

**Институт физиологически активных веществ
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Федерального исследовательского центра проблем химической физики и
медицинской химии
Российской академии наук**

На правах рукописи



Суханова Юлия Сергеевна

**РОЛЬ НЕДОСТАТОЧНОСТИ БЕЛКА ГАММА-СИНУКЛЕИНА В
НАРУШЕНИИ ФУНКЦИЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ, СВЯЗАННЫХ С
НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИЕЙ**

1.5.4. – Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Кухарский Михаил Сергеевич

Черноголовка – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	7
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1 Семейство синуклеинов: структура и свойства	13
1.1.1 Открытие синуклеинов.....	13
1.1.2 Общая структурная организация и физико-химические свойства синуклеинов	15
1.1.3 Экспрессия и локализация синуклеинов в клетках и тканях.....	17
1.2. Физиологические функции синуклеинов	18
1.3 Синуклеины и нейродегенеративные заболевания	21
1.3.1 Заболевания, связанные с α -синуклеинопатией.....	21
1.3.2 Роль β - и γ -синуклеинов в патологии.....	26
1.4 Глаукома как нейродегенеративное заболевание	28
1.5 Синуклеинопатия в периферических тканях	37
1.6 Биомаркеры нейродегенеративных заболеваний.....	43
1.6.1 Необходимость ранней диагностики НДЗ.....	43
1.6.2 Основные типы биомаркеров нейродегенерации	44
1.6.3 Физиологические, офтальмологические и иммунологические параметры в качестве биомаркеров нейродегенерации	49
1.7 Нокаутные модели как инструмент анализа функции синуклеинов	54
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	57
2.1 Экспериментальные животные.....	57
2.2 Клинический материал	57
2.3 Поведенческое тестирование	66
2.4 Оценка выживаемости животных.....	68

2.5 Вестерн-блот анализ синаптических белков	69
2.6 Иммуногистохимический анализ	69
2.6.1 Подготовка серий срезов для морфометрического анализа	70
2.6.2 Иммуногистохимическое окрашивание	71
2.6.3 Микроскопия и подсчёт дофаминергических нейронов	72
2.7 Оценка ВГД	73
2.8 Определение активности $\alpha 2$ -МГ и общего белка в слёзной жидкости .	74
2.9 Выявление аутоантител к γ -синуклеину	74
2.10 Определение содержания γ -синуклеина в слёзной жидкости и плазме крови	75
2.11 Статистическая обработка данных	76
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	77
3.1 Фенотипические проявления дефицита γ -синуклеина у нокаутных мышей	77
3.1.1 Продолжительность жизни мышей с дефицитом γ -синуклеина	77
3.1.2 Изменения моторных функций	78
3.1.3 Изменения тревожноподобного поведения и когнитивных показателей	82
3.2 Биохимические и морфологические характеристики нервной системы при дефиците γ -синуклеина	86
3.2.1 Содержание синаптических белков в стриатуме и коре головного мозга	87
3.2.2 Морфометрический анализ дофаминергических ядер среднего мозга	90
3.3 Маркеры нарушения функции γ -синуклеина в тканях глаза и биологических жидкостях	95

3.3.1 Изменение ВГД у γ -КО мышей при фармакологическом воздействии	95
3.3.2 Общее содержание белка и активность $\alpha 2$ -МГ в слёзной жидкости мышей нокаутных по γ -синуклеину	102
3.3.3 Аутоантитела к γ -синуклеину в сыворотке крови пациентов с глаукомой	105
3.3.4 Содержание γ -синуклеина и активность $\alpha 2$ -МГ в слёзной жидкости и плазме крови пациентов с болезнью Альцгеймера	111
3.4 Обсуждение результатов	114
3.4.1 Функциональная роль γ -синуклеина в нервной системе	114
3.4.2 Биохимические изменения при дефиците γ -синуклеина	120
ВЫВОДЫ	125
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	126

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- БА – болезнь Альцгеймера
БП – болезнь Паркинсона
ВГД – внутриглазное давление
ВОП – вентральная область покрышки
ГЦВ – глиальные цитоплазматические включения
ДАБ – 3,3'-диаминобензидин
ДТЛ – деменция с тельцами Леви
ИЛ – интерлейкин
ИФА – иммуноферментный анализ
МСА – множественная системная атрофия
НДЗ – нейродегенеративные заболевания
НП – неприменимо
ПНС – периферическая нервная система
ПОУГ – первичная открытоугольная глаукома
СМЖ – спинномозговая жидкость
СРБ – С-реактивный белок
ТГ – тирозингидроксилаза
ФНО- α – фактор некроза опухоли α
ФСБ – фосфатно-солевой буфер
ЦНС – центральная нервная система
ЧС – чёрная субстанция
ЭЭГ – электроэнцефалография
 α 2-МГ – α 2-макроглобулин
 α -КО – мышцы с нокаутом α -синуклеина
 $\alpha\beta$ -КО – мышцы с двойным нокаутом α - и β -синуклеина
 $\alpha\beta\gamma$ -КО – мышцы с тройным нокаутом α -, β - и γ -синуклеина
 γ -КО – мышцы с нокаутом γ -синуклеина
АМРН – амфифизин
BAPN – N-бензоил-DL-аргинин-п-нитроанилид

ECL – усиленная хемилюминесценция

GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок

HRP – пероксидаза хрена

KO – нокаут

NAC – неамилоидный компонент амилоида

NfL – лёгкие цепи нейрофиламентов

OD – правый глаз

OS – левый глаз

OU – оба глаза

PVDF – поливинилиденфторид

REM – фаза быстрого сна

SDS-PAGE – электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия

SNARE – комплекс белков, обеспечивающий слияние мембран при экзоцитозе

SYP – синаптофизин

Syn IIa – синапсин IIa

TMB – тетраметилбензидин

WT – дикий тип

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Синуклеины – высоко консервативные цитозольные белки, участвующие в регуляции синаптической передачи. Семейство состоит из трех гомологичных белков - α -, β - и γ -синуклеина. Все три члена семейства в норме широко представлены в нервной системе и имеют перекрывающиеся паттерны экспрессии [1]. Несмотря на сходство в строении трех белков, между ними существуют функциональные различия, которые остаются не до конца понятными [2]. Белок α -синуклеин активно исследуется в связи с его вовлеченностью в патогенез нейродегенеративных заболеваний (НДЗ), в частности он является основным компонентом патологических белковых отложений – телец Леви при болезни Паркинсона, деменции с тельцами Леви, а также обнаруживается в сенильных бляшках при болезни Альцгеймера [3, 4]. Отложения γ -синуклеина в нервной системе выявляются при боковом амиотрофическом склерозе и деменции с тельцами Леви. Помимо этого, γ -синуклеин связан с опухолевой трансформацией клеток [5, 6]. Для β -синуклеина принято считать, что он не склонен к патогенной агрегации с образованием отложений по причине отсутствия в его структуре NAC-домена. Однако имеющиеся данные указывают на то, что он может влиять на агрегацию α -синуклеина, подавляя ее, а также, наряду с другими синуклеинами, участвует в регуляции обмена дофамина в синапсах [7, 8].

Исследования нокаутных по генам синуклеинов мышей показали, что их выключение не препятствует нормальному раннему развитию и выживанию животных. Однако у нокаутных животных выявлялись возраст-зависимые изменения моторных функций и обмена дофамина [2]. Постепенное накопление сначала малозаметных, но все больше проявляющихся со временем, функциональных изменений в нервной системе является одним из характерных признаков старения. Поэтому нарушения, связанные с потерей функций одного или нескольких синуклеинов и слабо проявляющиеся у молодых мышей, могут становиться очевидными у стареющих животных.

Такой механизм, как предполагается, реализуется при нейродегенеративных заболеваниях, которые характеризуются истощением функционального пула синуклеинов из-за их агрегации и «запираания» в составе патологических включений [9, 10].

Несмотря на то, что о способности γ -синуклеина агрегировать и участвовать в развитии нейродегенеративных патологий известно давно, его функциональное значение для нервной системы в норме остается недостаточно изученным [11, 12]. Изменения в распределении или количестве белка γ -синуклеина в клетках нервной системы или в других тканях также могут служить биомаркером развития НДЗ. Повышенное содержание γ -синуклеина в спинномозговой жидкости отмечено у пациентов с болезнью Альцгеймера и Крейтцфельда-Якоба [13]. При глаукоме описаны изменения экспрессии и локализации γ -синуклеина в зрительном нерве [14]. Однако остается неясным, как нарушение функций γ -синуклеина в центральной нервной системе влияет на периферические физиологические показатели организма, и можно ли определить наличие таких нарушений неинвазивными методами.

Цель исследования

Установление роли γ -синуклеина в функционировании нервной системы и развитии нейродегенеративных процессов на основании экспериментального моделирования нарушения его функций у лабораторных животных и анализа биологических жидкостей пациентов.

Задачи исследования

1. Оценить влияние потери функции (генетического нокаута) γ -синуклеина в сравнении с другими членами семейства синуклеинов на продолжительность жизни мышей;
2. Охарактеризовать изменения моторных функций и поведенческих реакций у мышей с инактивацией одного, двух и трёх генов синуклеинов;

3. Оценить влияние дефицита γ -синуклеина на содержание синаптических белков в коре и стриатуме, а также на количество дофаминергических нейронов в чёрной субстанции и вентральной области покрышки;
4. Проанализировать влияние нокаута γ -синуклеина на регуляцию внутриглазного давления и активность $\alpha 2$ -макроглобулина в слёзной жидкости у мышей;
5. Определить наличие аутоантител к γ -синуклеину в крови пациентов с глаукомой;
6. Измерить содержание γ -синуклеина в слёзной жидкости и плазме крови пациентов с болезнью Альцгеймера.

Научная новизна работы

В рамках данной научной работы впервые был подробно описан поведенческий фенотип мышей с нокаутом γ -синуклеина и проведено сравнение с животными, нокаутными по двум другим или всем трём членам семейства, а также с животными дикого типа линии C57BL/6J. Также впервые было обнаружено, что отсутствие γ -синуклеина ассоциировано с меньшей продолжительностью жизни у мышей. Примечательно, что у нокаутных животных не наблюдалось изменений в уровне синаптических и везикулярных маркеров, а также в количестве дофаминергических нейронов среднего мозга. Это указывает на то, что γ -синуклеин участвует в тонкой регуляции и оптимизации работы нервной системы. Была доказана возможность регистрации нарушения функций γ -синуклеина с использованием периферических биомаркеров, источником которых может выступать слеза или физиологические показатели, связанные с регуляцией внутриглазного давления. Полученные данные вносят вклад в формирование фундаментальных знаний о роли синуклеинов, и в частности γ -синуклеина, в функционировании нервной системы и их значении в развитии патологических состояний.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Отсутствие белка γ -синуклеина приводит к специфическим нарушениям моторных функций и поведенческих реакций у мышей, нокаутных по гену *Sncg*, а также снижает их продолжительность жизни;
2. Изменений в дофаминергических структурах среднего мозга, а также в распределении синаптических маркеров у нокаутных по γ -синуклеину мышей не обнаруживается, что указывает на функциональный характер выявленных нарушений;
3. В качестве признаков, связанных с потерей функции γ -синуклеина у мышей, определяются нарушение регуляции внутриглазного давления и снижение активности $\alpha 2$ -макроглобулина в слёзной жидкости;
4. Снижение уровня γ -синуклеина и связанные с этим нарушения могут являться признаками наличия нейродегенеративного процесса у человека. Так, у части пациентов с глаукомой в крови выявляются аутоантитела к γ -синуклеину, а у пациентов с болезнью Альцгеймера наблюдается снижение концентрации γ -синуклеина в слёзной жидкости и снижение активности $\alpha 2$ -макроглобулина в крови.

Теоретическая и практическая значимость работы

Основное значение полученных результатов заключается в установлении специфической функциональной роли γ -синуклеина в регуляции моторных функций и тревожноподобного поведения, что имеет значение для понимания механизмов развития различных патологий нервной системы. Отдельное значение имеет выявленное впервые влияние потери функции γ -синуклеина на продолжительность жизни мышей, что говорит о значимости наблюдаемых нарушений для жизнедеятельности всего организма. Обнаружение аутоантител к γ -синуклеину у части пациентов с глаукомой, снижение уровня γ -синуклеина в слёзной жидкости пациентов с БА, а также влияние потери его функции на регуляцию внутриглазного давления и уровень $\alpha 2$ -макроглобулина в слёзной жидкости у мышей свидетельствует о перспективности использования данных показателей в

качестве потенциальных биомаркеров для НДЗ, в развитии которых участвует γ -синуклеин. Полученные результаты могут послужить основой для разработки диагностических тест-систем. Подробное описание поведенческих, биохимических и гистологических параметров у мышей разного возраста с одиночным, двойным и тройным нокаутом генов синуклеинов может быть использовано в качестве экспериментальной платформы для доклинического тестирования новых нейропротекторных препаратов.

Апробация работы

Результаты работы представлены на российских и международных конференциях в виде устных и стендовых докладов на ежегодных конференциях молодых ученых ИФАВ РАН (Черноголовка, 2020–2024 гг), «Геномика 21 века – от исследования геномов к генетическим технологиям» (онлайн-конференция, 2021 г), 28-я Международная мультидисциплинарная конференция по нейронаукам и биологической психиатрии «Стресс и поведение» (Санкт-Петербург, 2021 г), European Congress of Neuropsychopharmacology (Lisbon, 2021; Vienna, 2022), «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2022 г), Актуальные проблемы биомедицины (Санкт-Петербург, 2022-2023 гг), «Synuclein meeting» (Leuven, 2022), XIX Международный междисциплинарный конгресс Нейронаука для медицины и психологии (Судак, 2023 г), ХимБиоSeasons (Калининград, 2025 г).

Публикации

Результаты работы опубликованы в 19 печатных работах, в том числе 4 статьях в изданиях, рекомендованных ВАК, а также в 15 тезисах докладов научных конференций.

Личный вклад автора

Автором лично были проведены все поведенческие тесты, биохимический и иммуногистохимический анализы, а также описание и оформление всех полученных результатов. Анализ образцов слёзной жидкости и сыворотки крови от пациентов с глаукомой и болезнью

Альцгеймера, а также от здоровых людей проводился совместно с сотрудниками НМИЦ ГБ им. Гельмгольца.

Структура и объём работы

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, полученных результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 146 страницах, иллюстрирована 24 рисунками и 2 таблицами. Список цитируемой литературы включает 290 наименований.

Работа выполнялась в соответствии с планами исследовательских работ лаборатории Молекулярно-генетических механизмов нейродегенерации ИФАВ ФИЦ ПХФ и МХ РАН (рук. д-р. биол. наук Кухарский М.С.) в рамках государственного задания № FFSG-2024-0023.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Семейство синуклеинов: структура и свойства

1.1.1 Открытие синуклеинов

Синуклеины изучаются уже несколько десятилетий, главным образом в связи с их участием в пресинаптических процессах и нейродегенеративных заболеваниях. При этом физиологические функции этих белков остаются не до конца понятными. Первые сведения о синуклеинах получены при исследовании электрического органа ската *Torpedo californica* [15]. Первоначальная задача этих работ состояла не в поиске новых белков, а в изучении молекулярных механизмов синаптической передачи, прежде всего процессов упаковки нейромедиатора в везикулы, его хранения и последующего высвобождения в синаптическую щель. Выбор модели был методологически оправдан: электрические органы скатов отличаются чрезвычайно высоким содержанием синаптических контактов, что существенно облегчало выделение везикул и ассоциированных с ними белков. Ещё до прямого описания синуклеина были получены антисыворотки против белков холинергических синаптических везикул, и именно на этом экспериментальном фоне стало возможным выделение и последующая характеристика нового нейрон-специфического белка [16].

В 1988 г. опубликована работа, в которой впервые определена последовательность одного из таких белков и предложено название «synuclein» – из-за его одновременной локализации в пресинаптических окончаниях и в ядрах клеток. Позднее ядерная локализация не подтвердилась, что, по-видимому, связано с неспецифическим окрашиванием, однако сам термин к тому моменту уже закрепился в литературе [15]. Таким образом, термин «синуклеин» закрепился в литературе раньше, чем были уточнены представления о внутриклеточной локализации этого белка.

Второй член семейства, позднее названный β -синуклеином, был открыт в начале 1990-х годов при исследовании специфичных для нервной ткани

белков головного мозга быка. Сначала он фигурировал как «14 кДа-белок», затем как фосфонейропротеин 14, поскольку было показано, что он существует в фосфорилированной форме [17, 18, 19]. Только после установления его высокой гомологии с уже известным α -синуклеином было предложено современное название – β -синуклеин [20]. При этом первоначально β -синуклеин рассматривался как белок нормальной нервной ткани, а не как фактор, связанный с нейродегенеративными заболеваниями.

Открытие γ -синуклеина, напротив, изначально связано не с нейробиологией, а с онкологией. Этот белок впервые описан как продукт гена *BCSG1*, экспрессия которого возрастала в опухолевых клетках молочной железы и потому рассматривалась как потенциальный маркер ранних стадий канцерогенеза [21]. Позднее этот же белок был найден в нервной ткани и получил название *persyn*, и только позже он был отнесен к семейству синуклеинов [22, 23]. Уже в ранних исследованиях было отмечено, что γ -синуклеин отличается от α - и β -синуклеинов не только спектром экспрессии, но и, вероятно, функциональной специализацией: если первые два белка преимущественно ассоциированы с центральной нервной системой (ЦНС) и пресинаптическими структурами, то γ -синуклеин в большей степени связан с периферической нервной системой (ПНС) и с ненейрональными тканями [23], [7].

Связь α -синуклеина с нейродегенеративными заболеваниями впервые была показана в исследованиях болезни Альцгеймера. Фрагмент белка, соответствующий участку 61–95 аминокислотных остатков, был идентифицирован в амилоидных отложениях в головном мозге пациентов с болезнью Альцгеймера и получил название неамилоидного компонента амилоида, или NAC [4]. Позднее α -синуклеин был обнаружен в составе телец Леви – характерных внутриклеточных белковых включений при болезни Паркинсона и ряде других нейродегенеративных заболеваний [3, 24]. Почти одновременно с этим были обнаружены мутации в гене *SNCA*, ассоциированные с наследственными формами болезни Паркинсона, а позднее

также дупликации, трипликации и регуляторные варианты этого локуса, связанные с риском развития паркинсонизма [25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33]. После этих работ синуклеины стали рассматривать не только как белки, участвующие в пресинаптической регуляции, но и как факторы, связанные с развитием нейродегенеративных заболеваний.

Параллельно с развитием представлений о патологической роли α -синуклеина расширялись и знания о его физиологических функциях. В частности, ещё в 1990-е годы было показано, что уровень экспрессии родственного белка у птенцов зебровых амадин (*Taeniopygia guttata*) изменяется в критический период обучения пению, что связало синуклеины с нейропластичностью и процессами обучения [34]. В дальнейшем было установлено, что семейство синуклеинов вовлечено в тонкую настройку пресинаптических процессов, регуляцию везикулярного транспорта, гомеостаз моноаминов и межбелковые взаимодействия в нейронах [35, 36, 37, 38, 39]. В результате синуклеины стали рассматривать не как отдельные нейрональные белки, а как функционально связанное семейство, участвующее в регуляции нейрональных процессов и имеющее значение при развитии нейродегенеративных заболеваний.

1.1.2 Общая структурная организация и физико-химические свойства синуклеинов

Семейство синуклеинов включает три небольших белка – α -синуклеин, β -синуклеин и γ -синуклеин, состоящие соответственно из 140, 134 и 127 аминокислотных остатков [40, 1]. Их кодируют гены *SNCA*, *SNCB* и *SNCG* соответственно [41]. Общей особенностью всех трёх белков является принадлежность к внутренне неупорядоченным белкам, что обеспечивает высокую конформационную пластичность и способность вступать в множественные, часто транзиторные взаимодействия с мембранами и белковыми партнёрами [39]. Такая конформационная пластичность, вероятно, связана как с участием синуклеинов в различных физиологических процессах, так и со склонностью α -синуклеина к патологической агрегации.

На уровне первичной структуры синуклеины демонстрируют выраженное сходство (рис. 1). Для них характерно наличие повторяющихся мотивов KTKEGV, занимающих значительную часть молекулы: у α - и γ -синуклеина описано по семь таких мотивов, у β -синуклеина – шесть [39]. N-концевая область у всех трёх белков высококонсервативна и при взаимодействии с липидными бислоями способна формировать одну или две α -спирали [42, 43]. Напротив, C-концевые участки различаются по длине, заряду и жёсткости, что влияет на растворимость белков и на особенности их межмолекулярных взаимодействий [44, 45, 42, 46]. В случае α -синуклеина именно сочетание подвижной структуры, выраженной мембраносвязывающей способности и особенностей центрального домена создаёт предпосылки для конформационного перехода в агрегированное состояние.

Особое значение имеет центральный NAC-домен. Для α -синуклеина этот участок играет принципиальную роль в образовании β -складчатых структур и в формировании амилоидоподобных агрегатов; наиболее критическим для агрегации считается фрагмент 71–82, а весь NAC-регион охватывает аминокислотные остатки 61–95 [4, 47]. β -синуклеин лишён части NAC-региона и поэтому рассматривается как неамилоидогенный гомолог α -синуклеина и естественный отрицательный регулятор его агрегации [47, 7, 48, 49]. γ -синуклеин занимает промежуточное положение: он способен к агрегации в определённых условиях, однако по общему амилоидогенному потенциалу уступает α -синуклеину [50, 51, 39]. Изменения аминокислотной последовательности в центральном участке синуклеинов, даже относительно небольшие, могут существенно влиять на свойства этих белков, включая способность к агрегации.

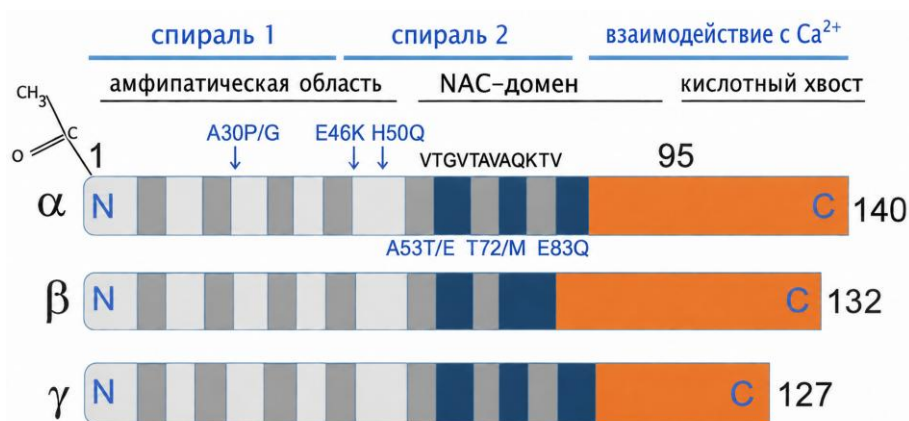


Рисунок 1. Схема структурной организации синуклеинов и аминокислотных замен, связанных с заболеваниями. Участки семи N-концевых повторов (мотив KTKEGV) показаны тёмно-серыми полосами в α - и γ -синуклеинах; в β -синуклеине присутствует шесть таких повторов. Показаны N-концевой амфипатический участок, центральный гидрофобный НАС-домен и отрицательно заряженный C-концевой участок. Некоторые миссенс-мутации, predisposing к заболеваниям, обозначены синим над и под схемой α -синуклеина. [39]

1.1.3 Экспрессия и локализация синуклеинов в клетках и тканях

Экспрессия разных синуклеинов в органах и тканях частично перекрывается. Так, α -синуклеин наиболее широко представлен в нейронах ЦНС, а также обнаруживается в эритроцитах, его экспрессия возрастает в ходе развития ЦНС, что согласуется с участием этого белка в синаптогенезе и созревании нейронных сетей [40]. β -Синуклеин составляет значительную долю от общей экспрессии членов семейства на уровне мРНК у человека и обнаруживается не только в нейронах ЦНС, но и в обонятельном эпителии, скелетных мышцах, астроцитах и миелине [7]. γ -Синуклеин, в свою очередь, характерен для нейронов ПНС и жировой ткани, а также нередко обнаруживается в опухолях различного происхождения [21, 22, 23, 11, 7]. Различия в паттернах экспрессии указывают на то, что функции синуклеинов могут зависеть не только от их общих молекулярных свойств, но и от типа клеток и тканей, в которых они экспрессируются.

На сегодняшний день синуклеины рассматриваются как белки, характерные преимущественно для позвоночных животных: их ортологи не выявлены у беспозвоночных и ланцетника, тогда как у круглоротых и других ранних позвоночных уже обнаруживаются гомологи всех трёх синуклеинов

[52, 37]. При этом у разных групп позвоночных состав семейства может варьировать: у ряда костистых рыб обнаруживаются альтернативные комбинации синуклеинов и дополнительные изоформы, тогда как у лопастепёрых рыб, включая целаканта, представлен «классический» набор из трёх белков, причём α - и β -синуклеины демонстрируют особенно высокую степень гомологии с человеческими [52]. Таким образом, появление синуклеинов можно связать с усложнением нервной регуляции у позвоночных.

Вместе с данными о структурной организации эти сведения показывают, что синуклеины являются эволюционно консервативным семейством белков позвоночных, представители которого сохраняют общие молекулярные свойства, но различаются по структуре, экспрессии и склонности к агрегации. Эти особенности важны как для анализа физиологических функций синуклеинов, так и для понимания их участия в патологических процессах.

1.2. Физиологические функции синуклеинов

Имеющиеся данные указывают на то, что синуклеины не являются строго необходимыми для раннего развития и выживания животных в стандартных условиях, однако важны для нормальной работы нервной системы. Так, даже инактивация всех трёх генов семейства у животных не приводит к ранней летальности или грубым нарушениям развития, но при более детальном анализе у нокаутов выявляются возраст-зависимые функциональные изменения [2, 9]. Эти данные позволяют рассматривать синуклеины как регуляторные белки, роль которых становится особенно заметной при старении или повышенной функциональной нагрузке на нервную систему.

Наиболее подробно изучена физиологическая роль α -синуклеина. Он локализуется преимущественно в пресинаптических окончаниях и участвует в регуляции пула синаптических пузырьков, их мобилизации и перераспределения [36]. Одним из наиболее изученных механизмов действия α -синуклеина является его участие в сборке и стабилизации SNARE-

комплекса через взаимодействие с белком VAMP2/синаптобревином-2, что связывает его с процессами экзоцитоза и высвобождения нейромедиатора [53, 54]. Ранние работы также указывали на роль синуклеинов в регуляции синаптической передачи, а именно транспорте медиаторов, их накоплении в везикулах и слиянии мембран [15].

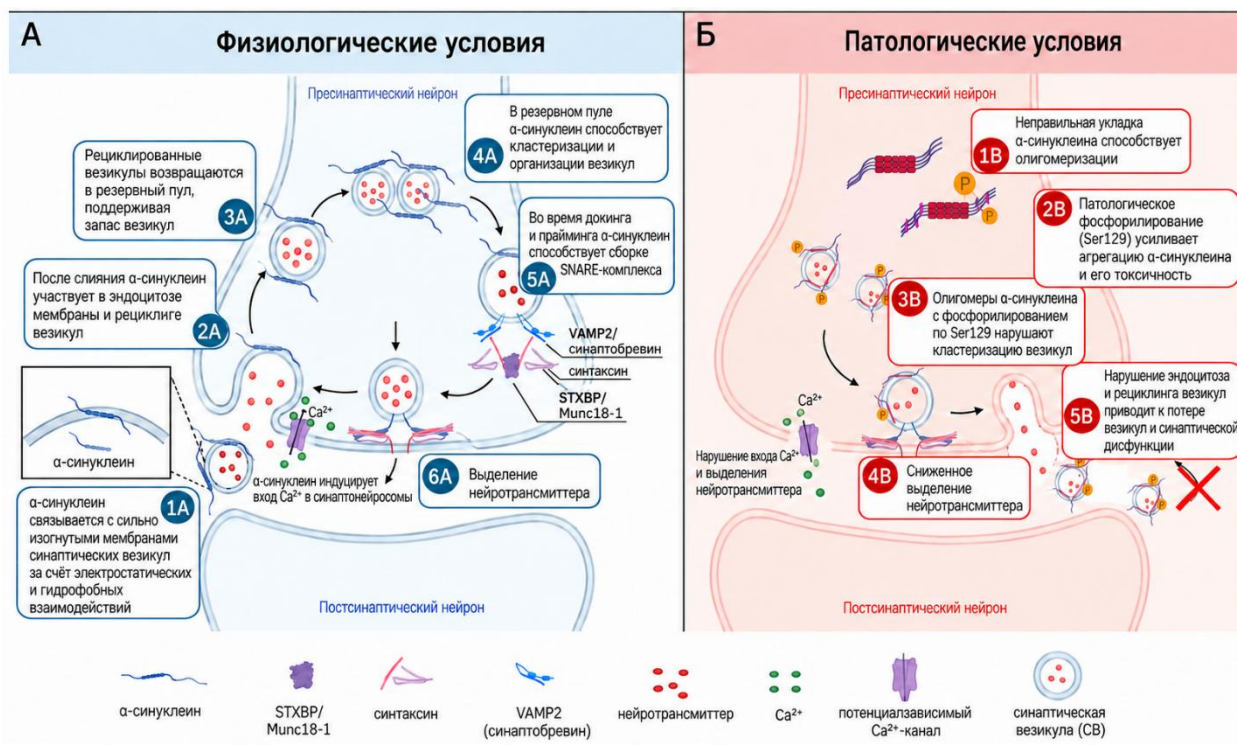


Рисунок 2. Схематическое изображение физиологической и патологической роли α -синуклеина в цикле синаптических везикул. (А) В физиологических условиях α -синуклеин связывается с искривлёнными мембранами везикул, участвует в их эндоцитарном возврате и рециклинге, поддерживает кластеризацию в резервном пуле, а также докинг и прайминг с участием комплекса SNARE перед кальций-зависимым высвобождением нейромедиатора. (Б) При патологическом накоплении и неправильном сворачивании α -синуклеина, включая образование олигомеров и фосфорилирование по Ser129, нарушаются организация везикул, докинг, прайминг, экзоцитоз и эндоцитоз, что может приводить к уменьшению высвобождения нейромедиатора и синаптической дисфункции. [55]

Функции α -синуклеина не ограничиваются собственно экзоцитозом. Показано, что он взаимодействует с компонентами митохондриального аппарата, включая комплексы дыхательной цепи и АТФ-синтазу, участвует в регуляции подвижности митохондрий и митофагии [56, 57, 58]. Помимо этого, α -синуклеин взаимодействует с различными элементами цитоскелета, в том числе с актином, спектринами, тау-белком и микротрубочками [59]. В физиологических условиях эти взаимодействия, вероятно, связаны с

регуляцией внутриклеточного транспорта, а при патологических изменениях могут способствовать дестабилизации цитоскелета. Наконец, для α -синуклеина описано участие в регуляции моноаминергических систем, в том числе взаимодействие с транспортёрами моноаминов и ферментами синтеза дофамина, а также влияние на периферические ткани, включая поджелудочную железу и системы, связанные с метаболизмом глюкозы [35, 60, 39].

β -Синуклеин функционально во многом дублирует α -синуклеин, но при этом обладает собственными особенностями. Его рассматривают как белок-шаперон, участвующий в процессах правильного сворачивания белков, в регуляции дофаминергической nigrostriарной системы, в сигнальных путях апоптоза и в системах белковой деградации [7]. В хромаффинных клетках надпочечников β -синуклеин регулирует динамику секреторных гранул и кинетику секреции по механизмам, принципиально сходным с нейрональными [61]. Показано, что β -синуклеин может снижать склонность α -синуклеина к агрегации, что позволяет рассматривать его как возможный защитный фактор при синуклеинопатиях [7, 10]. Эта особенность β -синуклеина делает его интересным объектом для изучения в контексте ранних механизмов синуклеинопатий [7].

Несмотря на меньшее число исследований, посвящённых γ -синуклеину, на данный момент понятно, что он имеет собственный профиль экспрессии и, вероятно, самостоятельные физиологические функции. В клетках он связан с регуляцией клеточного цикла, активностью киназ и ремоделированием цитоскелета [62, 63, 11, 64, 62]. Повышенная экспрессия γ -синуклеина описана при различных карциномах, что указывает на его возможное участие в пролиферативных и опухолевых процессах [21, 11]. В нервной системе γ -синуклеин, по-видимому, участвует в регуляции моноаминергических путей, в том числе за счёт взаимодействия с транспортёрами дофамина, норадреналина и серотонина [8]. Кроме того, имеются данные о его связи с метаболическими функциями жировой ткани и гипоталамуса [65, 66].

Хотя синуклеины сходны по строению и частично перекрываются по экспрессии, их функции нельзя считать взаимозаменяемыми [38]. Например, поддержание уровня дофамина в стриатуме зависит от α -синуклеина и не компенсируется β - или γ -синуклеином. В то же время β -синуклеин, по видимому, играет отдельную роль в поддержании координации и равновесия у стареющих животных [2, 67]. На различия между членами семейства указывают и данные о том, что β - и γ -синуклеины по-разному влияют на связывание α -синуклеина с синаптическими везикулами и тем самым могут менять его физиологическую активность [37].

В то же время имеющиеся данные указывают на частичную функциональную взаимозаменяемость синуклеинов. Все три белка обладают общими структурными свойствами и могут участвовать в сходных клеточных процессах, но различаются по взаимодействию с синаптическими структурами, влиянию на агрегацию α -синуклеина и связи с ненейрональными процессами. Поэтому фенотипы, возникающие при инактивации отдельных генов семейства, следует рассматривать не только как результат утраты общей функции синуклеинов, но и как проявление специфической роли каждого белка.

1.3 Синуклеины и нейродегенеративные заболевания

1.3.1 Заболевания, связанные с α -синуклеинопатией

Наибольшее клиническое и биомедицинское значение среди членов семейства имеет α -синуклеин. Болезни, при которых патологическое накопление, неправильный фолдинг и агрегация этого белка являются центральным звеном патогенеза, объединяют под общим названием «синуклеинопатии» [40, 39]. К ним относят, прежде всего, болезнь Паркинсона (БП), болезнь Паркинсона с деменцией, деменцию с тельцами Леви (ДТЛ) и множественную системную атрофию (МСА), хотя α -синуклеин-положительная патология встречается и при ряде других нейродегенеративных состояний [3, 24, 68, 69, 70, 71, 72, 73].

На молекулярном уровне агрегация α -синуклеина проходит через несколько стадий: накопление мономерного белка, образование олигомеров и формирование крупных нерастворимых фибрилл [74, 75]. Особое значение имеют растворимые олигомерные формы α -синуклеина, которые во многих работах рассматриваются как наиболее токсичные промежуточные продукты агрегации, тогда как крупные фибриллярные структуры могут в известной степени выполнять «запирающую» функцию, связывая более реакционноспособные промежуточные формы [74, 75]. Вместе с тем имеются данные о том, что уже сформированные фибриллы сами могут служить источником токсичных олигомерных частиц [76]. Таким образом, тельца Леви отражают лишь один из этапов патологии α -синуклеина, тогда как сам процесс включает последовательные изменения конформационного состояния белка.

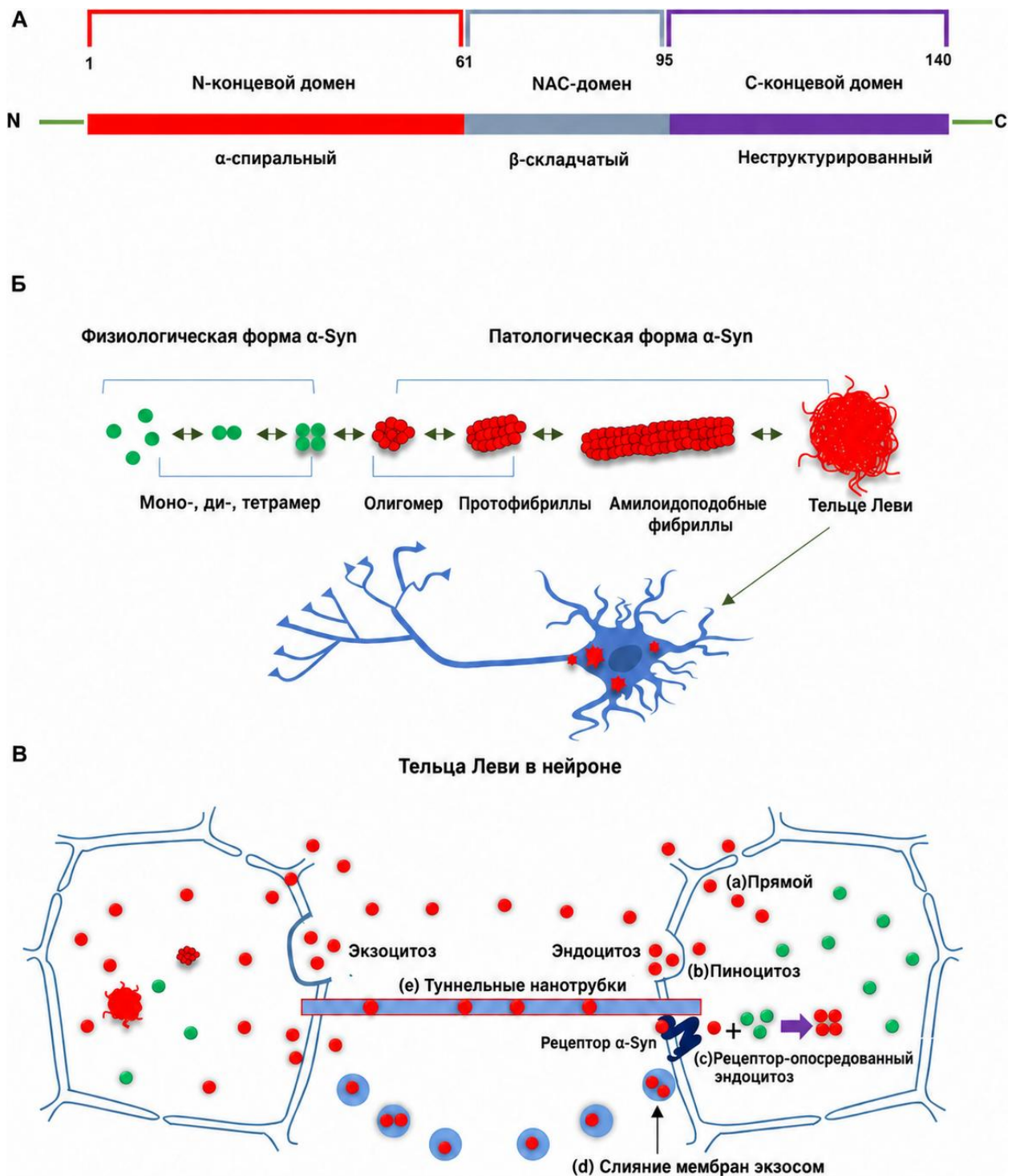


Рисунок 3. Структура α -синуклеина и возможные пути его распространения между клетками. (А) Схематическое изображение трёх доменов α -синуклеина: N-концевого, домена неамилоидного компонента (NAC) и С-концевого. (Б) В физиологических условиях α -синуклеин существует в виде мономера, димера или тетрамера; при патологических воздействиях он может переходить в нестабильные олигомеры и фибриллы, амилоидоподобные волокна и нерастворимые агрегаты, откладывающиеся в нейронах и вызывающие нейротоксичность. (В) Возможные пути переноса неправильно свёрнутого α -синуклеина между клетками: в свободной форме или в составе везикул (например, экзосом), посредством непосредственного проникновения, рецептор-опосредованного эндоцитоза, слияния мембран экзосом с мембраной клетки или туннельных нанотрубок; в клетке-реципиенте он может индуцировать агрегацию собственного α -синуклеина. [77]

Склонность α -синуклеина к агрегации зависит от ряда молекулярных и клеточных факторов. Среди них важное место занимают посттрансляционные модификации – фосфорилирование, нитрование, убиквитинилирование, ацетилирование и другие [78, 79, 80]. Дополнительное значение имеют ионный состав среды, уровень ионов Ca^{2+} , значение pH и особенности четвертичной организации уже сформированных фибрилл [81, 82]. Связывание α -синуклеина с липидными мембранами считается ключевым событием его патологической олигомеризации, в составе телец Леви присутствуют не только белковые агрегаты, но и мембранные структуры, митохондрии, везикулы и лизосомы [36, 83, 84, 85]. Нарушения аутофагосомно-лизосомного пути при этом выступают одновременно и как причина, и как следствие накопления патологических форм α -синуклеина [86, 85].

Особая уязвимость дофаминергических систем, прежде всего нигростриарного пути, по-видимому, определяется их биохимической спецификой. Дофамин и продукты его метаболизма способны стимулировать агрегацию α -синуклеина, а нейромеланин, характерный для нейронов чёрной субстанции, дополнительно усиливает экспрессию этого белка [40, 87, 88]. В связи с этим клинические проявления синуклеинопатий, особенно паркинсонизма, связаны не только с распределением белковых включений, но и с нарушением дофаминергической передачи [72].

Болезнь Паркинсона является наиболее изученной синуклеинопатией. Морфологически она характеризуется накоплением α -синуклеина в телах нейронов и их отростках, а клинически – сочетанием брадикинезии, ригидности, тремора покоя и постуральной нестабильности с широким спектром немоторных проявлений, включая расстройство сна, гипосмию, депрессию и вегетативные нарушения [89]. Важным этапом в изучении патогенеза болезни Паркинсона стало выявление семейных форм заболевания, связанных с мутациями в гене *SNCA*. Первая такая мутация, p.A53T, была описана в 1997 г., а позднее к патогенным вариантам были отнесены p.A30P,

p.E46K и ряд других замен, а также дубликации и трипликации локуса [25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 90, 91]. Эти данные показали, что в развитии нейротоксичности имеет значение не только изменение свойств α -синуклеина, но и повышение его уровня.

Деменция с тельцами Леви и БП с деменцией представляют собой близкие, но не тождественные клиничко-патологические формы. В обоих случаях выявляется диффузное распространение телец и нейритов Леви, однако клиническая дифференциация основывается на временных отношениях между паркинсонизмом и деменцией [92, 93]. Для ДТЛ особенно характерны ранние когнитивные нарушения, флуктуации когнитивного статуса, зрительные галлюцинации и нарушения фазы быстрого сна (REM) [92]. Важно, что морфологический паттерн отложения α -синуклеина не всегда прямо предсказывает клиническую картину: у части пациентов с ДТЛ может отсутствовать выраженный паркинсонизм, тогда как решающую роль в симптомообразовании играют поражение норадренергических структур и общее вовлечение лимбико-кортикальных сетей [94, 95].

Множественная системная атрофия занимает особое место среди синуклеинопатий, поскольку основным морфологическим субстратом здесь являются не нейрональные тельца Леви, а глиальные цитоплазматические включения (ГЦВ) в олигодендроцитах [69, 96, 97]. Клинически МСА проявляется сочетанием вегетативной недостаточности, паркинсонизма, мозжечковой атаксии и пирамидных симптомов, что отражает многоочаговый характер поражения [98, 96, 99]. Механизм образования ГЦВ до конца не ясен, в частности остаётся открытым вопрос, каким образом в олигодендроцитах накапливается значительное количество α -синуклеина при сравнительно низкой экспрессии соответствующей мРНК [100, 101]. Высказывалась гипотеза о поглощении белка извне, что согласуется с идеей межклеточного распространения патологических конформеров [101].

В последние годы всё большее значение придаётся представлению о различных «штаммах» патологического α -синуклеина. Считается, что при

разных синуклеинопатиях формируются конформационные агрегаты, различающиеся по цитотоксичности, клеточной тропности и способности индуцировать неправильное сворачивание эндогенного белка [72, 73, 102, 103]. Это может объяснять, почему патология, связанная с одним и тем же белком, проявляется разными клиническими вариантами. В пользу такого представления говорят и данные о прионоподобном распространении α -синуклеина [104].

α -синуклеиновая патология не ограничивается ЦНС. Отложения фосфорилированного α -синуклеина обнаруживаются в вегетативных ганглиях сердца, нервной сети кишечника, надпочечниках и коже, причём подобные изменения могут выявляться уже в продромальном периоде заболевания [105, 106, 107, 108, 109]. Системное вовлечение тканей при синуклеинопатиях позволяет рассматривать периферические изменения как возможную основу для поиска ранних диагностических биомаркеров. Однако связь между периферической и центральной патологией, равно как и последовательность их возникновения, пока неясна [106, 38].

1.3.2 Роль β - и γ -синуклеинов в патологии

По сравнению с α -синуклеином, β - и γ -синуклеины изучены значительно хуже, что связано с их меньшей склонностью к агрегации и отсутствием столь очевидной связи с классическими синуклеинопатиями [7, 110]. Накопленные данные указывают на то, что β - и γ -синуклеины имеют самостоятельное значение. Они могут модулировать агрегацию и токсичность α -синуклеина, а также участвовать в других патологических процессах.

β -Синуклеин традиционно рассматривается как естественный негативный регулятор агрегации α -синуклеина. Отсутствие части NAC-домена и особенности C-концевой области обуславливают его более низкий амилоидогенный потенциал [44, 45, 48, 49]. Экспериментально показано, что β -синуклеин способен связывать мономеры и ранние олигомеры α -синуклеина и подавлять формирование токсичных агрегатов [7, 111, 112]. Кроме того, фибриллы α -синуклеина, образующиеся в присутствии β -синуклеина,

оказываются менее цитотоксичными и менее агрессивными по своим биологическим свойствам [112]. Это позволяет рассматривать β -синуклеин как возможный эндогенный фактор нейропротекции.

Однако защитная роль β -синуклеина не является универсальной. Описаны мутации р.Р123Н и р.V70М, ассоциированные с нейродегенерацией и деменцией с тельцами Леви [113]. Кроме того, β -синуклеин-положительные включения были обнаружены в гиппокампе пациентов с ДТЛ и БП, а также в мозжечке при МСА [114, 115]. Это позволяет рассматривать β -синуклеин как белок с контекст-зависимой ролью: в одних условиях он может ограничивать агрегацию α -синуклеина, тогда как в других сам вовлекается в нейродегенеративные процессы.

γ -Синуклеин занимает особое место среди членов семейства синуклеинов. Его участие в классических синуклеинопатиях менее очевидно, однако для этого белка наиболее подробно описана связь с опухолевыми процессами. Повышение экспрессии γ -синуклеина выявлено при карциномах молочной железы, печени и, вероятно, яичников; в экспериментальных моделях его избыточная экспрессия связана с нарушениями клеточного цикла и повышением пролиферативной активности [21, 11, 116]. В нервной системе накопление γ -синуклеина обнаруживается в двигательных нейронах при боковом амиотрофическом склерозе, в опухолях мозга, а также при ряде других патологических состояний [117, 10, 5, 6]. Значение γ -синуклеина не ограничивается нервной системой и может быть связано с опухолевыми и метаболическими процессами.

Для β - и γ -синуклеинов описана также связь с заболеваниями глаз. Оба белка ассоциированы с нейродегенерацией при глаукоме; при этом для γ -синуклеина показаны изменения локализации в сетчатке и зрительном нерве, а также появление аутоантител к нему в ликворе и периферической крови [40, 118, 64, 38]. Подобные наблюдения указывают на то, что значение синуклеинов не ограничивается болезнью Паркинсона и должно рассматриваться в более широком патологическом контексте.

Синуклеины могут влиять на агрегацию друг друга. Показано, что α - и γ -синуклеины при определённых условиях взаимно ускоряют фибрилляцию, тогда как β -синуклеин способен ингибировать агрегацию обоих белков [51]. При этом предварительно сформированные фибриллы β - и γ -синуклеинов не индуцируют фибрилляцию α -синуклеина, что указывает на асимметрию межбелковых взаимодействий внутри семейства [51]. Кроме того, чрезмерное связывание всех трёх мономерных синуклеинов с мембранами, индуцированное точечными мутациями, сопровождается образованием включений и общей цитотоксичностью [42]. Это показывает, что нормальное взаимодействие синуклеинов с мембранами при определённых условиях может быть связано с конформационной нестабильностью и агрегацией.

Нарушение баланса экспрессии отдельных членов семейства синуклеинов само по себе может способствовать развитию патологических изменений. Существуют указания на то, что компенсаторное повышение уровня γ -синуклеина при уменьшении экспрессии α - и β -синуклеинов способствует патологическим изменениям в нервной системе [119]. Кроме того, описана связь α - и γ -синуклеинов с расстройствами аутистического спектра, а также участие γ -синуклеина в регуляции адипогенеза и функций адипоцитов [120, 66]. Таким образом, β - и γ -синуклеины имеют самостоятельное функциональное значение и вовлечены в широкий круг молекулярных процессов, связанных не только с нейродегенерацией, но также с опухолевым ростом и системным метаболизмом.

1.4 Глаукома как нейродегенеративное заболевание

Глаукома традиционно рассматривается как группа хронических прогрессирующих заболеваний глаза, при которых ключевым клиническим признаком является поражение зрительного нерва с постепенным сужением полей зрения [121, 122]. Наиболее значимым фактором риска остаётся повышение внутриглазного давления [121, 123]. Именно поэтому снижение внутриглазного давления до настоящего времени является основой терапии

глаукомы. Но глаукомный процесс не сводится только к механическому повреждению зрительного нерва при повышенном давлении. У части пациентов заболевание развивается при нормальных значениях внутриглазного давления, а у некоторых больных прогрессирование продолжается даже на фоне его медикаментозного или хирургического снижения. Эти наблюдения стали основанием для рассмотрения глаукомы как хронического нейродегенеративного заболевания, при котором первичной мишенью являются ганглиозные клетки сетчатки и их аксоны [124, 125, 126, 127].

Главными признаками нейродегенерации при глаукоме являются гибель ганглиозных клеток сетчатки, истончение слоя нервных волокон сетчатки и прогрессирующая атрофия зрительного нерва. Ганглиозные клетки представляют собой единственные выходные нейроны сетчатки, их аксоны формируют зрительный нерв и передают информацию в латеральное коленчатое тело и далее в зрительную кору. Поэтому повреждение этих клеток имеет последствия не только на уровне глаза, но и на уровне центральных зрительных путей. При этом дегенерация ганглиозных клеток включает не только гибель тел нейронов, но и ранние изменения дендритов, синапсов и аксонов, что сближает глаукому с другими хроническими нейродегенеративными процессами [128, 129, 130].

Современные данные указывают, что глаукома сопровождается не только локальной потерей аксонов в зрительном нерве, но и вторичными изменениями в структурах головного мозга, связанных со зрительной системой. Такой процесс описывают как транснейрональную дегенерацию, то есть распространение нейродегенеративных изменений по цепи функционально связанных нейронов. У пациентов с глаукомой и в экспериментальных моделях описаны изменения латерального коленчатого тела, зрительных радиаций и зрительной коры. Эти наблюдения не означают, что глаукома является первично церебральным заболеванием, однако

подчёркивают, что повреждение зрительного нерва может иметь последствия для всей зрительной системы [131, 132, 133, 134, 135].

Одним из ранних событий в патогенезе глаукомы считают нарушение аксонального транспорта. Длинные аксоны ганглиозных клеток сетчатки требуют постоянной доставки митохондрий, белков, везикул и нейротрофических факторов. При повышении внутриглазного давления, деформации головки зрительного нерва и ремоделировании решётчатой пластинки нарушается как антероградный, так и ретроградный транспорт. Критичным считается дефицит ретроградной доставки нейротрофических сигналов от центральных мишеней к телам ганглиозных клеток сетчатки. Это создаёт условия для энергетического дефицита, активации клеточного стресса и последующей гибели нейронов. При этом нарушение аксонального транспорта может предшествовать выраженной потере тел нейронов, что делает его одним из потенциально ранних механизмов глаукомной нейродегенерации [136, 137, 138, 139].

Наряду с механическими факторами существенное значение имеют митохондриальная дисфункция и окислительный стресс. Ганглиозные клетки сетчатки обладают высокой метаболической активностью, а их аксоны особенно чувствительны к дефициту энергии. Повреждение митохондрий приводит к снижению синтеза АТФ, нарушению кальциевого гомеостаза и повышенному образованию активных форм кислорода. При длительном стрессе это сопровождается повреждением белков, липидов и ДНК, а также активацией апоптотических путей. Особое внимание в последние годы уделяется митофагии – механизму селективного удаления повреждённых митохондрий. Нарушение митофагии может усиливать накопление дефектных митохондрий и поддерживать хроническое повреждение ганглиозных клеток сетчатки [140, 141, 142].

Ещё одним механизмом, сближающим глаукому с другими нейродегенеративными заболеваниями, является нарушение белкового гомеостаза. В клетке постоянно действуют системы контроля фолдинга,

деградации и утилизации повреждённых белков. При хроническом стрессе, старении, нарушении митохондриальной функции и воспалении эти системы становятся менее эффективными. Это может приводить к накоплению неправильно свернутых белков, стрессу эндоплазматического ретикулума, нарушению аутофагии и активации клеточной гибели. Подобные процессы хорошо известны при нейродегенеративных заболеваниях центральной нервной системы и всё активнее обсуждаются применительно к глаукоме, особенно к открытоугольным формам заболевания [143, 126, 127].

Важную роль в развитии глаукомной нейродегенерации играют глиальные клетки. В сетчатке и зрительном нерве в ответ на повреждение активируются астроциты, микроглия и клетки Мюллера. На ранних этапах такая реакция может иметь защитное значение, поскольку глия участвует в поддержании ионного баланса, удалении повреждённых клеточных компонентов и секреции трофических факторов. Однако при длительном или повторяющемся повреждении глиальная реакция приобретает хронический характер. Активированная микроглия и астроциты продуцируют провоспалительные цитокины, хемокины, активные формы кислорода и другие медиаторы, способные усиливать повреждение нейронов. В результате формируется самоподдерживающийся нейровоспалительный контур, при котором первичное повреждение ганглиозных клеток сетчатки усиливается вторичной воспалительной реакцией [144, 145, 146, 147].

С нейровоспалением тесно связана активация системы комплемента. В сетчатке при глаукоме описано повышение экспрессии C1q, в том числе в экспериментальных моделях и в тканях человека. Поскольку C1q участвует в маркировке синапсов для последующего удаления микроглией, его активация может быть связана с ранней потерей синаптических контактов и дендритной атрофией ганглиозных клеток сетчатки. Экспериментальные данные показывают, что подавление классического пути комплемента способно уменьшать раннюю дендритную и синаптическую дегенерацию, что

подчёркивает значение иммунно-глиальных механизмов в патогенезе глаукомы [148, 130, 149].

Иммунные механизмы при глаукоме также привлекают всё больше внимания. У пациентов с глаукомой описаны изменения профиля аутоантител и накопление IgG в сетчатке, а в экспериментальных моделях показано участие Т-клеточного иммунного ответа в повреждении ганглиозных клеток сетчатки. В одной из работ было показано, что Т-клетки, активированные белками теплового шока и связанные с влиянием комменсальной микрофлоры, способны поддерживать прогрессирующую дегенерацию сетчатки после эпизода повышения внутриглазного давления [150]. Позднее была предложена концепция «кишечно-ретиальной оси», согласно которой $\beta 7^+$ $CD4^+$ Т-клетки, связанные с иммунными процессами в кишечнике, могут участвовать в прогрессирующем повреждении ганглиозных клеток сетчатки при глаукоме [151]. Эти данные не позволяют сводить глаукому исключительно к аутоиммунному заболеванию, однако показывают, что иммунный компонент может участвовать в поддержании нейродегенеративного процесса, особенно при хроническом течении [152, 153].

Таким образом, глаукома обладает рядом признаков, характерных для нейродегенеративных заболеваний: избирательной уязвимостью определённой популяции нейронов, медленным прогрессированием, нарушениями аксонального транспорта, митохондриальной дисфункцией, нейровоспалением, нарушениями белкового гомеостаза и вторичными изменениями в центральных зрительных путях. При этом глаукома имеет и собственные специфические механизмы, связанные с внутриглазным давлением, особенностями строения головки зрительного нерва, гидродинамикой глаза и влиянием местного иммунного микроокружения.

На этом фоне особый интерес представляют белки семейства синуклеинов. Первые данные о распределении синуклеинов в тканях глаза показали, что α -, β - и γ -синуклеины присутствуют преимущественно в сетчатке и зрительном нерве. При этом γ -синуклеин оказался особенно

важным для структур, вовлечённых в поражение при глаукоме. Было показано, что в глазу синуклеины имеют тканеспецифичный характер распределения, а иммунореактивность γ -синуклеина меняется при глаукоме [63]. Эти наблюдения стали основанием для дальнейшего изучения синуклеинов как возможных участников ретиальной нейродегенерации.

Наиболее убедительные данные о связи синуклеинов с глаукомой получены для γ -синуклеина. В работе Surgucheva с соавт. было показано, что при глаукоме изменяется характер экспрессии и локализации γ -синуклеина в зрительном нерве, тогда как для α - и β -синуклеинов такие изменения были выражены значительно слабее. Кроме того, в культуре астроцитов крысы повышенное гидростатическое давление снижало количество γ -синуклеина, не оказывая аналогичного влияния на актин и глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP). Эти данные позволяют рассматривать γ -синуклеин как белок, чувствительный к условиям, моделирующим повреждение сетчатки [13].

Дальнейшие исследования показали, что γ -синуклеин является маркером ганглиозных клеток сетчатки. Он высоко экспрессируется в этих клетках у человека и выявляется не только в телах ганглиозных клеток, но и в их аксонах в слое нервных волокон сетчатки, решётчатой пластинке и ретробульбарном отделе зрительного нерва. При глаукоме иммунореактивность γ -синуклеина обнаруживалась в аксональных утолщениях зрительного нерва, что указывает на связь этого белка с повреждением аксонов ганглиозных клеток сетчатки [154]. В этом контексте снижение или перераспределение γ -синуклеина может отражать не просто потерю клеточного маркера, а изменение состояния самих ганглиозных клеток и их аксонов.

Экспериментальные данные подтверждают, что экспрессия γ -синуклеина меняется при разных формах повреждения ганглиозных клеток сетчатки. В моделях острой и хронической гибели этих клеток были выявлены различия в экспрессии γ -синуклеина в сетчатке и зрительном нерве. При

хронической глаукомной нейродегенерации, в том числе в модели DBA/2J, снижение γ -синуклеина связано с повреждением ганглиозных клеток сетчатки, тогда как при травматическом повреждении зрительного нерва γ -синуклеин может выявляться в зоне повреждения и участвовать в реакциях, связанных с перестройкой ткани [64]. Эти данные подчёркивают, что γ -синуклеин может выступать в качестве маркера сохранности ганглиозных клеток, а также является участником ответа на повреждение.

Функциональное значение γ -синуклеина для ганглиозных клеток сетчатки подтверждается и экспериментами с подавлением его экспрессии. Было показано, что подавление γ -синуклеина в клетках ганглиозного происхождения влияет на апоптотические пути, что указывает на возможную связь этого белка с механизмами выживаемости клеток и ответа на стресс [155]. Кроме того, в экспериментальных исследованиях антитела к γ -синуклеину оказывали влияние на жизнеспособность нейроретинальных клеток и показатели митохондриального апоптотического пути в условиях стрессового воздействия [156]. Эти данные не позволяют однозначно определить, является ли изменение γ -синуклеина причиной или следствием повреждения, однако поддерживают представление о его участии в клеточном ответе на нейродегенеративный стресс.

Современные данные транскриптомного анализа единичных клеток расширяют представления о распределении синуклеинов в сетчатке. Показано, что гены *Snca*, *Sncb* и *Scng* экспрессируются в ганглиозных клетках сетчатки у разных видов, включая человека, мышь и курицу. При этом характер экспрессии может различаться между подтипами ганглиозных клеток, а после повреждения аксонов уровни экспрессии членов семейства синуклеинов изменяются [157]. Эти результаты важны, поскольку ганглиозные клетки сетчатки представляют собой неоднородную популяцию, и разные их подтипы могут отличаться по устойчивости к повреждению при глаукоме. Следовательно, синуклеины могут быть связаны не только с общим

повреждением ганглиозных клеток, но и с их типоспецифической уязвимостью.

Роль α -синуклеина в глаукоме изучена менее подробно, чем роль γ -синуклеина. α -Синуклеин выявлен в сетчатке человека, что указывает на его возможное участие в нормальной физиологии ретинальных нейронов [158]. В экспериментальной модели глаукомы интравитреальное введение антител к α -синуклеину замедляло нейродегенеративные изменения, включая потерю ганглиозных клеток сетчатки и истончение слоя нервных волокон [159]. Эти данные интересны с точки зрения потенциальной нейропротекции, однако их не следует интерпретировать как доказательство того, что глаукома является классической α -синуклеинопатией. Скорее они показывают, что белки семейства синуклеинов могут быть вовлечены в общие механизмы ретинального повреждения и клеточного ответа на стресс.

β -Синуклеин также рассматривается как возможный участник глаукомной нейродегенерации, хотя данных по нему пока немного. В экспериментальной работе, посвящённой возрастным изменениям сетчатки при глаукоме, β -синуклеин рассматривался в связи с системой сероводорода, окислительным стрессом и повреждением ганглиозных клеток. Было показано, что изменения β -синуклеина зависят от возраста и условий повышенного внутриглазного давления, а экзогенный сероводород может оказывать защитное действие на ганглиозные клетки сетчатки [118]. Кроме того, возрастные изменения профиля синуклеинов в сетчатке мышей показывают, что экспрессия этих белков может зависеть от возраста – одного из основных факторов риска глаукомы [160]. Эти данные позволяют предположить, что β -синуклеин и другие представители семейства могут быть связаны с метаболическими и стресс-адаптационными механизмами в сетчатке, однако их значение при глаукоме требует дальнейшего изучения.

С практической точки зрения данные о преимущественной экспрессии γ -синуклеина в ганглиозных клетках сетчатки и изменении его уровня при повреждении этих клеток создают основание для дальнейшего изучения этого

белка как потенциального показателя состояния ретинальных нейронов и их аксонов. Поскольку глаукома сопровождается не только локальной потерей ганглиозных клеток сетчатки, но и хроническим нейровоспалением, нарушением аксонального транспорта, митохондриальной дисфункцией и изменением белкового гомеостаза, особый интерес представляет поиск доступных периферических маркеров, способных отражать отдельные звенья этого процесса. В этом отношении слёзная жидкость является перспективной биологической средой, поскольку её получение малоинвазивно, а состав может отражать локальные изменения в тканях глаза. Протеомные исследования слезы у пациентов с глаукомой и обзоры по молекулярным биомаркерам подчёркивают, что слёзная жидкость может использоваться для изучения воспалительных, протеолитических и стресс-ассоциированных изменений при глаукоме [161, 162, 163, 14, 164].

Поэтому исследование белков, связанных с нейрональным повреждением, воспалением и протеолитическим балансом, может иметь значение для характеристики периферических проявлений нейродегенерации при глаукоме. Это важно потому, что прямое исследование ганглиозных клеток сетчатки и зрительного нерва у пациентов практически невозможно, тогда как периферические биологические жидкости могут служить более доступным источником информации о локальных патологических процессах.

Вместе с тем имеющиеся данные требуют осторожной интерпретации. Большинство работ, посвящённых синуклеинам при глаукоме, выполнено на экспериментальных моделях или ограниченных выборках тканей человека, поэтому их результаты пока нельзя напрямую переносить на общую картину заболевания. Кроме того, остаётся неясным, являются ли изменения синуклеинов одной из причин повреждения ганглиозных клеток сетчатки или отражают уже развивающуюся нейродегенерацию. В отличие от болезни Паркинсона, для глаукомы не доказано наличие классической синуклеиновой агрегации как ведущего патогенетического механизма. Поэтому корректнее рассматривать глаукому не как синуклеинопатию в строгом смысле, а как

заболевание, при котором белки семейства синуклеинов, прежде всего γ -синуклеин, могут участвовать в развитии и прогрессировании нейродегенеративных изменений.

Современные представления о глаукоме выходят за рамки модели изолированного повреждения зрительного нерва вследствие повышенного внутриглазного давления. Глаукома рассматривается как хронический нейродегенеративный процесс, при котором гибель ганглиозных клеток сетчатки и повреждение их аксонов сопровождаются нарушением аксонального транспорта, митохондриальной дисфункцией, нейровоспалением, активацией иммунных механизмов и системы комплемента, нарушением белкового гомеостаза и вторичными изменениями центральных зрительных путей. В этом контексте синуклеины, прежде всего γ -синуклеин, заслуживают внимания как белки, связанные с ганглиозными клетками сетчатки и зрительным нервом. Изменения экспрессии и локализации γ -синуклеина при повреждении ганглиозных клеток позволяют рассматривать его как возможный участник нейродегенерации при глаукоме. При этом имеющиеся данные пока не дают оснований относить глаукому к классическим синуклеинопатиям. Более корректно говорить о возможном участии отдельных представителей семейства синуклеинов в повреждении ретинальных нейронов и о необходимости дальнейшего изучения их роли в патогенезе и диагностике глаукомы.

1.5 Синуклеинопатия в периферических тканях

Под периферической синуклеиновой патологией обычно понимают выявление патологических форм α -синуклеина вне центральной нервной системы. В большинстве исследований речь идёт о фосфорилированном по Ser129 α -синуклеине, агрегированных или олигомерных формах белка, а также о конформационно изменённом α -синуклеине, обладающем способностью передаваться между клетками и индуцировать агрегацию нативного белка, явление, которое получило название сидинг (англ. seeding). Такое определение принципиально отличает выявление периферической синуклеиновой

патологии от простой регистрации общего α -синуклеина в тканях или биологических жидкостях. Нормальный α -синуклеин экспрессируется не только в нейронах, но и в ряде периферических клеток, включая клетки крови, поэтому само по себе наличие белка в плазме, сыворотке, слюне или слёзной жидкости не является доказательством патологического процесса [165, 166].

Интерес к периферической α -синуклеиновой патологии во многом связан с гипотезой стадийного распространения патологического процесса при болезни Паркинсона. Согласно схеме, предложенной Braak с соавт. α -синуклеиновая патология при спорадической болезни Паркинсона может первоначально обнаруживаться в обонятельных структурах и нижних отделах ствола мозга, включая дорсальное моторное ядро блуждающего нерва, а затем распространяться в ростральном направлении [167]. В рамках этой концепции была сформулирована гипотеза о возможном периферическом начале патологического процесса, в частности в обонятельной слизистой или энтеральной нервной системе, с последующим вовлечением центральных структур через анатомически связанные пути. Эта модель хорошо согласуется с тем, что у части пациентов немоторные симптомы, такие как запоры, гипосмия и нарушения вегетативной регуляции, могут предшествовать моторным проявлениям заболевания на годы [168, 169].

Вместе с тем периферическое начало болезни Паркинсона не следует рассматривать как универсальный механизм. Распределение α -синуклеиновой патологии у пациентов неоднородно, а последовательность вовлечения структур может различаться. У части больных признаки поражения периферической автономной нервной системы выражены рано, тогда как у других клиническая картина длительное время определяется преимущественно центральными моторными проявлениями. Поэтому периферическая α -синуклеиновая патология в настоящее время рассматривается не как обязательная первая стадия заболевания, а как один из возможных компонентов системного патологического процесса при синуклеинопатиях [170, 166].

Существенное значение для формирования представлений о системном характере синуклеинопатий имели посмертные исследования периферических тканей. В работе Beach с соавт. было показано, что фосфорилированный α -синуклеин при заболеваниях с тельцами Леви может обнаруживаться во множестве органов и тканей, включая желудочно-кишечный тракт, слюнные железы, симпатические ганглии, сердце, кожу и другие структуры [171]. Сходные данные были получены Gelpi с соавт., показавшими множественное органное вовлечение при заболеваниях с тельцами Леви [107]. При этом патологический α -синуклеин преимущественно локализуется в нервных волокнах и автономных нервных сплетениях, что указывает на связь периферических нарушений с поражением периферической и вегетативной нервной системы, а не с неспецифическим накоплением белка в паренхиме органов.

Одним из наиболее изученных периферических участков является желудочно-кишечный тракт. Энтеральная нервная система представляет особый интерес, поскольку она анатомически и функционально связана с автономной регуляцией, а желудочно-кишечные нарушения относятся к частым немоторным проявлениям болезни Паркинсона. Фосфорилированный α -синуклеин обнаруживается в нервных структурах пищевода, желудка, тонкой и толстой кишки, а также в биоптатах слизистой и подслизистой оболочки [172, 170]. Исследования биопсий толстой кишки показали возможность прижизненного выявления α -синуклеиновой патологии, в том числе на ранних и продромальных стадиях заболевания [173, 174]. Однако диагностическая значимость биопсий желудочно-кишечного тракта остаётся ограниченной из-за вариабельности результатов. На выявляемость патологического белка влияют участок забора материала, глубина биопсии, плотность нервных волокон в образце, применяемые антитела, метод обработки ткани и критерии интерпретации окрашивания [172, 175].

Другим направлением является исследование слюнных желез. Подчелюстная железа содержит развитую автономную иннервацию, что

делает её потенциальным источником материала для выявления периферической α -синуклеиновой патологии. В биоптатах подчелюстной железы у пациентов с болезнью Паркинсона был обнаружен фосфорилированный α -синуклеин, причём такие находки описаны как при развернутой, так и при ранней стадии заболевания [176]. Малые слюнные железы также рассматривались как менее инвазивный объект исследования, однако их диагностическая чувствительность, по-видимому, ниже и сильнее зависит от объёма полученного материала и количества нервных элементов в препарате [177]. В целом слюнные железы являются важной моделью периферического поражения автономной нервной системы, но широкое использование биопсии в диагностике ограничено инвазивностью процедуры и необходимостью стандартизации методики.

Наиболее активно в последние годы развивается направление кожной биопсии. Кожа доступна для малотравматичного забора материала и содержит сеть соматических и автономных нервных волокон, включая волокна, иннервирующие потовые железы, сосуды и мышцы, поднимающие волосы. Выявление фосфорилированного α -синуклеина в кожных нервных волокнах рассматривается как перспективный метод прижизненного подтверждения синуклеинопатии [178]. В многоцентровом исследовании Gibbons с соавт. фосфорилированный α -синуклеин в коже был обнаружен у высокой доли пациентов с болезнью Паркинсона, деменцией с тельцами Леви, множественной системной атрофией и чистой автономной недостаточностью, тогда как в контрольной группе он обнаруживался редко [179]. Кожная биопсия может иметь высокую диагностическую ценность, однако окончательное определение её места в клинической практике требует дальнейшей проверки в независимых и менее селективных когортах.

Особое положение занимают исследования α -синуклеина в биологических жидкостях. Общий, олигомерный и фосфорилированный α -синуклеин определяли в крови, плазме, сыворотке, слюне, слёзной жидкости и спинномозговой жидкости [165, 166]. Эти подходы привлекательны

благодаря минимальной инвазивности, но их интерпретация осложняется несколькими обстоятельствами. Во-первых, α -синуклеин в значительном количестве присутствует в эритроцитах и тромбоцитах, поэтому даже минимальный гемолиз может существенно влиять на результаты измерений в крови. Во-вторых, разные исследования используют различные аналитические платформы и антитела, что затрудняет сопоставление данных. В-третьих, концентрация общего α -синуклеина не всегда отражает наличие патологических агрегатов. По этой причине показатели в биологических жидкостях целесообразно рассматривать не как прямой эквивалент изменений, происходящих в тканях, а как потенциальные периферические биомаркеры, требующие строгой аналитической и клинической валидации.

Сравнительные исследования, включающие несколько тканей и жидкостей у одних и тех же пациентов, показывают сложность данной проблемы. В исследовании Systemic Synuclein Sampling Study оценивали α -синуклеин в различных периферических тканях и биологических жидкостях у пациентов с болезнью Паркинсона и контрольных лиц [180]. Полученные данные подтвердили перспективность системного изучения α -синуклеина, но одновременно показали отсутствие простой взаимозаменяемости между разными источниками материала. Положительный результат в одной ткани не всегда сопровождается аналогичными изменениями в другой. Это может отражать как истинную биологическую неоднородность заболевания, так и различия в чувствительности методов, составе образцов и стадии патологического процесса.

Развитие методов амплификации патологической конформации α -синуклеина стало важным этапом в изучении синуклеинопатий. Эти методы основаны на способности агрегированных форм белка индуцировать переход рекомбинантного α -синуклеина в агрегированное состояние *in vitro*. В отличие от стандартного иммуногистохимического выявления, такие реакции направлены не только на обнаружение антигенного эпитопа, но и на функциональную регистрацию «затравочной» активности патологического

белка [181, 182]. Первоначально наибольшее развитие эти подходы получили при анализе спинномозговой жидкости, однако в последние годы они применяются также к периферическим тканям, включая кожу, слюнные железы и биоптаты желудочно-кишечного тракта. Это направление особенно важно для ранней диагностики и стратификации пациентов, но его использование требует стандартизации протоколов, контроля преданалитических факторов и сопоставления результатов с морфологическими данными.

Таким образом, периферическая синуклеиновая патология является важным проявлением системного характера синуклеинопатий. Наиболее убедительные данные получены для фосфорилированного и агрегированного α -синуклеина в структурах периферической и автономной нервной системы, особенно в коже, желудочно-кишечном тракте и слюнных железах [171, 107, 179]. Эти результаты имеют двойное значение. С одной стороны, они расширяют представления о патогенезе болезни Паркинсона и других синуклеинопатий, показывая, что патологический процесс может выходить за пределы центральной нервной системы. С другой стороны, они создают основу для разработки периферических биомаркеров, пригодных для прижизненной диагностики, выявления продромальных стадий и оценки прогрессирования заболевания.

При этом диагностическое значение периферических синуклеиновых маркеров пока остаётся недостаточно определённым. Основные ограничения связаны с неоднородностью распределения патологического α -синуклеина, различиями между синуклеинопатиями, вариабельностью биопсийного материала, недостаточной стандартизацией антител и методов окрашивания, а также влиянием преданалитических факторов при исследовании биологических жидкостей [165, 180, 166]. Поэтому при интерпретации периферических изменений необходимо различать три уровня доказательности: выявление общего α -синуклеина, обнаружение его патологически модифицированных форм и подтверждение затравочной

активности агрегатов. Наибольшую патогенетическую и диагностическую значимость имеют два последних подхода, поскольку они в большей степени отражают собственно синуклеиновую патологию, а не физиологическое присутствие белка в периферических тканях.

1.6 Биомаркеры нейродегенеративных заболеваний

1.6.1 Необходимость ранней диагностики НДЗ

Нейродегенеративные заболевания представляют собой одну из наиболее значимых медико-социальных проблем современной медицины. Их распространённость возрастает по мере старения населения, а клинические проявления часто развиваются постепенно и становятся очевидными уже после длительного периода скрытого течения патологического процесса. По данным глобальных эпидемиологических исследований, заболевания нервной системы вносят существенный вклад в потерю здоровья населения, что подчёркивает необходимость поиска подходов к более раннему выявлению и наблюдению таких состояний [183].

Особенность многих нейродегенеративных заболеваний состоит в том, что молекулярные и клеточные изменения предшествуют выраженным клиническим симптомам. Наиболее подробно эта закономерность изучена при болезни Альцгеймера. Согласно современным представлениям, патологическое накопление β -амилоида, изменения метаболизма тау-белка и признаки нейродегенерации могут выявляться за годы до развития деменции [184, 185]. В связи с этим болезнь Альцгеймера всё чаще рассматривается не только как клинический синдром деменции, но и как биологический континуум, включающий доклиническую стадию, стадию лёгких когнитивных нарушений и деменцию [185, 186].

Сходный принцип применим и к другим нейродегенеративным заболеваниям. При болезни Паркинсона до появления классических двигательных симптомов могут развиваться немоторные проявления, включая нарушения обоняния, сна, вегетативной регуляции и другие признаки

продромальной стадии [187]. Развитие представлений о продромальной болезни Паркинсона и биологическом стадировании α -синуклеиновой патологии показывает, что диагностика таких заболеваний постепенно смещается от распознавания поздних клинических симптомов к выявлению ранних признаков патологического процесса [187, 188].

Ранняя диагностика имеет значение не только для уточнения диагноза, но и для прогноза, отбора пациентов для наблюдения и разработки терапевтических подходов. Это особенно важно в условиях появления методов лечения, рассчитанных преимущественно на ранние стадии заболевания. Так, клинические исследования антиамилоидных препаратов при ранней болезни Альцгеймера показали, что вмешательство на ранних этапах патологического процесса может замедлять клиническое прогрессирование, хотя такие подходы требуют точного подтверждения биологической природы заболевания и тщательного отбора пациентов [189, 190]. Поэтому развитие ранней диагностики тесно связано с поиском надёжных биомаркеров, позволяющих выявлять патологические изменения до выраженной утраты функций.

1.6.2 Основные типы биомаркеров нейродегенерации

Биомаркеры нейродегенеративных заболеваний представляют собой измеряемые признаки, которые могут отражать наличие патологического процесса, его стадию, скорость прогрессирования или ответ на терапевтическое воздействие. В современной литературе биомаркеры классифицируют по нескольким принципам: по клиническому назначению, по биологической природе, по источнику материала и по методу измерения. Такое разделение условно, поскольку один и тот же показатель может иметь разное значение в зависимости от заболевания, стадии процесса и исследовательской задачи [191, 192].

По клиническому назначению выделяют диагностические, прогностические, мониторинговые, предиктивные, фармакодинамические и маркеры риска. Диагностические биомаркеры позволяют подтвердить

наличие заболевания или его биологической основы. Прогностические маркеры помогают оценить вероятность дальнейшего прогрессирования, а мониторинговые – отслеживать изменение состояния пациента во времени. Предиктивные маркеры указывают на вероятность ответа на определённое лечение, тогда как фармакодинамические отражают биологический эффект терапии. Такая классификация особенно важна для нейродегенеративных заболеваний, поскольку клиническая картина часто формируется позднее, чем начинаются молекулярные изменения [191, 185].

Одну из наиболее изученных групп составляют молекулярные биомаркеры, связанные с накоплением патологически изменённых белков. При болезни Альцгеймера к ним относят β -амилоид, общий тау-белок и фосфорилированные формы тау-белка. На основе этих показателей была предложена биологическая модель болезни Альцгеймера, в которой отдельно учитываются маркеры амилоидной патологии, тау-патологии и нейродегенерации [185]. При синуклеинопатиях особое значение имеет α -синуклеин, в том числе его агрегированные и патологически изменённые формы. Развитие методов выявления α -синуклеиновой патологии стало основой для новых подходов к биологическому стадированию болезни Паркинсона и родственных заболеваний [188, 193].

К отдельной группе относятся маркеры повреждения нейронов, аксонов и синапсов. Среди них наиболее часто обсуждаются белки нейрофиламентов, отражающие повреждение длинных аксонов, а также белки, связанные с синаптической функцией. Такие показатели не всегда являются специфичными для одной нозологической формы, однако они могут быть полезны для оценки выраженности нейронального повреждения и скорости прогрессирования заболевания [192, 194]. Например, лёгкие цепи нейрофиламентов (NfL) рассматриваются как один из наиболее перспективных маркеров нейроаксонального повреждения при разных нейродегенеративных заболеваниях, хотя их повышение требует интерпретации с учётом клинического контекста [192, 194].

Важное место занимают воспалительные и иммунологические биомаркеры. Нейродегенеративные заболевания сопровождаются изменениями со стороны микроглии, астроцитов, периферических иммунных клеток, цитокинов, белков комплемента и других компонентов воспалительного ответа. К таким показателям относят интерлейкины (ИЛ), фактор некроза опухоли α (ФНО- α), С-реактивный белок (СРБ), белки глиальной активации и другие молекулы, связанные с нейровоспалением [195, 196]. Их значение состоит в том, что они позволяют оценить воспалительный компонент патологического процесса. Однако большинство таких маркеров не является специфичным для конкретного нейродегенеративного заболевания и может изменяться при инфекциях, системном воспалении, старении и сопутствующей патологии [196, 197].

По источнику материала биомаркеры можно разделить на ликворные, кровяные и периферические маркеры, определяемые в других биологических жидкостях. Спинномозговая жидкость остаётся одной из наиболее информативных матриц, поскольку теснее связана с процессами, происходящими в центральной нервной системе. Именно в ликворе долгое время наиболее надёжно определяли β -амилоид, тау-белок, фосфорилированный тау-белок, нейрофиламентные белки и другие молекулы, связанные с нейродегенерацией [192, 194]. При этом получение спинномозговой жидкости является инвазивной процедурой, что ограничивает её использование для массового скрининга и частого динамического наблюдения.

Активно развиваются биомаркеры крови. Интерес к ним связан с меньшей инвазивностью, доступностью и возможностью повторного забора материала. Для болезни Альцгеймера особенно активно изучаются плазменные формы фосфорилированного тау-белка, β -амилоида, NfL и GFAP [194]. Биомаркеры крови потенциально могут использоваться для первичного отбора пациентов, стратификации групп риска и последующего направления на более точные методы обследования. Однако их интерпретация осложняется

низкой концентрацией молекул центрального происхождения, влиянием периферических тканей и зависимостью результатов от условий забора и обработки образцов [194, 198].

Кроме крови и спинномозговой жидкости, в качестве источника биомаркеров рассматриваются слёзная жидкость, слюна, моча и внеклеточные везикулы. Такие матрицы привлекательны благодаря относительной простоте получения и возможности повторного анализа. Слёзная жидкость представляет особый интерес, поскольку глаз и зрительный анализатор тесно связаны с центральной нервной системой, а состав слезы может отражать как местные процессы на глазной поверхности, так и системные изменения [199, 200]. В слезе при нейродегенеративных заболеваниях изучались белки, цитокины, метаболиты и молекулы, связанные с синуклеиновой патологией, однако эта область пока требует дальнейшей стандартизации методов забора и анализа материала [199, 200].

Отдельную группу составляют нейровизуализационные биомаркеры. Они позволяют оценивать структурные, метаболические и функциональные изменения головного мозга *in vivo*. К ним относят магнитно-резонансную томографию, позитронно-эмиссионную томографию с лигандами к β -амилоиду, тау-белку или дофаминергическим структурам, а также другие методы визуализации. При болезни Альцгеймера такие подходы используются для выявления амилоидной и тау-патологии, атрофии отдельных областей мозга и признаков нейродегенерации [185]. При болезни Паркинсона методы нейровизуализации применяются для оценки дофаминергической системы, структурных изменений и прогрессирования заболевания [193]. Эти методы высокоинформативны, но требуют специального оборудования, значительных затрат и не всегда подходят для широкого скрининга.

Генетические биомаркеры включают наследственные варианты, повышающие риск заболевания или определяющие его моногенные формы. При болезни Альцгеймера наиболее известным генетическим фактором риска является аллель APOE ϵ 4, а при болезни Паркинсона и других

нейродегенеративных заболеваниях значение имеют мутации в генах, связанных с белковой агрегацией, митохондриальной функцией, аутофагией и лизосомными процессами [192]. Генетические маркеры особенно важны для оценки риска, семейных форм заболевания и стратификации пациентов в исследованиях. В то же время наличие генетического фактора риска не всегда означает развитие заболевания, поэтому такие данные требуют осторожной интерпретации.

Наряду с отдельными молекулярными показателями всё большее значение приобретают комплексные высокопроизводительные подходы: геномный, транскриптомный, протеомный, метаболомный и липидомный анализ. Они позволяют выявлять не один маркер, а целые профили изменений, связанных с заболеванием [192, 194]. Такие подходы особенно полезны на этапе поиска новых биомаркеров и изучения механизмов заболевания. Однако их применение в клинической практике ограничено сложностью анализа, высокой стоимостью, необходимостью больших выборок и трудностями воспроизводимости результатов.

Наконец, к биомаркерам нейродегенеративных заболеваний относят физиологические и анатомические количественные показатели. К ним могут относиться параметры ходьбы, сна, двигательной активности, вариабельность сердечного ритма, глазодвигательные реакции, толщина слоёв сетчатки, состояние глазной поверхности и другие измеряемые признаки [201, 202]. Такие показатели редко обладают высокой специфичностью, но могут отражать функциональные последствия нейродегенеративного процесса и быть полезными при динамическом наблюдении. Особенно перспективным является их сочетание с молекулярными и клиническими данными.

Биомаркеры нейродегенеративных заболеваний представляют собой разнородную группу показателей, включающую молекулярные, генетические, иммунологические, нейровизуализационные, физиологические и периферические маркеры. Их значение определяется не только способностью выявлять патологический процесс, но и возможностью уточнять стадию

заболевания, прогнозировать течение, отбирать пациентов для исследований и оценивать ответ на терапию. Наиболее обоснованным в настоящее время считается не поиск одного универсального маркера, а использование комплексных панелей, объединяющих разные уровни информации о заболевании [192, 194, 198].

1.6.3 Физиологические, офтальмологические и иммунологические параметры в качестве биомаркеров нейродегенерации

К числу биомаркеров нейродегенеративных заболеваний относят не только молекулы, непосредственно связанные с патологической агрегацией белков или повреждением нейронов. В эту группу всё чаще включают и более общие показатели: физиологические параметры, изменения со стороны органа зрения, состав слёзной жидкости, а также признаки иммунной и воспалительной активации [192, 199]. Интерес к таким показателям связан с тем, что их можно оценивать относительно простыми и малоинвазивными методами, в том числе повторно, на разных этапах заболевания [192, 199].

Периферические параметры не являются прямой заменой ликворным маркерам или методам нейровизуализации. Их значение состоит скорее в другом: они позволяют оценить те проявления нейродегенеративного процесса, которые выходят за пределы узко понимаемого поражения отдельных нейрональных популяций [192]. Многие нейродегенеративные заболевания сопровождаются изменениями вегетативной регуляции, воспалительного ответа, обменных процессов, зрительных функций и состояния периферических тканей [201, 202, 195]. Поэтому такие показатели могут дополнять молекулярные и морфологические данные, особенно при комплексной оценке заболевания [192, 201].

Одним из физиологических параметров, изучаемых при нейродегенеративных заболеваниях, является вариабельность сердечного ритма. Этот показатель отражает состояние вегетативной регуляции сердечной деятельности и соотношение симпатических и парасимпатических влияний [202]. При болезни Паркинсона снижение вариабельности сердечного

ритма рассматривается как одно из проявлений вегетативной дисфункции, которая может развиваться уже на ранних стадиях заболевания и быть связана с немоторными симптомами [202]. По данным систематических обзоров и метаанализов, у пациентов с болезнью Паркинсона выявляются изменения variability сердечного ритма, указывающие на нарушение парасимпатической регуляции [202]. Связь этого показателя с когнитивными и поведенческими нарушениями обсуждается и при других нейродегенеративных состояниях [203]. В этом смысле физиологические параметры могут служить не столько специфическими диагностическими маркерами, сколько показателями общего функционального состояния организма [202, 203].

В экспериментальных исследованиях к физиологическим проявлениям нейродегенерации также относят изменения массы тела, двигательной активности, мышечной силы, выносливости и продолжительности жизни. При болезни Паркинсона изменения массы тела рассматриваются как многофакторное явление, связанное с нарушением двигательной активности, пищевого поведения, энергетического обмена, дофаминергической регуляции и проводимой терапией [204]. В доклинических исследованиях такие параметры особенно важны, поскольку позволяют оценить функциональные последствия генетических изменений или нарушения экспрессии определённых белков. Так, в исследованиях синуклеинов у мышей поведенческие и физиологические тесты применяют для оценки возраст-зависимых изменений моторной функции, синаптической передачи и жизнеспособности животных [9]. Такие параметры не являются биомаркерами в узком молекулярном смысле, но они отражают общее состояние животного и позволяют связать биохимические или морфологические изменения с функциональным фенотипом [204, 9].

Отдельное направление связано с офтальмологическими параметрами. Интерес к ним объясняется тем, что глаз имеет тесную связь с центральной нервной системой. Сетчатка является частью нервной ткани, а глазная

поверхность и слёзная железа находятся под влиянием нервной, иммунной и вегетативной регуляции [201, 205]. Поэтому изменения со стороны органа зрения рассматриваются как возможный источник малоинвазивных маркеров нейродегенеративных заболеваний [201, 205, 206].

При болезни Паркинсона и болезни Альцгеймера описаны изменения сетчатки, зрительных функций, движений глаз и состояния глазной поверхности [201, 205, 206]. В качестве возможных маркеров обсуждаются толщина отдельных слоёв сетчатки по данным оптической когерентной томографии, сосудистые показатели сетчатки, состояние роговицы, частота мигания, стабильность слёзной плёнки и признаки сухого глаза [201, 205, 206, 207, 208]. При болезни Паркинсона нарушения мигания, снижение слезопродукции и изменения глазной поверхности рассматриваются как возможные проявления нейродегенеративного процесса и вегетативной дисфункции [207, 208]. Однако эти показатели трудно считать специфичными. На них влияют возраст, сопутствующие офтальмологические заболевания, общее состояние пациента и особенности метода измерения [201, 207, 208]. Поэтому такие параметры целесообразнее рассматривать как часть комплексной оценки, а не как самостоятельные диагностические критерии [201, 205, 206].

Особое значение для поиска периферических биомаркеров имеет слёзная жидкость. Её можно получать относительно просто и с минимальным дискомфортом для пациента, что делает слезу удобной для повторных исследований [199, 200]. В её составе обнаруживаются белки, пептиды, липиды, метаболиты, иммуноглобулины, цитокины и другие молекулы, которые могут отражать как местные процессы на глазной поверхности, так и системные изменения [199, 200, 209, 210, 211]. В обзорах, посвящённых слёзным биомаркерам, отмечается, что при болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона и рассеянном склерозе изучались разные компоненты слёзной жидкости, включая белки, связанные с нейродегенерацией и воспалением [199].

При болезни Паркинсона особый интерес представляет α -синуклеин, поскольку его агрегация является одним из ключевых звеньев патогенеза синуклеинопатий [192, 212, 213]. В ряде работ α -синуклеин определяли в слёзной жидкости пациентов с болезнью Паркинсона [199, 212]. В исследовании Maass с соавт. было показано повышение уровня общего растворимого α -синуклеина в слезе пациентов по сравнению с контрольной группой, однако диагностическая точность этого показателя была умеренной [212]. Это указывает на возможность выявления белков, связанных с нейродегенерацией, в слёзной жидкости, но одновременно показывает, что одного такого показателя недостаточно для надёжной диагностики [212].

Более новый подход связан не только с измерением общего количества белка, но и с выявлением способности патологически изменённого α -синуклеина запускать агрегацию. Такие методы позволяют регистрировать не просто присутствие белка, а признаки его патологической конформации [213]. В недавних исследованиях было показано, что подобная активность α -синуклеина может выявляться в слёзной жидкости части пациентов с болезнью Паркинсона [213]. Этот подход потенциально ближе к оценке самого патологического процесса, чем определение общего уровня белка. Однако он пока требует дальнейшей проверки, стандартизации протоколов и анализа на независимых выборках [213, 198, 200].

Помимо α -синуклеина, в слёзной жидкости при болезни Паркинсона изучались катехоламины и белки, связанные с протеазной регуляцией и воспалением [214, 215]. В пилотном исследовании Bogdanov с соавт. были выявлены изменения уровня катехоламинов и активности $\alpha 2$ -МГ в слёзной жидкости пациентов с ранней стадией болезни Паркинсона, а также в экспериментальных моделях паркинсонизма [214]. $\alpha 2$ -МГ представляет интерес как белок с широким спектром функций: он участвует в ингибировании протеаз, воспалительных реакциях и связывании различных лигандов [214, 216]. Изменение его активности в слёзной жидкости может быть связано как с местными процессами на глазной поверхности, так и с

более общими нарушениями, сопровождающими нейродегенерацию [214, 216]. В пользу связи слёзной жидкости с воспалительными изменениями также свидетельствуют данные о повышении фактора некроза опухоли α в слезе пациентов с болезнью Паркинсона [215].

Иммунологические параметры составляют ещё одну важную группу периферических показателей. Нейровоспаление уже не рассматривается только как вторичная реакция на гибель нейронов. В настоящее время его всё чаще описывают как один из механизмов, способных поддерживать и усиливать нейродегенеративный процесс [195, 217]. В этом участвуют микроглия, астроциты, периферические иммунные клетки, цитокины, компоненты комплемента и другие медиаторы воспаления [195, 217].

При болезни Паркинсона среди периферических иммунологических маркеров чаще всего изучают цитокины и хемокины, включая ИЛ-6, ИЛ-1 β , ФНО- α , ИЛ-8, СРБ и другие показатели воспалительного ответа [196]. По данным систематического обзора и метаанализа Qu с соавт., у пациентов с болезнью Паркинсона по сравнению с контрольными группами выявляется повышение ряда воспалительных цитокинов в периферической крови и спинномозговой жидкости [196]. Эти данные подтверждают участие воспалительных механизмов в патогенезе заболевания, однако сами по себе такие маркеры не обладают высокой специфичностью [196, 197].

К более простым иммуновоспалительным показателям относят соотношение нейтрофилов и лимфоцитов, уровень СРБ, концентрацию провоспалительных цитокинов и другие параметры системного воспаления [196, 197]. Их преимущество заключается в технической доступности. При этом интерпретация таких показателей затруднена, поскольку они меняются при инфекциях, хронических воспалительных заболеваниях, метаболических нарушениях, старении, стрессе и приёме лекарственных препаратов [196, 197, 218]. Поэтому иммунологические параметры скорее отражают общий воспалительный фон и могут быть полезны в составе комплексной оценки, но

не являются специфическими признаками конкретного нейродегенеративного заболевания [196, 197].

Физиологические, офтальмологические и иммунологические параметры позволяют шире рассматривать проявления нейродегенеративных заболеваний. Они отражают не только повреждение нервной ткани, но и изменения вегетативной регуляции, глазной поверхности, состава слёзной жидкости и воспалительного ответа [192, 199, 201, 202, 195]. Более обоснованным представляется их использование не изолированно, а в сочетании с молекулярными, морфологическими, нейровизуализационными и клиническими данными [192, 201, 198, 218].

1.7 Нокаутные модели как инструмент анализа функции синуклеинов

Поскольку прямое наблюдение физиологических функций синуклеинов в клетке затруднено их функциональной пластичностью и перекрыванием ролей, важнейшим инструментом их изучения стали генетически модифицированные животные, прежде всего нокаутные мыши [90, 219, 2]. На ранних этапах исследования семейства синуклеинов ожидалось, что инактивация соответствующих генов приведёт к выраженным неврологическим фенотипам. Однако у мышей с инактивацией одного или двух генов синуклеинов, как правило, не выявляют грубых морфологических, поведенческих или репродуктивных нарушений [2]. Это указывает на то, что синуклеины, вероятно, не относятся к белкам, необходимым для базового развития и жизнеспособности организма, но могут быть важны для более тонкой регуляции нейрофизиологических процессов.

Однако отсутствие выраженного фенотипа не исключает функционального значения этих белков. Именно на нокаутных моделях было показано, что синуклеины оказывают заметное, хотя и нередко подпороговое влияние на дофаминергическую передачу, моторное поведение, когнитивные параметры и возрастную устойчивость нейрональных систем [220, 221, 2]. У стареющих животных с дефицитом α -синуклеина или комбинаций

синуклеинов выявляются статистически значимые изменения в nigrostriарной системе, в том числе снижение уровня дофамина [220, 2]. При этом отсутствие α -синуклеина может сопровождаться парадоксальным усилением высвобождения дофамина из везикул, тогда как его избыточная экспрессия, напротив, снижает высвобождение медиатора [10]. Физиологическая роль α -синуклеина в дофаминергических нейронах, вероятно, связана не с односторонним усилением или подавлением синаптической передачи, а с регуляцией накопления, высвобождения и обратного захвата дофамина.

Особенно показательны результаты, полученные на двойных и тройных нокаутах. У мышей, нокаутных по всем трём синуклеинам, наблюдаются сокращение продолжительности жизни, возрастное ухудшение координации и дегенерация сетчатки [54, 9]. Неврологический фенотип при этом выражен сильнее, чем у одиночных или двойных нокаутов, что свидетельствует о кумулятивном эффекте потери синуклеинов [222]. Функциональная компенсация между синуклеинами, по-видимому, существует, но носит частичный характер.

Нокаутные модели показывают, что отдельные члены семейства вносят неодинаковый вклад в поддержание нормальной функции нервной системы. Так, дефицит β -синуклеина ухудшает результаты животных в тестах координации, причём дополнительная инактивация α - или γ -синуклеина не усиливает этот эффект [2]. Отсутствие α -синуклеина связано с повышением порога поведенческой реакции, снижением импульсивности и нарушением ожидания значимого стимула, но не обязательно сопровождается усилением тревожности [116, 223]. Напротив, дефицит γ -синуклеина приводит к снижению тревожности, более выраженному исследовательскому поведению, ускоренной адаптации к новой среде и увеличению ёмкости рабочей памяти при неизменном пространственном обучении [222]. Эти результаты показывают, что различия между членами семейства синуклеинов проявляются не только на молекулярном, но и на поведенческом уровне.

Значение имеет не только утрата функции отдельного синуклеина, но и нарушение баланса между разными членами семейства. Показано, что существенные изменения параметров электроэнцефалографии (ЭЭГ) у нокаутных животных могут быть связаны именно с дисбалансом экспрессии разных членов семейства, а не с отсутствием какого-то одного белка [224]. Это согласуется с представлением о том, что функции синуклеинов зависят не только от наличия каждого белка по отдельности, но и от их соотношения. Поэтому при анализе трансгенных моделей и моделей сверхэкспрессии важно учитывать, что искусственное изменение уровня одного из синуклеинов само по себе может влиять на развитие патологических изменений. [90, 2].

Исследования нокаутных моделей также показали, что проявления фенотипа зависят не только от инактивации конкретного гена, но и от генетического фона животных, их возраста и условий содержания [2]. Так как синуклеины, вероятно, повышают эффективность процессов, а не обеспечивают их абсолютную осуществимость, нарушения особенно заметны при старении, метаболической нагрузке или других стрессовых воздействиях. Это частично объясняет, почему сходные исследования, выполненные в разных лабораториях, иногда дают неодинаковые результаты [2]. Поэтому результаты, полученные на нокаутных моделях синуклеинов, следует интерпретировать с осторожностью: отсутствие выраженных изменений не означает полного отсутствия функциональных последствий.

Нокаутные модели существенно расширили представления о функциях синуклеинов. Эти белки участвуют не только в синаптической передаче, но и в регуляции моноаминового гомеостаза, адаптации нервной системы к возрастным и функциональным нагрузкам, а также частично компенсируют потерю друг друга при снижении экспрессии одного из членов семейства [2, 9, 222, 225]. Поэтому данные, полученные на нокаутных животных, важны для понимания нормальных функций синуклеинов и механизмов ранних стадий синуклеинопатий.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Экспериментальные животные

В работе использовались линии мышей, нокаутные по генам синуклеинов: JAXMice 028559 B6(Cg)-Sncat^{tm1.2Vlb/J} (SncatΔflox, Sncat Δflox KO) с конститутивным нокаутом гена Sncat [226], JAXMice 006390 B6.129-Sncb^{tm1.1Sud/J} с конститутивным нокаутом Sncb [219], линия JAXMice 008843 B6.129P2-Sncg^{tm1Vlb/J} с конститутивным нокаутом Sncg (группа γ-KO; [227]). Все нокаутные линии были получены на генетическом фоне линии C57BL/6J. Двойной нокаут α- и β-синуклеина (группа αβ-KO) и тройной нокаут α-, β- и γ-синуклеина (группа αβγ-KO) были получены в результате скрещивания исходных линий с одиночными нокаутами. Мыши дикого типа линии C57BL/6 (WT) использовались в качестве контрольной группы. Колонии содержались в условиях конвенционального вивария при температуре 22 °C и световом режиме 12/12 день/ночь со свободным доступом к еде и воде. Каждая опытная группа состояла не менее чем из 20 самцов; точный размер выборки указан для каждого теста в подписях к рисункам.

2.2 Клинический материал

В работе был использован биоматериал (слёзная жидкость и сыворотка крови) от пациентов с первичной открытоугольной глаукомой (ПОУГ) и условно здоровых добровольцев без глаукомы, наблюдавшихся в НМИЦ ГБ им. Гельмгольца, а также биоматериал (слёзная жидкость и плазма крови) от пациентов с болезнью Альцгеймера (БА) и условно здоровых добровольцев без нейродегенеративных заболеваний, наблюдавшихся в ФЦМН ФМБА России. От всех пациентов было получено информированное согласие на участие в исследовании.

В исследование были включены 25 пациентов с ПОУГ, в том числе 12 женщин и 13 мужчин. Контрольную группу условно здоровых лиц без диагноза и анамнеза глаукомы составили 13 человек (7 женщин и 6 мужчин)

(табл. 1). Пациенты наблюдались в Московском НИИ глазных болезней им. Гельмгольца Минздрава России. Всем пациентам проводили комплексное офтальмологическое обследование: визометрию, пневмотонометрию, биомикроскопию, гониоскопию, офтальмоскопию и статическую периметрию. Все пациенты с глаукомой получали инстилляцию гипотензивных офтальмологических препаратов для нормализации внутриглазного давления (ВГД). Ранняя стадия заболевания была диагностирована в 5 (20%) случаях, умеренная – в 7 (28%) случаях, развитая – в 8 (32%) случаях, тяжёлая – в 4 (16%) случаях, терминальная глаукома – в 1 (4%) случае (табл. 1). Средний возраст пациентов с глаукомой и добровольцев без глаукомы составил 73 ± 8 и 66 ± 12 лет соответственно. Исследование проводили в соответствии с Хельсинкской декларацией; оно было одобрено локальным этическим комитетом НИИ глазных болезней им. Гельмгольца (протокол № 55/3 от 17 июня 2021 г.).

Критериями исключения были значимые рефракционные нарушения (высокая миопия и гиперметропия, астигматизм более 2,0 диоптрий), неглаукомная патология зрительного нерва, выраженное помутнение роговицы и наличие в анамнезе острых нарушений мозгового кровообращения. Для исследования использовали кровь, взятую в рамках стандартного биохимического анализа. Сыворотку получали и хранили при температуре -80°C .

Таблица 1. Клинические данные пациентов и лиц контрольной группы.

№	Пол	Возраст, лет	Диагноз	Аутоантитела к γ -синуклеину	Стадия заболевания	Хирургическое лечение глаукомы
Контрольная группа						

№	Пол	Возраст, лет	Диагноз	Аутоантитела к γ-синуклеину	Стадия заболевания	Хирургическое лечение глаукомы
1	М	44	Симптомов глаукомы нет	-	НП	НП
2	Ж	91	Симптомов глаукомы нет	-	НП	НП
3	М	70	Симптомов глаукомы нет	-	НП	НП
4	М	85	Симптомов глаукомы нет	-	НП	НП
5	М	64	Симптомов глаукомы нет	-	НП	НП

№	Пол	Возраст, лет	Диагноз	Аутоантитела к γ-синуклеину	Стадия заболевания	Хирургическое лечение глаукомы
6	М	64	Симптомов глаукомы нет	-	НП	НП
7	Ж	80	Симптомов глаукомы нет	-	НП	НП
8	Ж	59	Симптомов глаукомы нет	-	НП	НП
9	Ж	48	Симптомов глаукомы нет	-	НП	НП
10	Ж	67	Симптомов глаукомы нет	-	НП	НП

№	Пол	Возраст, лет	Диагноз	Аутоантитела к γ-синуклеину	Стадия заболевания	Хирургическое лечение глаукомы
11	Ж	63	Симптомов глаукомы нет	-	НП	НП
12	М	62	Симптомов глаукомы нет	-	НП	НП
13	Ж	67	Симптомов глаукомы нет	-	НП	НП
Первичная открытоугольная глаукома						
14	М	80	ПОУГ	+	⁴ OU	Да
15	Ж	78	ПОУГ	-	³ OU	Нет
16	М	76	ПОУГ	-	⁵ OS; 2 OD	Да
17	М	78	ПОУГ	-	² OU	Да

№	Пол	Возраст, лет	Диагноз	Аутоантитела к γ-синуклеину	Стадия заболевания	Хирургическое лечение глаукомы
18	Ж	78	ПОУГ	-	1 OU	Нет
19	М	78	ПОУГ	-	4 OS; 1 OD	Нет
20	Ж	86	ПОУГ	-	1 OU	Нет
21	Ж	75	ПОУГ	-	3 OU	Да
22	М	69	ПОУГ	-	4 OS; 3 OD	Да
23	Ж	59	ПОУГ	-	1 OS, подозре ние на глауком у; 1 OD	Да
24	М	76	ПОУГ	+	3 OS; 1 OD	Да

№	Пол	Возраст, лет	Диагноз	Аутоантитела к γ-синуклеину	Стадия заболевания	Хирургическое лечение глаукомы
25	Ж	69	ПОУГ	-	OU, подозрение на глаукому	Нет
26	М	80	ПОУГ	+	2 OS; 1 OD	Да
27	М	69	ПОУГ	-	1 OS; 3 OD	Да
28	Ж	80	ПОУГ	-	2 OU	Нет
29	М	53	ПОУГ	-	3 OU	Да
30	М	76	ПОУГ	+	2 OS; 3 OD	Да
31	Ж	85	ПОУГ	-	2 OS; анофтальмия OD	Нет

№	Пол	Возраст, лет	Диагноз	Аутоантитела к γ -синуклеину	Стадия заболевания	Хирургическое лечение глаукомы
32	М	64	ПОУГ	-	3 OU	Нет
33	Ж	68	ПОУГ	-	OU, подозрение на глаукому	Нет
34	Ж	71	ПОУГ	-	3 OS; 1 OD	Нет
35	М	79	ПОУГ	-	4 OS; 3 OD	Да
36	Ж	68	ПОУГ	-	1 OS; 2 OD	Да
37	Ж	71	ПОУГ	-	2 OU	Да
38	М	65	ПОУГ	+	1 OS; 2 OD	Нет

Примечание. «+» – аутоантитела к γ -синуклеину выявлены; «-» – аутоантитела к γ -синуклеину не обнаружены; НП – неприменимо.

Для биохимического анализа использовали образцы 24 пациентов с болезнью Альцгеймера и 12 лиц контрольной группы, для которых были доступны результаты обоих анализов (табл. 2). У всех включённых пациентов с болезнью Альцгеймера стадия заболевания в исходной базе была обозначена как деменция. Клинические данные представлены в обезличенном виде с указанием номера образца из базы ФЦМН.

Таблица 2. Клинические данные пациентов с болезнью Альцгеймера и лиц контрольной группы, образцы которых использованы в обоих анализах.

№ образца	Пол	Возраст, лет	МоСА	ММSE	Длительность заболевания, мес.
Контрольная группа					
1102	М	38	н/д	н/д	НП
1103	Ж	51	н/д	н/д	НП
1104	М	37	н/д	н/д	НП
1105	М	25	н/д	н/д	НП
1106	М	34	н/д	н/д	НП
1107	М	74	н/д	н/д	НП
1108	Ж	27	н/д	н/д	НП
1109	Ж	70	н/д	н/д	НП
1110	М	35	н/д	н/д	НП
1111	Ж	51	н/д	н/д	НП
1112	Ж	23	н/д	н/д	НП
1113	Ж	26	н/д	н/д	НП
Болезнь Альцгеймера					
1001	М	65	8	12	36
1002	Ж	68	13	22	26
1004	Ж	77	11	20	36
1005	М	72	19	23	59
1006	М	63	14	21	36
1007	Ж	76	18	22	24
1008	Ж	83	15	17	72
1009	Ж	83	14	20	36
1010	Ж	70	18	21	24
1011	Ж	80	14	20	27
1012	Ж	63	13	н/д	60
1013	Ж	78	11	20	48

№ образца	Пол	Возраст, лет	МоСА	ММSE	Длительность заболевания, мес.
1014	М	77	20	24	48
1015	Ж	66	14	16	60
1016	Ж	74	13	20	36
1017	Ж	80	13	18	36
1018	М	77	8	13	58
1020	Ж	82	16	23	48
1021	Ж	70	15	21	48
1022	Ж	68	15	17	36
1023	Ж	87	10	18	48
1024	Ж	83	9	14	48
1025	Ж	70	19	24	36
1026	Ж	85	14	23	48

Примечание. НП – неприменимо; н/д – нет данных; значения МоСА и MMSE приведены в баллах.

2.3 Поведенческое тестирование

Животные из всех 4 экспериментальных групп (γ -КО, $\alpha\beta$ -КО, $\alpha\beta\gamma$ -КО и WT) проходили ряд стандартных моторных тестов в возрасте 6, 13 и 24 месяцев: «Сила хватки», «Перевернутая сетка», «Ускоряющийся ротарод». В возрасте 13 месяцев животные дополнительно проходили тесты, направленные на оценку ориентировочно-исследовательского поведения и психоэмоционального состояния: «Открытое поле», «Y-образный лабиринт», «Приподнятый крестообразный лабиринт», «Водный лабиринт Морриса». Перед каждым тестом животных помещали в экспериментальную комнату за 30 минут до начала тестирования для адаптации. Моторные и когнитивные тесты проводились при освещении, соответствующем обычным условиям содержания животных около 20 лк. Поведение в «Открытом поле», Y-образном и приподнятом крестообразном лабиринтах записывалось на видео и анализировалось с помощью программного пакета EthoVision XT 11 (Noldus, Нидерланды), «Водный лабиринт Морриса» регистрировали и анализировали при помощи программы Any-maze (Дублин, Ирландия).

В тесте «Сила хватки» мышь удерживали за хвост, позволяя ей схватиться за металлическую решётку ($7 \times 12,1$ см, ячейки 6×6 мм), соединённую с прибором для измерения силы хватки (ALMEMO, Германия). Для анализа использовали среднее значение силы, измеренное для 6 попыток [228].

В тесте «Перевернутая сетка» мышь помещали на металлическую сетку ($33,6 \times 34,3$ см, ячейки $1,3 \times 1,3$ см), затем сетку переворачивали и фиксировали на высоте 50–60 см над мягкой подложкой. Регистрировали время до падения. Максимальное время теста составляло 60 секунд. Животным, упавшим раньше, давали ещё 2 попытки с интервалом в 15 минут. Для анализа использовали лучший результат из трёх попыток [229].

В тесте «Ускоряющийся ротарод» мышь помещали на стержень, вращающийся с возрастающей скоростью (Ugo Basile 7650, Италия). За день до теста мышей тренировали в том же аппарате при постоянной скорости (4 об/мин) в течение 10 мин. В день теста аппарат ускорялся от 4 до 40 об/мин за 4 минуты, затем оставался на максимальной скорости ещё 1 минуту. Каждой мыши предоставляли 4 попытки с 45-минутными интервалами. Регистрировали время до падения со стержня [230].

В тесте «Открытое поле» мышь помещали в арену размером 40×40 см с высотой стен 40 см (OpenScience, Россия), освещённую рассеянным светом (15 лк в центре, 10 лк в углах). В течение 5 минут вели запись активности (камера Basler acA1300-60). Анализ проводили при помощи программного обеспечения EthoVision XT 11.5. Регистрировали следующие параметры: общая пройденная дистанция, время и число выходов в центр арены (квадрат 20×20 см, равноудалённый от стенок) [231, 232, 233, 234].

В тесте «Y-образный лабиринт» животное помещали в установку, состоящую из трёх рукавов ($40 \times 6 \times 20$ см каждый), сходящихся в центре под углом 120° (OpenScience, Россия). Тест состоял из 2 этапов по 5 минут с интервалом 30 минут. В первую попытку был открыт доступ к двум рукавам, во вторую – ко всем. Предпочтение нового рукава рассчитывалось как процент

посещений нового рукава за первые 2 минуты второго этапа. Также учитывались общая дистанция, скорость и время в каждом рукаве [235].

В тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» установка состояла из четырёх рукавов, расходящихся от центральной площадки под углом 90°: два из них были открытыми (без стенок), а два других имели высокие стенки («закрытые»). Мышь помещали на центральную площадку лицом к открытому рукаву и давали ей свободно исследовать лабиринт в течение 5 минут. Освещённость в центре составляла 380–400 лк. Регистрировали время и число заходов в открытые рукава, дистанцию и скорость [236, 237].

В тесте «Водный лабиринт Морриса» использовался бассейн диаметром 150 см, заполненный водой температурой 22 °С до уровня 60 см (OpenScience, Россия). Скрытая платформа диаметром 10 см находилась на 1 см ниже поверхности, её положение не меняли все время обучения. Обучение мышей проводилось на протяжении 4 дней, в каждый из которых было по 4 попытки. Максимальное время, отведённое для нахождения платформы, составило 60 секунд. На 5-й день проводили тестовую попытку без платформы (время – 90 секунд). Регистрировали время нахождения платформы в каждой из попыток и число пересечений зоны платформы в тестовый день. Общую физическую активность оценивали по скорости плавания и пройденной дистанции [238].

2.4 Оценка выживаемости животных

По завершении поведенческого фенотипирования животные оставались под дальнейшим наблюдением и содержались в стандартных условиях вивария до наступления естественной смерти. Для каждой особи фиксировали число прожитых дней, которое использовали как показатель общей продолжительности жизни. Анализ выживаемости проводили с применением метода Каплана–Майера, позволяющего оценить вероятность дожития во времени на основе данных о времени наступления события.

2.5 Вестерн-блот анализ синаптических белков

Образцы дорсального стриатума и коры головного мозга гомогенизировали в 2× Лэммли буфере при помощи пестикового гомогенизатора и подвергали термической денатурации при 95 °С в течение 5 минут. После разделения белков методом электрофореза в 14 % полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) их переносили на мембрану из поливинилиденфторида (PVDF; Hybond-P, Amersham) методом полусухого переноса. Затем мембраны блокировали в растворе 4% обезжиренного сухого молока в TBST-буфере (Tris-солевой буфер с 0,1% Tween 20) с последующей инкубацией в первичных антителах к синаптическим белкам: синаптофизин (SYP; 1:5000, S31620, BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, США), синапсин IIa (Syn IIa; 1:10000, 610666, BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, США), амфифизин (AMPH; 1:10000, A59420, Transduction Laboratories, Franklin Lakes, США), тирозингидроксилаза (ТГ; 1:10000, t1299, Sigma-Aldrich, Burlington, США). Далее мембрану инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP; разведение 1:4000, кат. №5178-2504, Bio-Rad, Hercules, США). Детекцию проводили методом усиленной хемилюминесценции (ECL) согласно протоколу производителя (Thermo Fisher Scientific, Waltham, США). После визуализации синаптических белков мембраны повторно инкубировали с антителами против α -тубулина (1:10000, Proteintech, Rosemont, США) для контроля загрузки белка.

2.6 Иммуногистохимический анализ

Образцы тканей фиксировали в охлаждённом растворе Карнуа, состоящем из 60% этанола, 30% хлороформа и 10% уксусной кислоты. Дальнейшую обработку проводили с опорой на ранее описанные протоколы [220, 227, 239]. Образцы помещали в раствор Карнуа и инкубировали при 4°С на качающейся платформе в течение 18 часов. После фиксации ткани,

находившиеся в гистологических кассетах, отмывали от фиксирующего раствора в 70% этаноле в течение 30 минут.

Дегидратацию проводили при комнатной температуре путём последовательной инкубации образцов в спиртах возрастающей концентрации: 96% этанол – 5 минут, 96% этанол – 10 минут, 100% этанол – дважды по 10 минут. Затем кассеты с образцами переносили на 30 минут в смесь этанола и хлороформа в соотношении 1:1, после чего выдерживали в хлороформе в течение 1 часа. Далее хлороформ заменяли свежим раствором, и образцы оставляли на ночь при 4°C на качающейся платформе.

Пропитывание тканей парафином выполняли в гистологическом процессоре Leica ASP300 (Leica Biosystems, Германия) с использованием расплавленного парафина Formula 'R' (Leica Biosystems, Германия) при 60°C. Обработку проводили в три смены парафина, по 1 часу каждая. Заливку образцов в парафиновые блоки осуществляли с помощью станции Leica EG1160 (Leica Biosystems, Германия). Полученные блоки хранили при комнатной температуре.

Серийные срезы толщиной 8 мкм изготавливали на ротационном микротоме MT POINT RMD-3000 (МедТехникаПоинт, Россия) и монтировали на предметные стёкла, предварительно покрытые поли-L-лизинном (Thermo Scientific, Великобритания). Анатомическую локализацию исследуемых структур определяли с использованием атласа [240].

2.6.1 Подготовка серий срезов для морфометрического анализа

Для подсчёта дофаминергических нейронов в пределах всей исследуемой области чёрной субстанции формировали серии срезов, как описано ранее [221, 239], с внесением отдельных модификаций. В пределах анализируемой зоны на предметные стёкла монтировали каждый пятый срез; всего в одну серию включали 10 срезов, согласно схеме, представленной на рисунке 4. Как правило, для полного охвата исследуемой области с небольшим запасом требовалось шесть серий срезов.

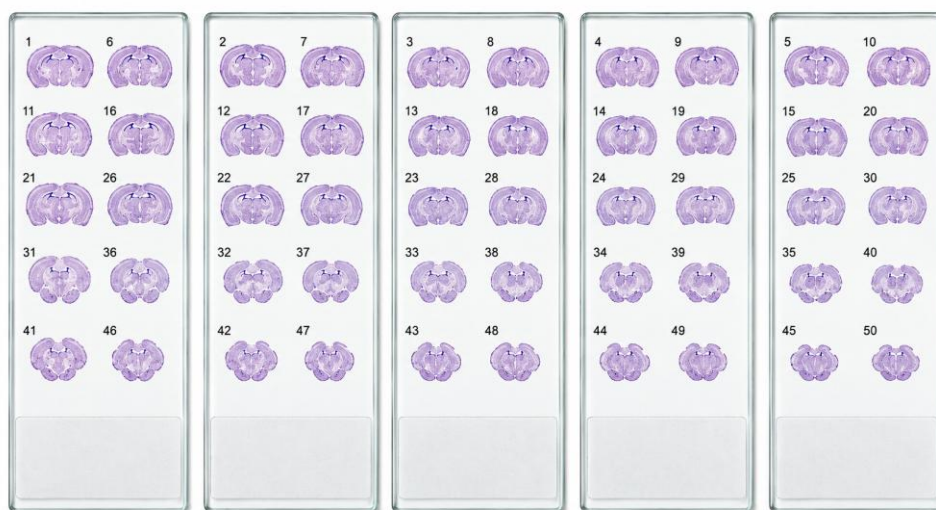


Рисунок 4. Схема размещения срезов на предметных стёклах и принцип нумерации срезов в области подсчёта для зоны чёрной субстанции и вентральной области покрышки.

2.6.2 Иммуногистохимическое окрашивание

Перед проведением иммуногистохимического окрашивания срезы депарафинировали в ксилоле в течение 20 минут при постоянном встряхивании с использованием многофункционального программируемого аппарата Leica ST5020 (Leica Biosystems, Германия). Затем препараты регидратировали при комнатной температуре в серии спиртов понижающейся концентрации по следующей схеме: 100% этанол – 20 минут, 95% этанол – 10 минут, 50% этанол – 10 минут, деионизованная вода – 10 минут.

Для демаскировки антигенов регидратированные срезы инкубировали в течение 10 минут в кипящем цитратном буфере pH 6,0, содержащем 2,94 г/л трёхосновного дигидрата цитрата натрия. После этого препараты оставляли в том же растворе на 30 минут при комнатной температуре для постепенного охлаждения.

Активность эндогенных пероксидаз блокировали путём инкубации срезов в quench solution, приготовленном из 25 мл 30% H_2O_2 и 225 мл метанола, в течение 20 минут при 4°C. Затем препараты промывали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) и инкубировали в блокирующем буфере, содержащем 10% лошадиной сыворотки и 0,1% Tween 20, в течение 1 часа при комнатной температуре.

Далее срезы инкубировали с первичными антителами при 4°C в течение ночи. Для выявления ТГ использовали моноклональные антитела (разведение 1:2000 t1299 Sigma-Aldrich, Burlington, США).

После инкубации с первичными антителами препараты дважды промывали в ФСБ, затем инкубировали в течение 1,5 часа со вторичными биотинилированными антителами против IgG мыши (Vector Laboratories, Великобритания) в разведении 1:1000 с добавлением 0,1% Tween 20. После этого срезы снова дважды промывали в ФСБ.

Для визуализации иммуногистохимической реакции препараты инкубировали с раствором ABC (Vector Laboratories, Великобритания), содержащим комплекс авидин–биотин с HRP, 45 минут при комнатной температуре. Затем срезы дважды промывали дистиллированной водой. В качестве хромогенного субстрата использовали 3,3'-диаминобензидин (ДАБ; Sigma-Aldrich, США). Инкубацию проводили в течение 5 минут при комнатной температуре, после чего реакцию останавливали добавлением дистиллированной воды. Далее препараты дважды промывали в воде по 10 минут.

После завершения окрашивания срезы дегидратировали: 50% этанол – 10 минут, 95% этанол – 10 минут, 100% этанол – 20 минут, ксилол – 20 минут. Покровные стёкла монтировали с использованием монтирующей среды HistoPoint (ГИСТОПОИНТ, Россия), после чего препараты высушивали при комнатной температуре.

2.6.3 Микроскопия и подсчёт дофаминергических нейронов

Анализ препаратов выполняли на микроскопе Carl Zeiss Axio Lab.A1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия). Микрофотографии получали с использованием камеры Zeiss AxioCam 105 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия) и программного обеспечения Zeiss Zen 2.3 Lite (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия). Съёмку проводили при увеличении $\times 20$ для подсчёта дофаминергических нейронов и при увеличении $\times 40$ для измерения их диаметра.

Подсчёт выполняли отдельно для правой и левой частей чёрной субстанции. На основании полученных данных рассчитывали суммарное количество дофаминергических нейронов во всём объёме анализируемой анатомической структуры. Поскольку диаметр нейрона может превышать толщину микротомного среза, часть клеток, видимых на препарате, представляла собой не целые объекты, а их фрагменты. Для внесения соответствующей поправки измеряли диаметр 30 нейронов, расположенных в пределах исследуемой зоны.

Общее число нейронов в популяции корректировали с использованием поправки Абекромби [241, 242, 243] по формуле:

$$P = (1/F) \times A \times M / (D + M),$$

где P – скорректированное общее число нейронов в популяции, F – частота отбора срезов для подсчёта, равная 1/5, A – количество тел нейронов, зарегистрированных в зоне подсчёта, M – толщина среза, мкм, D – средний диаметр ядра.

2.7 Оценка ВГД

Экспериментальным животным (γ -КО и WT мышам) однократно инстиллировали по 10 мкл 1% гидрохлорида фенилэфрина (Mesaton, Dalkhimfarm, Хабаровск, Россия), 0,5% малеата тимолола (Timolol, Diapharm, Москва, Россия), 1% пилокарпина (Pilocarpine, Renewal, Новосибирск, Россия), 0,1% сульфата атропина (Atropine, Dalkhimfarm, Хабаровск, Россия), 10% дофамина (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA) в 0,9% NaCl и 0,25% галоперидола (Haloperidol, Velpfarm, Москва, Россия) в оба глаза. ВГД измеряли под общей анестезией (Avertin, 200 мг/кг, внутривенно) с помощью автоматического электронного тонометра Tonovet (Icare Finland Oy, Vantaa, Финляндия) утром, до инстилляции и через 1 и 2 часа после неё. В предварительных экспериментах было установлено, что общая анестезия авертином не влияет на уровень ВГД ни у γ -КО, ни у WT мышей.

2.8 Определение активности $\alpha 2$ -МГ и общего белка в слёзной жидкости

Слёзную жидкость собирали с помощью полоски фильтровальной бумаги (у мышей) или офтальмологических полосок для сбора слёзной жидкости (у пациентов), которые помещали за нижнее веко на 5 минут. У мышей слёзную жидкость собирали из обоих глаз, после чего компоненты слёзной жидкости одной особи элюировали в течение 20 минут физиологическим раствором (50 мкл) в одной пробирке. У пациентов слёзную жидкость из правого и левого глаза собирали и обрабатывали отдельно; белки элюировали в 100 мкл физиологического раствора, после чего значения, полученные для двух глаз, усредняли и использовали как индивидуальный показатель пациента. Полученные элюаты центрифугировали в течение 10 минут при 3000 об/мин, после чего супернатант использовали для анализа. В элюате слёзной жидкости концентрацию белка определяли по методу Лоури [244], а активность $\alpha 2$ -МГ – ферментативным методом со специфическим субстратом N-бензоил-DL-аргинин-п-нитроанилидом (BAPN), как описано ранее [214]. Активность $\alpha 2$ -МГ выражали в нмоль/мин $\times$ мл слёзной жидкости и нмоль/мин $\times$ мг белка. Оптическую плотность образцов измеряли на многофункциональном фотометре для микропланшетов Synergy MX (BioTek, Winooski, VT, США).

2.9 Выявление аутоантител к γ -синуклеину

Для выявления аутоантител к γ -синуклеину в сыворотке крови использовали иммуноблоттинг [245]. Проводили электрофоретическое разделение 0,15 мкг очищенного рекомбинантного белка человеческого γ -синуклеина в 14% денатурирующем полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия. Затем образцы переносили на PVDF-мембрану (Hybon-P, Amersham, Sheffield, Великобритания) полусухим методом.

Блокирование мембраны проводили в растворе 4% обезжиренного сухого молока (NFDМ), приготовленном в солевом буфере TBST (Tris-buffered saline, 0,1% Tween 20). Затем мембрану инкубировали с образцами сыворотки,

разведёнными в 200 раз в растворе 4% NFDM в TBST, в течение ночи при 4 °С. Далее проводили инкубацию с HRP-конъюгированными антителами против человеческого IgG (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), в том же буфере, что и образцы сыворотки (разведение 1:3000), в течение 1,5 ч при комнатной температуре. Детекцию образовавшегося комплекса первичных и вторичных аутоантител выполняли с использованием набора для хемилюминесцентного выявления (ECL Plus, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) в соответствии с инструкцией производителя. Для регистрации хемилюминесценции применяли рентгеновскую плёнку (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). При наличии антител к γ -синуклеину на рентгеновской плёнке определялась полоса, соответствующая молекулярной массе γ -синуклеина 17 кДа.

2.10 Определение содержания γ -синуклеина в слёзной жидкости и плазме крови

Концентрацию γ -синуклеина в образцах плазмы крови и слёзной жидкости определяли методом сэндвич-иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческого набора ELISA Kit for Synuclein Gamma, human, SEA939Hu (Cloud-Clone Corp., США), согласно инструкции производителя. Образцы крови центрифугировали для получения плазмы крови; слёзную жидкость после сбора центрифугировали при 1000×g в течение 20 мин, для анализа использовали супернатант. До проведения анализа образцы хранили аликвотами, избегая повторных циклов замораживания–размораживания при температуре -80°C. Стандарты готовили в диапазоне 31,2–2000 пг/мл. В лунки планшета вносили по 100 мкл стандартов, холостого образца или исследуемых образцов и инкубировали 1 ч при 37 °С. Затем последовательно добавляли детекционные реагенты А и В с промежуточными промывками, после чего вносили тетраметилбензидиновый (ТМВ) субстрат. Реакцию останавливали стоп-раствором, и оптическую плотность измеряли при 450 нм. Концентрацию γ -синуклеина рассчитывали по стандартной

кривой с учетом фактора разведения. Диапазон определения набора составлял 31,2–2000 пг/мл белка, минимальная определяемая концентрация – менее 12,5 пг/мл.

2.11 Статистическая обработка данных

Статистический анализ проводился при помощи программного пакета GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, США). Данные представлены на рисунках в виде среднего значения $\pm$ стандартной ошибки среднего, если не указано иное. Цифры внутри столбцов указывают количество животных в группе. Выбор статистического критерия для анализа данных проводился на основании результатов теста на соответствие выборки нормальному распределению Д'Агостино-Пирса. В случае нормального распределения использовался однофакторный дисперсионный анализ, в ином случае его непараметрический аналог – тест Краскела-Уоллиса. Используемый статистический критерий и уровень значимости p для каждого теста указаны в подписях к рисункам. Анализ проводился в режиме слепого ввода данных: исследователи не знали распределение индивидуальных значений по группам до завершения анализа.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Фенотипические проявления дефицита γ -синуклеина у нокаутных мышей

Для оценки последствий дефицита γ -синуклеина на уровне целостного организма на первом этапе была проведена характеристика фенотипа нокаутных животных. Анализ включал оценку продолжительности жизни, моторных функций и поведенческих реакций мышей с различными вариантами нокаута генов семейства синуклеинов. Сопоставление этих показателей позволяло выявить изменения, связанные непосредственно с отсутствием γ -синуклеина, и сравнить их с эффектами дефицита других членов семейства.

3.1.1 Продолжительность жизни мышей с дефицитом γ -синуклеина

Продолжительность жизни является интегральным показателем функционального состояния организма, отражающим совокупное влияние нарушений, возникающих в течение онтогенеза. В связи с этим первым этапом фенотипической характеристики стала оценка выживаемости мышей с различными вариантами нокаута генов синуклеинов.

Нами был проведён сравнительный анализ выживаемости мышей, нокаутных по гену *Sncg* (γ -КО), и животных дикого типа (WT). Для оценки специфического вклада γ -синуклеина дополнительно анализировали мышей с одновременной инактивацией генов *Sncg* и *Sncb* при сохранном гене *Sncg* ($\alpha\beta$ -КО), а также животных с нокаутом всех трёх генов синуклеинов ($\alpha\beta\gamma$ -КО). Такое сопоставление позволяло определить, связано ли изменение продолжительности жизни преимущественно с отсутствием γ -синуклеина или является следствием общей недостаточности белков данного семейства. Анализ кривых выживаемости показал статистически значимое снижение продолжительности жизни у γ -КО и $\alpha\beta\gamma$ -КО мышей по сравнению с

животными дикого типа, тогда как группа $\alpha\beta$ -КО не отличалась от контроля (рис. 5).

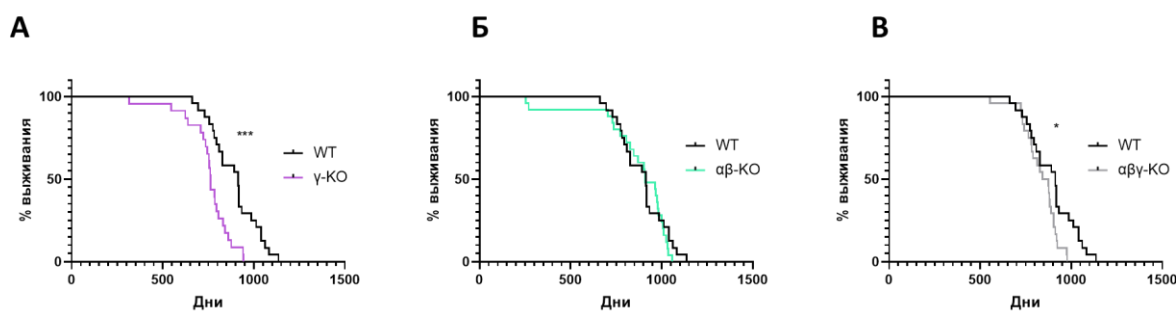


Рисунок 5. Кривые выживаемости животных, нокаутных по γ -синуклеину (γ -КО) (А), двойных нокаутов по α - и β -синуклеину ($\alpha\beta$ -КО) (Б) и бессинуклеиновых животных с тройным нокаутом синуклеинов ($\alpha\beta\gamma$ -КО) (В). Статистический анализ производился при помощи теста Мантела-Кокса. * – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$.

Медиана выживаемости для мышей WT составила 913 дней, для $\alpha\beta$ -КО – 910 дней, для $\alpha\beta\gamma$ -КО – 859 дней. Наиболее выраженное снижение данного показателя наблюдалось у γ -КО животных, у которых медиана выживаемости составила 763 дня, что на 150 дней меньше по сравнению с группой WT. Таким образом, инактивация генов *Snca* и *Sncb* при сохранном *Sncg* не сопровождалась изменением продолжительности жизни, тогда как отсутствие γ -синуклеина было связано с её снижением. При этом дополнительная инактивация α - и β -синуклеинов у $\alpha\beta\gamma$ -КО животных не приводила к дальнейшему уменьшению медианы выживаемости, что указывает на специфический вклад γ -синуклеина в поддержание нормальной продолжительности жизни животных.

3.1.2 Изменения моторных функций

Снижение продолжительности жизни отражает общий эффект дефицита γ -синуклеина, однако не позволяет определить, какие функциональные нарушения вносят вклад в формирование фенотипа нокаутных животных. Поэтому на следующем этапе была проведена оценка моторных функций, позволяющая охарактеризовать состояние двигательной системы при различных вариантах нокаута генов синуклеинов. Для анализа возможной

возрастной динамики выявленных изменений тестирование проводили в возрасте 6, 13 и 24 месяца в стандартном наборе тестов: «Сила хватки», «Перевернутая сетка» и «Ускоряющийся ротарод».

На первом этапе моторные функции оценивали у 6-месячных животных. Этот возраст соответствует зрелому взрослому состоянию мышц и позволяет выявить изменения, связанные с генотипом, до развития выраженных возраст-зависимых нарушений двигательной функции. Полученные в этой возрастной группе показатели использовали как исходную точку для последующего анализа динамики моторного фенотипа у 13- и 24-месячных животных. По результатам теста «Перевернутая сетка» не было выявлено статистически значимых различий между экспериментальными группами, хотя и наблюдалась некоторая тенденция к уменьшению времени удержания на сетке у γ -КО мышей (рис. 6Б). Можно заключить, что нарушений в кратковременной мышечной выносливости в условиях возможности переноса усилия с одной конечности на другую и их координации у нокаутных по синуклеинам животных данного возраста не выявляется.

При проведении теста «Ускоряющийся ротарод» было выявлено снижение времени падения со стержня у $\alpha\beta$ -КО мышей по сравнению с животными дикого типа (время до падения снижено на 28%), что может свидетельствовать о нарушении координации или снижении выносливости у этих животных (рис. 6В). Вместе с этим γ -КО мыши продемонстрировали такие же результаты, как и животные дикого типа. Таким образом, координация движения и выносливость больше зависят от присутствия в нервной системе α - и β -синуклеинов, чем γ -синуклеина. Мыши $\alpha\beta\gamma$ -КО, напротив, продемонстрировали большее время удержания, что может быть связано с компенсацией утраты всех трёх белков семейства либо с общей гиперактивностью этих мышей (см. далее).

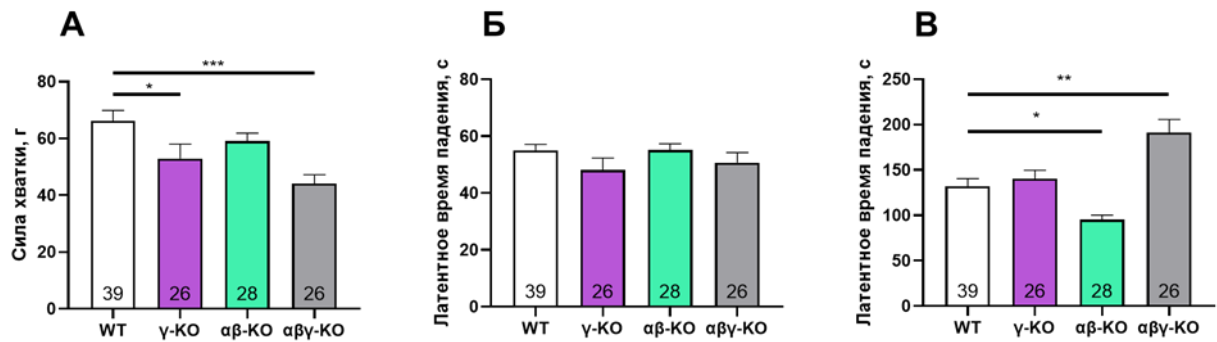


Рисунок 6. Моторные функции 6-месячных мышей, нокаутных по генам синуклеинов, в сравнении с животными дикого типа. А – тест «Сила хватки», Б – тест «Перевёрнутая сетка», В – тест «Ускоряющийся ротарод». Данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего. Статистический анализ производился при помощи теста Краскела-Уоллиса с поправкой Данна на множественные сравнения. Обозначения: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$. Размер выборки представлен в виде обозначений внутри столбцов.

На следующем этапе экспериментальные животные были протестированы в 13 месяцев, что соответствует среднему возрасту для мышей. Данная возрастная точка была выбрана для характеристики двигательного фенотипа в среднем возрасте, когда возраст-зависимые изменения нервной и мышечной систем уже могут начинать проявляться, но ещё не достигают выраженности, характерной для стареющих животных. В тесте «Сила хватки» у 13-месячных животных так же, как и у 6-месячных было выявлено снижение силы хватки в группах мышей γ -КО и $\alpha\beta\gamma$ -КО (рис. 7А). Мыши $\alpha\beta$ -КО не отличались от группы контроля. В тесте «Перевёрнутая сетка», в отличие от более молодых животных, наблюдалось уже статистически достоверное уменьшение времени до падения у мышей γ -КО, тогда как группы $\alpha\beta$ -КО и $\alpha\beta\gamma$ -КО не отличались от WT (рис. 7Б). Это указывает на постепенную прогрессию ухудшения моторных функций у γ -КО мышей. В тесте «Ускоряющийся ротарод» отмечалась тенденция к снижению времени удержания на стержне только для группы $\alpha\beta$ -КО, тогда как для $\alpha\beta\gamma$ -КО мышей, в отличие от 6-месячных животных, не было зафиксировано достоверного повышения этого показателя (рис. 7В).

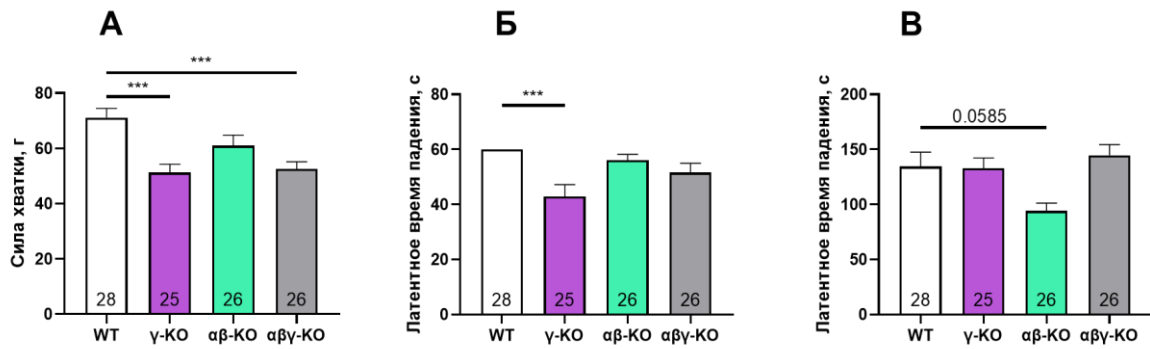


Рисунок 7. Моторные функции 13-месячных мышей, нокаутных по генам синуклеинов, в сравнении с животными дикого типа. А – тест «Сила хватки», Б – тест «Перевёрнутая сетка», В – тест «Ускоряющийся ротарод». Данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего. Статистический анализ производился при помощи теста Краскела-Уоллиса с поправкой Данна на множественные сравнения. Обозначения: *** – $p < 0,001$; в отдельных случаях точное значение p указано на графике. Размер выборки представлен в виде обозначений внутри столбцов.

Следующая временная точка тестирования составила 24 месяца, что соответствует периоду старения у мышей. В данном возрасте уже не регистрировалось снижение мышечной силы у γ -КО мышей в сравнении с контрольными животными в тесте «Сила хватки», тогда как у тройных нокаутов различия сохранялись (рис. 8А). Стоит отметить, что у стареющих WT мышей (24 месяца) мышечная сила была снижена в сравнении с протестированными ранее возрастными группами ($p = 0,0040$, анализ смешанных эффектов с поправкой Тьюки на множественное сравнение, для 13 и 24 месяцев), что, по-видимому, связано с естественным процессом старения этих животных. Очевидно, что отсутствие γ -синуклеина снизило мышечную силу в молодом возрасте, но не способствовало дальнейшему ухудшению этих показателей с возрастом, тогда как нокаут всех трёх синуклеинов оказал более выраженный негативный эффект [246]. В то же время наблюдалась прогрессия в ухудшении показателей при выполнении теста «Перевёрнутая сетка» у всех нокаутных групп мышей по сравнению с контрольными животными (рис. 8Б). В тесте «Ускоряющийся ротарод», как и у 6-месячных животных, наблюдалось увеличение времени удержания у $\alpha\beta\gamma$ -КО мышей. Мыши с одиночным и двойным нокаутом синуклеинов в данном тесте не отличались от контрольных животных. Так же, как и в случае с силой хватки для

контрольных животных, в данном тесте наблюдалось снижение абсолютных значений регистрируемого параметра по мере старения ($p = 0,0044$, анализ смешанных эффектов с поправкой Тьюки на множественное сравнение, для 13 и 24 месяцев).

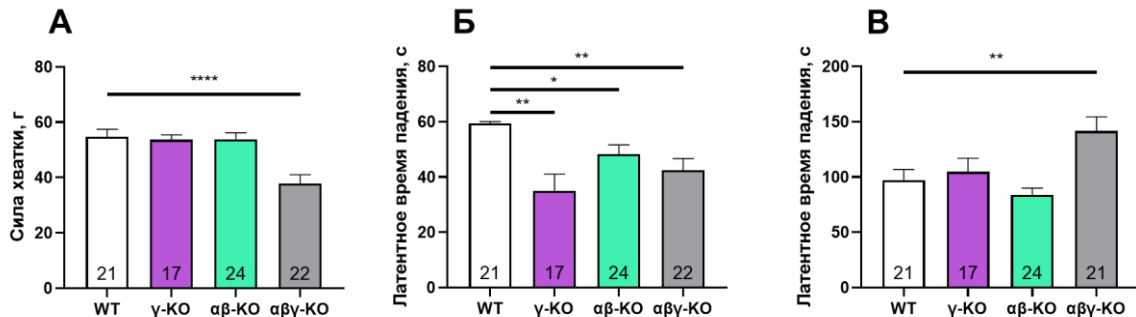


Рисунок 8. Моторные функции 24-месячных мышей, нокаутных по генам синуклеинов, в сравнении с животными дикого типа. А – тест «Сила хватки», Б – тест «Перевёрнутая сетка», В – тест «Ускоряющийся ротарод». Данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего. Статистический анализ производился при помощи теста Краскела-Уоллиса с поправкой Данна на множественные сравнения (Б) и однофакторного дисперсионного анализа с поправкой Даннетта на множественное сравнение (А, В). Обозначения: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; **** – $p < 0,0001$. Размер выборки представлен в виде обозначений внутри столбцов.

3.1.3 Изменения тревожноподобного поведения и когнитивных показателей

Для дальнейшей характеристики фенотипа нокаутных животных было важно установить, ограничиваются ли выявленные изменения нарушениями моторных функций или затрагивают также другие аспекты функционирования нервной системы. В связи с этим у 13-месячных мышей, у которых двигательные изменения уже были достаточно выражены, но ещё не доминировали возраст-зависимые нарушения, дополнительно исследовали тревожноподобное и ориентировочно-исследовательское поведение, а также показатели кратковременной и долговременной памяти.

Первым в этой серии был проведён тест «Открытое поле». Анализ поведения животных в «Открытом поле» показал, что общая двигательная и исследовательская активность не изменена у γ-KO мышей. На это указывают такие параметры, как «общая пройденная дистанция» и «количество входов в

центр арены», которые не отличались от аналогичных показателей контрольной группы (рис. 9А, В). В то же время у двойных нокаутов $\alpha\beta$ -КО, а также у тройных нокаутов $\alpha\beta\gamma$ -КО оба этих показателя были значимо выше в сравнении с группой WT. Интересно, что такая гиперактивность подтверждает результаты моторных тестов для тройных нокаутов, в то время как у двойных нокаутов проявилась только в «Открытом поле». Возможно, что для $\alpha\beta$ -КО в данном случае более выражен компонент исследовательской активности, чем только двигательной. На это косвенно указывает тенденция к увеличению времени, проведённому в центре арены именно у двойных нокаутов в сравнении с другими группами (рис. 9Б).

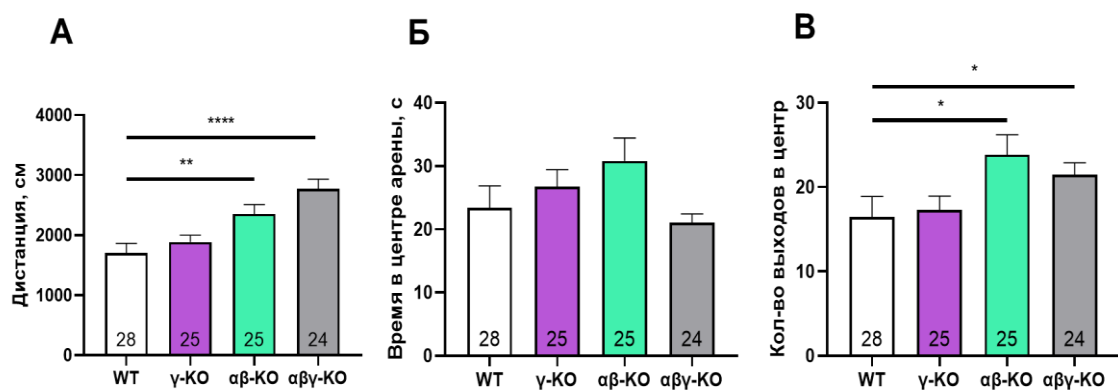


Рисунок 9. Тест «Открытое поле» 13-месячных мышей, нокаутных по генам синуклеинов, в сравнении с животными дикого типа. А – средняя дистанция, Б – количество времени, проведённое в центре арены, В – количество выходов в центр арены. Данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего. Статистический анализ производился при помощи теста Краскела-Уоллиса с поправкой Данна на множественные сравнения (Б, В) и однофакторного дисперсионного анализа с поправкой Даннетта на множественное сравнение (А). Обозначения: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; **** – $p < 0,0001$. Размер выборки представлен в виде обозначений внутри столбцов.

Для анализа кратковременной памяти использовали тест «Y-образный лабиринт». Различий между группами по параметру «посещение нового рукава лабиринта» выявлено не было, и все животные продемонстрировали повышенный интерес (более 40%) к неисследованному ранее рукаву (рис. 10Б). Это свидетельствует об отсутствии нарушений кратковременной памяти у всех протестированных животных. В данном тесте также отмечался гиперактивный фенотип у животных с тройным и двойным нокаутом

синуклеинов, о чем свидетельствует увеличение общей пройденной дистанции за время теста (рис. 10А), что согласуется с результатами, полученными в тесте «Открытое поле».

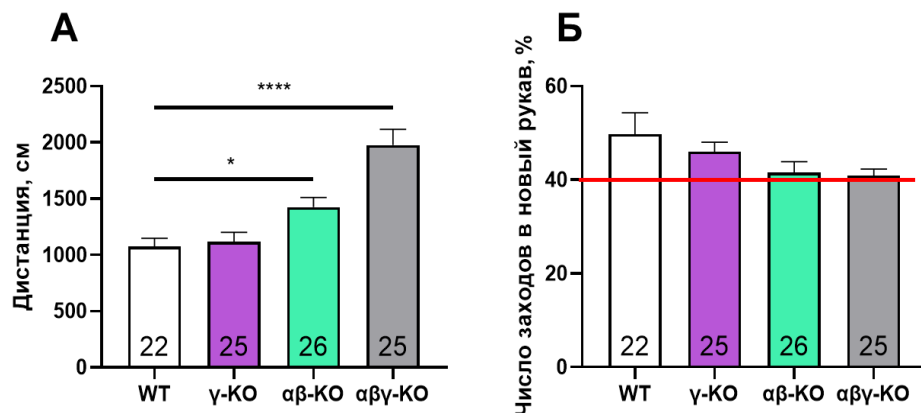


Рисунок 10. Тест «Y-образный лабиринт» 13-месячных мышей с нокаутом генов синуклеинов и животных дикого типа. А – средняя пройденная дистанция, Б – доля заходов в «новый» рукав от общего числа посещений рукавов лабиринта. Данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего. Статистический анализ производился при помощи теста Краскела-Уоллиса с поправкой Данна на множественные сравнения (Б) и однофакторного дисперсионного анализа с поправкой Даннетта на множественное сравнение (А). Обозначения: * – $p < 0,05$; **** – $p < 0,0001$. Размер выборки представлен в виде обозначений внутри столбцов.

Далее был проведён анализ долговременной памяти в тесте «Водный лабиринт Морриса». Животные из всех групп показали постепенное уменьшение времени, затрачиваемого ими на поиск платформы, что отражает нормальный процесс обучения (рис. 11А). В то же время кривые обучения нокаутных мышей показывают, что они обучались несколько хуже, по крайней мере в первые дни тестирования. Мыши, нокаутные по γ -синуклеину и всем трём синуклеинам, демонстрировали значительно меньшую среднюю скорость плавания, что может говорить, как о нарушениях мышечной силы и выносливости, так и о недостаточной оценке аверсивной стимуляции, которую создает для мышей сам факт пребывания в воде (рис. 11В).

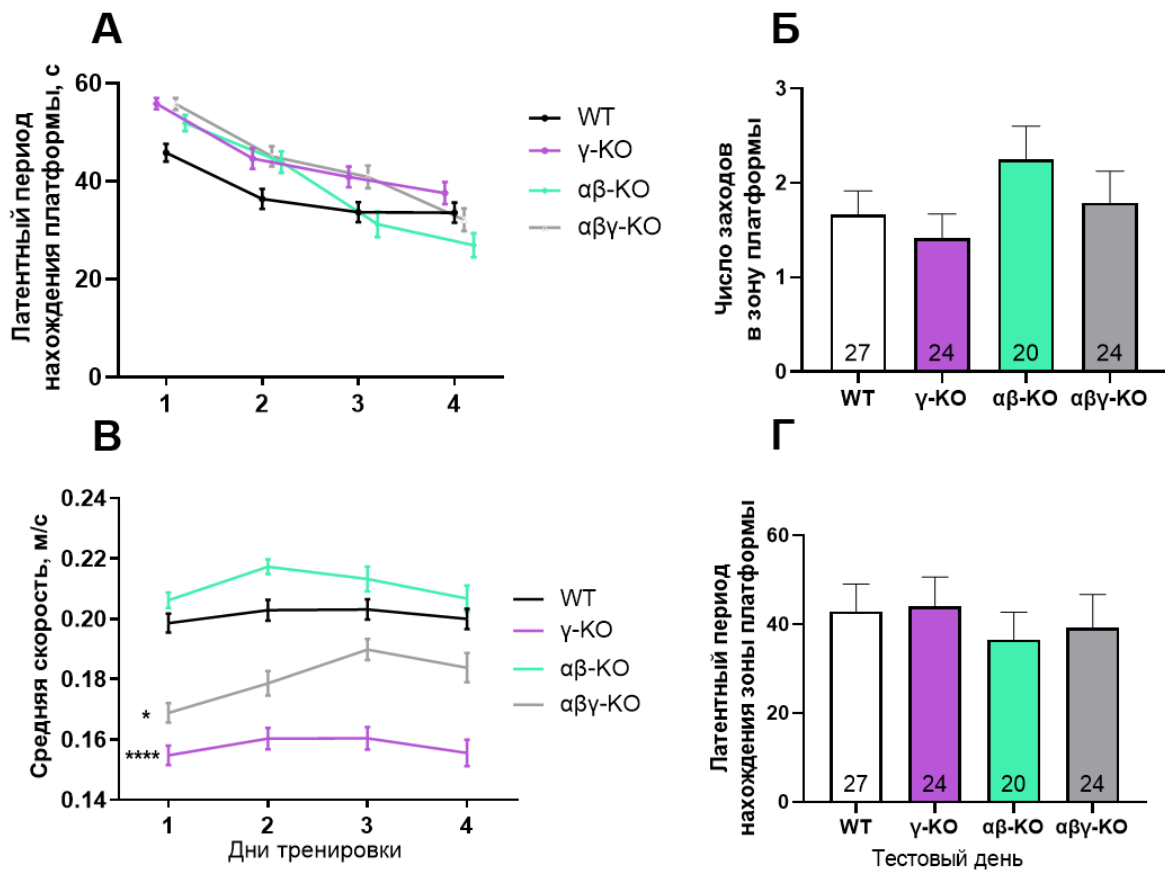


Рисунок 11. Тест «Водный лабиринт Морриса» 13-месячных мышей с нокаутом генов синуклеинов и животных дикого типа. А – латентный период нахождения платформы во время обучения в течение 4 дней, Б – число заходов в зону платформы во время тестирования на 5 день, В – средняя скорость животных во время обучения в течение 4 дней, Г – латентный период первого захода в зону платформы во время тестирования на 5 день. Данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего. Статистический анализ производился при помощи теста Краскела-Уоллиса с поправкой Данна на множественные сравнения (Б, Г) и двухфакторного дисперсионного анализа с поправкой Даннетта на множественное сравнение (А, В). Размер выборки представлен в виде обозначений внутри столбцов. Обозначения: * - $p < 0,05$; **** - $p < 0,0001$ в сравнении с группой WT.

По показателям, характеризующим долговременную память, нокаутные животные не отличались от контрольных. В последний, пятый, день тестирования, когда платформа убиралась из бассейна, все мыши одинаково быстро находили место, где ранее была платформа, а также проплывали над ним примерно одинаковое количество раз (рис. 11Б, Г). Таким образом, можно сделать вывод, что синуклеины, вероятно, не связаны с процессами, опосредующими формирование памяти, как кратковременной, так и долговременной. Те отклонения, которые наблюдаются при выполнении ими

теста «Водный лабиринт Морриса» скорее объясняются изменениями моторных функций либо тревожности животных.

Для более специфической оценки тревожноподобного поведения был проведён тест «Приподнятый крестообразный лабиринт». Было показано, что γ -КО, а также $\alpha\beta\gamma$ -КО мыши демонстрировали большее число выходов в открытый, более стрессогенный, рукав установки, что говорит о сниженном уровне тревожности (рис. 12А). Общее время, проведённое ими в открытом рукаве установки, также было значительно выше, чем у WT мышей (рис. 12Б). Интересно, что тройные нокауты в данном тесте так же, как и в «Открытом поле», демонстрировали гиперактивный фенотип, и общая пройденная дистанция была значительно выше в данной группе мышей (рис. 12В).

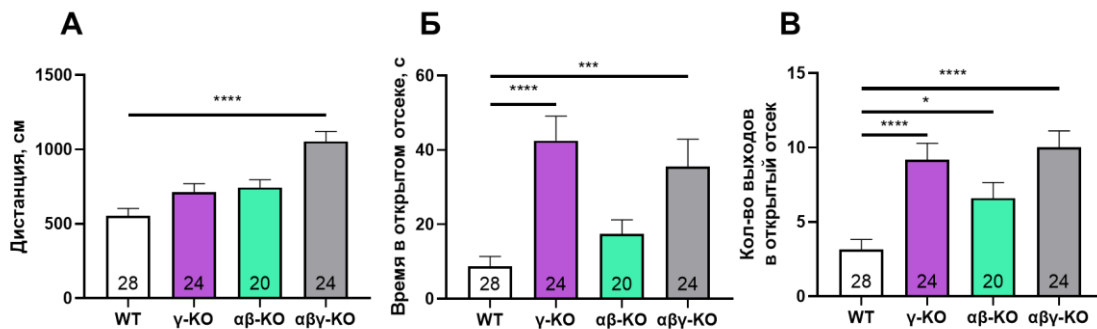


Рисунок 12. Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» 13-месячных мышей с нокаутом генов синуклеинов и животных дикого типа. А – количество выходов в открытые рукава лабиринта, Б – время в открытых рукавах лабиринта, В – средняя пройденная дистанция. Данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего. Статистический анализ производился при помощи теста Краскела-Уоллиса с поправкой Данна на множественные сравнения (А, Б) и однофакторного дисперсионного анализа с поправкой Даннетта на множественное сравнение (В). Обозначения: * – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$; **** – $p < 0,0001$. Размер выборки представлен в виде обозначений внутри столбцов.

3.2 Биохимические и морфологические характеристики нервной системы при дефиците γ -синуклеина

Выявленные у нокаутных животных изменения моторных функций и поведенческих реакций могли быть обусловлены нарушениями нейрональной передачи, а также изменениями состояния отдельных нейрональных популяций. В связи с этим следующим этапом исследования стала оценка

биохимических и морфологических характеристик нервной системы. Анализ включал определение содержания ряда синаптических белков в структурах переднего мозга и морфометрическую оценку дофаминергических нейронов среднего мозга, функционально связанных с регуляцией двигательной активности и поведения.

3.2.1 Содержание синаптических белков в стриатуме и коре головного мозга

В первую очередь было исследовано содержание белков, участвующих в различных этапах синаптического везикулярного цикла. Для анализа выбрали дорсальный стриатум и кору головного мозга, поскольку эти структуры участвуют в регуляции двигательной активности и сложных форм поведения, изменения которых были выявлены при фенотипировании нокаутных животных. Исследование проводили у 13-месячных мышей – в возрасте, когда поведенческий фенотип уже был достаточно выражен, но ещё не сопровождался выраженными возрастными изменениями, характерными для стареющих животных. В качестве маркеров оценивали содержание SYP (синаптофизина), Syn IIa (синапсина IIa) и AMPH (амфифизина), характеризующих различные этапы хранения, мобилизации и рециклинга синаптических везикул.

SYP является одним из наиболее распространённых белков мембраны синаптических везикул и участвует в регуляции процессов экзо- и эндоцитоза, обеспечивающих высвобождение и последующее восстановление пула синаптических везикул [247]. Благодаря высокой представленности в пресинаптических окончаниях его содержание широко используется в качестве маркера синаптических терминалей и для косвенной оценки сохранности синаптических контактов. В связи с этим определение уровня SYP позволяло оценить, сопровождается ли дефицит синуклеинов выраженными изменениями пресинаптического аппарата в структурах мозга, связанных с регуляцией двигательной активности и поведения. По

результатам вестерн-блот анализа статистически значимых различий в содержании SYP между нокаутными животными и мышами дикого типа выявлено не было ни в дорсальном стриатуме (рис. 13), ни в коре головного мозга (рис. 14). Отсутствие изменений наблюдалось при различных вариантах нокаута генов синуклеинов, что указывает на сохранение общего уровня данного пресинаптического маркера в исследованных структурах. Выявленные у нокаутных животных изменения моторных функций и поведенческих реакций не сопровождались заметным снижением содержания SYP и, следовательно, не были связаны с грубым уменьшением представленности синаптических терминалей в стриатуме и коре головного мозга.

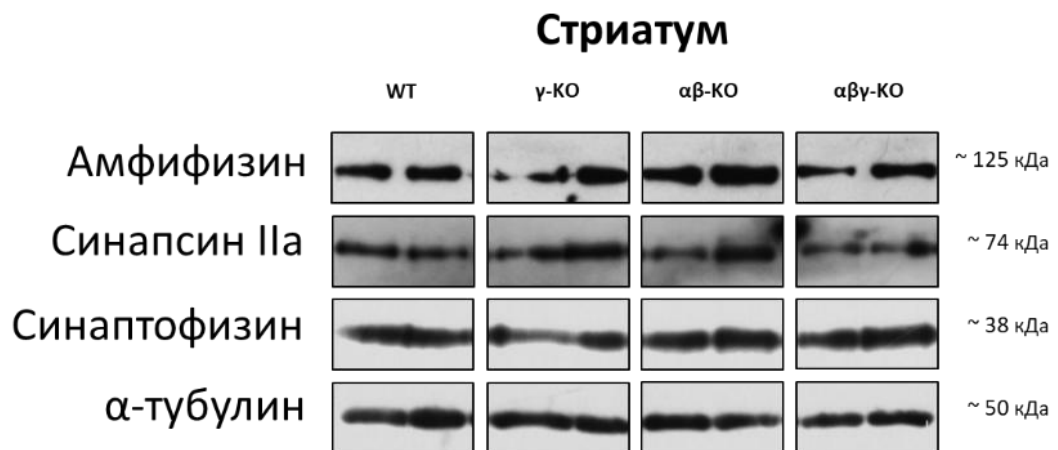


Рисунок 13. Синаптические белки в стриатуме 13-месячных нокаутных мышей (γ -КО, $\alpha\beta$ -КО и $\alpha\beta\gamma$ -КО) и мышей дикого типа (WT), репрезентативные изображения вестерн-блота.

Syn IIa представляет собой нейронспецифический фосфопротеин, ассоциированный с синаптическими везикулами и участвующий в поддержании их резервного пула и мобилизации при повышении функциональной активности синапса, в том числе в условиях высокочастотной стимуляции [248, 249, 250]. Синапсин II представлен двумя основными изоформами – IIa и IIb, различающимися по структурным и функциональным свойствам. Изоформа IIa характеризуется более выраженным взаимодействием с синаптическими везикулами и играет существенную роль в регуляции их распределения между резервным и

функционально активным пулами. Поэтому определение содержания Syn IIa дополнило анализ SYP и позволило оценить состояние белков, непосредственно связанных с организацией и мобилизацией везикулярного пула.

При анализе ткани дорсального стриатума статистически значимых различий в содержании Syn IIa между мышами дикого типа и животными с различными вариантами нокаута генов синуклеинов выявлено не было (рис. 13). Сходный результат был получен при исследовании коры головного мозга: уровень Syn IIa у γ -КО, $\alpha\beta$ -КО и $\alpha\beta\gamma$ -КО мышей не отличался от контрольной группы (рис. 14). Эти данные свидетельствуют о сохранении уровня белка, участвующего в поддержании и мобилизации резервного пула синаптических везикул, несмотря на выявленные у нокаутных животных изменения моторных и поведенческих показателей.

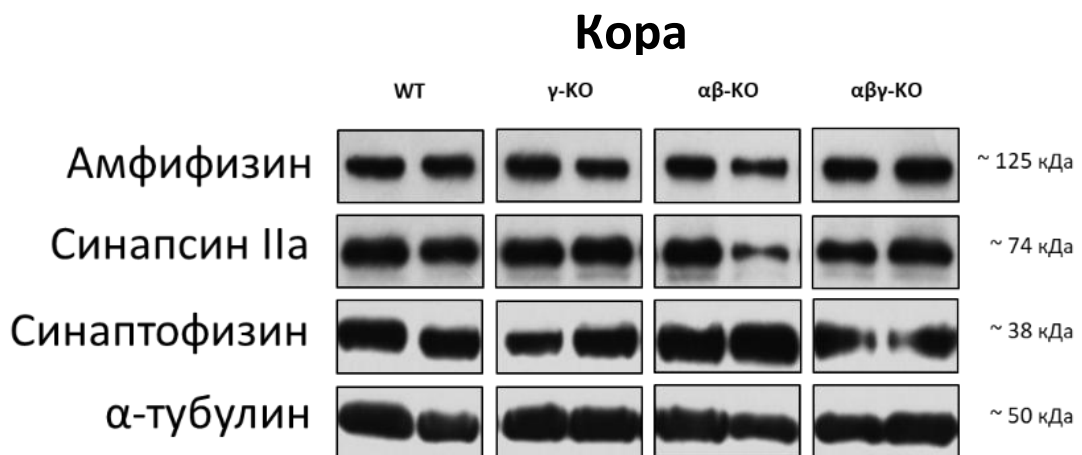


Рисунок 14. Синаптические белки в коре головного мозга 13-месячных нокаутных мышей (γ -КО, $\alpha\beta$ -КО и $\alpha\beta\gamma$ -КО) и мышей дикого типа (WT), репрезентативные изображения вестерн-блота.

АМРН является компонентом пресинаптического аппарата и участвует в эндоцитозе мембран синаптических везикул после их слияния с плазматической мембраной, обеспечивая восстановление везикулярного пула и поддержание непрерывности синаптической передачи [251, 252, 253]. В отличие от SYP и Syn IIa, характеризующих соответственно везикулярный аппарат и состояние резервного пула везикул, АМРН отражает другое

функциональное звено синаптического цикла – процессы эндоцитоза и рециклинга мембран. Поэтому его определение позволило дополнить оценку состояния пресинаптического аппарата при дефиците синуклеинов. В дорсальном стриатуме содержание AMPH у γ -КО, $\alpha\beta$ -КО и $\alpha\beta\gamma$ -КО мышей не отличалось от уровня у животных дикого типа (рис. 13). Аналогичная картина наблюдалась в коре головного мозга, где статистически значимых различий между исследуемыми группами также выявлено не было (рис. 14). В совокупности с результатами определения SYP и Syn Па эти данные показывают, что выявленные у нокаутных животных нарушения моторных функций и поведенческих реакций не сопровождаются выраженными изменениями общего содержания исследованных белков пресинаптического аппарата в стриатуме и коре головного мозга. При этом сохранение их общего уровня не позволяет исключить возможные функциональные нарушения синаптической передачи, связанные с изменением активности белков, их взаимодействий или динамики везикулярного цикла, которые в рамках данного исследования отдельно не оценивались.

3.2.2 Морфометрический анализ дофаминергических ядер среднего мозга

Отсутствие изменений содержания исследованных пресинаптических белков в стриатуме и коре головного мозга свидетельствовало о сохранении общего уровня отдельных компонентов синаптического аппарата, однако не исключало изменений на уровне конкретных нейрональных популяций. Поскольку у нокаутных животных были выявлены нарушения моторных функций и тревожноподобного поведения, представляло интерес определить, сопровождаются ли эти функциональные изменения изменением численности дофаминергических нейронов среднего мозга. Дофаминергическая система была выбрана для дальнейшего анализа с учётом её участия как в регуляции двигательной активности, так и в формировании эмоционально-мотивационных реакций.

Для морфометрического анализа были выбраны компактная часть чёрной субстанции (ЧС) и вентральная область покрышки (ВОП), представляющие две функционально различающиеся популяции дофаминергических нейронов среднего мозга. Нейроны компактной части ЧС преимущественно формируют нигростриатные проекции и участвуют в регуляции двигательной активности, тогда как нейроны ВОП являются источником мезолимбических и мезокортикальных дофаминергических проекций, связанных с эмоциональным и мотивационным поведением. Сопоставление этих двух структур позволяло оценить, могут ли выявленные у нокаутных животных моторные и поведенческие нарушения сопровождаться изменением численности соответствующих популяций дофаминергических нейронов.

Исследование проводили на серийных коронарных срезах головного мозга 13-месячных животных. Дофаминергические нейроны выявляли иммуногистохимически с использованием антител к тирозингидроксилазе (ТГ), после чего иммунореактивность визуализировали с помощью ДАБ в качестве хромогенного субстрата. Анатомические границы ЧС и ВОП определяли по атласу головного мозга мыши (рис. 15). Срезы толщиной 8 мкм получали последовательно на протяжении всей исследуемой области среднего мозга, при этом для морфометрического анализа использовали каждый пятый срез, что обеспечивало равномерное представительство анализируемой зоны по её протяжённости. В одну серию включали 10 срезов; для полного охвата области ЧС и ВОП, как правило, формировали шесть последовательных серий.

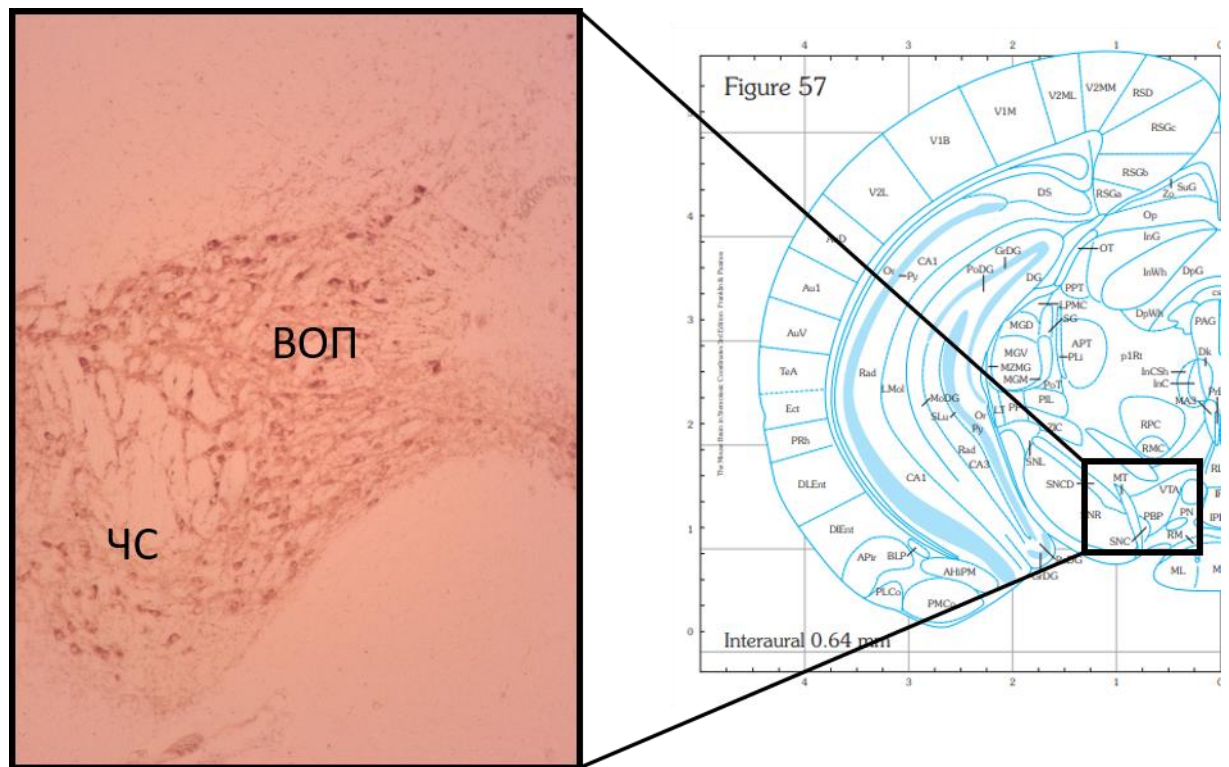


Рисунок 15. Локализация областей морфометрического анализа дофаминергических нейронов среднего мозга мыши. Слева – репрезентативный коронарный срез головного мозга с иммуногистохимическим выявлением ТГ; обозначены компактная часть чёрной субстанции (ЧС) и вентральная область покрышки (ВОП). Справа – соответствующий коронарный уровень головного мозга по стереотаксическому атласу Franklin и Paxinos (2007).

Подсчёт ТГ-позитивных нейронов выполняли при увеличении $\times 20$. При анализе учитывали количество нейронов отдельно в правой и левой частях структур с последующим расчётом суммарного количества нейронов. Поскольку толщина гистологического среза была меньше среднего диаметра тела нейрона, для исключения завышения численности клеток, связанного с повторным учётом их фрагментов на соседних срезах, дополнительно измеряли диаметр 30 нейронов при увеличении $\times 40$ и проводили коррекцию результатов с использованием поправки Абекромби.

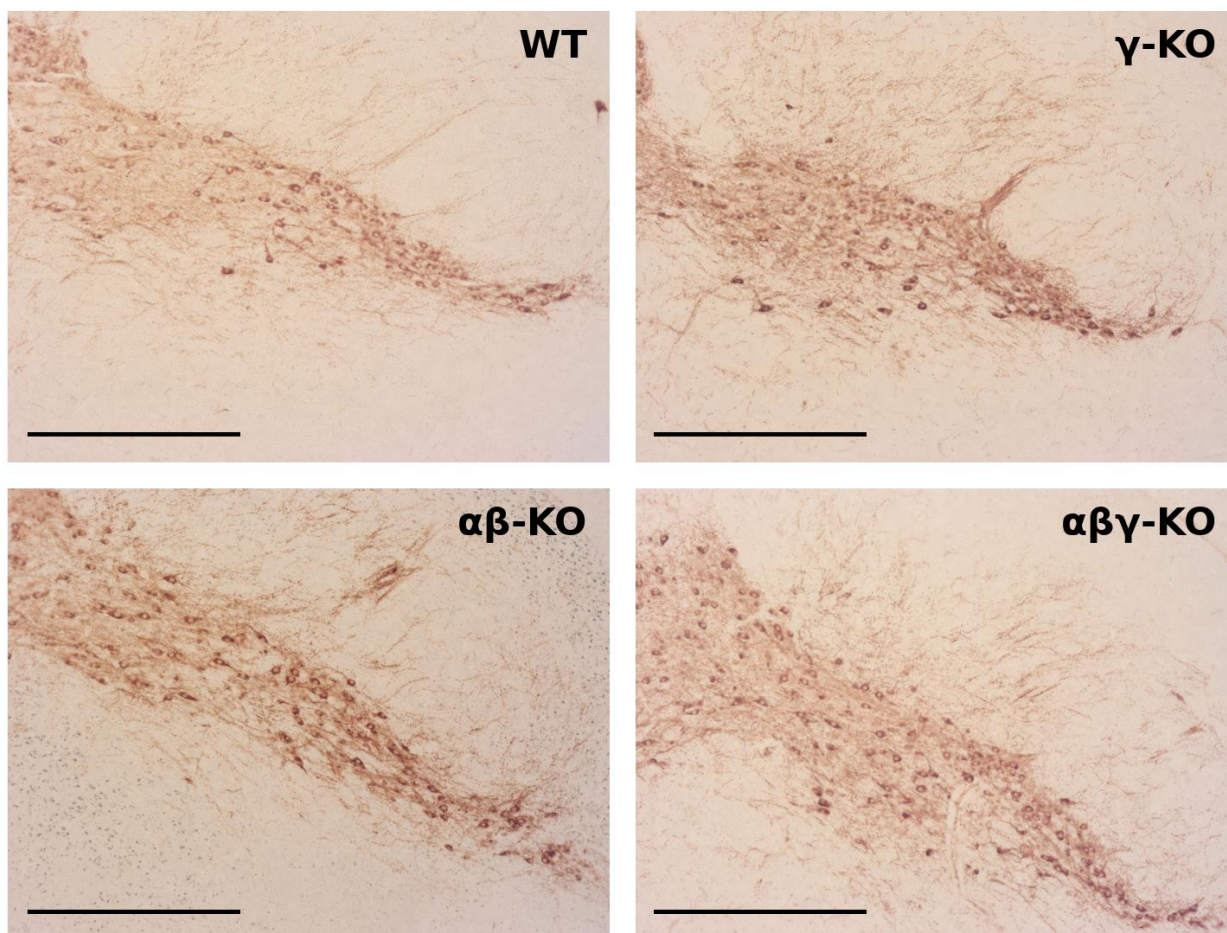


Рисунок 16. Репрезентативные микрофотографии поперечных срезов головного мозга в области ЧС и ВОП мышей разных генотипов. Препараты окрашены при помощи первичных антител к ТГ с последующей детекцией с помощью вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена и ДАБ в качестве субстрата. Масштабный отрезок – 500 мкм.

Сравнительный анализ не выявил статистически значимых различий между животными дикого типа и нокаутными группами ни в компактной части ЧС, ни в ВОП (рис. 16, 17). Следовательно, наблюдаемые у нокаутных мышей изменения моторных функций и эмоционально-реактивного поведения не сопровождались уменьшением численности основных популяций дофаминергических нейронов среднего мозга.

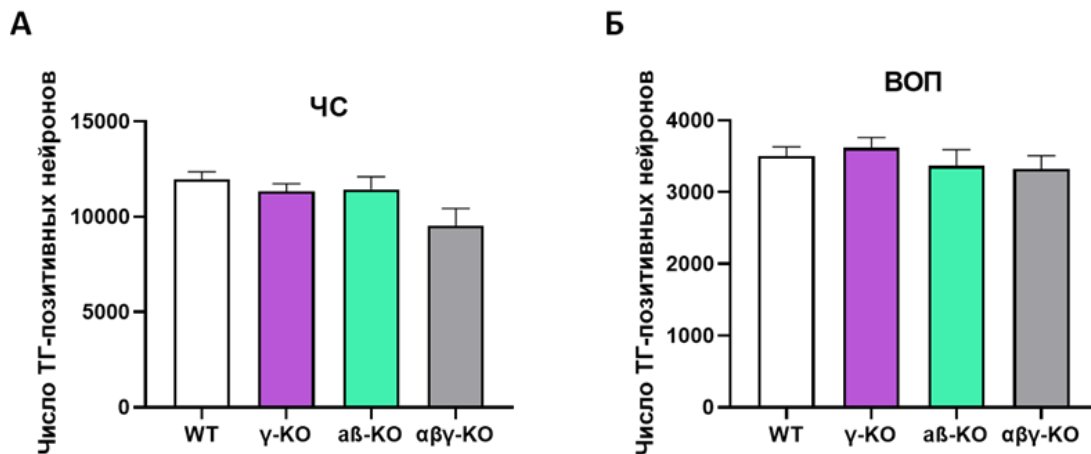


Рисунок 17. Количество ТГ-позитивных нейронов в компактной части чёрной субстанции (А) и вентральной области покрышки (Б). Данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего. Статистический анализ производился при помощи однофакторного дисперсионного анализа с поправкой Даннетта на множественное сравнение.

Полученные результаты позволяют предположить, что при дефиците синуклеинов в первую очередь изменяются функциональные параметры дофаминергической передачи, тогда как численность соответствующих нейронов на данном возрастном этапе сохраняется. Такое предположение согласуется с ранее полученными данными на различных линиях синуклеин-дефицитных мышей, у которых были описаны изменения содержания и обмена дофамина при отсутствии выраженной потери дофаминергических нейронов в чёрной субстанции и вентральной области покрышки [2, 220]. Синуклеины участвуют в регуляции процессов, связанных с синаптическими везикулами, экзоцитозом и обменом нейромедиаторов, поэтому нарушение их функций может отражаться на эффективности нейротрансмиссии без обязательного развития структурных изменений нейрональных популяций. В случае одиночных и двойных нокаутов дополнительное значение может иметь частичная функциональная компенсация со стороны сохраняющихся членов семейства синуклеинов. Вместе с тем отсутствие снижения числа ТГ-позитивных нейронов у $\alpha\beta\gamma$ -КО животных показывает, что сохранение дофаминергических популяций не может быть объяснено только взаимозаменяемостью белков этого семейства и, вероятно, связано также с

включением других компенсаторных механизмов. Таким образом, морфометрические данные в совокупности с результатами поведенческого тестирования указывают на то, что недостаточность синуклеинов может приводить к нарушениям работы дофаминергической системы без выраженной потери нейронов среднего мозга.

3.3 Маркеры нарушения функции γ -синуклеина в тканях глаза и биологических жидкостях

Поскольку выявленные у нокаутных животных изменения моторных и поведенческих функций не сопровождались выраженными изменениями содержания исследованных синаптических белков или численности дофаминергических нейронов среднего мозга, дальнейший анализ был направлен на поиск более чувствительных физиологических и биохимических признаков дефицита γ -синуклеина. Особый интерес представляли ткани глаза и периферические биологические жидкости, в которых γ -синуклеин также экспрессируется и потенциально может вызывать изменения, связанные с нарушением его функции. В связи с этим были исследованы регуляция внутриглазного давления (ВГД) и ряд биохимических показателей слезной жидкости и крови экспериментальных животных и пациентов.

3.3.1 Изменение ВГД у γ -КО мышей при фармакологическом воздействии

Глаукома традиционно рассматривается как группа хронических прогрессирующих заболеваний глаза, при которых ключевым проявлением является поражение зрительного нерва и постепенная потеря ганглионарных клеток сетчатки. По ряду признаков происходящие при глаукоме изменения сходны с нейродегенеративными процессами в центральной нервной системе: повреждение развивается постепенно, затрагивает определённые популяции нейронов и сопровождается нарушением их функции задолго до выраженной потери клеток. Наиболее значимым модифицируемым фактором риска

развития и прогрессирования глаукомы остаётся повышение ВГД, хотя повреждение зрительного нерва может наблюдаться и при его относительно нормальных значениях [254, 255]. В настоящее время снижение ВГД остаётся основным направлением медикаментозной терапии глаукомы, что подчёркивает значение механизмов его регуляции как для нормального функционирования глаза, так и для развития патологического процесса.

В контексте данной работы существенное значение имеет то, что γ -синуклеин экспрессируется в структурах зрительного анализатора. Этот белок обнаруживается в сетчатке и зрительном нерве, причём при повреждении этих структур характер его экспрессии и локализации изменяется. В тканях глаза пациентов с глаукомой было показано перераспределение γ -синуклеина: выраженная иммунореактивность наблюдалась в области решётчатой пластинки и в постламинарной зоне зрительного нерва, тогда как в норме подобное распределение белка выражено значительно слабее [13]. Изменения γ -синуклеина были выявлены и в экспериментальных моделях повреждения зрительного нерва и глаукомы. В частности, при хроническом и остром повреждении ганглионарных клеток сетчатки изменялось содержание γ -синуклеина как на уровне мРНК, так и на уровне белка [64]. Эти наблюдения указывают на то, что γ -синуклеин может быть вовлечён в ответ нервной ткани глаза на повреждение и изменение её функционального состояния.

При этом само по себе изменение экспрессии γ -синуклеина не позволяет определить, затрагивает ли его дефицит механизмы регуляции функций глаза. Одним из показателей, позволяющих оценить такую связь, является ВГД. Его уровень определяется балансом между продукцией внутриглазной жидкости и её оттоком через трабекулярный и увеосклеральный пути. Оба процесса находятся под нейрогуморальным контролем и зависят от активности нескольких нейромедиаторных систем. В регуляции ВГД участвуют адренергические, холинергические и дофаминергические механизмы, причём воздействие на соответствующие рецепторы может изменять как продукцию внутриглазной жидкости, так и сопротивление её оттоку [256, 257].

Связь этих механизмов с синуклеинами представляет отдельный интерес. Белки семейства синуклеинов участвуют в регуляции пресинаптических процессов и способны влиять на функционирование моноаминергических систем. Для них показано влияние на транспорт, экспрессию и локализацию переносчиков дофамина, норадреналина и серотонина на клеточной мембране [8]. Поэтому при отсутствии γ -синуклеина можно ожидать не только изменений отдельных нейромедиаторных путей в центральной нервной системе, но и нарушения периферических механизмов, в которых эти же медиаторные системы участвуют в регуляции физиологических параметров. В этом отношении ВГД представляет удобный функциональный показатель, поскольку его изменение можно регистрировать непосредственно и проследивать во времени после фармакологического воздействия.

При оценке только исходного уровня ВГД возможные нарушения регуляции могут оставаться незаметными, особенно если в покое они компенсируются за счёт других механизмов. Более информативным в данном случае является анализ ответа на фармакологическую стимуляцию или блокаду соответствующих нейромедиаторных систем. Если отсутствие γ -синуклеина влияет на их работу, различия между нокаутными животными и мышами дикого типа могут проявляться именно в характере и выраженности реакции ВГД на введение агониста или антагониста, даже при сходных исходных значениях.

На основании этого у γ -КО и WT мышей была исследована динамика ВГД после воздействия на адренергическую, холинергическую и дофаминергическую системы. Для каждой из них использовали препараты с противоположным направлением действия – агонисты и антагонисты соответствующих рецепторов. Такой подход позволял оценить реакцию системы регуляции ВГД как при её стимуляции, так и при фармакологическом подавлении и установить, изменяется ли эта реакция в условиях отсутствия γ -синуклеина.

В адренергической группе применяли 1% фенилэфрин (мезатон), являющийся агонистом α -адренорецепторов, и 0,5% тимолол, блокирующий β -адренорецепторы. Холинергические механизмы исследовали с использованием 1% пилокарпина и 0,1% атропина, оказывающих соответственно агонистическое и антагонистическое действие на мускариновые холинорецепторы. Для воздействия на дофаминергическую систему применяли 10% раствор дофамина и 0,25% галоперидол. ВГД измеряли до инстилляции препарата, а затем через 1 и 2 часа, что позволяло оценить изменение реакции во времени. При сравнении полученных кривых было установлено, что характер ответа γ -КО мышей на ряд фармакологических воздействий отличался от реакции животных дикого типа.

После инстилляции 1% фенилэфрина у γ -КО мышей наблюдалось выраженное снижение ВГД относительно исходного уровня. Через 1 час после введения препарата давление уменьшалось в среднем на 4 мм рт. ст. ($p = 0,0017$), а через 2 часа оставалось сниженным приблизительно на 3 мм рт. ст. ($p = 0,0222$). Таким образом, максимальный эффект фенилэфрина регистрировался в первый час наблюдения и частично сохранялся к окончанию второго часа. У животных дикого типа подобного снижения не наблюдалось; напротив, отмечалась тенденция к изменению ВГД в противоположном направлении, однако различия между исходным значением и последующими временными точками статистической значимости не достигали (рис. 18А). Полученные данные показывают, что при отсутствии γ -синуклеина реакция на стимуляцию адренергических рецепторов приобретала иной характер по сравнению с WT животными.

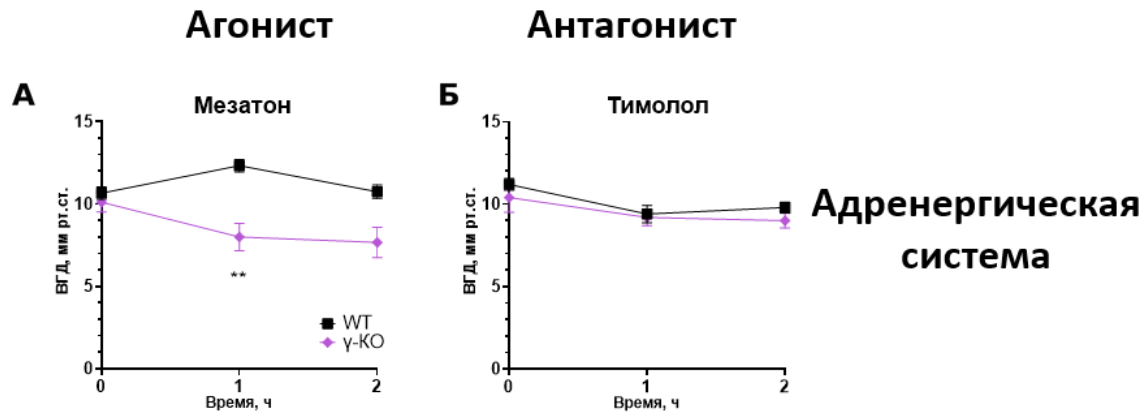


Рисунок 18. Изменение ВГД у нокаутных по γ -синуклеину (γ -КО) мышей по сравнению с мышами дикого типа (WT) после инстилляции препаратов, воздействующих на адренергическую систему: (А) агонист α -адренорецепторов – 1% фенилэфрин (мезатон); (Б) антагонист β -адренорецепторов – 0,5% тимолол. ВГД измеряли до инстилляции и через 60 и 120 минут после неё. Данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего. Статистический анализ проводили с использованием двухфакторного дисперсионного анализа с поправкой Сидака на множественные сравнения. Обозначения: ** - $p < 0,01$.

При применении 0,5% тимолола направление ответа было сходным в обеих группах: после инстилляции препарата ВГД снижалось как у WT, так и у γ -КО мышей. Однако статистически значимое изменение относительно исходного уровня было зарегистрировано только у животных дикого типа. При непосредственном сравнении групп значимых различий обнаружено не было (рис. 18Б). Следовательно, в отличие от фенилэфрина, блокада β -адренергических рецепторов не выявила выраженного генотип-зависимого расхождения по уровню ВГД.

При воздействии на холинергическую систему результаты также зависели от характера фармакологического воздействия. Инстилляция 1% пилокарпина не сопровождалась значимым изменением ВГД ни у WT, ни у γ -КО мышей. Значения показателя оставались близкими к исходным на протяжении периода наблюдения, а различий между группами не выявлялось (рис. 19А). Таким образом, стимуляция мускариновых холинорецепторов в использованных экспериментальных условиях не позволила выявить особенности регуляции ВГД, связанные с отсутствием γ -синуклеина.

Иная картина наблюдалась после инстилляций 0,1% атропина. У γ -КО мышей через 2 часа ВГД снижалось приблизительно на 3 мм рт. ст. по сравнению с исходным значением ($p = 0,0018$). В этой же временной точке показатель был в среднем на 2 мм рт. ст. ниже, чем у WT животных ($p = 0,0271$). У мышей дикого типа значимого изменения ВГД после введения атропина не происходило (рис. 19Б). Следовательно, различия между генотипами в ответе холинергической системы проявлялись не при её стимуляции, а при блокаде мускариновых рецепторов.

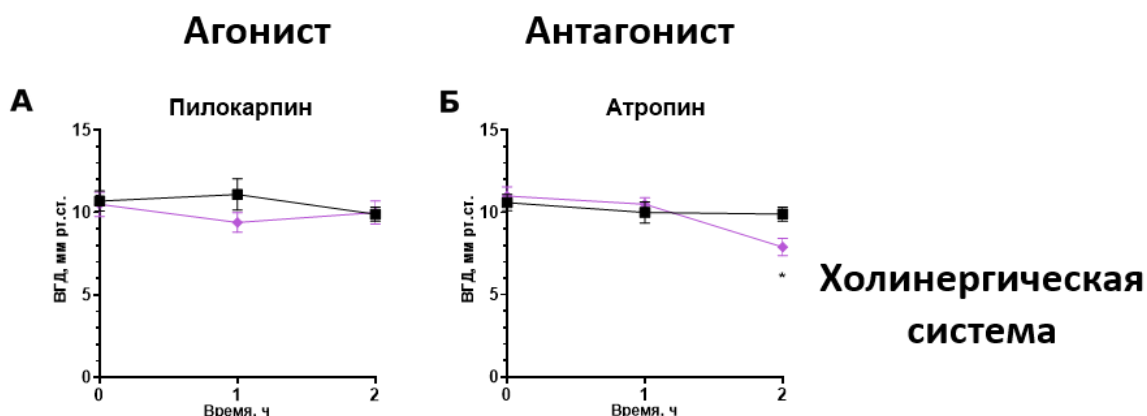


Рисунок 19. Изменение ВГД у нокаутных по γ -синуклеину (γ -КО) мышей по сравнению с мышами дикого типа (WT) после инстилляций препаратов, воздействующих на холинергическую систему: (А) холинергический агонист – 1% пилокарпин; (Б) холинергический антагонист – 0,1% атропин. ВГД измеряли до инстилляций и через 60 и 120 минут после неё. Данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего. Статистический анализ проводили с использованием двухфакторного дисперсионного анализа с поправкой Сидака на множественные сравнения. Обозначения: * - $p < 0,05$.

Наиболее выраженные различия между γ -КО и WT мышами были выявлены при воздействии на дофаминергическую систему. После инстилляций 10% дофамина у γ -КО животных ВГД снижалось с исходных 8 мм рт. ст. до приблизительно 4 мм рт. ст. через 1 час и до 5 мм рт. ст. через 2 часа; в обеих временных точках изменения относительно исходного уровня были статистически значимыми ($p = 0,0011$). У WT мышей сопоставимого снижения ВГД не наблюдалось. Через 1 и 2 часа после введения дофамина значения ВГД у животных дикого типа были приблизительно в два раза выше, чем у γ -КО мышей ($p = 0,0004$ и $p < 0,0001$ соответственно; рис. 20А). Таким

образом, именно при прямой стимуляции дофаминергической системы различия между генотипами проявлялись наиболее отчётливо и сохранялись на протяжении всего периода наблюдения после введения препарата.

Отличия обнаруживались и при блокаде дофаминовых рецепторов. Через 1 час после инстилляцией 0,25% галоперидола ВГД снижалось относительно исходного уровня как у WT, так и у γ -КО мышей. Однако дальнейшая динамика в двух группах различалась: через 2 часа у животных дикого типа давление возвращалось к исходным значениям, тогда как у γ -КО мышей снижение сохранялось. В этой временной точке ВГД у нокаутных животных было приблизительно на 2 мм рт. ст. ниже, чем у WT мышей ($p = 0,0063$; рис. 20Б). Следовательно, дефицит γ -синуклеина был связан не только с усиленным ответом на введение дофамина, но и с более продолжительным изменением ВГД после блокады дофаминовых рецепторов.

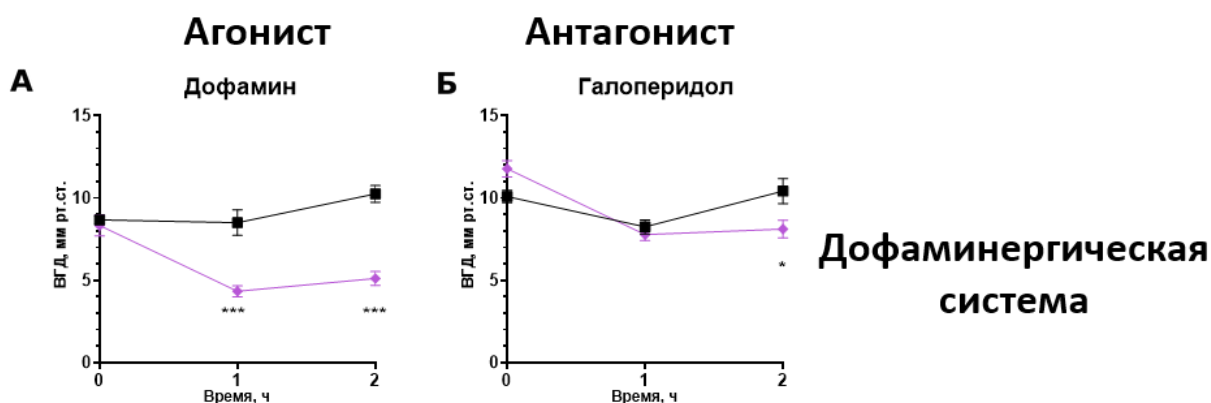


Рисунок 20. Изменение ВГД у нокаутных по γ -синуклеину (γ -КО) мышей по сравнению с мышами дикого типа (WT) после инстилляцией препаратов, воздействующих на дофаминергическую систему: (А) дофаминергический агонист – 10% дофамин; (Б) дофаминергический антагонист – 0,25% галоперидол. ВГД измеряли до инстилляцией и через 60 и 120 минут после неё. Данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего. Статистический анализ проводили с использованием двухфакторного дисперсионного анализа с поправкой Сидака на множественные сравнения. Обозначения: * - $p < 0,05$; *** - $p < 0,001$.

В целом фармакологическое тестирование показало, что отсутствие γ -синуклеина не приводит к изменению реакции на все исследованные препараты. Наиболее отчётливые различия между γ -КО и WT животными выявлялись при воздействии на дофаминергическую систему, причём они

наблюдались как при применении агониста, так и при блокаде рецепторов. Изменения ответа были обнаружены также при стимуляции адренергической системы фенилэфрином и при блокаде мускариновых холинорецепторов атропином, тогда как применение тимолола и пилокарпина не сопровождалось выраженными межгрупповыми различиями. Такая неоднородность ответа указывает на то, что дефицит γ -синуклеина не вызывает общего нарушения регуляции ВГД, а затрагивает отдельные механизмы, участвующие в контроле гидродинамики глаза. Наиболее чувствительной к отсутствию γ -синуклеина в проведённом эксперименте оказалась дофаминергическая регуляция [258].

3.3.2 Общее содержание белка и активность $\alpha 2$ -МГ в слёзной жидкости мышей нокаутных по γ -синуклеину

После оценки особенностей регуляции ВГД у γ -КО мышей мы перешли к анализу состава слёзной жидкости. Слеза представляет собой сложную биологическую среду, в состав которой входят белки, ферменты, ингибиторы протеаз, компоненты врождённого иммунитета и другие молекулы, участвующие в поддержании нормального состояния поверхности глаза. Изменения её состава описаны при различных заболеваниях глаза, а в последние годы слёзная жидкость всё чаще рассматривается как источник потенциальных биохимических маркеров, поскольку её получение не требует инвазивных вмешательств [259].

Одним из показателей, выбранных для анализа, была активность $\alpha 2$ -МГ. Этот белок относится к ингибиторам протеаз широкого спектра действия и способен связывать ферменты различных классов, ограничивая их протеолитическую активность. Помимо этого, $\alpha 2$ -МГ взаимодействует с рядом цитокинов и факторов роста и участвует в регуляции воспалительного ответа и процессов репарации [260]. Для нервной ткани интерес представляет также способность $\alpha 2$ -МГ связывать повреждённые и склонные к агрегации белки. В литературе описано его участие во взаимодействии с амилоидными

белками и ограничении образования крупных белковых агрегатов [261]. Ранее изменения активности $\alpha 2$ -МГ были обнаружены и в слёзной жидкости пациентов с болезнью Паркинсона [214], поэтому данный показатель представлял интерес и в модели дефицита γ -синуклеина.

Сначала в слёзной жидкости γ -КО и WT мышей определяли общую концентрацию белка. У γ -КО животных она оказалась значительно выше, чем у мышей дикого типа (рис. 21А). Сам по себе этот результат не позволяет определить, за счёт каких именно компонентов произошло увеличение общей концентрации белка. Оно может отражать изменение секреции отдельных белков, но может быть связано и с уменьшением объёма водной фазы слезы. В последнем случае при снижении поступления жидкости из слёзных желёз концентрация растворённых белков будет возрастать даже без увеличения их абсолютного количества. Поэтому повышение общего белка у γ -КО мышей скорее указывает на изменение состава или степени концентрирования слёзной жидкости, чем непосредственно на усиление синтеза белковых компонентов.

При определении активности $\alpha 2$ -МГ была получена иная картина. При расчёте на единицу объёма слёзной жидкости у γ -КО мышей наблюдалась тенденция к снижению активности по сравнению с WT животными, однако различия не достигали статистической значимости (рис. 21Б). После нормирования на общее количество белка различия становились значительно более выраженными: удельная активность $\alpha 2$ -МГ у γ -КО мышей была снижена примерно на 70 % (рис. 21В).

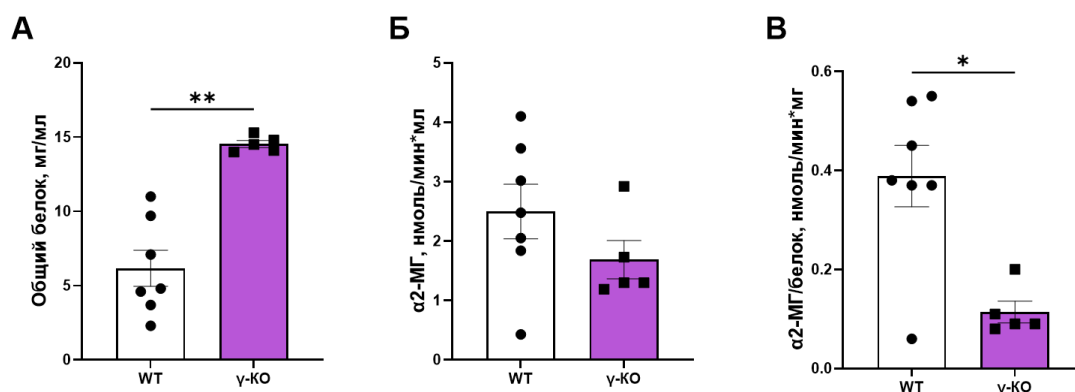


Рисунок 21. Общая концентрация белка и активность $\alpha 2$ -МГ отличаются в слёзной жидкости нокаутных по γ -синуклеину (γ -КО) мышей и мышей дикого типа (WT): (А) общая концентрация белка, определённая по методу Лоури (мг/мл); (Б) общая активность $\alpha 2$ -МГ (нмоль/мин $\times$ мл); (В) удельная активность $\alpha 2$ -МГ (нмоль/мин $\times$ мг) в слёзной жидкости γ -КО и WT мышей. Представлены средние значения $\pm$ SE и индивидуальные данные; р-значения указаны, если различия между группами были статистически значимыми по критерию Манна-Уитни. Для группы WT мышей $n = 7$; для группы γ -КО $n = 5$. Обозначения: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$.

Такое расхождение между общей концентрацией белка и активностью $\alpha 2$ -МГ важно для интерпретации результата. Если бы у γ -КО мышей происходило только концентрирование слёзной жидкости, можно было бы ожидать пропорционального увеличения большинства её белковых компонентов. Однако при повышенном общем содержании белка активность $\alpha 2$ -МГ на единицу белка, напротив, существенно снижалась. Это означает, что относительная представленность функционально активного $\alpha 2$ -МГ в белковой фракции слезы у нокаутных животных была ниже, чем у WT мышей.

При этом необходимо учитывать, что используемый метод позволяет оценить активность $\alpha 2$ -МГ, но не его абсолютную концентрацию. Поэтому по полученным данным нельзя однозначно заключить, уменьшилось ли содержание самого белка или изменилась доля его функционально активной формы. Не исключено также сочетание обоих процессов. Для ответа на этот вопрос потребовалось бы дополнительное определение концентрации $\alpha 2$ -МГ независимым методом. В данном случае результат свидетельствует именно о снижении его функциональной активности относительно общего содержания белка в слёзной жидкости.

С биологической точки зрения такое изменение может иметь значение для местных защитных механизмов глаза. $\alpha 2$ -МГ участвует в ограничении избыточного протеолиза и тем самым препятствует повреждению белков внеклеточного матрикса и других тканевых компонентов. При снижении его активности баланс между протеазами и их ингибиторами может смещаться в сторону более высокой протеолитической активности. Это особенно важно в условиях воспаления или повреждения ткани, когда количество активных протеаз возрастает. Кроме того, поскольку $\alpha 2$ -МГ способен связывать цитокины, факторы роста и повреждённые белки, снижение его активности потенциально может затрагивать не только контроль протеолиза, но и другие элементы местного ответа на повреждение [260].

Для γ -КО мышей в данном случае характерно сочетание двух изменений: более высокой общей концентрации белка в слёзной жидкости и одновременно более низкой удельной активности $\alpha 2$ -МГ. Это позволяет говорить не просто об увеличении концентрации слезы, а об изменении соотношения её белковых компонентов.

Полученные данные дополняют результаты исследования ВГД и показывают, что отсутствие γ -синуклеина отражается не только на физиологическом ответе глаза на фармакологическое воздействие, но и на биохимических характеристиках слёзной жидкости. При этом изменения слезы могут рассматриваться как отдельное проявление дефицита γ -синуклеина и как основание для дальнейшего поиска периферических показателей, связанных с нарушением его функции.

3.3.3 Аутоантитела к γ -синуклеину в сыворотке крови пациентов с глаукомой

После анализа слёзной жидкости у γ -КО мышей исследование было продолжено на клиническом материале. Полученные в экспериментальной модели данные показали, что нарушения, связанные с отсутствием γ -синуклеина, могут проявляться не только на уровне нервной системы, но и в

периферических показателях, в том числе в составе биологических жидкостей. Поэтому представляло интерес определить, выявляются ли изменения, связанные с γ -синуклеином, у человека при патологии зрительного анализатора. Для этой части работы были использованы образцы сыворотки крови пациентов с первичной открытоугольной глаукомой (ПОУГ).

Выбор глаукомы был связан не только с выраженным поражением ганглионарных клеток сетчатки и зрительного нерва при этом заболевании, но и с ранее описанными изменениями экспрессии и распределения γ -синуклеина в тканях глаза. Кроме того, в развитии глаукоматозной нейродегенерации рассматривается участие иммунных механизмов. У пациентов с глаукомой обнаруживаются изменения спектра циркулирующих аутоантител, а в сетчатке показано накопление иммуноглобулинов и участие клеточного иммунного ответа в повреждении ганглионарных клеток [150, 153]. При этом наличие иммунного компонента не означает, что глаукома является аутоиммунным заболеванием, однако длительное повреждение нервной ткани может сопровождаться изменением представления собственных антигенов и формированием антительного ответа к отдельным белкам.

В случае γ -синуклеина такая возможность представляет особый интерес. При повреждении ганглионарных клеток изменение внутриклеточной локализации белка, его высвобождение из повреждённых клеток или появление изменённых молекулярных форм теоретически может увеличивать доступность γ -синуклеина для иммунной системы. В экспериментальных условиях также показано, что антитела к γ -синуклеину способны влиять на жизнеспособность нейроретинальных клеток и показатели митохондриального апоптотического пути [156]. Поэтому на следующем этапе мы оценили наличие аутоантител к γ -синуклеину в сыворотке крови пациентов с ПОУГ, а также определили концентрацию циркулирующего γ -синуклеина.

Для выявления аутоантител использовали обратный иммуноблоттинг с рекомбинантным человеческим γ -синуклеином. После электрофоретического

разделения белок переносили на мембрану, которую затем разделяли на отдельные полосы; каждая полоска инкубировалась с образцом сыворотки одного пациента. При наличии в сыворотке IgG, способных связываться с γ -синуклеином, после инкубации со вторичными антителами выявлялась иммунореактивная полоса в области молекулярной массы около 17 кДа. Такой подход позволял непосредственно оценить наличие антител, распознающих рекомбинантный γ -синуклеин, в индивидуальных образцах сыворотки.

Аутоантитела к γ -синуклеину были обнаружены у 5 из 25 пациентов с ПОУГ, что составило 20% обследованной группы (рис. 22). В контрольной группе положительной реакции на γ -синуклеин не наблюдалось [258]. Таким образом, аутоантитела присутствовали не у всех пациентов с глаукомой, а только у определённой их части. Это наблюдение представляется важным, поскольку указывает на гетерогенность иммунного ответа при ПОУГ. Вероятно, появление антител к γ -синуклеину связано не непосредственно с наличием диагноза как такового, а с особенностями течения патологического процесса у отдельных пациентов.

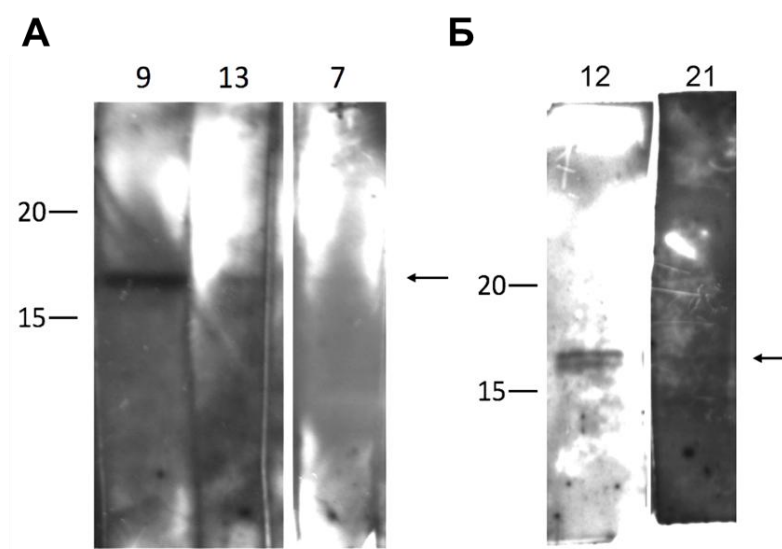


Рисунок 22. Выявление аутоантител к γ -синуклеину в сыворотке пациентов с глаукомой. А и Б получены методом обратного иммуноблоттинга и соответствуют разным независимым мембранам, разделённым на полосы. Каждую полоску мембраны инкубировали с образцом сыворотки одного пациента. Слева указана молекулярная масса (кДа) согласно белковому маркеру. Номера 9, 13, 7, 12, 21 обозначают номера образцов сыворотки пациентов с глаукомой, в которых были обнаружены аутоантитела к γ -синуклеину (17 кДа). Стрелка справа указывает на полосу, соответствующую γ -синуклеину.

Все образцы, в которых первоначально была обнаружена положительная реакция, анализировали повторно. В большинстве случаев при повторном исследовании сохранялась одна отчётливая иммунореактивная полоса с молекулярной массой около 17 кДа, соответствующая рекомбинантному γ -синуклеину. Повторное получение сигнала снижает вероятность того, что первоначальная реакция была следствием случайного технического артефакта.

В одном из образцов, № 12, помимо полосы в области ожидаемой молекулярной массы наблюдалась дополнительная иммунореактивная зона. Появление второй полосы может быть связано с присутствием небольшого количества продуктов деградации рекомбинантного белка либо с неспецифическим взаимодействием антител сыворотки с примесными белками рекомбинантного препарата. Основным критерием положительного результата оставалось наличие воспроизводимой полосы в области 17 кДа.

Интенсивность иммунореактивного сигнала заметно различалась между положительными образцами. Наиболее выраженная полоса наблюдалась, в частности, в образце № 9 (рис. 22). Более интенсивный сигнал может отражать более высокое содержание антител, связывающихся с γ -синуклеином, либо особенности их аффинности к использованному рекомбинантному антигену. Вместе с тем применённый вариант иммуоблоттинга являлся прежде всего качественным методом выявления аутоантител, поэтому по интенсивности полосы нельзя количественно определять их титр без проведения дополнительного титрования сыворотки.

Наличие аутоантител было выявлено у пациентов с различной выраженностью глаукоматозного процесса: стадии заболевания в этой подгруппе варьировали от 1а до 4а. Связи между наличием аутоантител и стадией ПОУГ установить не удалось. Также не обнаружено зависимости от уровня ВГД. Эти данные позволяют предположить, что образование аутоантител к γ -синуклеину не является простым отражением тяжести глаукомы или степени повышения ВГД. Возможно, оно характеризует

отдельный вариант иммунного ответа на повреждение нервных структур глаза и может зависеть от продолжительности заболевания, индивидуальных особенностей иммунной системы или характера повреждения ганглионарных клеток. Однако при имеющемся количестве наблюдений оценить вклад каждого из этих факторов отдельно невозможно.

Одновременно с выявлением аутоантител было проведено определение концентрации γ -синуклеина в сыворотке крови. У пациентов с глаукомой отмечалась тенденция к снижению уровня γ -синуклеина по сравнению с контрольной группой, однако статистически значимого различия получено не было (рис. 23). Поэтому данный результат следует рассматривать именно как тенденцию, а не как установленное снижение содержания циркулирующего белка.

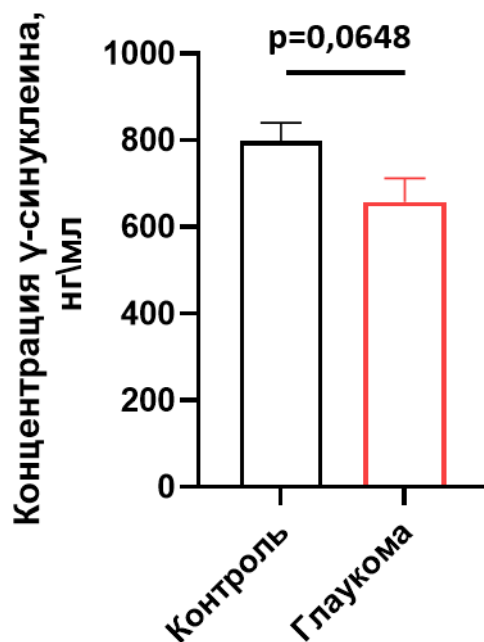


Рисунок 23. Измерение концентрации γ -синуклеина в сыворотке крови у пациентов с глаукомой ($n=24$) и лиц контрольной группы ($n=16$). Данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего. Статистический анализ производился при помощи t-теста Стьюдента для независимых выборок.

Одним из возможных объяснений такого направления изменений может быть образование комплексов γ -синуклеина с аутоантителами. Связывание циркулирующего белка антителами способно изменять долю свободного γ -синуклеина и потенциально снижать его доступность для определения

методом ИФА, особенно если связывание происходит в области эпитопов, распознаваемых антителами тест-системы. В то же время изменение концентрации γ -синуклеина в крови может быть связано и с другими процессами, включая изменение его выхода из клеток, распределения между тканями и кровотоком или скорости элиминации.

Необходимо учитывать и то, что аутоантитела были выявлены только у 20% пациентов, тогда как тенденция к снижению концентрации γ -синуклеина оценивалась для всей клинической группы. Поэтому связывать оба наблюдения единственным причинным механизмом пока преждевременно. Более информативным было бы отдельное сравнение концентрации γ -синуклеина у пациентов с выявленными аутоантителами и без них, однако при пяти положительных образцах статистические возможности такого анализа ограничены.

Сам факт обнаружения аутоантител у части больных при их отсутствии в исследованной контрольной группе представляет интерес в контексте поиска периферических признаков изменений γ -синуклеина при глаукоме. Вместе с тем частота выявления, составляющая 20%, не позволяет рассматривать этот показатель как самостоятельный диагностический маркер ПОУГ. Скорее, он может характеризовать определённую подгруппу пациентов, у которых глаукоматозный процесс сопровождается формированием гуморального ответа на γ -синуклеин. Для оценки диагностической или прогностической ценности такого показателя необходимы существенно большие группы пациентов и контрольных лиц, а также количественное определение уровня аутоантител.

В целом полученные результаты показывают, что изменения, связанные с γ -синуклеином при глаукоме, могут обнаруживаться не только непосредственно в тканях сетчатки и зрительного нерва, но и в периферической крови. У части пациентов с ПОУГ формируется иммунный ответ на γ -синуклеин, тогда как в контрольной группе в рамках исследованной выборки он не выявлялся. При этом отсутствие связи с уровнем ВГД и стадией

заболевания указывает на то, что данный показатель, вероятно, отражает не степень выраженности глаукомы, а другие особенности патологического процесса. Одновременно выявленная тенденция к снижению концентрации циркулирующего γ -синуклеина требует дальнейшей проверки на большей выборке и сопоставления с наличием аутоантител у каждого пациента.

3.3.4 Содержание γ -синуклеина и активность $\alpha 2$ -МГ в слёзной жидкости и плазме крови пациентов с болезнью Альцгеймера

После анализа клинического материала пациентов с глаукомой представляло интерес проверить, ограничиваются ли выявленные изменения γ -синуклеина патологией зрительного анализатора или могут наблюдаться и при нейродегенеративных заболеваниях другой природы. Для этого были исследованы образцы пациентов с болезнью Альцгеймера (БА), при которой основные патологические изменения развиваются в центральной нервной системе и не связаны непосредственно с первичным поражением глаза. Это позволяло оценить, могут ли изменения γ -синуклеина в периферических биологических жидкостях сопровождать нейродегенеративный процесс в целом, а не только заболевания сетчатки и зрительного нерва.

Выбор БА был связан в том числе с тем, что это заболевание сопровождается выраженными нарушениями белкового гомеостаза, накоплением патологически изменённых белков, синаптической дисфункцией и нейровоспалением [262]. Хотя γ -синуклеин не относится к основным белкам, образующим характерные для БА амилоидные бляшки и нейрофибриллярные клубки, представляло интерес определить, изменяется ли его содержание в периферических биологических жидкостях при развитии нейродегенеративного процесса.

Особое внимание было уделено анализу слёзной жидкости. В предыдущей части работы у γ -КО мышей уже были выявлены изменения её белкового состава и активности $\alpha 2$ -МГ, поэтому было важно проверить, обнаруживаются ли изменения исследуемых показателей и у пациентов.

Кроме того, в последние годы слёзная жидкость рассматривается как возможный источник периферических биомаркеров нейродегенеративных заболеваний, в том числе БА. В слезе пациентов с БА ранее были описаны изменения содержания ряда белков, связанных с воспалением, метаболизмом и защитными функциями поверхности глаза [263, 199]. Доступность и малоинвазивность получения слёзной жидкости также делают её удобным материалом для подобных исследований.

При измерении концентрации γ -синуклеина в слёзной жидкости было выявлено снижение данного показателя у пациентов с БА по сравнению с группой условно здоровых добровольцев (рис. 24А). Этот результат показывает, что изменение содержания γ -синуклеина в слезе наблюдается и при заболевании, основное патологическое поражение при котором локализуется в центральной нервной системе.

Причины обнаруженного снижения на основании имеющихся данных однозначно определить нельзя. Оно может быть связано с изменением продукции или секреции γ -синуклеина, его распределения между тканями и биологическими жидкостями либо с изменением состава самой слёзной жидкости. Ранее при БА уже были описаны изменения протеомного состава слезы, что показывает чувствительность этой биологической жидкости к системным изменениям, сопровождающим нейродегенерацию [264, 263]. Вместе с тем механизмы, определяющие концентрацию именно γ -синуклеина в слёзной жидкости, в настоящее время изучены недостаточно, поэтому интерпретировать снижение его уровня как следствие какого-либо одного процесса было бы преждевременно.

В плазме крови пациентов с БА средняя концентрация γ -синуклеина также была ниже, чем в контрольной группе, однако статистически значимых различий выявлено не было (рис. 24Б). Поэтому в данном случае можно говорить только о тенденции к снижению. Различия между результатами, полученными для слёзной жидкости и плазмы крови, могут быть связаны с особенностями формирования этих биологических сред, однако для

определения причин такого расхождения необходимы дополнительные исследования.

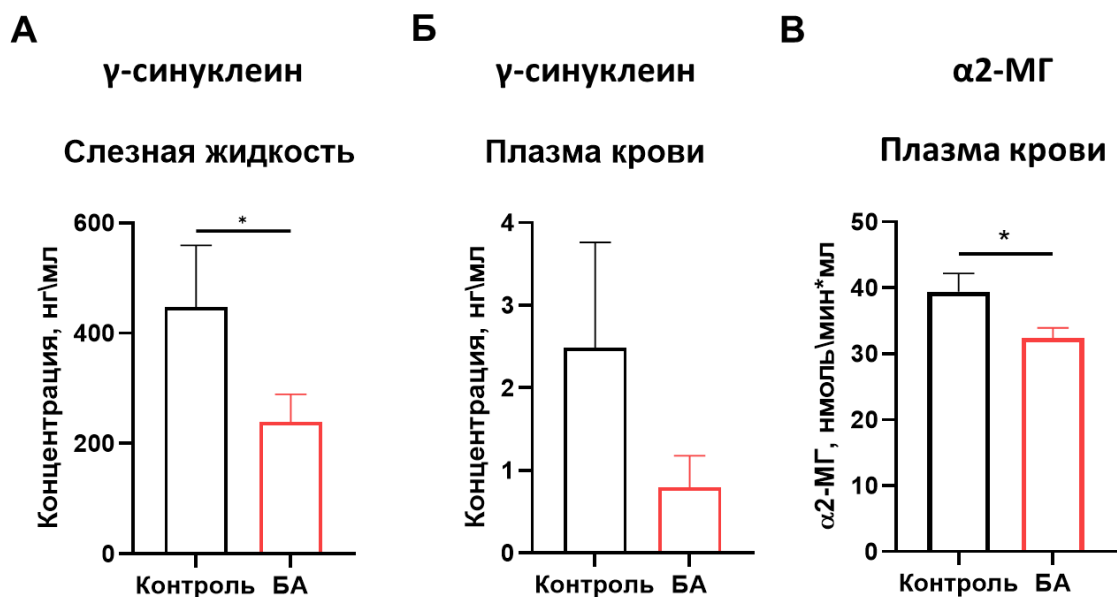


Рисунок 24. Концентрация γ -синуклеина в слёзной жидкости (А) и плазме крови (Б) у пациентов с болезнью Альцгеймера (n=11) и лиц контрольной группы (n=9). (В) – активность $\alpha 2$ -МГ в плазме крови у пациентов с болезнью Альцгеймера (n=24) и лиц контрольной группы (n=19). Данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего. Статистический анализ производился при помощи t-теста Стьюдента для независимых выборок. Обозначения: * – $p < 0,05$.

Помимо содержания γ -синуклеина, у пациентов с БА была исследована активность $\alpha 2$ -МГ в плазме крови. Измерение активности $\alpha 2$ -МГ представляет самостоятельный интерес в контексте БА. Этот белок связывает β -амилоид и участвует в его клиренсе и деградации, а также регулирует активность протеаз и ряда факторов роста [265, 266]. Изменения $\alpha 2$ -МГ в плазме крови ранее также рассматривались в качестве одного из возможных периферических признаков БА [267].

В исследованной нами группе пациентов с БА активность $\alpha 2$ -МГ в плазме крови была ниже, чем у условно здоровых добровольцев (рис. 24В). Таким образом, направление изменений совпадало с результатами, полученными в экспериментальной модели дефицита γ -синуклеина, несмотря на то что в двух частях работы исследовались разные биологические жидкости.

Само по себе совпадение направления изменений не свидетельствует о наличии прямой функциональной связи между γ -синуклеином и $\alpha 2$ -МГ. Активность $\alpha 2$ -МГ при БА может изменяться независимо от γ -синуклеина вследствие нарушения протеолитического баланса, воспалительных процессов или изменений обмена β -амилоида. Поэтому полученный результат корректнее рассматривать как сходное изменение периферического биохимического показателя в экспериментальной модели и при нейродегенеративном заболевании человека, а не как доказательство непосредственной регуляции $\alpha 2$ -МГ γ -синуклеином.

Изменения исследованных показателей не ограничиваются патологией зрительного анализатора. У пациентов с БА было выявлено снижение концентрации γ -синуклеина в слёзной жидкости и активности $\alpha 2$ -МГ в плазме крови, тогда как для γ -синуклеина в плазме наблюдалась только тенденция к снижению. Полученные данные дополняют результаты экспериментов на γ -КО мышцах и исследования пациентов с глаукомой и позволяют рассматривать изменения γ -синуклеина и $\alpha 2$ -МГ в периферических биологических жидкостях как потенциально связанные с нейродегенеративным процессом. Вместе с тем для оценки их возможного диагностического значения необходимы исследования на более крупных независимых выборках.

3.4 Обсуждение результатов

3.4.1 Функциональная роль γ -синуклеина в нервной системе

Полученные данные демонстрируют сложный и разнонаправленный характер изменений поведенческих реакций у мышей с нокаутом γ -синуклеина. Важно отметить, что, несмотря на высокую гомологию и перекрывание зон экспрессии, разные белки семейства синуклеинов, по всей видимости, имеют специализированные функции, которые могут проявляться только в специфических условиях. В данном исследовании мыши, нокаутные по γ -синуклеину, а также по всем трём генам синуклеинов продемонстрировали сниженную продолжительность жизни в сравнении с

контрольными WT мышами, в то время как двойные $\alpha\beta$ -нокауты имели нормальную продолжительность жизни (рис. 5). Ранее мы уже проводили оценку продолжительности жизни нокаутных мышей по генам синуклеинов в различных комбинациях, полученных на генетическом фоне линии C57BL/6 и не обнаружили изменений [2], однако данное исследование ограничивалось двухлетним сроком наблюдения (не более 750 дней), тогда как в текущей работе наблюдение велось на протяжении 3 лет (более 1000 дней). Таким образом, γ -синуклеин, по-видимому, единственный из членов семейства может влиять на такой интегральный показатель, как продолжительность жизни, причём этот эффект проявляется в позднем возрасте.

Одним из заметных фенотипических проявлений инактивации γ -синуклеина оказалось снижение мышечной силы, выявленное в тесте «Сила хвата». Этот эффект отмечался в молодом и среднем возрасте (6 и 13 месяцев соответственно), однако к 24 месяцам различия с контрольной группой исчезали (рис. 6А, 7А, 8А). С возрастом у контрольных животных наблюдалось естественное снижение силы хватки и отсутствие γ -синуклеина дополнительно не ухудшало этот параметр. Возможно, снижение силы у γ -КО мышей в молодом возрасте отражает нарушение механизмов синаптической передачи в центральных или нервно-мышечных синапсах, где γ -синуклеин может играть важную регуляторную роль [227]. Отсутствие дополнительных ухудшений в группе γ -КО на фоне снижения силы хватки у контрольных животных при старении может быть объяснено развивающейся адаптивной компенсацией, например, за счёт других белков семейства [268, 219], так как в случае отсутствия всех трёх синуклеинов снижение силы хватки наблюдалось во всех возрастных группах, в том числе и в 24 месяца (рис. 6А, 7А, 8А).

В тесте «Перевернутая сетка», где помимо развития кратковременной мышечной силы важны также выносливость и координация движений, у нокаутных мышей наблюдалось нарастание дисфункции с возрастом (рис. 6Б, 7Б, 8Б). Так, в 6-месячном возрасте ни в одной из групп нокаутных животных

не наблюдалось отклонений от значений контрольной группы. В возрасте 13 месяцев наблюдалось снижение времени удержания на сетке для группы γ -КО, а в 24 месяца для всех трёх групп нокаутных мышей (γ -КО, $\alpha\beta$ -КО и $\alpha\beta\gamma$ -КО), причём для γ -КО снижение было самым значительным (рис. 8Б). Ранее проводился анализ нокаутных по синуклеинам мышей в тестах «Перевёрнутая сетка» в возрасте 2 лет, при этом для γ -КО различий с контрольной группой обнаружено не было [2]. Причины такого разногласия в полученных результатах неясны. Хотя выполнение тестов, а также условия содержания животных были очень близки в обоих случаях, нельзя исключать влияние таких факторов, как возможные различия в диете мышей, неизвестные генетические изменения в линии лабораторных мышей C57Bl на генетическом фоне которых велись нокаутные животные и др. Для других проанализированных нами групп $\alpha\beta$ -КО и $\alpha\beta\gamma$ -КО, результаты согласуются с предыдущим исследованием, в обеих группах ранее также было зафиксировано снижение «времени до падения» в сравнении с контрольной группой [2].

Примечательно, что нокаут γ -синуклеина никак не повлиял на выполнение животными теста «Ускоряющийся ротарод», который также требует координации и выносливости, но в меньшей степени зависит от мышечной силы. Во все возрастные периоды γ -КО мыши не отличались от контрольных. Снижение показателя «время до падения» было отмечено для группы $\alpha\beta$ -КО в молодом возрасте и далее по мере старения животных эти различия исчезли. В данном случае так же, как и для теста «Перевёрнутая сетка» наблюдаются разногласия с ранее проведённым исследованием, так мы не обнаружили достоверного снижения «времени до падения» для $\alpha\beta$ -КО в 24-месячном возрасте, хотя тенденция к снижению данного показателя присутствовала. Самое значительное различие заключается в том, что у $\alpha\beta\gamma$ -КО мышей в наших экспериментах наблюдалось увеличение «времени до падения», тогда как в предыдущем исследовании оно, наоборот, снижалось в этой группе животных [2]. Мы регистрировали такое повышение во всех

возрастных группах для $\alpha\beta\gamma$ -КО мышей и связываем это с общей гиперактивностью $\alpha\beta\gamma$ -КО, которая выявляется и в других тестах. Существенным отличием тройных нокаутов в нашем исследовании является то, что для их получения использовалась другая линия мышей с нокаутом α -синуклеина (α -КО), описанная в работе Нинкина с соавт. [226]. Данная линия конститутивного нокаута α -синуклеина была получена с минимальным изменением (делецией) последовательности ДНК в районе экзона II и соседнего интрона в гене *Sncs*, в отличие от α -КО линии, использованной ранее и описанной в работе Abeliovich с соавт. [53], в которой был удалён более протяжённый фрагмент последовательности и наблюдалось изменение экспрессии соседнего с этим локусом гена *Mmrn1* [226]. Для того чтобы выяснить, могут ли данные генетические особенности объяснять выявленные различия в поведении, необходимо проведение дополнительных исследований обеих линий мышей.

Анализ ориентировочно-исследовательского поведения и когнитивных функций проводили на животных среднего возраста (13 месяцев). В этом возрасте у нокаутных мышей уже в достаточной мере развивались изменения, наблюдаемые в моторных тестах, но при этом ещё не оказывали сильного влияния изменения, связанные со старением. Наиболее выраженные поведенческие отклонения были выявлены в тесте на тревожность «Приподнятый крестообразный лабиринт» и общую исследовательскую активность «Открытое поле». Животные с нокаутом γ -синуклеина демонстрировали снижение тревожноподобного поведения, проводя больше времени в открытых, стрессогенных участках приподнятого крестообразного лабиринта (рис. 12). Интересно, что аналогичный фенотип наблюдался и у тройных нокаутов, хотя у последних он сопровождался гиперактивностью (рис. 12). Таким образом, по результатам разных тестов гиперактивность проявляется у животных с потерей двух ($\alpha\beta$) либо всех трёх ($\alpha\beta\gamma$) синуклеинов, тогда как для изменения тревожности достаточно нарушения функции одного γ -синуклеина.

Исследование кратковременной и долговременной памяти в тестах «Y-образный лабиринт» и «Водный лабиринт Морриса» соответственно указывает на отсутствие заметных когнитивных нарушений у нокаутных групп мышей (рис. 10, 11). При этом наблюдалась общая тенденция к замедленному обучению в водном лабиринте Морриса, которая может быть обусловлена не нарушениями памяти, а снижением мотивации или неправильной оценкой стрессового стимула (нахождение в воде). Это согласуется с данными литературы о возможной роли синуклеинов в регуляции дофаминергической системы и эмоционального состояния, а также с известными эффектами нокаута α -синуклеина, который влияет на порог запуска поведенческого ответа [222, 269, 67, 270]. Снижение тревожности при отсутствии нарушений памяти было описано для γ -КО мышей 3-месячного возраста в других поведенческих тестах [271, 222] и, таким образом, является устойчивым фенотипическим проявлением потери функции γ -синуклеина.

Отдельного внимания заслуживает отсутствие изменений в уровне синаптических белков SYP, Syn IIa и AMPH в стриатуме и коре головного мозга нокаутных мышей (рис. 13). Это свидетельствует о сохранении общей плотности синаптических контактов и системы везикулярного обмена медиаторами в изученных областях мозга при инактивации синуклеинов. Ранее было показано, что у стареющих (24 месяца) α -КО мышей на фоне снижения уровня дофамина в стриатуме также снижался уровень AMPH, но не SYP [220]. У γ -КО мышей в этом же возрасте не наблюдалось таких изменений [220]. Мы также подтвердили, что у γ -КО в возрасте 13 месяцев нет изменений в уровне синаптических маркеров, более того, у $\alpha\beta$ -КО и $\alpha\beta\gamma$ -КО мышей в данном возрасте также не обнаружили отличий от группы контроля как в стриатуме, так и в коре мозга. Таким образом, наблюдаемые отклонения в моторных функциях и поведении нокаутных животных, в том числе γ -КО, обусловлены не структурными перестройками синаптических контактов или везикулярного аппарата внутри них, а скорее могут быть объяснены тонкими физиологическими изменениями в регуляции нейротрансмиссии.

Подводя итоги анализа поведенческого фенотипа нокаутных по γ -синуклеину мышей в сравнении с мышами, у которых экспрессия γ -синуклеина сохранена, но при этом инактивированы другие два члена семейства (α - и β -синуклеин), а также с мышами с полной инактивацией всех трёх белков синуклеинов, можно сказать, что γ -синуклеин важен для работы нейромышечной системы, и его потеря приводит к устойчивому снижению мышечной силы. Ещё одним фенотипическим проявлением при нокауте γ -синуклеина у мышей является изменение тревожноподобного поведения в сторону ослабления ответной реакции на аверсивную стимуляцию, что говорит о неспособности животных адекватно оценить опасность в окружающей среде. При этом других нарушений высшей нервной деятельности, таких как изменение исследовательской активности или памяти, не наблюдалось. При нарушении функций всех трёх белков некоторые изменения в поведении повторяют то, что наблюдается у γ -нокаутов, например, уменьшение мышечной силы и снижение тревожности. Однако у тройных нокаутов проявляются и дополнительные отклонения в виде гиперактивности, которая была не свойственна для других групп нокаутов.

В некоторых случаях, например, в тесте «Перевернутая сетка» наблюдается отсутствие изменений у молодых мышей и появление достоверного ухудшения с возрастом, что может свидетельствовать о постепенном накоплении субклинических нарушений в регуляции моторных функций, которые проявляются лишь с возрастом. Однако в других тестах («Сила хватки») различия, наоборот, исчезают с возрастом. Это говорит о том, что нарушение функции синуклеинов не носит прямой накопительный характер, а скорее отражает сложные и разнонаправленные процессы компенсации нервной системой недостатка этих белков. При полном отсутствии синуклеинов хотя и не наступает фатальных последствий для организма, наблюдаются отклонения в регуляции нервной системой некоторых аспектов поведения, причём напрямую не связанных между собой, таких как моторные функции и тревожность. Это указывает на

неперекрываемость функций разных синуклеинов и отдельную роль γ -синуклеина как в регуляции двигательных функций, так и поведенческих реакций [272, 273, 222, 274].

3.4.2 Биохимические изменения при дефиците γ -синуклеина

Эксперименты по выявлению аутоантител к γ -синуклеину в крови пациентов с первичной открытоугольной глаукомой (ПОУГ) показали, что они обнаруживаются у 20% больных, в то время как у лиц без глаукомы отсутствуют в 100% случаев. Это указывает на то, что γ -синуклеин вовлечён в патогенез глаукомы, по крайней мере в части случаев. Учитывая многофакторную природу развития глаукомы, мы предполагаем, что γ -синуклеин участвует в этом процессе в различной степени. Ранее мы показали, что аутоантитела к γ -синуклеину выявляются также у пациентов с хронической ишемией головного мозга – с частотой обнаружения 1 на 7,6 человек – и у пациентов с БАС – с частотой обнаружения 1 на 20,5 человек [245]. Результаты настоящего исследования указывают на то, что у пациентов с глаукомой этот показатель выше (1 на 5 человек). Мы предполагаем, что общим механизмом, объясняющим образование аутоантител к γ -синуклеину при указанных выше заболеваниях, является попадание γ -синуклеина или его олигомерных форм в кровоток при нарушении гистогематических барьеров. Некоторые белки, включая синуклеины, меняют локализацию и накапливаются в определённых слоях и/или типах клеток сетчатки при нейродегенеративных заболеваниях [275, 276]. Более того, при нейродегенерации агрегация белков происходит в сетчатке так же, как и в головном мозге [277, 278].

При глаукоме изменения экспрессии и локализации γ -синуклеина отмечались в зрительном нерве. В норме волокна зрительного нерва иммунопозитивны по γ -синуклеину. Однако интенсивное иммунопозитивное окрашивание зрительного нерва по γ -синуклеину в области решётчатой пластинки и в постламинарной области наблюдалось только в глазах с

глаукомой. В модели глаукомы, воспроизводимой каутеризацией эписклеральных вен, показано снижение количества как мРНК γ -синуклеина, так и самого белка в зрительном нерве. При инкубации культуры астроцитов крысы в условиях повышенного гидростатического давления количество γ -синуклеина снижалось [13]. Экспрессия γ -синуклеина на уровне мРНК и белка снижалась в сетчатке генетической модели глаукомы (мыши DBA/2J) и у мышей модели раздавливания зрительного нерва (optic nerve crush, ONC) [64, 279]. В то же время накопление γ -синуклеина наблюдали только в зрительном нерве мышей ONC, но не у мышей DBA/2J [64]. Несмотря на полученные экспериментальные данные об изменении экспрессии и локализации γ -синуклеина в глазу во время глаукоматозного процесса, точные механизмы участия этого белка в патогенезе глаукомы остаются неясными.

Формирование аутоантител к γ -синуклеину и утрата функции белка могут способствовать патогенезу глаукомы. Тем не менее некоторые данные указывают на то, что аутоантитела к γ -синуклеину могут быть защитным фактором, обеспечивающим удаление избытка γ -синуклеина при критическом повышении его внутриклеточной концентрации, а также его неправильно свернутых и агрегированных форм. Это косвенно подтверждается нейропротективным действием аутоантител к γ -синуклеину в культуре нейроретинальных клеток [280].

Таким образом, можно предположить, что при повреждении γ -синуклеин-содержащих клеток данный белок может становиться мишенью гуморального иммунного ответа. Образование таких аутоантител не может рассматриваться однозначно как патогенное явление: в разных условиях иммунный ответ может быть связан как с повреждением тканей, так и с компенсаторными или протективными механизмами.

Ещё одним из механизмов участия γ -синуклеина в патогенезе глаукомы может быть его участие в моноаминергической нейротрансмиссии, которая способна влиять на ВГД [257, 8]. Все три члена семейства синуклеинов модулируют транспорт, экспрессию и функцию переносчиков моноаминов на

клеточной поверхности, тем самым играя центральную роль в регуляции обратного захвата моноаминов [8]. У нокаутных по γ -синуклеину мышей при поведенческом тестировании выявлялся умеренный дефицит дофаминергической нейромедиаторной системы [281]. γ -Синуклеин может регулировать активность переносчика серотонина, осуществляющего его обратный захват из синаптической щели [282]. Уровень ВГД зависит от скорости оттока и образования внутриглазной жидкости, на которые влияют адренергическая, дофаминергическая и холинергическая системы [257]. В настоящем исследовании мы показали, что динамика ВГД в ответ на инстилляцию регуляторов медиаторных систем у γ -КО мышей отличается от такового у WT мышей. После инстилляций дофаминергического агониста и антагониста, адренергического агониста и антагониста холинергических рецепторов у γ -КО мышей ВГД снижается. В то же время у WT мышей ВГД не изменяется или имеет тенденцию к повышению, как в случае фенилэфрина. Это может быть связано с нарушением нейронального контроля ВГД у γ -КО мышей и расстройством корректного взаимодействия между медиаторами адренергической, дофаминергической и холинергической систем [283, 284]. Для дальнейшего выяснения этого вопроса необходимы дополнительные исследования с использованием селективных агонистов и антагонистов рецепторов.

Выявленная тенденция к снижению концентрации γ -синуклеина в сыворотке крови у пациентов с глаукомой по сравнению с контрольной группой ($p = 0,0648$) дополняет данные об аутоантителах и указывает на возможное изменение периферического пула этого белка. Одним из вероятных объяснений такого снижения может быть связывание γ -синуклеина аутоантителами с образованием иммунных комплексов и последующим изменением его доступности для определения в биологических жидкостях. Однако на основании полученных данных нельзя установить, является ли появление аутоантител причиной снижения концентрации γ -синуклеина или, напротив, следствием повреждения клеток, экспрессирующих данный белок.

Поэтому этот механизм следует рассматривать как гипотезу, требующую дальнейшей проверки.

Особый интерес представляет то, что снижение концентрации γ -синуклеина было выявлено не только при глаукоме, но и в слёзной жидкости пациентов с болезнью Альцгеймера. Это наблюдение позволяет предположить, что изменения γ -синуклеина в периферических биологических жидкостях могут быть связаны не только с локальной патологией зрительного анализатора, но и с более общими нейродегенеративными процессами. Такая интерпретация согласуется с современными представлениями о слёзной жидкости как о потенциальном источнике биомаркеров болезни Альцгеймера: ранее для этого заболевания были описаны изменения белкового состава слезы и профиля микроРНК [285, 286].

При этом направление изменений γ -синуклеина может зависеть от исследуемой биологической жидкости и стадии патологического процесса. Так, для спинномозговой жидкости при болезни Альцгеймера было описано повышение концентрации α -, β - и γ -синуклеинов, что авторы связывали с процессами синаптической и нейрональной дегенерации [12]. В отличие от этого, снижение γ -синуклеина в слёзной жидкости, выявленное в настоящей работе, может отражать изменение локального или периферического белкового баланса, включая секрецию, элиминацию, связывание белка антителами или перераспределение между тканевыми и внеклеточными компартментами.

Одним из маркеров нейродегенеративного процесса в сетчатке и головном мозге рассматривают изменения $\alpha 2$ -МГ в слёзной жидкости [214]. $\alpha 2$ -МГ является белком острой фазы воспаления, ингибитором широкого спектра протеолитических ферментов и регулятором активности ряда цитокинов и факторов роста. Кроме того, он может выполнять функцию внеклеточного шаперона, препятствуя накоплению неправильно свернутых белков и их агрегатов, включая амилоид- β , отложение которого описано в сетчатке при глаукоме [287, 261, 288, 289, 290]. Мы отметили значимое

повышение концентрации общего белка в слёзной жидкости γ -КО мышей. Вероятно, это связано со снижением притока воды в слёзную жидкость из слёзных желёз и формированием более концентрированной слёзной жидкости. Значимое снижение активности $\alpha 2$ -МГ в слёзной жидкости γ -КО мышей указывает на нарушение его защитного эффекта. Сходное по направлению изменение было выявлено и в клиническом материале: у пациентов с болезнью Альцгеймера снижалась активность $\alpha 2$ -МГ в плазме крови. В совокупности эти результаты позволяют предположить, что дефицит γ -синуклеина и нейродегенеративные процессы могут сопровождаться ослаблением периферических защитных механизмов, связанных с $\alpha 2$ -МГ.

ВЫВОДЫ

1. У мышей, нокаутных по γ -синуклеину и по всем трём генам синуклеинов отмечается снижение продолжительности жизни по сравнению с контрольной группой;
2. При отсутствии γ -синуклеина у мышей наблюдается снижение мышечной силы, что указывает на специфическое его участие в регуляции моторных функций;
3. У γ -КО мышей выявляется снижение тревожноподобного поведения при отсутствии нарушений памяти, тогда как у животных с тройным нокаутом формируется гиперактивный поведенческий фенотип;
4. Морфологическая структура дофаминергических ядер среднего мозга и уровень основных синаптических белков не изменены у нокаутных по синуклеинам животных;
5. У мышей с дефицитом γ -синуклеина нарушается регуляция внутриглазного давления и снижается активность $\alpha 2$ -макроглобулина в слёзной жидкости, что может свидетельствовать о нарушении регуляторных и защитных механизмов в зрительном анализаторе;
6. У 20% пациентов с глаукомой в сыворотке крови выявлены аутоантитела к γ -синуклеину, отсутствующие у здоровых лиц;
7. У пациентов с болезнью Альцгеймера выявляется снижение концентрации γ -синуклеина в слёзной жидкости, а также снижение активности $\alpha 2$ -макроглобулина в крови.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. George, J. M. The synucleins / J. M. George // *Genome Biology*. – 2002. – Vol. 3, No. 1. – Art. reviews3002. – DOI 10.1186/gb-2001-3-1-reviews3002.
2. Combinational losses of synucleins reveal their differential requirements for compensating age-dependent alterations in motor behavior and dopamine metabolism / N. Connor-Robson, O. M. Peters, S. Millership [et al.] // *Neurobiology of Aging*. – 2016. – Vol. 46. – P. 107–112. – DOI 10.1016/j.neurobiolaging.2016.06.020.
3. α -Synuclein in Lewy bodies / M. G. Spillantini, M. L. Schmidt, V. M. Y. Lee [et al.] // *Nature*. – 1997. – Vol. 388, No. 6645. – P. 839–840. – DOI 10.1038/42166.
4. Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease / K. Ueda, H. Fukushima, E. Masliah [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1993. – Vol. 90, No. 23. – P. 11282–11286. – DOI 10.1073/pnas.90.23.11282.
5. Gamma-synuclein pathology in amyotrophic lateral sclerosis / O. M. Peters, T. Shelkovernikova, J. R. Highley [et al.] // *Annals of Clinical and Translational Neurology*. – 2015. – Vol. 2, No. 1. – P. 29–37. – DOI 10.1002/acn3.143.
6. γ -Synuclein and the progression of cancer / M. Ahmad, S. Attoub, M. N. Singh [et al.] // *The FASEB Journal*. – 2007. – Vol. 21, No. 13. – P. 3419–3430. – DOI 10.1096/fj.07-8379rev.
7. Hayashi, J. β -Synuclein: An Enigmatic Protein with Diverse Functionality / J. Hayashi, J. A. Carver // *Biomolecules*. – 2022. – Vol. 12, No. 1. – Art. 142. – DOI 10.3390/biom12010142.
8. Oaks, A. W. Synuclein modulation of monoamine transporters / A. W. Oaks, A. Sidhu // *FEBS Letters*. – 2011. – Vol. 585, No. 7. – P. 1001–1006. – DOI 10.1016/j.febslet.2011.03.009.
9. $\alpha\beta\gamma$ -Synuclein triple knockout mice reveal age-dependent neuronal dysfunction / B. Greten-Harrison, M. Polydoro, M. Morimoto-Tomita [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2010. – Vol. 107, No. 45. – P. 19573–19578. – DOI 10.1073/pnas.1005005107.
10. γ -Synucleinopathy: neurodegeneration associated with overexpression of the mouse protein / N. Ninkina, O. Peters, S. Millership [et al.] // *Human Molecular Genetics*. – 2009. – Vol. 18, No. 10. – P. 1779–1794. – DOI 10.1093/hmg/ddp090.
11. New α - and γ -synuclein immunopathological lesions in human brain / I. Surgucheva, K. L. Newell, J. Burns, A. Surguchov // *Acta Neuropathologica Communications*. – 2014. – Vol. 2, No. 1. – Art. 132. – DOI 10.1186/s40478-014-0132-8.
12. Sheehan, G.D. Synucleins in Neural Physiology: Understanding Endogenous Function to Better Contextualize Pathology / G.D. Sheehan, J.B. Ding // *Annu Rev Neurosci*. – 2026. – V. 49. – № 1. – P. 273–288. – DOI 10.1146/annurev-neuro-112723-051616
13. 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 / P. Oeckl, F. Metzger, M. Nagl [et al.] // *Molecular & Cellular Proteomics*. – 2016. – Vol. 15, No. 10. – P. 3126–3138. – DOI 10.1074/mcp.m116.059915.
14. Synucleins in glaucoma: Implication of γ -synuclein in glaucomatous alterations in the optic nerve / I. Surgucheva, B. McMahan, F. Ahmed [et al.] // *Journal of Neuroscience Research*. – 2002. – Vol. 68, No. 1. – P. 97–106. – DOI 10.1002/jnr.10198.

15. Maroteaux, L. Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal / L. Maroteaux, J. Campanelli, R. Scheller // *The Journal of Neuroscience*. – 1988. – Vol. 8, No. 8. – P. 2804–2815. – DOI 10.1523/jneurosci.08-08-02804.1988.
16. Carlson, S. S. An antiserum specific for cholinergic synaptic vesicles from electric organ / S. S. Carlson, R. B. Kelly // *The Journal of cell biology*. – 1980. – Vol. 87, No. 1. – P. 98–103. – DOI 10.1083/jcb.87.1.98.
17. Purification and Characterization of a Novel Brain-Specific 14-kDa Protein / S. Nakajo, K. Omata, T. Aiuchi [et al.] // *Journal of Neurochemistry*. – 1990. – Vol. 55, No. 6. – P. 2031–2038. – DOI 10.1111/j.1471-4159.1990.tb05792.x.
18. Cloning and Characterization of the cDNA Encoding a Novel Brain-Specific 14-kDa Protein / T. Tobe, S. Nakajo, A. Tanaka [et al.] // *Journal of Neurochemistry*. – 1992. – Vol. 59, No. 5. – P. 1624–1629. – DOI 10.1111/j.1471-4159.1992.tb10991.x.
19. A new brain-specific 14-kDa protein is a phosphoprotein / S. Nakajo, K. Tsukada, K. Omata [et al.] // *European Journal of Biochemistry*. – 1993. – Vol. 217, No. 3. – P. 1057–1063. – DOI 10.1111/j.1432-1033.1993.tb18337.x.
20. Jakes, R. Identification of two distinct synucleins from human brain / R. Jakes, M. G. Spillantini, M. Goedert // *FEBS Letters*. – 1994. – Vol. 345, No. 1. – P. 27–32. – DOI 10.1016/0014-5793(94)00395-5.
21. Identification of a breast cancer-specific gene, BCSG1, by direct differential cDNA sequencing / H. Ji, Y. E. Liu, T. Jia [et al.] // *Cancer research*. – 1997. – Vol. 57, No. 4. – P. 759–764. – PMID 9044857.
22. Persyn, a member of the synuclein family, influences neurofilament network integrity / V. Buchman, J. Adu, L. Pinõn [et al.] // *Nature Neuroscience*. – 1998. – Vol. 1, No. 2. – P. 101–103. – DOI 10.1038/349.
23. Identification, localization and characterization of the human γ -synuclein gene / C. Lavedan, E. Leroy, A. Dehejia [et al.] // *Human Genetics*. – 1998. – Vol. 103, No. 1. – P. 106–112. – DOI 10.1007/s004390050792.
24. NACP, a presynaptic protein, immunoreactivity in Lewy bodies in Parkinson's disease / K. Wakabayashi, K. Matsumoto, K. Takayama [et al.] // *Neuroscience Letters*. – 1997. – Vol. 239, No. 1. – P. 45–48. – DOI 10.1016/s0304-3940(97)00891-4.
25. Mutation in the α -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease / M. H. Polymeropoulos, C. Lavedan, E. Leroy [et al.] // *Science*. – 1997. – Vol. 276, No. 5321. – P. 2045–2047. – DOI 10.1126/science.276.5321.2045.
26. AlaSOPro mutation in the gene encoding α -synuclein in Parkinson's disease / R. Krüger, W. Kuhn, T. Müller [et al.] // *Nature Genetics*. – 1998. – Vol. 18, No. 2. – P. 106–108. – DOI 10.1038/ng0298-106.
27. The new mutation, E46K, of α -synuclein causes parkinson and Lewy body dementia / J. J. Zarranz, J. Alegre, J. C. Gómez-Esteban [et al.] // *Annals of Neurology*. – 2004. – Vol. 55, No. 2. – P. 164–173. – DOI 10.1002/ana.10795.
28. α -Synucleinopathy associated with G51D SNCA mutation: a link between Parkinson's disease and multiple system atrophy? / A. P. Kiely, Y. T. Asi, E. Kara [et al.] // *Acta Neuropathologica*. – 2013. – Vol. 125, No. 5. – P. 753–769. – DOI 10.1007/s00401-013-1096-7.

29. A novel α -synuclein mutation A53E associated with atypical multiple system atrophy and Parkinson's disease-type pathology / P. Pasanen, L. Myllykangas, M. Siitonen [et al.] // *Neurobiology of Aging*. – 2014. – Vol. 35, No. 9. – P. 2180.e1–2180.e5. – DOI 10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.024.
30. α -Synuclein Locus Triplication Causes Parkinson's Disease / A. B. Singleton, M. Farrer, J. Johnson [et al.] // *Science*. – 2003. – Vol. 302, No. 5646. – P. 841–841. – DOI 10.1126/science.1090278.
31. Causal relation between α -synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease / P. Ibáñez, A. M. Bonnet, B. Débarges [et al.] // *The Lancet*. – 2004. – Vol. 364, No. 9440. – P. 1169–1171. – DOI 10.1016/s0140-6736(04)17104-3.
32. Four Copies of SNCA Responsible for Autosomal Dominant Parkinson's Disease in Two Italian Siblings / R. Ferese, N. Modugno, R. Campopiano [et al.] // *Parkinson's Disease*. – 2015. – Vol. 2015. – P. 1–6. – DOI 10.1155/2015/546462.
33. Maraganore, D. M. Collaborative Analysis of α -Synuclein Gene Promoter Variability and Parkinson Disease / D. M. Maraganore // *JAMA*. – 2006. – Vol. 296, No. 6. – P. 661. – DOI 10.1001/jama.296.6.661.
34. Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch / J. M. George, H. Jin, W. S. Woods, D. F. Clayton // *Neuron*. – 1995. – Vol. 15, No. 2. – P. 361–372. – DOI 10.1016/0896-6273(95)90040-3.
35. The many faces of α -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target / H. A. Lashuel, C. R. Overk, A. Oueslati, E. Masliah // *Nature Reviews Neuroscience*. – 2013. – Vol. 14, No. 1. – P. 38–48. – DOI 10.1038/nrn3406.
36. Burré, J. Cell Biology and Pathophysiology of α -Synuclein / J. Burré, M. Sharma, T. C. Südhof // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. – 2018. – Vol. 8, No. 3. – P. a024091. – DOI 10.1101/cshperspect.a024091.
37. Synaptic vesicle binding of α -synuclein is modulated by β - and γ -synucleins / K. E. Carnazza, L. E. Komer, Y. X. Xie [et al.] // *Cell Reports*. – 2022. – Vol. 39, No. 2. – Art. 110675. – DOI 10.1016/j.celrep.2022.110675.
38. Ninkina, N. Editorial of the Special Issue: Recent Advances in Understanding of the Role of Synuclein Family Members in Health and Disease / N. Ninkina, M. S. Kukharsky // *Biomedicines*. – 2023. – Vol. 11, No. 9. – Art. 2330. – DOI 10.3390/biomedicines11092330.
39. Surguchov, A. Synucleins: New Data on Misfolding, Aggregation and Role in Diseases / A. Surguchov, A. Surguchev // *Biomedicines*. – 2022. – Vol. 10, No. 12. – Art. 3241. – DOI 10.3390/biomedicines10123241.
40. Alpha and Beta Synucleins: From Pathophysiology to Clinical Application as Biomarkers / L. Barba, F. Paolini Paoletti, G. Bellomo [et al.] // *Movement Disorders*. – 2022. – Vol. 37, No. 4. – P. 669–683. – DOI 10.1002/mds.28941.
41. Goedert, M. The Synucleinopathies: Twenty Years On / M. Goedert, R. Jakes, M. G. Spillantini // *Journal of Parkinson's Disease*. – 2017. – Vol. 7, No. s1. – P. S51–S69. – DOI 10.3233/jpd-179005.
42. Excess membrane binding of monomeric alpha-, beta- and gamma-synuclein is invariably associated with inclusion formation and toxicity / T. E. Kim, A. J. Newman, T. Imberdis [et al.] // *Human Molecular Genetics*. – 2021. – Vol. 30, No. 23. – P. 2332–2346. – DOI 10.1093/hmg/ddab188.

43. Landau, M. Getting in charge of β -synuclein fibrillation / M. Landau // *Journal of Biological Chemistry*. – 2017. – Vol. 292, No. 39. – P. 16380–16381. – DOI 10.1074/jbc.h117.780528.
44. Mehra, S. α -Synuclein misfolding and aggregation: Implications in Parkinson's disease pathogenesis / S. Mehra, S. Sahay, S. K. Maji // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. – 2019. – Vol. 1867, No. 10. – P. 890–908. – DOI 10.1016/j.bbapap.2019.03.001.
45. Janowska, M. K. The loss of inhibitory C-terminal conformations in disease associated P123H β -synuclein / M. K. Janowska, J. Baum // *Protein Science*. – 2016. – Vol. 25, No. 1. – P. 286–294. – DOI 10.1002/pro.2798.
46. Effect of Disease-Associated P123H and V70M Mutations on β -Synuclein Fibrillation / K. Sharma, S. Mehra, A. S. Sawner [et al.] // *ACS Chemical Neuroscience*. – 2020. – Vol. 11, No. 18. – P. 2836–2848. – DOI 10.1021/acscchemneuro.0c00405.
47. A Hydrophobic Stretch of 12 Amino Acid Residues in the Middle of α -Synuclein Is Essential for Filament Assembly / B. I. Giasson, I. V. J. Murray, J. Q. Trojanowski, V. M. Y. Lee // *Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – Vol. 276, No. 4. – P. 2380–2386. – DOI 10.1074/jbc.m008919200.
48. Villar-Piqué, A. Structure, function and toxicity of alpha-synuclein: the Bermuda triangle in synucleinopathies / A. Villar-Piqué, T. Lopes da Fonseca, T. F. Outeiro // *Journal of Neurochemistry*. – 2016. – Vol. 139, No. S1. – P. 240–255. – DOI 10.1111/jnc.13249.
49. Williams, J. K. Interactions between the Intrinsically Disordered Proteins β -Synuclein and α -Synuclein / J. K. Williams, X. Yang, J. Baum // *PROTEOMICS*. – 2018. – Vol. 18, No. 21-22. – Art. 1800109. – DOI 10.1002/pmic.201800109.
50. Parkinson's Disease-associated α -Synuclein Is More Fibrillogenic than β - and γ -Synuclein and Cannot Cross-seed Its Homologs / A. L. Biere, S. J. Wood, J. Wypych [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2000. – Vol. 275, No. 44. – P. 34574–34579. – DOI 10.1074/jbc.m005514200.
51. Comparative Analysis of the Conformation, Aggregation, Interaction, and Fibril Morphologies of Human α -, β -, and γ -Synuclein Proteins / M. K. Jain, P. Singh, S. Roy, R. Bhat // *Biochemistry*. – 2018. – Vol. 57, No. 26. – P. 3830–3848. – DOI 10.1021/acs.biochem.8b00343.
52. The African coelacanth genome provides insights into tetrapod evolution / C. T. Amemiya, J. Alföldi, A. P. Lee [et al.] // *Nature*. – 2013. – Vol. 496, No. 7445. – P. 311–316. – DOI 10.1038/nature12027.
53. Mice Lacking α -Synuclein Display Functional Deficits in the Nigrostriatal Dopamine System / A. Abeliovich, Y. Schmitz, I. Fariñas [et al.] // *Neuron*. – 2000. – Vol. 25, No. 1. – P. 239–252. – DOI 10.1016/s0896-6273(00)80886-7.
54. α -Synuclein Promotes SNARE-Complex Assembly in Vivo and in Vitro / J. Burré, M. Sharma, T. Tsetsenis [et al.] // *Science*. – 2010. – Vol. 329, No. 5999. – P. 1663–1667. – DOI 10.1126/science.1195227.
55. Presynaptic Functions of α -Synuclein: Regulating Synaptic Vesicle Dynamics and Neurotransmission with Insights into β - and γ -Synucleins (A Narrative Review) / E. A. Lysikova, I. S. Sukhanova, N. V. Ekimova [et al.] // *Applied Sciences*. – 2026. – Vol. 16, No. 14. – Art. 7222. – DOI 10.3390/app16147222.
56. Mutant and Wild-Type α -Synuclein Interact with Mitochondrial Cytochrome C Oxidase / H. Elkon, J. Don, E. Melamed [et al.] // *Journal of Molecular Neuroscience*. – 2002. – Vol. 18, No. 3. – P. 229–238. – DOI 10.1385/jmn:18:3:229.

57. Monomeric Alpha-Synuclein Exerts a Physiological Role on Brain ATP Synthase / M. H. R. Ludtmann, P. R. Angelova, N. N. Ninkina [et al.] // *The Journal of Neuroscience*. – 2016. – Vol. 36, No. 41. – P. 10510–10521. – DOI 10.1523/jneurosci.1659-16.2016.
58. Alpha-synuclein delays mitophagy and targeting Miro rescues neuron loss in Parkinson's models / A. Shaltouki, C. H. Hsieh, M. J. Kim, X. Wang // *Acta Neuropathologica*. – 2018. – Vol. 136, No. 4. – P. 607–620. – DOI 10.1007/s00401-018-1873-4.
59. Ordonez, D. G. α -synuclein Induces Mitochondrial Dysfunction through Spectrin and the Actin Cytoskeleton / D. G. Ordonez, M. K. Lee, M. B. Feany // *Neuron*. – 2018. – Vol. 97, No. 1. – P. 108–124.e6. – DOI 10.1016/j.neuron.2017.11.036.
60. α -Synuclein Regulates Peripheral Insulin Secretion and Glucose Transport / N. Wijesekara, R. Ahrens, L. Wu [et al.] // *Frontiers in Aging Neuroscience*. – 2021. – Vol. 13. – Art. 665348. – DOI 10.3389/fnagi.2021.665348.
61. Identification of β -synuclein on secretory granules in chromaffin cells and the effects of α - and β -synuclein on post-fusion BDNF discharge and fusion pore expansion / P. S. Abbineni, K. P. Bohannon, M. A. Bittner [et al.] // *Neuroscience Letters*. – 2019. – Vol. 699. – P. 134–139. – DOI 10.1016/j.neulet.2019.01.056.
62. Surgucheva, I. γ -synuclein has a dynamic intracellular localization / I. Surgucheva, B. McMahon, A. Surguchov // *Cell Motility and the Cytoskeleton*. – 2006. – Vol. 63, No. 8. – P. 447–458. – DOI 10.1002/cm.20135.
63. Synucleins in ocular tissues / A. Surguchov, B. McMahan, E. Masliah, I. Surgucheva // *Journal of Neuroscience Research*. – 2001. – Vol. 65, No. 1. – P. 68–77. – DOI 10.1002/jnr.1129.
64. Differential Gamma-Synuclein Expression in Acute and Chronic Retinal Ganglion Cell Death in the Retina and Optic Nerve / Y. Liu, M. L. Tapia, J. Yeh [et al.] // *Molecular Neurobiology*. – 2020. – Vol. 57, No. 2. – P. 698–709. – DOI 10.1007/s12035-019-01735-1.
65. γ -synuclein is a novel player in the control of body lipid metabolism / S. Millership, N. Ninkina, J. J. Rochford, V. L. Buchman // *Adipocyte*. – 2013. – Vol. 2, No. 4. – P. 276–280. – DOI 10.4161/adip.25162.
66. A microRNA Cluster Controls Fat Cell Differentiation and Adipose Tissue Expansion By Regulating SNCG / R. Rodríguez-Barrueco, J. Latorre, L. Devis-Jáuregui [et al.] // *Advanced Science*. – 2022. – Vol. 9, No. 4. – Art. 2104759. – DOI 10.1002/advs.202104759.
67. β -synuclein potentiates synaptic vesicle dopamine uptake and rescues dopaminergic neurons from MPTP-induced death in the absence of other synucleins / N. Ninkina, S. J. Millership, O. M. Peters [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2021. – Vol. 297, No. 6. – Art. 101375. – DOI 10.1016/j.jbc.2021.101375.
68. Lewy body in neurodegeneration with brain iron accumulation type 1 is immunoreactive for α -synuclein / S. Arawaka, Y. Saito, S. Murayama, H. Mori // *Neurology*. – 1998. – Vol. 51, No. 3. – P. 887–889. – DOI 10.1212/wnl.51.3.887.
69. Multiple-system atrophy: a new α -synuclein disease? / W. Gai, J. Power, P. Blumbergs, W. Blessing // *The Lancet*. – 1998. – Vol. 352, No. 9127. – P. 547–548. – DOI 10.1016/s0140-6736(05)79256-4.
70. α -Synuclein: Multiple System Atrophy Prions / A. L. Woerman, J. C. Watts, A. Aoyagi [et al.] // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. – 2018. – Vol. 8, No. 7. – P. a024588. – DOI 10.1101/cshperspect.a024588.

71. Erskine, D. Insights into Lewy body disease from rare neurometabolic disorders / D. Erskine, J. Attems // *Journal of Neural Transmission*. – 2021. – Vol. 128, No. 10. – P. 1567–1575. – DOI 10.1007/s00702-021-02355-7.
72. Goedert, M. Lewy body diseases and multiple system atrophy as α -synucleinopathies / M. Goedert, M. G. Spillantini // *Molecular Psychiatry*. – 1998. – Vol. 3, No. 6. – P. 462–465. – DOI 10.1038/sj.mp.4000458.
73. Neuropathology and molecular diagnosis of Synucleinopathies / S. Koga, H. Sekiya, N. Kondru [et al.] // *Molecular Neurodegeneration*. – 2021. – Vol. 16, No. 1. – Art. 83. – DOI 10.1186/s13024-021-00501-z.
74. Kalia, L. V. Parkinson's disease / L. V. Kalia, A. E. Lang // *The Lancet*. – 2015. – Vol. 386, No. 9996. – P. 896–912. – DOI 10.1016/s0140-6736(14)61393-3.
75. Kanaan, N. M. Loss of Functional Alpha-Synuclein: A Toxic Event in Parkinson's Disease? / N. M. Kanaan, F. P. Manfredsson // *Journal of Parkinson's Disease*. – 2012. – Vol. 2, No. 4. – P. 249–267. – DOI 10.3233/jpd-012138.
76. The release of toxic oligomers from α -synuclein fibrils induces dysfunction in neuronal cells / R. Cascella, S. W. Chen, A. Bigi [et al.] // *Nature Communications*. – 2021. – Vol. 12, No. 1. – Art. 1814. – DOI 10.1038/s41467-021-21937-3.
77. Clinical application of prion-like seeding in α -synucleinopathies: Early and non-invasive diagnosis and therapeutic development / J. Li, H. Luo, H. Zheng [et al.] // *Frontiers in Molecular Neuroscience*. – 2022. – Vol. 15. – Art. 975619. – DOI 10.3389/fnmol.2022.975619.
78. Antunes, A. S. L. M. Post-translational Modifications in Parkinson's Disease / A. S. L. M. Antunes // *Understanding PTMs in Neurodegenerative Diseases*. – Springer International Publishing. – 2022. – P. 85–94. – DOI 10.1007/978-3-031-05460-0_6.
79. Role of post-translational modifications on the alpha-synuclein aggregation-related pathogenesis of Parkinson's disease / H. Yoo, J. Lee, B. Kim [et al.] // *BMB Reports*. – 2022. – Vol. 55, No. 7. – P. 323–335. – DOI 10.5483/bmbrep.2022.55.7.073.
80. Zhang, J. The Roles of Post-translational Modifications on α -Synuclein in the Pathogenesis of Parkinson's Diseases / J. Zhang, X. Li, J. D. Li // *Frontiers in Neuroscience*. – 2019. – Vol. 13. – Art. 381. – DOI 10.3389/fnins.2019.00381.
81. De novo designed protein inhibitors of amyloid aggregation and seeding / K. A. Murray, C. J. Hu, S. L. Griner [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2022. – Vol. 119, No. 34. – Art. e2206240119. – DOI 10.1073/pnas.2206240119.
82. Extent of N-terminus exposure of monomeric alpha-synuclein determines its aggregation propensity / A. D. Stephens, M. Zacharopoulou, R. Moons [et al.] // *Nature Communications*. – 2020. – Vol. 11, No. 1. – Art. 2820. – DOI 10.1038/s41467-020-16564-3.
83. Endogenous alpha-synuclein monomers, oligomers and resulting pathology: let's talk about the lipids in the room / B. A. Killinger, R. Melki, P. Brundin, J. H. Kordower // *npj Parkinson's Disease*. – 2019. – Vol. 5, No. 1. – Art. 23. – DOI 10.1038/s41531-019-0095-3.
84. Interactions of α -synuclein oligomers with lipid membranes / G. Musteikytė, A. K. Jayaram, C. K. Xu [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. – 2021. – Vol. 1863, No. 4. – Art. 183536. – DOI 10.1016/j.bbamem.2020.183536.
85. Lewy pathology in Parkinson's disease consists of crowded organelles and lipid membranes / S. H. Shahmoradian, A. J. Lewis, C. Genoud [et al.] // *Nature Neuroscience*. – 2019. – Vol. 22, No. 7. – P. 1099–1109. – DOI 10.1038/s41593-019-0423-2.

86. The Vicious Cycle Between α -Synuclein Aggregation and Autophagic-Lysosomal Dysfunction / G. Bellomo, S. Paciotti, L. Gatticchi, L. Parnetti // *Movement Disorders*. – 2020. – Vol. 35, No. 1. – P. 34–44. – DOI 10.1002/mds.27895.
87. Haining, R. Neuromelanin, one of the most overlooked molecules in modern medicine, is not a spectator / R. Haining, C. Achat-Mendes // *Neural Regeneration Research*. – 2017. – Vol. 12, No. 3. – P. 372. – DOI 10.4103/1673-5374.202928.
88. Dopamine promotes the neurodegenerative potential of β -synuclein / A. Raina, K. Leite, S. Guerin [et al.] // *Journal of Neurochemistry*. – 2021. – Vol. 156, No. 5. – P. 674–691. – DOI 10.1111/jnc.15134.
89. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease / R. B. Postuma, D. Berg, M. Stern [et al.] // *Movement Disorders*. – 2015. – Vol. 30, No. 12. – P. 1591–1601. – DOI 10.1002/mds.26424.
90. Buchman, V. L. Modulation of α -synuclein expression in transgenic animals for modelling synucleinopathies – is the juice worth the squeeze? / V. L. Buchman, N. Ninkina // *Neurotoxicity Research*. – 2008. – Vol. 14, No. 4. – P. 329–341. – DOI 10.1007/bf03033857.
91. Chiba-Falek, O. Structural variants in SNCA gene and the implication to synucleinopathies / O. Chiba-Falek // *Current Opinion in Genetics & Development*. – 2017. – Vol. 44. – P. 110–116. – DOI 10.1016/j.gde.2017.01.014.
92. Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies / I. G. McKeith, B. F. Boeve, D. W. Dickson [et al.] // *Neurology*. – 2017. – Vol. 89, No. 1. – P. 88–100. – DOI 10.1212/wnl.0000000000004058.
93. Walker, L. Clinical and neuropathological differences between Parkinson's disease, Parkinson's disease dementia and dementia with Lewy bodies – current issues and future directions / L. Walker, L. Stefanis, J. Attems // *Journal of Neurochemistry*. – 2019. – Vol. 150, No. 5. – P. 467–474. – DOI 10.1111/jnc.14698.
94. Dementia with Lewy bodies: an update and outlook / T. F. Outeiro, D. J. Koss, D. Erskine [et al.] // *Molecular Neurodegeneration*. – 2019. – Vol. 14, No. 1. – Art. 5. – DOI 10.1186/s13024-019-0306-8.
95. The locus coeruleus: Another vulnerability target in Parkinson's disease / W. H. Oertel, M. T. Henrich, A. Janzen, F. F. Geibl // *Movement Disorders*. – 2019. – Vol. 34, No. 10. – P. 1423–1429. – DOI 10.1002/mds.27785.
96. Second consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy / S. Gilman, G. K. Wenning, P. A. Low [et al.] // *Neurology*. – 2008. – Vol. 71, No. 9. – P. 670–676. – DOI 10.1212/01.wnl.0000324625.00404.15.
97. Trojanowski, J. Q. Proposed neuropathological criteria for the post mortem diagnosis of multiple system atrophy / J. Q. Trojanowski, T. Revesz, the Neuropathology Working Group on MSA // *Neuropathology and Applied Neurobiology*. – 2007. – Vol. 33, No. 6. – P. 615–620. – DOI 10.1111/j.1365-2990.2007.00907.x.
98. Dysphagia in multiple system atrophy consensus statement on diagnosis, prognosis and treatment / G. Calandra-Buonaura, E. Alfonsi, L. Vignatelli [et al.] // *Parkinsonism & Related Disorders*. – 2021. – Vol. 86. – P. 124–132. – DOI 10.1016/j.parkreldis.2021.03.027.
99. Hippocampal α -synuclein pathology correlates with memory impairment in multiple system atrophy / Y. Miki, S. C. Foti, D. Hansen [et al.] // *Brain*. – 2020. – Vol. 143, No. 6. – P. 1798–1810. – DOI 10.1093/brain/awaa126.

100. Alpha-synuclein mRNA expression in oligodendrocytes in MSA / Y. T. Asi, J. E. Simpson, P. R. Heath [et al.] // *Glia*. – 2014. – Vol. 62, No. 6. – P. 964–970. – DOI 10.1002/glia.22653.
101. Insights into the pathogenesis of multiple system atrophy: focus on glial cytoplasmic inclusions / S. Kaji, T. Maki, T. Ishimoto [et al.] // *Translational Neurodegeneration*. – 2020. – Vol. 9, No. 1. – Art. 7. – DOI 10.1186/s40035-020-0185-5.
102. Propagation of prions causing synucleinopathies in cultured cells / A. L. Woerman, J. Stöhr, A. Aoyagi [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2015. – Vol. 112, No. 35. – P. E4949–58. – DOI 10.1073/pnas.1513426112.
103. Parkinson's disease and multiple system atrophy have distinct α -synuclein seed characteristics / T. R. Yamasaki, B. B. Holmes, J. L. Furman [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2019. – Vol. 294, No. 3. – P. 1045–1058. – DOI 10.1074/jbc.ra118.004471.
104. Goedert, M. Alzheimer's and Parkinson's diseases: The prion concept in relation to assembled A β , tau, and α -synuclein / M. Goedert // *Science*. – 2015. – Vol. 349, No. 6248. – Art. 1255555. – DOI 10.1126/science.1255555.
105. Immunohistochemical Detection of Synuclein Pathology in Skin in Idiopathic Rapid Eye Movement Sleep Behavior Disorder and Parkinsonism / A. Al-Qassabi, T. S. Tsao, A. Racolta [et al.] // *Movement Disorders*. – 2021. – Vol. 36, No. 4. – P. 895–904. – DOI 10.1002/mds.28399.
106. Distinctive distribution of phospho-alpha-synuclein in dermal nerves in multiple system atrophy / K. Doppler, J. Weis, K. Karl [et al.] // *Movement Disorders*. – 2015. – Vol. 30, No. 12. – P. 1688–1692. – DOI 10.1002/mds.26293.
107. Multiple organ involvement by alpha-synuclein pathology in Lewy body disorders / E. Gelpi, J. Navarro-Otano, E. Tolosa [et al.] // *Movement Disorders*. – 2014. – Vol. 29, No. 8. – P. 1010–1018. – DOI 10.1002/mds.25776.
108. Michell, A. W. Skin and platelet α -synuclein as peripheral biomarkers of Parkinson's disease / A. W. Michell, L. M. Luheshi, R. A. Barker // *Neuroscience Letters*. – 2005. – Vol. 381, No. 3. – P. 294–298. – DOI 10.1016/j.neulet.2005.02.030.
109. Lewy pathology of the esophagus correlates with the progression of Lewy body disease: a Japanese cohort study of autopsy cases / Z. i. Tanei, Y. Saito, S. Ito [et al.] // *Acta Neuropathologica*. – 2021. – Vol. 141, No. 1. – P. 25–37. – DOI 10.1007/s00401-020-02233-8.
110. Spillantini, M. G. Neurodegeneration and the ordered assembly of α -synuclein / M. G. Spillantini, M. Goedert // *Cell and Tissue Research*. – 2018. – Vol. 373, No. 1. – P. 137–148. – DOI 10.1007/s00441-017-2706-9.
111. A Focus on the Beneficial Effects of Alpha Synuclein and a Re-Appraisal of Synucleinopathies / L. Ryskalin, C. L. Busceti, F. Limanaqi [et al.] // *Current Protein & Peptide Science*. – 2018. – Vol. 19, No. 6. – P. 598–611. – DOI 10.2174/1389203718666171117110028.
112. Increased Dynamics of α -Synuclein Fibrils by β -Synuclein Leads to Reduced Seeding and Cytotoxicity / X. Yang, J. K. Williams, R. Yan [et al.] // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9, No. 1. – Art. 17579. – DOI 10.1038/s41598-019-54063-8.
113. Enhanced Lysosomal Pathology Caused by β -Synuclein Mutants Linked to Dementia with Lewy Bodies / J. Wei, M. Fujita, M. Nakai [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2007. – Vol. 282, No. 39. – P. 28904–28914. – DOI 10.1074/jbc.m703711200.

114. Axon pathology in Parkinson's disease and Lewy body dementia hippocampus contains α -, β -, and γ -synuclein / J. E. Galvin, K. Uryu, V. M. Y. Lee, J. Q. Trojanowski // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1999. – Vol. 96, No. 23. – P. 13450–13455. – DOI 10.1073/pnas.96.23.13450.
115. Reciprocal accumulation of β -synuclein in α -synuclein lesions in multiple system atrophy / F. Mori, M. Nishie, M. Yoshimoto [et al.] // *NeuroReport*. – 2003. – Vol. 14, No. 14. – P. 1783–1786. – DOI 10.1097/00001756-200310060-00005.
116. Deletion of alpha-synuclein decreases impulsivity in mice / Y. Peña-Oliver, V. L. Buchman, J. W. Dalley [et al.] // *Genes, Brain and Behavior*. – 2012. – Vol. 11, No. 2. – P. 137–146. – DOI 10.1111/j.1601-183x.2011.00758.x.
117. Expression of α -, β -, and γ -synuclein in glial tumors and medulloblastomas / K. M. Fung, L. B. Rorke, B. Giasson [et al.] // *Acta Neuropathologica*. – 2003. – Vol. 106, No. 2. – P. 167–175. – DOI 10.1007/s00401-003-0718-x.
118. Hydrogen Sulfide and β -Synuclein Are Involved and Interlinked in the Aging Glaucomatous Retina / H. Liu, K. Mercieca, F. Anders, V. Prokosch // *Journal of Ophthalmology*. – 2020. – Vol. 2020. – P. 1–12. – DOI 10.1155/2020/8642135.
119. Selective pattern of motor system damage in gamma-synuclein transgenic mice mirrors the respective pathology in amyotrophic lateral sclerosis / O. M. Peters, S. Millership, T. A. Shelkovernikova [et al.] // *Neurobiology of Disease*. – 2012. – Vol. 48, No. 1. – P. 124–131. – DOI 10.1016/j.nbd.2012.06.016.
120. Al-Mazidi, S. Plasma Levels of Alpha and Gamma Synucleins in Autism Spectrum Disorder: An Indicator of Severity / S. Al-Mazidi, L. Y. Al-Ayadhi // *Medical Principles and Practice*. – 2021. – Vol. 30, No. 2. – P. 160–167. – DOI 10.1159/000513935.
121. Weinreb, R. N. The Pathophysiology and Treatment of Glaucoma / R. N. Weinreb, T. Aung, F. A. Medeiros // *JAMA*. – 2014. – Vol. 311, No. 18. – P. 1901. – DOI 10.1001/jama.2014.3192.
122. Glaucoma / J. B. Jonas, T. Aung, R. R. Bourne [et al.] // *The Lancet*. – 2017. – Vol. 390, No. 10108. – P. 2183–2193. – DOI 10.1016/s0140-6736(17)31469-1.
123. Primary Open-Angle Glaucoma Preferred Practice Pattern® / S. J. Gedde, E. C. Bowden, P. Challa [et al.] // *Ophthalmology*. – 2026. – Vol. 133, No. 4. – P. P1–P103. – DOI 10.1016/j.ophtha.2025.12.029.
124. Bou Ghanem, G. O. Addressing neurodegeneration in glaucoma: Mechanisms, challenges, and treatments / G. O. Bou Ghanem, L. K. Wareham, D. J. Calkins // *Progress in Retinal and Eye Research*. – 2024. – Vol. 100. – Art. 101261. – DOI 10.1016/j.preteyeres.2024.101261.
125. Retinal Ganglion Cell Degeneration in Glaucoma: Systematic Review / M. Firoz, N. Shome, N. Wong [et al.] // *Bioengineering*. – 2026. – Vol. 13, No. 5. – Art. 509. – DOI 10.3390/bioengineering13050509.
126. Tezel, G. A broad perspective on the molecular regulation of retinal ganglion cell degeneration in glaucoma / G. Tezel // *Glaucoma: A Neurodegenerative Disease of the Retina and Beyond - Part A*. – Elsevier. – 2020. – Vol. 256, No. 1. – P. 49–77. – DOI 10.1016/bs.pbr.2020.05.027.
127. Tezel, G. Multifactorial Pathogenic Processes of Retinal Ganglion Cell Degeneration in Glaucoma towards Multi-Target Strategies for Broader Treatment Effects / G. Tezel // *Cells*. – 2021. – Vol. 10, No. 6. – Art. 1372. – DOI 10.3390/cells10061372.

128. The Role of Retinal Ganglion Cell Structure and Function in Glaucoma / K. M. Feng, T. H. Tsung, Y. H. Chen, D. W. Lu // *Cells*. – 2023. – Vol. 12, No. 24. – Art. 2797. – DOI 10.3390/cells12242797.
129. Morgan, J. E. Retina ganglion cell degeneration in glaucoma: an opportunity missed? A review / J. E. Morgan // *Clinical & Experimental Ophthalmology*. – 2012. – Vol. 40, No. 4. – P. 364–368. – DOI 10.1111/j.1442-9071.2012.02789.x.
130. Inhibition of the classical pathway of the complement cascade prevents early dendritic and synaptic degeneration in glaucoma / P. A. Williams, J. R. Tribble, K. W. Pepper [et al.] // *Molecular Neurodegeneration*. – 2016. – Vol. 11, No. 1. – Art. 26. – DOI 10.1186/s13024-016-0091-6.
131. Transneuronal Degeneration in the Brain During Glaucoma / M. You, R. Rong, Z. Zeng [et al.] // *Frontiers in Aging Neuroscience*. – 2021. – Vol. 13. – Art. 643685. – DOI 10.3389/fnagi.2021.643685.
132. Chan, J. W. Glaucoma as Neurodegeneration in the Brain / J. W. Chan, N. C. Chan, A. A. Sadun // *Eye and Brain*. – 2021. – Vol. Volume 13. – P. 21–28. – DOI 10.2147/eb.s293765.
133. Atrophy of the lateral geniculate nucleus in human glaucoma detected by magnetic resonance imaging / N. Gupta, G. Greenberg, L. N. de Tilly [et al.] // *British Journal of Ophthalmology*. – 2009. – Vol. 93, No. 1. – P. 56–60. – DOI 10.1136/bjo.2008.138172.
134. Volume of Lateral Geniculate Nucleus in Patients with Glaucoma in 7Tesla MRI / E. Kosior-Jarecka, A. Pankowska, P. Polit [et al.] // *Journal of Clinical Medicine*. – 2020. – Vol. 9, No. 8. – Art. 2382. – DOI 10.3390/jcm9082382.
135. Yücel, Y. Effects of retinal ganglion cell loss on magno-, parvo-, koniocellular pathways in the lateral geniculate nucleus and visual cortex in glaucoma / Y. Yücel // *Progress in Retinal and Eye Research*. – 2003. – Vol. 22, No. 4. – P. 465–481. – DOI 10.1016/s1350-9462(03)00026-0.
136. The Role of Axonal Transport in Glaucoma / M. S. Dias, X. Luo, V. T. Ribas [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23, No. 7. – Art. 3935. – DOI 10.3390/ijms23073935.
137. Fahy, E. T. Impaired Axonal Transport and Glaucoma / E. T. Fahy, V. Chrysostomou, J. G. Crowston // *Current Eye Research*. – 2015. – P. 1–11. – DOI 10.3109/02713683.2015.1037924.
138. In vivo imaging of axonal transport of mitochondria in the diseased and aged mammalian CNS / Y. Takihara, M. Inatani, K. Eto [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2015. – Vol. 112, No. 33. – P. 10515–10520. – DOI 10.1073/pnas.1509879112.
139. Anterograde transport blockade precedes deficits in retrograde transport in the visual projection of the DBA/2J mouse model of glaucoma / C. M. Dengler-Criss, M. A. Smith, D. M. Inman [et al.] // *Frontiers in Neuroscience*. – 2014. – Vol. 8. – Art. 290. – DOI 10.3389/fnins.2014.00290.
140. Duarte, J. N. Neuroinflammatory Mechanisms of Mitochondrial Dysfunction and Neurodegeneration in Glaucoma / J. N. Duarte // *Journal of Ophthalmology*. – 2021. – Vol. 2021, No. 1. – Art. 4581909. – DOI 10.1155/2021/4581909.
141. The Role of Mitophagy in Glaucomatous Neurodegeneration / D. Stavropoulos, M. K. Grewal, B. Petriti [et al.] // *Cells*. – 2023. – Vol. 12, No. 15. – Art. 1969. – DOI 10.3390/cells12151969.

142. The Influence of Mitochondrial Dynamics and Function on Retinal Ganglion Cell Susceptibility in Optic Nerve Disease / N. A. Muench, S. Patel, M. E. Maes [et al.] // *Cells*. – 2021. – Vol. 10, No. 7. – Art. 1593. – DOI 10.3390/cells10071593.
143. Venkatesan, A. Protein misfolding and mitochondrial dysfunction in glaucoma / A. Venkatesan, A. M. Bernstein // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2025. – Vol. 13. – Art. 1595121. – DOI 10.3389/fcell.2025.1595121.
144. Glaucoma and microglia-induced neuroinflammation / M. Ishikawa, Y. Izumi, K. Sato [et al.] // *Frontiers in Ophthalmology*. – 2023. – Vol. 3. – Art. 1132011. – DOI 10.3389/fopht.2023.1132011.
145. Glaucoma: from pathogenic mechanisms to retinal glial cell response to damage / J. A. Fernández-Albarral, A. I. Ramírez, R. de Hoz [et al.] // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2024. – Vol. 18. – Art. 1354569. – DOI 10.3389/fncel.2024.1354569.
146. Glial Cell Activation and Immune Responses in Glaucoma: A Systematic Review of Human Postmortem Studies of the Retina and Optic Nerve / A. Salkar, R. V. Wall, D. Basavarajappa [et al.] // *Aging and disease*. – 2024. – Vol. 15, No. 5. – P. 2069. – DOI 10.14336/ad.2024.0103.
147. The Role of Microglia in Retinal Neurodegeneration: Alzheimer's Disease, Parkinson, and Glaucoma / A. I. Ramirez, R. de Hoz, E. Salobar-Garcia [et al.] // *Frontiers in Aging Neuroscience*. – 2017. – Vol. 9. – Art. 214. – DOI 10.3389/fnagi.2017.00214.
148. Complement Component 1Q (C1Q) Upregulation in Retina of Murine, Primate, and Human Glaucomatous Eyes / K. Stasi, D. Nagel, X. Yang [et al.] // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2006. – Vol. 47, No. 3. – P. 1024. – DOI 10.1167/iovs.05-0830.
149. Hoppe, C. The Role of Complement Dysregulation in Glaucoma / C. Hoppe, M. Gregory-Ksander // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2024. – Vol. 25, No. 4. – Art. 2307. – DOI 10.3390/ijms25042307.
150. Commensal microflora-induced T cell responses mediate progressive neurodegeneration in glaucoma / H. Chen, K. S. Cho, T. H. K. Vu [et al.] // *Nature Communications*. – 2018. – Vol. 9, No. 1. – Art. 3209. – DOI 10.1038/s41467-018-05681-9.
151. Gut-licensed $\beta 7 + CD4 + T$ cells contribute to progressive retinal ganglion cell damage in glaucoma / C. He, W. Xiu, Q. Chen [et al.] // *Science Translational Medicine*. – 2023. – Vol. 15, No. 707. – Art. eadg1656. – DOI 10.1126/scitranslmed.adg1656.
152. Enhanced Insight into the Autoimmune Component of Glaucoma: IgG Autoantibody Accumulation and Pro-Inflammatory Conditions in Human Glaucomatous Retina / O. W. Gramlich, S. Beck, N. von Thun und Hohenstein-Blaul [et al.] // *PLoS ONE*. – 2013. – Vol. 8, No. 2. – Art. e57557. – DOI 10.1371/journal.pone.0057557.
153. Wang, L. T Cell-Mediated Autoimmunity in Glaucoma Neurodegeneration / L. Wang, X. Wei // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12. – Art. 803485. – DOI 10.3389/fimmu.2021.803485.
154. Gamma-synuclein as a marker of retinal ganglion cells / I. Surgucheva, A. D. Weisman, J. L. Goldberg [et al.] // *Molecular vision*. – 2008. – Vol. 14. – P. 1540–1548. – PMID 18728752.
155. Surgucheva, I. Effect of γ -Synuclein Silencing on Apoptotic Pathways in Retinal Ganglion Cells / I. Surgucheva, V. I. Shestopalov, A. Surguchov // *Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – Vol. 283, No. 52. – P. 36377–36385. – DOI 10.1074/jbc.m806660200.

156. γ -Synuclein Antibodies Have Neuroprotective Potential on Neuroretinal Cells via Proteins of the Mitochondrial Apoptosis Pathway / C. Wilding, K. Bell, S. Beck [et al.] // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9, No. 3. – Art. e90737. – DOI 10.1371/journal.pone.0090737.
157. Retinal ganglion cell type-specific expression of synuclein family members revealed by scRNA-sequencing / Q. Yang, L. Liu, F. He [et al.] // International Journal of Medical Sciences. – 2024. – Vol. 21, No. 8. – P. 1472–1490. – DOI 10.7150/ijms.95598.
158. Identification and Localization of Alpha-Synuclein in Human Cornea / S. Hong, H. K. Lee, C. Y. Kim, G. J. Seong // Korean Journal of Ophthalmology. – 2008. – Vol. 22, No. 2. – P. 145. – DOI 10.3341/kjo.2008.22.2.145.
159. Decelerated neurodegeneration after intravitreal injection of α -synuclein antibodies in a glaucoma animal model / J. Teister, F. Anders, S. Beck [et al.] // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7, No. 1. – Art. 6260. – DOI 10.1038/s41598-017-06702-1.
160. Age-Related Changes of the Synucleins Profile in the Mouse Retina / S. B. Dias, L. de Lemos, L. Sousa [et al.] // Biomolecules. – 2023. – Vol. 13, No. 1. – Art. 180. – DOI 10.3390/biom13010180.
161. Proteomic Profiling of Inflammatory Signaling Molecules in the Tears of Patients on Chronic Glaucoma Medication / T. T. Wong, L. Zhou, J. Li [et al.] // Investigative Ophthalmology & Visual Science. – 2011. – Vol. 52, No. 10. – P. 7385. – DOI 10.1167/iovs.10-6532.
162. Mass spectrometry analysis of human tear fluid biomarkers specific for ocular and systemic diseases in the context of 3P medicine / X. Zhan, J. Li, Y. Guo, O. Golubnitschaja // EPMA Journal. – 2021. – Vol. 12, No. 4. – P. 449–475. – DOI 10.1007/s13167-021-00265-y.
163. Patient stratification in clinical glaucoma trials using the individual tear proteome / J. Nättinen, A. Jylhä, U. Aapola [et al.] // Scientific Reports. – 2018. – Vol. 8, No. 1. – Art. 12038. – DOI 10.1038/s41598-018-30369-x.
164. Candidate Glaucoma Biomarkers: From Proteins to Metabolites, and the Pitfalls to Clinical Applications / A. Fernández-Vega Cueto, L. Álvarez, M. García [et al.] // Biology. – 2021. – Vol. 10, No. 8. – Art. 763. – DOI 10.3390/biology10080763.
165. Alpha-synuclein in peripheral tissues and body fluids as a biomarker for Parkinson's disease - a systematic review / N. Malek, D. Swallow, K. A. Grosset [et al.] // Acta Neurologica Scandinavica. – 2014. – Vol. 130, No. 2. – P. 59–72. – DOI 10.1111/ane.12247.
166. Alpha-Synuclein in Peripheral Tissues as a Possible Marker for Neurological Diseases and Other Medical Conditions / F. J. Jiménez-Jiménez, H. Alonso-Navarro, E. García-Martín [et al.] // Biomolecules. – 2023. – Vol. 13, No. 8. – Art. 1263. – DOI 10.3390/biom13081263.
167. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease / H. Braak, K. D. Tredici, U. Rüb [et al.] // Neurobiology of Aging. – 2003. – Vol. 24, No. 2. – P. 197–211. – DOI 10.1016/s0197-4580(02)00065-9.
168. Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen / H. Braak, U. Rüb, W. P. Gai, K. Del Tredici // Journal of Neural Transmission. – 2003. – Vol. 110, No. 5. – P. 517–536. – DOI 10.1007/s00702-002-0808-2.
169. Exploring Braak's Hypothesis of Parkinson's Disease / C. D. Rietdijk, P. Perez-Pardo, J. Garssen [et al.] // Frontiers in Neurology. – 2017. – Vol. 8. – DOI 10.3389/fneur.2017.00037.

170. Alpha-Synuclein in Peripheral Tissues in Parkinson's Disease / L. Y. Ma, G. L. Liu, D. X. Wang [et al.] // *ACS Chemical Neuroscience*. – 2019. – Vol. 10, No. 2. – P. 812–823. – DOI 10.1021/acscchemneuro.8b00383.
171. Multi-organ distribution of phosphorylated α -synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders / Arizona Parkinson's Disease Consortium, T. G. Beach, C. H. Adler [et al.] // *Acta Neuropathologica*. – 2010. – Vol. 119, No. 6. – P. 689–702. – DOI 10.1007/s00401-010-0664-3.
172. Cersosimo, M. G. Gastrointestinal Biopsies for the Diagnosis of Alpha-Synuclein Pathology in Parkinson's Disease / M. G. Cersosimo // *Gastroenterology Research and Practice*. – 2015. – Vol. 2015. – P. 1–6. – DOI 10.1155/2015/476041.
173. Colonic Biopsies to Assess the Neuropathology of Parkinson's Disease and Its Relationship with Symptoms / T. Lebouvier, M. Neunlist, S. Bruley des Varannes [et al.] // *PLoS ONE*. – 2010. – Vol. 5, No. 9. – Art. e12728. – DOI 10.1371/journal.pone.0012728.
174. Is alpha-synuclein in the colon a biomarker for premotor Parkinson's Disease? Evidence from 3 cases / K. M. Shannon, A. Keshavarzian, H. B. Dodiya [et al.] // *Movement Disorders*. – 2012. – Vol. 27, No. 6. – P. 716–719. – DOI 10.1002/mds.25020.
175. Ruffmann, C. Gut Feelings About α -Synuclein in Gastrointestinal Biopsies: Biomarker in the Making? / C. Ruffmann, L. Parkkinen // *Movement Disorders*. – 2016. – Vol. 31, No. 2. – P. 193–202. – DOI 10.1002/mds.26480.
176. Peripheral Synucleinopathy in Early Parkinson's Disease: Submandibular Gland Needle Biopsy Findings / C. H. Adler, B. N. Dugger, J. G. Hentz [et al.] // *Movement Disorders*. – 2016. – Vol. 31, No. 2. – P. 250–256. – DOI 10.1002/mds.26476.
177. Alpha-synuclein in salivary gland as biomarker for Parkinson's disease / F. Campo, R. Carletti, M. Fusconi [et al.] // *Reviews in the Neurosciences*. – 2019. – Vol. 30, No. 5. – P. 455–462. – DOI 10.1515/revneuro-2018-0064.
178. Skin Biopsy as a Diagnostic Tool for Synucleinopathies / S. Waqar, H. Khan, S. K. Zulfiqar, A. Ahmad // *Cureus*. – 2023. – Vol. 15, No. 10. – Art. e47179. – DOI 10.7759/cureus.47179.
179. Skin Biopsy Detection of Phosphorylated α -Synuclein in Patients With Synucleinopathies / C. H. Gibbons, T. Levine, C. Adler [et al.] // *JAMA*. – 2024. – Vol. 331, No. 15. – P. 1298. – DOI 10.1001/jama.2024.0792.
180. In vivo distribution of α -synuclein in multiple tissues and biofluids in Parkinson disease / L. M. Chahine, T. G. Beach, M. C. Brumm [et al.] // *Neurology*. – 2020. – Vol. 95, No. 9. – Art. e1267–e1284. – DOI 10.1212/wnl.00000000000010404.
181. α -Synuclein Real-Time Quaking-Induced Conversion in the Submandibular Glands of Parkinson's Disease Patients / S. Manne, N. Kondru, H. Jin [et al.] // *Movement Disorders*. – 2020. – Vol. 35, No. 2. – P. 268–278. – DOI 10.1002/mds.27907.
182. Rissardo, J. P. Alpha-Synuclein Seed Amplification Assays in Parkinson's Disease: A Systematic Review and Network Meta-Analysis / J. P. Rissardo, A. L. Fornari Caprara // *Clinics and Practice*. – 2025. – Vol. 15, No. 6. – Art. 107. – DOI 10.3390/clinpract15060107.
183. Global, regional, and national burden of disorders affecting the nervous system, 1990–2021: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021 / J. D. Steinmetz, K. M. Seeher, N. Schiess [et al.] // *The Lancet Neurology*. – 2024. – Vol. 23, No. 4. – P. 344–381. – DOI 10.1016/s1474-4422(24)00038-3.

184. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease / R. A. Sperling, P. S. Aisen, L. A. Beckett [et al.] // *Alzheimer's & Dementia*. – 2011. – Vol. 7, No. 3. – P. 280–292. – DOI 10.1016/j.jalz.2011.03.003.
185. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease / C. R. Jack, D. A. Bennett, K. Blennow [et al.] // *Alzheimer's & Dementia*. – 2018. – Vol. 14, No. 4. – P. 535–562. – DOI 10.1016/j.jalz.2018.02.018.
186. Rafii, M. S. Detection and treatment of Alzheimer's disease in its preclinical stage / M. S. Rafii, P. S. Aisen // *Nature Aging*. – 2023. – Vol. 3, No. 5. – P. 520–531. – DOI 10.1038/s43587-023-00410-4.
187. Postuma, R. B. Prodromal Parkinson's Disease: The Decade Past, the Decade to Come / R. B. Postuma, D. Berg // *Movement Disorders*. – 2019. – Vol. 34, No. 5. – P. 665–675. – DOI 10.1002/mds.27670.
188. A biological definition of neuronal α -synuclein disease: towards an integrated staging system for research / T. Simuni, L. M. Chahine, K. Poston [et al.] // *The Lancet Neurology*. – 2024. – Vol. 23, No. 2. – P. 178–190. – DOI 10.1016/s1474-4422(23)00405-2.
189. Lecanemab in Early Alzheimer's Disease / C. H. van Dyck, C. J. Swanson, P. Aisen [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2023. – Vol. 388, No. 1. – P. 9–21. – DOI 10.1056/nejmoa2212948.
190. Donanemab in Early Symptomatic Alzheimer Disease / J. R. Sims, J. A. Zimmer, C. D. Evans [et al.] // *JAMA*. – 2023. – Vol. 330, No. 6. – P. 512. – DOI 10.1001/jama.2023.13239.
191. Califf, R. M. Biomarker definitions and their applications / R. M. Califf // *Experimental Biology and Medicine*. – 2018. – Vol. 243, No. 3. – P. 213–221. – DOI 10.1177/1535370217750088.
192. Biomarkers of Neurodegenerative Diseases: Biology, Taxonomy, Clinical Relevance, and Current Research Status / D. Koníčková, K. Menšíková, L. Tučková [et al.] // *Biomedicines*. – 2022. – Vol. 10, No. 7. – Art. 1760. – DOI 10.3390/biomedicines10071760.
193. Neuroimaging and fluid biomarkers in Parkinson's disease in an era of targeted interventions / A. Zarkali, G. E. C. Thomas, H. Zetterberg, R. S. Weil // *Nature Communications*. – 2024. – Vol. 15, No. 1. – Art. 5661. – DOI 10.1038/s41467-024-49949-9.
194. Fluid biomarkers for neurodegenerative diseases: a comprehensive update / M. Valletta, N. Briel, I. Yuksekul [et al.] // *Alzheimer's Research & Therapy*. – 2025. – Vol. 18, No. 1. – Art. 12. – DOI 10.1186/s13195-025-01919-z.
195. Role of neuroinflammation in neurodegeneration development / W. Zhang, D. Xiao, Q. Mao, H. Xia // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2023. – Vol. 8, No. 1. – Art. 267. – DOI 10.1038/s41392-023-01486-5.
196. A systematic review and meta-analysis of inflammatory biomarkers in Parkinson's disease / Y. Qu, J. Li, Q. Qin [et al.] // *npj Parkinson's Disease*. – 2023. – Vol. 9, No. 1. – Art. 18. – DOI 10.1038/s41531-023-00449-5.
197. Blood-Based Biomarkers of Neuroinflammation in Alzheimer's Disease: A Central Role for Periphery? / F. Angiulli, E. Conti, C. P. Zoia [et al.] // *Diagnostics*. – 2021. – Vol. 11, No. 9. – Art. 1525. – DOI 10.3390/diagnostics11091525.

198. Increasing the reproducibility of fluid biomarker studies in neurodegenerative studies / N. Mattsson-Carlsson, S. Palmqvist, K. Blennow, O. Hansson // *Nature Communications*. – 2020. – Vol. 11, No. 1. – Art. 6252. – DOI 10.1038/s41467-020-19957-6.
199. Tear Biomarkers in Alzheimer's and Parkinson's Diseases, and Multiple Sclerosis: Implications for Diagnosis (Systematic Review) / A. Król-Grzymała, E. Sienkiewicz-Szłapka, E. Fiedorowicz [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23, No. 17. – Art. 10123. – DOI 10.3390/ijms231710123.
200. Diagnostic biomarkers in tear fluid: from sampling to preanalytical processing / F. Bachhuber, A. Huss, M. Senel, H. Tumani // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11, No. 1. – Art. 10064. – DOI 10.1038/s41598-021-89514-8.
201. Neurodegenerative Disorders of the Eye and of the Brain: A Perspective on Their Fluid-Dynamical Connections and the Potential of Mechanism-Driven Modeling / G. Guidoboni, R. Sacco, M. Szopos [et al.] // *Frontiers in Neuroscience*. – 2020. – Vol. 14. – Art. 566428. – DOI 10.3389/fnins.2020.566428.
202. Heart Rate Variability Analyses in Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis / K. G. Heimrich, T. Lehmann, P. Schlattmann, T. Prell // *Brain Sciences*. – 2021. – Vol. 11, No. 8. – Art. 959. – DOI 10.3390/brainsci11080959.
203. Heart rate variability in relation to cognition and behavior in neurodegenerative diseases: A systematic review and meta-analysis / K. Y. Liu, T. Elliott, M. Knowles, R. Howard // *Ageing Research Reviews*. – 2022. – Vol. 73. – Art. 101539. – DOI 10.1016/j.arr.2021.101539.
204. Kistner, A. Mechanisms of Body Weight Fluctuations in Parkinson's Disease / A. Kistner, E. Lhommée, P. Krack // *Frontiers in Neurology*. – 2014. – Vol. 5. – Art. 84. – DOI 10.3389/fneur.2014.00084.
205. Ophthalmic Biomarkers for Alzheimer's Disease: A Review / A. Majeed, B. Marwick, H. Yu [et al.] // *Frontiers in Aging Neuroscience*. – 2021. – Vol. 13. – Art. 720167. – DOI 10.3389/fnagi.2021.720167.
206. Li, S. W. R. The Retina as a Biomarker for Parkinson's Disease: A Systematic Review / S. W. R. Li, A. Gardner, M. Votruba // *Neuro-Ophthalmology*. – 2026. – Vol. 50, No. 1. – P. 1–12. – DOI 10.1080/01658107.2025.2547216.
207. Prevalence and characteristics of dry eye disease in Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis / K. Nagino, J. Sung, G. Oyama [et al.] // *Scientific Reports*. – 2022. – Vol. 12, No. 1. – Art. 18348. – DOI 10.1038/s41598-022-22037-y.
208. Dry eye in Parkinson's disease: a narrative review / L. Ungureanu, K. R. Chaudhuri, S. Diaconu, C. Falup-Pecurariu // *Frontiers in Neurology*. – 2023. – Vol. 14. – Art. 1236366. – DOI 10.3389/fneur.2023.1236366.
209. Comparison of Capillary and Schirmer Strip Tear Fluid Sampling Methods Using SWATH-MS Proteomics Approach / J. Nättinen, U. Aapola, A. Jylhä [et al.] // *Translational Vision Science & Technology*. – 2020. – Vol. 9, No. 3. – P. 16. – DOI 10.1167/tvst.9.3.16.
210. Pre-analytical sample handling effects on tear fluid protein levels / M. Gijs, S. Arumugam, N. van de Sande [et al.] // *Scientific Reports*. – 2023. – Vol. 13, No. 1. – Art. 1317. – DOI 10.1038/s41598-023-28363-z.
211. Precision in Tear Fluid Biomarker Discovery: Quantitative Proteomic Profiling of Small-Volume, Individual Samples Using Capillary Tube Collection / K. Frenia, Y. Fu, M. A. Beatty [et al.] // *Biomedicines*. – 2025. – Vol. 13, No. 2. – Art. 386. – DOI 10.3390/biomedicines13020386.

212. Increased alpha-synuclein tear fluid levels in patients with Parkinson's disease / F. Maass, S. Rikker, V. Dambeck [et al.] // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10, No. 1. – Art. 8507. – DOI 10.1038/s41598-020-65503-1.
213. Detection of alpha-synuclein seeding activity in tear fluid in patients with Parkinson's disease / S. Canaslan, M. Schmitz, F. Maass [et al.] // *npj Parkinson's Disease*. – 2026. – Vol. 12, No. 1. – Art. 66. – DOI 10.1038/s41531-026-01282-2.
214. A Pilot Study of Changes in the Level of Catecholamines and the Activity of α -2-Macroglobulin in the Tear Fluid of Patients with Parkinson's Disease and Parkinsonian Mice / V. Bogdanov, A. Kim, M. Nodel [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22, No. 9. – Art. 4736. – DOI 10.3390/ijms22094736.
215. Tear levels of tumor necrosis factor-alpha in patients with Parkinson's disease / S. S. Çomoğlu, H. Güven, M. Acar [et al.] // *Neuroscience Letters*. – 2013. – Vol. 553. – P. 63–67. – DOI 10.1016/j.neulet.2013.08.019.
216. Alpha-2 macroglobulin in Alzheimer's disease: a marker of neuronal injury through the RCAN1 pathway / V. R. Varma, S. Varma, Y. An [et al.] // *Molecular Psychiatry*. – 2017. – Vol. 22, No. 1. – P. 13–23. – DOI 10.1038/mp.2016.206.
217. Microglia in neurodegenerative diseases: mechanism and potential therapeutic targets / C. Gao, J. Jiang, Y. Tan, S. Chen // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2023. – Vol. 8, No. 1. – Art. 359. – DOI 10.1038/s41392-023-01588-0.
218. Alzheimer blood biomarkers: practical guidelines for study design, sample collection, processing, biobanking, measurement and result reporting / X. Zeng, Y. Chen, A. Sehrawat [et al.] // *Molecular Neurodegeneration*. – 2024. – Vol. 19, No. 1. – Art. 40. – DOI 10.1186/s13024-024-00711-1.
219. Double-knockout mice for α - and β -synucleins: Effect on synaptic functions / S. Chandra, F. Fornai, H. B. Kwon [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2004. – Vol. 101, No. 41. – P. 14966–14971. – DOI 10.1073/pnas.0406283101.
220. Absence of α -synuclein affects dopamine metabolism and synaptic markers in the striatum of aging mice / A. Al-Wandi, N. Ninkina, S. Millership [et al.] // *Neurobiology of Aging*. – 2010. – Vol. 31, No. 5. – P. 796–804. – DOI 10.1016/j.neurobiolaging.2008.11.001.
221. Functional Alterations to the Nigrostriatal System in Mice Lacking All Three Members of the Synuclein Family / S. Anwar, O. Peters, S. Millership [et al.] // *The Journal of Neuroscience*. – 2011. – Vol. 31, No. 20. – P. 7264–7274. – DOI 10.1523/jneurosci.6194-10.2011.
222. Differential involvement of the gamma-synuclein in cognitive abilities on the model of knockout mice / V. S. Kokhan, G. I. Van'kin, S. O. Bachurin, I. Y. Shamakina // *BMC Neuroscience*. – 2013. – Vol. 14, No. 1. – Art. 53. – DOI 10.1186/1471-2202-14-53.
223. Peña-Oliver, Y. Lack of involvement of alpha-synuclein in unconditioned anxiety in mice / Y. Peña-Oliver, V. L. Buchman, D. N. Stephens // *Behavioural Brain Research*. – 2010. – Vol. 209, No. 2. – P. 234–240. – DOI 10.1016/j.bbr.2010.01.049.
224. Loss of the Synuclein Family Members Differentially Affects Baseline- and Apomorphine-Associated EEG Determinants in Single-, Double- and Triple-Knockout Mice / V. Vorobyov, A. Deev, I. Sukhanova [et al.] // *Biomedicines*. – 2022. – Vol. 10, No. 12. – Art. 3128. – DOI 10.3390/biomedicines10123128.
225. Gruschus, J. M. The Knockout – The history of the knockout mouse and the surprising results for the synuclein proteins / J. M. Gruschus // *Synuclein and the Coelacanth*. – Elsevier. – 2021. – P. 49–68. – DOI 10.1016/b978-0-323-85707-9.00010-1.

226. A novel resource for studying function and dysfunction of α -synuclein: mouse lines for modulation of endogenous Snca gene expression / N. Ninkina, N. Connor-Robson, A. A. Ustyugov [et al.] // *Scientific Reports*. – 2015. – Vol. 5, No. 1. – Art. 16615. – DOI 10.1038/srep16615.
227. Neurons Expressing the Highest Levels of γ -Synuclein Are Unaffected by Targeted Inactivation of the Gene / N. Ninkina, K. Papachroni, D. C. Robertson [et al.] // *Molecular and Cellular Biology*. – 2003. – Vol. 23, No. 22. – P. 8233–8245. – DOI 10.1128/mcb.23.22.8233-8245.2003.
228. Forelimb Grip Strength testing v1 / J. Arudkumar, Y. Chinn Joshua Chey, S. Piltz [et al.] // *protocols.io*. – 2024. – DOI 10.17504/protocols.io.eq2lyjrjqlx9/v1.
229. Comparative Analysis of MPTP Neurotoxicity in Mice with a Constitutive Knockout of the α -Synuclein Gene / K. D. Chaprov, E. V. Teterina, A. Y. Roman [et al.] // *Molecular Biology*. – 2021. – Vol. 55, No. 1. – P. 133–142. – DOI 10.1134/s0026893321010039.
230. Quantification of early learning and movement sub-structure predictive of motor performance / V. Jakkamsetti, W. Scudder, G. Kathote [et al.] // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11, No. 1. – Art. 14405. – DOI 10.1038/s41598-021-93944-9.
231. Gellért, L. Locomotion Activity Measurement in an Open Field for Mice / L. Gellért, D. Varga // *BIO-PROTOCOL*. – 2016. – Vol. 6, No. 13. – Art. e1857. – DOI 10.21769/bioprotoc.1857.
232. Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide / N. Sestakova, A. Puzserova, M. Kluknavsky, I. Bernatova // *Interdisciplinary Toxicology*. – 2013. – Vol. 6, No. 3. – P. 126–135. – DOI 10.2478/intox-2013-0020.
233. Behavioral and Locomotor Measurements Using an Open Field Activity Monitoring System for Skeletal Muscle Diseases / K. S. Tatem, J. L. Quinn, A. Phadke [et al.] // *Journal of Visualized Experiments*. – 2014, No. 91. – Art. 51785. – DOI 10.3791/51785.
234. Basal anxiety during an open field test is correlated with individual differences in contextually conditioned fear in mice / S. H. Ahn, E. H. Jang, J. H. Choi [et al.] // *Animal Cells and Systems*. – 2013. – Vol. 17, No. 3. – P. 154–159. – DOI 10.1080/19768354.2013.790840.
235. Genetic Differences in Response to Novelty and Spatial Memory Using a Two-Trial Recognition Task in Mice / F. Dellu, A. Contarino, H. Simon [et al.] // *Neurobiology of Learning and Memory*. – 2000. – Vol. 73, No. 1. – P. 31–48. – DOI 10.1006/nlme.1999.3919.
236. Walf, A. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents / A. A. Walf, C. A. Frye // *Nature Protocols*. – 2007. – Vol. 2, No. 2. – P. 322–328. – DOI 10.1038/nprot.2007.44.
237. Komada, M. Elevated Plus Maze for Mice / M. Komada, K. Takao, T. Miyakawa // *Journal of Visualized Experiments*. – 2008, No. 22. – Art. e1088. – DOI 10.3791/1088-v.
238. Kapadia, M. The water maze paradigm in experimental studies of chronic cognitive disorders: Theory, protocols, analysis, and inference / M. Kapadia, J. Xu, B. Sakic // *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. – 2016. – Vol. 68. – P. 195–217. – DOI 10.1016/j.neubiorev.2016.05.016.
239. 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 / D. C. Robertson, O. Schmidt, N. Ninkina [et al.] // *Journal of Neurochemistry*. – 2004. – Vol. 89, No. 5. – P. 1126–1136. – DOI 10.1111/j.1471-4159.2004.02378.x.

240. Digital Atlasing and Standardization in the Mouse Brain / M. Hawrylycz, R. A. Baldock, A. Burger [et al.] // PLoS Computational Biology. – 2011. – Vol. 7, No. 2. – Art. e1001065. – DOI 10.1371/journal.pcbi.1001065.
241. Abercrombie, M. Estimation of nuclear population from microtome sections / M. Abercrombie // The Anatomical Record. – 1946. – Vol. 94, No. 2. – P. 239–247. – DOI 10.1002/ar.1090940210.
242. Abercrombie, M. Quantitative histology of Wallerian degeneration; nuclear population in rabbit sciatic nerve / M. Abercrombie, M. L. Johnson // Journal of anatomy. – 1946. – Vol. 80. – P. 37–50. – PMID 20996672.
243. Abercrombie, M. The effect of reinnervation on collagen formation in degenerating sciatic nerves of rabbits / M. Abercrombie, M. L. Johnson // Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry. – 1947. – Vol. 10, No. 2. – P. 89–92. – DOI 10.1136/jnnp.10.2.89.
244. Protein measurement with the folin phenol reagent / O. Lowry, N. Rosebrough, A. L. Farr, R. Randall // Journal of Biological Chemistry. – 1951. – Vol. 193, No. 1. – P. 265–275. – DOI 10.1016/s0021-9258(19)52451-6.
245. Detection of autoantibodies to potentially amyloidogenic protein, gamma-synuclein, in the serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis and cerebral circulatory disorders / A. Y. Roman, E. A. Kovrazhkina, O. D. Razinskaya [et al.] // Doklady Biochemistry and Biophysics. – 2017. – Vol. 472, No. 1. – P. 64–67. – DOI 10.1134/s1607672917010197.
246. Комплексная оценка влияния белков-синуклеинов на ухудшение моторной функции при возрастных изменениях / О. А. Морозова, А. М. Краюшкина, Ю. С. Суханова [и др.] // Патогенез. – 2024. – Т. 22, № 2. – С. 67–71. – DOI 10.25557/2310-0435.2024.02.67-71.
247. A 3D transcriptomics atlas of the mouse nose sheds light on the anatomical logic of smell / M. L. Ruiz Tejada Segura, E. Abou Moussa, E. Garaballo [et al.] // Cell Reports. – 2022. – Vol. 38, No. 12. – Art. 110547. – DOI 10.1016/j.celrep.2022.110547.
248. Gitler, D. Synapsins and Regulation of the Reserve Pool / D. Gitler, G. J. Augustine // Encyclopedia of Neuroscience. – Elsevier. – 2009. – P. 709–717. – DOI 10.1016/b978-008045046-9.01776-9.
249. Synapsin E-domain is essential for α -synuclein function / A. Stavsky, L. A. Parra-Rivas, S. Tal [et al.] // eLife. – 2024. – Vol. 12. – Art. RP89687. – DOI 10.7554/elife.89687.3.
250. Distinct Roles of Synapsin I and Synapsin II during Neuronal Development / A. Ferreira, L. S. Chin, L. Li [et al.] // Molecular Medicine. – 1998. – Vol. 4, No. 1. – P. 22–28. – DOI 10.1007/bf03401726.
251. Bauerfeind, R. Amphiphysin I Is Associated with Coated Endocytic Intermediates and Undergoes Stimulation-dependent Dephosphorylation in Nerve Terminals / R. Bauerfeind, K. Takei, P. De Camilli // Journal of Biological Chemistry. – 1997. – Vol. 272, No. 49. – P. 30984–30992. – DOI 10.1074/jbc.272.49.30984.
252. A role of amphiphysin in synaptic vesicle endocytosis suggested by its binding to dynamin in nerve terminals / C. David, P. S. McPherson, O. Mundigl, P. de Camilli // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1996. – Vol. 93, No. 1. – P. 331–335. – DOI 10.1073/pnas.93.1.331.
253. Kontaxi, C. The phospho-regulated amphiphysin/endophilin interaction is required for synaptic vesicle endocytosis / C. Kontaxi, N. Kim, M. A. Cousin // Journal of Neurochemistry. – 2023. – Vol. 166, No. 2. – P. 248–264. – DOI 10.1111/jnc.15848.

254. Under Pressure: Cellular and Molecular Responses During Glaucoma, a Common Neurodegeneration with Axonopathy / R. W. Nickells, G. R. Howell, I. Soto, S. W. M. John // *Annual Review of Neuroscience*. – 2012. – Vol. 35, No. 1. – P. 153–179. – DOI 10.1146/annurev.neuro.051508.135728.
255. Activation of retinal glial cells contributes to the degeneration of ganglion cells in experimental glaucoma / Y. Miao, G. L. Zhao, S. Cheng [et al.] // *Progress in Retinal and Eye Research*. – 2023. – Vol. 93. – Art. 101169. – DOI 10.1016/j.preteyeres.2023.101169.
256. Lapalus, P. Neurotransmitters and intraocular pressure / P. Lapalus, P. P. Elena // *Fundamental & Clinical Pharmacology*. – 1988. – Vol. 2, No. 4. – P. 305–325. – DOI 10.1111/j.1472-8206.1988.tb00643.x.
257. Role of Dopaminergic Receptors in Glaucomatous Disease Modulation / N. Pescosolido, F. Parisi, P. Russo [et al.] // *BioMed Research International*. – 2013. – Vol. 2013. – P. 1–5. – DOI 10.1155/2013/193048.
258. Gamma-Synuclein Dysfunction Causes Autoantibody Formation in Glaucoma Patients and Dysregulation of Intraocular Pressure in Mice / T. A. Pavlenko, A. Y. Roman, O. A. Lytkina [et al.] // *Biomedicines*. – 2023. – Vol. 11, No. 1. – Art. 60. – DOI 10.3390/biomedicines11010060.
259. A comprehensive scoping review of methodological approaches and clinical applications of tear fluid biomarkers / M. Gijs, N. van de Sande, C. Bonnet [et al.] // *Progress in Retinal and Eye Research*. – 2025. – Vol. 106. – Art. 101338. – DOI 10.1016/j.preteyeres.2025.101338.
260. Vandooren, J. Alpha-2-Macroglobulin in Inflammation, Immunity and Infections / J. Vandooren, Y. Itoh // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12. – Art. 803244. – DOI 10.3389/fimmu.2021.803244.
261. Cater, J. H. Alpha-2-Macroglobulin, a Hypochlorite-Regulated Chaperone and Immune System Modulator / J. H. Cater, M. R. Wilson, A. R. Wyatt // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2019. – Vol. 2019. – P. 1–9. – DOI 10.1155/2019/5410657.
262. The emerging roles of protein homeostasis-governing pathways in Alzheimer's disease / J. Cheng, B. J. North, T. Zhang [et al.] // *Aging Cell*. – 2018. – Vol. 17, No. 5. – Art. e12801. – DOI 10.1111/ace1.12801.
263. Tear Biomarkers and Alzheimer's Disease / S. Kaštelan, M. Braš, N. Pjevač [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24, No. 17. – Art. 13429. – DOI 10.3390/ijms241713429.
264. Wood, H. Could tear proteins be biomarkers for Alzheimer disease? / H. Wood // *Nature Reviews Neurology*. – 2016. – Vol. 12, No. 8. – P. 432–432. – DOI 10.1038/nrneurol.2016.104.
265. Kovacs, D. α 2-Macroglobulin in late-onset Alzheimer's disease / D. Kovacs // *Experimental Gerontology*. – 2000. – Vol. 35, No. 4. – P. 473–479. – DOI 10.1016/s0531-5565(00)00113-3.
266. Functional analysis of plasma α 2-macroglobulin from Alzheimer's disease patients with the A2M intronic deletion / C. Hope, J. Mettenburg, S. L. Gonias [et al.] // *Neurobiology of Disease*. – 2003. – Vol. 14, No. 3. – P. 504–512. – DOI 10.1016/j.nbd.2003.08.005.
267. Plasma biomarkers for mild cognitive impairment and Alzheimer's disease / F. Song, A. Poljak, G. A. Smythe, P. Sachdev // *Brain Research Reviews*. – 2009. – Vol. 61, No. 2. – P. 69–80. – DOI 10.1016/j.brainresrev.2009.05.003.

268. Functional and Pathological Effects of α -Synuclein on Synaptic SNARE Complexes / V. Gao, J. A. Briano, L. E. Komer, J. Burré // *Journal of Molecular Biology*. – 2023. – Vol. 435, No. 1. – Art. 167714. – DOI 10.1016/j.jmb.2022.167714.
269. A dual role for α -synuclein in facilitation and depression of dopamine release from substantia nigra neurons in vivo / M. Somayaji, S. Cataldi, S. J. Choi [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2020. – Vol. 117, No. 51. – P. 32701–32710. – DOI 10.1073/pnas.2013652117.
270. Chronic stress induces depression-like behaviors and Parkinsonism via upregulating α -synuclein / D. Xia, M. Xiong, Y. Yang [et al.] // *npj Parkinson's Disease*. – 2025. – Vol. 11, No. 1. – Art. 139. – DOI 10.1038/s41531-025-00998-x.
271. Targeted Inactivation of the Gene Encoding Gamma-Synuclein Affects Anxiety Levels and Investigative Activity in Mice / V. S. Kokhan, A. V. Bolkunov, A. A. Ustiugov [et al.] // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. – 2012. – Vol. 42, No. 6. – P. 575–581. – DOI 10.1007/s11055-012-9603-1.
272. Upregulation of γ -synuclein in the prefrontal cortex and hippocampus following dopamine depletion: A study using the striatal 6-hydroxydopamine hemiparkinsonian rat model / B. Kim, M. Yang, J. Lee [et al.] // *Neuroscience Letters*. – 2024. – Vol. 839. – Art. 137936. – DOI 10.1016/j.neulet.2024.137936.
273. Boyer, F. The role of gamma-synuclein in cocaine-induced behaviour in rats / F. Boyer, J. L. Dreyer // *European Journal of Neuroscience*. – 2008. – Vol. 27, No. 11. – P. 2938–2951. – DOI 10.1111/j.1460-9568.2008.06198.x.
274. Distinct Role of γ -Synuclein in the Regulation of Motor Performance and Behavioral Responses in Mice / I. S. Sukhanova, K. D. Chaprov, O. A. Morozova [et al.] // *Biomedicines*. – 2026. – Vol. 14, No. 1. – Art. 92. – DOI 10.3390/biomedicines14010092.
275. Retinal involvement in dementia with Lewy bodies: A clue to hallucinations? / C. A. Maurage, M. M. Ruchoux, R. De Vos [et al.] // *Annals of Neurology*. – 2003. – Vol. 54, No. 4. – P. 542–547. – DOI 10.1002/ana.10730.
276. Surguchev, A. Conformational diseases: Looking into the eyes / A. Surguchev, A. Surguchov // *Brain Research Bulletin*. – 2010. – Vol. 81, No. 1. – P. 12–24. – DOI 10.1016/j.brainresbull.2009.09.015.
277. Inflammation, neurodegeneration and protein aggregation in the retina as ocular biomarkers for Alzheimer's disease in the 3xTg-AD mouse model / A. Grimaldi, C. Brighi, G. Peruzzi [et al.] // *Cell Death & Disease*. – 2018. – Vol. 9, No. 6. – Art. 685. – DOI 10.1038/s41419-018-0740-5.
278. Protein Aggregation in the Aging Retina / F. Leger, P. O. Fernagut, M. H. Canron [et al.] // *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. – 2011. – Vol. 70, No. 1. – P. 63–68. – DOI 10.1097/nen.0b013e31820376cc.
279. Retinal Ganglion Cells Downregulate Gene Expression and Lose Their Axons within the Optic Nerve Head in a Mouse Glaucoma Model / I. Soto, E. Oglesby, B. P. Buckingham [et al.] // *The Journal of Neuroscience*. – 2008. – Vol. 28, No. 2. – P. 548–561. – DOI 10.1523/jneurosci.3714-07.2008.
280. Neuroprotective effects of antibodies on retinal ganglion cells in an adolescent retina organ culture / K. Bell, C. Wilding, S. Funke [et al.] // *Journal of Neurochemistry*. – 2016. – Vol. 139, No. 2. – P. 256–269. – DOI 10.1111/jnc.13765.

281. The Dopaminergic Dysfunction and Altered Working Memory Performance of Aging Mice Lacking Gamma-synuclein Gene / V. S. Kokhan, T. y. G. Kokhan, A. N. Samsonova [et al.] // *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*. – 2018. – Vol. 17, No. 8. – P. 604–607. – DOI 10.2174/1871527317666180726095734.
282. Wersinger, C. Partial regulation of serotonin transporter function by γ -synuclein / C. Wersinger, A. Sidhu // *Neuroscience Letters*. – 2009. – Vol. 453, No. 3. – P. 157–161. – DOI 10.1016/j.neulet.2009.02.033.
283. Lei, S. Cross interaction of dopaminergic and adrenergic systems in neural modulation / S. Lei // *International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology*. – 2014. – Vol. 6, No. 3. – P. 137–142. – PMID 25349636.
284. Schwahn, H. N. Effects of atropine on refractive development, dopamine release, and slow retinal potentials in the chick / H. N. Schwahn, H. Kaymak, F. Schaeffel // *Visual Neuroscience*. – 2000. – Vol. 17, No. 2. – P. 165–176. – DOI 10.1017/s0952523800171184.
285. Changes in the Chemical Barrier Composition of Tears in Alzheimer's Disease Reveal Potential Tear Diagnostic Biomarkers / G. Kalló, M. Emri, Z. Varga [et al.] // *PLOS ONE*. – 2016. – Vol. 11, No. 6. – Art. e0158000. – DOI 10.1371/journal.pone.0158000.
286. Proteins and microRNAs are differentially expressed in tear fluid from patients with Alzheimer's disease / A. Kenny, E. M. Jiménez-Mateos, M. A. Zea-Sevilla [et al.] // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9, No. 1. – Art. 15437. – DOI 10.1038/s41598-019-51837-y.
287. Rehman, A. A. Alpha-2-macroglobulin: A physiological guardian / A. A. Rehman, H. Ahsan, F. H. Khan // *Journal of Cellular Physiology*. – 2013. – Vol. 228, No. 8. – P. 1665–1675. – DOI 10.1002/jcp.24266.
288. Protease-activated alpha-2-macroglobulin can inhibit amyloid formation via two distinct mechanisms / A. R. Wyatt, P. Constantinescu, H. Ecroyd [et al.] // *FEBS Letters*. – 2013. – Vol. 587, No. 5. – P. 398–403. – DOI 10.1016/j.febslet.2013.01.020.
289. Platelet-generated amyloid beta peptides in Alzheimer's disease and glaucoma / M. Inyushin, A. Zayas-Santiago, L. Rojas [et al.] // *Histology and Histopathology*. – 2019. – Vol. 34, No. 8. – P. 843–856. – DOI 10.14670/HH-18-111.
290. Wang, L. Role of Retinal Amyloid- β in Neurodegenerative Diseases: Overlapping Mechanisms and Emerging Clinical Applications / L. Wang, X. Mao // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22, No. 5. – Art. 2360. – DOI 10.3390/ijms22052360.