром, из которого высвобождаются токсичные олигомеры (Cascella et al., 2021). Отдельную дискуссию вызвал вопрос о том, существует ли α -синуклеин в физиологических условиях в виде стабильного тетрамера. На основании электрофореза, химического сшивания и сканирующей просвечивающей электронной микроскопии была

выдвинута гипотеза о преимущественно тетрамерной (~58 кДа), устойчивой к агрегации спирально свернутой форме эндогенного белка (Bartels et al., 2011). Последующие работы дали противоречивые результаты, в настоящее время преобладает представление о динамическом равновесии между мономерным и мультимерным состояниями, которое задается локальной концентрацией белка, доступностью мембраны и посттрансляционными модификациями (Sulzer & Edwards, 2019).

β -синуклеин состоит из 134 аминокислот, и его последовательность на 60% схожа с α -синуклеином, с особенно высокой гомологией в N-концевом домене, содержащем повторы KTKGV (рис. 1). Различие заключается в том, что β -синуклеин не имеет 11 остатков в области NAC (соответствующих остаткам 73-83 α -синуклеина), что значительно снижает его склонность к агрегации. Это структурное различие привело к предположению, что β -синуклеин может функционировать как естественный ингибитор агрегации α -синуклеина. Способность β -синуклеина напрямую подавлять агрегацию α -синуклеина показана *in vitro* на клеточных линиях. Совместная экспрессия этих синуклеинов приводила к снижению накопления агрегированного α -синуклеина и улучшению функционального состояния нейронов (Hashimoto et al., 2001). Методы ЯМР-спектроскопии и различные флуоресцентные методы позволили уточнить молекулярную основу этого эффекта. Транзиторные белок-белковые контакты между α - и β -синуклеином модулируют стадии нуклеации и удлинения фибрилл, а за ингибирование отвечают конкретные участки межмолекулярного взаимодействия (Janowska et al., 2015). Однако у пациентов с деменцией с тельцами Леви обнаружены изменения соответствующего гена, при котором мутантные формы β -синуклеина сами приобретают патогенные свойства и способствуют нейродегенерации (Ohtake et al., 2004).

γ -синуклеин состоит из 127 аминокислот и обладает консервативным N-концевым амфипатическим повторяющимся мотивом, но отличается по своему C-концевому домену, который короче, чем у α -синуклеина (рис. 1). В растворе γ -синуклеин является внутренне неупорядоченным и может принимать альфа-

спиральные конформации при связывании с мембраной. Изначально этот белок был независимо описан под названием «персин», от «периферический синуклеин», по характерному паттерну экспрессии в периферической нервной системе и отдельных структурах центральной нервной системы (ЦНС) в процессе развития (Buchman et al., 1998). В нормальных физиологических условиях γ -синуклеин менее склонен к агрегации, чем α -синуклеин, однако его сверхэкспрессия у трансгенных мышей приводит к возрастной нейродегенерации с цитоплазматическими включениями, двигательными нарушениями и реактивным астроглиозом, что напрямую связывает γ -синуклеин с нейродегенеративной патологией (Ninkina et al., 2009). γ -синуклеин также вовлечен в протекание опухолевых процессов. Уровень его экспрессии коррелирует с прогрессированием рака молочной железы, яичников и ряда других новообразований и может служить маркером заболевания и метастатического потенциала (Liu et al., 2022).

1.1.2 Распределение синуклеинов в тканях организма и субклеточная локализация

α -синуклеин обильно экспрессируется по всей ЦНС, с особенно высокими уровнями в неокортексе, гиппокампе, обонятельной луковице, стриатуме, таламусе и мозжечке (Iwai et al., 1995; Villar-Piqué et al., 2016). Внутри нейронов содержание α -синуклеина составляет приблизительно 0,5-1% от общего количества цитозольного белка, что является высоким для регуляторного белка. Он локализуется преимущественно в пресинаптических терминалах, где динамически связывается с поверхностью синаптических везикул и пресинаптической плазматической мембраной. Пресинаптический характер этой локализации был установлен еще в ранних работах, белок-предшественник NAC-компонента амилоида при БА оказался пресинаптическим белком центральной нервной системы, широко распространенным по различным областям мозга (Iwai et al., 1995). Экспрессия синуклеинов меняется в ходе развития, уровень α -синуклеина нарастает по мере созревания синапсов, а сам белок регулирует размер пресинаптического везикулярного пула и в большей мере участвует в созревании и

поддержании синапсов, чем в их первоначальном формировании (Wang et al., 2024).

На субклеточном уровне синуклеины существуют в динамическом равновесии между цитозольным и мембраносвязанным состояниями. α -синуклеин обратимо связывается с синаптическими везикулами и, в меньшей степени, с наружными мембранами митохондрий, эндоплазматическим ретикуломом (ЭР) и плазматической мембраной. Распределение регулируется концентрацией белка, составом мембранных липидов, посттрансляционными модификациями и метаболическим состоянием клетки. α -синуклеин также обнаруживается в митохондриально-ассоциированных мембранах ЭР (МАМ), специализированных субдоменах, опосредующих перенос кальция и биосинтез липидов между ЭР и митохондриями (Guardia-Laguarta et al., 2014).

Митохондриальная локализация α -синуклеина рассматривается отдельно от синаптической. Его мономерная форма участвует в работе митохондриальной АТФ-синтазы. Проникая в митохондрии, α -синуклеин связывается с α -субъединицей фермента (комплекс V) и повышает его каталитическую эффективность, модулируя продукцию АТФ. В первичных нейронах и астроцитах мышей с нокаутом гена α -синуклеина активность АТФ-синтазы была значительно снижена, а отсутствие компенсировалось добавлением экзогенного мономерного α -синуклеина (Ludtmann et al., 2016).

β -синуклеин экспрессируется совместно с α -синуклеином во многих областях мозга и имеет аналогичную локализацию в пресинаптических терминалах. Оба белка демонстрируют существенное совпадение в своем распределении в ЦНС, но отличаются экспрессией по разным нейронным популяциям, что предполагает частично различные функции на уровне нейронных цепей (Lavedan, 1998).

В отличие от α - и β -синуклеинов, γ -синуклеин имеет иное распределение в тканях организма. В ЦНС экспрессия γ -синуклеина более ограничена, с преобладанием в определенных ядрах ствола мозга, сетчатке и отдельных популяциях нейронов коры головного мозга и гиппокампа. γ -синуклеин

преимущественно экспрессируется в периферической нервной системе, особенно в первичных сенсорных нейронах дорсальных корешковых ганглиев, симпатических нейронах и двигательных нейронах (Buchman et al., 1998). Функции γ -синуклеина не ограничиваются нервной системой. Мыши, лишенные этого белка, защищены от ожирения, вызванного диетой с повышенным содержанием жиров, и демонстрируют усиленный липолиз и измененный липидный гомеостаз, что указывает на его метаболическую роль (Millership et al., 2013).

1.1.3 Физиологические функции синуклеинов: участие в везикулярном транспорте и синаптической передаче

Наиболее подробно описана роль α -синуклеина в поддержании резервного пула синаптических везикул и процессах высвобождения нейромедиаторов. Белок напрямую способствует сборке комплексов растворимого N-этилмалеимид-чувствительного фактора прикрепления белка-рецептора (SNARE) – молекулярного комплекса, необходимого для слияния синаптических везикул с пресинаптической плазматической мембраной при высвобождении нейромедиатора (Burré et al., 2010). Механистически α -синуклеин связывается с v-SNARE-белком синаптобревином-2 (VAMP2) на синаптических везикулах и катализирует образование транс-SNARE-комплекса между VAMP2, синтаксином-1 и SNAP-25.

При связывании с мембраной α -синуклеин собирается в мультимеры более высокого порядка, и именно эти мультимерные формы каталитически активны в отношении сборки SNARE-комплекса (Burré et al., 2013).

α -синуклеин также влияет на размер и мобилизацию пулов синаптических везикул. У мышей с нокаутом соответствующего гена потеря белка сопровождается изменениями рециркуляции везикул и истощением их резервного пула, а также ослаблением синаптических ответов при длительной высокочастотной стимуляции (Cabin et al., 2002). У мышей с тройным нокаутом, лишенных всех трех синуклеинов α , β и γ , развивается возраст-зависимая нейрональная дисфункция. Размер возбуждающих синапсов *in vivo* уменьшается

примерно на 30%, а синаптическая передача прогрессирующе снижается, что указывает на потребность в совместном присутствии всех трех белков для долговременного поддержания синапсов (Greten-Harrison et al., 2010).

Роль α -синуклеина в активации SNARE-комплексов не ограничивается нервной системой, его удаление нарушает функцию тромбоцитов. У нокаутных мышей снижена секреция плотных гранул и нарушено образование тромбов (Sennett et al., 2024), то есть шаперонная активность α -синуклеина в отношении SNARE-опосредованного слияния мембран способна затрагивать и периферическую систему организма.

Физиологические роли β -синуклеина и γ -синуклеина определены менее четко. Предполагается, что β -синуклеин функционирует как регулятор, ингибирующий агрегацию α -синуклеина *in vivo*, но есть данные о том, что он также играет независимую нейропротекторную роль в функции синаптических везикул (Ninkina et al., 2021).

γ -синуклеин поддерживает работу периферической нервной системы, что согласуется с его присутствием в сенсорных и моторных нейронах (Buchman et al., 1998). Было показано, что животные с нокаутом гена γ -синуклеина имеют улучшенные результаты в поведенческих тестах на пассивное и активное избегание, чем контрольные особи дикого типа, что указывает на тоническое тормозное влияние γ -синуклеина на отдельные процессы обучения и памяти в норме (Kokhan et al., 2013).

1.1.4 Взаимодействие синуклеинов с липидными мембранами

Взаимодействие синуклеинов с биологическими мембранами необходимо для поддержания нормальных физиологических функций организма и одновременно создает условия для патологической агрегации этих белков. В обычном состоянии α -синуклеин находится в неупорядоченном мономерном состоянии, тогда как при контакте с липидными бислоями N-концевой и NAC-регионы принимают амфипатические альфа-спиральные формы. Этот конформационный переход обусловлен электростатическими взаимодействиями

между положительно заряженными лизиновыми остатками повторов KTKEGV и анионными фосфолипидными группами, дополненными гидрофобным внедрением неполярной стороны амфипатической спирали в область ацильной цепи мембранного липида (Ulmer et al., 2005). Взаимодействие между α -синуклеином и липидами носит двунаправленный характер: белок влияет на свойства мембраны, такие как кривизна и текучесть, а ее липидный состав определяет конформацию и функцию этого белка (Fanning et al., 2019).

α -синуклеин чаще связывается с мембранами с малым диаметром, такими как мембраны синаптических везикул, ~40 нм в диаметре, по сравнению с плоскими или мембранами с большим диаметром. По данным флуоресцентной корреляционной спектроскопии, сродство α -синуклеина к мембране резко возрастает с увеличением мембранной кривизны везикул и дополнительно зависит от липидного состава. Анионные липиды фосфатидилсерин (PS) и фосфатидилглицерол (PG) сильно способствуют связыванию, тогда как нейтральный фосфатидилхолин (PC) поддерживает лишь слабые взаимодействия (Middleton & Rhoades, 2010).

В ряде работ рассматривается роль липидных рафтов в направленном транспорте α -синуклеина к мембране. Липидные рафты – это мембранные микродомены, обогащенные холестерином и сфинголипидами, которые опосредуют синаптическую локализацию α -синуклеина. Нарушение липидных рафтов путем экстракции холестерина приводило к исчезновению связи α -синуклеина с синаптическими мембранами в культивируемых нейронах, в то время как мутации, снижающие сродство к липидным рафтам, уменьшали синаптическую локализацию этого белка (Fortin et al., 2004).

Особенно важное взаимодействие происходит между α -синуклеином и кардиолипином (CL), характерным дифосфолипидом внутренней митохондриальной мембраны (ВММ), где он составляет приблизительно 15-20% от общего содержания фосфолипидов. Кардиолипин необходим для структурной организации дыхательных суперкомплексов и димеров АТФ-синтазы. В условиях митохондриального стресса кардиолипин мигрирует из внутренней мембраны в

наружную митохондриальную мембрану (НММ), где служит сигнальной платформой и обеспечивает высокоаффинный участок связывания для α -синуклеина. Кроме того, кардиолипин усиливает порообразующую активность олигомеров α -синуклеина. Содержащие кардиолипин модельные мембраны легче подвергались вызванной олигомерами пермеабилзации. Взаимодействие кардиолипина с α -синуклеином, вероятно, и составляет тот патологический механизм, посредством которого неправильно свернутый белок нарушает целостность митохондриальной мембраны (Ghio et al., 2019).

Последствия взаимодействия α -синуклеина с мембраной включают химическую модификацию липидного бислоя. В гибели клеток, вызванной α -синуклеином, существенную роль играет перекисное окисление липидов. Воздействие олигомерного белка на первичные нейрон-глиальные культуры запускало перекисное окисление мембранных липидов, а его предотвращение, за счет встраивания в мембраны устойчивых к окислению дейтерированных полиненасыщенных жирных кислот (D-ПНЖК), значительно ослабляло цитотоксичность (Angelova et al., 2015).

β -синуклеин и γ -синуклеин также связываются с липидными мембранами через свои консервативные N-концевые домены, но с более низкой аффинностью, чем α -синуклеин. Различия в сродстве к мембране между членами этого семейства происходят из-за различий в их N-концевых последовательностях, укороченного NAC-домена у β -синуклеина и его дивергенции у γ -синуклеина (Kim et al., 2021; Ramalingam & Dettmer, 2021).

1.1.5 Роль синуклеинов в метаболизме дофамина и дофаминергической сигнализации

Тесная связь между α -синуклеином и дофаминергической системой была установлена с момента выявления мутаций гена SNCA при наследственной БП, заболевании, характеризующемся прогрессирующей дегенерацией дофаминергических нейронов в компактной части черной субстанции (SNpc) (Vekrellis et al., 2024). Нарушение метаболизма дофамина в патогенезе БП

объединяет везикулярную дисфункцию, накопление цитозольного дофамина, окислительный стресс и неправильное сворачивание α -синуклеина. На молекулярном уровне α -синуклеин влияет на гомеостаз дофамина через несколько независимых механизмов, таких как синтез (Perez et al., 2002), везикулярное хранение и высвобождение дофамина (Lehrer & Rheinstein, 2022).

α -синуклеин регулирует везикулярное хранение дофамина, модулируя активность и транспорт везикулярного переносчика моноаминов 2 (VMAT2) (Lotharius & Brundin, 2002; Rosenthal et al., 2025). При сверхэкспрессии белок снижает VMAT2-опосредованный захват дофамина в синаптические везикулы и уровень цитоплазматического дофамина растет. Такое состояние само по себе токсично, поскольку дофамин легко подвергается ауто- и ферментативному окислению (Lotharius & Brundin, 2002). Обратная ситуация – это полная потеря синуклеинов, которая тоже нарушает везикулярную обработку дофамина. Так, у мышей с тройным нокаутом эффективность его захвата синаптическими везикулами снижена (Ninkina et al., 2019). Таким образом, как избыток, так и полное отсутствие синуклеинов нарушают везикулярное хранение дофамина, а баланс между цитозольным и везикулярным хранением дофамина поддерживается только при определенном уровне экспрессии синуклеинов.

Роль синуклеинов в дофаминергической системе была также показана на нокаутных линиях мышей. У двойных нокаутов, лишенных α - и γ -синуклеина, развивается выраженный гипердофаминергический фенотип с двукратным увеличением вызванного высвобождения дофамина в стриатуме (Senior et al., 2008). Этот прирост обусловлен повышенной вероятностью высвобождения из дофаминергических терминалей, то есть в норме α - и γ -синуклеин ограничивают выброс дофамина. У мышей с тройным нокаутом повышенное высвобождение сочетается со сниженным тканевым содержанием дофамина и его усиленным потреблением, что указывает на вклад синуклеинов в везикулярное хранение дофамина при одновременной регуляции его высвобождения (Anwar et al., 2011).

Разные комбинации утраты синуклеинов дают разные нейрохимические и поведенческие профили. Так, потеря α -синуклеина сильнее сказывается на

эффективности везикулярного захвата дофамина, а потеря γ -синуклеина – на вероятности его высвобождения, то есть отдельные члены семейства вносят взаимодополняющий вклад в гомеостаз дофаминергической системы (Connor-Robson et al., 2016). β -синуклеин играет нейропротекторную роль, в отсутствие других синуклеинов он способен усиливать захват дофамина синаптическими везикулами и защищать дофаминергические нейроны от гибели, вызванной нейротоксином 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином (MPTP) (Ninkina et al., 2021).

Сам метаболизм дофамина представляет собой значительный источник АФК и реактивных альдегидов. Моноаминоксидаза (МАО) катализирует окислительное дезаминирование дофамина, образуя 3,4-дигидроксифенилацетальдегид (ДОПАЛ), аммиак и H_2O_2 в качестве стехиометрических побочных продуктов (Rasool et al., 2024). ДОПАЛ ковалентно модифицирует лизиновые остатки α -синуклеина и способствует его олигомеризации, создавая токсический цикл с положительной обратной связью. Кроме того, цитозольный дофамин подвергается спонтанному автоокислению с образованием хинонов дофамина, аминокрома и предшественников нейромеланина, генерируя супероксид и H_2O_2 (Masato et al., 2019).

1.2 Роль синуклеинов в патологии нервной системы

Патологическая агрегация α -синуклеина – определяющая молекулярная черта синуклеинопатий. Именно этот белок оказался основным структурным компонентом телец Леви (Vekrellis et al., 2024), а его связь с БП подтверждается наследственными формами, такими как миссенс-мутация A53T в гене SNCA при наследственных формах заболевания (Spathopoulou et al., 2022) и трипликацией SNCA, вызывающей агрессивный вариант с ранним развитием патологии (Statoulla et al., 2026). Олигомерные формы более нейротоксичны, чем фибриллярные формы (Casella et al., 2021), а различные конформационные варианты фибрилл демонстрируют разные профили токсичности (Mehra et al., 2021). Было показано, что агрегация α -синуклеина имеет прионоподобный характер, патологические

формы белка могут служить «затравками» для индукции агрегации мономерных форм синуклеина. Распространение этого неправильно свернутого белка между клетками способно инициировать агрегацию эндогенного α -синуклеина в клетках-реципиентах, поддерживая прогрессирование патологии (Khedmatgozar et al., 2024). Одним из механизмов нейродегенерации может быть то, что олигомерный α -синуклеин способствует открытию митохондриальной поры (mPTP) (Ludtmann et al., 2018) и запуску процессов апоптоза дофаминергических нейронов. Агрегация α -синуклеина приводит к ферроптотической гибели клеток (Angelova et al., 2020; Ding et al., 2023) и перекисному окислению липидов, что также ведет к гибели клеток, индуцированной α -синуклеином (Angelova et al., 2015).

Повышенный уровень α -синуклеина был обнаружен в сыворотке крови пациентов с эпилепсией, коррелируя с тяжестью заболевания (Salem et al., 2025). Мыши с экспрессией мутантного человеческого α -синуклеина демонстрируют когнитивные нарушения и признаки сетевой гипервозбудимости, включая эпилептиформные события. Систематический анализ ЭЭГ у мышей, лишенных отдельных синуклеинов или их комбинаций, показал, что практически любая такая потеря приводит к широко распространенным изменениям спектральных профилей ЭЭГ. Наиболее существенно на электрическую активность мозга влияет, по-видимому, именно дисбаланс между членами семейства, а не отсутствие какого-то одного синуклеина (Vorobyov et al., 2023, 2024). Сверхэкспрессия и патологическая агрегация α -синуклеина могут усиливать нейровоспаление, нарушать аутофагию и синаптическую передачу, провоцируя эпилептиформную активность. В то же время сами патологические процессы, происходящие при судорожной активности, могут ускорять агрегацию α -синуклеина за счет окислительного стресса и метаболических сдвигов (Fedulina et al., 2026a).

У трансгенных мышей, экспрессирующих γ -синуклеин в избытке, развивается нейродегенерация с внутрицитоплазматическими включениями (Ninkina et al., 2009). Аномальное накопление γ -синуклеина вызывает распад цитоскелета нейрофиламентов, приводя к последующей дегенерации аксонов в двигательных нейронах (Peters et al., 2012). Такой патологический процесс был

обнаружен при боковом амиотрофическом склерозе (БАС) (Peters et al., 2015). Помимо этого, повышенный уровень γ -синуклеина был обнаружен в спинномозговой жидкости пациентов с БА и болезнью Крейтцфельдта-Якоба (Oeskl et al., 2016). Сравнение α -, β - и γ -синуклеинов по распространению, экспрессии, физиологическим функциям и связанным патологиям приведено в таблице А.1. (Приложение А).

1.3 Окислительно-восстановительная сигнализация в клетках мозга.

Основные ферменты, производящие АФК в клетке

1.3.1 Понятие активных форм кислорода и их физиологическая роль в клеточной сигнализации

Человеческий мозг при своей массе 2% от общей массы организма потребляет 20% всего поступающего кислорода и глюкозы. Высокое потребление нейронами и астроцитами кислорода связано с его высоким окислительно-восстановительным потенциалом. Он способен легко принимать электроны от восстановленных субстратов, тем самым поддерживая нормальную выработку энергии митохондриями (Dienel, 2019). Активные формы кислорода (АФК) – это химически активные молекулы, образующиеся в результате частичного восстановления молекулярного кислорода (Cheung & Vousden, 2022). Основными молекулами АФК являются супероксидный анион-радикал ($O_2^{\bullet-}$), перекись водорода (H_2O_2), гидроксильный радикал ($\bullet OH$) и синглетный кислород ($^1O_2$). Долгое время АФК рассматривались как токсичные побочные продукты аэробного метаболизма, которые могут приводить к оксидативному стрессу. Однако позже выяснилось, что в живых клетках они являются важными сигнальными молекулами. В частности, молекулы H_2O_2 регулируют пролиферацию, дифференцировку, миграцию клеток, иммунную защиту и синаптическую пластичность (Sies & Jones, 2020). Перекись водорода является нерадикальным окислителем, проникаемым для мембран, и выполняет функцию вторичного мессенджера АФК. Она способна выполнять сигнальную функцию путем обратимого окисления специфических остатков цистеина в целевых белках,

превращая тиолат-анион (Cys-S-) в сульфеновую кислоту (Cys-SOH). Высокие концентрации перекиси водорода в клетках запускают процессы клеточной гибели. Было показано, что концентрации H_2O_2 близкие к 1-10 нМ являются нормальными, а концентрации, превышающие 100 нМ, вызывают окислительный стресс, при этом пороговые концентрации зависят от типа клеток и локальной антиоксидантной способности (de la Lastra et al., 2026).

Супероксид ($\text{O}_2^{\bullet-}$) является умеренно реактивным радикалом с ограниченной проницаемостью для мембран, быстро дисмутирующим до H_2O_2 под действием супероксиддисмутазы. Супероксиддисмутазы – это группа ферментов, осуществляющих основную антиоксидантную функцию в клетках мозга за счет устранения супероксидных анион-радикалов (Chidambaram et al., 2024).

АФК имеют разный уровень реактивности, одним из наиболее реактивных является гидроксильный радикал ($\bullet\text{OH}$), который характеризуется неизбирательной реакционной способностью и не выполняет сигнальной функции (Sies & Jones, 2020). При ослаблении антиоксидантной системы такие молекулы могут изменять функциональные свойства живых клеток и приводить к их гибели.

Синглетный кислород ($^1\text{O}_2$) стимулирует митохондриальную биоэнергетику в клетках мозга. Низкие концентрации синглетного кислорода снижали автофлуоресценцию НАДН и повышали выработку АТФ в нейронах и астроцитах, в то время как более высокие концентрации вызывали деполяризацию митохондрий (Sokolovski et al., 2021).

1.3.2 НАДФН-оксидаза: структура, изоформы, механизм активации

НАДФН-оксидазы представляют собой семейство мембрано-ассоциированных ферментных комплексов, основная биологическая функция которых заключается в целенаправленном образовании АФК. Высокотоксичные свободные радикалы, образуемые в ходе работы этих ферментов, обеспечивают иммунную функцию организма, уничтожение бактерий, регуляцию воспаления и межклеточную сигнализацию. В отличие от митохондриального образования АФК, которое происходит как следствие переноса электронов, ферменты НАДФН-

оксидазы напрямую образуют супероксид и перекись водорода в качестве своих каталитических продуктов. Семейство НАДФН-оксидазы млекопитающих включает семь членов (НАДФН-оксидазы 1-5, двойные оксидазы 1-2), при этом НАДФН-оксидаза 2 является наиболее широко изученной изоформой в ЦНС (Pecchillo Cimmino et al., 2023).

Было показано участие НАДФН-оксидазы в патогенезе нейродегенеративных заболеваний, таких как БА (Abramov et al., 2004) и БП (Belarbi et al., 2017). Патологическая микроглиальная НАДФН-оксидаза 2 вызывает окислительный взрыв, защитный механизм микроглии, повреждающий окружающие нейроны, в то время как нейрональный НАДФН-оксидаза 2 способствует эксайтотоксической гибели клеток (Belarbi et al., 2017). Помимо этого, активация этого фермента способствует гибели нейронов после ишемии и травмы.

Бета-амилоидные пептиды (A β 1-42) вызывают окислительный стресс в астроцитах посредством активации НАДФН-оксидазы вследствие поступления кальция внутрь клеток (Quansah et al., 2023). Этот астроцитарный окислительный взрыв является необходимым и достаточным условием для гибели совместно культивируемых нейронов. Образование АФК, индуцированное A β , в астроцитах деполяризует митохондрии и в сочетании с повышенной концентрацией кальция запускает процесс открытия митохондриальной поры. Этот процесс служит сигналом для запуска окислительного стресса, который передается нейронам и также инициирует клеточную гибель. Это было подтверждено исследованием, в котором активность НАДФН-оксидазы в астроцитах была заблокирована, в то время как нейроны, совместно культивируемые с этими астроцитами, были защищены от токсичности A β (Abramov et al., 2004).

АФК астроцитов необходимы для нормальной работы мозга и метаболической связи между нейронами и астроцитами. Было показано (Vicente-Gutierrez et al., 2019), что селективное снижение митохондриальной H₂O₂ астроцитов снижает гликолитический поток и уменьшает поступление лактата к нейронам, что приводит к нарушениям обучения и памяти.

1.3.3 Ксантиноксидаза: связь с пуриновым метаболизмом

Ксантиноксидоредуктаза – это флавофермент, содержащий молибдоптерин и железо-серу, который катализирует два заключительных этапа катаболизма пуринов – гидроксилирование гипоксантина до ксантина и ксантина до мочевой кислоты (Hille, 2023). Фермент существует в двух взаимопревращающихся формах: ксантиндегидрогеназа, которая переносит электроны на НАД⁺, и ксантиноксидаза (КСО), которая переносит электроны на молекулярный кислород, генерируя супероксид и H₂O₂. Превращение ксантиндегидрогеназы в КСО происходит обратимо путем окисления цистеина или необратимо путем ограниченного протеолиза и усиливается при ишемии и воспалении (Battelli et al., 2014).

Путь деградации пуринов, в котором участвует КСО, напрямую связан с клеточным энергетическим метаболизмом по следующей последовательности: АТФ → АДФ → АМФ → ИМФ → инозин → гипоксантин → ксантин → мочевая кислота. В условиях энергетического кризиса ускоренное потребление АТФ приводит к накоплению АДФ и АМФ, которые далее метаболизируются до гипоксантина. Каждый этап окисления, катализируемый КСО, генерирует АФК, устанавливая прямую биохимическую связь между истощением клеточной энергии и окислительной нагрузкой (Battelli et al., 2014; Hille, 2023).

1.3.4 Моноаминоксидаза: изоформы А и В, различия и функции

Моноаминоксидазы (МАО) – это содержащие ФАД флавоферменты, заякоренные на внешней митохондриальной мембране, которые катализируют окислительное дезаминирование моноаминовых нейромедиаторов и пищевых аминов. У млекопитающих существуют две изоформы, МАО-А и МАО-В, имеющие примерно 70% идентичности последовательностей, но различающиеся по субстратной специфичности и чувствительности к ингибиторам. МАО-А преимущественно дезаминирует серотонин, норадреналин, адреналин и ингибируется хлоргилином, тогда как МАО-В обладает более высоким сродством к фенилэтиламину и бензиламину и ингибируется селегилином. Дофамин является

субстратом для обеих изоформ (Cho et al., 2021). МАО-В в основном присутствует в астроцитах, где экспрессия этого фермента увеличивается с возрастом и при реактивном астроглиозе при БА и БП (Jaisa-aad et al., 2025). При нейродегенеративных заболеваниях повышение уровня МАО-В в реактивных астроцитах способствует окислительному стрессу, аномальному синтезу ГАМК и образованию пероксида водорода (Nam et al., 2022). МАО-А экспрессируется преимущественно в катехоламинергических и серотонинергических нейронах. Такое дифференциальное распределение имеет прямое значение для окислительно-восстановительного гомеостаза. Астроцитарная МАО-В генерирует H_2O_2 из моноаминов, поступающих из синаптической щели, тогда как нейрональная МАО-А производит H_2O_2 в результате внутринейронного катаболизма (Cho et al., 2021).

Катаболизм моноаминов с помощью МАО происходит с использованием ФАД: $R-CH_2-NH_2 + O_2 + H_2O \rightarrow R-CHO + NH_3 + H_2O_2$. В результате этой реакции образуется H_2O_2 в качестве побочного продукта. Каталитический механизм протекает через двухэлектронное окисление с участием ковалентных флавиновых промежуточных соединений (Niveta et al., 2024). Было показано, что экзогенная добавка дофамина к астроцитам гиппокампа приводит к значительному увеличению внутриклеточного кальция, которое опосредуется не обычной сигнализацией дофаминовых рецепторов, а образованием АФК в результате МАО-зависимого катаболизма дофамина. H_2O_2 , образуемая в результате катализируемого МАО окисления дофамина, действует как сигнальная молекула, запуская высвобождение кальция из внутриклеточных запасов (Vaarmann et al., 2010).

1.3.5 Продукция АФК в митохондриях

Митохондрии являются главным источником клеточных АФК в нейронах и астроцитах (Angelova & Abramov, 2016). Основная функция митохондрий – производство энергии в виде АТФ путем окислительного фосфорилирования. Это происходит за счет митохондриального дыхания, процесса, протекающего на внутренней мембране митохондрии и обеспечивающего генерацию

трансмембранного потенциала за счет накачки протонов, ионов водорода, в межмембранное пространство электрон-транспортной цепью (Vercellino & Sazanov, 2022). В нее входят четыре белковых комплекса и два подвижных переносчика. Комплекс I (НАДН-дегидрогеназа, убихинон-оксидоредуктаза) принимает электроны от НАДН и перекачивает протоны через мембрану. Комплекс II (сукцинатдегидрогеназа) принимает электроны от сукцината через связанный ФАД. Убихинон и цитохром с, подвижные молекулы, переносящие электроны между комплексами. Комплекс III (убихинон-цитохром с-редуктаза) передает электроны на цитохром с и также выкачивает протоны наружу. Комплекс IV (цитохром с-оксидаза) передает электроны на кислород (O_2), который, соединяясь с протонами, образует молекулу воды (H_2O). Протонный градиент, создаваемый в ходе работы дыхательной цепи, запускает работу АТФ-синтазы (комплекс V) и синтез АТФ в матриксе митохондрий из АДФ и неорганического фосфата (Guan et al., 2022).

Во время окислительного фосфорилирования электроны, передаваемые через электрон-транспортную цепь (ЭТЦ), могут выходить наружу и взаимодействовать с O_2 , генерируя супероксид. Эта утечка электронов составляет примерно 0,2-2% от общего потребления кислорода митохондриями в физиологических условиях. Было идентифицировано по меньшей мере семь различных участков образования митохондриальных АФК, причем комплекс I (НАДН: убихинон оксидоредуктаза) и комплекс III (убихинол: цитохром с оксидоредуктаза) являются наиболее значимыми (Su et al., 2025). В комплексе I супероксид генерируется двумя различными путями. При прямом переносе электронов (ППЭ) электроны вытекают из участка флавинмононуклеотида (ФМН), когда соотношение НАДН/НАД⁺ высокое. В ходе обратного переноса электронов (ОПЭ) электроны текут в обратном направлении из пула убихинола через комплекс I, генерируя большое количество супероксида, для этого необходимы сильно восстановленный пул убихинона и повышенный митохондриальный мембранный потенциал ($\Delta\Psi_m$) (Bao et al., 2025). При ишемии сердца сукцинат накапливается до миллимолярных концентраций, его быстрое окисление комплексом II приводит к массивному ОПЭ-зависимому

образованию супероксида в комплексе I, главному фактору ишемически-реперфузионного повреждения (Chouchani et al., 2014). Супероксид в комплексе I высвобождается исключительно в матрикс, в то время как комплекс III (сайт Qo) высвобождает супероксид как в матрикс, так и в межмембранное пространство. Супероксид в межмембранном пространстве превращается в H_2O_2 под действием супероксиддисмутазы-1 (СОД1) и проникает через внешнюю мембрану в цитозоль, передавая митохондриальный окислительно-восстановительный сигнал (Brand, 2016).

Митохондриальные АФК регулируют нейрональную дифференцировку, синаптическую пластичность, высвобождение нейромедиаторов и развитие мозга. Однако они способствуют нейродегенерации, когда выработка АФК превышает локальную антиоксидантную способность (Angelova & Abramov, 2018). В то же время, подавление всех митохондриальных АФК нарушает фундаментальные клеточные процессы (Angelova & Abramov, 2016).

1.3.6 Система эндогенной антиоксидантной защиты клеток мозга

Антиоксидантная защита головного мозга представляет собой скоординированную сеть ферментативных и неферментативных систем, которые поддерживают концентрацию АФК на уровне, совместимом с сигнальными процессами, предотвращая при этом переход к окислительному повреждению (рис. 2). Гамма-L-глутамил-L-цистеинилглицин, или глутатион (Glutathione, GSH), является наиболее распространенным низкомолекулярным тиоловым антиоксидантом в головном мозге (1-3 мМ). GSH служит основным внутриклеточным окислительно-восстановительным буфером, обеспечивая электроны для восстановления H_2O_2 с помощью глутатионпероксидазы (GPx): $H_2O_2 + 2GSH \rightarrow GSSG + 2H_2O$. Окисленный глутатион (GSSG) регенерируется глутатионредуктазой за счет НАДФН, поддерживая соотношение GSH/GSSG приблизительно на уровне 100:1 (Liu et al., 2022). Синтез глутатиона представляет собой двухэтапный АТФ-зависимый процесс, катализируемый гамма-

глутамилцистеинлигазой и глутатионсинтетазой и зависящий от доступности цистеина (Asantewaa et al., 2024; Dringen & Arend, 2025).

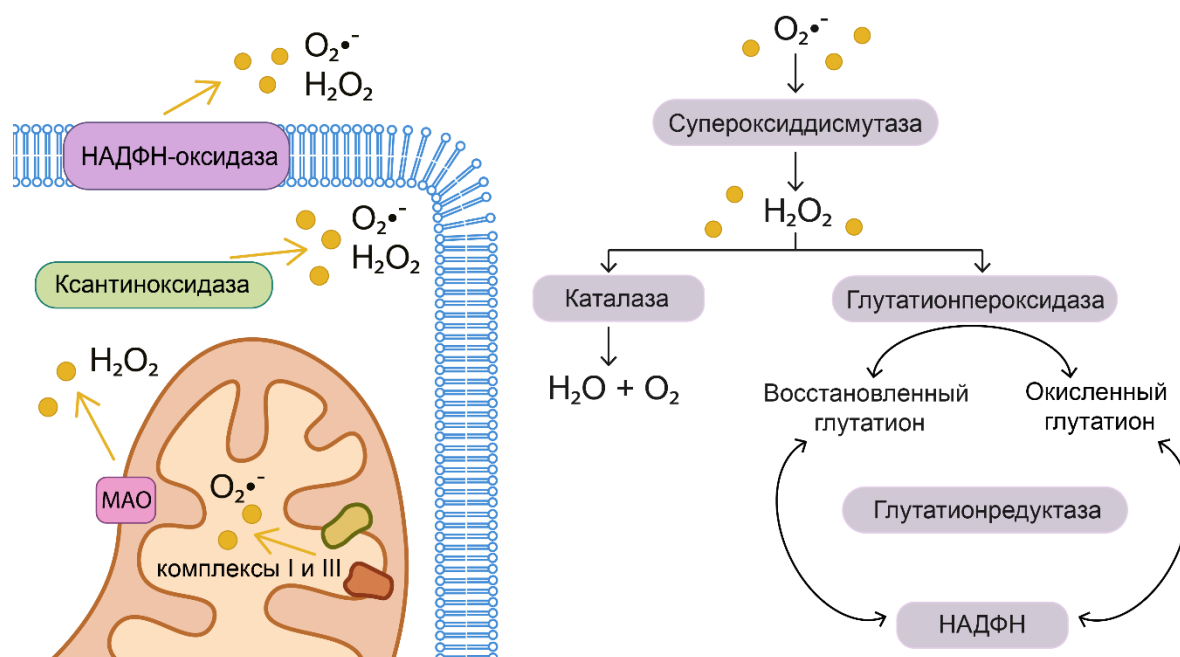


Рисунок 2 – Основные источники активных форм кислорода в клетке мозга и ключевые звенья антиоксидантной защиты, MAO – моноаминоксидаза. Адаптировано по (Angelova & Abramov, 2016)

Астроциты являются главными регуляторами окислительно-восстановительного гомеостаза головного мозга. Они содержат высокие концентрации GSH (около 3,8 мМ) по сравнению с нейронами (около 2,5 мМ). Астроциты экспортируют GSH через белок множественной лекарственной устойчивости 1 (Multidrug resistance-associated protein 1, MRP1). Экспортированный глутатион расщепляется внеклеточно гамма-глутамилтранспептидазой до цистеинилглицина, а затем до цистеина и глицина, которые нейроны поглощают для синтеза собственного GSH. Этот межклеточный механизм переноса глутатиона необходим для антиоксидантной защиты нейронов. Кроме того, астроциты характеризуются более высокой экспрессией Nrf2, главного регулятора антиоксидантных генов, по сравнению с нейронами (Dringen & Arend, 2025).

Супероксиддисмутаза (СОД) катализирует дисмутацию супероксида в H_2O_2 и молекулярный кислород. Существует три изоформы СОД: Cu/Zn-СОД – СОД1 находится в цитозоле и межмембранном пространстве, Mn-СОД – СОД2 локализуется в митохондриальном матриксе и ЕС-СОД – СОД3 является внеклеточной. СОД2 имеет важное значение в головном мозге, обеспечивая немедленную защиту от супероксида, образующегося комплексами I и III. У мышей с нокаутом гена СОД2 развивается тяжелая дилатационная кардиомиопатия, нейродегенерация со спонгиозной энцефалопатией и метаболический ацидоз. Такие животные погибают в течение первых трех недель жизни, что свидетельствует о высокой уязвимости нервной системы к избыточной и неконтролируемой генерации митохондриального супероксида (Chidambaram et al., 2024).

Каталаза разлагает H_2O_2 на воду и молекулярный кислород с высокой каталитической эффективностью. В головном мозге каталаза локализуется преимущественно в пероксисомах, а также обнаруживается в цитоплазме и митохондриях (Fujiki et al., 2022). В мозге она имеет низкую активность по сравнению с печенью и почками. Каталаза играет важную роль при высоких концентрациях H_2O_2 , в то время как при низких концентрациях она малоэффективна (Cobley et al., 2018).

1.3.7 Перекисное окисление липидов

Перекисное окисление липидов (ПОЛ) – это процесс окисления и деградации липидного бислоя мембран под действием свободных радикалов. ПОЛ является показателем редокс-статуса клетки, объединяющим суммарную продукцию АФК и емкость антиоксидантных систем. Вследствие высокого содержания полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), интенсивного потребления кислорода и присутствия каталитически активного железа, мозг имеет высокую уязвимость к процессам, лежащим в основе ПОЛ. На первой стадии под действием АФК происходит отрыв атома водорода от углерода ПНЖК-содержащего фосфолипида с образованием липидного радикала ($L\cdot$). Липидный радикал,

взаимодействуя с молекулой O_2 , образует пероксильный радикал ($LOO\bullet$), который начинает окислять соседние ПНЖК. При рекомбинации радикалов или при восстановлении гидроперекисей липидов ($LOOH$) в стабильные соединения, липидные спирты (LOH), предотвращается развитие цепной реакции повреждения клеточных мембран (Ding et al., 2023; Sun et al., 2025). Одним из защитных механизмов является замена атома водорода ПНЖК атомами дейтерия (D-ПНЖК). Это стабильные и тяжелые изотопы водорода, имеющие прочную связь углерод-дейтерий в D-ПНЖК, на разрыв которой необходимы большие затраты энергии, чем на разрыв связи углерод-водород, поэтому они в несколько раз устойчивее к ПОЛ (Angelova et al., 2015, 2020). Ионы Fe^{2+} ускоряют ПОЛ, разлагая $LOOH$ с образованием свободных радикалов ($OH\bullet$, $LO\bullet$, $LOO\bullet$). Продукты распада гидроперекисей, такие как 4-гидроксиноненаль (4-HNE), малоновый диальдегид (МДА) и акролеин, образуют ковалентные аддукты с остатками цистеина, гистидина и лизина, модифицируя транспортеры глутамата, Na^+/K^+ -АТФазу и митохондриальные ферменты. Так, ПОЛ является не только повреждающим, но и сигнальным процессом, а сами альдегиды рассматриваются как биомаркеры прогрессирования нейродегенерации (Allowitz et al., 2025).

Естественной защитой от ПОЛ служит глутатионпероксидаза 4 (GPx4) – фермент, восстанавливающий фосфолипидные гидроперекиси непосредственно в составе мембраны за счет восстановленного глутатиона. Кроме него существуют НАДФН-зависимые пути защиты клетки от ферроптоза: ферроптоз-супрессирующий белок 1 (FSP1– $CoQH_2$), дигидрооротатдегидрогеназа (DHODH– $CoQH_2$) и ГТФ-циклогидролаза 1 (GCH1– BH_4), а также липофильные перехватчики радикалов, в первую очередь α -токоферол (Витамин Е), регенерируемый через FSP1 (Alves et al., 2025). Синтез глутатиона в нейронах зависит от доступности цистеина и зависит от поставки его предшественников астроцитами (Liu et al., 2022), при нарушении этих процессов в условиях перегрузки железом запускаются процессы ферроптоза, одной из форм клеточной гибели (Ding et al., 2023). Роль синуклеинов в этом процессе была показана на нейрон-глиальных культурах. Олигомерный, но не мономерный α -синуклеин (100 нМ), повышал скорость ПОЛ,

тогда как предынкубация с D-ПНЖК возвращала ее к базальному уровню и снижала гибель клеток (Angelova et al., 2015, 2020).

1.3.8 Редокс-сигнализация и окислительный стресс

Различие между редокс-сигнализацией и окислительным стрессом имеет фундаментальное значение для понимания двойственной природы АФК в головном мозге. Редокс-сигнализация включает селективное, обратимое окисление определенных остатков цистеина в целевых белках путем контролируемого образования H_2O_2 , тогда как окислительный стресс включает неизбирательное, часто бесконтрольное и необратимое окисление, вызванное АФК (Averill-Bates, 2024).

Избирательность задается белковым окружением цистеина: снижение рКа тиоловой группы до 4–6 переводит ее в форму тиолата, окисляемого H_2O_2 до сульфеновой кислоты (Cys-SOH). Cys-SOH – нестабильное химическое соединение, которое быстро реагирует с цистеином с образованием дисульфидной связи (Cys-S-S-Cys), или взаимодействует с глутатионом, образуя S-глутатионилированный белок (Cys-S-S-G). Обе модификации снимаются тиоредоксин- и глутаредоксин-редуктазными системами за счет НАДФН, тогда как гиперокисление до сульфиновой (Cys-SO₂H) и сульфоновой (Cys-SO₃H) форм необратимо (Sies & Jones, 2020). Основными эффекторами H_2O_2 выступают протеинтирозинфосфатазы (PTP1B, SHP-2) и липидная фосфатаза PTEN, обратимая инактивация которых продлевает сигнал рецепторных тирозинкиназ и оси PI3K–Akt. Киназа ASK1, освобождаемая при окислении тиоредоксина, запускает каскады p38MAPK и JNK, окисление сенсорных цистеинов Keap1 стабилизирует Nrf2 и включает гены антиоксидантного ответа, формируя отрицательную обратную связь, а белки кальциевого транспорта, рианодиновые и IP₃-рецепторы, SERCA, каналы TRP, преобразуют редокс-сигнал в кальциевый (Averill-Bates, 2024; Verma et al., 2022).

Низкая концентрация H_2O_2 приводит к обратимым изменениям в сигнальной системе, в то время как высокие концентрации вызывают необратимое

гиперокисление, ведущее к повреждению клеток мозга. Для эффективной передачи сигналов АФК необходимо соблюдение нескольких условий, таких как контролируемое производство окислителя, низкая концентрация H_2O_2 в наномолярном диапазоне 1-10 нМ (de la Lastra et al., 2026), молекулярные мишени с реактивными цистеиновыми остатками и ферментативные системы для прекращения сигнала. Пространственная организация НАДФН-оксидазы на плазматической мембране, MAO на внешней мембране митохондрий и комплексов дыхательной цепи (I и III) в совокупности с пероксиредоксинами обеспечивают локальное распространение сигнала к белку-мишени. В клетках мозга такой механизм реализован, в частности, при катаболизме моноаминов: H_2O_2 , образующийся при дезаминировании дофамина MAO, индуцирует кальциевый сигнал в астроцитах (Vaarmann et al., 2010). Терминацию обеспечивают супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазная и тиоредоксиновая системы, опирающиеся на пул восстановленного глутатиона (Dringen & Arend, 2025). При нарушении любого из этих условий система переходит от сигнализации к стрессу (Cortese-Krott et al., 2017).

Окислительный стресс – это состояние, при котором клетки повреждаются избытком АФК. Это происходит вследствие нарушения баланса между производством АФК и работой антиоксидантной системы. Избыток АФК может приводить к окислению липидов, белков, ДНК или РНК и вызывать различные патологические состояния.

Дисфункция митохондриальной цепи и окислительный стресс ведут к снижению выработки АТФ, нарушению кальциевого обмена и открытию митохондриальной поры. Окислительный стресс провоцирует потерю нейронов, что характерно для широкого спектра патологий, таких как БА, БП, БАС, эпилепсия и других нейродегенеративных заболеваний. При БП уровни маркеров перекисного окисления повышены, в то время как в мозге происходит окислительное повреждение белков, дисфункция митохондрий и накопление железа и кальция (Chang & Chen, 2020). При БА показана роль окислительного

стресса и митохондриальной дисфункции вследствие агрегации β -амилоида (Abramov et al., 2004; Mushtaq et al., 2024).

1.4 Энергетический метаболизм мозга

1.4.1 Структурная организация митохондрий

Митохондрии – это внутриклеточные органеллы с двумя мембранами, служащие главными энергетическими станциями эукариотических клеток. В них происходит окислительное фосфорилирование, окисление жирных кислот, цикл трикарбоновых кислот (ЦТК), сборка железо-серных кластеров и буферизация кальция. В головном мозге их строение специфично для разных типов клеток в зависимости от их потребностей и метаболизма.

Митохондрии распределены в нейронах по всей клетке, с высокой концентрацией в пресинаптических терминалях и перехватах Ранвье на аксоне. Расположение митохондрий в этих местах обусловлено высокими энергетическими потребностями этих участков клетки. Внутриклеточная концентрация кальция, синаптическая активность и метаболический статус нейрона регулируют стыковку, закрепление и подвижность митохондрий. Повышение уровня цитозольного кальция способствует закреплению митохондрий с помощью кинезина в активных синапсах (López-Doménech & Kittler, 2023). Белок синтафилин дополнительно закрепляет неподвижные митохондрии на микротрубочках в зависимости от активности нервной клетки (Salzinger et al., 2025).

В нейронах митохондрии образуют длинные трубчатые сети из-за постоянного процесса слияния и деления. Слияние митохондрий происходит за счет работы белков-митофузинов MFN1/MFN2 на внешней мембране и ГТФазы OPA1 на внутренней мембране. Нарушения в этих процессах или генетические мутации могут приводить к нейродегенеративным заболеваниям (Huo et al., 2022).

Астроцитарные митохондрии отличаются от нейрональных своей дыхательной цепью. В нейронах комплексы I, III и IV объединяются в суперкомплексы (респирасомы), которые минимизируют утечку электронов в кислород. В астроцитах большая часть комплекса I существует в свободной,

несвязанной с суперкомплексами форме, что приводит к более высокой выработке митохондриального супероксида (Lopez-Fabuel et al., 2016; Vicente-Gutierrez et al., 2019). Митохондрии астроцитов играют важную роль в передаче нейромедиаторов в цикле глутамат-глутамин между нейронами и астроцитами, окислении жирных кислот, буферизации кальция вблизи синаптических контактов и поддержании окислительно-восстановительного баланса (Rose et al., 2020).

1.4.2 Митохондриальное дыхание и окислительное фосфорилирование

Окислительное фосфорилирование является основным механизмом синтеза АТФ в митохондриях в процессе клеточного дыхания (рис. 3). Процесс происходит на внутренней мембране митохондрий и включает два этапа: работу ЭТЦ и АТФ-синтазы.

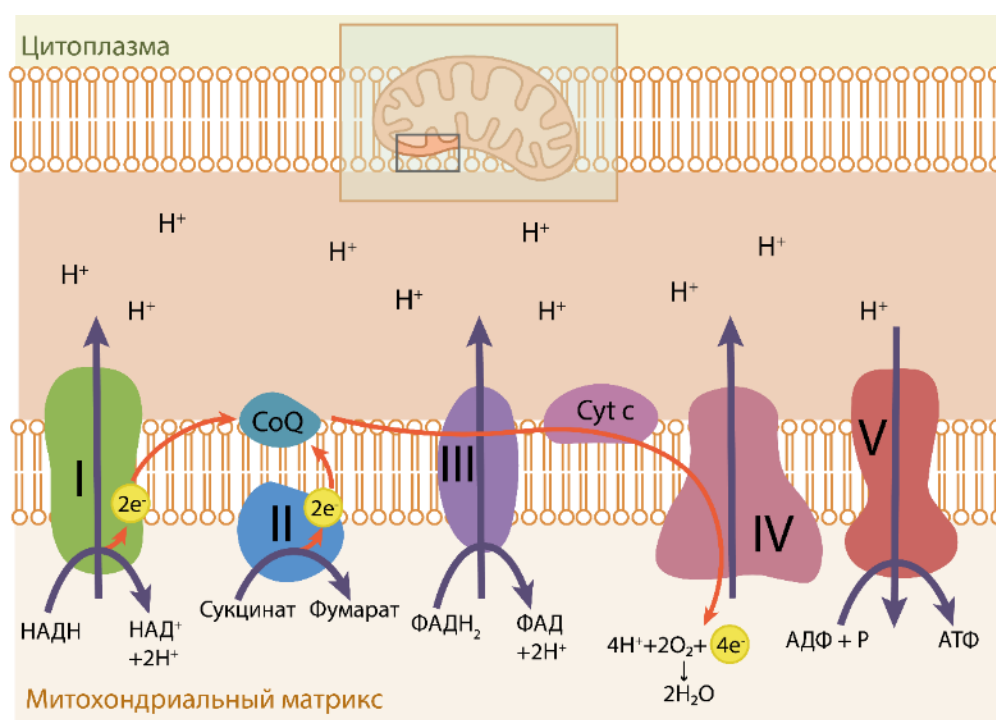


Рисунок 3 – Окислительное фосфорилирование и дыхание на внутренней мембране митохондрии. Комплексы I, III и IV переносят протоны из матрикса в межмембранное пространство, комплексы I и II передают электроны на убихинон (CoQ). Обратный ток H⁺ через АТФ-синтазу (V) сопряжен с синтезом АТФ. Адаптировано по (Bao et al., 2025)

На первом этапе происходит процесс переноса электронов через белковые комплексы ЭТЦ и выкачка протонов из митохондриального матрикса в

межмембранное пространство, создавая тем самым протонный градиент, который и является движущей силой для запуска АТФ-синтазы и синтеза АТФ. Создаваемый градиент формирует митохондриальный мембранный потенциал и составляет от -150 до -180 мВ (Vercellino & Sazanov, 2022).

НАДН, поступивший из цикла трикарбоновых кислот, передает электроны комплексу I, который переносит их на убихинон, одновременно перекачивая протоны через внутреннюю мембрану. ФАДН₂, генерируемый сукцинатдегидрогеназой (комплекс II), поступает на убихинон без перекачивания протонов на этом этапе. Электроны проходят через комплекс III, выкачивая протоны в межмембранное пространство, на цитохром c и через него на комплекс IV (цитохром c-оксидаза), который тоже перекачивает протоны и катализирует четырехэлектронное восстановление O₂ до H₂O. В итоге протонный градиент приводит в действие молекулярный вращающийся ротор АТФ-синтазы, необходимый для фосфорилирования АДФ и синтеза АТФ (Althaher & Alwahsh, 2023). Митохондриальный мембранный потенциал является параметром, от которого напрямую зависит синтез АТФ, образование АФК и поглощение кальция митохондриями (Ahmed Selim & Wojtovich, 2025).

α -синуклеин оказывает прямое влияние на синтез АТФ. Было показано, что у мышей с нокаутом гена α -синуклеина в митохондриях головного мозга наблюдалось снижение активности АТФ-синтазы, снижение запаса АТФ и частичное нарушение дыхания. Экзогенная добавка мономерного α -синуклеина восстанавливала эти нарушения, оказывая прямое воздействие на АТФ-синтазу головного мозга, взаимодействуя с ее α -субъединицей и повышая каталитическую эффективность ферментативного комплекса (Ludtmann et al., 2016). Было также показано, что агрегированные формы α -синуклеина могут взаимодействовать с АТФ-синтазой, однако из-за их неправильной структуры они, наоборот, блокируют синтез АТФ (Ludtmann et al., 2018).

1.4.3 Особенности энергетического метаболизма в различных типах клеток мозга

В нейронах почти 50% энергии АТФ идет на поддержание ионных градиентов Na^+/K^+ -АТФазой. Это необходимо для осуществления передачи нервного импульса и генерации потенциалов действия. Остальная энергия идет на поддержание рециркуляции синаптических везикул и аксонального транспорта (López-Doménech & Kittler, 2023). Основными субстратами для синтеза АТФ в нейронах являются глюкоза, поступающая из крови, и лактат, поступающий от астроцитов. Эти субстраты используются в окислительном фосфорилировании в митохондриях.

Астроциты тоже тратят большую часть энергии на работу Na^+/K^+ -насосов, кроме того, астроциты захватывают обратно нейромедиаторы из синаптической щели, такие как ГАМК и глутамат (Andersen, 2025). Их активный цитоскелет также потребляет энергию АТФ, поскольку они постоянно меняют форму своих отростков для выполнения различных функций, таких как контроль мозгового кровотока, формирование гематоэнцефалического барьера и Ca^{2+} сигнализация. Основным путем для синтеза энергии в астроцитах является аэробный гликолиз, то есть метаболизм глюкозы до лактата. В отличие от нейронов, астроциты накапливают гликоген, который потом могут использовать для получения энергии. Существует гипотеза лактатного челночного механизма, которую предложили Пеллерин и Магистретти в 1994 году (Pellerin & Magistretti, 1994). Они предположили, что в зависимости от активности поглощения глутамата в астроцитах запускается аэробный гликолиз. Образующийся лактат экспортируется через монокарбоксилатные транспортеры МСТ1 и МСТ4 и поглощается нейронами через МСТ2, где он превращается в пируват и окисляется в цикле трикарбоновых кислот. Однако этот механизм не является главным, поскольку было показано, что скорость окисления глюкозы астроцитами значительно выше по сравнению с лактатным челночным механизмом (Dienel, 2019; Kim et al., 2025).

1.4.4 Роль митохондриальной дисфункции в патологии мозга

Дисфункция митохондрий является патологическим механизмом, обнаруженным при многочисленных заболеваниях головного мозга. Такие нарушения, как избыточное образование АФК, нарушение буферизации кальция, нарушение митофагии и высвобождение проапоптотических факторов, были отмечены при БП, БА, болезни Хантингтона, БАС, инсульте и черепно-мозговой травме (Klemmensen et al., 2024).

Моделирование БП с помощью МРТР и ротенона, ингибиторов комплекса I митохондрий, воспроизводит основные паттерны БП. Мутации в генах, кодирующих белки контроля качества митохондрий PINK1, Parkin и DJ-1, вызывают аутосомно-рецессивную БП, что напрямую указывает на участие митохондрий в этиологии заболевания (Hu et al., 2021).

Существует взаимосвязь между α -синуклеином и митохондриальной дисфункцией. Физиологический мономерный α -синуклеин повышает эффективность АТФ-синтазы (Ludtmann et al., 2016). Однако α -синуклеин в олигомерной форме оказывает противоположный эффект. Агрегированный α -синуклеин взаимодействует с β -субъединицей АТФ-синтазы, индуцирует ее селективное окисление, способствует перекисному окислению липидов внутренней митохондриальной мембраны и снижает порог открытия митохондриальной поры, что приводит к ее открытию и клеточной смерти (Ludtmann et al., 2018). Агрегация α -синуклеина приводит к ферроптозу посредством накопления железа, нарушения регуляции кальция и перекисного окисления липидов (Angelova et al., 2020). Патологическая структурная трансформация α -синуклеина происходит преимущественно на поверхности митохондрий, где липидная среда катализирует образование токсичных соединений. Именно фибриллы α -синуклеина вызывают митохондриальную дисфункцию и гибель клеток в нейронах человека (Angelova et al., 2025).

1.5 Кальциевая сигнализация

1.5.1 Общие принципы кальциевой сигнализации в нейронах и астроцитах

Ионы кальция (Ca^{2+}) – это универсальный внутриклеточный вторичный мессенджер, регулирующий высвобождение нейромедиаторов, синаптическую пластичность, экспрессию генов, митохондриальный метаболизм и запрограммированную клеточную смерть.

В состоянии покоя нейронов и астроцитов концентрация свободного цитозольного Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) поддерживается на уровне 50-100 нМ, что в 20 000 раз ниже внеклеточной $[\text{Ca}^{2+}]$ (1,5-2,0 мМ) и в 5 000-10 000 раз ниже концентрации Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_{ER}$) внутри просвета эндоплазматического ретикулума (ЭР) (0,5-1,0 мМ). Такой электрохимический градиент создается преимущественно Ca^{2+} -АТФазой на плазматической мембране и поддерживается $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменником. Митохондриальное поглощение ионов Ca^{2+} идет через комплекс – митохондриальный кальциевый унипортер (Mitochondrial Calcium Uniporter, MCU). Гомеостаз кальция напрямую связан с энергетическим метаболизмом, снижение доступа к АТФ снижает способность кальциевого обмена (Ahmed Selim & Wojtovich, 2025).

В нейронах Ca^{2+} сигналы генерируются потенциал-зависимыми кальциевыми каналами (Voltage-gated calcium channels, VGCC), лиганд-зависимыми рецепторными каналами, включая NMDA-рецепторы и пуринаргические рецепторы P_2X , инозитолтрифосфатными рецепторами (IP_3R) и рианодиновыми рецепторами (RyR), а также депо-управляемым кальциевым входом (Store-Operated Calcium Entry, SOCE) (Heck et al., 2021). В астроцитах передача Ca^{2+} сигналов осуществляется преимущественно за счет продукции IP_3 , опосредованной метаботропными рецепторами, и последующего высвобождения ионов Ca^{2+} из ЭР, с дополнительным вкладом от SOCE и семейства каналов с транзиторным рецепторным потенциалом (Transient Receptor Potential, TRP) (Bai et al., 2024).

1.5.2 Основные кальциевые каналы

Потенциал-зависимые кальциевые каналы представляют собой основные каналы для входа ионов Ca^{2+} в нейроны, индуцированного деполяризацией. Семейство включает десять членов в трех подсемействах: CaV1 (L-тип), CaV2 (P/Q-, N- и R-тип) и CaV3 (T-тип). В пресинаптических терминалях каналы CaV2.1 (P/Q-тип) и CaV2.2 (N-тип) обеспечивают приток ионов Ca^{2+} для слияния везикул с мембранами и выброса нейромедиатора в синаптическую щель. На постсинаптических мембранах находятся каналы CaV1.2 и CaV1.3 (L-тип), обеспечивающие вход ионов Ca^{2+} в дендриты (Zamponi et al., 2015). При БП дофаминергические нейроны черной субстанции используют L-тип каналы CaV1.3 для поддержания автономной генерации ритма 2-5 Гц, создавая постоянную нагрузку кальциевого потока. Кальций-зависимая генерация ритма делает нейроны черной субстанции уязвимыми к стрессорным факторам старения, агрегации α -синуклеина и митохондриальной дисфункции (Surmeier et al., 2017).

Рецептор-опосредованный вход ионов Ca^{2+} в нейроны осуществляется в основном NMDA-рецепторами, кальций-проницаемыми AMPA-рецепторами и пуринергическими рецепторами P_2X .

Вход кальция, опосредованный запасами (Store-Operated Calcium Entry, SOCE), запускается истощением запасов ионов Ca^{2+} в эндоплазматическом ретикулуме. Специальные сенсорные белки STIM (STIM1, STIM2) реагируют на истощение запасов ионов Ca^{2+} в просвете эндоплазматического ретикулума, олигомеризуются и мигрируют к контактам ЭР с плазматической мембраной, где они непосредственно регулируют работу каналов Orai. SOCE восполняет запасы кальция в ЭР и поддерживает длительную кальциевую сигнализацию, выполняя важную роль в синаптической пластичности, морфологии шипиков и нейрональном гомеостазе (Courjaret et al., 2024).

1.5.3 Митохондриальный кальциевый транспорт

Митохондрии служат буферами для ионов Ca^{2+} , они быстро связывают свободные ионы Ca^{2+} во время сигнальных событий и медленно высвобождают его

при завершении сигнала. Поглощение ионов Ca^{2+} митохондриями происходит за счет MCU. Это высокоселективный для ионов Ca^{2+} канал на внутренней мембране митохондрий. Комплекс MCU включает в себя порообразующую субъединицу MCU, доминантно-негативный паралог MCUb, необходимую регуляторную субъединицу EMRE и димер MICU1/MICU2, выполняющий функцию регулятора (Wang et al., 2025).

Поступление ионов Ca^{2+} через MCU определяется величиной мембранного потенциала, поэтому любой фактор, меняющий мембранный потенциал митохондрий, влияет на поглощение ионов Ca^{2+} через MCU. Отток ионов Ca^{2+} из митохондрий осуществляется в основном митохондриальным $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменником (NCLX). Скорость оттока, опосредованного NCLX, значительно ниже скорости поглощения через MCU, что дает возможность митохондриям накапливать ионы Ca^{2+} и определяет стационарную $[\text{Ca}^{2+}]_m$ в матриксе. Это позволяет запускать дегидрогеназы цикла трикарбоновых кислот, такие как пируватдегидрогеназу, изоцитратдегидрогеназу и альфа-кетоглутаратдегидрогеназу, стимулируя выработку НАДН и синтез АТФ (Matuz-Mares et al., 2022). Поскольку α -синуклеин может взаимодействовать с АТФ-синтазой (Ludtmann et al., 2016), предполагается, что изменения в экспрессии синуклеинов могут приводить к сдвигу митохондриального потенциала и, как следствие, к изменению регуляции Ca^{2+} обмена в митохондриях.

1.5.4 Взаимосвязь кальциевого сигнала, продукции АФК и энергетического метаболизма

Системы кальциевой, АФК и энергетической сигнализации тесно взаимосвязаны, при этом митохондрия является объединяющим фактором. Поглощение и накопление ионов Ca^{2+} митохондриями стимулирует дегидрогеназы цикла трикарбоновых кислот (Walkon et al., 2022), увеличивая поступление НАДН, а также синтез АТФ и утечку электронов на кислород, что приводит к повышению образования АФК (Brand, 2016). АФК способны окислять цистеины на рианодиновых рецепторах и рецепторах IP_3 , усиливая высвобождение ионов Ca^{2+}

из ЭР. В то же время повышение $[Ca^{2+}]_i$ активирует кальций-зависимую НАДФН-оксидазу, которая в ходе своей активности генерирует супероксид (Angelova & Abramov, 2016). Было продемонстрировано, что дофамин индуцирует передачу Ca^{2+} сигналов в астроцитах через АФК, генерируемые моноаминооксидазой (Vaarmann et al., 2010).

1.5.5 Митохондриальная мегапора и клеточная гибель

Когда приток ионов Ca^{2+} превышает буферную способность клетки, чрезмерная Ca^{2+} нагрузка митохондрий приводит к повышенному производству АФК, которые окисляют мембранные липиды и повреждают комплексы ЭТЦ, еще больше снижая мембранный потенциал митохондрий, нарушая синтез АТФ и уменьшая активность АТФ-зависимых кальциевых насосов (Baev et al., 2024; Matuz-Mares et al., 2022). Этот механизм постепенно усиливает перегрузку кальцием, что в конечном итоге приводит к гибели клетки из-за открытия митохондриальной поры.

Митохондриальная мегапора или митохондриальная пора проницаемости (mPTP) – это неселективный канал с высокой пропускной способностью во внутренней митохондриальной мембране, длительное открытие которой вызывает набухание митохондрий и последующую гибель клетки. mPTP открывается в ответ на перегрузку матрикса ионами Ca^{2+} , которая усиливается окислительным стрессом, высоким содержанием неорганического фосфата и истощением адениновых нуклеотидов. При открытии через нее могут проходить вещества размером до 1,5 кДа, которые обычно слишком велики для того, чтобы проходить через целую плазматическую мембрану с помощью пассивной диффузии. Этот процесс вызывает немедленный коллапс клетки, остановку синтеза АТФ, набухание матрикса и разрыв внешней мембраны (Bernardi et al., 2023).

Открытие поры является одним из патологических механизмов нейродегенерации, посредством которого возникает митохондриальная дисфункция, перегрузка кальцием и окислительный стресс, приводящие к гибели нейронов (Baev et al., 2024). Существует связь между α -синуклеином и

митохондриальной порой проницаемости. Олигомерный α -синуклеин взаимодействует с β -субъединицей АТФ-синтазы, вызывает ее селективное окисление, способствует перекисному окислению липидов внутренней митохондриальной мембраны и снижает пороговое значение $[Ca^{2+}]_m$ для открытия mPTP (Ludtmann et al., 2018). Также было показано, что фибриллы α -синуклеина сами по себе вызывают митохондриальную дисфункцию и гибель клеток в нейронах человека (Angelova et al., 2025).

1.6 Передача сигнала в клетках мозга

1.6.1 Глутаматергическая передача сигнала

Глутамат является основным возбуждающим нейромедиатором в центральной нервной системе млекопитающих. Он играет важную роль в обучении, консолидации памяти, развитии нервной системы и синаптической пластичности. Глутаматные рецепторы делятся на ионотропные и метаботропные (рис. 4). Ионотропные глутаматные рецепторы (iGluR) представляют собой лиганд-управляемые катионные каналы, опосредующие быстрые возбуждающие постсинаптические токи. К ним относятся NMDA-рецепторы, AMPA-рецепторы и каинатные рецепторы (Hansen et al., 2021).

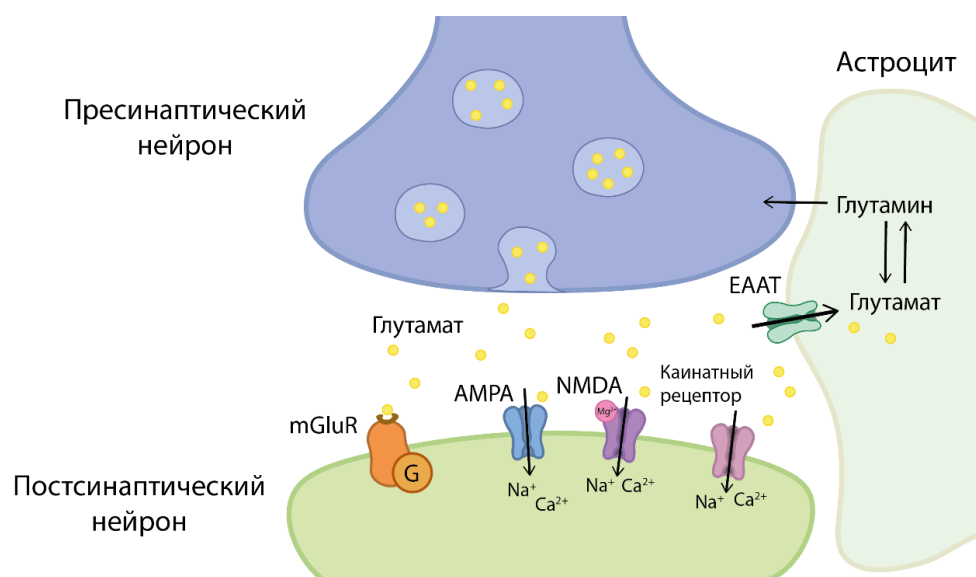


Рисунок 4 – Глутаматергическая передача сигнала. Выброс глутамата, постсинаптические каинатные рецепторы, AMPA, NMDA и mGluR. Захват глутамата астроцитом через EAAT, цикл глутамат–глутамин. Адаптировано по (de León-López et al., 2025)

NMDA-рецепторы представляют собой гетеротетрамерные комплексы, состоящие из основной субъединицы GluN1 и регуляторных субъединиц GluN2 или GluN3. Они являются лиганд-управляемыми каналами с потенциал-зависимой Mg^{2+} -блокировкой. При связывании глутамата с рецептором происходит конформационное изменение структуры этого белка и открытие канала, который заблокирован магнием в условиях потенциала покоя. При деполяризации постсинаптической мембраны магниевый блок снимается и ионы Na^+ и Ca^{2+} пассивно проходят по электрохимическому градиенту через канал. Эти рецепторы обладают высокой проницаемостью для ионов Ca^{2+} , медленной деактивацией и необходимостью связывания с ко-агонистом (глицином или D-серином) (Mony & Paoletti, 2023).

AMPA-рецепторы опосредуют большую часть быстрой возбуждающей передачи. Большинство зрелых AMPA-рецепторов содержат модифицированный GluA2, в котором, в результате редактирования РНК, в сайте Q/R трансмембранного домена M2 глутамин заменен на аргинин, что делает их непроницаемыми для ионов Ca^{2+} . Однако кальций-проницаемые AMPA-рецепторы (CP-AMPA) экспрессируются в определенных популяциях интернейронов и привлекли внимание как потенциальные медиаторы эксайтотоксического повреждения и терапевтические мишени при эпилепсии (de León-López et al., 2025).

Вместе с NMDA-рецептором AMPA-рецепторы участвуют в процессах синаптической пластичности, долговременной потенциации (LTP) и долговременной депрессии (LTD) (Hansen et al., 2021). Вследствие притока ионов Ca^{2+} через NMDA-рецепторы и локального повышения внутриклеточной концентрации ионов кальция ($[Ca^{2+}]_i$) в постсинаптическом нейроне запускаются биохимические каскады и процесс выхода AMPA-рецепторов на поверхность постсинаптической мембраны из внутриклеточного пула, тем самым увеличивая эффективность синаптической передачи и поддерживая LTP (Díaz-Alonso & Nicoll, 2021). Механизм LTD противоположен: при продолжительном повышении $[Ca^{2+}]_i$ или mGluR-зависимой сигнализации AMPA-рецепторы уходят с поверхности

синаптической мембраны обратно во внутриклеточное хранилище, ослабляя синаптическую передачу (Bin Ibrahim et al., 2022).

Метаботропные глутаматные рецепторы (mGluR) классифицируются на три группы: группа I (mGluR1, mGluR5) сопряжена с Gq-белками и активирует PLC β , что приводит к образованию IP $_3$ и DAG. Группы II (mGluR2, mGluR3) и III (mGluR4, mGluR6, mGluR7, mGluR8) сопряжены с Gi/Go-белками и, как правило, ингибируют аденилатциклазу (Ribeiro et al., 2017).

Эксайтотоксичность относится к патологическому процессу, при котором чрезмерная активация глутаматных рецепторов вызывает гибель нейронов из-за массивного притока ионов Ca $^{2+}$, перегрузки митохондрий, избыточной продукции АФК и открытия митохондриальной поры (Verma et al., 2022).

1.6.2 Дофаминергическая передача сигнала

Дофамин – это катехоламиновый нейромедиатор, играющий важную роль в управлении двигательной активностью, положительном подкреплении, мотивации, когнитивных функциях и нейроэндокринной системе. Дофаминовые рецепторы классифицируются на семейство возбуждающих D1-подобных (D1 и D5), стимулирующее аденилатциклазу, и семейство тормозных D2-подобных (D2, D3, D4), ингибирующее аденилатциклазу (рис. 5). В дорсальном стриатуме рецепторы D1 и D2 в основном разделены на средние шипиковые нейроны прямого и непрямого путей стриатума (Beaulieu & Gainetdinov, 2011). Помимо опосредованной цАМФ-сигналикации, дофамин активирует рецептор-зависимую кальциевую сигнализацию посредством D1-опосредованного усиления токов L-типа Ca $^{2+}$ -каналов и связи D1-Gq/PLC/IP $_3$. Рецепторы D2 модулируют Ca $^{2+}$ - и K $^{+}$ -каналы через субъединицы G $\beta\gamma$.

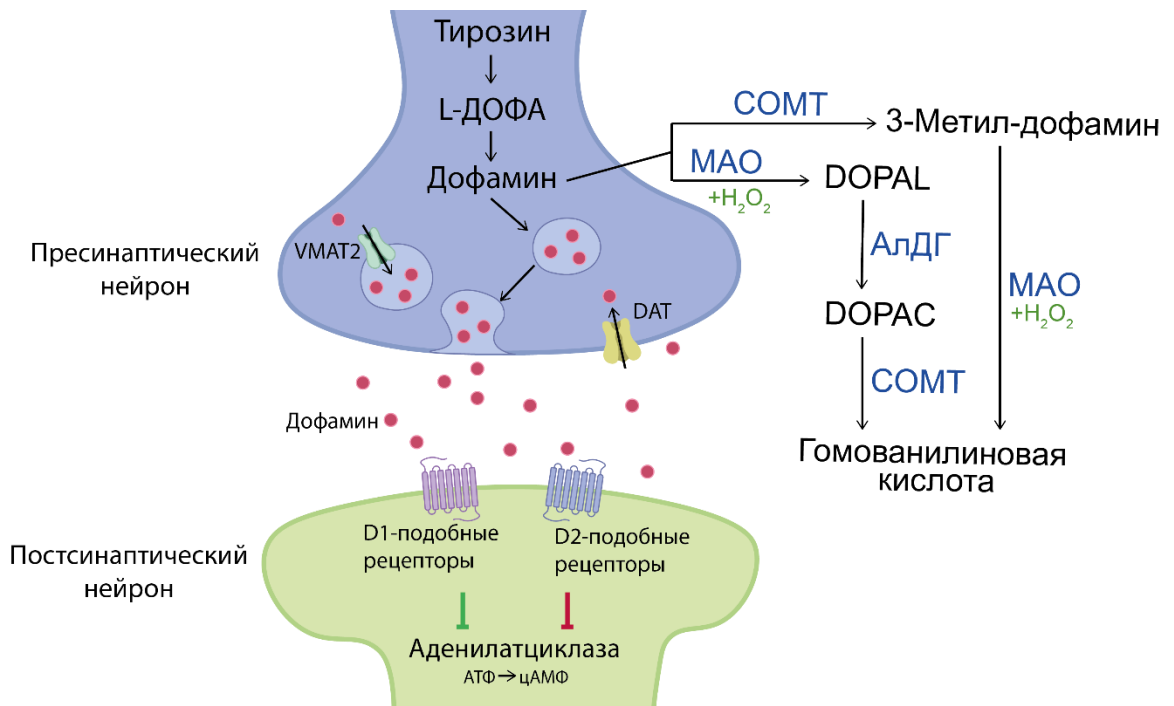


Рисунок 5 – Дофаминергическая передача сигнала. Синтез дофамина (тирозин → L-ДОФА → дофамин), везикулярная загрузка (VMAT2), рецепторы D1 и D2, обратный захват через транспортер дофамина (DAT), распад дофамина через моноаминоксидазу (MAO), катехол-О-метилтрансферазу (COMT). АлДГ – альдегиддегидрогеназа, ДОПАЛ – 3,4-дигидроксифенилацетальдегид, ДОПАК – 3,4-дигидроксифенилуксусная кислота. Адаптировано по (Nam et al., 2022)

Помимо классического рецепторного пути, дофамин может влиять на клеточную сигнализацию посредством нереперторного механизма, полностью независимого от активации дофаминовых рецепторов. В частности, в экспериментах на астроцитах, добавление экзогенного дофамина индуцирует выраженные Ca^{2+} -ответы через нереперторный путь, включающий поглощение дофамина, MAO-опосредованный метаболизм, генерацию H_2O_2 , и последующее высвобождение кальция из ЭР посредством окисления IP_3 -рецепторов (Vaarmann et al., 2010). Метаболизм дофамина является источником АФК. MAO катализирует окислительное дезаминирование дофамина до 3,4-дигидроксифенилацетальдегида (ДОПАЛ), генерируя H_2O_2 . Цитозольный дофамин также подвергается окислению до реактивных дофаминовых хинонов и родственных промежуточных продуктов (Rasool et al., 2024).

1.6.3 Патологии, сопровождающиеся нарушениями баланса нейромедиаторов

БП представляет собой нейродегенеративное состояние, связанное с дефицитом дофамина. Она обусловлена потерей дофаминергических нейронов в черной субстанции и скоплением патологически агрегированного α -синуклеина, которое называется тельцами Леви (Sivakumar et al., 2023). Избирательная уязвимость дофаминергических нейронов компактной части черной субстанции (substantia nigra pars compacta, SNpc) объясняется совокупностью факторов. Нейроны SNpc имеют широко ветвящиеся аксоны, в результате чего эти нейроны работают на пределе своих энергетических способностей и являются уязвимыми к нарушениям, связанным с энергетикой клетки. Спонтанная ритмическая активность или пейсмейкинг нейронов SNpc сопровождается входом ионов кальция через CaV1, для них необходим постоянный кальциевый вход, поэтому процессы, ведущие к нарушению Ca^{2+} гомеостаза, являются смертельными для этих клеток. Метаболизм дофамина в нейронах SNpc является источником АФК вследствие работы ферментов, таких как MAO, и создает дополнительную митохондриальную и кальциевую нагрузку. В сочетании с патологической агрегацией α -синуклеина, которая нарушает везикулярный транспорт, работу АТФ-синтазы и ведет к митохондриальной дисфункции (Ludtmann et al., 2018), усиливается нагрузка на нейроны SNpc, что ведет к их гибели (Martino et al., 2026; Surmeier et al., 2017).

Шизофрения ассоциируется с нарушениями в дофаминергической сигнализации. Симптоматика разделяется на два типа: позитивная, с мезолимбической дофаминергической гиперактивностью, при которой обостряются бред, галлюцинации и спутанность сознания, и негативная, с мезокортикальной гипофункцией, сопровождающейся симптомами апатии и когнитивных нарушений. Была продемонстрирована значительно повышенная способность к пресинаптическому синтезу дофамина у пациентов с шизофренией. У пациентов была обнаружена повышенная концентрация дофамина в

пресинаптических терминалях, а также его повышенный синтез и высвобождение. При этом доступность транспортера дофамина не изменилась (Howes et al., 2012).

Эпилепсия связана с дисбалансом между возбуждающей и тормозящей системами передачи сигнала в мозге, при этом чрезмерная глутаматергическая активность приводит к возникновению судорог и эксайтотоксическому повреждению, особенно нейронов гиппокампа в слоях CA1 (Green et al., 2021). При усилении глутаматергической передачи и параллельном ослаблении тормозных процессов формируется патологическая высокоамплитудная гиперсинхронная активность, которая в клинической картине проявляется как замирание или судорожный приступ. Такие процессы запускают эксайтотоксичность и Ca^{2+} -зависимое повреждение нейронов, которое ведет к повышенной генерации АФК, митохондриальной дисфункции и клеточной смерти (Verma et al., 2022).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Используемые реактивы и оборудование

В работе использовали реактивы аналитической степени чистоты. Компоненты солевых растворов и буферов (NaCl, KCl, CaCl₂, MgSO₄, MgCl₂, KН₂PO₄, Na₂HPO₄, NaHCO₃, D-глюкоза, HEPES, сахароза, EGTA, Tris), ферменты, ингибиторы дыхательной цепи и протонофоры (FCCP, олигомицин, NaCN, йодуксусная кислота (ИУК), а также флуоресцентные зонды TMRM, MitoTracker Red CM-H2Xros, ди гидроэтидий (ДГЭ), монохлоробиман (MCB), X-Rhod-1 AM, Mag-Fura-2 AM, Calcium Green-5N от производителей (Thermo Fisher Scientific/Invitrogen, США; Sigma-Aldrich, США; ПанЭко, Россия; Gibco, США). Среды для культивирования и сыворотки – производства ПанЭко (Россия) и Gibco (США).

Основное аналитическое оборудование: лазерный сканирующий конфокальный микроскоп Zeiss LSM 900 (Carl Zeiss AG, Германия); инвертированный широкопольный флуоресцентный микроскоп на базе Olympus IX73P1F (Olympus Corporation, Япония) с системой возбуждения/регистрации флуоресценции Cairn (Cairn Research Ltd., Великобритания) и охлаждаемой sCMOS-камерой (Teledyne Photometrics, Канада); источники светодиодного возбуждения и наборы интерференционных светофильтров (Thorlabs, США; Cairn Research, Великобритания); вибрационный микротом Campden 7000smz-2 (Campden Instruments, Великобритания); многофункциональный планшетный ридер CLARIOstar Plus (BMG Labtech, Германия); гомогенизатор Поттера (Wenk LabTec, Германия) и рефрижераторная центрифуга (Sigma Zentrifugen, Германия) для дифференциального фракционирования.

2.2 Объекты исследования

2.2.1 Линии используемых животных

Исследование выполнено на половозрелых самцах в возрасте 12–24 недель, полученных на генетическом фоне линии C57BL/6J. Использовали животных с

направленной инактивацией (нокаутом) генов, кодирующих белки семейства синуклеинов, в различных комбинациях: одиночные нокауты α -синуклеина (B6(Cg)-Snc^{tm1.2Vlb}), β -синуклеина (B6(Cg)-Sncb^{tm1Sud}) и γ -синуклеина (B6(Cg)-Sncg^{tm1Vlb}), а также комбинированные (двойной $\alpha\gamma$ - и тройной $\alpha\beta\gamma$ -) нокауты. Все линии были получены на генетическом фоне линии C57BL/6J. Контрольную группу составляли мыши дикого типа (ДТ) линии C57BL/6J без генетических модификаций. Животные предоставлены биоресурсной коллекцией ЦКП и ЦДИ ИФАВ РАН (программа FFSG-2024-0020). Поддержание колонии и генотипирование, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), проводилось по описанным протоколам (Vorobyov et al., 2022).

Животных содержали в стандартных условиях вивария категории SPF (specific pathogen-free): световой режим 12 ч свет/12 ч темнота, температура 19–23 °С, относительная влажность 40–55 %, при свободном доступе к корму и воде.

Все процедуры были выполнены в соответствии с требованиями Директивы 2010/63/EU об охране животных, используемых в научных целях, рекомендациями ARRIVE, а также в соответствии с принципами надлежащей лабораторной практики и этическими нормами по гуманному обращению с животными и одобрены этическим комитетом при ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева» (Протокол № 2 от 06.12.2024).

2.2.2 Приготовление переживающих срезов головного мозга

Эвтаназию осуществляли путем цервикальной дислокации с последующей декапитацией. Головной мозг извлекали из черепной коробки менее чем за 60 с и сразу же погружали в ледяной (0–4 °С) раствор для нарезки составом (мМ): K-gluconate 140, HEPES 10, Na-gluconate 15, EGTA 0.2, NaCl 4; pH 7.4. Быстрое охлаждение замедляет метаболизм, снижает эксайтотоксическое накопление глутамата и ограничивает Ca^{2+} -зависимое повреждение ткани при механическом воздействии. В качестве среды для последующей инкубации и съемки использовали раствор Хэнкса (HBSS), с буфером HEPES, следующего состава (мМ): NaCl 138, KCl 5,3, CaCl_2 1,3, MgSO_4 0,4, MgCl_2 0,5, KH_2PO_4 0,45, Na_2HPO_4 0,3,

NaHCO₃ 4, D-глюкоза 5,6–10, HEPES 20; pH доводили до 7,4 раствором NaOH. Срезы инкубировали без продувки карбогеном (95% O₂+5% CO₂). Это снижает риск гипероксического артефакта при редокс-измерениях, но требует осторожности при сопоставлении с работами, выполненными на карбогене.

Коронарные срезы коры головного мозга толщиной 200 мкм получали на вибрационном микротоме Campden 7000smz-2 (Campden Instruments, Великобритания) со стальным лезвием при малой скорости подачи ($\approx 0,03$ мм/с), амплитуде вибрации лезвия 1,0 мм и частоте 80 Гц. Низкая скорость продвижения и высокочастотная латеральная вибрация лезвия минимизируют деформацию ткани и сохраняют жизнеспособность поверхностных слоев клеток. Срезы переносили в инкубационную камеру с HBSS и выдерживали не менее 30 мин при температуре (22–25 °C) для восстановления. Регистрацию проводили в течение 1–2 ч после приготовления срезов.

2.2.3 Получение первичной нейрон-глиальной культуры

Первичные нейрон-глиальные культуры, содержащие преимущественно нейроны и астроциты коры, получали из новорожденных мышат (P0–P2). Животных декапитировали в условиях гипотермической анестезии, мозг извлекали в стерильных условиях и помещали в холодный фосфатно-солевой буфер (PBS; ПанЭко, Россия) с добавлением Na₂-ЭДТА. Хелатирование Ca²⁺ ослабляет кадгериновые межклеточные контакты и облегчает последующую диссоциацию. После удаления мозжечка и гиппокампа ткань коры измельчали на фрагменты ~ 1 мм³ и подвергали ферментативной обработке 0,05 % раствором трипсина в течение 15 мин при 37 °C. Трипсин гидролизует белки внеклеточного матрикса и адгезионные молекулы, разрушая тканевую архитектуру до уровня отдельных клеток.

Действие фермента останавливали трехкратной отмывкой Нейробазальной средой (ПанЭко, Россия), после чего проводили механическую диссоциацию путем последовательного пропускания суспензии через пипетки с постепенно уменьшающимся диаметром кончика. Клетки осаждали центрифугированием (200

г, 5 мин), осадок ресуспендировали в свежей Нейробазальной среде, дополненной 2 % НейроМакс (ПанЭко, Россия), 2 mM L-аланил-L-глутамином (Gibco, США), пенициллином (100 Ед/мл) и стрептомицином (100 мкг/мл) (ПанЭко, Россия). Бессывороточная среда Neurobasal/NeuroMax поддерживает преимущественно нейрональный фенотип и ограничивает избыточную пролиферацию глии. Клетки высевали на круглые покровные стекла диаметром 25 мм, предварительно обработанные полиэтиленгликолем (0,05 %) для улучшения адгезии, при плотности $\sim 1 \times 10^5$ клеток/см². Нейрон-глиальные культуры содержали при 37 °C в атмосфере 5 % CO₂, среду частично заменяли каждые 3–4 дня.

Эксперименты выполняли на зрелых нейрон-глиальных культурах на 10–14-й день культивирования, к этому сроку нейроны демонстрируют спонтанную синаптическую активность, а астроциты формируют монослой.

2.2.4 Получение суспензии изолированных митохондрий мозга

Митохондрии выделяли из переднего мозга мышей методом дифференциального центрифугирования по ранее описанным протоколам (Baev et al., 2022) с модификациями. Препараты получали параллельно из четырех групп животных (ДТ, α -КО, γ -КО и $\alpha\beta\gamma$ -КО), что обеспечивало идентичность условий выделения и корректность межгрупповых сравнений.

Животных подвергали эвтаназии цервикальной дислокацией с последующей декапитацией. Передний мозг извлекали, очищали от оболочек и сосудов и измельчали в среде выделения (mM): сахараза 300, HEPES 10, EGTA 10; БСА 0,01 %; pH 7,2, доведенный КОН. Изотоническая сахараза сохраняет осмотическую целостность органелл, EGTA связывает свободные ионы Ca²⁺, предотвращая активацию Ca²⁺-зависимых фосфолипаз и открытие поры, БСА связывает свободные жирные кислоты, обладающие разобщающим действием. Ткань измельчали до однородного состояния в гомогенизаторе Поттера при 400 об/мин до получения гомогенной суспензии. Для повышения выхода митохондрий из синапсом создавали кратковременное отрицательное давление быстрым извлечением плотно пригнутого пестика. Все операции выполняли на льду.

Гомогенат центрифугировали 10 мин при 800 g и 1 °C для осаждения ядер, фрагментов клеток и неразрушенной ткани. Супернатант переносили в чистую пробирку и добавляли дигитонин до конечной концентрации 0,02 %, осторожно перемешивая 1–2 мин. Дигитонин избирательно встраивается в богатые холестерином плазматические и синапсомембранные мембраны, разрушая их и высвобождая интрасинаптические митохондрии, при этом митохондриальные мембраны с низким содержанием холестерина остаются интактными. Далее суспензию центрифугировали 13 мин при 13 000 g и 1 °C, осадок митохондрий ресуспендировали в 15 мл среды выделения (СВ) без дигитонина и БСА и повторно центрифугировали при тех же параметрах для отмывки. Конечный осадок ресуспендировали в 200 мкл СВ без дигитонина и БСА. Концентрацию белка определяли методом Брэдфорда с БСА в качестве стандарта. Все функциональные эксперименты проводили в течение 4 ч после выделения, пока митохондрии сохраняют способность к дыханию и удержанию кальция.

2.3 Исследование энергетического метаболизма

2.3.1 Измерение митохондриального мембранного потенциала

Митохондриальный мембранный потенциал ($\Delta\psi_m$) оценивали с помощью потенциалзависимого флуоресцентного зонда тетраметилродамин-метилового эфира (TMRM; Thermo Fisher Scientific, США). TMRM – липофильный катион, который распределяется через мембраны согласно уравнению Нернста: его равновесное накопление в матриксе экспоненциально зависит от величины $\Delta\psi_m$, отрицательного внутри. Чем выше потенциал, тем сильнее краситель концентрируется в митохондриях, снижение или коллапс $\Delta\psi_m$ сопровождается выходом зонда в цитозоль и падением локальной интенсивности флуоресценции. Зонд использовали в низкой концентрации, когда самотушение флуоресценции минимально и сигнал линейно отражает изменения потенциала.

Переживающие срезы (200 мкм) и нейрон-глиальные культуры инкубировали с 25 нМ TMRM в HBSS в течение 40 мин при комнатной температуре в темноте без последующей отмывки. Такую же концентрацию зонда

поддерживали в растворе на всем протяжении эксперимента во избежание артефактов перераспределения. Изображения получали на конфокальном микроскопе Zeiss LSM 900 (объективы 10×/20×) в режиме послойного сканирования (z-стек, шаг 0,5 мкм), возбуждение лазером 561 нм, регистрация эмиссии в диапазоне 565–650 нм.

Уровень $\Delta\psi_m$ оценивали по максимальной интенсивности флуоресценции TMRM в клетке. Данные выражали в условных единицах флуоресценции, нормированных на среднее значение группы ДТ, полученного в тот же день эксперимента, и сравнивали между генотипами. Для подтверждения потенциалзависимой природы сигнала в части экспериментов после блокады АТФ-синтазы олигомицином применяли протонофор FCCP (1 мкМ), полностью рассеивающий $\Delta\psi_m$. В экспериментах по восстановлению $\Delta\psi_m$ нейрон-глиальные культуры инкубировали с 30 нМ мономерного α -синуклеина в течение 1 ч.

2.3.2 Измерение уровня НАД(Ф)Н

Уровень митохондриального НАДН оценивали по собственной (автофлуоресценции) флуоресценции восстановленных пиридиновых нуклеотидов НАД(Ф)Н в переживающих срезах. Восстановленные формы НАДН/НАДФН флуоресцируют при УФ-возбуждении, тогда как окисленные ($NAD^+/NADP^+$) – нет, поэтому интенсивность автофлуоресценции отражает редокс-состояние пула пиридиновых нуклеотидов, в значительной мере определяемое балансом между поступлением восстановительных эквивалентов в цикле Кребса и их окислением комплексом I дыхательной цепи.

Автофлуоресценцию НАД(Ф)Н возбуждали светодиодом 365 нм (M365FP1, Thorlabs, США), эмиссию регистрировали на 423–467 нм (MF445-45, Thorlabs, США). Для выделения митохондриальной компоненты сигнала в каждом поле зрения проводили двухточечную фармакологическую калибровку. После регистрации стабильного базального уровня (F_{basal}) применяли разобщитель FCCP (1 мкМ; Sigma-Aldrich), который максимально активирует дыхательную цепь и окисляет НАДН, задавая минимум сигнала ($F_{\text{min}} = 0 \%$). Остаточную

флуоресценцию принимали за уровень автофлуоресценции НАДФН и немитохондриального НАДН. Затем применяли ингибитор комплекса IV – цианид натрия (NaCN, 1 mM, Sigma-Aldrich), который блокирует терминальное окисление и вызывает максимальное накопление восстановленной формы ($F_{\text{max}} = 100\%$). Митохондриальный уровень НАДН рассчитывался как амплитуда автофлуоресценции между F_{min} после FCCP и F_{max} после NaCN в исходных единицах. Текущий редокс-индекс рассчитывали, как положение базального сигнала (F_{basal}) между этими двумя точками. Скорость продукции НАДН рассчитывалась по угловому коэффициенту кривой на интервале регистрации. Области интереса (ОИ) выделяли вручную в слоях коры мозга.

2.3.3 Измерение относительного уровня АТФ и скорости потребления АТФ

Энергетическую емкость клеток оценивали с помощью мембранопроницающего индикатора Mag-Fura-2 AM (Invitrogen / Thermo Fisher Scientific, США). Mag-Fura-2 – низкоаффинный к двухвалентным катионам ратиометрический зонд: к ионам Mg^{2+} он имеет относительно низкое сродство ($K_d \sim 1,5\text{--}5\text{ mM}$), а к ионам Ca^{2+} – высокое ($K_d \sim 25\text{ мкМ}$). В цитозоле Mag-Fura-2 работает как магниевый индикатор, поскольку физиологическая концентрация свободного Mg^{2+} находится в миллимолярном диапазоне, тогда как базальный уровень Ca^{2+} слишком мал для насыщения зонда. Поскольку основная доля внутриклеточных ионов Mg^{2+} связана в комплекс Mg-АТФ, гидролиз АТФ при истощении энергии высвобождает свободные ионы Mg^{2+} , что повышает сигнал индикатора, одновременно сродство к ионам Ca^{2+} позволяет регистрировать резкое, многократное возрастание $[\text{Ca}^{2+}]_i$ при потере ионного гомеостаза.

Клетки загружали 5 мкМ Mag-Fura-2 AM в HBSS (мМ: NaCl 138, CaCl_2 1,3, MgSO_4 0,4, MgCl_2 0,5, KCl 5,3, KH_2PO_4 0,45, NaHCO_3 4, Na_2HPO_4 0,3, D-глюкоза 10, HEPES 20; pH 7,4) в течение 30 мин при 37 °C. Ацетоксиметильная (AM) форма электронейтральна и проникает через мембрану, после чего внутриклеточные эстеразы отщепляют AM-группы, переводя зонд в заряженную, удерживаемую в

цитозоле форму. После загрузки клетки дважды отмывали HBSS и выдерживали 15 мин для полной деэстерификации красителя.

Регистрацию выполняли на широкопольном флуоресцентном микроскопе на базе Olympus IX73P1F (Olympus, Япония) с системой Cairn (Cairn Research, Великобритания) и флюоритовым иммерсионным объективом 40×. Возбуждение проводили на 340-380 нм с регистрацией эмиссии в области 505-510 нм. Отношение интенсивностей флуоресценции при возбуждении 340/380 нм компенсирует неравномерность загрузки красителя, фотовыцветание и различия толщины клеток, повышая надежность количественной оценки $[Mg^{2+}]_i$ и фиксации момента резкого подъема $[Ca^{2+}]_i$.

Скорость потребления макроэргов оценивали по динамике сигнала Mag-Fura-2 после одновременного ингибирования митохондриального синтеза АТФ (NaCN – ингибитор комплекса IV) и гликолиза (йодуксусная кислота, ИУК – ингибитор глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы). В условиях блокады обоих путей синтеза АТФ запасы макроэрга истощаются, после чего клетка теряет способность поддерживать трансмембранный градиент кальция, и $[Ca^{2+}]_i$ резко возрастает. Поскольку зонд имеет аффинность к ионам Ca^{2+} , отражается резкое нарастание. Интервал времени между началом ингибирования синтеза АТФ и моментом коллапса кальциевого градиента рассматривали как меру энергетической емкости клеток.

2.4 Исследование продукции активных форм кислорода

2.4.1 Измерение продукции АФК в митохондриях

Генерацию АФК в митохондриях оценивали с помощью зонда MitoTracker Red CM-H2Xros (Thermo Fisher Scientific, США). Это восстановленная, нефлуоресцирующая форма (дигидро-производное) красителя, содержащая тиол-реактивную хлорметильную группу. Накапливаясь в митохондриях в зависимости от $\Delta\psi_m$, зонд окисляется внутри-митохондриальными АФК до флуоресцирующего производного, которое ковалентно фиксируется на тиолах матричных белках. Нарастание флуоресценции во времени отражает кинетику продукции АФК.

Нейрон-глиальные культуры инкубировали в HBSS с 500 нМ MitoTracker Red CM-H2Xros 10 мин при комнатной температуре. Покадровую регистрацию проводили на конфокальном микроскопе LSM 900 (Carl Zeiss, Германия): возбуждение 561 нм, эмиссия 610 нм. Для каждой клетки интенсивность флуоресценции (F) с вычетом фона на каждом временном кадре нормировали на исходное значение в начале записи (F_0), получая отношение F/F_0 . Скорость митохондриальной продукции АФК определяли на основе изменения относительной флуоресценции F/F_0 за время регистрации, используя линейную аппроксимацию кривой F/F_0 и вычисляя угловой коэффициент (наклон линейной зависимости). Значения нормировали на средний показатель контрольной группы ДТ.

2.4.2 Измерение цитозольных АФК, преимущественно супероксид-аниона

Внутриклеточную продукцию АФК (преимущественно супероксид-аниона $O_2^{\cdot-}$) оценивали с помощью дигидроэтидия (ДГЭ; Invitrogen / Thermo Fisher Scientific, США). ДГЭ, мембранопроникающий зонд, который при окислении супероксидом превращается в специфический продукт 2-гидроксиэтидий, интеркалирующий в ДНК и дающий яркую флуоресценцию (при неспецифическом окислении другими АФК образуется этидий с несколько отличным спектром). 5 мкМ ДГЭ присутствовали в среде на протяжении всего эксперимента.

Покадровую съемку на переживающих срезах выполняли на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе LSM 900 (Carl Zeiss, Германия): возбуждение 561 нм, эмиссия через полосовой фильтр 620 нм. Мощность лазера устанавливали на уровне 0,1 % и поддерживали постоянной во всех экспериментах, чтобы минимизировать фотоокисление зонда и обеспечить сопоставимость сессий.

Возбуждение восстановленной и окисленной форм ДГЭ на нейрон-глиальных культурах проводилось на широкопольном флуоресцентном микроскопе Olympus IX73P1F (Olympus Corporation, Япония) с системой возбуждения/регистрации флуоресценции Cairn (Cairn Research Ltd.,

Великобритания) и охлаждаемой sCMOS-камерой (Teledyne Photometrics, Канада). Возбуждение восстановленной формы ДГЭ производилось на 380 нм и регистрация на 410-450 нм, а окисленная форма – возбуждение 530 нм, регистрация на 600-650 нм. Результаты представлять как отношение окисленной формы к восстановленной (530/380 нм).

Анализ изображений срезов проводили в ZEN Microscopy Software (Carl Zeiss) и ImageJ/FIJI (NIH, США). Для каждой ОИ строили зависимость средней интенсивности флуоресценции ДГЭ от времени, а скорость продукции АФК определяли как наклон линейной аппроксимации возрастающего участка кривой. Данные с нейрон-глиальных культур обрабатывали в MetaFluor (Molecular Devices, Великобритания), при этом скорость определяли как наклон линейной аппроксимации отношения интенсивностей окисленной и восстановленной форм ДГЭ. Значения нормировали на средний наклон контрольной группы ДТ, принятый за 100 %.

Для дифференцировки ферментативных источников АФК перед регистрацией и в ее ходе применяли ингибиторы (без отмывки), параллельные контроли регистрировали при идентичных параметрах съемки в рамках одной сессии. Для блокады флавинзависимой НАДФН-оксидазной компоненты применяли DPI (0,5 мкМ, 30 мин), для селективного ингибирования НАДФН-оксидазы 2 – GSK2795039 (10 мкМ, 20 мин), для ингибирования моноаминоксидазы (МАО) – селегилин (20 мкМ, 20 мин). В части экспериментов со срезами применяли оксипуринол (20 мкМ, 30 мин) – ингибитор ксантиноксидазы.

2.4.3 Оценка уровня восстановленного глутатиона

Содержание восстановленного глутатиона (GSH) определяли с помощью монохлоробимана (MCB; Thermo Fisher Scientific, США). MCB – нефлуоресцирующий мембранопроникающий зонд, который в ходе катализируемой глутатион-S-трансферазой реакции конъюгирует с GSH по тиольной группе с образованием флуоресцирующего аддукта GSH-бимана.

Поскольку реакция избирательна к восстановленной форме, интенсивность флуоресценции пропорциональна внутриклеточному уровню GSH, ключевого низкомолекулярного антиоксиданта, отражающего антиоксидантную емкость клетки.

Переживающие срезы и нейрон-глиальные культуры инкубировали с 50 мкМ MCB в течение 40 мин при комнатной температуре. Флуоресценцию регистрировали на конфокальном микроскопе LSM 900 (Carl Zeiss, Германия) с объективом 20×: возбуждение 405 нм, эмиссия через полосовой фильтр 430–480 нм. Измеряли среднюю интенсивность флуоресценции, уровень GSH для каждой клетки выражали как интенсивность флуоресценции MCB-GSH в процентах от среднего значения группы ДТ.

2.5 Оценка внутриклеточной концентрации кальция

Концентрацию свободного внутриклеточного кальция ($[Ca^{2+}]_i$) регистрировали с помощью мембранопроникающего родаминового индикатора X-Rhod-1 AM (Invitrogen / Thermo Fisher Scientific, США; $K_d \approx 700$ нМ), оптимального для измерений $[Ca^{2+}]_i$ как в нейронах, так и в астроцитах. Связывание ионов Ca^{2+} повышает квантовый выход флуоресценции индикатора, его умеренная аффинность ($K_d \sim 700$ нМ) соответствует физиологическому диапазону изменений $[Ca^{2+}]_i$ и обеспечивает чувствительность без насыщения при больших нагрузках.

Срезы инкубировали в HBSS с 5 мкМ X-Rhod-1 AM в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте, затем многократно отмывали HBSS без красителя. Покадровую съемку выполняли на инвертированном лазерном сканирующем конфокальном микроскопе LSM 900 (Carl Zeiss, Германия) с объективами 10× и 20×: возбуждение 561 нм, эмиссия через длинноволновый фильтр LP 580, кадры регистрировали каждые 10 с. Мощность лазера поддерживали на уровне 0,5 % номинала и постоянной во всех сессиях для ограничения фотоповреждения и обеспечения сопоставимости. Срезы помещали в камеру с HBSS и снимали при комнатной температуре (22–25 °C).

В части экспериментов срезы предынкубировали с селегилином (20 мкМ) перед аппликацией дофамина. Агонисты вносили непосредственно в регистрационную камеру до указанных конечных концентраций. Внесенные добавки не отмывались. Использовали два протокола, различавшихся порядком внесения дофамина и глутамата:

Протокол 1: после 1 мин базальной регистрации вносили дофамин (50 мкМ), через 2–3 мин АТФ (200 мкМ), еще через 2–3 мин L-глутамат (10 мкМ), в конце записи добавляли KCl (50 мМ).

Протокол 2: после 1 мин базальной регистрации первым вносили L-глутамат (10 мкМ), через 2–3 мин дофамин (50 мкМ), затем АТФ (200 мкМ), в конце добавляли KCl (50 мМ).

Все клетки с кальциевой активностью классифицировали визуально как нейроны или астроциты по профилю ответов. Нейроны определяли по выраженному быстрому росту $[Ca^{2+}]_i$ в ответ на 10 мкМ глутамата (активация ионотропных рецепторов NMDA, AMPA/каинатного типов) и устойчивому ответу на деполяризацию 50 мМ KCl (открытие потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов). Астроциты идентифицировали по выраженному подъему $[Ca^{2+}]_i$ в ответ на АТФ (активация метаботропных P2Y-рецепторов и IP_3 -зависимое высвобождение ионов Ca^{2+} из внутриклеточных депо) при отсутствии или слабом ответе на глутамат и KCl.

2.6 Оценка скорости перекисного окисления липидов

Скорость перекисного окисления липидов в острых срезах мозга измеряли с помощью зонда C11-BODIPY 581/591 (2 мкМ; Molecular Probes) методом конфокальной микроскопии, при возбуждении на длинах волн 488 и 565 нм и регистрации эмиссии на длинах волн 505–550 нм и >580 нм. Скорость перекисного окисления определяли как угловой коэффициент линейной аппроксимации кривой отношения флуоресценции окисленного/восстановленного C11-BODIPY во времени.

2.7 Оценка транспорта ионов Ca^{2+} в изолированных митохондриях

Кальциевую емкость митохондрий (CRC, calcium retention capacity) оценивали по высвобождению ионов Ca^{2+} , сопровождающему открытие неспецифической поры переходной проницаемости (mPTP). Открытие mPTP при перегрузке матрикса кальцием приводит к коллапсу $\Delta\psi_m$, набуханию матрикса и массивному выбросу накопленных ионов Ca^{2+} в среду, что регистрируется по нарастанию сигнала внеклеточного Ca^{2+} -индикатора. Использовали непроникающий через мембрану кальций-чувствительный зонд Calcium Green-5N (0,5 мкМ; возбуждение 506 нм, эмиссия 532 нм), регистрирующий $[\text{Ca}^{2+}]$ в инкубационной среде. Измерения выполняли на планшетном ридере CLARIOstar Plus (BMG Labtech, Германия) в 96-луночных планшетах в среде следующего состава: KCl 120 мМ, Tris-основание 10 мМ, KH_2PO_4 1 мМ, MgSO_4 1 мМ, глутамат 5 мМ, малат 1 мМ (pH 7,1, доведен KOH). Митохондрии вносили до конечной концентрации 1 мг/мл (по белку). Препараты от всех животных распределяли по лункам и измеряли параллельно, митохондрии одного выделения использовали в трех независимых повторях. Значения CRC контрольных образцов принимали за 100 %, изменения в иных условиях рассчитывали относительно контроля.

Скорость поглощения кальция (вход) оценивали после первых пяти последовательных добавлений Ca^{2+} методом линейной аппроксимации в OriginPro. Для оценки выхода кальция в начале эксперимента вносили однократную большую дозу Ca^{2+} (50 мкМ). После полного поглощения кальция митохондриями добавляли NaCl, и скорость высвобождения ионов Ca^{2+} (опосредованного $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменником) анализировали в течение первых 3 мин после добавления Na^+ линейной аппроксимацией в OriginPro.

2.8 Обработка цифровых изображений

Обработку и анализ изображений проводили в программных пакетах ZEN (Carl Zeiss) и ImageJ/FIJI (NIH, США), а для данных широкопольной микроскопии нейрон-глиальных культур – в MetaFluor (Molecular Devices, Великобритания). Области интереса (ОИ) выделяли вручную вокруг тел отдельных клеток.

Флуоресцентные кривые нормировали как F/F_0 , где F – интенсивность флуоресценции в данном кадре, а F_0 – средняя интенсивность базального периода, предшествующего первому внесению добавки. Такая нормировка устраняет влияние различий в загрузке красителя и неоднородности освещения. Для кинетических измерений (продукция АФК по ДГЭ и MitoTracker) скорость рассчитывали, как угловой коэффициент линейной аппроксимации возрастающего участка кривой, полученные значения нормировали относительно среднего показателя контрольной группы (ДТ), принятого за 100 %.

2.9 Статистическая обработка данных

Обработку данных, построение графиков и статистический анализ выполняли с использованием программного обеспечения OriginPro (OriginLab Corporation, США) и языка программирования Python (библиотека statsmodels). Нормальность распределений проверяли критерием Шапиро–Уилка. Для сравнения выборок с распределением, значительно отличающимся от нормального ($p < 0,05$), а также при малых и неравных объемах групп применяли U-критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони для множественных сравнений с ДТ. Для парных сравнений, в частности, скорости продукции АФК в одних и тех же ОИ, применяли критерий Уилкоксона для связанных выборок. Скорость ПОЛ, уровень GSH, $\Delta\psi_m$ и амплитуду кальциевых ответов анализировали линейной смешанной моделью (Linear Mixed Model, LMM) со случайным эффектом, с последующей поправкой Холма на множественные сравнения. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего или как медианы и межквартильный размах. Уровни значимости обозначены: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, # $p < 0,0001$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Изменение энергетического метаболизма в клетках мозга при отсутствии синуклеинов

3.1.1 Митохондриальный мембранный потенциал при отсутствии синуклеинов

Поскольку подавляющее большинство митохондриальных процессов регулируется митохондриальным мембранным потенциалом ($\Delta\psi_m$), этот параметр служит одним из наиболее универсальных показателей функционального состояния органелл. Величина $\Delta\psi_m$ считается универсальным индикатором функциональной активности митохондрий, поскольку именно от нее зависит и контролируется большинство протекающих в этих органеллах процессов (Abramov et al., 2017). Полученные результаты согласуются с опубликованными ранее данными (Ludtmann et al., 2016). Так, в срезах мозга $\alpha\beta\gamma$ -КО значение $\Delta\psi_m$, регистрируемое по флуоресценции TMRM (N – количество животных, P – количество срезов мозга, n – области интереса (ОИ) в срезах: ДТ N = 6, P=32, n = 336; α -КО N = 3, P=17, n = 123; β -КО N = 6, P=32, n = 327; γ -КО N = 3, P=15, n = 122; $\alpha\beta\gamma$ -КО N = 3, P=12, n = 60; рис. 6), оказалось статистически значимо ниже, чем у ДТ ($72,3 \pm 3,1\%$; n=60; $p < 0,05$; рис. 6 E). Сниженный потенциал отмечался и у одиночных нокаутов – α -КО и β -КО (α -КО $56 \pm 2,7\%$, n=123, $p < 0,001$; β -КО $83 \pm 2,7\%$, n=327, $p < 0,05$; рис. 6 E). Высокая активность ЭТЦ вместе с пониженным $\Delta\psi_m$ свидетельствует о частичном разобщении митохондрий. Было показано, что мономерная форма α -синуклеина способна связываться с F0-F1-АТФ-синтазой, влияя на эффективность ее работы (Ludtmann et al., 2016). Исходя из этого, была проведена оценка, как изменяется $\Delta\psi_m$ под действием ингибитора F0-F1-АТФ-синтазы (олигомицин, 2 мкг/мл) в зависимости от присутствия эндогенных синуклеинов.

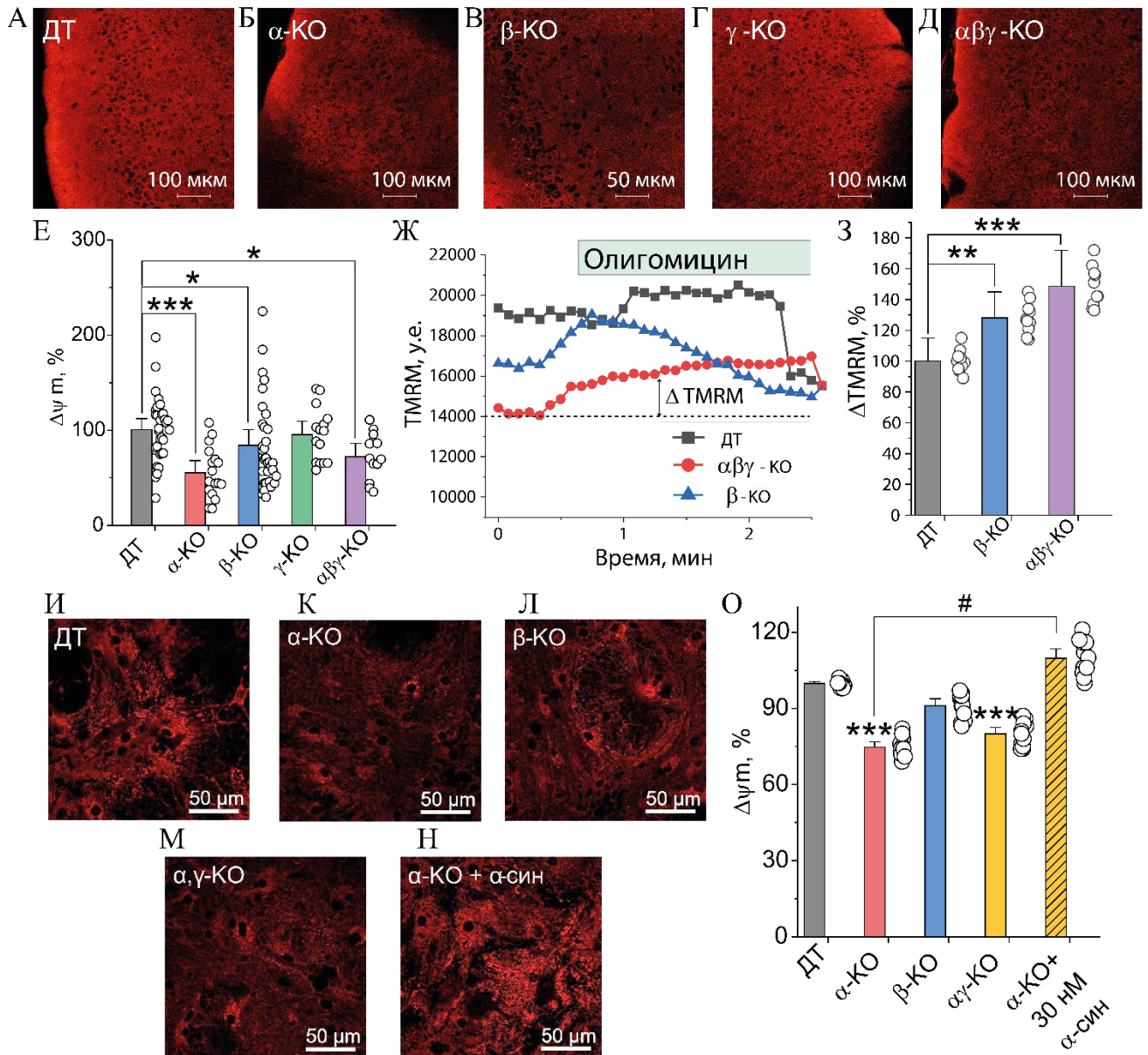


Рисунок 6 – Влияние отсутствия синуклеинов на митохондриальный мембранный потенциал ($\Delta\psi_m$). Острые переживающие срезы коры (А–З) и первичные нейрон-глиальные культуры коры (И–О). (А–Д) Репрезентативные конфокальные изображения острых срезов, загруженных TMRM: (А) дикий тип (ДТ), (Б) α -КО, (В) β -КО, (Г) γ -КО, (Д) $\alpha\beta\gamma$ -КО и (Е) Величина $\Delta\psi_m$. Точки на графике – Р. (Ж) Репрезентативные кривые флуоресценции TMRM в срезах мозга при добавке олигомицина (2 мкг/мл). (З) Прирост амплитуды флуоресценции TMRM после добавки олигомицина. Точки на графике – п. (И–Н) Репрезентативные конфокальные изображения нейрон-глиальных культур, загруженных TMRM: (И) ДТ, (К) α -КО, (Л) β -КО, (М) $\alpha\gamma$ -КО, (Н) α -КО после инкубации с 30 нМ мономерного α -синуклеина. Величина $\Delta\psi_m$ нормирована по среднему ДТ (принято за 100 %). Точки на графике – Р. Данные на (Е, З, О) представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего. Статистический анализ: (Е, З) линейная смешанная модель (LMM) с поправкой Холма. (О) U-критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, относительно ДТ; # $p < 0,0001$ (Fedulina et al., 2025)

В срезах мозга дикого типа добавление 2 мкг/мл олигомицина приводило к характерному росту флуоресценции TMRM, отражающему гиперполяризацию митохондрий (ДТ N = 4, P = 4, n = 11; β -КО N = 3, P=3, n = 10; $\alpha\beta\gamma$ -КО N = 3, P=3, n = 10; рис. 6 Ж). Несмотря на отличия в работе ЭТЦ у $\alpha\beta\gamma$ -КО и β -КО, блокада F0-F1-АТФ-синтазы олигомицином также сопровождалась подъемом $\Delta\psi_m$, причем более выраженным, чем у ДТ (β -КО $128 \pm 3,2\%$, n=10, p <0,01; $\alpha\beta\gamma$ -КО $148,6 \pm 4,1\%$, n=10, p <0,001; рис. 6 Ж, 3). Ингибирование комплекса V олигомицином блокирует утечку протонов через АТФ-синтазу и повышает их концентрацию по одну сторону мембраны. Более значительный прирост у $\alpha\beta\gamma$ -КО и β -КО указывает на то, что в этих клетках АТФ-синтаза пропускает большее количество протонов, синтезируя при этом АТФ менее эффективно. Полученные результаты позволили предположить, что повышенная активность ЭТЦ на фоне умеренного разобщения должна сопровождаться снижением образования АФК в митохондриях.

Отсутствие эндогенных синуклеинов снижает митохондриальный мембранный потенциал в первичных нейрон-глиальных культурах. Данные сравнительного анализа $\Delta\psi_m$ в клетках первичных нейрон-глиальных культур коры мозга мышей ДТ и животных с нокаутом генов синуклеинов представлены на рисунке 6 (И–О). Оценивая $\Delta\psi_m$ с помощью флуоресцентного индикатора TMRM (25 нМ) в первичных клетках коры мозга мышей с КО синуклеинов, было установлено, что инактивация гена α -синуклеина ведет к выраженному падению $\Delta\psi_m$ – до $74,7 \pm 1,1\%$ от уровня клеток ДТ (N=4, P=12; p <0,001; рис. 6 О). Этот результат воспроизводит ранее опубликованные данные по данному генотипу (Ludtmann et al., 2016). Сопоставимое снижение $\Delta\psi_m$ обнаружено и при двойном нокауте по α - и γ -синуклеинам ($79,9 \pm 1,3\%$, N=4, P=12; p <0,001; рис. 6 О), тогда как у мышей с нокаутом β -синуклеина изменения не достигали значимости ($91,0 \pm 1,4\%$, N=4, P=12; p=0,133; рис. 6 О). Чтобы убедиться, что эффект обусловлен именно нехваткой α -синуклеина, а не иными последствиями генетической модификации, клетки в течение 1 часа инкубировали с 30 нМ мономерного α -синуклеина. Такая обработка полностью возвращала $\Delta\psi_m$ в клетках α -нокаутных мышей к уровню ДТ

($109 \pm 2\%$, $N=4$, $P=12$; $p=1$ к контролю; $p < 0,0001$ к α -КО; рис. 6 О). Таким образом, отсутствие α - и γ -синуклеина приводит к снижению $\Delta\psi_m$ в клетках мозга.

3.1.2 Уровень НАД(Ф)Н при отсутствии синуклеинов

Окислительно-восстановительные функции митохондрий и генерация АФК в цепи переноса электронов напрямую определяются интенсивностью митохондриального дыхания и величиной мембранного потенциала. Ранее было показано, что недостаток синуклеинов сопровождается изменением функции митохондрий (Ludtmann et al., 2016).

На острых срезах мозга мышей ДТ, $\alpha\beta\gamma$ -КО и β -КО был измерен пул митохондриального НАДН, окислительно-восстановительный индекс, уровень НАДФН и скорость производства НАДН (рис. 7). НАДН выступает основным субстратом и донором электронов для комплекса I дыхательной цепи и образуется в матриксе митохондрий в ходе цикла трикарбоновых кислот (ЦТК). Однако спектр автофлуоресценции НАДН полностью совпадает со спектром НАДФН, а сам НАДН присутствует как в митохондриях, так и в цитозоле. Поэтому для регистрации именно митохондриального НАДН применяли разобщитель 1 мкМ FCCP, который максимально активирует дыхание и снижает уровень НАДН до минимума (принят за 0%), после чего вносили 1 мМ NaCN, блокирующий дыхание и потребление НАДН и тем самым доводящий пул митохондриального НАДН до максимума (100%, рис. 7 Б) (Angelova et al., 2025). Уровень автофлуоресценции после применения FCCP можно принять за уровень НАДФН и низкий уровень цитозольного НАДН (рис. 7 Б, Д) (Esteras et al., 2023). Применение ингибитора митохондриального комплекса IV – 1 мМ NaCN – блокирует потребление НАДН и позволяет оценить продукцию НАДН в цикле трикарбоновых кислот по увеличению скорости автофлуоресценции НАДН (рис. 7 Б, Е).

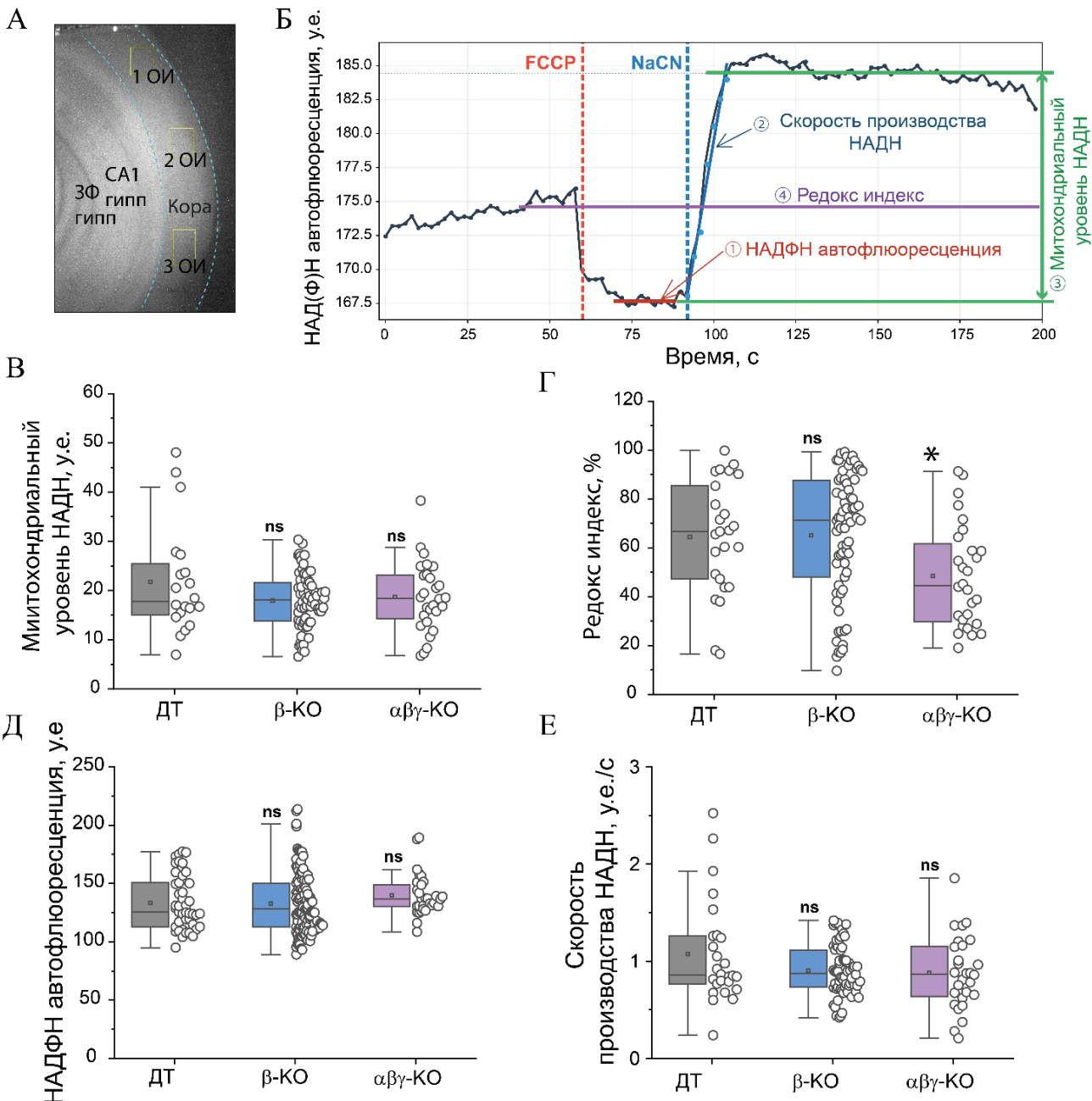


Рисунок 7 – Оценка окислительно-восстановительного состояния митохондриального НАД(Ф)Н в острых срезах мозга мышей дикого типа и мышей с нокаутом генов β -, $\alpha\beta\gamma$ - синуклеинов. (А) Репрезентативное изображение острого переживающего среза головного мозга мыши с различными областями интереса (ОИ) в коре. (Б) Репрезентативная кривая аутофлуоресценции НАД(Ф)Н, иллюстрирующая экспериментальный протокол. (В) Пул митохондриального НАДН. (Г) Митохондриальный редокс-индекс. (Д) Аутофлуоресценция НАД(Ф)Н (Е) Скорость производства НАДН. N – количество животных, n – ОИ. ДТ N=3, n=43; β -КО N=5, n=119; $\alpha\beta\gamma$ -КО N=3, n=30. Точки на графике – n. Данные представлены как медианы и межквартильный размах (IQR). Статистический анализ: критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони для множественных сравнений. *p < 0,05. Статистически незначимые сравнения обозначены как ns (p > 0,05) (Fedulina et al., 2026b)

Окислительно-восстановительный (редокс) индекс НАДН, характеризующий соотношение между его образованием и расходом в митохондриях, у $\alpha\beta\gamma$ -КО был ниже, чем у ДТ ($48,4 \pm 4,0$ % у $\alpha\beta\gamma$ -КО против $64,4 \pm 4,7$ % у ДТ; $\alpha\beta\gamma$ -КО $n=30$; $p=0,022$; рис. 7 Г), тогда как у β -КО подобного снижения не наблюдалось. Сам же пул митохондриального НАДН, его относительная концентрация, в срезах мозга β -КО и $\alpha\beta\gamma$ -КО статистически не отличался от ДТ (рис. 7 В). В наших экспериментах уровень НАДФН и скорость образования НАДН в срезах мозга с отсутствием β -синуклеина и $\alpha\beta\gamma$ -КО были аналогичны результатам, полученным в срезах мозга дикого типа (рис. 7 Д, Е). Следовательно, у $\alpha\beta\gamma$ -КО снижение редокс-индекса НАДН отражает усиленное потребление НАДН в митохондриальной ЭТЦ. Из полученных данных можно сделать вывод, что отсутствие синуклеинов нарушает энергетический метаболизм митохондрий.

3.1.3 Пул АТФ и скорость его потребления при отсутствии синуклеинов

Энергетическую емкость клеток (рис. 8) оценивали с применением флуоресцентного зонда MagFura-2. В клетке АТФ находится преимущественно в форме магниевой соли, поэтому ее гидролиз повышает $[Mg^{2+}]$, что фиксируется по изменению флуоресценции Mag-Fura-2. Совместное ингибирование гликолиза и окислительного фосфорилирования (20 мкМ ИУК и 5 мМ NaCN соответственно) прекращает синтез АТФ, при этом его расход на нужды клетки сохраняется. Окончательное истощение АТФ влечет энергетический коллапс с нарушением ионного баланса, который также проявляется резким подъемом флуоресценции MagFura-2, так как зонд обладает сродством к ионам Ca^{2+} . Промежуток времени от внесения ингибиторов до момента коллапса можно рассматривать как меру энергетической емкости клеток (Abramov et al., 2007).

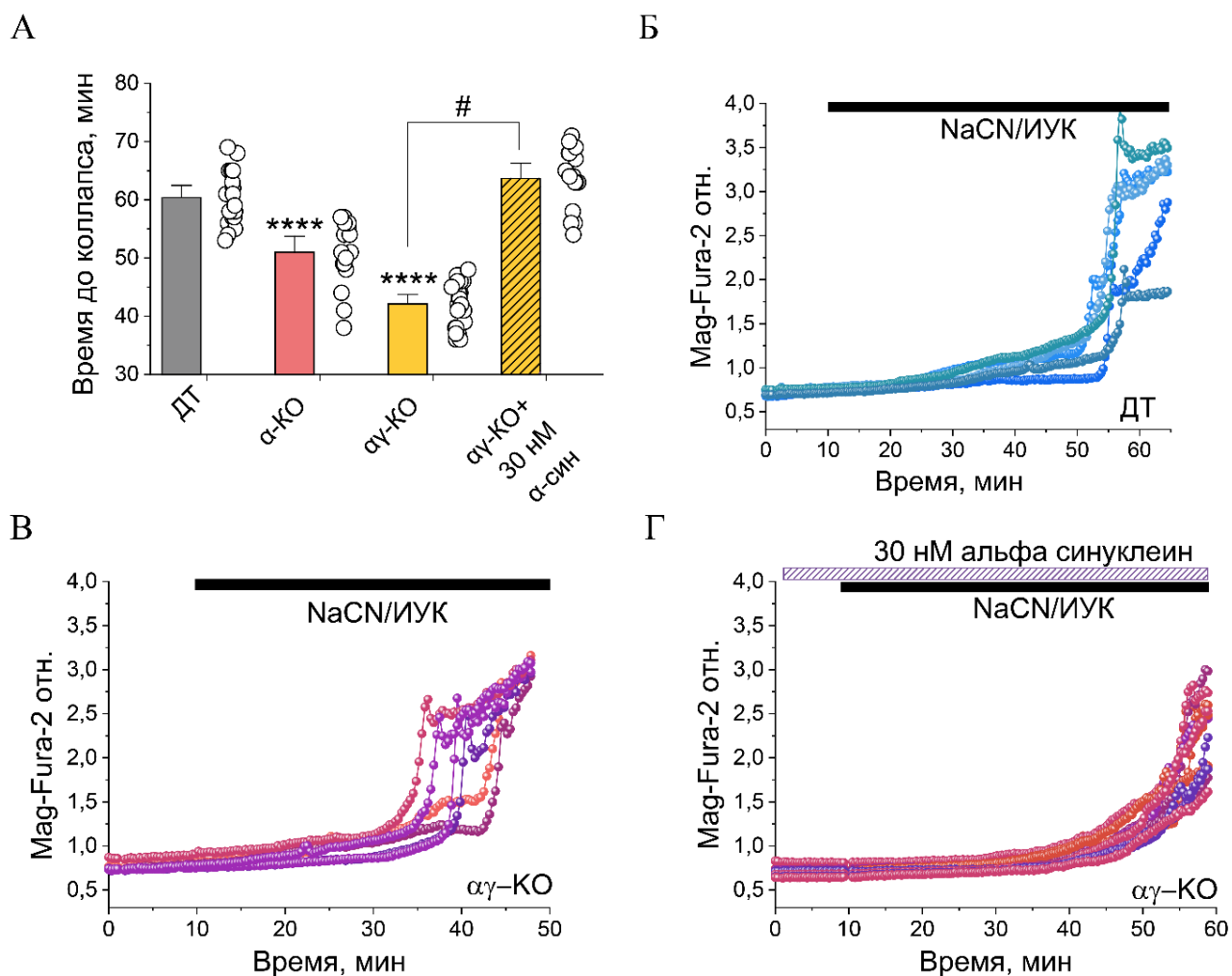


Рисунок 8 – Нокаут генов α - и γ -синуклеинов сокращает время до энергетического коллапса в нейрон-глиальных культурах. (А) Результаты статистического анализа времени до энергетического коллапса в нейрон-глиальных культурах из мозга мышей ДТ и мышей с нокаутом генов синуклеинов. (Б) Репрезентативные графики изменения отношения интенсивности флуоресценции Mag-Fura-2 при возбуждении 340 нм и 380 нм в клетках ДТ, (В) при одновременном нокауте генов α - и γ -синуклеинов без дополнительного воздействия и (Г) в присутствии мономерного α -синуклеина. N – биологические повторы, n – клетки. Точки на графике – n. ДТ N=4, n = 19; α -KO N=4, n = 17; $\alpha\gamma$ -KO N=4, n = 22; $\alpha\gamma$ -KO + 30 нМ α -синуклеина N=4, n = 16. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего. Статистический анализ: U-критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони. ****p < 0,0001 относительно ДТ; #p < 0,0001 (Fedulina et al., 2025)

В клетках контрольной группы энергетический коллапс наступал в среднем через 60 минут (n=19; рис. 8 А, Б), тогда как у животных с нокаутом α -синуклеина, а также с двойным α -, γ -нокаутом он развивался заметно раньше – за 51 минуту (N=4, n=17; p<0,0001; рис. 8 А) и 42 минуты (N=4, n=22; p<0,0001; рис. 8 А, В)

соответственно. Это указывает на уменьшение запаса АТФ в клетках при отсутствии α - и γ -синуклеинов. Для проверки участия α -синуклеина в данном процессе в нейрон-глиальной культуре клеток с одновременным отсутствием α - и γ -синуклеинов добавляли 30 нМ мономерного α -синуклеина. Такая добавка повышала энергетическую емкость клеток с двойным $\alpha\gamma$ -КО, коллапс происходил в среднем на 63-й минуте (N=4, n=16; p=1 к контролю; p<0,0001 к $\alpha\gamma$ -КО; рис. 8 А, Г), то есть в сроки, характерные для клеток контрольной группы.

3.1.4 Транспорт кальция в изолированных митохондриях мозга при отсутствии синуклеинов

В экспериментах на изолированных митохондриях нокаут α -синуклеина не вызывал значимых изменений кривой кальциевого обмена (CRC), скорости захвата или процессов оттока ионов кальция (рис. 9). После однократной добавки 50 мкМ Ca^{2+} флуоресценция снижается по мере поглощения иона митохондриями (Ca^{2+} вход; рис. 9 А, В, Г). Затем, при внесении экзогенного NaCl, внешний Na^+ активирует митохондриальный $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник (NCLX) внутренней мембраны и запускает выход Ca^{2+} из матрикса в среду (Ca^{2+} выход; рис 9 А, В, Д). У митохондрий, полученных от животных с нокаутом γ -синуклеина, CRC оказалась на 15,3% ниже, чем у митохондрий дикого типа (γ -КО N=5, n = 15, $84,7 \pm 5,7$ % от ДТ N=6, n = 14, p <0,05; рис. 9 А, Б). Кроме того, у них снижалась скорость захвата кальция (ДТ N=6, n = 34; γ -КО N=5, n = 22; p <0,01; рис. 9 В, Г) при сохранении неизменными процессов его оттока (ДТ N=6, n = 11; γ -КО N=5, n = 7; рис. 9 В, Д). При тройном нокауте α -, β - и γ -синуклеинов наблюдалась статистически незначимая тенденция к повышению CRC ($\alpha\beta\gamma$ -КО N=5, n = 14, $128,2 \pm 8,0$ % от ДТ N=6, n = 14; p = 0,106; рис. 9 Б) без значимого действия на вход ($\alpha\beta\gamma$ -КО N=5, n = 37; рис. 9 Г) и выход ($\alpha\beta\gamma$ -КО N=5, n = 9; рис. 9 Д) ионов кальция из митохондрий.

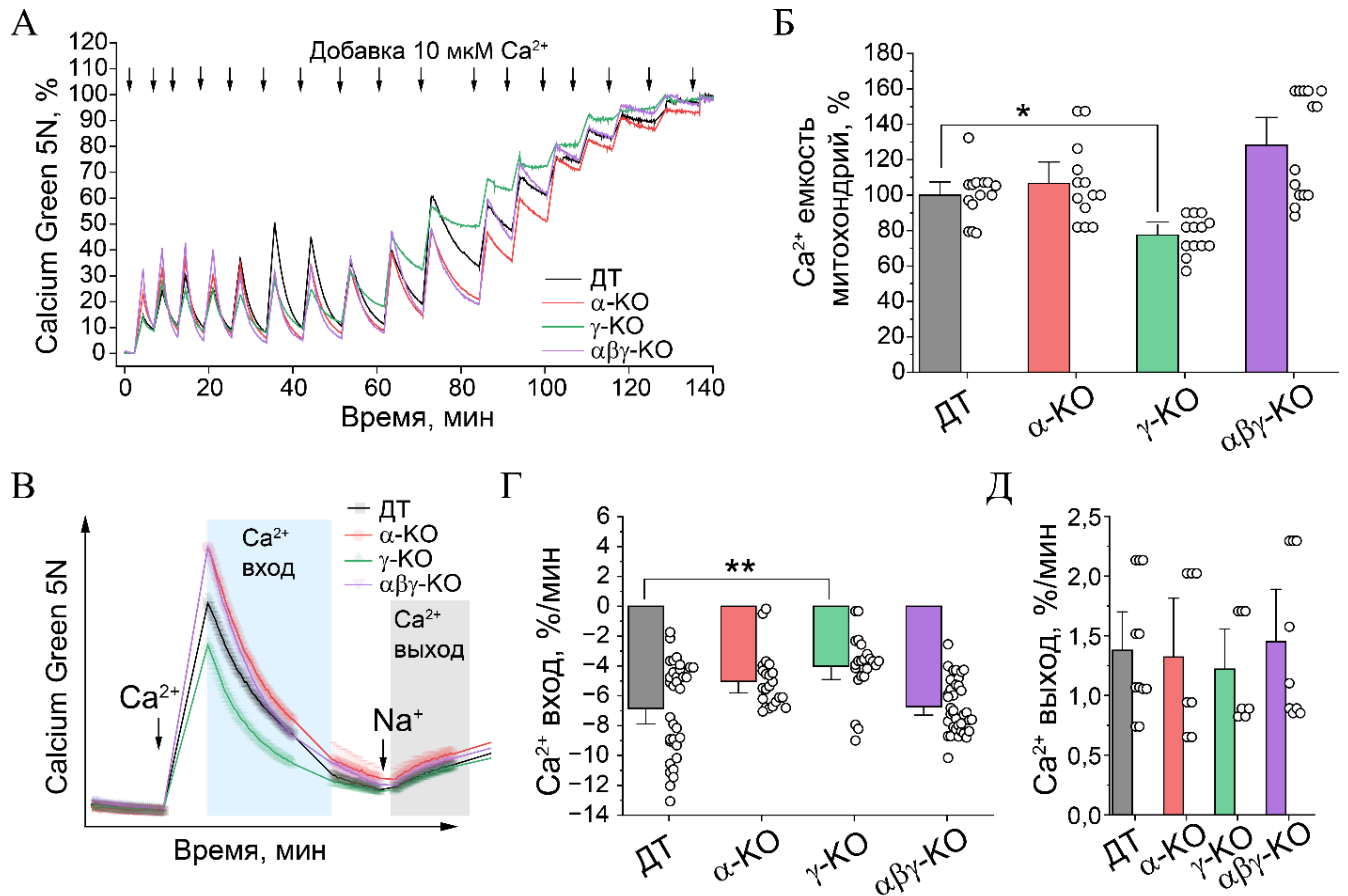


Рисунок 9 – Участие синуклеинов в кальциевой регуляции в митохондриях. (А) Репрезентативные экспериментальные графики и (Б) кальциевая емкость митохондрий (CRC), нормированная на среднее ДТ (принято за 100 %). N – количество животных, n – отдельные эксперименты. ДТ N=6, n = 14; α -КО N=5, n = 13; γ -КО N=5, n = 15; $\alpha\beta\gamma$ -КО N=5, n = 14. (В) Репрезентативные кривые входа и выхода ионов Ca^{2+} . (Г) Скорость входа Ca^{2+} ($\Delta\text{F}/\text{мин}$): линейная аппроксимация спада флуоресценции после первых пяти последовательных добавок. ДТ N=6, n = 34; α -КО N=5, n = 22; γ -КО N=5, n = 22; $\alpha\beta\gamma$ -КО N=5, n = 37. (Д) Скорость выхода ионов Ca^{2+} ($\Delta\text{F}/\text{мин}$): линейная аппроксимация прироста флуоресценции в течение первых 3 мин после добавления Na^+ . ДТ N=6, n = 11; α -КО N=5, n = 7; γ -КО N=5, n = 7; $\alpha\beta\gamma$ -КО N=5, n = 9. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего. Точки на графиках – n. Статистический анализ: U-критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони для сравнений с ДТ. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ относительно ДТ (Fedulina et al., 2026c)

3.2 Базовый уровень продукции АФК в отсутствие синуклеинов

Пероксид водорода – одна из множества активных форм кислорода, задействованных в окислительно-восстановительной сигнализации. Чтобы оценить влияние отдельных синуклеинов на механизм редокс-сигнализации в клетках головного мозга, была зарегистрирована генерация АФК (главным образом

супероксид-аниона) в острых срезах мозга с помощью флуоресцентного индикатора дигидроэтидия (ДГЭ) (рис.10 А-Д).

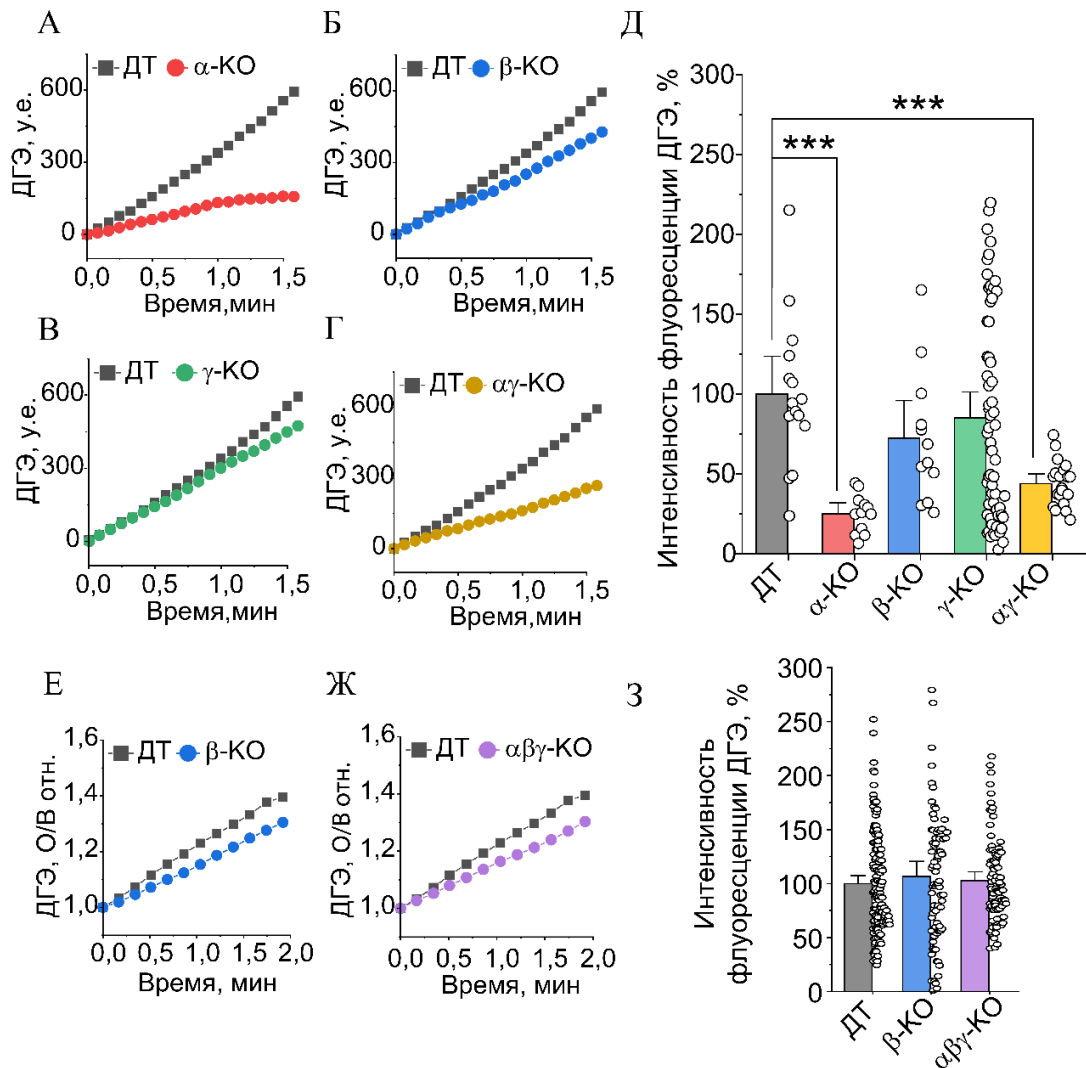


Рисунок 10 – Базовая скорость образования АФК в клетках головного мозга в отсутствие синуклеинов. (А–Г) Репрезентативные кривые (усредненные) интенсивности флуоресценции ДГЭ в острых срезах головного мозга от мышей ДТ и (А) α-KO, (Б) β-KO, (В) γ-KO, (Г) αγ-KO. (Д) Скорость флуоресценции ДГЭ в срезах. N – количество животных, n – ОИ. ДТ N=5, n = 15; α-KO N=4, n = 12; β-KO N=4, n = 12; γ-KO N=5, n = 62; αγ-KO N=4, n = 20. (Е, Ж) Репрезентативные кривые (усредненные) интенсивности флуоресценции ДГЭ в первичной нейрон-глиальной культуре от мышей ДТ, (Е) β-KO и (Ж) αβγ-KO. (З) Скорость флуоресценции ДГЭ в первичной нейрон-глиальной культуре. N – биологические повторы, n – клетки. ДТ N=3, n = 146; β-KO N=3, n = 80; αβγ-KO N=3, n = 91. Точки на графиках – n. Данные (Д, З) представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего. Скорость окисления ДГЭ рассчитывалась как наклон кривой флуоресценции и нормировалась на среднее ДТ (принято за 100 %). Для репрезентативных кривых (А-Г) была проведена коррекция смещения путем вычитания базовой линии ($\Delta F = F - F_0$). Статистический анализ: U-критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони для сравнений с ДТ. ***p < 0,001

Оказалось, что в срезах мозга с отсутствием α -синуклеина скорость окисления ДГЭ составляла всего $24,9 \pm 3,4\%$ от продукции АФК в срезах дикого типа (ДТ N=5, n = 15; α -КО N=4, n = 12, p < 0,001; рис. 10 А, Д). Ключевая роль α -синуклеина подтвердилась и в экспериментах на срезах $\alpha\gamma$ -КО, где скорость образования АФК также была ниже ($43,9 \pm 3,1\%$, $\alpha\gamma$ -КО N=4, n = 20, p < 0,001) по сравнению с ДТ (рис. 10 Г, Д), тогда как в срезах с отсутствием γ -синуклеина скорость генерации АФК не отличалась от клеток ДТ (γ -КО N=5, n = 62; рис. 10 В, Д). У β -КО скорость образования АФК составляла $72,3 \pm 11\%$ (β -КО N=4, n = 12) от значений ДТ (рис. 10 Б, Д) и от дикого типа статистически не отличалась. Измерения скорости окисления ДГЭ в первичных нейрон-глиальных культурах также не выявили снижения базовой продукции АФК у β -КО ($106,6 \pm 7,1\%$, β -КО N=3, n = 80, p = 1; рис. 10 Е, З). Неожиданным оказалось то, что у клеток с тройным нокаутом синуклеина (α , β , γ) скорость продукции АФК была сопоставима с диким типом ($102,8\%$, N=3, n = 91, p = 0,79; рис. 10 Ж, З). Таким образом, отсутствие α -синуклеина приводит к существенному снижению скорости образования цитозольных АФК.

3.3 Митохондриальная продукция АФК в отсутствие синуклеинов

Применяя MitoTracker Red CM-H2Xros как индикатор митохондриальной продукции АФК, мы зарегистрировали, что у β -КО и $\alpha\beta\gamma$ -КО скорость генерации АФК была статистически значимо ниже, чем в клетках дикого типа (β -КО $45 \pm 6\%$, n=18, p < 0,01; $\alpha\beta\gamma$ -КО $50 \pm 6\%$, n=12, p < 0,05; рис. 11 А, Б, В, Д, Ж). У γ -КО скорость, напротив, была статистически значимо выше, чем у ДТ ($167 \pm 12\%$, n=12, p < 0,01; рис. 11 А, Б, Е). У α -КО наблюдалась тенденция к повышению, не достигавшая значимости после поправки Бонферрони ($153 \pm 15\%$, n=18, p=0,086; рис. 11 А, Б, Г), а при двойном $\alpha\gamma$ -нокауте скорость от ДТ не отличалась ($76 \pm 11\%$, n=16, p=1; рис. 11 А, Б). Это указывает на существование дополнительного механизма, влияющего на образование митохондриальных АФК в этих клетках.

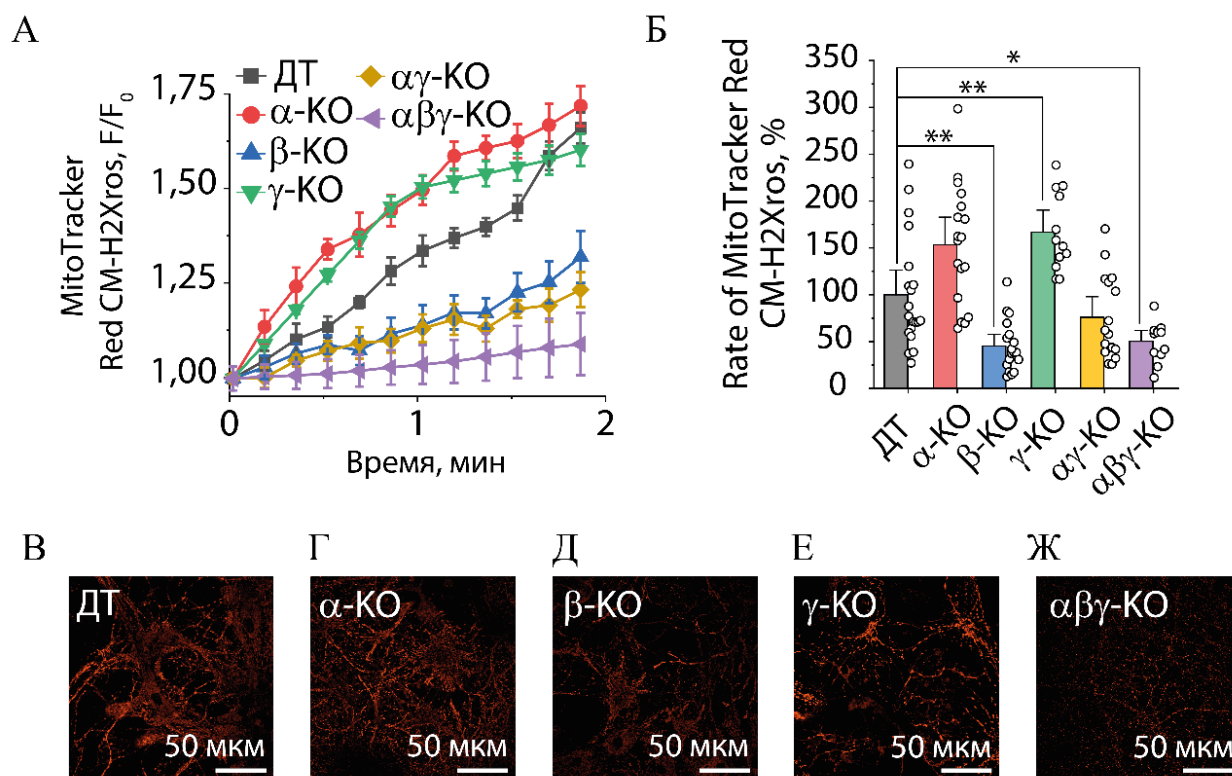


Рисунок 11 – Влияние отсутствия синуклеинов на скорость образования АФК в митохондриях первичных нейрон-глиальных культур. (А) Репрезентативные кривые продукции митохондриальных АФК. (Б) Скорость образования митохондриальных АФК. N – биологические повторы, n – клетки. ДТ N=4, n = 20; α-KO N=4, n = 18; β-KO N=4, n = 18; γ-KO N=3, n = 12; αγ-KO N=3, n = 16; αβγ-KO N=3, n = 12. (В-Ж) Репрезентативные конфокальные изображения нейрон-глиальной культуры, загруженной MitoTracker Red CM-H2Xros, в (В) диком типе и (Г) нокауте генов α- (Д) β- (Е) γ- (Ж) αβγ- синуклеинов. Данные (Б) представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего. Интенсивность флуоресценции нормировали на исходный уровень (F/F₀), скорость окисления зонда рассчитывали, как наклон линейного участка кривой F/F₀ и выражали в процентах от среднего ДТ (принято за 100 %). Точки на графиках – n. Статистический анализ: U-критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони для сравнений с ДТ. *p < 0,05, **p < 0,01 относительно ДТ

3.4 Изменение вклада ксантиноксидазы в генерацию АФК в отсутствие синуклеинов

Используя ДГЭ в качестве зонда для измерения скорости продукции АФК в переживающих срезах мозга (рис. 12), была дана оценка роли отдельных синуклеинов в поддержании окислительно-восстановительного баланса клеток мозга путем селективного ингибирования ферментов – источников АФК.

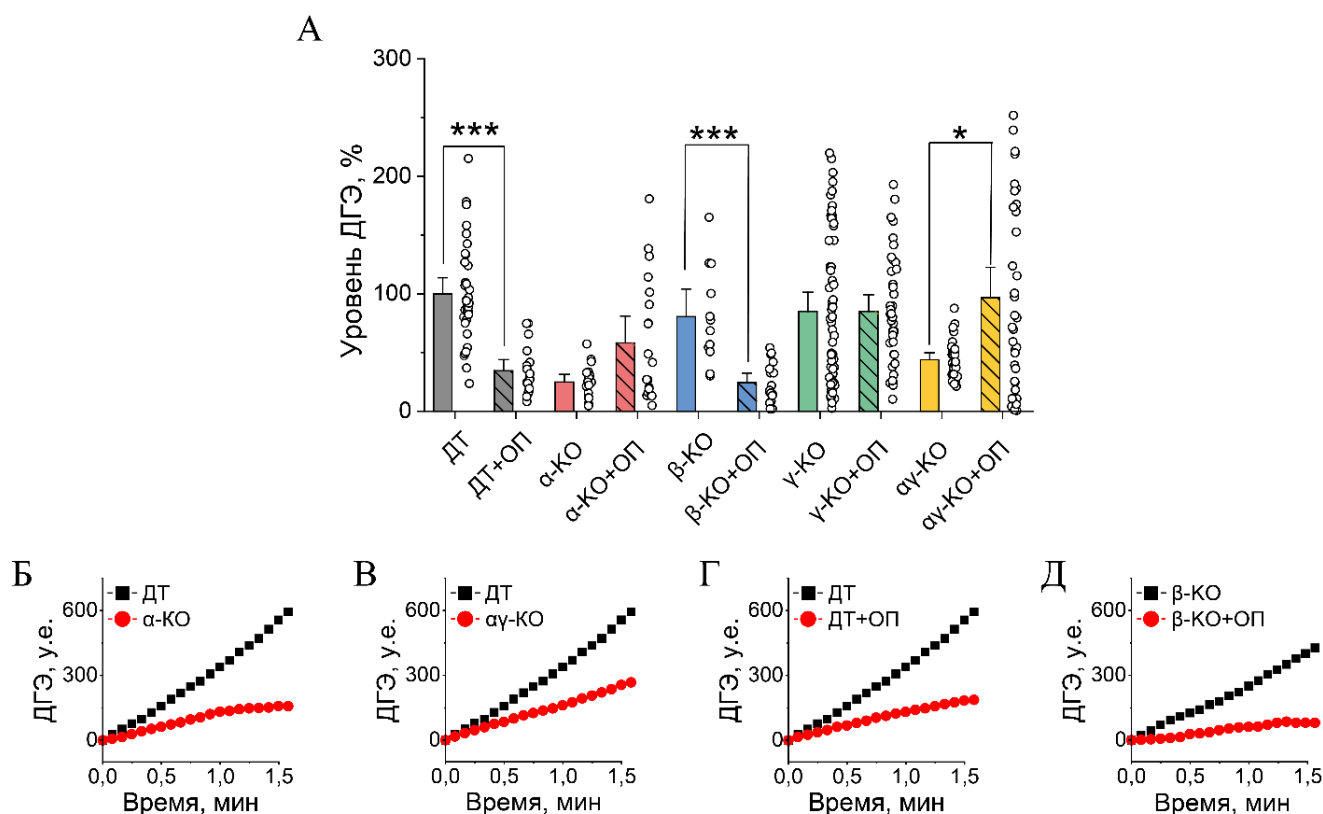


Рисунок 12— Скорость продукции АФК в переживающих срезах мозга мышей ДТ и мышей с отсутствием синуклеинов в различных комбинациях на базовом уровне и при ингибировании ксантиноксидазы (КСО). (А) Скорость флуоресценции ДГЭ в переживающих срезах мозга. N – количество животных, n – ОИ. ДТ N=5, n = 18; α -КО N=4, n = 20; β -КО N=4, n = 17; γ -КО N=5, n = 41; $\alpha\gamma$ -КО N=4, n = 35. Точки на графике – n. Данные нормированы по среднему значению базового уровня скорости флуоресценции ДГЭ у ДТ (принято за 100 %). (Б-Д) Репрезентативные кривые (усредненные) интенсивности флуоресценции ДГЭ при оценке скорости продукции АФК. Данные (А) представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего. Скорость окисления ДГЭ рассчитывалась как наклон кривой флуоресценции и нормировалась на среднее ДТ (принято за 100 %). Для репрезентативных кривых (Б-Д) была проведена коррекция смещения путем вычитания базовой линии ($\Delta F = F - F_0$). Статистический анализ: U-критерий Манна–Уитни. * $p < 0,05$ *** $p < 0,001$, (Fedulina et al., 2025)

К числу таких ферментов относится КСО, участвующая в метаболизме пуринов (Furuhashi, 2020). Принимая во внимание высокую экспрессию этого фермента при повышении уровня α -синуклеина (Starr et al., 2023), активацию КСО при подавлении биоэнергетических процессов (Abramov et al., 2007), а также вовлеченность α -синуклеина в энергетический метаболизм (Ludtmann et al., 2016,

2018), мы использовали ингибитор КСО оксипуринол (ОП), чтобы определить ее вклад в продукцию АФК.

При инкубации срезов с ингибитором (20 мкМ, 30 минут) у животных ДТ уровень продукции АФК статистически значимо снижался до $34,6 \pm 4,8 \%$ ($n=18$; $P<0,0001$), а при нокауте β -синуклеина до $24,4 \pm 4,1 \%$ ($n=17$; $P<0,001$; рис. 12 А). Это говорит о том, что в данных группах фермент сохраняет физиологическую активность, поскольку его ингибитор уменьшает выработку АФК. В то же время группы с нокаутами α - и γ -синуклеина, а также с двойным нокаутом по генам обоих белков, не отвечали снижением на добавление ОП, что может указывать на модуляцию КСО со стороны α - и γ -синуклеинов. Поскольку одним из факторов, способных влиять на активность КСО в клетке, является изменение энергетического метаболизма и баланса пуринов (Furuhashi, 2020), для выяснения механизма регуляции КСО α - и γ -синуклеинами в данной работе было исследовано их влияние на митохондриальный метаболизм.

3.5 МАО-зависимая и дофамин-индуцированная продукция АФК

3.5.1 МАО-зависимое образование АФК при отсутствии синуклеинов

Одним из характерных признаков болезни Паркинсона, протекающей на фоне низкого уровня дофамина, является агрегация α -синуклеина. Дофамин расщепляется моноаминоксидазой А (преимущественно нейрональной) и В (преимущественно астроцитарной) с образованием H_2O_2 и альдегидов. Среди важнейших физиологических функций синуклеина – его участие в транспорте и метаболизме дофамина (Vaarmann et al., 2010). Учитывая это, было исследовано, как отсутствие синуклеинов может отражаться на МАО-индуцированной продукции АФК. С помощью ингибитора МАО – селегилина, который в концентрации 20 мкМ блокирует как МАО А, так и МАО В, было показано, что 20-минутная предынкубация срезов мозга мышей дикого типа с этим соединением значительно снижала скорость образования АФК ($14,8 \pm 1,4\%$, $n=16$, $p<0,0001$; рис. 13 А, В).

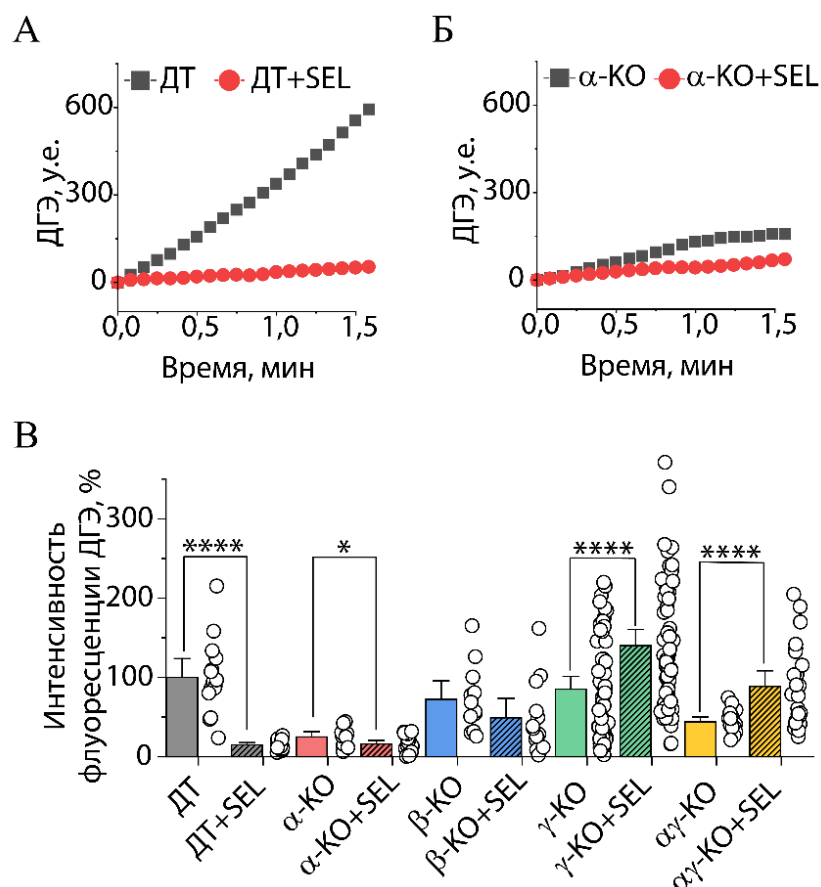


Рисунок 13 – Скорость продукции АФК в переживающих срезах мозга мышей ДТ и мышей с отсутствием синуклеинов в различных комбинациях на базовом уровне и при ингибировании моноаминоксидазы (МАО). (А, Б) Репрезентативные (усредненные) кривые интенсивности флуоресценции ДГЭ при оценке скорости образования АФК без (черный) и в присутствии ингибитора МАО – селегилина (SEL) (красный) (А) в ДТ и (Б) α -КО. (В) Скорость флуоресценции ДГЭ. N – количество животных, n – ОИ. Базовые значения: ДТ N=5, n = 15; α -КО N=4, n = 12; β -КО N=4, n = 12; γ -КО N=5, n = 62; $\alpha\gamma$ -КО N=4, n = 20. Селегилин: ДТ N=5, n = 16; α -КО N=4, n = 23; β -КО N=4, n = 13; γ -КО N=5, n = 60; $\alpha\gamma$ -КО N=4, n = 25. Точки на графике – n. Данные (В) представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего. Скорость окисления ДГЭ рассчитывалась как наклон кривой флуоресценции и нормировалась на среднее значение базовой скорости у ДТ (принято за 100 %). Для репрезентативных кривых (А, Б) была проведена коррекция смещения путем вычитания базовой линии ($\Delta F = F - F_0$). Статистический анализ: U-критерий Манна–Уитни. * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$

Хотя базальная скорость продукции АФК в срезах мозга α -нокаутных мышей и была изначально ниже, чем у дикого типа, инкубация этих срезов с 20 мкМ селегилина существенно уменьшала скорость прироста флуоресценции ДГЭ, что свидетельствует о вкладе МАО в образование АФК в клетках мозга мышей дикого типа и α -КО животных ($p < 0,05$; рис. 13 Б, В). В срезах мозга β -нокаутных мышей

действие селегилина было незначительным (рис. 13 В), а в клетках с γ -КО селегилин, напротив, повышал скорость образования АФК (рис. 13 В). Это указывает на минимальный либо полностью отсутствующий вклад МАО в базальную продукцию АФК в клетках с нокаутом β - и γ -синуклеина.

3.5.2 Влияние дофамина на редокс-сигнализацию при отсутствии синуклеинов

Ослабленное действие ингибиторов МАО на базальную скорость образования АФК в срезах мозга мышей с отсутствием синуклеина может объясняться либо пониженной активностью самого фермента, либо сниженным содержанием моноаминов, включая дофамин или адреналин. Чтобы устранить различия в уровнях моноаминов, во время измерений к срезам мозга добавляли 20 мкМ дофамина (рис. 14 А). Добавка 20 мкМ дофамина повышала скорость образования АФК примерно на 41% в острых срезах мозга дикого типа и α -нокаутных животных (ДТ $141,4 \pm 14,2\%$, $n=15$, $p < 0,001$; α -КО $n=12$, $p < 0,05$; рис. 14 А, Б). В срезах γ -КО экзогенный дофамин также значительно повышал скорость окисления ДГЭ ($103,8 \pm 11,6\%$, $n=62$, $p < 0,001$; рис. 14 А, Б). В срезах мозга с β - и $\alpha\gamma$ -КО добавление 20 мкМ дофамина не вызывало значимого прироста АФК, что согласуется с меньшим вкладом МАО в базальную продукцию АФК в этих клетках. Однако экзогенное внесение дофамина в срезы не исключало того, что транспорт дофамина через ткань может протекать медленнее. Чтобы свести этот эффект к минимуму, мы воспроизвели аналогичный эксперимент на первичной кортикальной нейрон-глиальной культуре (рис. 14 В, Г). Интересно, что у клеток $\alpha\beta\gamma$ -КО базальная скорость образования АФК практически не отличалась от дикого типа (рис. 14 В, Г) на первичной нейрон-глиальной культуре. Внесение 20 мкМ дофамина статистически значимо повышало скорость флуоресценции ДГЭ во всех клетках – дикого типа, β -синуклеина и $\alpha\beta\gamma$ -КО (ДТ $n=146$, $p < 0,0001$; β -КО $n=80$, $p < 0,0001$; $\alpha\beta\gamma$ -КО $n=91$, $p < 0,0001$; рис. 14 В, Г), что предполагает возможность активации МАО во всех этих типах клеток.

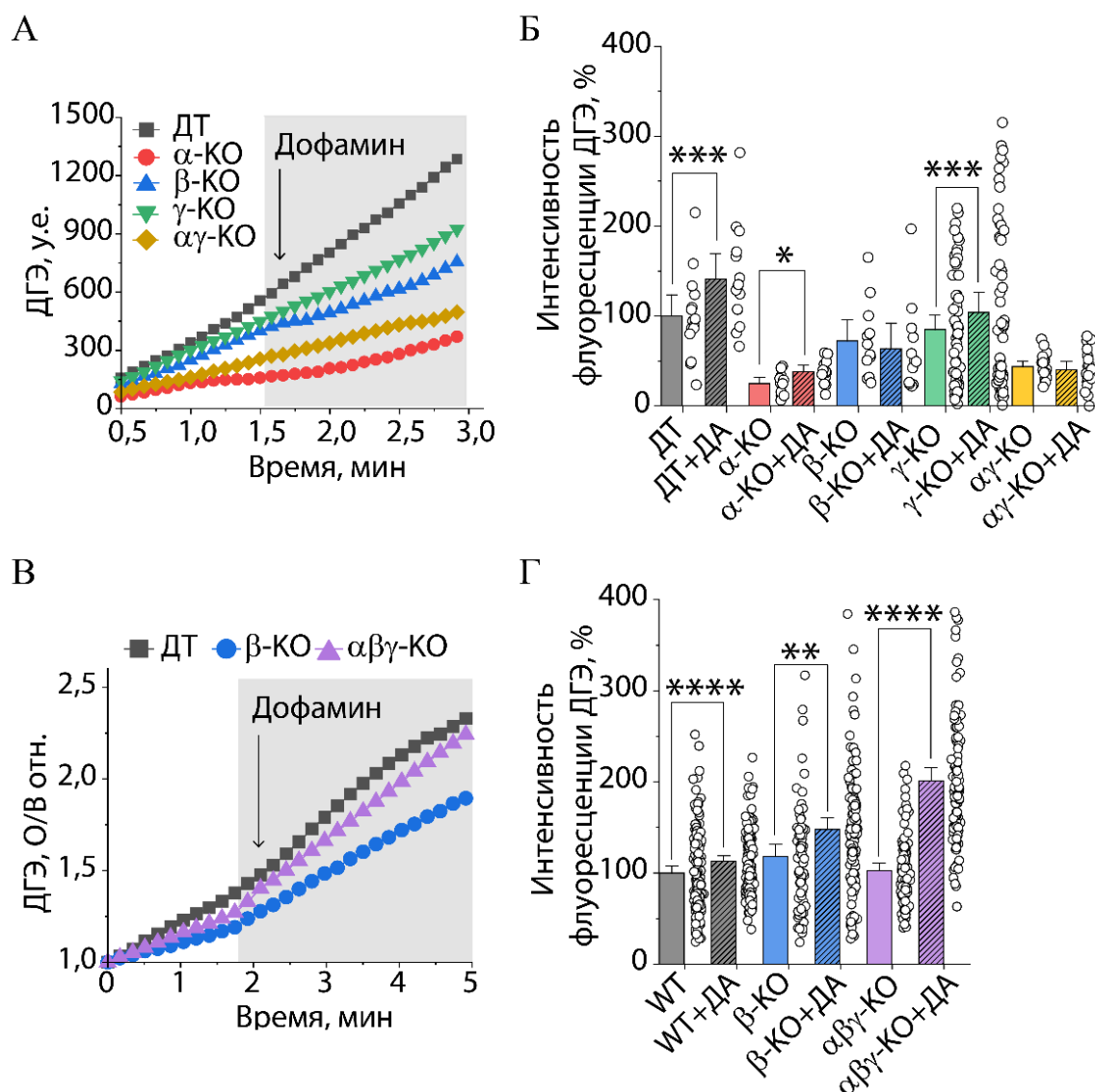


Рисунок 14 – Влияние экзогенного дофамина (ДА) на скорость образования АФК в острых срезах коры и в первичных нейрон-глиальных культурах. (А) Репрезентативные кривые (усредненные) флуоресценции ДГЭ в острых срезах мозга мышей дикого типа и мышей с отсутствием синуклеина в различных комбинациях до и после внесения экзогенного дофамина (20 мкМ). (Б) Скорость флуоресценции ДГЭ в срезах мозга. N – количество животных, n – ОИ. ДТ N=5, n = 15; α-KO N=4, n = 12; β-KO N=4, n = 12; γ-KO N=5, n = 62; αγ-KO N=4, n = 20. (В) Репрезентативные кривые (усредненные) в нейрон-глиальной культуре (Г) Скорость флуоресценции ДГЭ в первичной нейрон-глиальной культуре. N – биологические повторы, n – клетки. ДТ N=3, n = 146; β-KO N=3, n = 80; αβγ-KO N=3, n = 91. Точки на графике – n. Данные (Б, Г) представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего. Скорость окисления ДГЭ рассчитывалась как наклон кривой флуоресценции и нормировалась на среднее значение базовой скорости у ДТ (принято за 100 %). Для репрезентативных кривых (А,) была проведена коррекция смещения путем вычитания базовой линии ($\Delta F = F - F_0$). Статистический анализ: критерий Уилкоксона для сравнения база vs дофамин внутри генотипа. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

3.6 Продукция АФК в НАДФН-оксидазе при отсутствии синуклеинов

Одним из главных источников АФК в клетке является НАДФН-оксидаза – семейство ферментов, играющих важную роль в физиологии и патологии головного мозга (Angelova et al., 2021; Gandhi & Abramov, 2012). Чтобы понять, какую роль НАДФН-оксидазы играют в механизме окислительно-восстановительного гомеостаза клеток с отсутствием синуклеина, срезы мозга инкубировали с селективным ингибитором НАДФН-оксидазы 2 – GSK2795039 (10 мкМ, 20 мин предынкубации) либо с более широким ингибитором НАДФН-оксидаз – дифенилениодином (DPI) (0,5 мкМ, 30 мин предынкубации). В срезах мозга дикого типа оба ингибитора НАДФН-оксидазы вызывали значительное снижение продукции АФК относительно необработанного контроля (ДТ-GSK $3,0 \pm 1,2\%$, $p < 0,001$; ДТ-DPI $24,4 \pm 2,5\%$, $p < 0,001$; рис. 15 А, Е), что подтверждает значимость НАДФН-оксидазы в генерации АФК в нейронах и астроцитах. Однако в срезах мозга α - и β -нокаутных мышей предобработка GSK2795039 или DPI не снижала скорость флуоресценции ДГЭ, что указывает на то, что НАДФН-оксидаза в этих клетках уже находится в ингибированном состоянии (рис. 15 Б, В, Е).

В срезах мозга мышей с γ -КО или α -КО предынкубация с ингибиторами НАДФН-оксидазы снижала скорость образования АФК, однако этот эффект был слабее, чем у дикого типа (γ -КО+DPI $n=17$, $p < 0,05$; $\alpha\gamma$ -КО+GSK $n=27$, $p < 0,05$; рис. 15 Г, Д, Е). $\alpha\gamma$ -КО в условиях ингибирования DPI повышал скорость ($\alpha\gamma$ -КО+DPI $n=15$, $p < 0,0001$; рис. 15 Д, Е). Такой эффект может наблюдаться из-за того, что сам DPI является неселективным ингибитором I митохондриального комплекса и способен повышать продукцию АФК (Li et al., 2003), в энергетически ослабленных $\alpha\gamma$ -КО митохондриях, за счет нарушения электронного транспорта и утечки электронов на кислород. Следовательно, отсутствие α - или β -синуклеина приводит к подавлению образования АФК НАДФН-оксидазой, что свидетельствует о роли мономерных α - и β -синуклеинов в регуляции этого фермента.

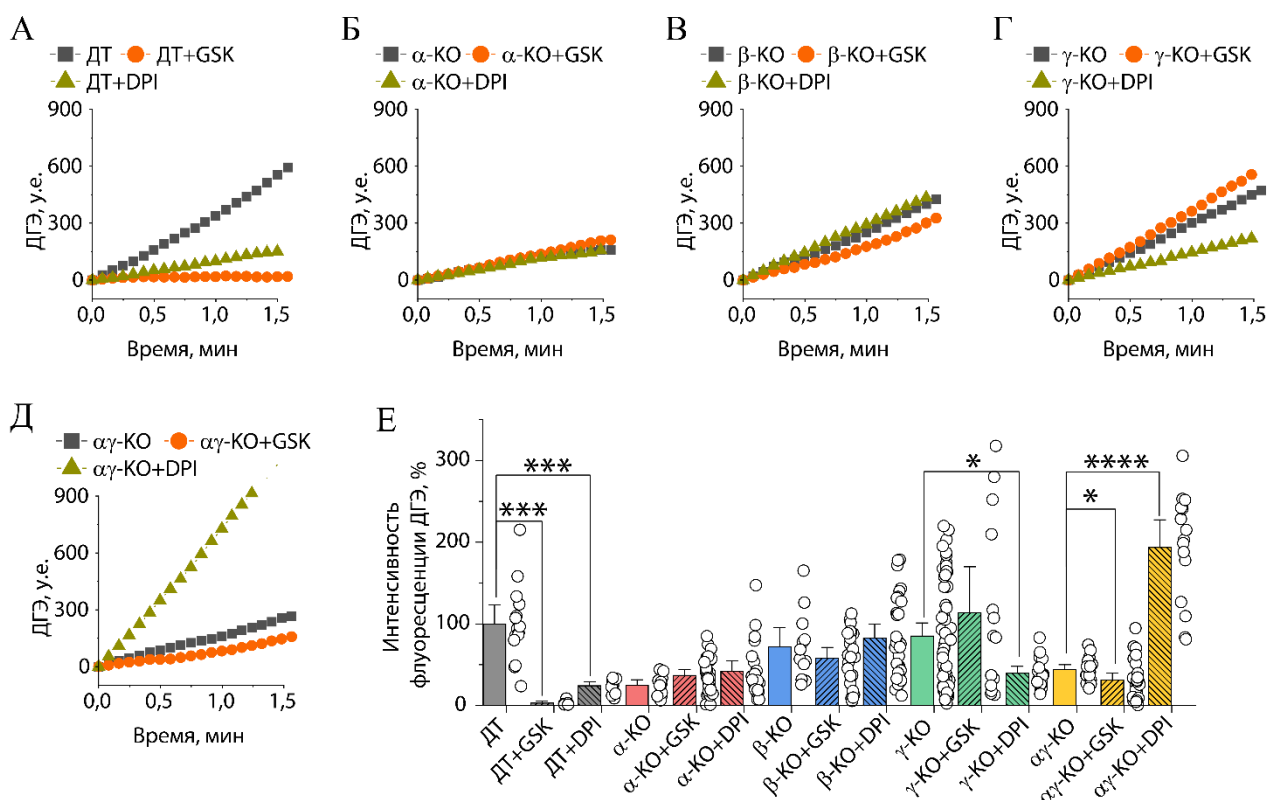


Рисунок 15 – Скорость продукции АФК в переживающих срезах мозга мышей ДТ и мышей с отсутствием синуклеинов в различных комбинациях на базовом уровне и при ингибировании НАДФН-оксидазы. (А–Д) Репрезентативные кривые (усредненные) скорости флуоресценции ДГЭ при оценке скорости образования АФК без (черный) и с ингибиторами НАДФН-оксидазы GSK2795039 (GSK) (оранжевый) и дифенилениодином (DPI) (зеленый) в острых срезах головного мозга: (А) ДТ, (Б) α-KO, (В) β-KO, (Г) γ-KO, (Д) αγ-KO. (Е) Скорость флуоресценции ДГЭ в ответ на ингибиторы НАДФН-оксидазы GSK2795039 (GSK) и дифенилениодин (DPI). N – количество животных, n – ОИ. Базовые значения: ДТ N=5, n = 15; α-KO N=4, n = 12; β-KO N=4, n = 12; γ-KO N=5, n = 62; αγ-KO N=4, n = 20. GSK: ДТ N=5, n = 6; α-KO N=4, n = 34; β-KO N=4, n = 24; γ-KO N=5, n = 14; αγ-KO N=4, n = 27. DPI: ДТ N=5, n = 12; α-KO N=4, n = 24; β-KO N=4, n = 31; γ-KO N=5, n = 17; αγ-KO N=4, n = 15. Точки на графике – n. Данные (Е) представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего. Скорость окисления ДГЭ рассчитывалась как наклон кривой флуоресценции и нормировалась на среднее значение базовой скорости у ДТ (принято за 100 %). Для репрезентативных кривых (А,) была проведена коррекция смещения путем вычитания базовой линии ($\Delta F = F - F_0$). Статистический анализ: U-критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

3.7 Уровень восстановленного глутатиона при отсутствии синуклеинов

Образование АФК представляет собой лишь одну составляющую окислительно-восстановительного баланса и приводит к окислительному стрессу только тогда, когда превышает возможности эндогенной антиоксидантной защиты.

Окислительный стресс может развиваться и вследствие снижения синтеза основного антиоксиданта – глутатиона (GSH). Поскольку уровень GSH способен варьировать в зависимости от области мозга (Vinokurov et al., 2021), были использованы срезы коры головного мозга (N – количество животных, P – количество срезов мозга, n – клетки. ДТ N=5, P=16, n=954; α -КО N=4, P=8, n=419; γ -КО N=4, P=8, n=1260; $\alpha\beta\gamma$ -КО N=4, P=8, n=519; рис. 16 А), а также первичная нейрон-глиальная культура из двух различных областей – коры и среднего мозга (N – биологические повторы, P – отдельные эксперименты, n – клетки. Астроциты: ДТ N=4, P=11, n=77; $\alpha\gamma$ -КО N=4, P=12, n=75; $\alpha\beta\gamma$ -КО N=4, P=9, n=35. Нейроны: ДТ N=4, P=13, n=73; $\alpha\gamma$ -КО N=4, P=11, n=108; $\alpha\beta\gamma$ -КО N=4, P=10, n=86; рис. 16 Б, В). Применяя монохлорбиман как флуоресцентный индикатор GSH, мы обнаружили, что в среднем мозге $\alpha\beta\gamma$ -КО и $\alpha\gamma$ -КО уровень GSH соответствовал значениям ДТ, а в срезах коры и первичной нейрон-глиальной культуре даже превышал их (рис. 16). Таким образом, отсутствие синуклеинов не вызывает окислительного стресса и не снижает уровень GSH. Инкубация клеток ДТ с нетоксичной концентрацией дофамина (10 мкМ) (Gandhi et al., 2012) в течение 4 часов увеличила уровень GSH в астроцитах ДТ и осталась неизменной в нейронах, но значительно снизила уровень GSH в астроцитах с β -КО и в нейронах и астроцитах $\alpha\beta\gamma$ -КО (Астроциты: β -КО+ДА $102,46 \pm 3,97\%$, N=10, n=770; $\alpha\beta\gamma$ -КО+ДА $47,74 \pm 3,03\%$, N=10, n=621; Нейроны: $\alpha\beta\gamma$ -КО+ДА $29,65 \pm 2,07\%$, N=10, n=282; рис. 16 Е, Ж, З). Следует отметить, что это снижение было связано с образованием перекиси водорода МАО, поскольку этот эффект блокировался ингибитором МАО А и В, 20 мкМ селегилином ($\alpha\beta\gamma$ -КО+СЕЛ $35,55 \pm 2,94\%$, N=10, n=299; рис. 16 Е, Ж, З). Глутатион (GSH) образуется с использованием НАДФН, и мы проверили, обусловлен ли высокий уровень GSH повышенной скоростью образования НАДФН в пентозофосфатном пути (ПФП). Из полученных данных (рис. 7), как уровень НАДФН, так и скорость образования НАДН в срезах мозга с β -КО и $\alpha\beta\gamma$ -КО не отличались от дикого типа. Таким образом, высокий уровень GSH в клетках с отсутствием синуклеина не связан с изменениями метаболизма глюкозы и уровня НАДН и НАДФН в этих клетках.

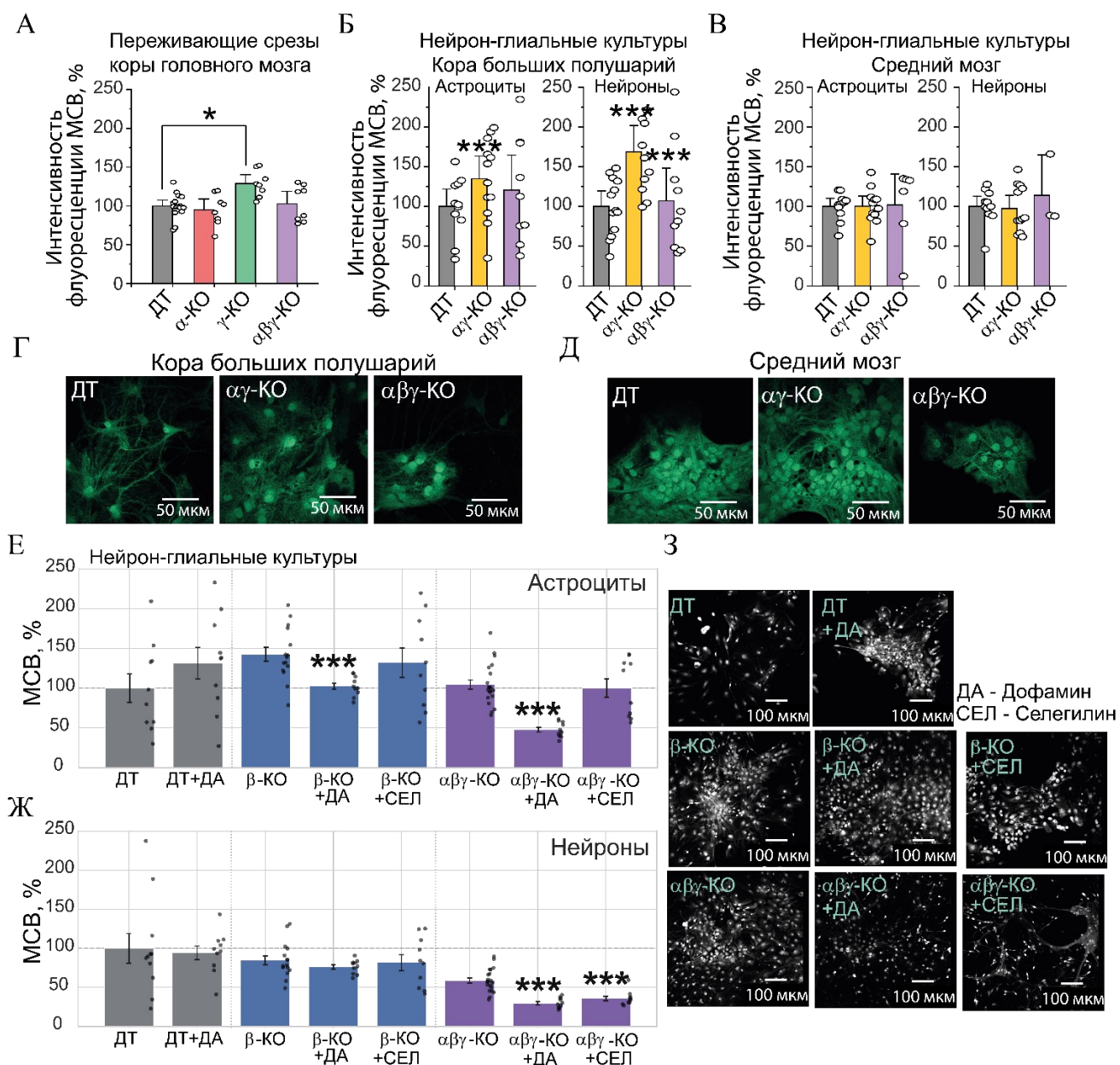


Рисунок 16 – Уровень восстановленного глутатиона (GSH) при отсутствии синуклеинов, по флуоресценции аддукта моноклорбиман-GSH (МСВ). Гистограммы количественной оценки интенсивности флуоресценции МСВ (А) в острых срезах мозга, (Б) нейрон-глиальной культуры из коры головного мозга и (В) среднего мозга МСВ. Репрезентативные конфокальные изображения (Г, Д). Интенсивность флуоресценции МСВ для (Е) астроцитов и (Ж) нейронов на базовом уровне и после добавления 10 мкМ дофамина (ДА) или 20 мкМ селегилина (СЕЛ). (З) Репрезентативные конфокальные изображения нейрон-глиальной культуры. Точки на графиках – Р. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего. ДТ принято за 100%. Статистический анализ: линейная смешанная модель (LMM) со случайным эффектом, с поправкой Холма $*p < 0,05$, $***p < 0,001$ (Fedulina, et al., 2026b)

3.8 Перекисное окисление липидов в отсутствие синуклеинов

Перекисное окисление липидов представляет собой цепное свободнорадикальное окисление полиненасыщенных фосфолипидов мембраны, участвующее в ряде физиологических процессов. Однако, избыточное образование продуктов перекисного окисления липидов приводит к патологии и гибели клеток, включая ферроптоз (Angelova, Esteras, et al., 2021). Используя BODIPY C-11 в качестве флуоресцентного зонда, мы измерили скорость перекисного окисления липидов в срезах мозга мышей (рис. 17).

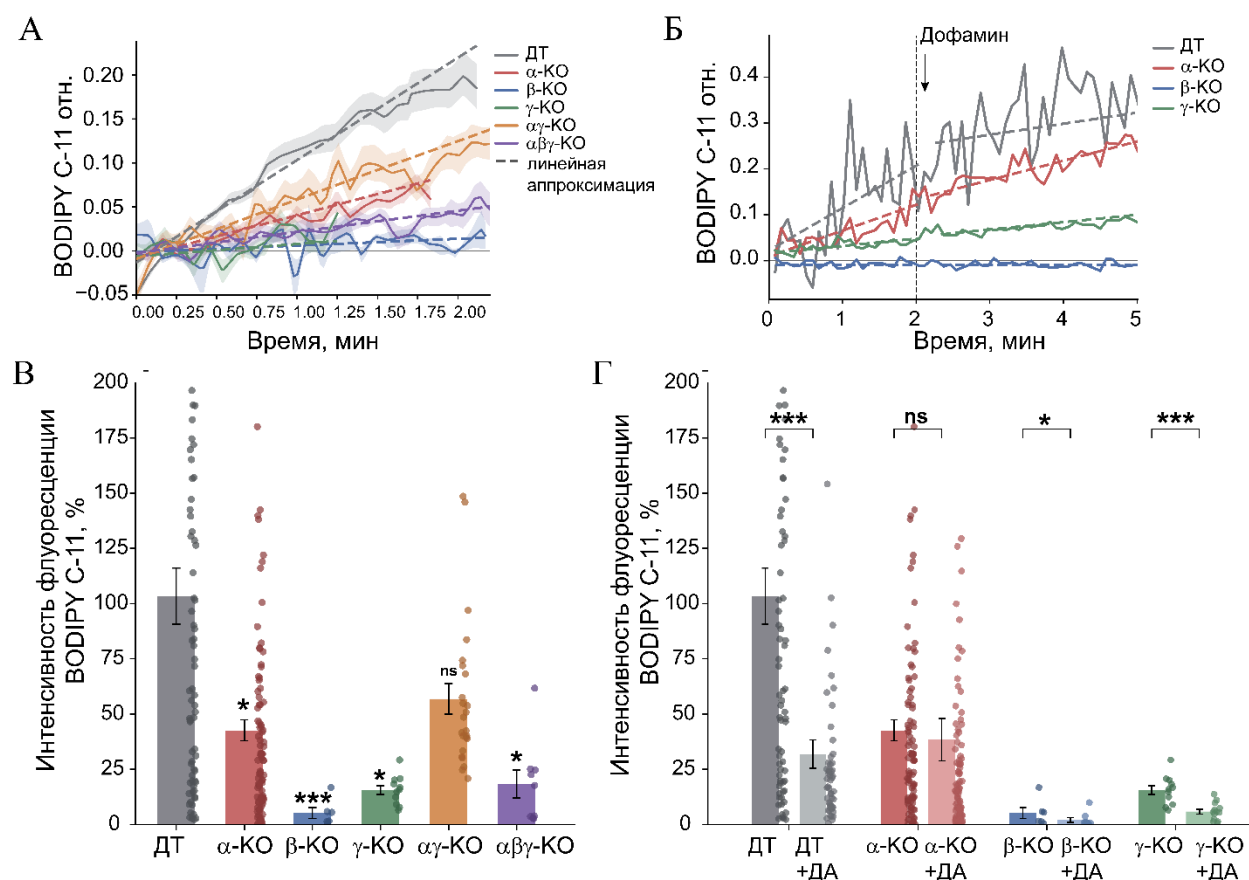


Рисунок 17 – Базовая скорость перекисного окисления липидов (ПОЛ) при отсутствии синуклеинов. (А) Репрезентативные кривые отношения флуоресценции С11-BODIPY во времени на базовом уровне в острых срезах мышей ДТ, α -КО, β -КО, γ -КО, $\alpha\gamma$ -КО и $\alpha\beta\gamma$ -КО. (Б) Репрезентативные кривые, показывающие влияние добавки дофамина (ДА) на скорость ПОЛ. (В) Базовая скорость ПОЛ. (Г) Базовая скорость ПОЛ до и после добавки ДА. Скорость ПОЛ рассчитывали, как наклон линейного участка отношения флуоресценции окисленной и восстановленной форм зонда. Точки на графиках – n. Данные (В, Г) представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего. ДТ принято за 100%. Статистический анализ: линейная смешанная модель (LMM) со случайным эффектом (ОИ внутри среза), двусторонние р-значения с поправкой Холма. (В) сравнения с ДТ; (Г) сравнения база vs ДА внутри генотипа. *p < 0,05, ***p < 0,001. (Fedulina et al., 2026b)

В наших экспериментах нокаут α -, β - или γ -синуклеинов вызывал резкое снижение скорости перекисного окисления липидов по сравнению со срезами мозга дикого типа (N – количество животных, P – количество срезов, n – ОИ. ДТ $N=5$, $P=7$, $n = 75$; α -КО $N=4$, $P=9$, $n=92$; β -КО $N=3$, $P=3$, $n=6$; γ -КО $N=3$, $P=5$, $n = 11$; $\alpha\gamma$ -КО $N=3$, $P=3$, $n = 24$; $\alpha\beta\gamma$ -КО $N=3$, $P=3$, $n = 9$; рис. 17 А, В), при этом наиболее значительное снижение на 90% наблюдалось в срезах мозга с нокаутом β -синуклеина (β -КО $8,5 \pm 5,5$ %, $N=3$, $P=3$, $n=6$, $p<0,001$ по сравнению с ДТ). Важно отметить, что перекисное окисление липидов в срезах мозга с двойным нокаутом $\alpha\gamma$ -синуклеинов не имело существенных отличий от дикого типа ($\alpha\gamma$ -КО $65,2 \pm 12,8$ %, $N=3$, $P=3$, $n = 24$, $p = 0,28$ по сравнению с ДТ; рис. 17 А, В), что указывает на важность β -синуклеина в поддержании перекисного окисления липидов. Тройное нокаутирование α -, β - и γ -синуклеина также привело к снижению скорости перекисного окисления липидов ($\alpha\beta\gamma$ -КО $20,9 \pm 10,4$ %, $N=3$, $P=3$, $n = 9$, $p < 0,05$ по сравнению с ДТ; рис. 17 А, В). Значимое снижение также наблюдалось при отсутствии α -синуклеина ($32,8 \pm 10,0$ %, $N=4$, $P=9$, $n = 92$, $p < 0,05$) и γ -синуклеина ($16,6 \pm 2,3$ %, $N=3$, $P=5$, $n = 11$, $p < 0,05$). Таким образом, отсутствие синуклеинов приводит к снижению перекисного окисления липидов в срезах мозга *ex vivo*. Чтобы определить, может ли функциональная активация нейронов и астроцитов изменить скорость перекисного окисления липидов, мы добавили 10 мкМ дофамина, который может активировать ряд окислительных процессов, включая запуск МАО и окисление дофамина (Akagawa et al., 2006; Angelova & Abramov, 2017). В соответствии с ранее показанными результатами (Ben-Shachar & Youdim, 1993; Spencer et al., 1996), дофамин снижал (ДТ+ДА $N=4$, $P=4$, $n=53$, $p < 0,001$) перекисное окисление липидов в срезах мозга ДТ (рис. 17 Б, Г). Отсутствие β - и γ -синуклеинов снижает (β -КО+ДА $N=3$, $P=3$, $n=9$; $p < 0,05$; γ -КО+ДА $N=3$, $P=4$, $n=13$, $p < 0,001$) эффект дофамина по сравнению с ДТ, хотя снижение перекисного окисления липидов все еще было значительным (рис. 17 Б, Г). В срезах мозга с нокаутом α -синуклеина дофамин не вызывал дальнейшего снижения перекисного окисления липидов (α -КО+ДА, $N=4$, $P=7$, $n=88$, $p > 0,05$), что может быть связано с очень низкой базальной скоростью перекисного окисления липидов в этих срезах

мозга. Эти результаты указывают на низкий уровень перекисного окисления липидов в клетках мозга с отсутствием синуклеинов, но остается неясным, связано ли это с метаболизмом липидов или окислительно-восстановительным балансом в этих клетках.

3.9 Кальциевая сигнализация в отсутствие синуклеинов

3.9.1 Базовый уровень цитозольного кальция в отсутствие синуклеинов

Базовый уровень внутриклеточной концентрации кальция в нейронах и астроцитах относится к ключевым характеристикам клеточного кальциевого гомеостаза (рис. 18).

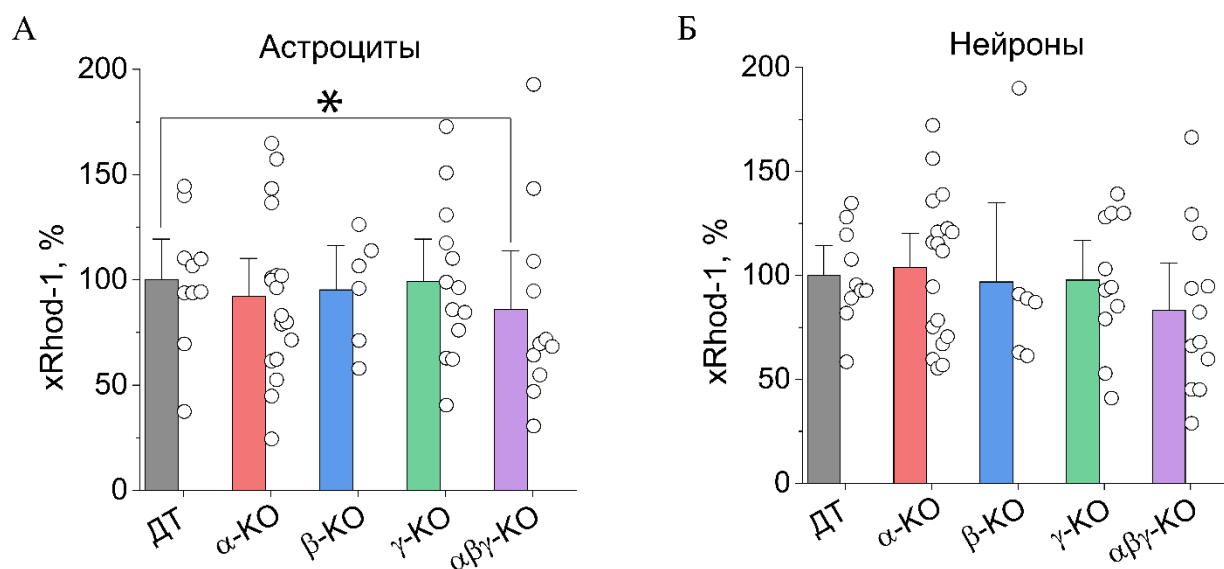


Рисунок 18 – Базовый уровень $[Ca^{2+}]_i$ в астроцитах и нейронах острых переживающих срезов коры головного мозга мышей. (А) Астроциты. N – количество животных, P – количество срезов мозга, n – клетки. DT N=6, P=10, n=76; α-KO N=4, P=18, n=98; β-KO N=6, P=6, n=61; γ-KO N=4, P=13, n=58; αβγ-KO N=4, P=11, n=42. (Б) Нейроны. DT N=6, P=10, n=83; α-KO N=4, P=18, n=120; β-KO N=6, P=6, n=39; γ-KO N=4, P=11, n=72; αβγ-KO N=4, P=12, n=55. Точки на графиках – P. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего. Интенсивность флуоресценции нормировали на среднее DT (принято за 100 %). Статистический анализ: линейная смешанная модель (LMM) со случайным эффектом (ОИ внутри среза); двусторонние p против DT с поправкой Холма. *p < 0,05 (Fedulina et al., 2026c)

В проведенных экспериментах $[Ca^{2+}]_i$ в астроцитах в состоянии покоя была статистически значимо ниже у αβγ-нокаутных ($69 \pm 5\%$, N=4, P=11, n=42, p<0,05)

животных, тогда как в остальных генотипах он оставался близким к контрольному (рис. 18 А). Это может указывать на повышенную активность кальциевых АТФаз или на угнетение основных кальциевых транспортеров, в том числе глутаматных рецепторов, либо их включение в электрическую систему. В нейронах статистически значимого изменения $[Ca^{2+}]_i$ не регистрировалось.

3.9.2 Дофамин-индуцированный кальциевый сигнал в нейронах в отсутствие синуклеинов

Показано, что α -синуклеин и β -синуклеин играют существенную роль в гомеостазе дофамина (Al-Wandi et al., 2010; Vaarmann et al., 2010). Дофамин запускает в нейронах как рецептор-зависимый (через D1-подобные рецепторы), так и рецептор-независимый кальциевый сигнал (Saint-Jour et al., 2025; Vaarmann et al., 2010). В наших экспериментах дофамин апплицировали на острые срезы мозга мышей. Установлено, что дофамин (50 мкМ) повышал уровень $[Ca^{2+}]_i$ в нейронах дикого типа (N – количество животных, P – количество срезов мозга, n – клетки. ДТ N=6, P=13, n=119; α -КО N=4, P=21, n=159; β -КО N=6, P=6, n=46; γ -КО N=4, P=16, n=97; $\alpha\beta\gamma$ -КО N=4, P=11, n=33; рис. 19), причем в α -КО нейронах этот сигнал был статистически значимо ниже (α -КО $65,5 \pm 3,7\%$, N=4, P=21, n=159, $p<0,01$; рис. 19 А, Д), тогда как при β -КО дофамин-индуцированный кальциевый ответ повышался (β -КО $134,6 \pm 11,7\%$, N=6, P=6, n=46, $p<0,05$; рис. 19 Б, Д). В нейронах γ -КО и тройным нокаутом синуклеинов дофамин-индуцированный сигнал был ниже, чем в нейронах срезов дикого типа (γ -КО $54,5 \pm 3,3\%$, N=4, P=16, n=97, $p<0,001$; $\alpha\beta\gamma$ -КО $45,6 \pm 5,1\%$, N=4, P=11, n=33, $p<0,001$; рис. 19 В, Г, Д). Стоит отметить, что, несмотря на различия в амплитуде дофамин-индуцированного кальциевого сигнала, его форма у всех генотипов была сходной, что предполагает общность механизмов.

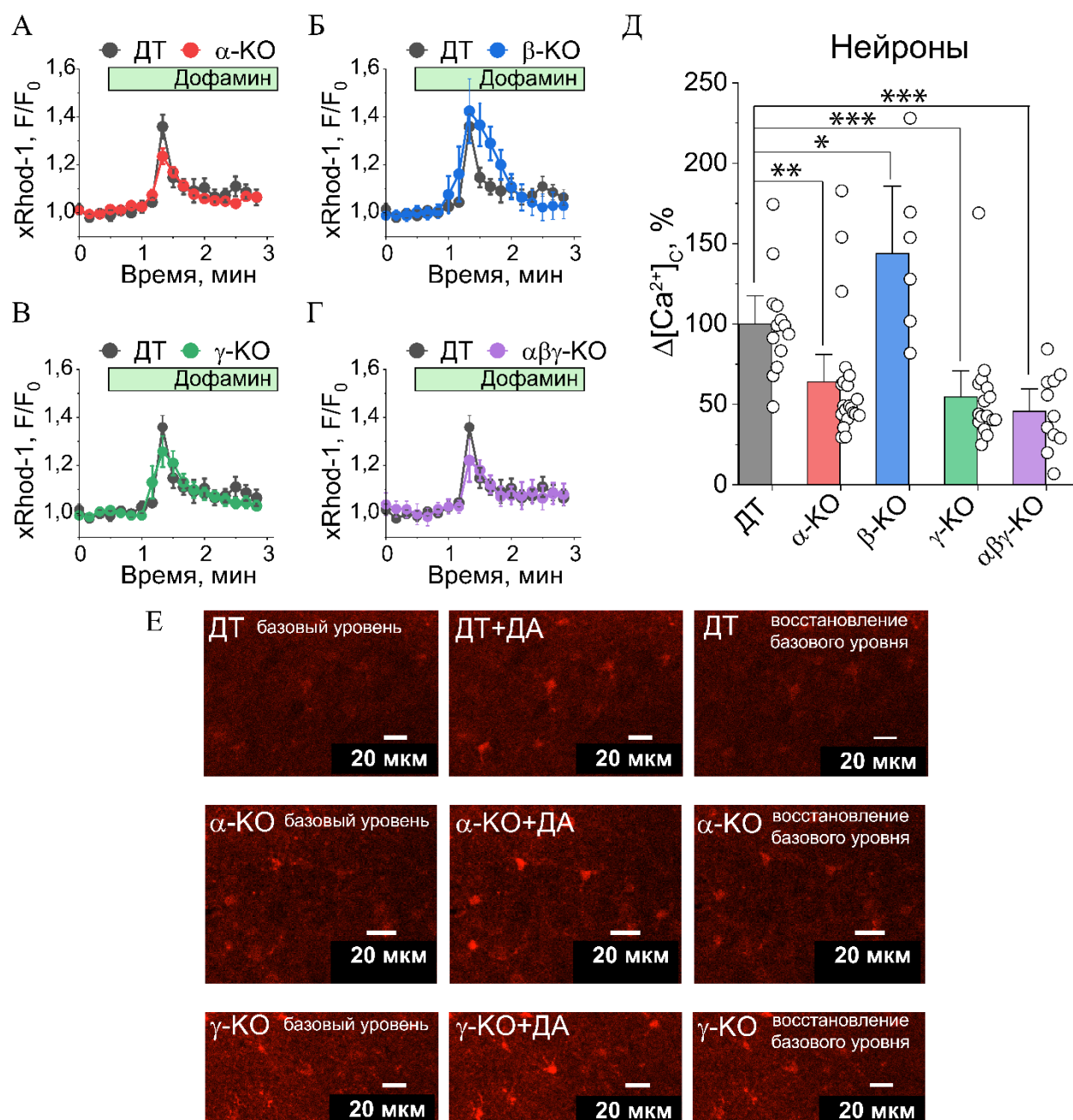


Рисунок 19 – Дофамин-индуцированный кальциевый сигнал в острых срезах мозга. Репрезентативные усредненные кривые дофамин-индуцированного кальциевого сигнала в острых срезах мозга от мышей дикого типа (ДТ) и (А) α -КО, (Б) β -КО, (В) γ -КО, (Г) $\alpha\beta\gamma$ -КО. (Д) Амплитуда дофамин-индуцированного кальциевого сигнала в нейронах. Точки на графике – Р. (Е) Репрезентативные конфокальные изображения (X-Rhod-1) для ДТ, α -КО, γ -КО на базовом уровне, в присутствии ДА и после восстановления базового уровня. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего. Амплитуду сигнала рассчитывали, как прирост флуоресценции (F/F₀) и нормировали на среднее ДТ (принято за 100 %). Статистический анализ: линейная смешанная модель (LMM) со случайным эффектом (ОИ внутри среза); двусторонние р против ДТ с поправкой Холма. * p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 (Fedulina et al., 2026c)

3.9.3 Влияние отсутствия синуклеинов на глутамат-индуцированный кальциевый сигнал в нейронах

Глутамат – главный нейромедиатор центральной нервной системы, поэтому любые изменения кальциевых ответов на глутамат могут отражать различия в общей передаче нейронного сигнала. Было показано, что добавка физиологической концентрации глутамата (10 мкМ) вызвала типичный ответ в нейронах острых срезов мышей ДТ (рис. 20 А).

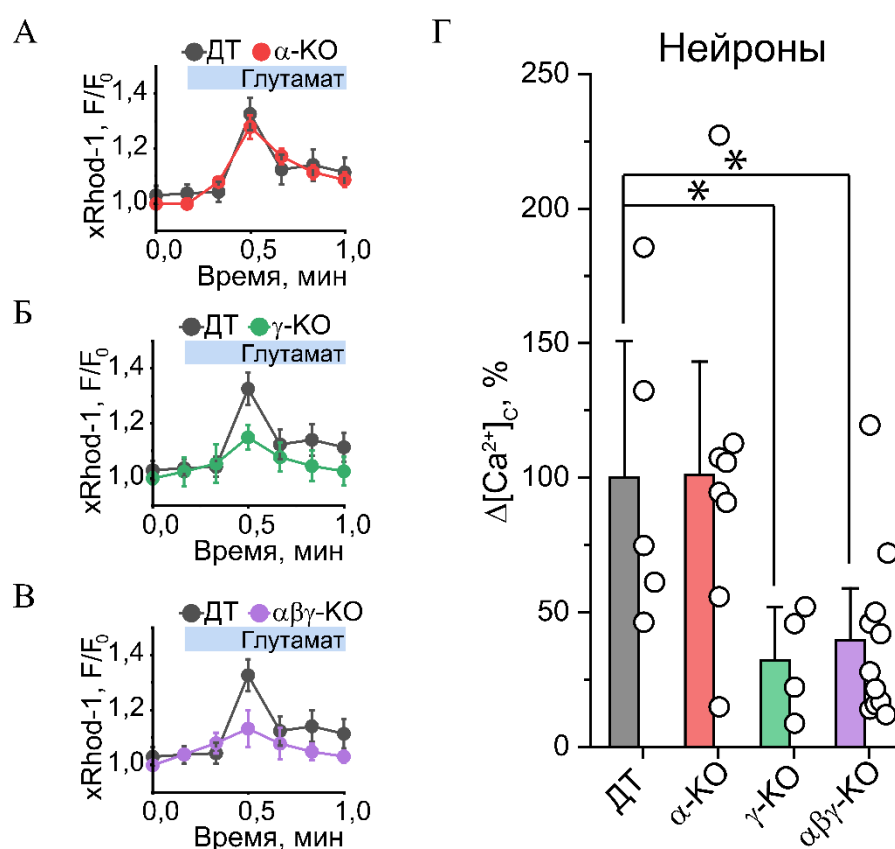


Рисунок 20 – Индуцированный глутаматом кальциевый сигнал в острых срезах мозга. (А-В) Репрезентативные усредненные кривые индуцированного глутаматом кальциевого сигнала в острых срезах мозга от мышей дикого типа (ДТ) и (А) α -КО, (Б) γ -КО, (В) $\alpha\beta\gamma$ -КО. (Г) Амплитуда глутамат-индуцированного кальциевого сигнала в нейронах. N – количество животных, P – количество срезов мозга, n – клетки. ДТ N=5, P=5, n=12; α -КО N=4, P=8, n=26; γ -КО N=4, P=4, n=9; $\alpha\beta\gamma$ -КО N=4, P=11, n=16. Точки на графике – P. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего. Амплитуду сигнала рассчитывали, как прирост флуоресценции (F/F_0) и нормировали на среднее ДТ (принято за 100 %). Статистический анализ: линейная смешанная модель (LMM) со случайным эффектом (ОИ внутри среза); двусторонние p против ДТ с поправкой Холма. *p < 0,05 (Fedulina et al., 2026c)

При внесении той же концентрации глутамата в срезы мозга α -нокаутных мышей амплитуда кальциевого сигнала не отличалась от дикого типа ($93,1 \pm 11,7\%$, $N=4$, $P=8$, $n=26$; рис. 20 А, Г), тогда как в клетках с нокаутом γ -синуклеина ответ на глутамат был существенно слабее, чем в нейронах дикого типа ($34,4 \pm 6,5\%$, $N=4$, $P=4$, $n=9$, $p < 0,05$; рис. 20 Б, Г). Отсутствие всех синуклеинов также снижало глутамат-индуцированный кальциевый сигнал относительно нейронов в срезах мозга дикого типа ($28,7 \pm 6,0\%$, $N=4$, $P=11$, $n=16$, $p < 0,05$; рис. 20 В, Г). Совокупность этих данных свидетельствует, что нокаут γ - и $\alpha\beta\gamma$ -синуклеинов приводит к изменению реакции нейронов на глутамат.

3.9.4 Дофаминовая модуляция глутамат-индуцированного кальциевого сигнала при отсутствии синуклеинов

Ранее было показано, что активация D2-подобных рецепторов в нейронах в норме подавляет глутамат-индуцированный кальциевый сигнал, что способно ограничивать глутаматную эксайтотоксичность (Vaarmann et al., 2013; Wang et al., 2003). С учетом регуляторной функции синуклеинов в транспорте дофамина было проверено, способно ли добавление экзогенного дофамина изменить глутамат-индуцированный кальциевый сигнал в нейронах с отсутствием синуклеина. Согласно ранее опубликованным данным (Vaarmann et al., 2013), в нейронах срезов мозга дикого типа внесение глутамата после дофамина статистически значимо ослабляло прирост $[Ca^{2+}]_i$ в ответ на глутамат ($32,2 \pm 2,7\%$, $N=6$, $P=9$, $n=57$, $p < 0,001$; рис. 21 Г).

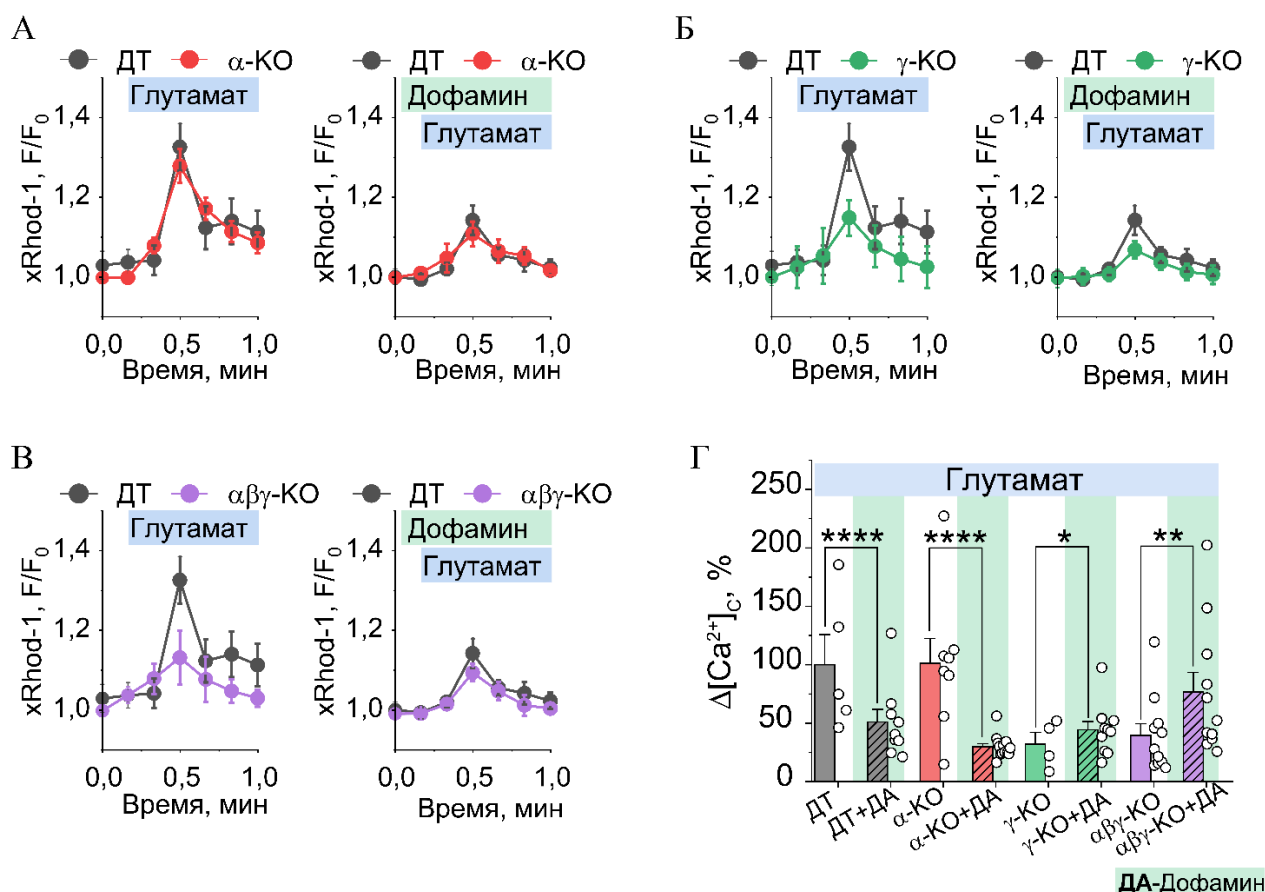


Рисунок 21 – Модуляция глутамат-индуцированного кальциевого сигнала нейронов дофамином в острых переживающих срезах мозга. (А-В) Репрезентативные кривые индуцированного глутаматом кальциевого сигнала в острых срезах мозга от мышей дикого типа (ДТ) и (А) α -КО, (Б) γ -КО, (В) $\alpha\beta\gamma$ -КО. (Г) Амплитуда индуцированного глутаматом кальциевого сигнала в нейронах. N – количество животных, P – количество срезов мозга, n – клетки. Добавка глутамата: ДТ N=5, P=5, n=12; α -КО N=4, P=8, n=26; γ -КО N=4, P=4, n=9; $\alpha\beta\gamma$ -КО N=4, P=11, n=16. Добавка глутамата после дофамина: ДТ N=6, P=9, n=57; α -КО N=4, P=13, n=40; γ -КО N=4, P=10, n=27; $\alpha\beta\gamma$ -КО N=4, P=11, n=16. Точки на графике – P. Данные (Г) представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего. Амплитуду сигнала рассчитывали, как прирост флуоресценции (F/F_0) и нормировали на среднее значение глутаматного ответа ДТ без ДА (принято за 100 %). Статистический анализ: линейная смешанная модель (LMM) со случайным эффектом (ОИ внутри среза). *p < 0,05, **p < 0,01, ****p < 0,0001 (Fedulina et al., 2026c)

В α -КО нейронах внесение глутамата после дофамина давало реакцию, подобную нейронам дикого типа: подъем кальция в ответ на глутамат статистически значимо снижался по сравнению с необработанными клетками ($25,3 \pm 2,4\%$, N=4, P=13, n=40, p < 0,0001; рис. 21 А, Г). Однако в нейронах γ -КО этот

эффект исчезал – предварительная инкубация с дофамином не меняла реакцию на глутамат (рис. 21 Б, Г). В нейронах срезов мозга мышей с нокаутом $\alpha\beta\gamma$ -синуклеина регистрировался ответ как на дофамин, так и на глутамат, но дофамин не уменьшал глутамат-индуцированный подъем $[Ca^{2+}]_i$ (рис. 21 В, Г). Эти результаты указывают на то, что у γ - и $\alpha\beta\gamma$ -нокаутных нейронов ослаблена способность дофамина подавлять глутамат-индуцированный кальциевый ответ через D2-рецепторы по сравнению с нейронами дикого типа или α -КО нейронами.

3.9.5 Дофамин-индуцированный кальциевый сигнал в астроцитах в отсутствие синуклеинов

В астроцитах дофамин-индуцированный кальциевый сигнал является преимущественно рецептор-независимым и запускается за счет образования пероксида водорода моноаминоксидазой (Vaarmann et al., 2010). Так, инкубация срезов мозга с ингибитором МАО селегилином (20 мкМ) блокировала дофамин-индуцированный кальциевый сигнал в астроцитах (рис. 22 Б), но не в нейронах. Примечательно, что дофамин вызывал кальциевый сигнал в астроцитах всех изученных генотипов без различий в амплитуде подъема $[Ca^{2+}]_i$ у ДТ, β -, γ - и $\alpha\beta\gamma$ -нокаутов синуклеина (N – количество животных, P – количество срезов мозга, n – клетки. ДТ N=6, P=10, n=52; α -КО N=4, P=15, n=40; β -КО N=6, P=10, n=66; γ -КО N=4, P=12, n=27; $\alpha\beta\gamma$ -КО N=4, P=10, n=15; рис. 22 Г, Д, Е, Ж). Вместе с тем, в отличие от нейронов, в астроцитах с α -КО кальциевый ответ на дофамин был статистически значимо выше ($183 \pm 24\%$, N=4, P=15, n=40, $p < 0,05$; рис. 22 В, Ж). Такой ответ можно объяснить повышенной активностью МАО в клетках с α -КО, активность которой сохраняется в клетках этого генотипа. Пероксид водорода, образующийся при окислении дофамина, окисляет мембранные липиды, активирует фосфолипазу C и через IP_3 высвобождает Ca^{2+} из эндоплазматического ретикула (Domijan et al., 2014).

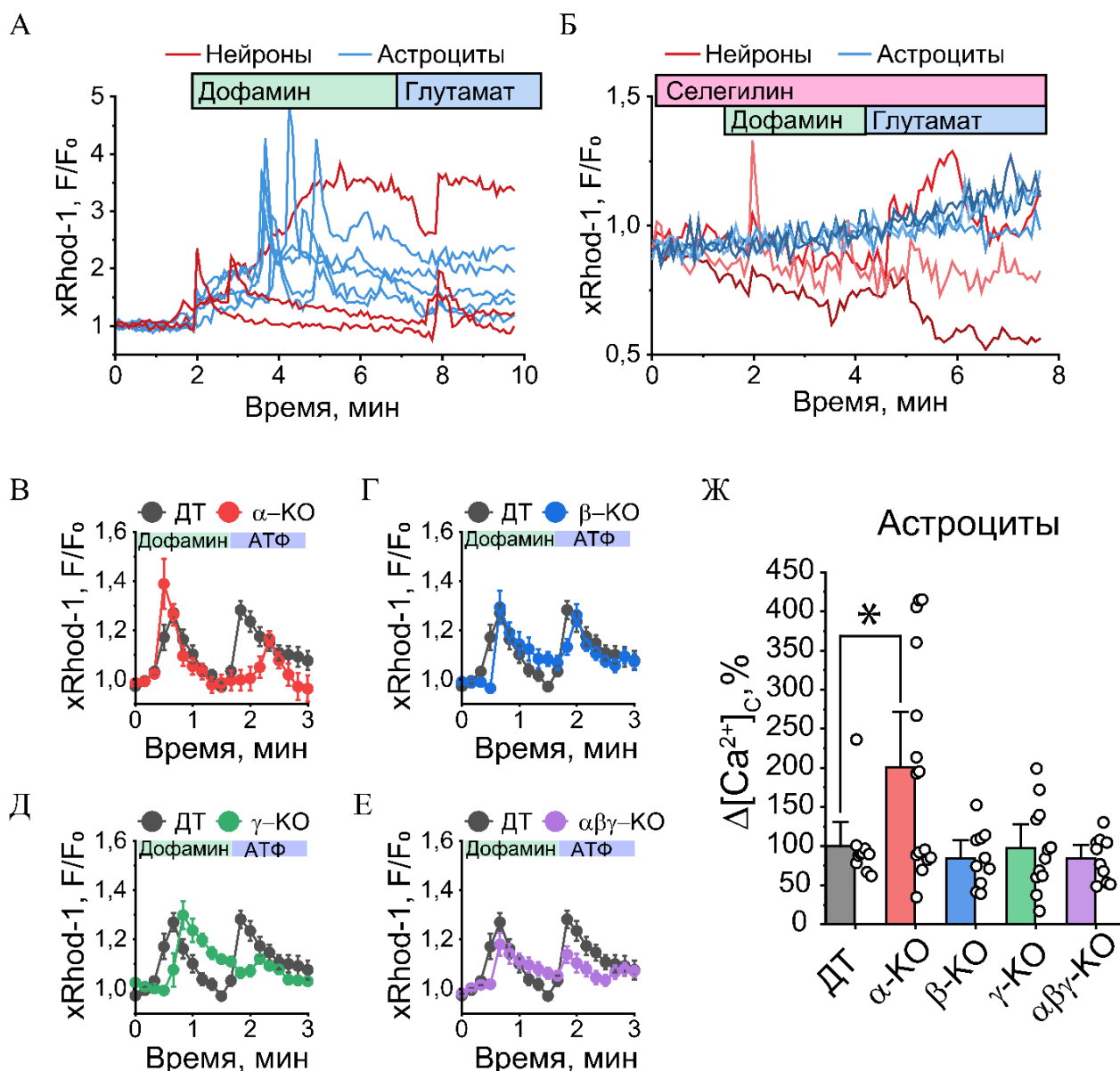


Рисунок 22 – Дофамин-индуцированный кальциевый сигнал астроцитов в острых переживающих срезах мозга (А-Б) Репрезентативные кривые кальциевого сигнала, индуцированного дофамином и глутаматом, в острых срезах мозга (А) без какой-либо модуляции и (Б) после инкубации с ингибитором МАО – селегилином. (В-Е) Репрезентативные кривые кальциевого сигнала, индуцированного дофамином и АТФ, в астроцитах в острых срезах мозга ДТ и (В) α-КО, (Г) β-КО, (Д) γ-КО, (Е) αβγ-КО. (Ж) Амплитуда кальциевого сигнала, индуцированного дофамином, в астроцитах. N – количество животных, P – количество срезов мозга, n – клетки. ДТ N=6, P=10, n=52; α-КО N=4, P=15, n=40; β-КО N=6, P=10, n=66; γ-КО N=4, P=12, n=27; αβγ-КО N=4, P=10, n=15. Точки на графике – P. Данные (3) представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего. Амплитуду сигнала рассчитывали, как прирост флуоресценции (F/F₀) и нормировали на среднее ДТ (принято за 100 %). Статистический анализ: линейная смешанная модель (LMM) со случайным эффектом (ОИ внутри среза); двусторонние p против ДТ с поправкой Холма. *p < 0,05 (Fedulina et al., 2026с)

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Здесь мы рассматриваем синуклеины как модуляторы энергетического метаболизма митохондрий и их влияние на потенциал, НАДН и пул АТФ. Было показано, что в отсутствие мономерного α -синуклеина или присутствие его олигомерной формы происходит увеличение активности электрон-транспортной цепи и митохондриального дыхания, что, вероятно, происходит вследствие падения эффективности F_0F_1 -АТФ-синтазы (Ludtmann et al., 2016, 2018). Повышенная амплитуда TMRM в ответ на олигомицин также может подтверждать это. Известно, что скорость переноса электронов между комплексами III – цитохром c – комплекс IV зависит от наличия суперкомплексов ЭТЦ (т. е. суперкомплексов, состоящих из димера комплекса III и комплекса IV) и респирасомы (комплекс I – димер комплекса III – комплекс IV), а также что цитохром c существует в нескольких субпопуляциях (свободный и связанный с внутренней митохондриальной мембраной цитохром c в обеих редокс-формах) (Hernansanz-Agustín & Enríquez, 2021; Lopez-Fabuel et al., 2016). Возможно, при отсутствии синуклеинов происходит реорганизация ЭТЦ из-за необходимости производить больше АТФ, так как получаемое клеткой количество энергии недостаточно для ее нормального функционирования. Считается, что мягкое разобщение митохондрий снижает продукцию АФК в ЭТЦ (Vaarmann et al., 2010). Это подтверждают полученные данные, согласно которым происходит двукратное снижение митохондриальной продукции АФК и прирост $\Delta\psi_m$ в ответ на внесение олигомицина у β -КО и тройного нокаута синуклеинов.

Было показано, что отсутствие синуклеинов перестраивает митохондриальный энергетический метаболизм клеток мозга (Fedulina et al., 2025; Ludtmann et al., 2016). Поскольку транспорт кальция в матрикс митохондрий сопряжен с митохондриальным мембранным потенциалом ($\Delta\psi_m$) и служит одновременно механизмом накопления $[Ca^{2+}]$ и стимулом окислительного метаболизма, отсутствие синуклеинов может приводить к изменениям в митохондриальном Ca^{2+} гомеостазе.

В наших экспериментах на изолированных митохондриях мозга этот эффект оказался изоформ-специфичным. Только у животных с нокаутом γ -синуклеина наблюдалось ингибирование митохондриального кальциевого накопления и более низкая кальциевая емкость, которая служит интегральным показателем способности органелл аккумулировать ионы Ca^{2+} до порогового открытия митохондриальной поры (mPTP). При этом скорость оттока кальция из митохондрий оставалась неизменной, что указывает на нарушение именно потенциал-зависимого захвата ионов Ca^{2+} , а не на общее повреждение митохондрий. Потенциально более низкая митохондриальная кальциевая емкость может объяснять значительный дефицит дофаминергических нейронов в черной субстанции у мышей с нокаутом γ -синуклеина (Robertson et al., 2004), что может приводить к более короткой продолжительности жизни у γ -синуклеин КО мышей по сравнению с другими линиями мутантных животных (Sukhanova et al., 2026). Данный механизм, вероятно, действует не изолированно, а накладывается на возраст-зависимую потерю нейронов (Connor-Robson et al., 2016) и пресинаптический дисбаланс, формируя совокупный фенотип нейродегенеративной уязвимости при утрате γ -синуклеина.

Полученные результаты выявили взаимосвязь энергетического метаболизма и продукции АФК, митохондриальный и ксантиноксидазный пути как функционально сопряженные механизмы.

Было показано, что отсутствие α -синуклеина (α -КО) или его комбинации с отсутствием γ -синуклеина ($\alpha\gamma$ -КО) приводили к значительному снижению продукции АФК, преимущественно супероксида, в цитозоле. Хотя полное отсутствие синуклеинов не было показано как причина выраженных изменений физиологии в моделях грызунов, нокаут отдельных синуклеинов приводил к изменениям сигнальной трансдукции и общей продолжительности жизни (Sukhanova et al., 2026). Было показано, что отсутствие синуклеинов значительно изменяет активность основных продуцентов АФК в клетках мозга, что указывает на роль мономерных синуклеинов в функции НАДФН-оксидазы, моноаминоксидазы, ксантиноксидазы и митохондрий.

Существует много исследований на тему участия агрегированного α -синуклеина в генерации АФК и окислительного стресса. Способность α -синуклеина индуцировать окислительный стресс проявляется преимущественно у его агрегированных форм. Так, его олигомеры даже в бесклеточной среде в присутствии двухвалентных катионов способны производить супероксид-анион (Deas et al., 2016; Ludtmann et al., 2018). Кроме того, фибриллярные и олигомерные формы α -синуклеина активируют производство АФК ферментами и ЭТЦ митохондрий (Angelova et al., 2020), что способствует развитию ферроптоза. При этом во всех указанных работах мономерный α -синуклеин не вызывал статистически значимых изменений продукции АФК (Deas et al., 2016).

Настоящее исследование показало значительное уменьшение производства АФК в клетках с отсутствием синуклеинов, в особенности у животных с нокаутом по гену α -синуклеина и двойному нокауту по α - и γ -синуклеинам. Однако статистически значимого снижения производства АФК в одиночных β - и γ -КО не наблюдалось, что означает, что значительное снижение в двойном нокауте так же опосредовано отсутствием α -синуклеина. Интересно, что в нейрон-глиальных культурах с тройным нокаутом по всем синуклеинам изменения скорости выработки АФК не происходило. Этот феномен можно объяснить пока что неизученным механизмом адаптации животных с тройным нокаутом, поскольку они способны доживать до старости наряду со здоровыми животными, хотя и имеют функциональные изменения нигростриарной системы, заметные нарушения моторики и сниженный уровень выживаемости (Connor-Robson et al., 2016b; Greten-Harrison et al., 2010).

Было показано, что в ответ на ингибитор КСО, оксипуринол, у животных как с одиночным, так и с двойным α -КО и γ -КО не было понижения скорости продукции АФК. Предположительно, активность КСО регулируется α - и γ -синуклеинами, но не β -синуклеином, а их отсутствие приводило к ингибированию КСО и как следствие продукции АФК продуцируемого работой этого фермента. Это объясняет понижение базовой скорости продукции АФК в отсутствие α -синуклеина, но не γ -синуклеина. Интересно, что базовая скорость АФК была

снижена у α -КО и $\alpha\gamma$ -КО, в то время как значения скорости производства АФК у γ -КО были на уровне контроля. Это может означать, что γ -синуклеин вносит вклад в поддержание активности КСО преимущественно в условиях, когда α -синуклеин уже отсутствует, то есть реализует частично компенсаторную, а не самостоятельную модуляторную функцию. Отсутствие ответа на ОП у γ -КО указывает на то, что вклад ксантиноксидазного пути в общую продукцию АФК здесь минимален, либо фермент находится в функционально подавленном состоянии, тогда как базальный редокс-фон поддерживается альтернативными источниками, прежде всего НАДФН-оксидазой и, в меньшей степени, МАО. Для аллопуринола, и в меньшей степени ОП показана антирадикальная активность (Grootveld et al., 1987; Moorhouse et al., 1987). Тем не менее, в наших экспериментах эффект ОП преимущественно вызван ингибированием КСО потому, что продукция АФК при двойном $\alpha\gamma$ -КО даже повышалась, что не может быть при действии антиоксиданта.

Регуляция КСО α - и γ -синуклеинами может происходить по нескольким механизмам: либо непосредственным взаимодействием белков с ферментом, либо изменением митохондриального метаболизма, который, в свою очередь, ведет к изменению гомеостаза пуринов. Активация КСО в различных формах ишемии была показана ранее (Abramov et al., 2007; Angelova et al., 2023; Harrison, 2004). Изменения в митохондриальном метаболизме и энергетическом балансе клеток головного мозга с отсутствием эндогенных α - и γ -синуклеинов могут приводить к изменению активности КСО, посредством влияния на быстрые изменения в уровне пуринов. Для α -синуклеина была показана его роль в митохондриальном метаболизме (Ludtmann et al., 2016). β -КО так же меняет $\Delta\psi_m$, но при этом активность КСО в отсутствие β -синуклеина сохраняется. Следовательно, митохондриальный сдвиг β -КО недостаточен, чтобы отменить вклад ксантиноксидазного пути. γ -синуклеин может влиять на липидный обмен, динамику микротрубочек и актинового цитоскелета (Guschina et al., 2011; Millership et al., 2013; Zhang et al., 2011), что может давать вклад в регуляцию энергетики и метаболизма нервных клеток.

Моноаминоксидазы – ферменты, играющие важную роль в деградации катехоламинов, включая серотонин, дофамин и адреналин. Они также важны в редокс-сигналикации за счет продукции H_2O_2 и запуска повышения $[Ca^{2+}]_i$ в астроцитах (Novikova et al., 2020). Показано, что β -синуклеин участвует в гомеостазе дофамина через регуляцию захвата дофамина синаптическими везикулами (Ninkina et al., 2021). Хотя было показано, что экзогенный α -синуклеин увеличивает экспрессию MAO A, в настоящем исследовании, при отсутствии α -синуклеина MAO остается активной, ингибируемой селегилином и способной отвечать на экзогенный дофамин. В данной работе были получены результаты, в которых отсутствие β - или γ -, но не α -синуклеина, сопровождалось нечувствительностью к ингибиторам моноаминоксидаз. В отсутствие γ -синуклеина наблюдалось повышение скорости продукции АФК в ответ на селегилин. Ингибирование MAO может приводить к накоплению катехоламинов и их MAO-независимому окислению, кроме того, этому может способствовать нарушенная D2-зависимая регуляция при γ -КО.

В работе был показан вклад НАДФН-оксидазы в общий редокс-профиль при отсутствии синуклеинов. α -КО и β -КО были нечувствительными к ингибиторам НАДФН-оксидазы, что указывает на то, что эти синуклеины могут модулировать активность фермента. Примечательно, что мономерный α -синуклеин не индуцирует продукцию АФК, тогда как олигомерный и фибриллярный α -синуклеин индуцируют АФК, что в краткосрочной перспективе было независимо от ингибиторов НАДФН-оксидазы (Cremades et al., 2012; Gandhi & Abramov, 2012). Эти данные показывают, что острая генерация АФК олигомерным α -синуклеином не требует НАДФН-оксидазы. Снижение базальной продукции АФК при участии НАДФН-оксидазы может быть связано с эндогенными процессами, такими как возможная роль мономерного α -синуклеина в сборке НАДФН-оксидазы, а не с прямой активацией НАДФН-оксидазы этим синуклеином. Однако показано, что различные формы α -синуклеина способны активировать микроглиальные ферменты НАДФН-оксидазы через различные рецепторы (Hou et al., 2018; Jiang et al., 2015; Rodriguez-Perez et al., 2018). Кроме того, АФК, индуцированные НАДФН-

оксидазой, показаны как триггер агрегации α -синуклеина (Cristóvão et al., 2012; Kumar et al., 2016).

Синуклеины являются регуляторами генерации АФК, но не провоцируют окислительный стресс, так как антиоксидантная защита сохраняется, уровень восстановленного глутатиона не был снижен при синуклеиновых нокаутах. Скорее всего, они участвуют в сигнальной функции с помощью молекул АФК. Исключением является МАО-зависимый путь, где его регуляторами выступают β - и γ - синуклеины.

Отсутствие всех трех α -, β - и γ -синуклеинов как одновременно, так и по отдельности приводит к значительному снижению базальной скорости перекисного окисления липидов. Наиболее выраженный эффект наблюдался в срезах мозга с нокаутом β -синуклеина, а присутствие этого белка в клетках с нокаутом $\alpha\gamma$ -синуклеина поддерживало уровень перекисного окисления липидов на уровне, существенно не отличающемся от уровня в клетках дикого типа.

Интересно, что у ДТ, а также при нокауте β - и γ -синуклеина дофамин снижал скорость перекисного окисления липидов, тогда как при нокауте α -синуклеина снижения не наблюдалось, хотя эксперименты с GSH указывали на МАО-зависимое образование H_2O_2 , которое могло быть триггером перекисного окисления липидов. Важно отметить, что в астроцитах ДТ дофамин не вызывал статистически значимого увеличения GSH, в то время как та же концентрация дофамина снижала уровень GSH в астроцитах с нокаутом β -синуклеина и в нейронах и астроцитах с тройным нокаутом. Это может быть объяснено более высокой продукцией GSH в астроцитах ДТ в ответ на умеренное окисление и зависимостью путей, контролирующих синтез GSH, таких как Nrf2 (Esteras et al., 2023; Esteras & Abramov, 2022), от синуклеина в астроцитах. Более выраженное влияние отсутствия синуклеина на GSH в астроцитах по сравнению с нейронами подтверждает это, поскольку астроциты в большей степени участвуют в синтезе GSH и поддерживают нейроны предшественниками GSH.

Одним из потенциальных объяснений низкого уровня перекисного окисления липидов при отсутствии синуклеина может быть более низкий уровень

образования активных форм кислорода ферментами, включая КСО (Fedulina et al., 2025). Частично это подтверждают результаты измерений GSH и НАДФН в клетках с нокаутом синуклеина, демонстрирующие более высокие или аналогичные уровни молекул, участвующих в антиоксидантной защите.

Другое, более перспективное объяснение низкого уровня перекисного окисления липидов может заключаться в участии синуклеинов в метаболизме липидов, а отсутствие этих белков приводит к изменению липидного профиля у мышей с нокаутом γ - и тройного синуклеина (Guschina et al., 2011; Guschina et al., 2021). Возможный механизм может заключаться в способности α -синуклеина образовывать тройной комплекс с анионными липидами и цитохромом с, который проявляет пероксидазную активность (Bayir et al., 2009), а отсутствие синуклеинов приводит к ингибированию базальной скорости перекисного окисления липидов.

Низкая скорость перекисного окисления липидов может быть результатом или триггером восстановительного стресса (Gores et al., 1989), но уровни НАДФН не изменяются, а GSH не снижен и в ряде препаратов сопоставим с контролем или повышен, что говорит против значительной активации этого процесса. Однако более низкий уровень перекисного окисления липидов может снижать активность фосфолипаз и механизмов кальциевой сигнализации (Domijan et al., 2014).

В данной работе была изучена роль синуклеинов в кальциевой сигнализации нейронов, индуцированной глутаматом и дофамином. Связь синуклеинов с глутаматной передачей ранее описывали в основном для α -синуклеина. Было показано снижение Mn^{2+} -индуцированного фосфорилирования субъединиц NMDA-рецепторов при нокауте α -синуклеина (Ma et al., 2020) и влияние α -КО на глутаматную передачу и высвобождение глутамата (Gureviciene et al., 2007). В наших экспериментах γ - и $\alpha\beta\gamma$ -КО существенно ослабляли глутамат-индуцированный кальциевый ответ в нейронах. Снижение глутамат-индуцированного кальциевого сигнала при $\alpha\beta\gamma$ -КО, по-видимому, не определяется митохондриальным кальциевым захватом и, вероятнее всего, связано с модуляцией функции ионотропных или метаботропных глутаматных рецепторов.

Следует отметить, что не только олигомерный, но и физиологический мономерный α -синуклеин может индуцировать транспорт ионов Ca^{2+} через плазматическую мембрану, что может влиять на сигнальную трансдукцию (Angelova et al., 2016; Angelova & Abramov, 2017). Таким образом, отсутствие синуклеинов может модулировать кальциевую сигнализацию на уровне мембранной проводимости, не обязательно сопровождаясь изменением экспрессии рецепторов и транспортеров.

Учитывая эффекты дофамина, снижение дофамин-индуцированного кальциевого сигнала в нейронах α - или γ -КО с большей вероятностью связано с влиянием отсутствия синуклеинов на D1-подобные рецепторы или моноаминовый транспортер (Surmeier et al., 1995; Vaarmann et al., 2010). Это может включать снижение эффективности G-белок-сопряженной сигнализации (сАМР/РКА, Ca^{2+} /CaMK), изменение захвата дофамина или удаление D1-подобных рецепторов из липидных доменов, где синуклеины обычно локализуются.

Известно, что дофамин подавляет глутамат-индуцированный сигнал через активацию D2-подобных рецепторов (Vaarmann et al., 2013). Отсутствие γ -синуклеина блокирует модуляторный эффект дофамина на глутамат-индуцированный кальциевый сигнал, что может указывать на то, что синуклеины влияют на функцию D2-подобных рецепторов. Нарушение аккумуляции и захвата кальция в митохондриях, повышенный уровень митохондриального АФК, а также снижение Ca^{2+} сигнала в ответ на добавку дофамина и глутамата в отсутствие γ -синуклеина может говорить о том, что он скорее всего поддерживает Ca^{2+} гомеостаз через депо митохондрий. При этом у γ -синуклеина есть дополнительная роль в функционировании D2-подобных рецепторов, которая пока недостаточно изучена.

Поскольку глутамат-индуцированный Ca^{2+} сигнал идет через систему mGluR/IP₃ и NMDA/AMPA рецепторов, а в отсутствие α -синуклеина сигнал сохранился, значит глутаматные рецепторы функциональны. При α -КО происходит энергетический дефицит в митохондриях, в то же время сохраняется глутамат-индуцированный Ca^{2+} ответ и, по-видимому, запас ионов Ca^{2+} в ЭР. Это может

означать, что активность α -синуклеина не зависит от общей Ca^{2+} системы, что подтверждается отсутствием снижения базального кальция в отсутствие этого синуклеина как в нейронах, так и в астроцитах. По-видимому, α -синуклеин дофамин-специфичен и влияет на Ca^{2+} ответ по дофаминовому пути, то есть может регулировать синтез или захват дофамина или связываться с D-подобными рецепторами, но не с D2, поскольку при отсутствии α -синуклеина их функциональность сохраняется.

Таким образом, синуклеины играют важную роль в регуляции дофаминергической и глутаматергической сигнализации. Без них меняются амплитуды ответов на дофамин и глутамат и способность дофамина ослаблять глутаматный Ca^{2+} -сигнал, что согласуется с нарушением D2-подобной модуляции.

Дофамин и другие моноамины вызывают повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в астроцитах не через классические дофаминовые рецепторы на мембране, а через окисление моноаминов МАО (Novikova et al., 2020; Vaarmann et al., 2010). Моноаминооксидаза, в астроцитах преимущественно МАО-В, окисляет субстрат с образованием H_2O_2 , которая окисляет мембранные липиды, активируя фосфолипазу С с образованием IP_3 , после чего происходит высвобождение ионов Ca^{2+} из ЭР. В наших экспериментах амплитуда кальциевого сигнала в астроцитах в отсутствие α -синуклеина была выше, чем в клетках ДТ, что может указывать на более высокую экспрессию или активность этого фермента при α -КО. Это подтверждает данные о зависимости экспрессии и активности МАО-В от наличия α -синуклеина (Krayushkina et al., 2025).

α -Синуклеин поддерживает базальную продукцию цитозольных АФК, а его отсутствие влияет на активность НАДФН-оксидазы и ксантиноксидазы. В митохондриях α -синуклеин поддерживает митохондриальный мембранный потенциал и время до энергетического коллапса, поскольку его добавка восстанавливает эти функции клетки. α -Синуклеин выступает модулятором дофаминергической передачи и поддерживает биоэнергетику клетки.

Отсутствие β -синуклеина влияет на производство АФК НАДФН-оксидазой и МАО. В митохондриях поддерживает процессы окислительного

фосфорилирования, его отсутствие дает усиленный протонный ток через АТФ-синтазу и снижение мембранного потенциала.

γ -Синуклеин участвует в потенциал-зависимом захвате ионов Ca^{2+} митохондриями и в поддержании их кальциевой емкости при неизменном оттоке. Его отсутствие повышает скорость образования митохондриальных АФК. Он влияет на производство АФК ферментами, такими как МАО и ксантиноксидаза, а также имеет связь с D2-подобными рецепторами.

При отсутствии всех трех синуклеинов наблюдается падение базального кальция в астроцитах, снижение дофамин- и глутамат-индуцированных Ca^{2+} ответов, утрата модуляции подавления дофамином глутамат-индуцированного кальциевого сигнала, наличие усиленного протонного тока через АТФ-синтазу в митохондриях, снижение производства митохондриальных АФК и усиленное потребление НАДН митохондриальной цепью, что характеризует нарушение окислительного фосфорилирования, что в общей сложности дает суммарную нагрузку на биоэнергетику клеток мозга. Сопоставление эффектов одиночных α -КО, β -КО, γ -КО, двойного $\alpha\gamma$ -КО и тройного $\alpha\beta\gamma$ -КО по всем исследованным системам приведено в таблице А.2. (Приложение А).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синуклеины (α , β и γ) – представляют собой семейство небольших, преимущественно пресинаптических белков. В современной литературе наибольшее внимание уделяется α -синуклеину как ключевому фактору патогенеза болезни Паркинсона (Sivakumar et al., 2023; Vekrellis et al., 2024), тогда как физиологические функции мономерных α -, β - и γ -изоформ остаются менее изученными. В данной работе вклад синуклеинов в различные клеточные процессы был исследован на переживающих срезах головного мозга, нейрон-глиальных первичных культурах и изолированных митохондриях клеток головного мозга мышей линии C57Bl/6J с одиночными, двойным $\alpha\gamma$ -КО и тройным $\alpha\beta\gamma$ -КО генов синуклеинов. Полученные результаты показали, как отсутствие синуклеинов может влиять на энергетический метаболизм, редокс-сигнализацию, кальциевый гомеостаз, глутамат- и дофамин-индуцированную кальциевую передачу сигнала в клетках мозга мышей.

Полученные данные показывают, что мономерные синуклеины участвуют в поддержании энергетического метаболизма митохондрий. При нокауте гена β -синуклеина в срезах снижены $\Delta\psi_m$ и базальная митохондриальная продукция АФК, усилен прирост потенциала в ответ на олигомицин. При тройном нокауте снижение $\Delta\psi_m$ сочетается с усиленным ответом на олигомицин, снижением редокс-индекса НАДН и снижением митохондриальной продукции АФК примерно вдвое. При нокауте гена α -синуклеина снижены митохондриальный мембранный потенциал и энергетическая емкость клетки, оба показателя восстанавливаются при внесении 30 нМ мономерного α -синуклеина, что согласуется с опубликованными ранее исследованиями (Ludtmann et al., 2016). Это, вероятно, связано со снижением эффективности работы F_0F_1 -АТФ-синтазы. На что указывает и повышенная амплитуда сигнала TMRM в ответ на олигомицин. По-видимому, при отсутствии синуклеинов происходит реорганизация ЭТЦ, направленная на компенсацию недостатка энергии, доступной клетке. Важным следствием является мягкое разобщение митохондрий – небольшое повышение

протонной утечки через внутреннюю мембрану: митохондриальный мембранный потенциал снижен, синтез АТФ сохраняется, а митохондриальная продукция АФК падает примерно вдвое.

Анализ результатов, полученных на изолированных митохондриях мозга, показал, что только у животных с γ -КО наблюдалось снижение митохондриального накопления ионов кальция и кальциевой емкости. Поскольку скорость выхода ионов Ca^{2+} при этом не менялась, речь идет о нарушении именно потенциал-зависимого захвата ионов Ca^{2+} , а не об общем повреждении митохондрий. Сниженная кальциевая емкость может вносить вклад в описанный дефицит дофаминергических нейронов черной субстанции и меньшую продолжительность жизни γ -КО животных, формируя совокупный фенотип нейродегенеративной уязвимости при утрате γ -синуклеина (Connor-Robson et al., 2016).

В работе была определена роль синуклеинов в редокс-сигналикации через регуляцию основных ферментов, продуцентов АФК, в головном мозге. Отсутствие α -синуклеина или его двойного нокаута с γ -синуклеином приводило к значительному снижению продукции супероксида в цитозоле, тогда как в одиночных β - и γ -КО статистически значимого снижения не наблюдалось. Это может объяснять, что эффект двойного нокаута опосредован прежде всего отсутствием α -синуклеина. Ингибиторный анализ показал, что активность производства АФК КСО зависит от присутствия α - и γ -, но не β -синуклеина. У α -КО и $\alpha\gamma$ -КО в ответ на добавление оксипуринола, ингибитора КСО, не снижалась продукция АФК. При этом базовая продукция АФК была снижена у α -КО и $\alpha\gamma$ -КО, но сохранялась на уровне контроля у γ -КО, что говорит о возможной компенсаторной роли γ -синуклеина, происходящей в условиях отсутствия α -синуклеина. Отсутствие β - или γ -, но не α -синуклеина сопровождалось нарушением МАО-зависимой продукции АФК, причем введение экзогенного дофамина восстанавливало фермент-зависимую продукцию АФК. Это указывает на участие синуклеинов в функциональной работе МАО, вероятно, через механизм, отличный от простого контроля экспрессии фермента или доступности эндогенного субстрата. Было показано, что отсутствие α - или β -синуклеина не снижало

продукцию АФК в присутствии ингибитора НАДФН-оксидазы, что указывает на их возможное участие в сборке или регуляции этого ферментного комплекса. Интересно, что тройной нокаут не изменял базовую скорость продукции АФК в нейрон-глиальных культурах, что отражает пока не известные механизмы адаптации этих животных. Впервые показано, что базовая скорость ПОЛ при нокауте генов синуклеинов снижена. Наибольшее снижение наблюдалось при нокауте гена β -синуклеина, а при двойном $\alpha\gamma$ -КО скорость от ДТ не отличалась.

Кроме того, синуклеины оказались важными регуляторами кальциевой сигнализации, запускаемой глутаматом и дофамином. Глутамат-индуцированный кальциевый ответ нейронов был существенно ослаблен у γ - и $\alpha\beta\gamma$ -КО. Наиболее вероятной причиной этого процесса является модуляция функции ионотропных или метаботропных глутаматных рецепторов. Дофамин-индуцированный кальциевый сигнал был снижен у α - и γ -КО, что указывает на возможное влияние синуклеинов на функционирование D1-подобных рецепторов или моноаминового транспортера. В астроцитах, где повышение $[Ca^{2+}]_i$ в ответ на дофамин опосредуется преимущественно окислением моноаминов МАО-В и активацией фосфолипазы C, амплитуда кальциевого ответа при отсутствии α -синуклеина была выше контроля, что согласуется с литературными данными о регуляции активности МАО-В α -синуклеином (Kang et al., 2018). В норме дофамин подавляет глутамат-индуцированный кальциевый сигнал через D2-подобные рецепторы. Это подавление сохранялось у ДТ и при α -КО, но сменялось повышением ответа при нокауте гена γ -синуклеина и при тройном нокауте.

Были выявлены функциональные различия между изоформами синуклеинов. α -Синуклеин преимущественно ассоциирован с митохондриальным энергетическим метаболизмом. β -Синуклеин вовлечен в дофаминергический гомеостаз и модуляцию работы моноаминоксидазы. γ -Синуклеин важен для поддержания митохондриального кальциевого гомеостаза и глутаматергической передачи. Полученные данные расширяют представления о функциях мономерных форм синуклеинов, смещая акцент с патологической агрегации на их участие в поддержании энергетического, редокс- и кальциевого гомеостаза.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что α -синуклеин необходим для поддержания митохондриального мембранного потенциала и энергетической емкости клетки: при отсутствии этого синуклеина оба показателя снижены и восстанавливаются при внесении экзогенного мономерного α -синуклеина. Установлено, что при отсутствии β -синуклеина в срезах снижены митохондриальный мембранный потенциал и базовая митохондриальная продукция АФК. При одновременном отсутствии α -, β - и γ -синуклеинов снижение митохондриального мембранного потенциала сочетается со снижением редокс-индекса НАДН и снижением митохондриальных АФК.

2. Впервые выявлено участие γ -синуклеина в митохондриальном транспорте ионов кальция. В отсутствие γ -синуклеина снижены кальциевая емкость митохондрий и скорость захвата Ca^{2+} при неизменной скорости оттока. В отсутствие α -синуклеина, эти параметры от дикого типа не отличались.

3. Продemonстрировано, что базовую продукцию супероксид-аниона в цитозоле поддерживает α -синуклеин: при его отсутствии и при одновременном отсутствии α - и γ -синуклеинов снижена базовая скорость продукции АФК. Показано, что базовый уровень перекисного окисления липидов поддерживают все три изоформы: при одиночном отсутствии α -, β - или γ -синуклеина и при отсутствии всех трех изоформ снижена базовая скорость перекисного окисления липидов. Модуляция продукции АФК отдельными ферментами является изоформ-специфичной: эффект ингибитора ксантиноксидазы утрачивался при отсутствии α - или γ -синуклеина, эффект ингибиторов НАДФН-оксидазы – при отсутствии α - или β -синуклеина, эффект ингибитора моноаминоксидазы утрачивался при отсутствии β -синуклеина или γ -синуклеина. Уровень восстановленного глутатиона (GSH) не был снижен ни в одной из групп.

4. Показано, что вклад изоформ в дофамин-индуцированную кальциевую сигнализацию нейронов разнонаправлен: при отсутствии α -синуклеина, γ -синуклеина и при одновременном отсутствии всех трех изоформ снижена

амплитуда дофамин-индуцированного ответа, при отсутствии β -синуклеина она повышена. γ -Синуклеин модулирует глутамат-индуцированную кальциевую сигнализацию нейронов и участвует в подавлении дофамином глутамат-индуцированного кальциевого сигнала: при его отсутствии снижена амплитуда глутамат-индуцированного ответа и утрачивается способность дофамина подавлять глутамат-индуцированный ответ.

5. Выявлено, что α -синуклеин играет роль в дофамин-индуцированной кальциевой сигнализации астроцитов. В отсутствие α -синуклеина амплитуда ответа повышена, при отсутствии β - и γ -синуклеинов и при отсутствии всех трех изоформ амплитуда от дикого типа не отличалась. При одновременном отсутствии α -, β - и γ -синуклеинов снижен базовый уровень цитозольного кальция в астроцитах.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АДФ – аденозиндифосфат
 АМФ – аденозинмонофосфат
 АТФ – аденозинтрифосфат
 АФК – активные формы кислорода
 БА – болезнь Альцгеймера
 БАС – боковой амиотрофический склероз
 БП – болезнь Паркинсона
 ГАМК – γ -аминомасляная кислота
 ДА – дофамин
 ДГЭ – дигидроэтидий
 ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
 ДОПАЛ – 3,4-дигидроксифенилацетальдегид
 ДТ – дикий тип
 ДТЛ – деменция с тельцами Леви
 ИМФ – инозинмонофосфат
 ИУК – йодуксусная кислота
 ИУК – йодуксусная кислота
 комплекс I – НАДН-дегидрогеназа (комплекс I дыхательной цепи)
 комплекс II – сукцинатдегидрогеназа (комплекс II дыхательной цепи)
 комплекс III – убихинон-цитохром c-редуктаза (комплекс III дыхательной цепи)
 комплекс IV – цитохром c-оксидаза (комплекс IV дыхательной цепи)
 комплекс V – АТФ-синтаза (комплекс V дыхательной цепи)
 КСО – ксантиноксидаза
 КСО – ксантиноксидаза
 МАО – моноаминоксидаза
 ММ – митохондриальная мембрана
 НАДН – никотинамидадениндинуклеотид (восстановленная форма)
 НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат (восстановленная форма)
 O_2 – молекулярный кислород
 $O_2^{\bullet -}$ – супероксидный анион-радикал
 ОИ– область интереса
 ОП – оксипуринол
 ОПЭ – обратный перенос электронов
 ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты
 ПОЛ – перекисное окисление липидов
 ППЭ – прямой перенос электронов
 ПЦР – полимеразная цепная реакция
 РНК – рибонуклеиновая кислота
 СВ – среда выделения митохондрий
 СОД – супероксиддисмутаза

- УФ – ультрафиолетовое излучение
 ФАД – флавинадениндинуклеотид
 ФАДН₂ – флавинадениндинуклеотид (восстановленная форма)
 ФМН – флавинмононуклеотид
 цАМФ – циклический аденозинмонофосфат
 ЦНС – центральная нервная система
 ЦТК – цикл трикарбоновых кислот
 ЭР – эндоплазматический ретикулум
 ЭТЦ – электрон-транспортная цепь
 ЭЭГ – электроэнцефалография
 ЯМР – ядерный магнитный резонанс
 АМРА – α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота
 (ионотропный глутаматный рецептор)
 Аβ – β-амилоидный пептид
 Ca²⁺-АТФазаРС – фосфатидилхолин
 CaV – потенциал-зависимые кальциевые каналы
 CL – кардиолипид
 CRAC – кальций-релиз-активируемый канал (компонент SOCE)
 CRC – кальциевая емкость митохондрий, способность удержания кальция
 (calcium retention capacity)
 Cys-SOH – сульфеновая кислота цистеина
 D1-5 – дофаминовый рецептор
 DAG – диацилглицерол
 DAT – дофаминовый транспортер (dopamine transporter)
 DHE – дигидроэтидий
 DPI – дифенилениодоний
 EGTA – этиленгликоль-бис (β-аминоэтиловый эфир)-N,N,N',N'-
 тетрауксусная кислота
 FCCP – карбонилцианид-4-(трифторметокси)фенилгидразон (протонофор)
 GSH – глутатион (восстановленная форма)
 GSK – GSK2795039 ингибитор НАДФН-оксидазы 2
 H₂O₂ – перекись водорода
 HBSS – сбалансированная солевая среда Хэнкса (Hank's Balanced Salt
 Solution)
 HEPES – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота (буфер)
 iGluR – ионотропные глутаматные рецепторы
 IP₃ – инозитол-1,4,5-трифосфат
 IP₃R – рецепторы IP₃
 KCN – цианид калия
 КО – нокаут (knockout)
 LTD – долговременная депрессия (long-term depression)
 LTP – долговременная потенция (long-term potentiation)
 Mag-Fura-2 – флуоресцентный индикатор Mg²⁺/Ca²⁺
 MAO – моноаминоксидаза

- MCB – монохлоробиман
- MCU – митохондриальный кальциевый унипортер (mitochondrial calcium uniporter)
- mGluR – metabотропные глутаматные рецепторы
- MPTP – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (нейротоксин, модель БП)
- mPTP – митохондриальная пора проницаемости (mitochondrial permeability transition pore)
- NAC – неамилоидный компонент (non-amyloid component)
- NaCN – цианид натрия
- NCX – $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник
- NMDA – N-метил-D-аспартат (ионотропный глутаматный рецептор)
- Nrf2 – ядерный фактор, регулирующий экспрессию антиоксидантных генов
- Orai – каналы SOCE
- P2X – пуриnergические ионотропные рецепторы
- P2Y – пуриnergические metabотропные рецепторы
- PLC – фосфолипаза C
- SEL – селегилин
- SERCA – Ca^{2+} -АТФаза эндоплазматического ретикулума
- SNARE – растворимый N-этилмалеимид-чувствительный фактор прикрепления белка-рецептора
- SNCA – ген α -синуклеина
- SNCB – ген β -синуклеина
- SNCG – ген γ -синуклеина
- SNpc – компактная часть черной субстанции (substantia nigra pars compacta)
- SOCE – кальциевый вход, опосредованный запасами (Store-Operated Calcium Entry)
- SPF – specific pathogen-free (безпатогенный статус животных)
- TMRM – тетраметилродамин-метиловый эфир
- t-SNARE – таргетные SNARE-белки
- VAMP2 – везикул-ассоциированная мембранная белок-2 (синаптобrevин-2)
- VGCC – потенциал-зависимые кальциевые каналы (Voltage-Gated Calcium Channels)
- VMAT2 – везикулярный переносчик моноаминов 2
- v-SNARE – везикулярные SNARE-белки
- α -KO – нокаут гена α -синуклеина
- $\alpha\beta\gamma$ -KO – тройной нокаут генов α -, β - и γ -синуклеинов
- $\alpha\gamma$ -KO – двойной нокаут генов α - и γ -синуклеинов
- β -KO – нокаут гена β -синуклеина
- γ -KO – нокаут гена γ -синуклеина
- $\Delta\Psi_m$ – митохондриальный мембранный потенциал
- OH – гидроксильный радикал
- $^1\text{O}_2$ – синглетный кислород

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abramov A. Y. Interaction of misfolded proteins and mitochondria in neurodegenerative disorders / Abramov A. Y., Berezhnov A. V., Fedotova E. I., Zinchenko V. P., Dolgacheva L. P. // *Biochemical Society Transactions*. – 2017. – Vol. 45. – № 4. – P. 1025-1033. DOI 10.1042/BST20170024
2. Abramov A. Y. Three Distinct Mechanisms Generate Oxygen Free Radicals in Neurons and Contribute to Cell Death during Anoxia and Reoxygenation / Abramov A. Y., Scorziello A., Duchen M. R. // *The Journal of Neuroscience*. – 2007. – Vol. 27. – № 5. – P. 1129-1138. DOI 10.1523/JNEUROSCI.4468-06.2007
3. Abramov A. Y. β -Amyloid Peptides Induce Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Astrocytes and Death of Neurons through Activation of NADPH Oxidase / Abramov A. Y., Canevari L., Duchen M. R. // *The Journal of Neuroscience*. – 2004. – Vol. 24. – № 2. – P. 565-575. DOI 10.1523/JNEUROSCI.4042-03.2004
4. Ahmed Selim N. Mitochondrial membrane potential and compartmentalized signaling: Calcium, ROS, and beyond / Ahmed Selim N., Wojtovich A. P. // *Redox Biology*. – 2025. – Vol. 86. – Art. 103859. DOI 10.1016/j.redox.2025.103859
5. Akagawa M. Metal-Catalyzed Oxidation of Protein-Bound Dopamine / Akagawa M., Ishii Y., Ishii T., Shibata T., Yotsu-Yamashita M., Suyama K., Uchida K. // *Biochemistry*. – 2006. – Vol. 45. – № 50. – P. 15120-15128. DOI 10.1021/bi0614434
6. Allowitz K. Oxidative Stress-mediated Lipid Peroxidation-derived Lipid Aldehydes in the Pathophysiology of Neurodegenerative Diseases / Allowitz K., Taylor J., Harnes K., Yoo J., Baloch O., Ramana K. V. // *Current Neuropharmacology*. – 2025. – Vol. 23. – № 6. – P. 671-685. DOI 10.2174/011570159X342720241014164650
7. Althaher A. R. An overview of ATP synthase, inhibitors, and their toxicity / Althaher A. R., Alwahsh M. // *Heliyon*. – 2023. – Vol. 9. – № 11. – Art. e22459. DOI 10.1016/j.heliyon.2023.e22459
8. Alves F. In defence of ferroptosis / Alves F., Lane D., Nguyen T. P. M., Bush A. I., Ayton S. // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2025. – Vol. 10. – № 1. – Art. 2. DOI 10.1038/s41392-024-02088-5

9. Al-Wandi A. Absence of α -synuclein affects dopamine metabolism and synaptic markers in the striatum of aging mice / Al-Wandi A., Ninkina N., Millership S., Williamson S. J. M., Jones P. A., Buchman V. L. // *Neurobiology of Aging*. – 2010. – Vol. 31. – № 5. – P. 796-804. DOI 10.1016/j.neurobiolaging.2008.11.001
10. Andersen J. V. The Glutamate/ GABA -Glutamine Cycle: Insights, Updates, and Advances / Andersen J. V. // *Journal of Neurochemistry*. – 2025. – Vol. 169. – № 3. DOI 10.1111/jnc.70029
11. Angelova P. R. Alpha synuclein aggregation drives ferroptosis: an interplay of iron, calcium and lipid peroxidation / Angelova P. R., Choi M. L., Berezhnov A. V., Horrocks M. H., Hughes C. D., De S., Rodrigues M., Yapom R., Little D., Dolt K. S., Kunath T., Devine M. J., Gissen P., Shchepinov M. S., Sylantsev S., Pavlov E. V., Klenerman D., Abramov A. Y., Gandhi S. // *Cell Death & Differentiation*. – 2020. – Vol. 27. – № 10. – P. 2781-2796. DOI 10.1038/s41418-020-0542-z
12. Angelova P. R. Alpha-synuclein and beta-amyloid – different targets, same players: calcium, free radicals and mitochondria in the mechanism of neurodegeneration / Angelova P. R., Abramov A. Y. // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2017. – Vol. 483. – № 4. – P. 1110-1115. DOI 10.1016/j.bbrc.2016.07.103
13. Angelova P. R. Assessment of ROS Production in the Mitochondria of Live Cells / Angelova P. R., Dinkova-Kostova A. T., Abramov A. Y. – 2021. – P. 33-42. DOI 10.1007/978-1-0716-0896-8_2
14. Angelova P. R. Ca^{2+} is a key factor in α -synuclein-induced neurotoxicity / Angelova P. R., Ludtmann M. H. R., Horrocks M. H., Negoda A., Cremades N., Klenerman D., Dobson C. M., Wood N. W., Pavlov E. V., Gandhi S., Abramov A. Y. // *Journal of Cell Science*. – 2016. – Vol. 129. – № 9. – P. 1792-1801. DOI 10.1242/jcs.180737
15. Angelova P. R. Carbon monoxide neurotoxicity is triggered by oxidative stress induced by ROS production from three distinct cellular sources / Angelova P. R., Myers I., Abramov A. Y. // *Redox Biology*. – 2023. – Vol. 60. – Art. 102598. DOI 10.1016/j.redox.2022.102598

16. Angelova P. R. Functional role of mitochondrial reactive oxygen species in physiology / Angelova P. R., Abramov A. Y. // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2016. – Vol. 100. – P. 81-85. DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2016.06.005
17. Angelova P. R. Lipid peroxidation is essential for α -synuclein-induced cell death / Angelova P. R., Horrocks M. H., Klenerman D., Gandhi S., Abramov A. Y., Shchepinov M. S. // *Journal of Neurochemistry*. – 2015. – Vol. 133. – № 4. – P. 582-589. DOI 10.1111/jnc.13024
18. Angelova P. R. Mitochondria and lipid peroxidation in the mechanism of neurodegeneration: Finding ways for prevention / Angelova P. R., Esteras N., Abramov A. Y. // *Medicinal Research Reviews*. – 2021. – Vol. 41. – № 2. – P. 770-784. DOI 10.1002/med.21712
19. Angelova P. R. Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration / Angelova P. R., Abramov A. Y. // *FEBS Letters*. – 2018. – Vol. 592. – № 5. – P. 692-702. DOI 10.1002/1873-3468.12964
20. Angelova P. R. α -synuclein fibrils per se but not α -synuclein seeded aggregation causes mitochondrial dysfunction and cell death in human neurons / Angelova P. R., Esteras N., Evans J., Kostic M., Melki R., Prehn J. H. M., Gandhi S., Abramov A. Y. // *Redox Biology*. – 2025. – Vol. 86. – Art. 103817. DOI 10.1016/j.redox.2025.103817
21. Anwar S. Functional Alterations to the Nigrostriatal System in Mice Lacking All Three Members of the Synuclein Family / Anwar S., Peters O., Millership S., Ninkina N., Doig N., Connor-Robson N., Threlfell S., Kooner G., Deacon R. M., Bannerman D. M., Bolam J. P., Chandra S. S., Cragg S. J., Wade-Martins R., Buchman V. L. // *The Journal of Neuroscience*. – 2011. – Vol. 31. – № 20. – P. 7264-7274. DOI 10.1523/JNEUROSCI.6194-10.2011
22. Asantewaa G. Glutathione synthesis in the mouse liver supports lipid abundance through NRF2 repression / Asantewaa G., Tuttle E. T., Ward N. P., Kang Y. P., Kim Y., Kavanagh M. E., Girnius N., Chen Y., Rodriguez K., Hecht F., Zocchi M., Smorodintsev-Schiller L., Scales T. Q., Taylor K., Alimohammadi F., Duncan R. P.,

Sechrist Z. R., Agostini-Vulaj D., Schafer X. L. // *Nature Communications*. – 2024. – Vol. 15. – № 1. – Art. 6152. DOI 10.1038/s41467-024-50454-2

23. Averill-Bates D. Reactive oxygen species and cell signaling. Review / Averill-Bates D. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. – 2024. – Vol. 1871. – № 2. – Art. 119573. DOI 10.1016/j.bbamcr.2023.119573

24. Baev A. Y. Ecdysterone prevents negative effect of acute immobilization stress on energy metabolism of rat liver mitochondria / Baev A. Y., Charishnikova O. S., Khasanov F. A., Nebesnaya K. S., Makhmudov A. R., Rakhmedova M. T., Khushbaktova Z. A., Syrov V. N., Levitskaya Y. V. // *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. – 2022. – Vol. 219. – Art. 106066. DOI 10.1016/j.jsbmb.2022.106066

25. Baev A. Y. Mitochondrial Permeability Transition, Cell Death and Neurodegeneration / Baev A. Y., Vinokurov A. Y., Potapova E. V., Dunaev A. V., Angelova P. R., Abramov A. Y. // *Cells*. – 2024. – Vol. 13. – № 7. – Art. 648. DOI 10.3390/cells13070648

26. Bai Y. Revisiting astrocytic calcium signaling in the brain / Bai Y., Zhou Z., Han B., Xiang X., Huang W., Yao H. // *Fundamental Research*. – 2024. – Vol. 4. – № 6. – P. 1365-1374. DOI 10.1016/j.fmre.2023.11.021

27. Bao Y. Mitochondrial Reverse Electron Transport: Mechanisms, Pathophysiological Roles, and Therapeutic Potential / Bao Y., Hu C., Wang B., Liu X., Wu Q., Xu D., Shi Z., Sun C. // *Biology*. – 2025. – Vol. 14. – № 9. – Art. 1140. DOI 10.3390/biology14091140

28. Bartels T. α -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation / Bartels T., Choi J. G., Selkoe D. J. // *Nature*. – 2011. – Vol. 477. – № 7362. – P. 107-110. DOI 10.1038/nature10324

29. Battelli M. G. Xanthine oxidoreductase in atherosclerosis pathogenesis: Not only oxidative stress / Battelli M. G., Polito L., Bolognesi A. // *Atherosclerosis*. – 2014. – Vol. 237. – № 2. – P. 562-567. DOI 10.1016/j.atherosclerosis.2014.10.006

30. Bayır H. Peroxidase Mechanism of Lipid-dependent Cross-linking of Synuclein with Cytochrome c / Bayır H., Kapralov A. A., Jiang J., Huang Z., Tyurina Y.

Y., Tyurin V. A., Zhao Q., Belikova N. A., Vlasova I. I., Maeda A., Zhu J., Na H.-M., Mastroberardino P.-G., Sparvero L. J., Amoscato A. A., Chu C. T., Greenamyre J. T., Kagan V. E. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2009. – Vol. 284. – № 23. – P. 15951-15969. DOI 10.1074/jbc.M900418200

31. Beaulieu J.-M. The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors / Beaulieu J.-M., Gainetdinov R. R. // *Pharmacological Reviews*. – 2011. – Vol. 63. – № 1. – P. 182-217. DOI 10.1124/pr.110.002642

32. Belarbi K. NADPH oxidases in Parkinson's disease: a systematic review / Belarbi K., Cuvelier E., Destée A., Gressier B., Chartier-Harlin M.-C. // *Molecular Neurodegeneration*. – 2017. – Vol. 12. – № 1. – Art. 84. DOI 10.1186/s13024-017-0225-5

33. Ben-Shachar D. Iron, melanin and dopamine interaction: relevance to parkinson's disease / Ben-Shachar D., Youdim M. B. H. // *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. – 1993. – Vol. 17. – № 1. – P. 139-150. DOI 10.1016/0278-5846(93)90038-T

34. Bernardi P. Identity, structure, and function of the mitochondrial permeability transition pore: controversies, consensus, recent advances, and future directions / Bernardi P., Gerle C., Halestrap A. P., Jonas E. A., Karch J., Mnatsakanyan N., Pavlov E., Sheu S.-S., Soukas A. A. // *Cell Death & Differentiation*. – 2023. – Vol. 30. – № 8. – P. 1869-1885. DOI 10.1038/s41418-023-01187-0

35. Bin Ibrahim M. Z. Long-term plasticity in the hippocampus: maintaining within and 'tagging' between synapses / Bin Ibrahim M. Z., Benoy A., Sajikumar S. // *The FEBS Journal*. – 2022. – Vol. 289. – № 8. – P. 2176-2201. DOI 10.1111/febs.16065

36. Brand M. D. Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling / Brand M. D. // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2016. – Vol. 100. – P. 14-31. DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.001

37. Buchman V. L. Persyn, a Member of the Synuclein Family, Has a Distinct Pattern of Expression in the Developing Nervous System / Buchman V. L., Hunter H. J. A., Pinõn L. G. P., Thompson J., Privalova E. M., Ninkina N. N., Davies A. M. // *The*

Journal of Neuroscience. – 1998. – Vol. 18. – № 22. – P. 9335-9341. DOI 10.1523/JNEUROSCI.18-22-09335.1998

38. Burré J. Properties of native brain α -synuclein / Burré J., Vivona S., Diao J., Sharma M., Brunker A. T., Südhof T. C. // Nature. – 2013. – Vol. 498. – № 7453. – P. E4-E6. DOI 10.1038/nature12125

39. Burré J. α -Synuclein Promotes SNARE-Complex Assembly in Vivo and in Vitro / Burré J., Sharma M., Tsetsenis T., Buchman V., Etherton M. R., Südhof T. C. // Science. – 2010. – Vol. 329. – № 5999. – P. 1663-1667. DOI 10.1126/science.1195227

40. Cabin D. E. Synaptic Vesicle Depletion Correlates with Attenuated Synaptic Responses to Prolonged Repetitive Stimulation in Mice Lacking α -Synuclein / Cabin D. E., Shimazu K., Murphy D., Cole N. B., Gottschalk W., McIlwain K. L., Orrison B., Chen A., Ellis C. E., Paylor R., Lu B., Nussbaum R. L. // The Journal of Neuroscience. – 2002. – Vol. 22. – № 20. – P. 8797-8807. DOI 10.1523/JNEUROSCI.22-20-08797.2002

41. Cascella R. The release of toxic oligomers from α -synuclein fibrils induces dysfunction in neuronal cells / Cascella R., Chen S. W., Bigi A., Camino J. D., Xu C. K., Dobson C. M., Chiti F., Cremades N., Cecchi C. // Nature Communications. – 2021. – Vol. 12. – № 1. – Art. 1814. DOI 10.1038/s41467-021-21937-3

42. Chang K.-H. The Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease / Chang K.-H., Chen C.-M. // Antioxidants. – 2020. – Vol. 9. – № 7. – Art. 597. DOI 10.3390/antiox9070597

43. Cheung E. C. The role of ROS in tumour development and progression / Cheung E. C., Vousden K. H. // Nature Reviews Cancer. – 2022. – Vol. 22. – № 5. – P. 280-297. DOI 10.1038/s41568-021-00435-0

44. Chidambaram S. B. Superoxide dismutase and neurological disorders / Chidambaram S. B., Anand N., Varma S. R., Ramamurthy S., Vichitra C., Sharma A., Mahalakshmi A. M., Essa M. M. // IBRO Neuroscience Reports. – 2024. – Vol. 16. – P. 373-394. DOI 10.1016/j.ibneur.2023.11.007

45. Cho H.-U. Redefining differential roles of MAO-A in dopamine degradation and MAO-B in tonic GABA synthesis / Cho H.-U., Kim S., Sim J., Yang S., An H., Nam

M.-H., Jang D.-P., Lee C. J. // *Experimental & Molecular Medicine*. – 2021. – Vol. 53. – № 7. – P. 1148-1158. DOI 10.1038/s12276-021-00646-3

46. Chouchani E. T. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS / Chouchani E. T., Pell V. R., Gaude E., Aksentijević D., Sundier S. Y., Robb E. L., Logan A., Nadtochiy S. M., Ord E. N. J., Smith A. C., Eyassu F., Shirley R., Hu C.-H., Dare A. J., James A. M., Rogatti S., Hartley R. C., Eaton S., Costa A. S. H. // *Nature*. – 2014. – Vol. 515. – № 7527. – P. 431-435. DOI 10.1038/nature13909

47. Cobley J. N. 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress / Cobley J. N., Fiorello M. L., Bailey D. M. // *Redox Biology*. – 2018. – Vol.15. – P. 490-503. DOI 10.1016/j.redox.2018.01.008

48. Connor-Robson N. Combinational losses of synucleins reveal their differential requirements for compensating age-dependent alterations in motor behavior and dopamine metabolism / Connor-Robson N., Peters O. M., Millership S., Ninkina N., Buchman V. L. // *Neurobiology of Aging*. – 2016. – Vol. 46. – P. 107-112. DOI 10.1016/j.neurobiolaging.2016.06.020

49. Cortese-Krott M. M. The Reactive Species Interactome: Evolutionary Emergence, Biological Significance, and Opportunities for Redox Metabolomics and Personalized Medicine / Cortese-Krott M. M., Koning A., Kuhnle G. G. C., Nagy P., Bianco C. L., Pasch A., Wink D. A., Fukuto J. M., Jackson A. A., van Goor H., Olson K. R., Feelisch M. // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2017. – Vol. 27. – № 10. – P. 684-712. DOI 10.1089/ars.2017.7083

50. Courjaret R. SOCE as a regulator of neuronal activity / Courjaret R., Prakriya M., Machaca K. // *The Journal of Physiology*. – 2024. – Vol. 602. – № 8. – P. 1449-1462. DOI 10.1113/JP283826

51. Cremades N. Direct Observation of the Interconversion of Normal and Toxic Forms of α -Synuclein / Cremades N., Cohen S. I. A., Deas E., Abramov A. Y., Chen A. Y., Orte A., Sandal M., Clarke R. W., Dunne P., Aprile F. A., Bertonecini C. W., Wood N. W., Knowles T. P. J., Dobson C. M., Klenerman D. // *Cell*. – 2012. – Vol. 149. – № 5. – P. 1048-1059. DOI 10.1016/j.cell.2012.03.037

52. Cristóvão A. C. NADPH Oxidase 1 Mediates α -Synucleinopathy in Parkinson's Disease / Cristóvão A. C., Guhathakurta S., Bok E., Je G., Yoo S. D., Choi D.-H., Kim Y.-S. // *The Journal of Neuroscience*. – 2012. – Vol. 32. – № 42. – P. 14465-14477. DOI 10.1523/JNEUROSCI.2246-12.2012
53. de la Lastra J. M. P. Pathophysiology of reactive oxygen species (ROS) / de la Lastra J. M. P., Andrés C. M. C., Munguira E. B., Juan C. A., Pérez-Lebeña E. // *Archives of Toxicology*. – 2026. – Vol. 100. – № 2. – P. 475-513. DOI 10.1007/s00204-025-04276-w
54. de León-López C. A. M. AMPA Receptors in Synaptic Plasticity, Memory Function, and Brain Diseases / de León-López C. A. M., Carretero-Rey M., Khan Z. U. // *Cellular and Molecular Neurobiology*. – 2025. – Vol. 45. – № 1. – Art. 14. DOI 10.1007/s10571-024-01529-7
55. Deas E. Alpha-Synuclein Oligomers Interact with Metal Ions to Induce Oxidative Stress and Neuronal Death in Parkinson's Disease / Deas E., Cremades N., Angelova P. R., Ludtmann M. H. R., Yao Z., Chen S., Horrocks M. H., Banushi B., Little D., Devine M. J., Gissen P., Klenerman D., Dobson C. M., Wood N. W., Gandhi S., Abramov A. Y. // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2016. – Vol. 24. – № 7. – P. 376-391. DOI 10.1089/ars.2015.6343
56. Díaz-Alonso J. AMPA receptor trafficking and LTP: Carboxy-termini, amino-termini and TARPs / Díaz-Alonso J., Nicoll R. A. // *Neuropharmacology*. – 2021. – Vol. 197. – Art. 108710. DOI 10.1016/j.neuropharm.2021.108710
57. Dienel G. A. Brain Glucose Metabolism: Integration of Energetics with Function / Dienel G. A. // *Physiological Reviews*. – 2019. – Vol. 99. – № 1. – P. 949-1045. DOI 10.1152/physrev.00062.2017
58. Ding X. Ferroptosis in Parkinson's disease: Molecular mechanisms and therapeutic potential / Ding X., Gao L., Han Z., Eleuteri S., Shi W., Shen Y., Song Z., Su M., Yang Q., Qu Y., Simon D. K., Wang X., Wang B. // *Ageing Research Reviews*. – 2023. – Vol. 91. – Art. 102077. DOI 10.1016/j.arr.2023.102077

59. Domijan A.-M. Lipid peroxidation is essential for phospholipase C activity and IP3 related calcium signal / Domijan A.-M., Kovac S., Abramov A. Y. // *Journal of Cell Science*. – 2014. – Vol. 127. – № 1. – P. 21-26. DOI 10.1242/jcs.138370
60. Dringen R. Glutathione Metabolism of the Brain—The Role of Astrocytes / Dringen R., Arend C. // *Journal of Neurochemistry*. – 2025. – Vol. 169. – № 5. DOI 10.1111/jnc.70073
61. Esteras N. Nrf2 as a regulator of mitochondrial function: Energy metabolism and beyond / Esteras N., Abramov A. Y. // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2022. – Vol. 189. – P. 136-153. DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2022.07.013
62. Esteras N. Nrf2 regulates glucose uptake and metabolism in neurons and astrocytes / Esteras N., Blacker T. S., Zhrebtsov E. A., Stelmashuk O. A., Zhang Y., Wigley W. C., Duchon M. R., Dinkova-Kostova A. T., Abramov A. Y. // *Redox Biology*. – 2023. – Vol. 62. – Art. 102672. DOI 10.1016/j.redox.2023.102672
63. Fanning S. Lipidomic Analysis of α -Synuclein Neurotoxicity Identifies Stearoyl CoA Desaturase as a Target for Parkinson Treatment / Fanning S., Haque A., Imberdis T., Baru V., Barrasa M. I., Nuber S., Termine D., Ramalingam N., Ho G. P. H., Noble T., Sandoe J., Lou Y., Landgraf D., Freyzon Y., Newby G., Soldner F., Terry-Kantor E., Kim T.-E., Hofbauer H. F. // *Molecular Cell*. – 2019. – Vol. 73. – № 5. – P. 1001-1014.e8. DOI 10.1016/j.molcel.2018.11.028
64. Fedulina A. A. Alpha- and Gamma-Synucleins Regulate Energy Metabolism and Xanthine Oxidase Activity in Brain Cells / Fedulina A. A., Seryogina E. S., Krayushkina A. M., Chaprov K. D., Vinokurov A. Yu, Abramov A. Yu // *Biochemistry (Moscow)*. – 2025. – Vol. 90. – № 10. – P. 1388-1396. DOI 10.1134/S0006297925602278
65. Fedulina A. A. The role of synucleins in epileptogenesis / Fedulina A. A., Matveeva M. V., Rozov A. V. // *Genes & Cells*. – 2026a. – Vol. 21. – № 1. – P. 17-32. DOI 10.17816/gc687682
66. Fedulina A.A. Lack of synucleins induces an alteration of lipid peroxidation in the brai / Fedulina A.A., Seryogina E., Chaprov K.D., Baev A.Y., Vinokurov A.Y.,

Abramov A.Y. // Biochemical and biophysical research communications. – 2026b. – Vol. 833. – P. 154420. DOI 10.1016/j.bbrc.2026.154420

67. Fedulina A. A. Synucleins deficiency alter dopamine- and glutamate induced calcium signal in neurons and astrocytes / Fedulina A.A., Baev A.Y., Emelyanov A.V., Chaprov K.D., Vinokurov A.Y., Abramov A.Y. // Neurochemistry International. – 2026c. – Vol. 200. – P. 106269. DOI 10.1016/j.neuint.2026.106269

68. Fortin D. L. Lipid Rafts Mediate the Synaptic Localization of α -Synuclein / Fortin D. L., Troyer M. D., Nakamura K., Kubo S., Anthony M. D., Edwards R. H. // The Journal of Neuroscience. – 2004. – Vol. 24. – № 30. – P. 6715-6723. DOI 10.1523/JNEUROSCI.1594-04.2004

69. Fujiki Y. Molecular insights into peroxisome homeostasis and peroxisome biogenesis disorders / Fujiki Y., Okumoto K., Honsho M., Abe Y. // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. – 2022. – Vol. 1869. – № 11. – Art. 119330. DOI 10.1016/j.bbamcr.2022.119330

70. Furuhashi M. New insights into purine metabolism in metabolic diseases: role of xanthine oxidoreductase activity / Furuhashi M. // American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. – 2020. – Vol. 319. – № 5. – P. E827-E834. DOI 10.1152/ajpendo.00378.2020

71. Gandhi S. Dopamine Induced Neurodegeneration in a PINK1 Model of Parkinson's Disease / Gandhi S., Vaarmann A., Yao Z., Duchen M. R., Wood N. W., Abramov A. Y. // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7. – № 5. – Art. e37564. DOI 10.1371/journal.pone.0037564

72. Gandhi S. Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration / Gandhi S., Abramov A. Y. // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2012. – Vol. 2012. – P. 1-11. DOI 10.1155/2012/428010

73. Ghio S. Cardiolipin Promotes Pore-Forming Activity of Alpha-Synuclein Oligomers in Mitochondrial Membranes / Ghio S., Camilleri A., Caruana M., Ruf V. C., Schmidt F., Leonov A., Ryazanov S., Griesinger C., Cauchi R. J., Kamp F., Giese A., Vassallo N. // ACS Chemical Neuroscience. – 2019. – Vol. 10. – № 8. – P. 3815-3829. DOI 10.1021/acscchemneuro.9b00320

74. Goedert M. Synucleinopathies and Tauopathies / Goedert M., Spillantini M. G. // *Basic Neurochemistry: Principles of Molecular, Cellular, and Medical Neurobiology* / ed. by Brady S. T., Siegel G. J., Albers R. W., Price D. L. – 8th ed. – Waltham: Academic Press, 2012. – P. 829–843. DOI 10.1016/B978-0-12-374947-5.00047-X
75. Gores G. J. Swelling, reductive stress, and cell death during chemical hypoxia in hepatocytes / Gores G. J., Flarsheim C. E., Dawson T. L., Nieminen A. L., Herman B., Lemasters J. J. // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. – 1989. – Vol. 257. – № 2. – P. C347-C354. DOI 10.1152/ajpcell.1989.257.2.C347
76. Green J. L. Role of glutamate excitotoxicity and glutamate transporter EAAT2 in epilepsy: Opportunities for novel therapeutics development / Green J. L., dos Santos W. F., Fontana A. C. K. // *Biochemical Pharmacology*. – 2021. – Vol. 193. – Art. 114786. DOI 10.1016/j.bcp.2021.114786
77. Greten-Harrison B. $\alpha\beta\gamma$ -Synuclein triple knockout mice reveal age-dependent neuronal dysfunction / Greten-Harrison B., Polydoro M., Morimoto-Tomita M., Diao L., Williams A. M., Nie E. H., Makani S., Tian N., Castillo P. E., Buchman V. L., Chandra S. S. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2010. – Vol. 107. – № 45. – P. 19573-19578. DOI 10.1073/pnas.1005005107
78. Grootveld M. Action of Uric Acid, Allopurinol and Oxypurinol on the Myeloperoxidase-Derived Oxidant Hypochlorous Acid / Grootveld M., Halliwell B., Moorhouse C. P. // *Free Radical Research Communications*. – 1987. – Vol. 4. – № 2. – P. 69-76. DOI 10.3109/10715768709088090
79. Guan S. Mitochondrial Respiratory Chain Supercomplexes: From Structure to Function / Guan S., Zhao L., Peng R. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23. – № 22. – Art. 13880. DOI 10.3390/ijms232213880
80. Guardia-Laguarta C. α -Synuclein Is Localized to Mitochondria-Associated ER Membranes / Guardia-Laguarta C., Area-Gomez E., Rüb C., Liu Y., Magrané J., Becker D., Voos W., Schon E. A., Przedborski S. // *The Journal of Neuroscience*. – 2014. – Vol. 34. – № 1. – P. 249-259. DOI 10.1523/JNEUROSCI.2507-13.2014

81. Gureviciene I. Role of α -synuclein in synaptic glutamate release / Gureviciene I., Gurevicius K., Tanila H. // *Neurobiology of Disease*. – 2007. – Vol. 28. – № 1. – P. 83-89. DOI 10.1016/j.nbd.2007.06.016
82. Guschina I. A. Triple-Knockout, Synuclein-Free Mice Display Compromised Lipid Pattern / Guschina I. A., Ninkina N., Roman A., Pokrovskiy M. V., Buchman V. L. // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26. – № 11. – Art. 3078. DOI 10.3390/molecules26113078
83. Guschina I. Lipid Classes and Fatty Acid Patterns are Altered in the Brain of γ -Synuclein Null Mutant Mice / Guschina I., Millership S., O'Donnell V., Ninkina N., Harwood J., Buchman V. // *Lipids*. – 2011. – Vol. 46. – № 2. – P. 121-130. DOI 10.1007/s11745-010-3486-0
84. Hallaceli E. The Parkinson's disease protein alpha-synuclein is a modulator of processing bodies and mRNA stability / Hallaceli E., Kayatekin C., Nazeen S., Wang X. H., Sheinkopf Z., Sathyakumar S., Sarkar S., Jiang X., Dong X., Di Maio R., Wang W., Keeney M. T., Felsky D., Sandoe J., Vahdatshoar A., Udeshi N. D., Mani D. R., Carr S. A., Lindquist S. // *Cell*. – 2022. – Vol. 185. – № 12. – P. 2035-2056.e33. DOI 10.1016/j.cell.2022.05.008
85. Hansen K. B. Structure, Function, and Pharmacology of Glutamate Receptor Ion Channels / Hansen K. B., Wollmuth L. P., Bowie D., Furukawa H., Menniti F. S., Sobolevsky A. I., Swanson G. T., Swanger S. A., Greger I. H., Nakagawa T., McBain C. J., Jayaraman V., Low C.-M., Dell'Acqua M. L., Diamond J. S., Camp C. R., Perszyk R. E., Yuan H., Traynelis S. F. // *Pharmacological Reviews*. – 2021. – Vol. 73. – № 4. – P. 1469-1658. DOI 10.1124/pharmrev.120.000131
86. Harrison R. Physiological Roles of Xanthine Oxidoreductase / Harrison R. // *Drug Metabolism Reviews*. – 2004. – Vol. 36. – № 2. – P. 363-375. DOI 10.1081/DMR-120037569
87. Hashimoto M. β -Synuclein Inhibits α -Synuclein Aggregation / Hashimoto M., Rockenstein E., Mante M., Mallory M., Masliah E. // *Neuron*. – 2001. – Vol. 32. – № 2. – P. 213-223. DOI 10.1016/S0896-6273(01)00462-7

88. Heck J. More than a pore: How voltage-gated calcium channels act on different levels of neuronal communication regulation / Heck J., Palmeira Do Amaral A. C., Weißbach S., El Khallouqi A., Bikbaev A., Heine M. // *Channels*. – 2021. – Vol. 15. – № 1. – P. 322-338. DOI 10.1080/19336950.2021.1900024
89. Hernansanz-Agustín P. Functional segmentation of CoQ and cyt c pools by respiratory complex superassembly / Hernansanz-Agustín P., Enríquez J. A. // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2021. – Vol. 167. – P. 232-242. DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2021.03.010
90. Hille R. Xanthine Oxidase—A Personal History / Hille R. // *Molecules*. – 2023. – Vol. 28. – № 4. – Art. 1921. DOI 10.3390/molecules28041921
91. Hou L. Integrin CD11b mediates α -synuclein-induced activation of NADPH oxidase through a Rho-dependent pathway / Hou L., Bao X., Zang C., Yang H., Sun F., Che Y., Wu X., Li S., Zhang D., Wang Q. // *Redox Biology*. – 2018. – Vol. 14. – P. 600-608. DOI 10.1016/j.redox.2017.11.010
92. Howes O. D. The Nature of Dopamine Dysfunction in Schizophrenia and What This Means for Treatment / Howes O. D., Kambeitz J., Kim E., Stahl D., Slifstein M., Abi-Dargham A., Kapur S. // *Archives of General Psychiatry*. – 2012. – Vol. 69. – № 8. DOI 10.1001/archgenpsychiatry.2012.169
93. Hu S. Molecular chaperones and Parkinson's disease / Hu S., Tan J., Qin L., Lv L., Yan W., Zhang H., Tang B., Wang C. // *Neurobiology of Disease*. – 2021. – Vol. 160. – Art. 105527. DOI 10.1016/j.nbd.2021.105527
94. Huo Y. The MFN1 and MFN2 mitofusins promote clustering between mitochondria and peroxisomes / Huo Y., Sun W., Shi T., Gao S., Zhuang M. // *Communications Biology*. – 2022. – Vol. 5. – № 1. – Art. 423. DOI 10.1038/s42003-022-03377-x
95. Iwai A. The precursor protein of non-A β component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system / Iwai A., Masliah E., Yoshimoto M., Ge N., Flanagan L., de Silva H. A., Kittel A., Saitoh T. // *Neuron*. – 1995. – Vol. 14. – № 2. – P. 467-475. DOI 10.1016/0896-6273(95)90302-X

96. Jaisa-aad M. Monoamine Oxidase-B (MAO-B) Identifies Neurotoxic Reactive Astrocytes in Alzheimer's Disease and Related Dementias / Jaisa-aad M., Agüero C., Rabaneda-Lombarte N., Bianco C. R., Melloni A. N., Hyman B. T., Gomez-Isla T., Brugarolas P., Serrano-Pozo A. // *Alzheimer's & Dementia*, 21(S1).. – 2025. DOI 10.1002/alz70855_102019
97. Janowska M. K. Unveiling transient protein-protein interactions that modulate inhibition of alpha-synuclein aggregation by beta-synuclein, a pre-synaptic protein that co-localizes with alpha-synuclein / Janowska M. K., Wu K.-P., Baum J. // *Scientific Reports*. – 2015. – Vol. 5. – № 1. – Art. 15164. DOI 10.1038/srep15164
98. Jia C. α -Synuclein up-regulates monoamine oxidase A expression and activity via trans-acting transcription factor 1 / Jia C., Cheng C., Li T., Chen X., Yang Y., Liu X., Li S., Le W. // *Frontiers in Aging Neuroscience*. – 2021. – Vol. 13. – Art. 653379. DOI 10.3389/fnagi.2021.653379
99. Jiang T. P2X7 receptor is critical in α -synuclein-mediated microglial NADPH oxidase activation / Jiang T., Hoekstra J., Heng X., Kang W., Ding J., Liu J., Chen S., Zhang J. // *Neurobiology of Aging*. – 2015. – Vol. 36. – № 7. – P. 2304-2318. DOI 10.1016/j.neurobiolaging.2015.03.015
100. Kang S. S. α -Synuclein stimulation of monoamine oxidase-B and legumain protease mediates the pathology of Parkinson's disease / Kang S. S., Ahn E. H., Zhang Z., Liu X., Manfredsson F. P., Sandoval I. M., Dhakal S., Iuvone P. M., Cao X., Ye K. // *The EMBO Journal*. – 2018. – Vol. 37. – № 12. – Art. EMBJ201798878. DOI 10.15252/embj.201798878
101. Khedmatgozar C. R. The role of α -synuclein prion strains in Parkinson's disease and multiple system atrophy / Khedmatgozar C. R., Holec S. A. M., Woerman A. L. // *PLOS Pathogens*. – 2024. – Vol. 20. – № 1. – Art. e1011920. DOI 10.1371/journal.ppat.1011920
102. Kim T.-E. Excess membrane binding of monomeric alpha-, beta- and gamma-synuclein is invariably associated with inclusion formation and toxicity / Kim T.-E., Newman A. J., Imberdis T., Brontesi L., Tripathi A., Ramalingam N., Fanning S.,

Selkoe D., Dettmer U. // Human Molecular Genetics. – 2021. – Vol. 30. – № 23. – P. 2332-2346. DOI 10.1093/hmg/ddab188

103. Kim Y. Brain energy homeostasis: the evolution of the astrocyte-neuron lactate shuttle hypothesis / Kim Y., Dube S. E., Park C. B. // The Korean Journal of Physiology & Pharmacology. – 2025. – Vol. 29. – № 1. – P. 1-8. DOI 10.4196/kjpp.24.388

104. Klemmensen M. M. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders / Klemmensen M. M., Borrowman S. H., Pearce C., Pyles B., Chandra B. // Neurotherapeutics. – 2024. – Vol. 21. – № 1. – Art. e00292. DOI 10.1016/j.neurot.2023.10.002

105. Kokhan V. S. Differential involvement of the gamma-synuclein in cognitive abilities on the model of knockout mice / Kokhan V. S., Van'kin G. I., Bachurin S. O., Shamakina I. Y. // BMC Neuroscience. – 2013. – Vol. 14. – № 1. – Art. 53. DOI 10.1186/1471-2202-14-53

106. Krayushkina A. M. Synaptic Changes in Mice Lacking Alpha- and Gamma-Synucleins / Krayushkina A. M., Morozova O., Khizeva A., Ivanova T. A., Ninkina N., Chaprov K. // Biomedicines. – 2025. – Vol. 13. – № 12. – Art. 2866. DOI 10.3390/biomedicines13122866

107. Kumar A. Formation and Implications of Alpha-Synuclein Radical in Maneb- and Paraquat-Induced Models of Parkinson's Disease / Kumar A., Leinisch F., Kadiiska M. B., Corbett J., Mason R. P. // Molecular Neurobiology. – 2016. – Vol. 53. – № 5. – P. 2983-2994. DOI 10.1007/s12035-015-9179-1

108. Lavedan C. The Synuclein Family / Lavedan C. // Genome Research. – 1998. – Vol. 8. – № 9. – P. 871-880. DOI 10.1101/gr.8.9.871

109. Lehrer S. α -synuclein enfolds tyrosine hydroxylase and dopamine β -hydroxylase, potentially reducing dopamine and norepinephrine synthesis / Lehrer S., Rheinstein P. H. // Journal of Proteins and Proteomics. – 2022. – Vol. 13. – № 2. – P. 109-115. DOI 10.1007/s42485-022-00088-z

110. Li N. DPI induces mitochondrial superoxide-mediated apoptosis / Li N., Ragheb K., Lawler G., Sturgis J., Rajwa B., Melendez J. A., Robinson J. P. // Free Radical

Biology and Medicine. – 2003. – Vol. 34. – № 4. – P. 465-477. DOI 10.1016/S0891-5849(02)01325-4

111. Liu J. Gamma synuclein promotes cancer metastasis through the MKK3/6-p38MAPK cascade / Liu J., Shao T., Zhang J., Liu Q., Hua H., Zhang H., Wang J., Luo T., Shi Y. E., Jiang Y. // International Journal of Biological Sciences. – 2022. – Vol. 18. – № 8. – P. 3167-3177. DOI 10.7150/ijbs.69155

112. Liu T. Imbalanced GSH/ROS and sequential cell death / Liu T., Sun L., Zhang Y., Wang Y., Zheng J. // Journal of Biochemical and Molecular Toxicology. – 2022. – Vol. 36. – № 1. DOI 10.1002/jbt.22942

113. López-Doménech G. Mitochondrial regulation of local supply of energy in neurons / López-Doménech G., Kittler J. T. // Current Opinion in Neurobiology. – 2023. – Vol. 81. – Art. 102747. DOI 10.1016/j.conb.2023.102747

114. Lopez-Fabuel I. Complex I assembly into supercomplexes determines differential mitochondrial ROS production in neurons and astrocytes / Lopez-Fabuel I., Le Douce J., Logan A., James A. M., Bonvento G., Murphy M. P., Almeida A., Bolaños J. P. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2016. – Vol. 113. – № 46. – P. 13063-13068. DOI 10.1073/pnas.1613701113

115. Lotharius J. Pathogenesis of parkinson's disease: dopamine, vesicles and α -synuclein / Lotharius J., Brundin P. // Nature Reviews Neuroscience. – 2002. – Vol. 3. – № 12. – P. 932-942. DOI 10.1038/nrn983

116. Ludtmann M. H. R. Monomeric Alpha-Synuclein Exerts a Physiological Role on Brain ATP Synthase / Ludtmann M. H. R., Angelova P. R., Ninkina N. N., Gandhi S., Buchman V. L., Abramov A. Y. // The Journal of Neuroscience. – 2016. – Vol. 36. – № 41. – P. 10510-10521. DOI 10.1523/JNEUROSCI.1659-16.2016

117. Ludtmann M. H. R. α -synuclein oligomers interact with ATP synthase and open the permeability transition pore in Parkinson's disease / Ludtmann M. H. R., Angelova P. R., Horrocks M. H., Choi M. L., Rodrigues M., Baev A. Y., Berezhnov A. V., Yao Z., Little D., Banushi B., Al-Menhali A. S., Ranasinghe R. T., Whiten D. R., Yapom R., Dolt K. S., Devine M. J., Gissen P., Kunath T., Jaganjac M. // Nature

Communications. – 2018. – Vol. 9. – № 1. – Art. 2293. DOI 10.1038/s41467-018-04422-2

118. Ma Z. Alpha-synuclein is involved in manganese-induced spatial memory and synaptic plasticity impairments via TrkB/Akt/Fyn-mediated phosphorylation of NMDA receptors / Ma Z., Liu K., Li X.-R., Wang C., Liu C., Yan D.-Y., Deng Y., Liu W., Xu B. // *Cell Death & Disease*. – 2020. – Vol. 11. – № 10. – Art. 834. DOI 10.1038/s41419-020-03051-2

119. Maroteaux L. Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal / Maroteaux L., Campanelli J., Scheller R. // *The Journal of Neuroscience*. – 1988. – Vol. 8. – № 8. – P. 2804-2815. DOI 10.1523/JNEUROSCI.08-08-02804.1988

120. Martino E. Di. Distinctive characteristics of dopamine neuron release mechanisms: Insights into Parkinson's Disease / Martino E. Di, Maduro S., Luchicchi A., Wilhelmus M. M. M., Orefice N. S. // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2026. – Vol. 200. – Art. 119534. DOI 10.1016/j.biopha.2026.119534

121. Masato A. Impaired dopamine metabolism in Parkinson's disease pathogenesis / Masato A., Plotegher N., Boassa D., Bubacco L. // *Molecular Neurodegeneration*. – 2019. – Vol. 14. – Art. 35. DOI 10.1186/s13024-019-0332-6

122. Matuz-Mares D. Mitochondrial Calcium: Effects of Its Imbalance in Disease / Matuz-Mares D., González-Andrade M., Araiza-Villanueva M. G., Vilchis-Landeros M. M., Vázquez-Meza H. // *Antioxidants*. – 2022. – Vol. 11. – № 5. – Art. 801. DOI 10.3390/antiox11050801

123. Meade R. M. Alpha-synuclein structure and Parkinson's disease – lessons and emerging principles / Meade R. M., Fairlie D. P., Mason J. M. // *Molecular Neurodegeneration*. – 2019. – Vol. 14. – Art. 29. DOI 10.1186/s13024-019-0329-1

124. Mehra S. Structural and Functional Insights into α -Synuclein Fibril Polymorphism / Mehra S., Gadhe L., Bera R., Sawner A. S., Maji S. K. // *Biomolecules*. – 2021. – Vol. 11. – № 10. – Art. 1419. DOI 10.3390/biom11101419

125. Middleton E. R. Effects of Curvature and Composition on α -Synuclein Binding to Lipid Vesicles / Middleton E. R., Rhoades E. // *Biophysical Journal*. – 2010. – Vol. 99. – № 7. – P. 2279-2288. DOI 10.1016/j.bpj.2010.07.056
126. Millership S. γ -synuclein is a novel player in the control of body lipid metabolism / Millership S., Ninkina N., Rochford J. J., Buchman V. L. // *Adipocyte*. – 2013. – Vol. 2. – № 4. – P. 276-280. DOI 10.4161/adip.25162
127. Mony L. Mechanisms of NMDA receptor regulation / Mony L., Paoletti P. // *Current Opinion in Neurobiology*. – 2023. – Vol. 83. – Art. 102815. DOI 10.1016/j.conb.2023.102815
128. Moorhouse P. C. Allopurinol and oxypurinol are hydroxyl radical scavengers / Moorhouse P. C., Grootveld M., Halliwell B., Quinlan J. G., Gutteridge J. M. C. // *FEBS Letters*. – 1987. – Vol. 213. – № 1. – P. 23-28. DOI 10.1016/0014-5793(87)81458-8
129. Mushtaq U. Amyloid beta-activated alpha-1-syntrophin has ramifications on Rac1 activation, ROS production and neuronal cell death / Mushtaq U., Ganai R. A., Ahmad M., Khanday F. A. // *European Journal of Neuroscience*. – 2024. – Vol. 60. – № 11. – P. 6935-6952. DOI 10.1111/ejn.16609
130. Nam M.-H. Revisiting the Role of Astrocytic MAOB in Parkinson's Disease / Nam M.-H., Sa M., Ju Y. H., Park M. G., Lee C. J. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23. – № 8. – Art. 4453. DOI 10.3390/ijms23084453
131. Ninkina N. N. Synuclein Deficiency Decreases the Efficiency of Dopamine Uptake by Synaptic Vesicles / Ninkina N. N., Tarasova T. V., Chaprov K. D., Goloborshcheva V. V., Bachurin S. O., Buchman V. L. // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. – 2019. – Vol. 486. – № 1. – P. 168-170. DOI 10.1134/S1607672919030025
132. Ninkina N. β -synuclein potentiates synaptic vesicle dopamine uptake and rescues dopaminergic neurons from MPTP-induced death in the absence of other synucleins / Ninkina N., Millership S. J., Peters O. M., Connor-Robson N., Chaprov K., Kopylov A. T., Montoya A., Kramer H., Withers D. J., Buchman V. L. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2021. – Vol. 297. – № 6. – Art. 101375. DOI 10.1016/j.jbc.2021.101375

133. Ninkina N. γ -Synucleinopathy: neurodegeneration associated with overexpression of the mouse protein / Ninkina N., Peters O., Millership S., Salem H., van der Putten H., Buchman V. L. // *Human Molecular Genetics*. – 2009. – Vol. 18. – № 10. – P. 1779-1794. DOI 10.1093/hmg/ddp090

134. Niveta J. P. S. Monoamine oxidase mediated oxidative stress: a potential molecular and biochemical crux in the pathogenesis of obesity / Niveta J. P. S., John C. M., Arockiasamy S. // *Molecular Biology Reports*. – 2024. – Vol. 51. – № 1. – Art. 29. DOI 10.1007/s11033-023-08938-9

135. Novikova I. N. Adrenaline induces calcium signal in astrocytes and vasoconstriction via activation of monoamine oxidase / Novikova I. N., Manole A., Zharebtsov E. A., Stavtsev D. D., Vukolova M. N., Dunaev A. V., Angelova P. R., Abramov A. Y. // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2020. – Vol. 159. – P. 15-22. DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2020.07.011

136. Oeckl P. Alpha-, Beta-, and Gamma-synuclein Quantification in Cerebrospinal Fluid by Multiple Reaction Monitoring Reveals Increased Concentrations in Alzheimer's and Creutzfeldt-Jakob Disease but No Alteration in Synucleinopathies / Oeckl P., Metzger F., Nagl M., von Arnim C. A. F., Halbgebauer S., Steinacker P., Ludolph A. C., Otto M. // *Molecular & Cellular Proteomics*. – 2016. – Vol. 15. – № 10. – P. 3126-3138. DOI 10.1074/mcp.M116.059915

137. Ohtake H. β -Synuclein gene alterations in dementia with Lewy bodies / Ohtake H., Limprasert P., Fan Y., Onodera O., Kakita A., Takahashi H., Bonner L. T., Tsuang D. W., Murray I. V. J., Lee V. M., Trojanowski J. Q., Ishikawa A., Idezuka J., Murata M., Toda T., Bird T. D., Leverenz J. B., Tsuji S., La Spada A. R. // *Neurology*. – 2004. – Vol. 63. – № 5. – P. 805-811. DOI 10.1212/01.WNL.0000139870.14385.3C

138. Pecchillo Cimmino T. NOX Dependent ROS Generation and Cell Metabolism / Pecchillo Cimmino T., Ammendola R., Cattaneo F., Esposito G. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24. – № 3. – Art. 2086. DOI 10.3390/ijms24032086

139. Pellerin L. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization / Pellerin L., Magistretti P.

J. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1994. – Vol. 91. – № 22. – P. 10625-10629. DOI 10.1073/pnas.91.22.10625

140. Perez R. G. A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis / Perez R. G., Waymire J. C., Lin E., Liu J. J., Guo F., Zigmond M. J. // The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience. – 2002. – Vol. 22. – № 8. – P. 3090–3099. DOI 10.1523/JNEUROSCI.22-08-03090.2002

141. Peters O. M. Gamma-synuclein pathology in amyotrophic lateral sclerosis / Peters O. M., Shelkovernikova T., Highley J. R., Cooper-Knock J., Hortobágyi T., Troakes C., Ninkina N., Buchman V. L. // Annals of Clinical and Translational Neurology. – 2015. – Vol. 2. – № 1. – P. 29-37. DOI 10.1002/acn3.143

142. Peters O. M. Selective pattern of motor system damage in gamma-synuclein transgenic mice mirrors the respective pathology in amyotrophic lateral sclerosis / Peters O. M., Millership S., Shelkovernikova T. A., Soto I., Keeling L., Hann A., Marsh-Armstrong N., Buchman V. L., Ninkina N. // Neurobiology of Disease. – 2012. – Vol. 48. – № 1. – P. 124-131. DOI 10.1016/j.nbd.2012.06.016

143. Quansah D. NK. Amyloid Beta Protein (A β 1-42) induced Endolysosome Iron Dyshomeostasis caused increases in Reactive Oxygen Species, Mitochondrial Depolarization, and Neurotoxicity / Quansah D. NK., Halcrow P. W., Kumar N., Liang B., Geiger J. D. // The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 2023. – Vol. 385. – Art. 130. DOI 10.1124/jpet.122.212100

144. Ramalingam N. Temperature is a key determinant of alpha- and beta-synuclein membrane interactions in neurons / Ramalingam N., Dettmer U. // Journal of Biological Chemistry. – 2021. – Vol. 296. – Art. 100271. DOI 10.1016/j.jbc.2021.100271

145. Rasool A. Oxidative Stress and Dopaminergic Metabolism: A Major PD Pathogenic Mechanism and Basis of Potential Antioxidant Therapies / Rasool A., Manzoor R., Afzal R., Ul-Haq A., Imran H., Kaleem I., Akhtar T., Farrukh A., Hameed S., Bashir S. // CNS & Neurological Disorders - Drug Targets. – 2024. – Vol. 23. – № 7. – P. 852-864. DOI 10.2174/1871527322666230609141519

146. Ribeiro F. M. Metabotropic glutamate receptors and neurodegenerative diseases / Ribeiro F. M., Vieira L. B., Pires R. G. W., Olmo R. P., Ferguson S. S. G. //

Pharmacological Research. – 2017. – Vol. 115. – P. 179-191. DOI 10.1016/j.phrs.2016.11.013

147. Robertson D. C. Developmental loss and resistance to MPTP toxicity of dopaminergic neurones in substantia nigra pars compacta of γ -synuclein, α -synuclein and double α/γ -synuclein null mutant mice / Robertson D. C., Schmidt O., Ninkina N., Jones P. A., Sharkey J., Buchman V. L. // Journal of Neurochemistry. – 2004. – Vol. 89. – № 5. – P. 1126-1136. DOI 10.1111/j.1471-4159.2004.02378.x

148. Rodriguez-Perez A. I. Angiotensin Type 1 Receptor Antagonists Protect Against Alpha-Synuclein-Induced Neuroinflammation and Dopaminergic Neuron Death / Rodriguez-Perez A. I., Sucunza D., Pedrosa M. A., Garrido-Gil P., Kulisevsky J., Lanciego J. L., Labandeira-Garcia J. L. // Neurotherapeutics. – 2018. – Vol. 15. – № 4. – P. 1063-1081. DOI 10.1007/s13311-018-0646-z

149. Rose J. Mitochondrial Metabolism in Astrocytes Regulates Brain Bioenergetics, Neurotransmission and Redox Balance / Rose J., Brian C., Pappa A., Panayiotidis M. I., Franco R. // Frontiers in Neuroscience. – 2020. – Vol. 14. DOI 10.3389/fnins.2020.536682

150. Rosenthal L. S. Vesicular monoamine transport inhibitors: current uses and future directions / Rosenthal L. S., Farag M., Aziz N. A., Bang J. // The Lancet. – 2025. – Vol. 406. – № 10503. – P. 650-664. DOI 10.1016/S0140-6736(25)01072-4

151. Saint-Jour E. Nuclear Calcium Signaling in D1 Receptor-Expressing Neurons of the Nucleus Accumbens Regulates Molecular, Cellular, and Behavioral Adaptations to Cocaine / Saint-Jour E., Allichon M.-C., Andrianarivelo A., Montalban E., Martin C., Huet L., Heck N., Hagenston A. M., Ravenhorst A., Marias M., Gervasi N., Arrivet F., Vilette A., Pinchaud K., Betuing S., Lissek T., Caboche J., Bading H., Vanhoutte P. // Biological Psychiatry. – 2025. – Vol. 98. – № 1. – P. 34-45. DOI 10.1016/j.biopsych.2025.01.013

152. Salem A. M. S. Serum α -Synuclein in Pediatric Refractory Epilepsy: Correlation with Diagnosis and Clinical Severity / Salem A. M. S., Morgan D. S., Elgendy M. O., Abdelrahim M. E. A., Mohamed Mostafa N. M., Saleh A., Abdel-Aziz M. M.,

Ramadan A. K. // *Medicina*. – 2025. – Vol. 61. – № 5. – Art. 818. DOI 10.3390/medicina61050818

153. Salzinger A. Syntaphilin loss enhances mitochondrial axonal transport and neuromuscular junction formation in a human stem cell derived neuromuscular assembloid model / Salzinger A., Özkan E., Ramesh V., Nanda J., Burr K., Story D., Pham N. T., Chandran S., Selvaraj B. T. // *Molecular Medicine*. – 2025. – Vol. 31. – № 1. – Art. 328. DOI 10.1186/s10020-025-01319-x

154. Senior S. L. Increased striatal dopamine release and hyperdopaminergic-like behaviour in mice lacking both alpha-synuclein and gamma-synuclein / Senior S. L., Ninkina N., Deacon R., Bannerman D., Buchman V. L., Cragg S. J., Wade-Martins R. // *European Journal of Neuroscience*. – 2008. – Vol. 27. – № 4. – P. 947-957. DOI 10.1111/j.1460-9568.2008.06055.x

155. Sennett C. α -Synuclein Deletion Impairs Platelet Function: A Role for SNARE Complex Assembly / Sennett C., Jia W., Khalil J. S., Hindle M. S., Coupland C., Calaminus S. D. J., Langer J. D., Frost S., Naseem K. M., Rivero F., Ninkina N., Buchman V., Aburima A. // *Cells*. – 2024. – Vol. 13. – № 24. – Art. 2089. DOI 10.3390/cells13242089

156. Sies H. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents / Sies H., Jones D. P. // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2020. – Vol. 21. – № 7. – P. 363-383. DOI 10.1038/s41580-020-0230-3

157. Sivakumar P. Review on the interactions between dopamine metabolites and α -Synuclein in causing Parkinson's disease / Sivakumar P., Nagashanmugam K. B., Priyatharshni S., Lavanya R., Prabhu N., Ponnusamy S. // *Neurochemistry International*. – 2023. – Vol. 162. – Art. 105461. DOI 10.1016/j.neuint.2022.105461

158. Sokolovski S. G. Singlet oxygen stimulates mitochondrial bioenergetics in brain cells / Sokolovski S. G., Rafailov E. U., Abramov A. Y., Angelova P. R. // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2021. – Vol. 163. – P. 306-313. DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2020.12.022

159. Spathopoulou A. Targeting α -Synuclein in Parkinson's Disease by Induced Pluripotent Stem Cell Models / Spathopoulou A., Edenhofer F., Fellner L. // *Frontiers in Neurology*. – 2022. – Vol. 12. DOI 10.3389/fneur.2021.786835
160. Spencer J. P. E. Evaluation of the Pro-Oxidant and Antioxidant Actions of L-DOPA and Dopamine in Vitro: Implications for Parkinson's Disease / Spencer J. P. E., Jenner A., Butler J., Aruoma O. I., Dexter D. T., Jenner P., Halliwell B. // *Free Radical Research*. – 1996. – Vol. 24. – № 2. – P. 95-105. DOI 10.3109/10715769609088005
161. Starr L. A. Attenuation of Dopaminergic Neurodegeneration in a *C. elegans* Parkinson's Model through Regulation of Xanthine Dehydrogenase (XDH-1) Expression by the RNA Editase, ADR-2 / Starr L. A., McKay L. E., Peter K. N., Seyfarth L. M., Berkowitz L. A., Caldwell K. A., Caldwell G. A. // *Journal of Developmental Biology*. – 2023. – Vol. 11. – № 2. – Art. 20. DOI 10.3390/jdb11020020
162. Statoulla E. SNCA triplication disrupts proteostasis and extracellular architecture prior to neurodegeneration in human midbrain organoids / Statoulla E., Zafeiri M., Chalkiadaki K., Voudouri G., Gkika K. S., Papazoglou C., Durcan T. M., Khoutorsky A., Jafarnejad S. M., Maguire S., Dityatev A., Gkogkas C. G. // *Npj Parkinson's Disease*. – 2026. – Vol. 12. – № 1. – Art. 81. DOI 10.1038/s41531-026-01292-0
163. Su Z. Mitochondrial targeting of coenzyme Q10 in inflammatory bowel disease: mechanisms, challenges, and prospects for clinical application / Su Z., He X., Mao F., Chu Y. // *International Immunopharmacology*. – 2025. – Vol. 166. – Art. 115529. DOI 10.1016/j.intimp.2025.115529
164. Sukhanova I. S. Distinct Role of γ -Synuclein in the Regulation of Motor Performance and Behavioral Responses in Mice / Sukhanova I. S., Chaprov K. D., Morozova O. A., Ovchinnikov R. K., Kukharskaya O. A., Zalevskaya V. N., Yusupova N. M., Lugovskaya A. A., Ninkina N. N., Kukharsky M. S. // *Biomedicines*. – 2026. – Vol. 14. – № 1. – Art. 92. DOI 10.3390/biomedicines14010092
165. Sulzer D. The physiological role of α -synuclein and its relationship to Parkinson's Disease / Sulzer D., Edwards R. H. // *Journal of Neurochemistry*. – 2019. – Vol. 150. – № 5. – P. 475-486. DOI 10.1111/jnc.14810

166. Sun D. Lipid metabolism in ferroptosis: mechanistic insights and therapeutic potential / Sun D., Wang L., Wu Y., Yu Y., Yao Y., Yang H., Hao C. // *Frontiers in Immunology* – 2025. – Vol. 16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1545339>
167. Surmeier D. J. Modulation of calcium currents by a D1 dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons / Surmeier D. J., Bargas J., Hemmings H. C., Nairn A. C., Greengard P. // *Neuron*. – 1995. – Vol. 14. – № 2. – P. 385-397. DOI 10.1016/0896-6273(95)90294-5
168. Surmeier D. J. Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease / Surmeier D. J., Obeso J. A., Halliday G. M. // *Nature Reviews Neuroscience*. – 2017. – Vol. 18. – № 2. – P. 101-113. DOI 10.1038/nrn.2016.178
169. Uéda K. Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease / Uéda K., Fukushima H., Masliah E., Xia Y., Iwai A., Yoshimoto M., Otero D. A., Kondo J., Ihara Y., Saitoh T. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1993. – Vol. 90. – № 23. – P. 11282-11286. DOI 10.1073/pnas.90.23.11282
170. Ulmer T. S. Structure and Dynamics of Micelle-bound Human α -Synuclein / Ulmer T. S., Bax A., Cole N. B., Nussbaum R. L. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – Vol. 280. – № 10. – P. 9595-9603. DOI 10.1074/jbc.M411805200
171. Vaarmann A. Dopamine Induces Ca^{2+} Signaling in Astrocytes through Reactive Oxygen Species Generated by Monoamine Oxidase / Vaarmann A., Gandhi S., Abramov A. Y. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2010. – Vol. 285. – № 32. – P. 25018-25023. DOI 10.1074/jbc.M110.111450
172. Vaarmann A. Dopamine protects neurons against glutamate-induced excitotoxicity / Vaarmann A., Kovac S., Holmström K. M., Gandhi S., Abramov A. Y. // *Cell Death & Disease*. – 2013. – Vol. 4. – № 1. – P. e455-e455. DOI 10.1038/cddis.2012.194
173. Vekrellis K. α -Synuclein in Parkinson's Disease: 12 Years Later / Vekrellis K., Emmanouilidou E., Xilouri M., Stefanis L. // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. – 2024. – Vol. 14. – № 11. – Art. a041645. DOI 10.1101/cshperspect.a041645

174. Vercellino I. The assembly, regulation and function of the mitochondrial respiratory chain / Vercellino I., Sazanov L. A. // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2022. – Vol. 23. – № 2. – P. 141-161. DOI 10.1038/s41580-021-00415-0

175. Verma M. Excitotoxicity, calcium and mitochondria: a triad in synaptic neurodegeneration / Verma M., Lizama B., Chu C. T. // *Translational Neurodegeneration*. – 2022. – Vol. 11. – № 1. – Art. 3. DOI 10.1186/s40035-021-00278-7

176. Vicente-Gutierrez C. Astrocytic mitochondrial ROS modulate brain metabolism and mouse behaviour / Vicente-Gutierrez C., Bonora N., Bobo-Jimenez V., Jimenez-Blasco D., Lopez-Fabuel I., Fernandez E., Josephine C., Bonvento G., Enriquez J. A., Almeida A., Bolaños J. P. // *Nature Metabolism*. – 2019. – Vol. 1. – № 2. – P. 201-211. DOI 10.1038/s42255-018-0031-6

177. Villar-Piqué A. Structure, function and toxicity of alpha-synuclein: the Bermuda triangle in synucleinopathies / Villar-Piqué A., da Fonseca T., Outeiro T. F. // *Journal of Neurochemistry*. – 2016. – Vol. 139. – № S1. – P. 240-255. DOI 10.1111/jnc.13249

178. Vinokurov A. Y. Brain region specificity in reactive oxygen species production and maintenance of redox balance / Vinokurov A. Y., Stelmashuk O. A., Ukolova P. A., Zherebtsov E. A., Abramov A. Y. // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2021. – Vol. 174. – P. 195-201. DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2021.08.014

179. Vorobyov V. Disruption of Electroencephalogram Coherence between Cortex/Striatum and Midbrain Dopaminergic Regions in the Knock-Out Mice with Combined Loss of Alpha, Beta, and Gamma Synucleins / Vorobyov V., Deev A., Chaprov K., Ninkina N. // *Biomedicines*. – 2024. – Vol. 12. – № 4. – Art. 881. DOI 10.3390/biomedicines12040881

180. Vorobyov V. Early Effects of Alpha-Synuclein Depletion by Pan-Neuronal Inactivation of Encoding Gene on Electroencephalogram Coherence between Different Brain Regions in Mice / Vorobyov V., Deev A., Morozova O., Oganessian Z., Krayushkina A., Ivanova T., Chaprov K. // *Biomedicines*. – 2023. – Vol. 11. – № 12. – Art. 3282. DOI 10.3390/biomedicines11123282

181. Vorobyov V. Loss of the Synuclein Family Members Differentially Affects Baseline- and Apomorphine-Associated EEG Determinants in Single-, Double- and Triple-Knockout Mice / Vorobyov V., Deev A., Sukhanova I., Morozova O., Oganessian Z., Chaprov K., Buchman V. L. // *Biomedicines*. – 2022. – Vol. 10. – № 12. – Art. 3128. DOI 10.3390/biomedicines10123128
182. Walkon L. L. Calcium Overload and Mitochondrial Metabolism / Walkon L. L., Strubbe-Rivera J. O., Bazil J. N. // *Biomolecules*. – 2022. – Vol. 12. – № 12. – Art. 1891. DOI 10.3390/biom12121891
183. Wang C. VAMP2 chaperones α -synuclein in synaptic vesicle co-condensates / Wang C., Zhang K., Cai B., Haller J. E., Carnazza K. E., Hu J., Zhao C., Tian Z., Hu X., Hall D., Qiang J., Hou S., Liu Z., Gu J., Zhang Y., Seroogy K. B., Burré J., Fang Y., Liu C. // *Nature Cell Biology*. – 2024. – Vol. 26. – № 8. – P. 1287-1295. DOI 10.1038/s41556-024-01456-1
184. Wang J. MCU complex: Exploring emerging targets and mechanisms of mitochondrial physiology and pathology / Wang J., Jiang J., Hu H., Chen L. // *Journal of Advanced Research*. – 2025. – Vol. 68. – P. 271-298. DOI 10.1016/j.jare.2024.02.013
185. Wang X. Regulation of NMDA Receptors by Dopamine D 4 Signaling in Prefrontal Cortex / Wang X., Zhong P., Gu Z., Yan Z. // *The Journal of Neuroscience*. – 2003. – Vol. 23. – № 30. – P. 9852-9861. DOI 10.1523/JNEUROSCI.23-30-09852.2003
186. Zamponi G. W. The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential / Zamponi G. W., Striessnig J., Koschak A., Dolphin A. C. // *Pharmacological Reviews*. – 2015. – Vol. 67. – № 4. – P. 821-870. DOI 10.1124/pr.114.009654
187. Zhang H. Role of gamma-synuclein in microtubule regulation / Zhang H., Kouadio A., Cartledge D., Godwin A. K. // *Experimental Cell Research*. – 2011. – Vol. 317. – № 10. – P. 1330-1339. DOI 10.1016/j.yexcr.2010.10.013

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых периодических изданиях

1. Fedulina A.A. Alpha- and Gamma-Synucleins Regulate Energy Metabolism and Xanthine Oxidase Activity in Brain Cells / Fedulina A.A., Seryogina E.S., Krayushkina A.M., Chaprov K.D., Vinokurov A.Yu., Abramov A.Yu. // Biochemistry (Moscow). – 2025. – Vol. 90, No. 10. – P. 1388-1396. – DOI 10.1134/S0006297925602278. – EDN CDMPCO
2. Fedulina A.A. Lack of synucleins induces an alteration of lipid peroxidation in the brain / Fedulina A.A., Seryogina E., Chaprov K.D., Baev A.Y., Vinokurov A.Y., Abramov A.Y. // Biochemical and biophysical research communications. – 2026b. – Vol. 833. – P. 154420. DOI 10.1016/j.bbrc.2026.154420
3. Fedulina A. A. Synucleins deficiency alter dopamine- and glutamate induced calcium signal in neurons and astrocytes / Fedulina A.A., Baev A.Y., Emelyanov A.V., Chaprov K.D., Vinokurov A.Y., Abramov A.Y. // Neurochemistry International. – 2026c. – Vol. 200. – P. 106269. DOI 10.1016/j.neuint.2026.106269

Статьи в сборниках конференций и тезисы докладов

1. Федулина А. А. Роль синуклеинов в редокс балансе клеток мозга / Федулина А. А., Серегина Е. С., Чапров К. Д., Винокуров А.Ю, Абрамов А.Ю. // Volga Neuroscience Meeting 2025: Тезисы Пятой международной конференции, Нижегородская обл., г. Дзержинск, п. Желнино, 25–29 августа 2025 года. – Нижний Новгород: Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, 2025. – С. 13-14. – EDN HFBZFA.
2. Федулина А. А. Роль синуклеинов в регуляции окислительновосстановительного баланса клеток мозга / Федулина А. А., Серегина Е. С., Чапров К. Д., Винокуров А.Ю, Абрамов А.Ю. // Прогресс в биомедицине: от исследований до клинической практики (OrelBioMed): Сборник трудов Всероссийской конференции, Орел, 11–13 сентября 2025 года. – Орел: Орловский государственный университет им. И.С. Тургенева, 2025. – С. 64. – EDN KKVWLW.

3. Федулина А. А. Регуляторная роль синуклеинов в поддержании энергетического и редокс баланса клеток мозга / Федулина А. А., Серегина Е. С., Чапров К. Д., Винокуров А.Ю, Абрамов А.Ю. // Нейрокампус Байкал 2025: Сборник трудов Всероссийской конференции с международным участием, пос. Большие Коты, оз. Байкал, 29 июня – 04 июля 2025 года. – Орел: Орловский государственный университет им. И.С. Тургенева, 2025. – С. 28. – EDN KCFRKS.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица А.1 – Сравнение изоформ семейства синуклеинов (α , β , γ) по распространению, экспрессии, физиологическим функциям и патологиям

Характеристика	α -синуклеин (SNCA)	β -синуклеин (SNCB)	γ -синуклеин (SNCG)
Структура	140 а.о., переход из мономерной формы в α -спираль на мембране и β -структурные олигомеры/фибриллы (Villar-Piqué et al., 2016; Meade et al., 2019)	134 а.о., делеция 11 а.о. в NAC-регионе, что снижает его способность к агрегации (Lavedan, 1998)	127 а.о., «персин» (Buchman et al., 1998)
Распространение по органам/тканям	ЦНС (преимущественно): пресинаптические окончания серого вещества, неокортекс, гиппокамп, обонятельная луковица, стриатум, таламус, мозжечок, черная субстанция (Maroteaux et al., 1988; Iwai et al., 1995; Lavedan, 1998; Sulzer & Edwards, 2019). Периферия: лимфоциты, эритроциты и тромбоциты (Sennett et al., 2024)	ЦНС (преимущественно): экспрессируется все с α -синуклеином, пресинаптические окончания серого вещества, неокортекс, гиппокамп, мозжечок, обонятельные рецепторные нейроны, мезэнцефалон (Lavedan, 1998; Ramalingam & Dettmer, 2021). Периферия: скелетные мышцы, клетки Сертоли (Lavedan, 1998)	ПНС (преимущественно): первичные сенсорные нейроны (ганглии задних корешков), симпатические и мотонейроны (Buchman et al., 1998; Lavedan, 1998). Специфический маркер ганглиозных клеток в сетчатке и их аксонов (Surgucheva et al., 2002, 2008). ЦНС (ограниченно): стволовые ядра, черная субстанция, кора и гиппокамп (Buchman et al., 1998; Lavedan, 1998; Ninkina et al., 2009). Периферия: белая жировая ткань (Millership et al., 2013), сердце, скелетные мышцы, слабо экспрессируется в поджелудочной железе, почках, легких (Lavedan, 1998)
Основные физиологические функции	Синаптическая функция: сборка SNARE-комплекса (связывание VAMP2/синаптобреви	Антиагрегация: молекулярный шаперон, подавление агрегации α -синуклеина	Нейрофиламенты: регуляция микротрубочек (Zhang et al., 2011); влияние на нейрофиламентную

	на-2) (Burré et al., 2010; Wang et al., 2024), везикулярный транспорт и рециклинг синаптических везикул, поддержание резервного пула везикул (Cabin et al., 2002; Greten-Harrison et al., 2010). Дофамин: регуляция VMAT2 везикулярного захвата дофамина (Ninkina et al., 2019), тирозингидроксилазы (Lehrer & Rheinstein, 2022), метаболизм дофамина в стриатуме (Al-Wandi et al., 2010; Lotharius & Brundin, 2002). Липиды/мембраны: связывание липидных мембран (Middleton & Rhoades, 2010; Ulmer et al., 2005), кардиолипина (Ghio et al., 2019), липидные рафты (Fortin et al., 2004); влияние на липидный гомеостаз (Fanning et al., 2019). Митохондрии: вход мономера в митохондрии, повышение эффективности АТФ-синтазы (комплекс V) (Ludtmann et al., 2016); локализация на мембранах, ассоциированных с ЭПР (Guardia-Laguarta et al., 2014). Метаболизм/редокс: заякоривание G6PD на синаптических везикулах, связывание или инактивация GAPDH и модуляция гликолиза, ПФП, НАДФН. Прочее:	(Hashimoto et al., 2001), ингибирование вторичной нуклеации (Janowska et al., 2015) Антиапоптоз: p53/Mdm2-зависимая защита от стауспорина и 6-OHDA (da Costa et al., 2003); Akt-зависимая защита от ротенона (Hashimoto et al., 2004). Липиды: связывание N-конца с липидами, температурно- (Ramalingam & Dettmer, 2021) и липид-зависимое мембранное связывание (Kim et al., 2021). Синапс/дофамин: поддержка синаптической функции (Greten-Harrison et al., 2010; Anwar et al., 2011); потенцирование везикулярного захвата дофамина и защита дофаминергических нейронов от МРТР при отсутствии других синуклеинов (Ninkina et al., 2021; Ninkina et al., 2019). Деграция белков: участие в аутофаго-лизосомном и убиквитин-протеасомном путях. Сетевая активность мозга: утрата β-syn в одиночных, двойных и тройных КО по своему изменяет ЭЭГ-показатели (Vorobyov et al., 2022; Vorobyov et al., 2024).	сеть и аксональную архитектуру (Buchman et al., 1998; Ninkina et al., 2009). Сигналинг: активация MAPK/Elk-1; каскад MKK3/6–p38MAPK (показано в опухолевых клетках) (Liu et al., 2022). Метаболизм: регуляция хранения липидов в адипоцитах, влияние на энергетический, липидный обмен организма (Millership et al., 2013), изменение состава липидов и жирных кислот мозга у γ-КО (Guschina et al., 2011). Дофамин: совместно с α-синуклеином ограничивает высвобождение дофамина в стриатуме (Senior et al., 2008; Robertson et al., 2004). Поведение: тоническое торможение отдельных когнитивных и моторных функций (Kokhan et al., 2013; Sukhanova et al., 2026). Компенсация возрастных нарушений: роль в поддержании моторного поведения и метаболизма дофамина при старении (Connor-Robson et al., 2016). Сетевая активность мозга: вклад в ЭЭГ-показатели, отличный от α- и β-syn (Vorobyov et al., 2022)
--	--	--	--

	шаперон-подобная активность, ингибирование фосфолипазы D2, модуляция процессинговых тел и стабильности мРНК (Hallacli et al., 2022); влияние на высвобождение глутамата (Gureviciene et al., 2007), секреция в тромбоцитах (SNARE) (Sennett et al., 2024). Глутаматергическая передача и пластичность: участие в TrkB/Akt/Fyn-зависимом фосфорилировании NMDA-рецепторов и в поддержании пространственной памяти (Ma et al., 2020). Моноаминоксидаза: стимуляция MAO-B и легумаина (AEP) (Kang et al., 2018). Сетевая активность мозга: панейрональная инактивация SNCA изменяет ЭЭГ-когерентность между корой/стриатумом и дофаминергическими областями среднего мозга (Vorobyov et al., 2023)		
Патологии	Болезнь Паркинсона (мутации, мультипликации SNCA: PARK1, PARK4) (Meade et al., 2019; Vekrellis et al., 2024; Statoulla et al., 2026), деменция с тельцами Леви (ДТЛ), множественная системная атрофия (МСА): главный	Мутации V70M и P123H гена SNCA описаны при ДТЛ (Ohtake et al., 2004). Избыточное мембранное связывание мономера (мутанты KTKGV) приводит к токсичности (Kim et al., 2021). В ликворе β-синуклеин повышен	Онкология: сверхэкспрессируется в ряде опухолей, чаще на поздних стадиях, и связан с метастазированием, сверхэкспрессия в HerG2 увеличивает легочные метастазы у мышей (Liu et al., 2022). Нейродегенерация: Сверхэкспрессия

	компонент телец Леви и глиальных включений, штамм-специфичность агрегатов при БП и МСА (Khedmatgozar et al., 2024; Mehra et al., 2021). Неамилоидный компонент (NAC) бляшек при болезни Альцгеймера (Uéda et al., 1993; Iwai et al., 1995). Для агрегированных форм показана Ca^{2+}-зависимая нейротоксичность (Angelova et al., 2016), повышенное перекисное окисление липидов и ферроптоз (Angelova et al., 2015; Angelova et al., 2020), порообразование и открытие поры проницаемости в митохондриях (Ghio et al., 2019; Ludtmann et al., 2018), фибриллы вызывают митохондриальную дисфункцию и гибель нейронов (Casella et al., 2021; Angelova et al., 2025); взаимодействие олигомеров с ионами металлов вызывает окислительный стресс и гибель нейронов (Deas et al., 2016); образование свободнорадикальной формы α-синуклеина в токсин-индуцированных моделях (Kumar et al., 2016); ферроптоз (Ding et al., 2023); общие с β-амилоидом механизмы (Ca^{2+},	при болезни Альцгеймера и болезни Крейтцфельда–Якоба и не изменен при синуклеинопатиях (Oeckl et al., 2016). В тельцах Леви при ДТЛ агрегаты β-синуклеина не выявлены (Ohtake et al., 2004).	мышинного γ-синуклеина (Thy-1) вызывает возраст- и дозозависимую нейродегенерацию с агрегатами и астроглиозом, наиболее выраженную в спинном мозге с гибелью мотонейронов (Ninkina et al., 2009). Избирательное поражение верхней и нижней моторной системы при относительной сохранности сенсорной воспроизводит паттерн БАС (Peters et al., 2012). В аутопсийном материале БАС найдены γ-синуклеин-позитивные профили в кортикоспинальных трактах и в спинальных мотонейронах Peters et al., 2015).
--	--	--	--

	свободные радикалы, митохондрией) (Angelova & Abramov, 2017), и общий принцип взаимодействия неправильно свернутых белков с митохондриями (Abramov et al., 2017); нарушенный метаболизм дофамина и токсичность его реактивных метаболитов (Masato et al., 2019; Sivakumar et al., 2023), усиливаемые МАО-В-зависимым путем (Kang et al., 2018). Окислительный стресс как интегральный механизм БП (Chang & Chen, 2020), перегрузка системы молекулярных шаперонов и нарушение протеостаза (Hu et al., 2021). Нейровоспаление: α-синуклеин активирует НАДФН-оксидазу 2 микроглии через интегрин CD11b и путь RhoA/ROCK (Hou et al., 2018) и через рецептор P2X7 (Jiang et al., 2015); роль НАДФН-оксидазы при БП суммирована в систематическом обзоре (Belarbi et al., 2017). Антагонисты АТ1-рецепторов ангиотензина ослабляют α-синуклеин-индуцированное нейровоспаление и гибель дофаминергических		
--	--	--	--

	нейронов (Rodriguez-Perez et al., 2018). В дофаминергических нейронах НАДФН-оксидаза 1 способствует экспрессии и агрегации α -синуклеина в моделях БП (Cristóvão et al., 2012).		
--	--	--	--

Таблица А.2 – Эффекты нокаутов α -, β - и γ -синуклеинов на изучаемые системы

Блок	Показатель	ДТ	α -КО	β -КО	γ -КО	$\alpha\gamma$ -КО	$\alpha\beta\gamma$ -КО
Сравнения с ДТ							
$\Delta\psi_m$	$\Delta\psi_m$ + олигомицин (культура)	реф.	—	↑ 128,0%	—	—	↑ 148,6%
	$\Delta\psi_m$ (культура)	реф.	↓ 74,7%	=	—	↓ 79,9%	—
	$\Delta\psi_m$ (срезы)	реф.	↓ 56,8%	↓ 83,2%	=	—	↓ 72,3%
Время до коллапса митохондрий	время до коллапса (культура)	реф.	↓ 84,5%	—	—	↓ 69,7%	—
НАД(Ф)Н	НАДФН	реф.	—	=	—	—	=
	пул НАДН	реф.	—	=	—	—	=
	редокс-индекс	реф.	—	=	—	—	↓ 75,1%
	скорость продукции НАДН	реф.	—	=	—	—	=
Митохондриальный Ca^{2+}	CRC	реф.	=	—	↓ 84,7%	—	=
	скорость выхода ионов Ca^{2+}	реф.	=	—	=	—	=
	скорость входа ионов Ca^{2+}	реф.	=	—	↓ 58,8%	—	=
Митохондриальные АФК	MitoTracker (культура)	реф.	=	↓ 45,1%	↑ 166,8%	=	↓ 50,3%

Блок	Показатель	ДТ	α -КО	β -КО	γ -КО	$\alpha\gamma$ -КО	$\alpha\beta\gamma$ -КО
АФК	Базовый ДГЭ (культура)	реф.	—	=	—	—	=
	Базовый ДГЭ (срезы)	реф.	↓ 24,9%	=	=	↓ 43,9%	—
Глутатион	GSH MCB астроциты, кора (культура)	реф.	—	=	—	↑ 132,6%	=
	GSH MCB астроциты, ср. мозг (культура)	реф.	—	—	—	=	=
	GSH MCB нейроны, кора (культура)	реф.	—	=	—	↑ 153,6%	↑ 151,1%
	GSH MCB нейроны, ср. мозг (культура)	реф.	—	—	—	=	=
	GSH MCB (срезы)	реф.	=	—	↑ 127,3%	—	=
ПОЛ	ПОЛ (срезы)	реф.	↓ 32,8%	↓ 8,5%	↓ 16,6%	=	↓ 20,9%
Ca ²⁺ базовый уровень	астроциты (срезы)	реф.	=	=	=	—	↓ 69,3%
	нейроны (срезы)	реф.	=	=	=	—	=
Ca ²⁺ ответы	ответ астроцитов на ДА (срезы)	реф.	↑ 183,2%	=	=	—	=
	ответ нейронов на глутамат (срезы)	реф.	=	—	↓ 34,4%	—	↓ 28,7%
	ответ нейронов на ДА (срезы)	реф.	↓ 65,5%	↑135%	↓ 54,5%	—	↓ 45,6%
Добавки внутри генотипа							
Время до коллапса митохондрий	время до коллапса + 30 нМ α -syn (культура)	—	—	—	—	↑ 151,3%	—

Блок	Показатель	ДТ	α -КО	β -КО	γ -КО	$\alpha\gamma$ -КО	$\alpha\beta\gamma$ -КО
$\Delta\psi_m$	$\Delta\psi_m + 30$ нМ α -syn (культура)		↑ 110%				
АФК	ДГЭ + ДА (культура)	↑ 113,2%	—	↑ 138,7%	—	—	↑ 195,7%
	ДГЭ + ДА (срезы)	↑ 141,4%	↑ 152,3%	=	↑ 122,0%	=	—
	ДГЭ + DPI (срезы)	↓ 24,4%	=	=	↓ 46,4%	↑ 440,8%	—
	ДГЭ + GSK (срезы)	↓ 3,0%	=	=	=	↓ 71,0%	—
	ДГЭ + ОП (срезы)	↓ 34,6%	=	↓ 33,7%	=	↑ 220,3%	—
	ДГЭ + СЕЛ (срезы)	↓ 14,8%	↓ 64,2%	=	↑ 164,5%	↑ 201,6%	—
Глутатион	GSH MCB + ДА, астроциты (культура)	=	—	↓ 71,9%	—	—	↓ 45,7%
	GSH MCB + ДА, нейроны (культура)	=	—	=	—	—	↓ 50,6%
	GSH MCB + СЕЛ, астроциты (культура)	—	—	=	—	—	=
	GSH MCB + СЕЛ, нейроны (культура)	—	—	=	—	—	↓ 60,6%
ПОЛ	ПОЛ + ДА (срезы)	↓ 26,0%	=	↓ 54,1%	↓ 44,1%	—	—
Ca^{2+} ответы	ответ на глутамат после ДА (срезы)	↓ 32,2%	↓ 27,2%	—	=	—	↑ 227,1%