

На правах рукописи

Федулина Анастасия Алексеевна

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

1.5.2. – Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Пущино – 2026

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева»

Научный руководитель: доктор биологических наук
Абрамов Андрей Юрьевич

Официальные оппоненты: **Силачев Денис Николаевич**
доктор биологических наук,
Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского
Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, лаборатория биохимии двигательных систем, заведующий

Гайдин Сергей Геннадьевич
кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки,
«Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», лаборатория клеточных механизмов нейропатологий, старший научный сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится 17 декабря 2026 г. в 14 ч 00 мин на заседании диссертационного совета 24.1.232.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (ФИЦ ПНЦБИ РАН) по адресу: 142290, Московская область, г.о. Серпухов, г. Пущино, ул. Институтская, д. 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФИЦ ПНЦБИ РАН по адресу: 142290 г. Пущино, ул. Институтская, д. 3 и на сайте www.pbcras.ru/.

Автореферат разослан «___» _____ 2026 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Дегтярева Ольга Васильевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 (Hallacli 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 ($\Delta\psi\text{m}$) при нокауте гена α -синуклеина подтверждает роль мономерного белка в работе АТФ-синтазы (Ludtmann et al., 2016). Впервые показано, что отсутствие β -синуклеина снижает $\Delta\psi\text{m}$ и базовую митохондриальную продукцию АФК и усиливает прирост $\Delta\psi\text{m}$ в ответ на олигомицин. Снижение $\Delta\psi\text{m}$ 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, моноаминоксидаза – 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.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 153 машинописных страницах, включает 22 рисунка. Список литературы содержит 187 источников. Работа содержит следующие разделы: оглавление, введение, обзор литературы, материалы и методы, обсуждение, заключение, выводы, список литературы, список опубликованных работ и список сокращений, приложение.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. Работа выполнена на половозрелых самцах мышей 12–24 недель на генетическом фоне линии C57BL/6J: дикий тип, одиночные нокауты α -синуклеина (B6(Cg)-Snca^{tm1.2Vlb}), β -синуклеина (B6(Cg)-Snbc^{tm1Sud}), γ -синуклеина (B6(Cg)-Snsg^{tm1Vlb}), двойной $\alpha\gamma$ -КО и тройной $\alpha\beta\gamma$ -КО. Процедуры соответствовали Директиве 2010/63/EU и рекомендациям ARRIVE и одобрены этическим комитетом Орловского государственного университета имени И.С. Тургенева (протокол № 2 от 06.12.2024).

Коронарные срезы коры толщиной 200 мкм готовили на микротоме Campden 7000smz-2. Инкубацию и регистрацию вели в HBSS (pH 7,4) при 22–25 °C. Первичные нейрон-глиальные культуры коры получали от мышат P0–P2 диссоциацией 0,05 % трипсином (15 мин, 37 °C) и вели в нейробазальной среде с 2 % NeuroMax при 37 °C и 5 % CO₂. Митохондрии переднего мозга выделяли параллельно дифференциальным центрифугированием (800 g, затем 13 000 g, 1 °C) с 0,02 % дигитонина.

Флуоресцентная микроскопия. Митохондриальный мембранный потенциал регистрировали по интенсивности флуоресценции метилового эфира тетраметилродамина (TMRM, инкубация 25 нМ, 40 мин; Ex/Em 561/580 нм) на конфокальном микроскопе Zeiss LSM 900. Автофлуоресценция НАД(Ф)Н в срезах (Ex/Em 365/423–467 нм). Энергетическую емкость оценивали индикатором Mag-Fura-2 AM (5 мкМ, 30 мин; Ex/Em 340–380/505–510 нм). Продукцию АФК оценивали по

скорости окисления зондов, нормированной на ДТ (100 %). Цитозольный супероксид регистрировали с помощью диgidроэтидия (ДГЭ) (5 мкМ; Ex/Em 561/620 нм). Митохондриальные АФК в культурах регистрировали по наклону F/F₀ зонда MitoTracker Red CM-H₂Xros (500 нМ, 10 мин; Ex/Em 561/610 нм). Уровень восстановленного глутатиона (GSH) оценивали по флуоресценции аддукта монохлоробимана (MCB) (50 мкМ, 40 мин; Ex/Em 405/430–480 нм). Скорость перекисного окисления липидов (ПОЛ) в срезах определяли по наклону отношения окисленной и восстановленной форм C11-BODIPY 581/591 (2 мкМ; Ex/Em 488/505–550 нм и 565/>580 нм). Кальциевую емкость изолированных митохондрий (1 мг белка/мл; глутамат 5 мМ и малат 1 мМ) регистрировали зондом Calcium Green-5N (0,5 мкМ, Ex/Em 506/532 нм) на ридере CLARIOstar Plus. Цитозольный Ca²⁺ в срезах оценивали по флуоресценции X-Rhod-1 AM (5 мкМ, 30 мин; Ex/Em 561/580 нм).

Анализ данных и статистический анализ. Обработку изображений проводили в ZEN, ImageJ/FIJI и MetaFluor. Статистический анализ выполняли в OriginPro и Python (statsmodels). Нормальность проверяли критерием Шапиро–Уилка. Независимые выборки сравнивали критерием Манна–Уитни, при сравнениях с ДТ – с поправкой Бонферрони, связанные измерения – критерием Уилкоксона. ПОЛ, GSH, Δψm срезов и амплитуды Ca²⁺ ответов анализировали линейной смешанной моделью со случайным эффектом с поправкой Холма. Все данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего. Уровни значимости обозначены: *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001, # p < 0,0001.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Митохондриальный мембранный потенциал при отсутствии синуклеинов.

Поскольку подавляющее большинство митохондриальных процессов регулируется митохондриальным мембранным потенциалом (Δψm), была дана оценка вклада синуклеинов в Δψm. В острых срезах коры потенциал, регистрируемый по флуоресценции TMRM был снижен при отсутствии α-синуклеина (56 ± 2,7 %; n = 123; p < 0,001), β-синуклеина (83 ± 2,7 %; n = 327; p < 0,05) и при тройном нокауте (72,3 ± 3,1 %; n = 60; p < 0,05) (рис. 1 Е). Снижение при α-КО согласуется с участием мономерного α-синуклеина в работе F₀F₁-АТФ-синтазы (Ludtmann et al., 2016). Если АТФ-синтаза в отсутствие синуклеинов пропускает больше протонов при менее эффективном синтезе АТФ, блокада фермента олигомицином должна давать больший прирост Δψm. В срезах ДТ олигомицин (2 мкг/мл) вызывал ожидаемый подъем флуоресценции TMRM. У β-КО и αβγ-КО этот прирост был больше, чем у ДТ: 128 ± 3,2 % (n = 10; p < 0,01) и 148,6 ± 4,1 % (n = 10; p < 0,001) соответственно, при среднем ДТ, принятом за 100 % (рис. 1 Ж, З). Такой ответ указывает на повышенный протонный поток через АТФ-синтазу в этих генотипах. В первичных нейрон-глиальных культурах падение Δψm воспроизводилось при нокауте α-синуклеина (74,7 ± 1,1 %; N = 4; P = 12; p < 0,001) и при αγ-КО (79,9 ± 1,3 %; N = 4; P = 12; p < 0,001). Инкубация нейрон-глиальных культур α-КО с 30 нМ мономерного α-синуклеина в течение 1 ч возвращала потенциал к уровню ДТ (109 ± 2 %; p = 1 относительно ДТ; p < 0,0001 относительно α-КО). Следовательно, снижение Δψm в этих клетках обусловлено нехваткой мономерного α-синуклеина.

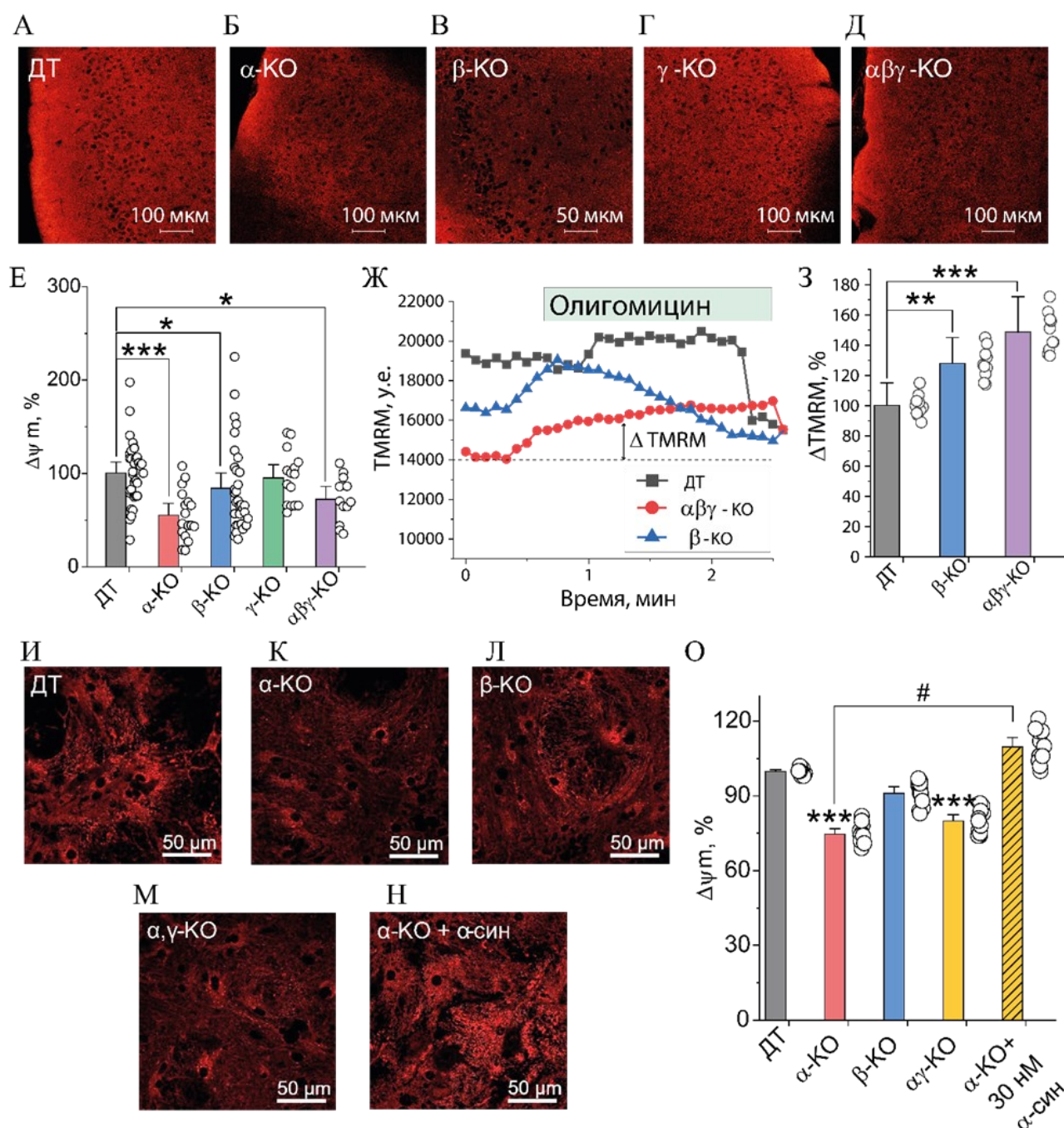


Рисунок 1. Митохондриальный мембранный потенциал при отсутствии синуклеинов. (А–Д) Репрезентативные изображения срезов коры головного мозга, загруженные TMRM. (Е) $\Delta\psi_m$ в срезах. ДТ: N = 6, P = 32, n = 336; α -KO: N = 3, P = 17, n = 123; β -KO: N = 6, P = 32, n = 327; γ -KO: N = 3, P = 15, n = 122; $\alpha\beta\gamma$ -KO: N = 3, P = 12, n = 60. (Ж, З) Прирост TMRM после олигомицина (2 мкг/мл). ДТ: N = 4, P = 4, n = 11; β -KO: N = 3, P = 3, n = 10; $\alpha\beta\gamma$ -KO: N = 3, P = 3, n = 10. (И–Н) Репрезентативные изображения нейрон-глиальных культур. (О) $\Delta\psi_m$ нейрон-глиальных культур. N = 4, P = 12 в каждой группе. ДТ=100%. Точки на графиках – P. (Е, З) Линейная смешанная модель с поправкой Холма, (О) критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 относительно ДТ; #p < 0,0001 (Fedulina et al., 2025)

Энергетическая емкость клеток. Если $\Delta\psi_m$ (рис. 1) и редокс-индекс (ДТ $64,4 \pm 4,7$ % $N=3$, $n=43$; β ; $\alpha\beta\gamma$ -КО $48,4 \pm 4,0$ % $N=3$, $n=30$; $p=0,022$) смещены, энергетическая емкость клеток мозга может быть изменена. Это оценивалось по времени до энергетического коллапса после одновременной блокады окислительного фосфорилирования (5 мМ NaCN) и гликолиза (20 мкМ йодуксусной кислоты). В культурах ДТ коллапс наступал в среднем через 60 мин (рис 2. А, Б). При α -КО это время сокращалось до 51 мин ($N = 4$; $n = 17$; $p < 0,0001$), при $\alpha\gamma$ -КО – до 42 мин ($N = 4$; $n = 22$; $p < 0,0001$; рис 2. А, В). Добавление 30 нМ мономерного α -синуклеина к нейрон-глиальным культурам $\alpha\gamma$ -КО возвращало время коллапса к 63 мин ($N = 4$; $n = 16$; $p = 1$ относительно ДТ; $p < 0,0001$ относительно $\alpha\gamma$ -КО) (рис. 2 А, Г). Таким образом, мономерный α -синуклеин поддерживает $\Delta\psi_m$ и энергетическую емкость клеток головного мозга.

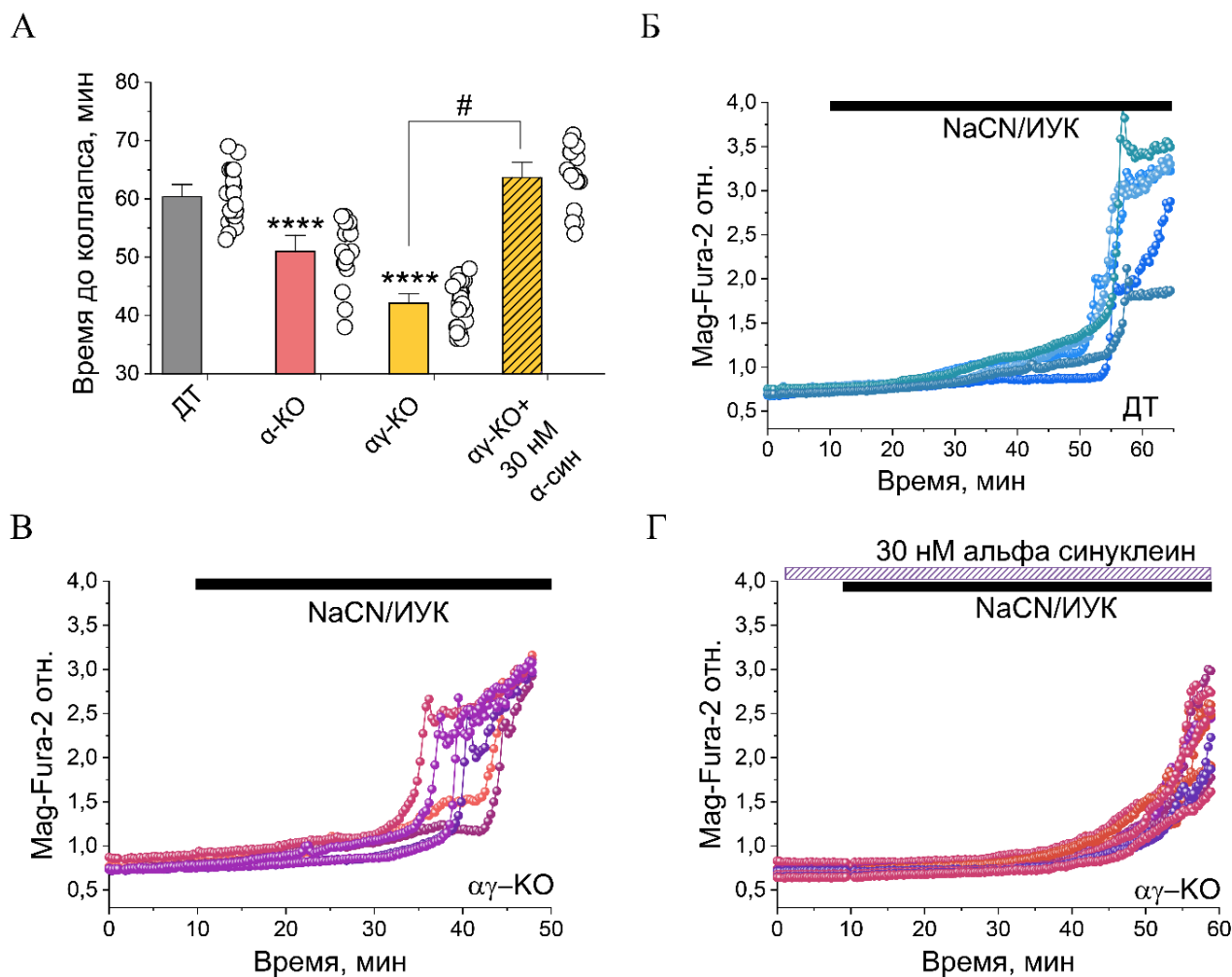


Рисунок 2. Время до энергетического коллапса в нейрон-глиальных культурах. (А) Результаты статистического анализа времени до энергетического коллапса. (Б–Г) Репрезентативные кривые отношения Mag-Fura-2 340/380 у ДТ, $\alpha\gamma$ -КО и $\alpha\gamma$ -КО в присутствии 30 нМ мономерного α -синуклеина. ДТ: $N = 4$, $n = 19$; α -КО: $N = 4$, $n = 17$; $\alpha\gamma$ -КО: $N = 4$, $n = 22$; $\alpha\gamma$ -КО + α -синуклеин: $N = 4$, $n = 16$. Точки на графиках – n . Критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони. **** $p < 0,0001$ относительно ДТ; # $p < 0,0001$ (Fedulina et al., 2025)

Транспорт ионов Ca^{2+} в изолированных митохондриях. Захват кальция митохондриями зависит от $\Delta\psi_m$, поэтому было исследовано, меняется ли кальциевая емкость (CRC) самих органелл. На изолированных митохондриях α -КО не изменял ни CRC, ни скорость захвата, ни скорость Na^+ -зависимого выхода ионов Ca^{2+} (рис. 3 Б, Г, Д). У γ -КО кальциевая емкость составила $84,7 \pm 5,7\%$ от ДТ ($p < 0,05$), а скорость захвата была снижена (γ -КО $N=5$, $n = 22$; $p < 0,01$; рис.3 Г) при сохраненной скорости выхода ионов Ca^{2+} . При тройном нокауте CRC, вход и выход ионов Ca^{2+} статистически не отличался от ДТ (рис. 3 Б, Г, Д). Следовательно, именно γ -синуклеин поддерживает потенциал-зависимый вход Ca^{2+} и емкость митохондрий до открытия поры, выход ионов Ca^{2+} через $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник от этой изоформы в данных условиях не зависит.

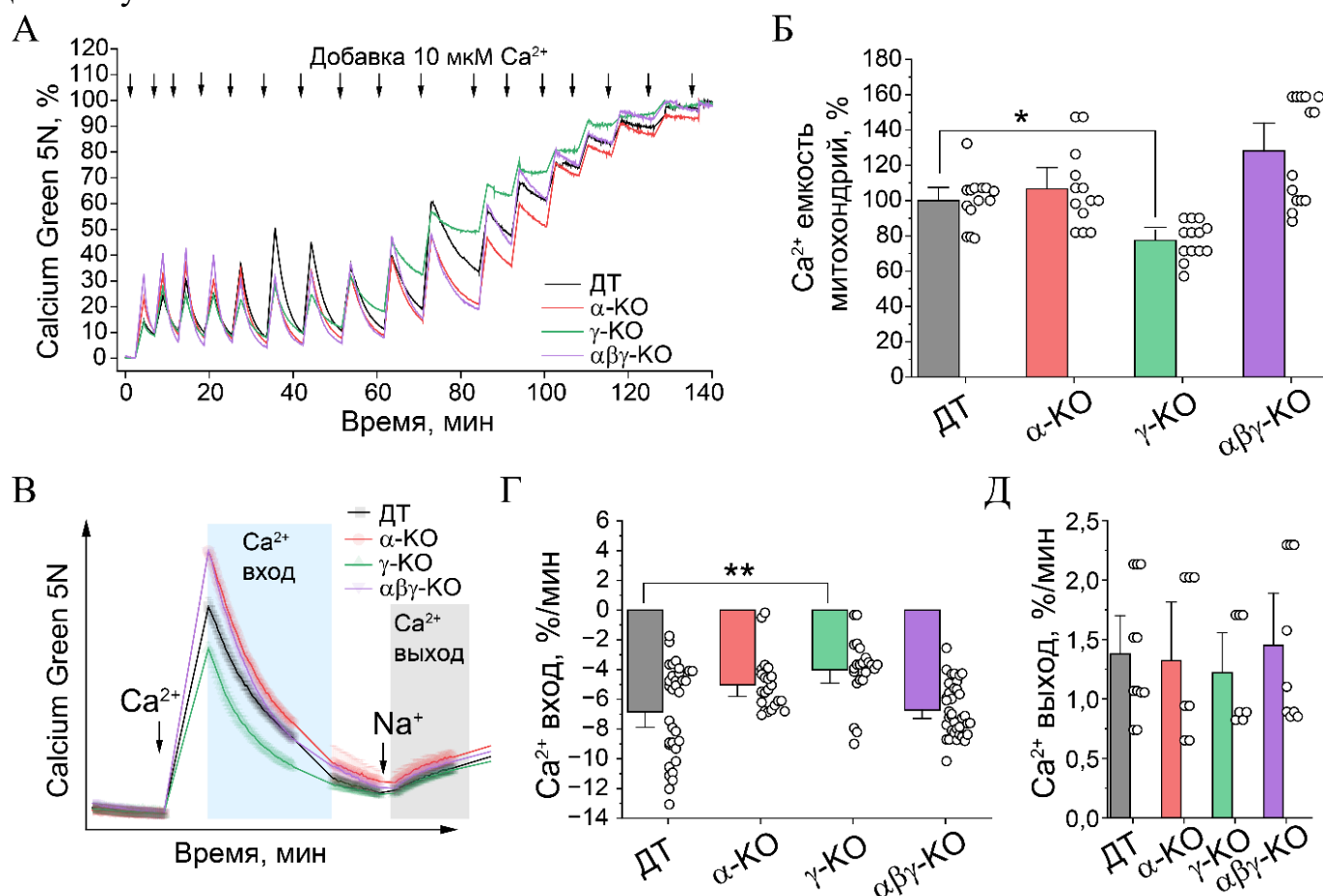


Рисунок 3. Участие синуклеинов в кальциевой регуляции в митохондриях. (А) Репрезентативные экспериментальные графики и (Б) кальциевая емкость митохондрий (CRC). ДТ=100%. ДТ: $N = 6$, $n = 14$; α -КО: $N = 5$, $n = 13$; γ -КО: $N = 5$, $n = 15$; $\alpha\beta\gamma$ -КО: $N = 5$, $n = 14$. (В) Репрезентативные кривые. (Г) Скорость входа Ca^{2+} ($\Delta F/\text{мин}$). ДТ: $n = 34$; α -КО: $n = 22$; γ -КО: $n = 22$; $\alpha\beta\gamma$ -КО: $n = 37$. (Д) Скорость выхода ионов Ca^{2+} ($\Delta F/\text{мин}$). ДТ: $n = 11$; α -КО: $n = 7$; γ -КО: $n = 7$; $\alpha\beta\gamma$ -КО: $n = 9$. Точки на графиках – n . Критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ относительно ДТ (Fedulina et al., 2026a)

Базовая продукция АФК в митохондриях и цитозоле. Сниженный $\Delta\psi_m$ и усиленный ответ на олигомицин соответствует повышенному входу протонов через АТФ-синтазу. Более низкий потенциал способен уменьшить утечку электронов на

кислород и снизить продукцию АФК в митохондриях. Митохондриальную продукцию АФК измеряли в нейрон-глиальных культурах с помощью MitoTracker Red CM-H₂Xros. Сниженный уровень скорости образования АФК подтвердился для β -КО ($45 \pm 6 \%$; $n = 18$; $p < 0,01$) и $\alpha\beta\gamma$ -КО ($50 \pm 6 \%$; $n = 12$; $p < 0,05$). У γ -КО скорость, напротив, была выше контроля ($167 \pm 12 \%$; $n = 12$; $p < 0,01$). У α -КО наблюдалась тенденция к повышению, не достигшая значимости после поправки Бонферрони ($153 \pm 15 \%$; $n = 18$; $p = 0,086$), а при $\alpha\gamma$ -КО скорость от ДТ не отличалась ($76 \pm 11 \%$; $n = 16$; $p = 1$) (рис. 4).

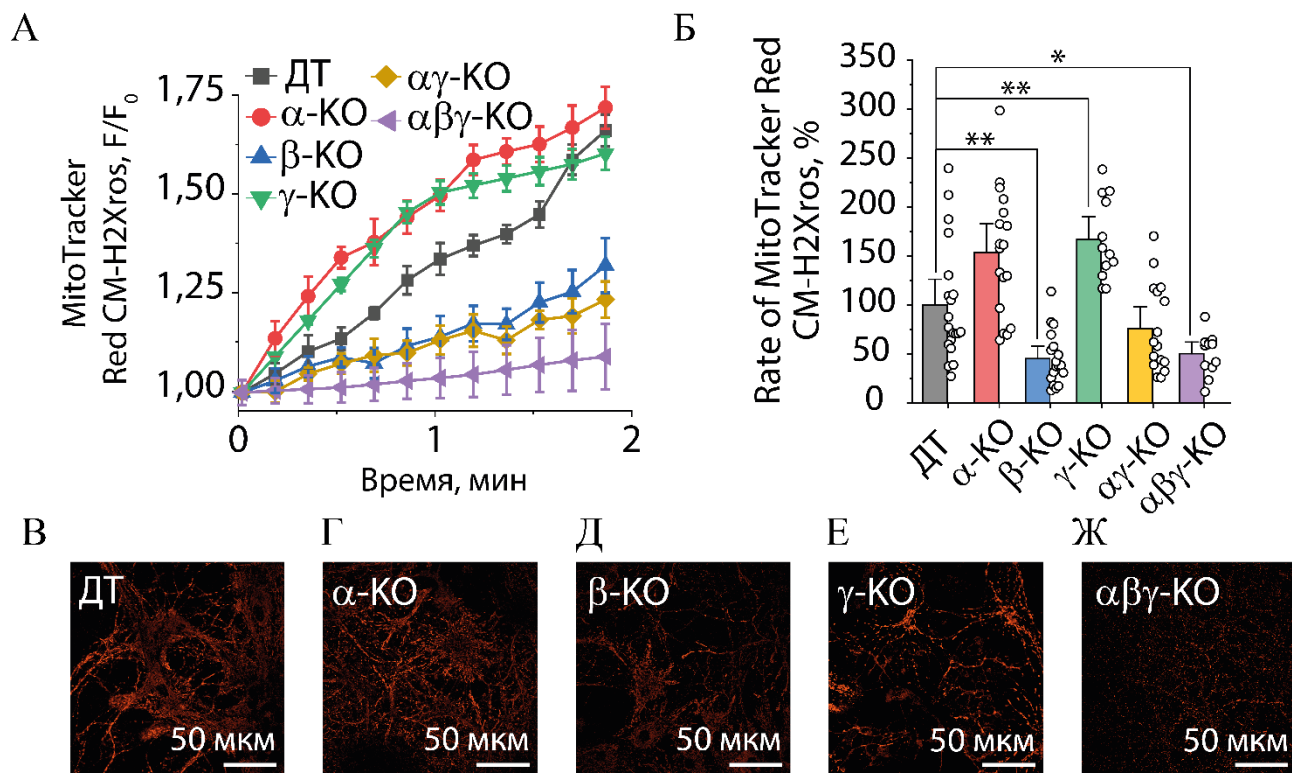


Рисунок 4. Митохондриальная продукция АФК в нейрон-глиальных культурах. (А) Репрезентативные кривые продукции митохондриальных АФК. (Б) Скорость окисления MitoTracker Red CM-H₂Xros. ДТ=100%. ДТ: N = 4, n = 20; α -КО: N = 4, n = 18; β -КО: N = 4, n = 18; γ -КО: N = 3, n = 12; $\alpha\gamma$ -КО: N = 3, n = 16; $\alpha\beta\gamma$ -КО: N = 3, n = 12. (В-Г) Репрезентативные конфокальные изображения. Точки на графиках – n. F/F₀, наклон линейного участка. Критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ относительно ДТ

Чтобы оценить влияние отдельных синуклеинов на механизм редокс-сигналикации в клетках головного мозга, была проведена оценка базовой скорости образования АФК (главным образом супероксид-аниона) в острых срезах мозга с помощью флуоресцентного индикатора дигидроэтидия (ДГЭ) (рис.5). При α -КО скорость составила $24,9 \pm 3,4 \%$ от ДТ ($n = 12$; $p < 0,001$), при $\alpha\gamma$ -КО – $43,9 \pm 3,1 \%$ ($n = 20$; $p < 0,001$). У β -КО ($72,3 \pm 11,0 \%$; $n = 12$) и γ -КО ($85,1 \pm 8,3 \%$; $n = 62$) отличие от ДТ не было значимым (рис. 5 Д). В культурах базовая скорость у β -КО ($106,6 \pm 7,1 \%$; $p = 1$) и у $\alpha\beta\gamma$ -КО ($102,8 \%$; $p = 0,79$) также была сопоставима с ДТ. Снижение цитозольных АФК при двойном $\alpha\gamma$ -КО поэтому объясняется прежде всего отсутствием α -синуклеина.

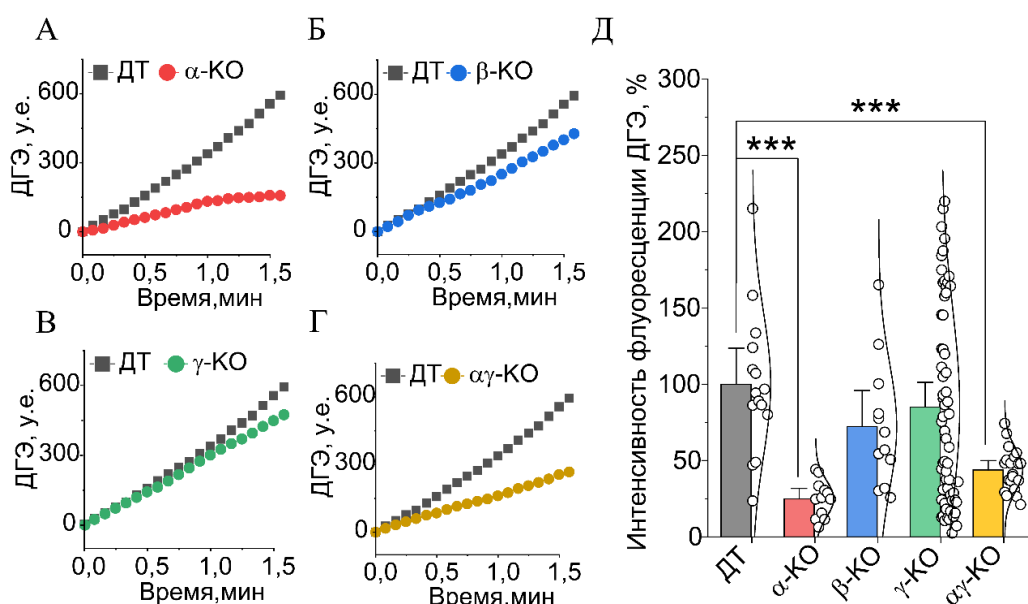


Рисунок 5. Базовая скорость образования АФК в срезах головного мозга. (А-Г) Репрезентативные кривые. (Д) Скорость флуоресценции ДГЭ. ДТ: N = 5, n = 15; α-КО: N = 4, n = 12; β-КО: N = 4, n = 12; γ-КО: N = 5, n = 62; αγ-КО: N = 4, n = 20. Точки на графиках – n. ДТ=100 %. Критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони. ***p < 0,001

Вклад ксантиноксидазы (КСО) в базовое производство АФК. Была дана оценка роли отдельных синуклеинов в поддержании окислительно-восстановительного баланса клеток мозга путем селективного ингибирования ферментов – источников АФК. К числу таких ферментов относится КСО, участвующая в метаболизме пуринов (рис. 6).

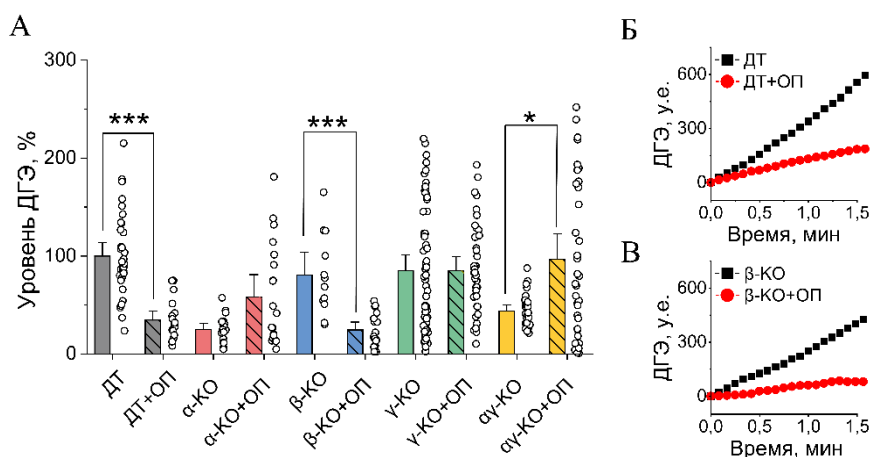


Рисунок 6. Вклад КСО в базовое производство АФК. (А) Скорость окисления ДГЭ в срезах с ингибитором КСО. (Б, В) Репрезентативные кривые. ОП – оксипуринол. Точки на графиках – n. ДТ=100%. Критерий Манна–Уитни. *p < 0,05, ***p < 0,001 (Fedulina et al., 2025)

При инкубации срезов с ингибитором (Оксипуринол 20 мкМ, 30 минут) у ДТ скорость окисления ДГЭ снижалась до $34,6 \pm 4,8$ % (N = 5, n = 18; p < 0,0001; рис. 6 А, Б), у β-КО – до $24,4 \pm 4,1$ % (N = 4, n = 17; p < 0,001; рис. 6 А, В). α-КО, γ-КО и αγ-КО на оксипуринол снижением не отвечали (α-КО: N = 4, n = 20; γ-КО: N = 5, n = 41; αγ-КО: N = 4, n = 35; рис. 6 А). Физиологический вклад КСО в базовые АФК сохраняется при наличии α- и γ-синуклеинов и утрачивается при отсутствии любой из этих двух изоформ. При этом базальная скорость АФК у одиночного γ-КО остается

близкой к контролю, тогда как у α -КО она резко снижена. γ -Синуклеин, следовательно, поддерживает ксантиноксидазный путь, но не определяет суммарный цитозольный фон в той мере, в какой это делает α -синуклеин: при сохраненных остальных источниках потеря только γ -изоформы на общей скорости не сказывается.

Вклад моноаминоксидазы (МАО) в базовое производства АФК. МАО ингибировали селегилином (20 мкМ, 20 мин), который в этой концентрации блокирует МАО А и В. В срезах ДТ селегилин снижал скорость образования АФК до $14,8 \pm 1,4 \%$ ($n = 16$; $p < 0,0001$; рис. 7 А, В). Хотя базальная скорость продукции АФК в срезах мозга α -КО мышей и была изначально ниже, чем у ДТ, инкубация этих срезов с 20 мкМ селегилина существенно уменьшала скорость прироста флуоресценции ДГЭ ($p < 0,05$; рис. 7 Б, В). У β -КО эффект селегилина был незначимым, а у γ -КО ингибитор повышал скорость образования АФК. Таким образом, вклад МАО в базальную продукцию зависит от β - и γ -синуклеинов и сохраняется при отсутствии α -синуклеина. У β -КО селегилин не снижает скорость продукции АФК (рис. 7 В). Это согласуется с участием β -изоформы в гомеостазе дофамина, в том числе через захват его синаптическими везикулами (Ninkina et al., 2021). У γ -КО и $\alpha\gamma$ -КО селегилин повышал скорость окисления ДГЭ, что согласуется с преобладанием образования супероксид-аниона при автоокислении цитозольных моноаминов над утратой пероксида водорода вследствие ингибирования МАО.

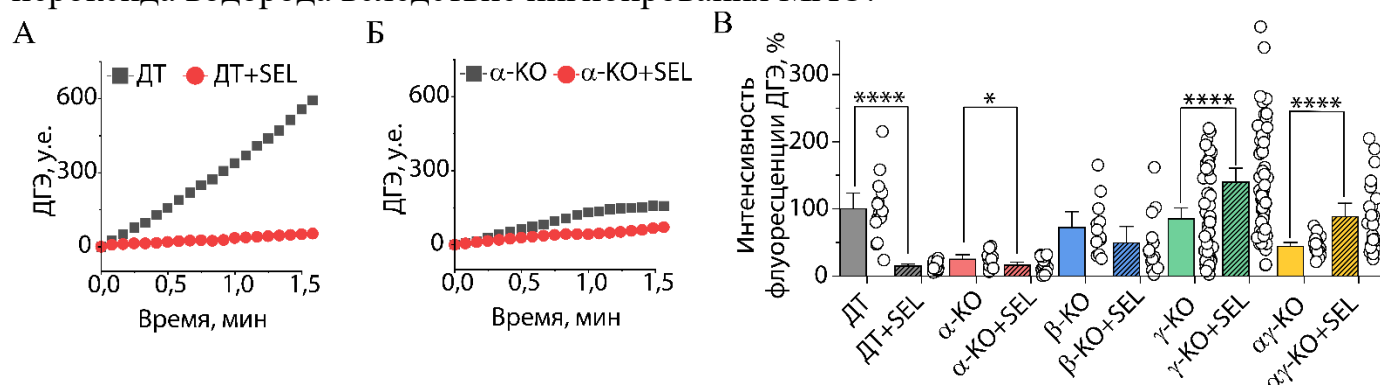


Рисунок 7. Вклад МАО в базовое производство АФК. (А, Б) Репрезентативные кривые. (В) Скорость окисления ДГЭ в срезах с ингибитором МАО. ДТ: $N = 5$, $n = 15$; α -КО: $N = 4$, $n = 12$; β -КО: $N = 4$, $n = 12$; γ -КО: $N = 5$, $n = 62$; $\alpha\gamma$ -КО: $N = 4$, $n = 20$. Селегилин: ДТ $n = 16$, α -КО $n = 23$, β -КО $n = 13$, γ -КО $n = 60$, $\alpha\gamma$ -КО $n = 25$. SEL – селегилин. Точки на графиках – n . ДТ=100%. Критерий Манна–Уитни. * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$.

Вклад НАДФН-оксидазы в базовое производства АФК. Для определения вклада НАДФН-оксидазы, источника АФК, использовались селективный ингибитор НАДФН-оксидазы 2 GSK2795039 (10 мкМ, 20 мин) и ингибитор широкого спектра DPI (0,5 мкМ, 30 мин). В срезах ДТ оба соединения снижали продукцию АФК: GSK2795039 – до $3,0 \pm 1,2 \%$ ($p < 0,001$), DPI – до $24,4 \pm 2,5 \%$ ($p < 0,001$; рис. 8 А, Е). В срезах α -КО и β -КО ни один из ингибиторов не снижал скорость продукции АФК. 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. 8 Г, Д, Е). DPI в $\alpha\gamma$ -КО повышал скорость производства АФК ($n = 15$; $p < 0,0001$; рис. 8 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. Таким образом, вклад НАДФН-оксидазы в базовое производство АФК поддерживают α - и β -синуклеины.

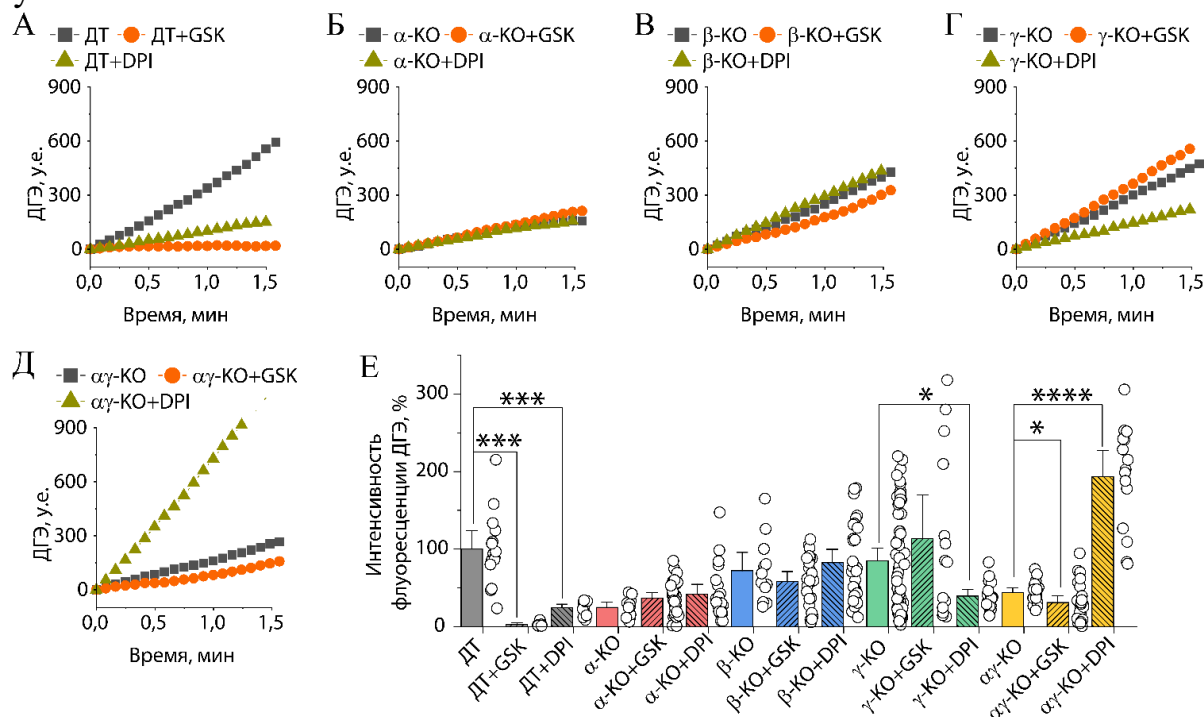


Рисунок 8. Вклад НАДФН-оксидазы в базовое производство АФК. (А-Д) Репрезентативные кривые. (Е) Скорость окисления ДГЭ в срезах с ингибиторами НАДФН-оксидазы. ДТ 15, α -КО 12, β -КО 12, γ -КО 62, $\alpha\gamma$ -КО 20. GSK2795039: ДТ $n = 6$, α -КО $n = 34$, β -КО $n = 24$, γ -КО $n = 14$, $\alpha\gamma$ -КО $n = 27$. DPI: ДТ $n = 12$, α -КО $n = 24$, β -КО $n = 31$, γ -КО $n = 17$, $\alpha\gamma$ -КО $n = 15$. Точки на графиках – n . ДТ=100%. Критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Восстановленный глутатион. 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). Применяя монохлорбиман (MCB) 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. 9). Таким образом, отсутствие синуклеинов не вызывает окислительного стресса и не снижает уровень GSH. Инкубация клеток ДТ с нетоксичной концентрацией дофамина (10 мкМ) 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.

9 Е, Ж, 3). Следует отметить, что это снижение было связано с образованием H_2O_2 MAO, поскольку этот эффект блокировался ингибитором, селегилином (20 мкМ; $\alpha\beta\gamma$ -КО+СЕЛ $35,55 \pm 2,94\%$, $N=10$, $n=299$; рис. 9 Е, Ж, 3). Поскольку ни уровень НАДФН, ни скорость образования НАДН у β -КО и $\alpha\beta\gamma$ -КО от ДТ не отличались, повышенный базальный GSH при нокаутах не объясняется ускорением пентозофосфатного пути.

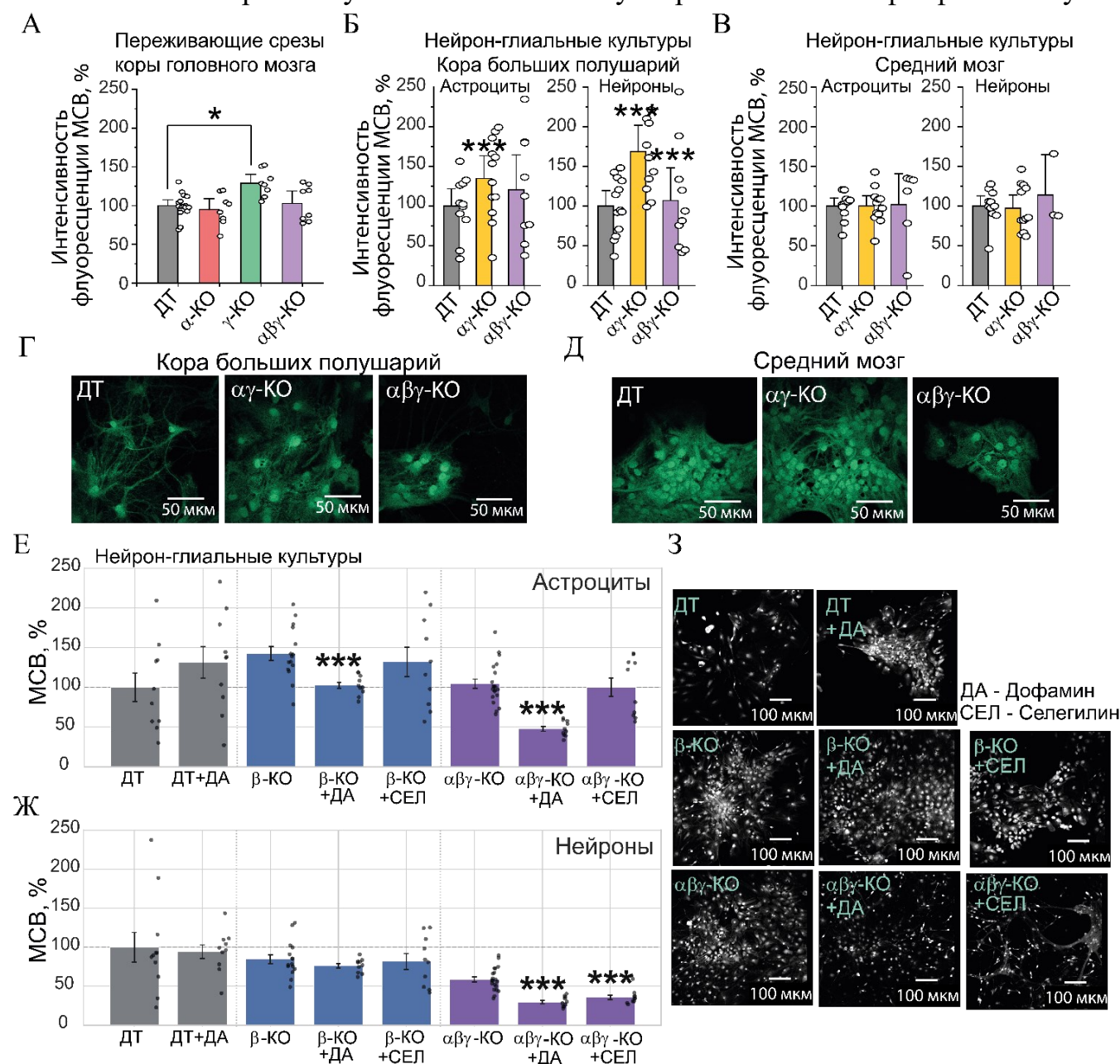


Рисунок 9. (А) Уровень GSH в срезах коры головного мозга. ДТ: $N = 5$, $P = 16$, $n = 954$; α -КО: $N = 4$, $P = 8$, $n = 419$; γ -КО: $N = 4$, $P = 8$, $n = 1260$; $\alpha\beta\gamma$ -КО: $N = 4$, $P = 8$, $n = 519$. (Б, Г) Нейрон-глиальные культуры коры. Астроциты: ДТ $N=4$, $P=11$, $n=77$; $\alpha\gamma$ -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 $N=4$, $P=10$, $n=86$; (В, Д) Нейрон-глиальные культуры среднего мозга. (Е-3) Базальный уровень GSH и уровень после 10 мкМ дофамина или 20 мкМ селегилина в астроцитах и нейронах. Точки на графиках – P. ДТ=100%. Линейная смешанная модель с поправкой Холма. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ (Fedulina, et al., 2026b)

Перекисное окисление липидов (ПОЛ). ПОЛ представляет собой цепное свободнорадикальное окисление полиненасыщенных фосфолипидов мембраны, участвующее в ряде физиологических процессов. Однако, избыточное образование продуктов ПОЛ приводит к патологии и гибели клеток, включая ферроптоз (Angelova et al., 2020). Отсутствие всех трех α -, β - и γ -синуклеинов как одновременно, так и по отдельности приводит к значительному снижению базальной скорости ПОЛ. Наиболее выраженный эффект наблюдался в срезах мозга с β -КО (ДТ: N = 5, P = 7, n = 75; α -КО: N = 4, P = 9, n = 92; β -КО: $8,5 \pm 5,5$ % N = 3; P = 3; n = 6; p < 0,001; рис. 10 А, В), а присутствие этого белка в клетках с $\alpha\gamma$ -КО поддерживало уровень ПОЛ на уровне, существенно не отличающемся от уровня в клетках ДТ. У α -КО скорость ПОЛ составила $32,8 \pm 10,0$ % (N = 4; P = 9; n = 92; p < 0,05), у γ -КО – $16,6 \pm 2,3$ % (N = 3; P = 5; n = 11; p < 0,05), у $\alpha\beta\gamma$ -КО – $20,9 \pm 10,4$ % (N = 3; P = 3; n = 9; p < 0,05; рис. 10 А, В). Базовое перекисное окисление липидов поддерживают все три изоформы, а присутствие одного β -синуклеина на фоне отсутствия α - и γ -синуклеинов достаточно, чтобы удержать скорость вблизи контроля. Внесение дофамина (10 мкМ) снижало ПОЛ в срезах ДТ (n = 53; p < 0,001), β -КО (n = 9; p < 0,05) и γ -КО (n = 13; p < 0,001).

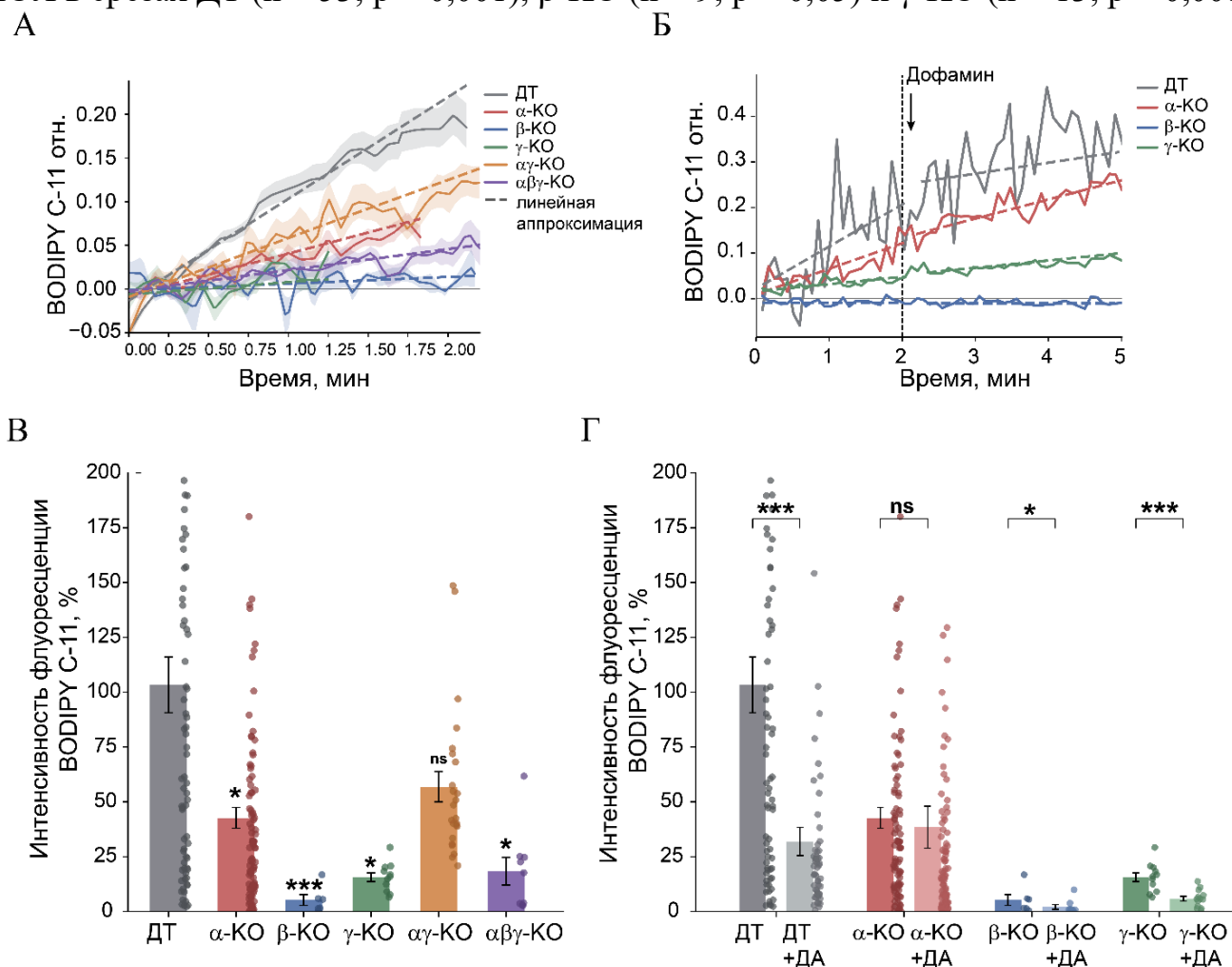


Рисунок 10. Скорость ПОЛ по интенсивности флуоресценции C11-BODIPY в острых срезах коры головного мозга. (А, В) Базальный уровень ПОЛ. (Б, Г) ПОЛ после добавки 10 мкМ дофамина. Точки на графиках – n. ДТ=100%. Линейная смешанная модель с поправкой Холма. *p < 0,05, ***p < 0,001 (Fedulina et al., 2026b)

Базовый уровень кальция в нейронах и астроцитах. Базовый уровень внутриклеточной концентрации кальция в нейронах и астроцитах относится к ключевым характеристикам клеточного кальциевого гомеостаза. В нейронах статистически значимого изменения $[Ca^{2+}]_i$ не регистрировалось. В астроцитах он был снижен только при тройном нокауте ($\alpha\beta\gamma$ -КО 69 ± 5 %; N = 4; P = 11; n = 42; p < 0,05; рис. 11 А); одиночные нокауты оставались близки к ДТ (Астроциты: ДТ N=6, P=10, n=76; α -КО N=4, P=18, n=98; β -КО N=6, P=6, n=61; γ -КО N=4, P=13, n=58; $\alpha\beta\gamma$ -КО N=4, P=11, n=42. Нейроны: ДТ N=6, P=10, n=83; α -КО N=4, P=18, n=120; β -КО N=6, P=6, n=39; γ -КО N=4, P=11, n=72; $\alpha\beta\gamma$ -КО N=4, P=12, n=55; рис. 11).

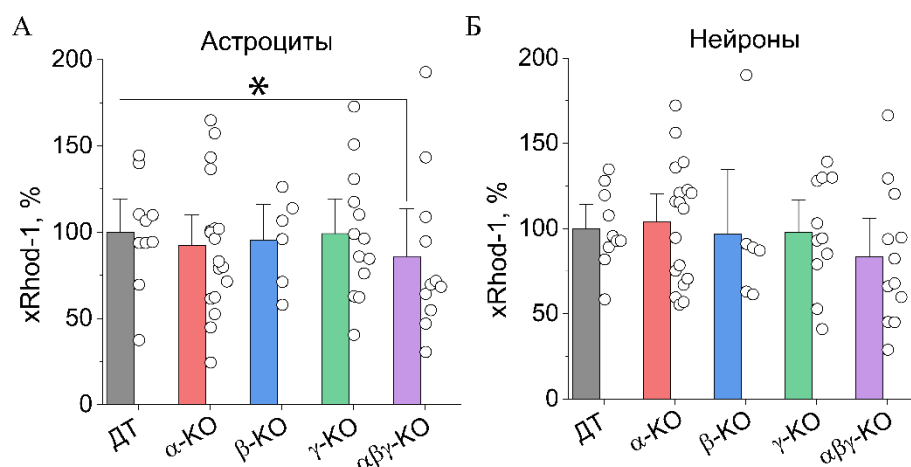


Рисунок 11. Базовый $[Ca^{2+}]_i$ в срезах коры головного мозга. (А) Астроциты. (Б) Нейроны. Точки на графиках – Р. ДТ=100%. Линейная смешанная модель с поправкой Холма. *p < 0,05 (Fedulina et al., 2026a)

Дофамин-индуцированный кальциевый сигнал нейронов. Установлено, что добавка экзогенного дофамина (50 мкМ) повышала уровень $[Ca^{2+}]_i$ в нейронах ДТ (N = 6, P = 13, n = 119). Амплитуда дофамин-индуцированного кальциевого ответа была снижена при α -КО (α -КО $65,5 \pm 3,7$ %; N = 4; P = 21; n = 159; p < 0,01), γ -КО ($54,5 \pm 3,3$ %; N = 4; P = 16; n = 97; p < 0,001) и $\alpha\beta\gamma$ -КО ($45,6 \pm 5,1$ %; N = 4; P = 11; n = 33; p < 0,001) и повышена при β -КО ($134,6 \pm 11,7$ %; N = 6; P = 6; n = 46; p < 0,05; рис. 12) по сравнению с ДТ. Полученные результаты показывают, что α - и γ -синуклеины выступают в качестве позитивных модуляторов дофамин-индуцированной кальциевой сигнализации, поддерживая дофамин-индуцированный кальциевый ответ нейронов, тогда как β -синуклеин выступает в роли негативного модулятора, ограничивая его амплитуду. Стоит отметить, что, несмотря на различия в амплитуде дофамин-индуцированного кальциевого сигнала, его форма у всех генотипов была сходной, что предполагает общность механизмов. Снижение ответа при α -КО и γ -КО не объясняется опустошением кальциевых депо: покоящийся $[Ca^{2+}]_i$ нейронов при этих нокаутах не отличался от ДТ. Более вероятна перестройка дофаминовой передачи на уровне D1-подобных рецепторов или моноаминового транспортера. Она может затрагивать G-белок-сопряженный каскад cAMP/PKA и Ca^{2+} /CaMK, захват дофамина и удержание D1-подобных рецепторов в липидных доменах (Surmeier et al., 1995), где локализуются синуклеины. Повышение ответа при β -КО соответствует ограничивающей роли этой изоформы, в том числе через регуляцию захвата дофамина синаптическими везикулами (Ninkina et al., 2021). Вклад двух α - и γ -изоформ перекрывает ограничение со стороны β -синуклеина, поскольку при тройном нокауте амплитуда ниже, чем при одиночных α -КО и γ -КО.

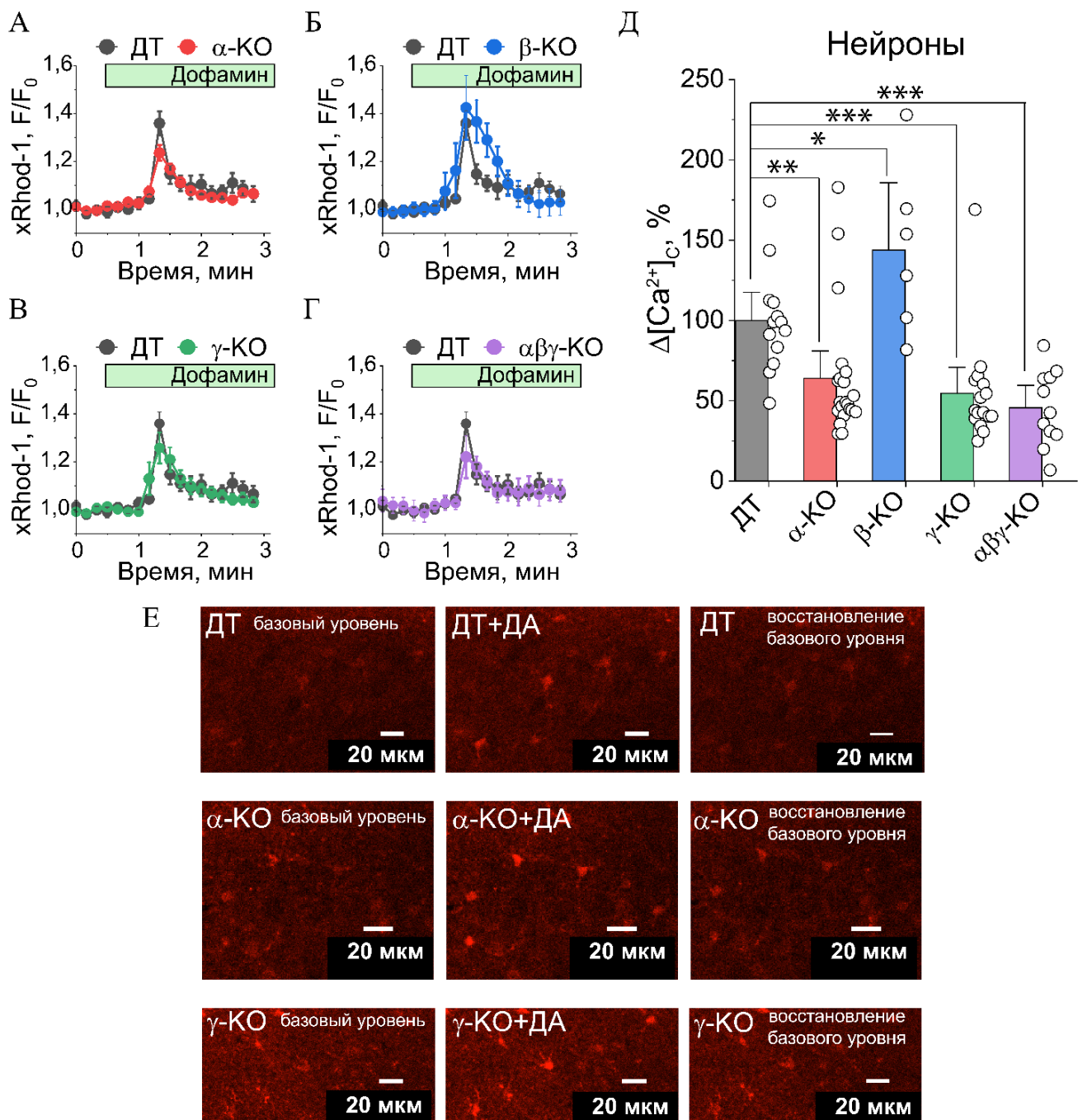
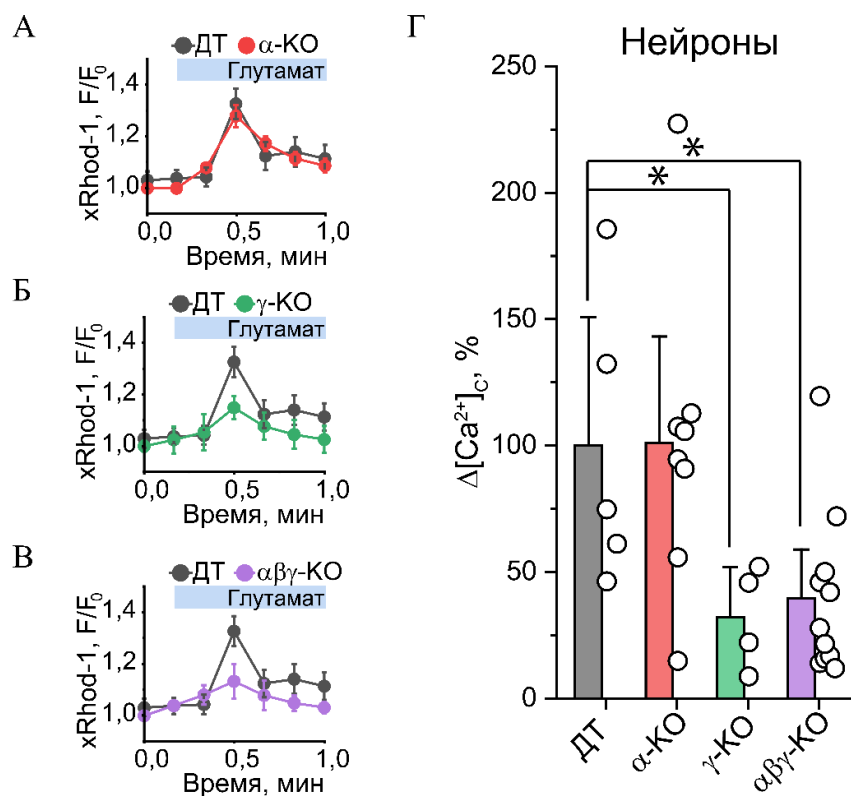


Рисунок 12. Дофамин-индуцированный кальциевый сигнал нейронов в срезах коры головного мозга. (А-Г) Репрезентативные кривые. (Д) Амплитуда дофамин-индуцированного кальциевого сигнала в нейронах. (Е) Репрезентативные конфокальные изображения. Точки на графиках – Р. Амплитуда F/F_0 . ДТ=100%. Линейная смешанная модель с поправкой Холма. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (Fedulina et al., 2026a)

Глутамат-индуцированный кальциевый сигнал нейронов. Глутамат – главный нейромедиатор центральной нервной системы, поэтому любые изменения кальциевых ответов на глутамат могут отражать различия в общей передаче нейронного сигнала (Hansen et al., 2021). Было показано, что добавка физиологической концентрации глутамата (10 мкМ) вызывала типичный ответ в

нейронах острых срезов мышей ДТ (N = 5, P = 5, n = 12). При α -КО амплитуда от контроля не отличалась ($93,1 \pm 11,7$ %; N = 4; P = 8; n = 26). При γ -КО она падала до $34,4 \pm 6,5$ % (N = 4; P = 4; n = 9; $p < 0,05$), при $\alpha\beta\gamma$ -КО – до $28,7 \pm 6,0$ % (N = 4; P = 11; n = 16; $p < 0,05$; рис. 13). 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.



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). В нейронах ДТ дофамин, внесенный до глутамата, ослаблял последующий глутаматный ответ до $32,2 \pm 2,7$ % от ответа на один глутамат (N = 6; P = 9; n = 57; $p < 0,001$). То же подавление сохранялось при α -КО ($25,3 \pm 2,4$ %; N = 4; P = 13; n = 40; $p < 0,0001$). Однако в нейронах γ -КО и $\alpha\beta\gamma$ -КО этот эффект исчезал – предварительная инкубация с дофамином не вызывала снижения амплитуды кальциевого сигнала в ответ на глутамат (рис. 14 Б, Г). Эти результаты указывают на то, что у γ - и $\alpha\beta\gamma$ -КО нейронов ослаблена способность дофамина подавлять глутамат-индуцированный кальциевый ответ через D2-рецепторы по сравнению с нейронами дикого типа или α -КО нейронами. Поскольку у этих генотипов ослаблен и сам глутаматный ответ, γ -синуклеин нужен и для проведения сигнала через ионотропные и метаботропные рецепторы, и для его дофаминовой модуляции. 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 возможно поддерживает Ca^{2+} гомеостаз через митохондриальный кальциевый транспорт. При этом у γ -синуклеина есть дополнительная роль в функционировании D2-подобных рецепторов, которая пока недостаточно изучена.

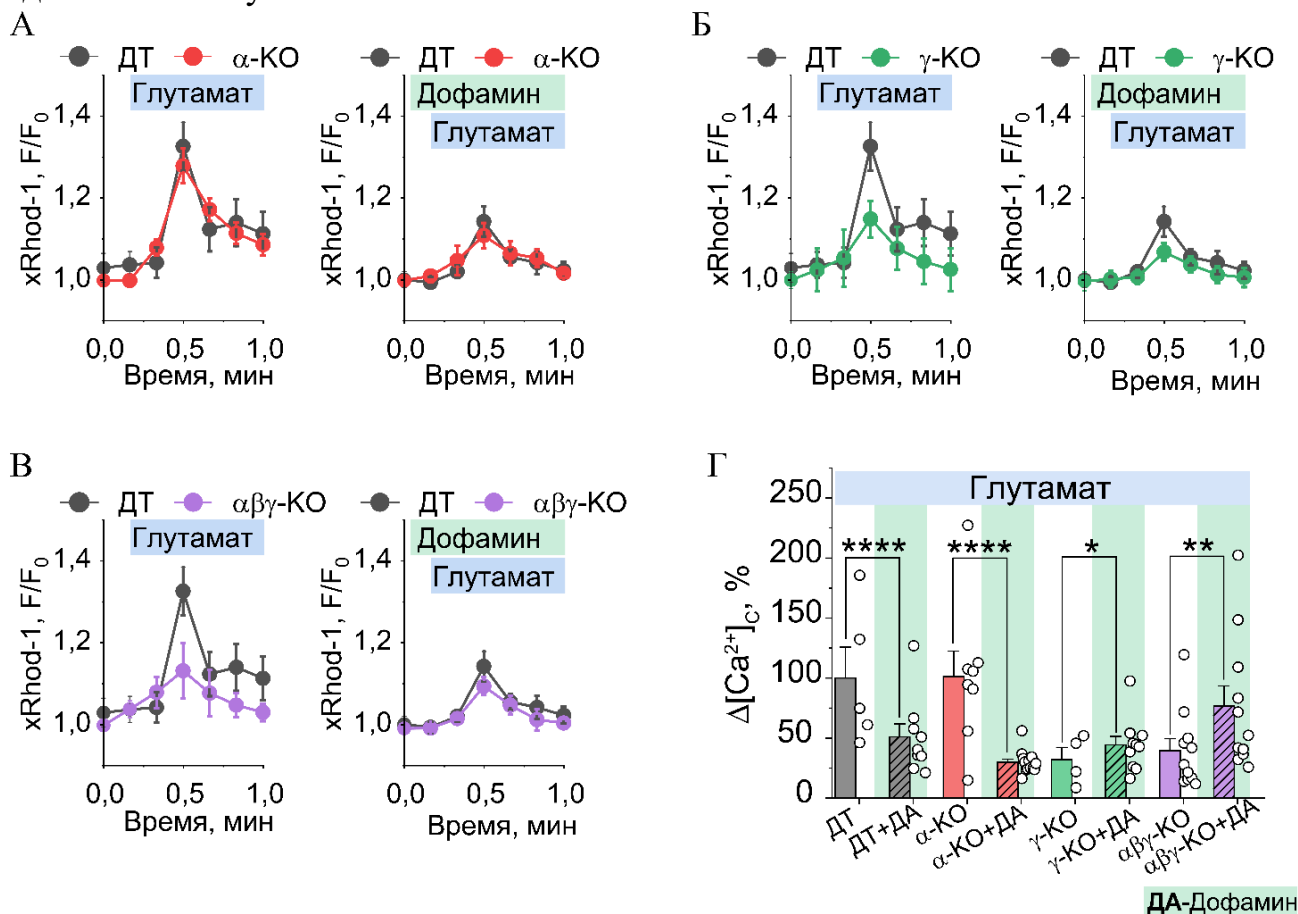


Рисунок 14. – Модуляция глутамат-индуцированного кальциевого сигнала нейронов дофамином в острых переживающих срезах мозга. (А-В) Репрезентативные кривые. (Г) Амплитуда кальциевого сигнала в нейронах. ДТ N=5, P=5, n=12; α-KO N=4, P=8, n=26; γ-KO N=4, P=4, n=9; αβγ-KO N=4, P=11, n=16. ДТ+ДА N=6, P=9, n=57; α-KO+ДА N=4, P=13, n=40; γ-KO+ДА N=4, P=10, n=27; αβγ-KO+ДА N=4, P=11, n=16. Точки на графиках – P. ДТ=100 %. Линейная смешанная модель. *p < 0,05, **p < 0,01, ****p < 0,0001 (Fedulina et al., 2026a)

Дофамин-индуцированный кальциевый сигнал астроцитов. В астроцитах дофамин-индуцированный кальциевый сигнал является преимущественно рецептор-независимым и запускается за счет образования пероксида водорода моноаминоксидазой (Vaarman et al., 2010). инкубация срезов мозга с ингибитором MAO селегилином (20 мкМ) блокировала дофамин-индуцированный кальциевый сигнал в астроцитах (рис. 15 Б), но не в нейронах. Амплитуда астроцитарного дофамин-индуцированного ответа у β-KO, γ-KO и αβγ-KO не отличалась от ДТ. При α-KO она была повышена: 183 ± 24 % (N = 4; P = 15; n = 40; p < 0,05; рис. 15 В, Ж). α-Синуклеин ограничивает MAO-зависимый кальциевый ответ астроцитов. Такой ответ можно объяснить повышенной активностью MAO в клетках с α-KO, активность

которой сохраняется в клетках этого генотипа. Пероксид водорода, образующийся при метаболизме дофамина, окисляет мембранные липиды, активирует фосфолипазу С и через IP_3 высвобождает Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума (Domijan et al., 2014). Это подтверждает данные о зависимости экспрессии и активности MAO-B от наличия α -синуклеина (Krayushkina et al., 2025).

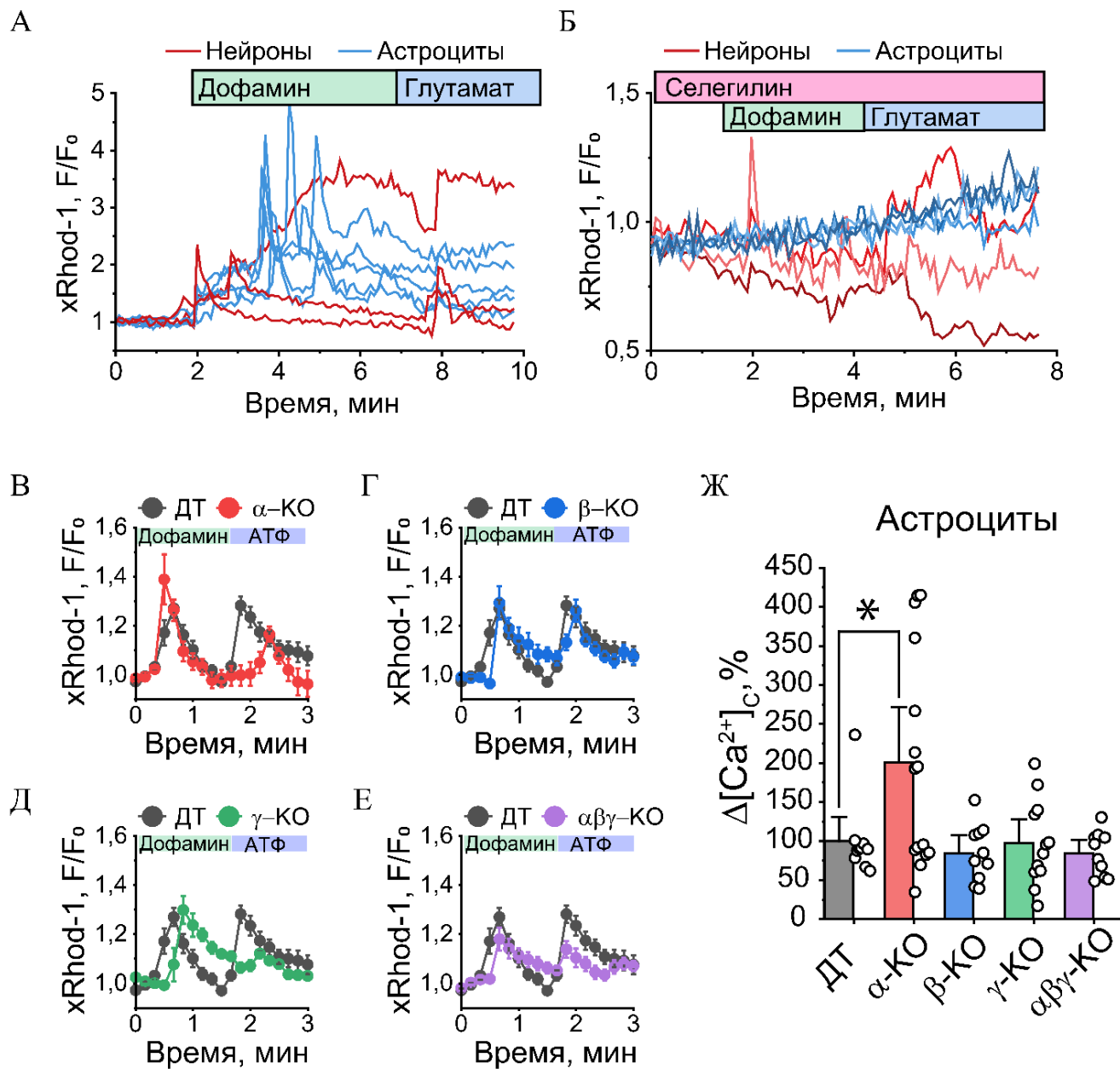


Рисунок 15. Дофамин-индуцированный кальциевый сигнал астроцитов в острых переживающих срезах мозга. (А-Е) Репрезентативные кривые. (Ж) Амплитуда кальциевого сигнала, индуцированного дофамином, в астроцитах. ДТ: N = 6, P = 10, n = 52; α -КО: N = 4, P = 15, n = 40; β -КО: N = 6, P = 10, n = 66; γ -КО: N = 4, P = 12, n = 27; $\alpha\beta\gamma$ -КО: N = 4, P = 10, n = 15. Точки на графиках – P. F/F₀. ДТ = 100 %. Линейная смешанная модель с поправкой Холма. *p < 0,05 (Fedulina et al., 2026a)

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-сигнализации 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 С, 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 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. – 2026a. – 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.