

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ОДНОВРЕМЕННОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ mTOR И STING КАК ПОДХОД К СНИЖЕНИЮ УРОВНЯ АЛЬФА-СИНУКЛЕИНА И ЛИЗОСФИНГОЛИПИДОВ В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ МАКРОФАГОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА И КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ НЕЙРОБЛАСТОМЫ SH-SY5Y: ПЕРСПЕКТИВЫ ТЕРАПИИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

А.И. Безрукова^{1,2}, К.С. Башарова^{1,2}, Е.С. Галкина¹, О.С. Епифановская³,
Г.В. Байдакова¹, Е.Ю. Захарова¹, С.Н. Пчелина^{1,2}, Т.С. Усенко^{1,2*}

¹Петербургский институт ядерной физики имени Б.П. Константинова
Научно-исследовательский центр “Курчатовский институт”,

188300, Ленинградская обл., Гатчина, мкр. Орлова роща, 1; *эл. почта: usenko_ts@pnpi.nrcki.ru

²Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова,
197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6-8

³Научно-исследовательский институт детской онкологии, гематологии и
трансплантологии имени Р.М. Горбачевой, 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6-8

⁴Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова,
115478, Москва, ул. Москворечье, 1

В первичной культуре макрофагов периферической крови здоровых доноров и клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y исследовали сочетанное влияние разнонаправленных препаратов: ингибитора mTOR (Torin 1), ключевого регулятора аутофагии, и ингибитора STING (H-151), ключевого регулятора воспаления, на параметры аутофаголизосомной системы. Сочетанное применение этих препаратов приводило к снижению уровня лизосфинголипидов, являющихся триггерами олигомеризации альфа-синуклеина, а также к снижению уровня мономерного и нейротоксичного фосфорилированного (Ser129) альфа-синуклеина и увеличению уровня тирозингидроксилазы. Полученные результаты открывают новые перспективы для применения комбинированной терапии предложенных препаратов в лечении как заболеваний, связанных с дисфункцией лизосом, так и с нейродегенеративными патологиями.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона; mTOR; STING; альфа-синуклеин; активность лизосомных ферментов; аутофагия

DOI: 10.18097/PBMCR1616

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона (БП) — это хроническое прогрессирующее распространённое нейродегенеративное заболевание, которое характеризуется гибелью дофаминергических нейронов чёрной субстанции головного мозга человека [1–4]. В основе патогенеза лежит накопление и агрегация белка альфа-синуклеина [5]. Несмотря на то, что молекулярные механизмы БП неизвестны, последние исследования указывают на важную роль воспалительных процессов и нарушений аутофагии в патогенезе заболевания [6–10]. Хроническая активация воспаления приводит к активации иммунных клеток, что усиливает уязвимость нейронов к дегенерации [11]. Нарушения в функционировании аутофаголизосомной системы также играют значимую роль в патогенезе БП,

поскольку аутофагия участвует в деградации дефектных и токсичных белков, включая альфа-синуклеин [12]. Известно, что гиперактивация сигнального пути mTOR приводит к подавлению аутофагии, что способствует накоплению белков, в том числе и альфа-синуклеина и прогрессированию процессов нейродегенерации [13–15]. Кроме того, активация воспалительных процессов может дополнительно угнетать аутофагию через сигнальные пути, включая cGAS-STING [16]. Нами и другими авторами было показано увеличение секреции провоспалительных цитокинов в плазме крови и нарушение пути mTOR в клетках пациентов со спорадической формой БП (сБП) и пациентов с наиболее распространённой формой БП с известной этиологией — БП, ассоциированной с мутациями в гене *GBA1* (*GBA1*-БП) [9, 17–22].

Принятые сокращения: ASMase – сфингомиелиназа; GALC – галактоцереброзидаза; *GBA1*-БП – болезнь Паркинсона, ассоциированная с мутациями в гене *GBA1*; GCase – глюкоцереброзидаза; GLA – альфа-галактозидаза; HexSph – гексазилсфингозин; i-CTSD – промежуточная форма белка катепсин D; LysG3 – лизоглоботриаозилсфингозин; LysSM – лизосфингомиелин; m-CTSD – зрелая форма белка катепсин D; pro-CTSD – про-форма белка катепсин D; TH – тирозингидроксилаза; ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; БП – болезнь Паркинсона; сБП – спорадическая форма болезни Паркинсона.



© 2026 Коллектив авторов. Лицензиат ИБМХ, Москва. Статья открытого доступа, распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY-SA 4.0) (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>).

Недавно зарегистрированное клиническое исследование цилостазола в качестве препарата для терапии сБП (NCT06612593), предполагающее одновременную модуляцию путей mTOR и STING за счёт антиоксидантного и противовоспалительного действия, подтверждает актуальность комбинированного подхода. Одновременная модуляция этих двух сигнальных каскадов может стать перспективной терапевтической стратегией для БП, приводя к синергическому эффекту. Однако клеточный ответ при сочетанном ингибировании данных сигнальных путей остаётся неизученным.

В настоящем исследовании впервые было оценено сочетанное влияние селективного ингибитора mTOR (Torin 1), ключевого регулятора аутофагии, и селективного ингибитора STING (H-151), ключевого регулятора воспаления, на параметры аутофаголизосомной системы, а именно активность лизосомных ферментов и концентрацию лизосфинголипидов, уровень ключевых белковых маркеров аутофагии, уровень различных форм белка альфа-синуклеина, а также степень апоптоза в первичной культуре макрофагов периферической крови человека и клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y.

Макрофаги играют ключевую роль в регуляции воспалительного ответа, аутофагии и апоптоза [23], а клеточная линия SH-SY5Y широко применяется для изучения механизмов деградации альфа-синуклеина, аутофагии и апоптоза [24].

МЕТОДИКА

Характеристика пациентов, включённых в исследование

В исследование было включено 10 неврологически здоровых индивидуумов (3 мужчины, 7 женщин, средний возраст 27,0±5,5 лет), которые наблюдались в консультативно-диагностическом центре Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова.

Культивирование первичной культуры макрофагов периферической крови

Первичная культура макрофагов периферической крови была получена по протоколу, описанному нами ранее, из мононуклеарной фракции, выделенной из цельной крови каждого индивидуума [25–27]. На 4 сутки к первичной культуре макрофагов были добавлены селективный ингибитор протеинкиназы mTOR Torin 1 (“Abcam”, США) в концентрациях 25 нМ, 50 нМ, 100 нМ, 200 нМ или ингибитор белка STING H-151 (“MCE”, Швеция) в концентрациях 0,25 мкМ, 0,5 мкМ, 1 мкМ, 2 мкМ или сочетание ингибиторов Torin 1 и H-151 в концентрациях 50 нМ, 100 нМ и 0,5 мкМ, 1 мкМ, соответственно, выявленных по результатам оценки выживаемости [28], с последующим культивированием в течение 24 ч.

Культивирование клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y

Клеточную линию нейробластомы SH-SY5Y, предоставленную коллегами из института Цитологии РАН, С.-Петербург (д.б.н. Казначеева Е.В.), культивировали в питательной среде DMEM (“Биолот”, Россия) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (“Биолот”) и 1% антибиотика гентомицина (“Биолот”) в течение 4 суток при 37°C и 5% CO₂. Дифференцировку клеток SH-SY5Y проводили по протоколу, описанному ранее. На 9 сутки культивирования к клеткам нейробластомы SH-SY5Y были добавлены селективный ингибитор протеинкиназы mTOR Torin 1 (“Abcam”) в концентрациях 25 нМ, 50 нМ, 100 нМ, 200 нМ или ингибитор белка STING H-151 (“MCE”) в концентрациях 0,25 мкМ, 0,5 мкМ, 1 мкМ, 2 мкМ или сочетание ингибиторов Torin 1 и H-151 в концентрациях 50 нМ, 100 нМ и 0,5 мкМ, 1 мкМ, соответственно, выявленных по результатам оценки выживаемости, с последующим культивированием в течение 24 ч. Каждый эксперимент был выполнен в 5 независимых повторах.

Определение уровня белков фосфорилированной формы mTOR, фосфорилированной формы RPS6, STING, фосфорилированной формы TBK1, BECN1, p62, LC3B, CTSD, GCase, тирозингидроксилазы и альфа-синуклеина методом вестерн-блоттинга

Количество общего белка определяли с использованием набора BCA Protein Quantitative Detection Kit (“ServiceBio”, Китай). Равные количества белка разделены на электрофореze в полиакриламидном геле (20% SDS-PAGE для белка LC3B, 12% SDS-PAGE — для остальных белков) и перенесены на поливинилиденфторидную мембрану (“Bio-Rad”, США). Измерение уровня белков фосфорилированной формы mTOR (Ser2448) (p-mTOR), фосфорилированной формы RPS6 (Ser235/236) (p-RPS6), STING, фосфорилированной формы TBK1 (Ser172) (p-TBK1), BECN1, p62, LC3B, CTSD, GCase, тирозингидроксилазы (TH) и альфа-синуклеина (фосфорилированная (Ser129), мономерная и тетрамерная формы) в первичной культуре макрофагах периферической группы неврологически здоровых индивидуумов и клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y в присутствии ингибиторов протеинкиназы mTOR и/или белка STING в различных концентрациях, описанных выше, и без ингибиторов проводили с использованием соответствующих первичных антител (разведение 1:1000) (Phospho-mTOR-S2448, “ABclonal” (США), AP0094; Phospho-RPS6-S235/236, “ABclonal”, AP1326; STING, “Cloud-Clone Corp.” (Китай) PAN011Hu01; Phospho-TBK1-S172, “Affinity Biosciences” (Китай), AF8190; BECN1, “Cloud-Clone Corp.”, PAJ557Hu01; p62, “Cloud-Clone Corp.”, PAD198Hu01; LC3B, “ABclonal”, A19665; CTSD, “Cloud-Clone Corp.”, PAB280Hu01; GCase, “ABclonal”, A19057; TH, “Cloud-Clone Corp.”, PAB438Hu01; Phospho-α-Synuclein (Ser129) (D1R1R), “Cell Signal” (США), 23706; anti-alpha-synuclein

oligomeric, “Sigma” (США), ABN2265). В качестве вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, использовали антитела фирмы “Abcam” в разведении 1:5000 (goat anti-rabbit HRP conjugate, “Abcam”, ab6721). Окраску вторичных антител производили системой для детекции Clarity Western ECL Blotting Substrate (“BioRad”). Количество исследуемого белка нормировано на соответствующие показатели для референсного белка GAPDH (“ABclonal”, AC036, 1:15000). Для каждого белка эксперименты были выполнены в трёх повторах. Результаты вестерн-блоттинга проанализированы с использованием программы Fiji (версия 2.14.0/1.54f).

Оценка активности лизосомных ферментов и концентрации лизосфинголипидов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией

Оценку ферментативной активности лизосомных ферментов (GCase, альфа-галактозидаза (GLA), сфингомиелиназа (ASMase), галактоцереброзидаза (GALC)) и концентраций соответствующих субстратов (гексазилсфингозин (HexSph) (смесь гликозилсфингозина (GlcSph) и галактозилсфингозина (GalSph)), лизосфингомиелин (LysoSM) и лизоглобтриаозилсфингозин (LysoGb3)) проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) в первичной культуре макрофагов периферической крови группы неврологически здоровых индивидуумов и клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y в присутствии и без ингибиторов протеинкиназы mTOR (Torin 1) и/или белка STING (H-151) в различных концентрациях, описанных выше по протоколу, описанному нами ранее [29, 30]. Все измерения были выполнены в трёх повторах.

О ферментативной активности GCase, GLA, ASMase, GALC судили по концентрации продукта, образующегося в результате реакции фермента с субстратом, измерения проводили на тандемном масс-спектрометре API 3200 QTrap (“ABSciex”, США) в режиме мониторинга множественных реакций (multiple reaction monitoring, MRM). Расчёт активности был проведён исходя из предположения, что количество полученного продукта прямо пропорционально активности ферментов в суспензии клеток. В качестве контроля были использованы образцы с известным уровнем активности ферментов, полученные из центра по контролю и профилактике заболеваний (Атланта, США), которые были включены в каждый планшет.

Лизосфинголипиды HexSph, LysoSM, LysoGb3 экстрагировали из сухих пятен клеточной суспензии путём добавления 100 мкл экстракционного растворителя (80% метанола, 15% ацетонитрила и 5% воды), содержащего 10 нг/мл IS (LysoLC) с последующей инкубацией в течение 60 мин (при 30°C, 650 об/мин). Экстрагированные лизосфинголипиды были перенесены в новый 96-луночный планшет. ВЭЖХ-МС/МС система состояла из ВЭЖХ Shimadzu Nexera (“Shimadzu

Corporation”, Япония) и масс-спектрометра API-5500 QTrap (“ABSciex”). Разделение метаболитов проводили на колонке Phenomenex Fusion-RP (“Phenomenex”, США) 4 мкм 2,1×50 мм в линейном режиме градиента.

Оценка уровня апоптоза в первичной культуре макрофагов периферической крови методом проточной цитометрии

Апоптоз в первичной культуре макрофагов периферической крови неврологически здоровых индивидуумов в присутствии ингибиторов протеинкиназы mTOR и/или белка STING в различных концентрациях, описанных выше, и без ингибиторов оценивали методом проточной цитофлуорометрии с использованием набора Annexin V-FITC/PI Apoptosis Detection (Kit A211, “Vazyme”, Китай) по протоколу производителя на проточном цитометре Cytomics FC-500 (“Beckman Coulter”, США).

Статистическая обработка

Статистическую обработку проводили с использованием встроенных пакетов “R” (версия 4.5.2) [31]. Для оценки различий между несколькими группами использовали тест Краскела-Уоллиса. Для оценки различий между группами использовали парный тест Вилкоксона. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Клинические характеристики представлены в виде среднее значение ± стандартное отклонение, экспериментальные значения — медиана (мин-макс). Для количественной оценки взаимодействия Torin 1 и H-151 использовали метод Highest Single Agent (HSA). Для этого данные о клеточной реакции (уровни маркеров) преобразовывали в матрицу “доза-ответ” с указанием концентраций Torin 1 и H-151, включая монотерапии и нулевые дозы (контроль). Расчёт и визуализацию синергического эффекта выполняли с помощью пакета synergyfinder в R и дополнительно проверяли с помощью онлайн-платформы SynergyFinder Plus.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В настоящее время одной из актуальных задач при разработке терапии БП является не только поиск новых терапевтических мишеней, но и изучение комбинированных подходов с целью достижения синергетического эффекта при применении малой дозы препаратов и снижения риска побочных проявлений. Особую значимость приобретает стратегия одновременного влияния на несколько ключевых сигнальных путей, участвующих в патогенезе БП. В данном исследовании мы оценили дозозависимое и сочетанное действие ингибиторов mTOR (Torin 1) и STING (H-151) на ключевые параметры аутофаголизосомной системы, включая активность лизосомных ферментов, концентрацию лизосфинголипидов, уровень аутофагии, различных форм альфа-синуклеина и GCase, а также степень апоптоза в первичной культуре

макрофагов периферической крови человека и клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y.

В основной части работы представлены данные как по воздействию ингибиторов Torin 1 (50 нМ и 100 нМ) и H-151 (0,5 мкМ и 1 мкМ) отдельно, так и их комбинаций в тех же концентрациях на все исследуемые параметры. В дополнительных материалах приведены дозозависимые изменения при более широком диапазоне концентраций Torin 1 — 25 нМ, 50 нМ, 100 нМ и 200 нМ и H-151 — 0,25 мкМ, 0,5 мкМ, 1 мкМ и 2 мкМ (Дополнительные материалы, рис. S1–S10).

Оценка эффективности ингибирования *mTOR* и *STING* в первичной культуре макрофагов периферической крови неврологически здоровых индивидумов и клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y в присутствии ингибитора Torin 1 и/или H-151

Эффективность ингибирования протеинкиназы *mTOR* и белка *STING* соответствующими ингибиторами Torin 1 и H-151 в макрофагах и клетках SH-SY5Y оценивали по уровню белков p-*mTOR* (Ser2448) и p-RPS6 (Ser235/236) (для Torin 1) (рис. 1А), *STING*, p-TBK1 (Ser172) (для H-151) (рис. 2А).

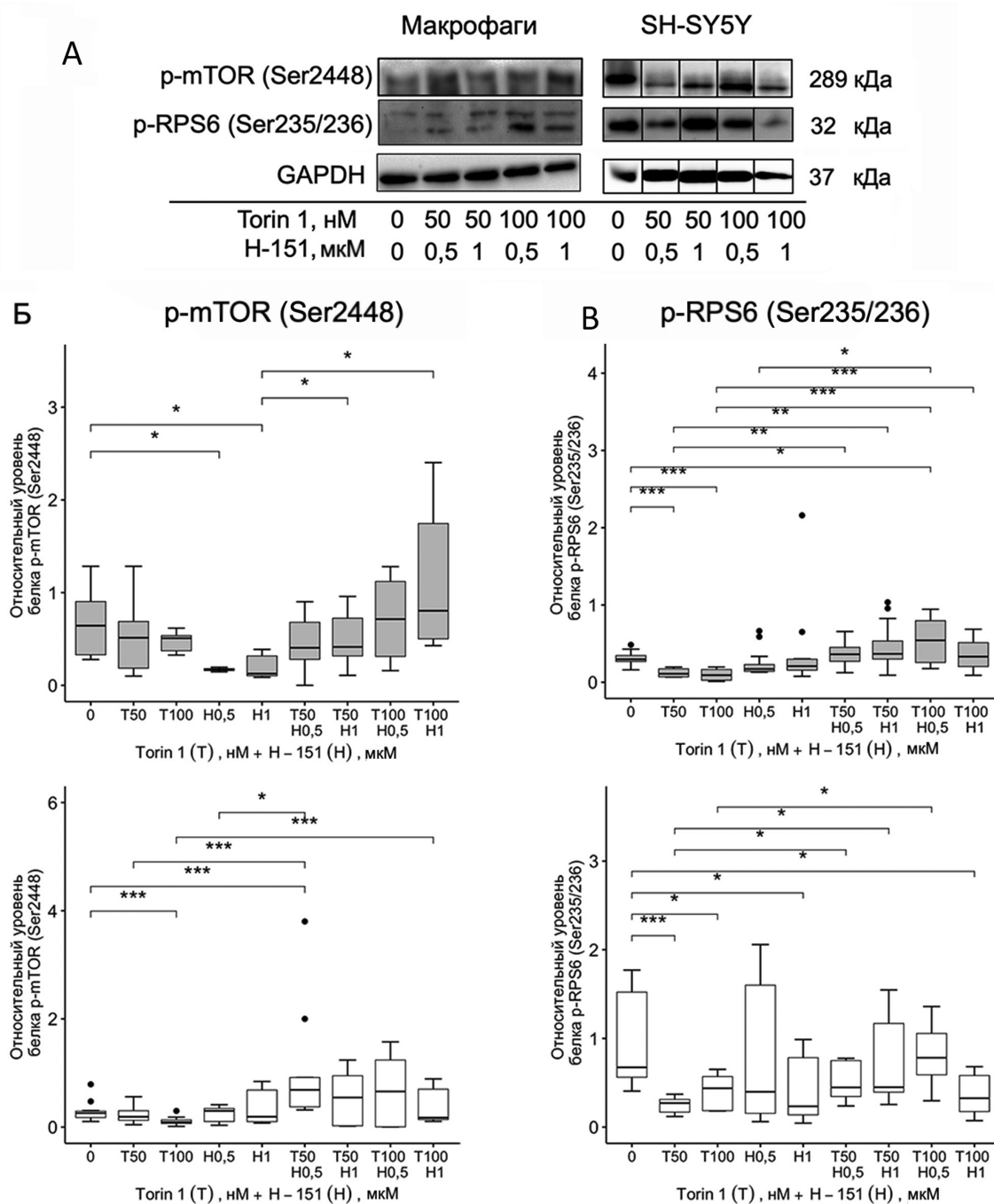


Рисунок 1. Оценка эффективности сочетанного ингибирования протеинкиназы *mTOR* Torin 1 и H-151 в первичной культуре макрофагов (макрофаги) (серый цвет) и клеток SH-SY5Y (SH-SY5Y) (белый цвет). **А** – данные вестерн-блоттинга; **Б** – относительный уровень p-*mTOR* (Ser2448); **В** – относительный уровень p-RPS6 (Ser235/236). Т – Torin 1, H – H-151. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

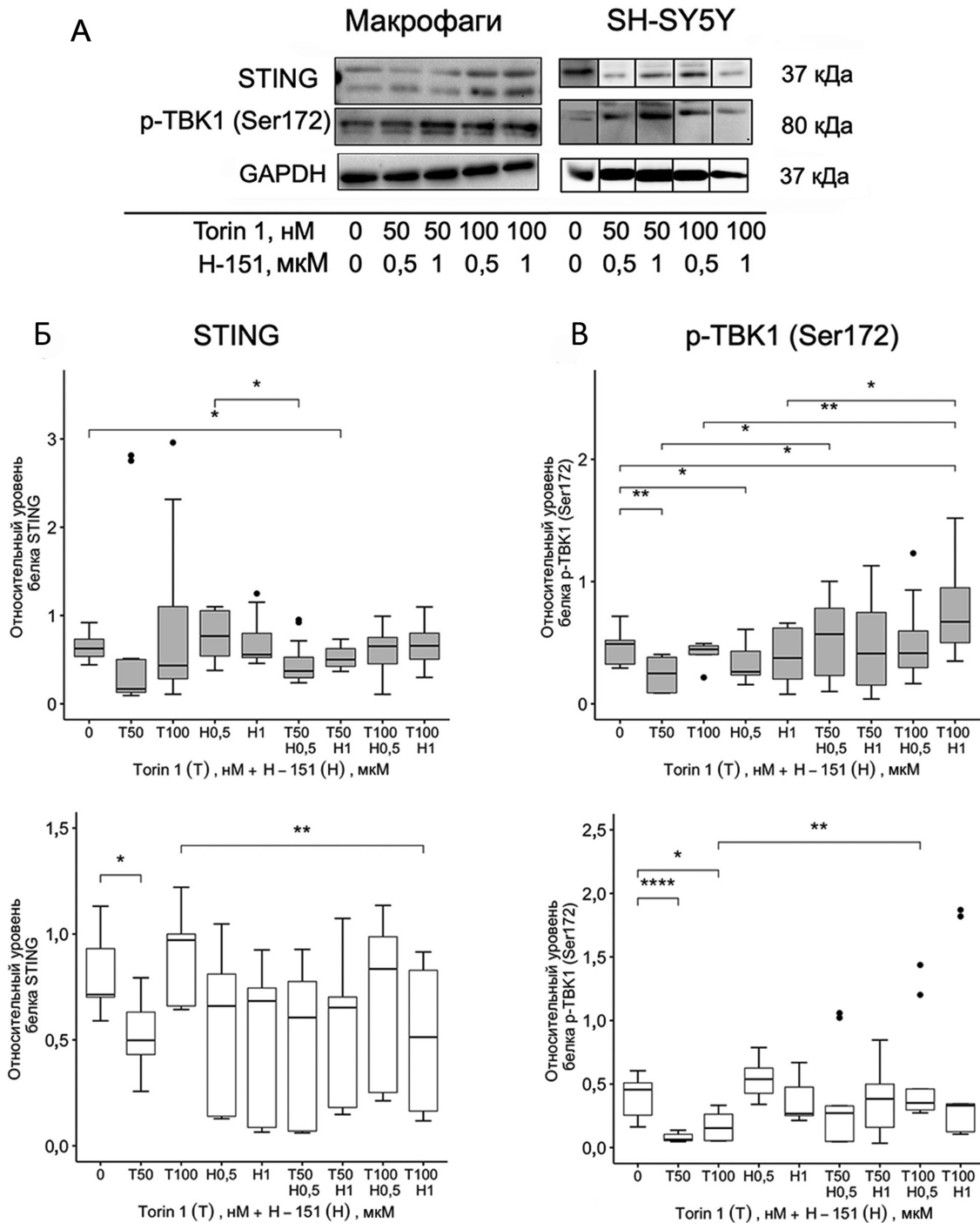


Рисунок 2. Оценка эффективности сочетанного ингибирования белка STING Torin 1 и H-151 в первичной культуре макрофагов (макрофаги) (серый цвет) и клеток SH-SY5Y (SH-SY5Y) (белый цвет). **A** – данные вестерн-блоттинга; **Б** – относительный уровень STING; **В** – относительный уровень p-TBK1 (Ser172). Т – Torin 1, Н – H-151. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Фосфорилированные формы белков выбраны в качестве маркеров активности сигнальных путей, поскольку степень их фосфорилирования отражает состояние активации соответствующих молекулярных каскадов. Фосфорилированная форма киназы mTOR (p-mTOR, Ser2448) отражает её каталитическую активность; фосфорилирование в положении Ser2448 связано с активацией комплекса mTOR, регулирующего клеточный рост, метаболизм и синтез белка.

Снижение уровня p-mTOR по остатку Ser2448 при действии ингибитора Torin 1 указывает на подавление активности комплекса mTOR. Рибосомный белок S6 (RPS6) фосфорилируется киназой S6K, являющейся прямым субстратом mTOR, поэтому уровень p-RPS6 (Ser235/236) рассматривается как вторичный индикатор активности пути mTOR. Снижение уровня p-RPS6 (Ser235/236) при обработке Torin 1 дополнительно подтверждает эффективность

ингибирования данного сигнального каскада. Белок STING (Stimulator of Interferon Genes) является ключевым адаптером врожденного иммунного ответа, активирующим киназу TBK1 и транскрипционный фактор IRF3. Активация белка STING сопровождается конформационными изменениями и запуском фосфорилирования нижележащих эффекторов сигнального каскада. Аутофосфорилированная форма серин/треонин-киназы TBK1 по Ser172 отражает её активное состояние и служит показателем функциональной активности STING-сигналинга. Ингибитор H-151 предотвращает активацию STING, блокируя его пальмитилирование, что приводит к снижению уровня p-TBK1. Таким образом, фосфорилированные формы p-mTOR и p-RPS6 используются для оценки эффективности ингибирования пути mTOR, а уровень p-TBK1 — для оценки подавления STING-зависимой активации.

Сочетанное действие ингибиторов сравнивали с их одиночным воздействием, а также с необработанной культурой клеток.

В первичной культуре макрофагов периферической крови здоровых доноров, как было показано нами ранее [32], ингибирование Torin 1 (50 нМ и 100 нМ) не вызывало достоверных изменений уровня p-mTOR (Ser2448) по сравнению с необработанной культурой клеток (рис. 1Б). При этом H-151 (0,5 мкМ и 1 мкМ) приводил к статистически значимому снижению уровня p-mTOR (Ser2448) по сравнению с необработанной культурой клеток ($p < 0,05$) (рис. 1Б). Сочетанное воздействие Torin 1 (50 нМ и 100 нМ) и H-151 (1 мкМ) приводило к увеличению уровня p-mTOR (Ser2448) по сравнению с одиночным воздействием H-151 в той же концентрации ($p < 0,05$) (рис. 1Б).

В клетках линии SH-SY5Y ингибирование mTOR Torin 1 (100 нМ) вызывало статистически значимое снижение уровня p-mTOR (Ser2448) по сравнению с необработанными клетками ($p < 0,001$) (рис. 1Б), как было показано нами ранее [32]. Однако добавление H-151 (0,5 мкМ) к Torin 1 (50 нМ) вызывало повышение p-mTOR (Ser2448) по сравнению с необработанными клетками и монопрепаратами в тех же концентрациях (рис. 1Б), что может свидетельствовать о перекрёстном регуляторном эффекте. Аналогичный эффект, который выражался в повышении p-mTOR (Ser2448), был выявлен при культивировании клеток с комбинацией Torin 1 (100 нМ) и H-151 (1 мкМ) по сравнению с воздействием только Torin 1 (100 нМ) (рис. 1Б).

При этом уровень белка p-RPS6 (Ser235/236) как нижележащей мишени mTOR в первичной культуре макрофагов периферической крови при добавлении Torin 1 (50 нМ и 100 нМ) снижался в дозозависимой манере по сравнению с культурой клеток без добавления ингибиторов ($p < 0,001$) (рис. 1В). Однако культивирование при сочетанном воздействии Torin 1 и H-151 во всех исследуемых комбинациях приводило к увеличению уровня p-RPS6 (Ser235/236) по сравнению с моновоздействием Torin 1 (50 нМ и 100 нМ) (рис. 1В). При этом комбинация препаратов Torin 1 (100 нМ) и H-151 (0,5 мкМ)

приводила к более выраженному увеличению p-RPS6 (Ser235/236) в первичной культуре макрофагов периферической крови по сравнению с добавлением только H-151 (0,5 мкМ) и в отсутствии ингибиторов ($p < 0,05$) (рис. 1В).

В клетках SH-SY5Y было отмечено снижение относительного уровня белка p-RPS6 (Ser235/236) при использовании Torin 1 (50 нМ и 100 нМ) в дозозависимой манере и H-151 (1 мкМ) по отдельности по сравнению с необработанной культурой клеток, при этом комбинация препаратов Torin 1 (50 нМ) с H-151 (0,5 мкМ и 1 мкМ) и Torin 1 (100 нМ) с H-151 (0,5 мкМ) приводила к увеличению уровня p-RPS6 (Ser235/236) относительно моновоздействия Torin 1 (50 нМ и 100 нМ) ($p < 0,05$) (рис. 1В). Снижение уровня p-RPS6 (Ser235/236) было выявлено при комбинации Torin 1 с H-151 в максимальных концентрациях, используемых в данном исследовании, по сравнению с необработанной культурой клеток ($p < 0,05$) (рис. 1В).

Уровень STING снижался в первичной культуре макрофагов при комбинированной аппликации Torin 1 (50 нМ) и H-151 (1 мкМ) по сравнению с необработанной культурой клеток ($p < 0,05$) и при культивировании в присутствии комбинации Torin 1 (100 нМ) и H-151 (0,5 мкМ) по сравнению с добавлением H-151 в той же концентрации ($p < 0,05$) (рис. 2Б).

При добавлении Torin 1 (50 нМ) к клеткам SH-SY5Y относительный уровень STING снижался по сравнению с клетками без добавления ингибитора ($p < 0,05$) (рис. 2Б). В то же время комплексное воздействие ингибиторов в максимальных исследуемых концентрациях приводило к снижению STING по сравнению с моновоздействием Torin 1 (100 нМ) на клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y ($p < 0,01$) (рис. 2Б).

Уровень p-TBK1 (Ser172), являющегося ключевым медиатором в нижележащем пути STING, демонстрировал разнонаправленные изменения при моно- и комбинированном воздействии ингибиторов. Так, в первичной культуре макрофагов низкие дозы ингибиторов Torin 1 (50 нМ) и H-151 (0,5 мкМ) по отдельности снижали уровень p-TBK1 (Ser172) по сравнению с необработанной культурой клеток, в то время как комбинация высоких доз Torin 1 (100 нМ) и H-151 (1 мкМ) способствовала увеличению его уровня по сравнению с необработанной культурой клеток и монотерапией Torin 1 и H-151 в тех же концентрациях, как и комбинация низких доз препаратов по сравнению с Torin 1 (50 нМ) ($p < 0,05$) (рис. 2В). В клетках SH-SY5Y Torin 1 (50 нМ и 100 нМ) приводил к снижению p-TBK1 (Ser172) по сравнению с необработанной культурой клеток, а отдельное воздействие H-151 и сочетанное добавление ингибиторов не влияло на уровень p-TBK1 (Ser172) по сравнению с необработанной культурой клеток ($p > 0,05$) (рис. 2В). Однако комбинация Torin 1 (100 нМ) и H-151 (0,5 мкМ) увеличивала p-TBK1 (Ser172) по сравнению с одиночным воздействием Torin 1 в той же концентрации ($p < 0,01$) (рис. 2В).

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ mTOR И STING ПРИ БП

Полученные результаты позволяют предположить, что сочетанное ингибирование путей mTOR и STING с использованием Torin 1 и H-151 оказывает сложное и дозозависимое влияние на основные белки исследуемых сигнальных каскадов.

Сочетанное влияние ингибиторов протеинкиназы mTOR Torin 1 и белка STING H-151 на основные этапы аутофагии в первичной культуре макрофагов периферической крови неврологически здоровых индивидуумов и клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y

Аутофагия — это процесс клеточной деградации и переработки дисфункциональных молекул и органелл, являющийся высоко консервативным у всех эукариот. Весь процесс аутофагии можно разделить на несколько этапов:

образование фагофора и его элонгация (BECN1), образование и созревание аутофagosомы (LC3B-II и p62), синтез аутолизосомы и деградация её содержимого (рис. 3А).

В первичной культуре макрофагов периферической крови Torin 1 (50 нМ и 100 нМ) снижал уровни BECN1 и p62 и повышал LC3B-II по сравнению с необработанной культурой клеток ($p < 0,01$), отражая активацию аутофагии и, в частности, формирования аутофagosом (рис. 3Б–Г), что частично было показано нами ранее [32]. Интересно отметить, что все изучаемые комбинации Torin 1 (50 нМ и 100 нМ) и H-151 (0,5 мкМ и 1 мкМ) приводили к противоположному эффекту, а именно к увеличению BECN1 и p62 на фоне снижения LC3B-II по сравнению с одиночным воздействием Torin 1 (50 нМ и 100 нМ) ($p < 0,01$) (рис. 3Б–Г).

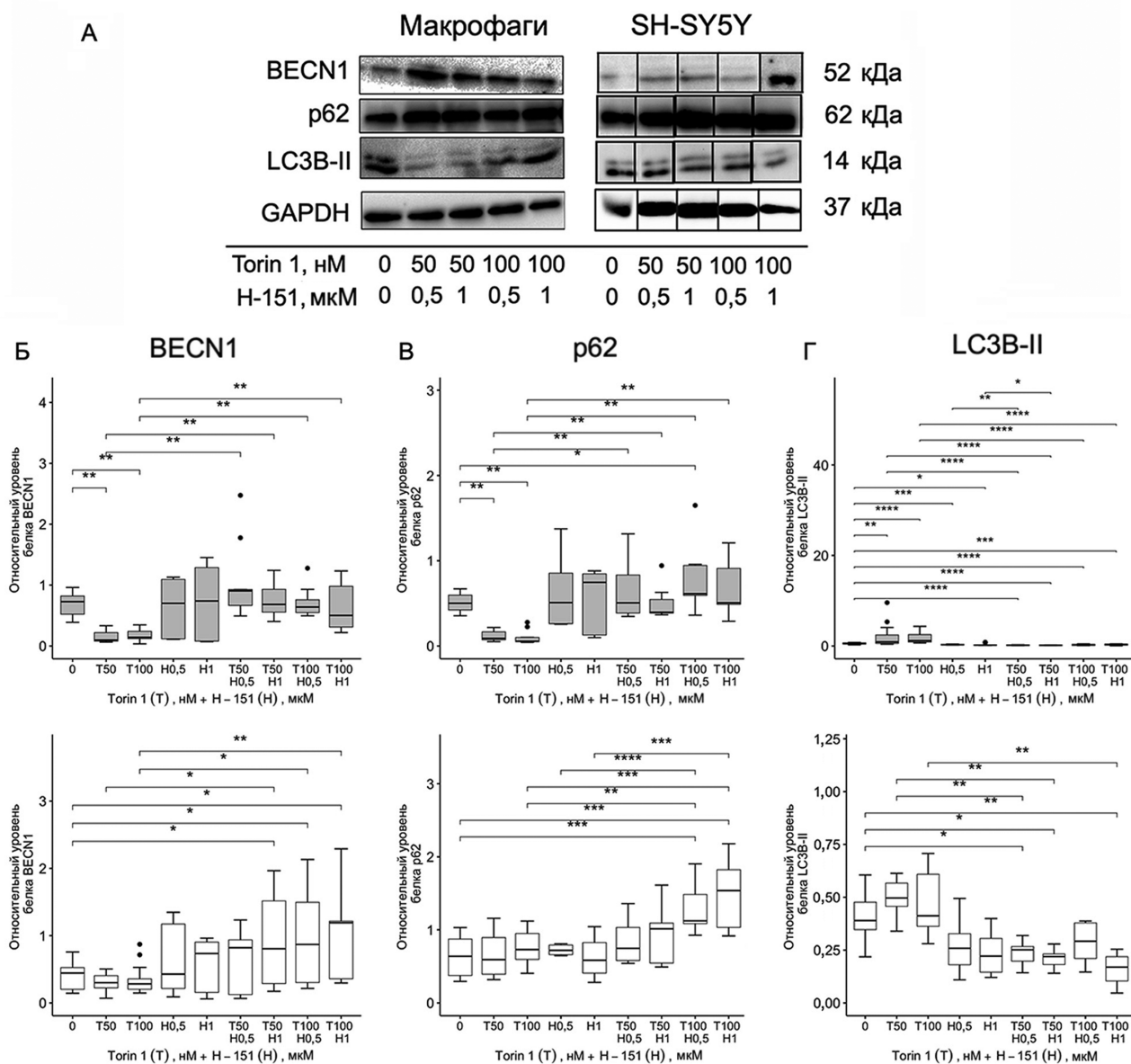


Рисунок 3. Оценка дозозависимого сочетанного влияния ингибирования протеинкиназы mTOR Torin 1 и белка STING H-151 в первичной культуре макрофагов периферической крови (макрофаги) (серый цвет) и клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y (SH-SY5Y) (белый цвет) на основные этапы аутофагии. **А** – данные вестерн-блоттинга; **Б** – относительный уровень BECN1; **В** – относительный уровень p62; **Г** – относительный уровень LC3B-II. Т – Torin 1, Н – H-151. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Однако культивирование макрофагов периферической крови в присутствии H-151 (0,5 мкМ и 1 мкМ), как в комбинации с Torin 1 (50 нМ и 100 нМ), так и отдельно, снижало уровень LC3B-II ($p < 0,05$) (рис. 3Г) по сравнению с клетками без добавления ингибиторов, а комбинация Torin 1 (100 нМ) и H-151 (0,5 мкМ) повышала уровень p62 ($p < 0,05$) (рис. 3В) при отсутствии изменений в уровне BECN1 при любых комбинациях Torin 1 и H-151 и одиночного воздействия H-151 ($p > 0,05$) по сравнению с необработанной культурой клеток (рис. 3Б), что может свидетельствовать о блокаде деградации аутолизосом. Сочетание препаратов Torin 1 (50 нМ) и H-151 (0,5 мкМ и 1 мкМ) снижало уровень LC3B-II по сравнению с моновоздействием H-151 в соответствующих концентрациях (рис. 3Г).

В клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y различные комбинации Torin 1 и H-151 приводили к повышению уровней BECN1 и p62 ($p < 0,05$) (рис. 3Б,В) на фоне снижения LC3B-II ($p < 0,05$) (рис. 3Г) по сравнению как с необработанной культурой клеток, так и с культивированием в присутствии отдельных ингибиторов в соответствующих концентрациях.

Таким образом, сочетание Torin 1 и H-151 оказывает разностороннее влияние на аутофагию, вызывая активацию ранних этапов при возможном блокировании терминальных стадий, что подтверждается накоплением BECN1, p62 и снижением LC3B-II. Выраженность данных эффектов зависит от типа клеток.

Сочетанное влияние ингибиторов протеинкиназы mTOR Torin 1 и белка STING H-151 на изменение уровней CTSD и GCase в первичной культуре макрофагов периферической крови неврологически здоровых индивидуумов и клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y

Степень деградации содержимого в лизосомах оценивали по уровню белков GCase и CTSD. CTSD в клетке находится в виде трёх основных форм. Про-форма (pro-CTSD) созревает в аппарате Гольджи, затем перерабатывается в ферментативно активную промежуточную форму в эндосомах (i-CTSD), далее транспортируется в лизосомы, где приобретает зрелую форму (m-CTSD) (рис. 4А).

В первичной культуре макрофагов Torin 1 (100 нМ) повышал уровень pro-CTSD, а H-151 (0,5 мкМ и 1 мкМ) снижал по сравнению с необработанной культурой клеток (рис. 4Б). Сочетанное действие ингибиторов Torin 1 и H-151 в различных концентрациях снижало pro-CTSD по сравнению с Torin 1 ($p < 0,01$), но увеличивало по сравнению с H-151 в соответствующих концентрациях без изменения по сравнению с необработанной культурой клеток ($p > 0,05$) (рис. 4Б). Torin 1 (50 нМ и 100 нМ) снижал i-CTSD по сравнению с клетками без добавления ингибиторов ($p < 0,05$), однако комбинации с H-151 (0,5 мкМ и 1 мкМ) увеличивали его уровень по сравнению с добавлением только Torin 1 в соответствующих концентрациях (рис. 4В).

Только сочетанное воздействие Torin 1 (50 нМ) и H-151 (1 мкМ) увеличивало уровень i-CTSD по сравнению с клетками без добавления ингибиторов (рис. 4В). Уровень m-CTSD снижался при отдельном воздействии ингибиторов Torin 1 и H-151 при всех исследуемых концентрациях, но увеличивался при сочетанном воздействии Torin 1 и H-151 при всех комбинациях по сравнению с необработанной культурой клеток и одиночным воздействием ингибиторов (рис. 4Г). Уровень GCase увеличивался при Torin 1 100 нМ, что было показано нами ранее [32], и снижался в присутствии H-151 0,5 мкМ, однако сочетанное воздействие Torin 1 и H-151 не влияло на уровень GCase относительно необработанной культуры клеток ($p > 0,05$) (рис. 4Д). Смесь ингибиторов Torin 1 (50 нМ и 100 нМ) и H-151 (0,5 мкМ) увеличивала уровень GCase по сравнению с добавлением только H-151 в соответствующей концентрации.

В клетках нейробластомы SH-SY5Y комбинация Torin 1 (100 нМ) и H-151 (0,5 мкМ) увеличивала pro-CTSD, а сочетание Torin 1 (50 нМ) и H-151 (1 мкМ) снижало i-CTSD по сравнению с моновоздействием Torin 1 в соответствующих концентрациях (рис. 4Б,В). Все исследуемые комбинации Torin 1 и H-151, а также моновоздействие Torin 1 (50 нМ) и H-151 (0,5 мкМ и 1 мкМ) увеличивали уровень m-CTSD по сравнению с необработанной культурой клеток (рис. 4Г). При этом более выраженное повышение m-CTSD было показано при культивировании клеток SH-SY5Y с комбинациями Torin 1 (50 нМ) и H-151 (0,5 мкМ и 1 мкМ) и с сочетанием Torin 1 (100 нМ) и H-151 (0,5 мкМ) по сравнению индивидуальным воздействием Torin 1 в соответствующих концентрациях (рис. 4Г). Уровень GCase снижался при всех исследуемых комбинациях Torin 1 и H-151, а также при их моновоздействии по сравнению с необработанной культурой клеток ($p < 0,05$) (рис. 4Д) [32]. Более выраженное снижение было отмечено при сочетанном добавлении Torin 1 (100 нМ) и H-151 (0,5 мкМ и 1 мкМ) по сравнению с добавлением только Torin 1 (100 нМ) (рис. 4Д).

Сочетанное влияние ингибиторов протеинкиназы mTOR Torin 1 и белка STING H-151 на активность лизосомных гидролаз в первичной культуре макрофагов периферической крови неврологически здоровых индивидуумов и клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y

В данном исследовании также была оценена активность лизосомных ферментов (GALC, GCase, ASMase, GLA) и концентрация лизосфинголипидов (HexSph, LysoSM, LysoGb3), участвующих в метаболизме церамидов и ассоциированных с патогенезом БП. В первичной культуре макрофагов и клеток линии нейробластомы SH-SY5Y как отдельное воздействие Torin 1 [32] и H-151, так и их сочетание не приводили к статистически значимым изменениям в активности GALC, GCase, ASMase и GLA ($p > 0,05$) по сравнению с клетками без добавления ингибиторов (рис. 5).

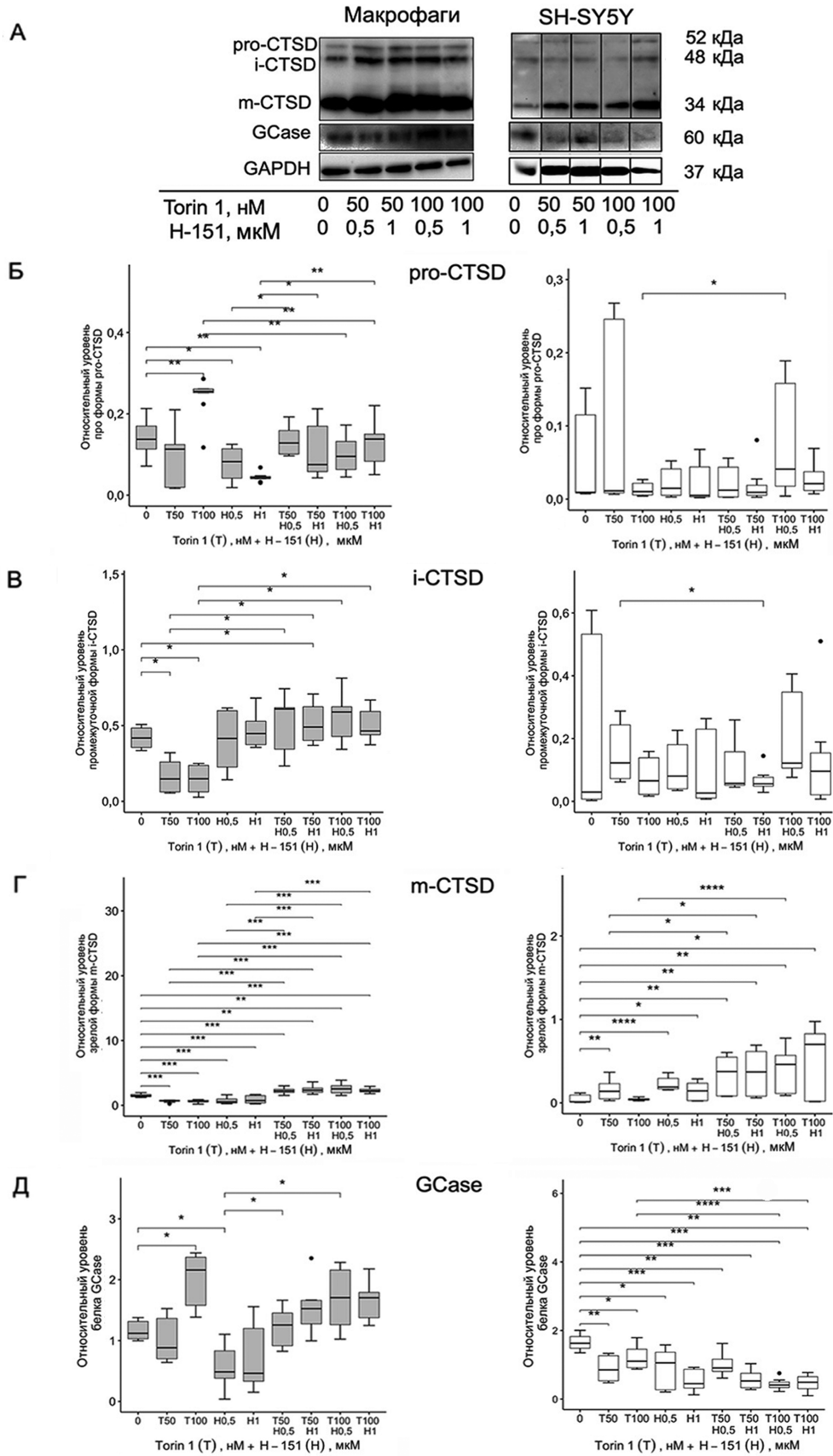


Рисунок 4. Оценка дозозависимого сочетанного влияния ингибирования протеинкиназы mTOR Torin 1 и белка STING H-151 в первичной культуре макрофагов (макрофаги) (серый цвет) и клеток SH-SY5Y (SH-SY5Y) (белый цвет) на лизосомную деградацию. **А** – данные вестерн-блоттинга; **Б** – относительный уровень pro-CTSD; **В** – относительный уровень i-CTSD; **Г** – относительный уровень m-CTSD; **Д** – относительный уровень GCase. Т – Torin 1, Н – H-151. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

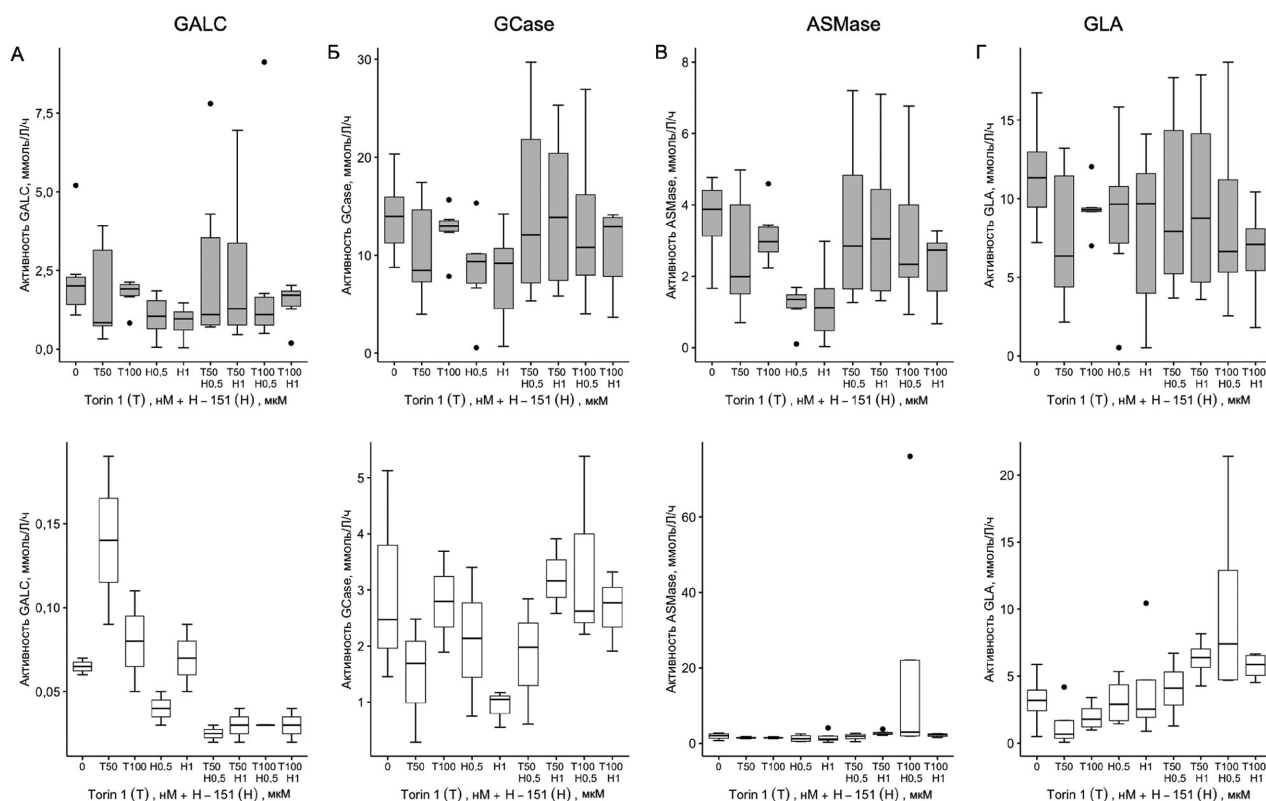


Рисунок 5. Оценка дозозависимого сочетанного влияния ингибирования протеинкиназы mTOR Torin 1 и белка STING H-151 в первичной культуре макрофагов (макрофаги) (серый цвет) и клеток линии SH-SY5Y (SH-SY5Y) (белый цвет) активность лизосомных ферментов. **А** – GALC; **Б** – GCCase; **В** – ASMase; **Г** – GLA. Т – Torin 1, H – H-151.

В то же время комбинированное воздействие Torin 1 и H-151 при всех исследуемых концентрациях снижало концентрацию HexSph в лизатах первичной культуры макрофагов периферической крови по сравнению с необработанной культурой клеток (рис. 6А). Интересно отметить, что комбинированное воздействие ингибиторов во всех исследуемых концентрациях Torin 1 и H-151, за исключением низких концентраций веществ, приводило к более выраженному снижению концентрации HexSph по сравнению с монодействием препаратов в соответствующих концентрациях (рис. 6А). При этом уровень LysoGb3 снижался при культивировании первичной культуры макрофагов периферической крови в присутствии комбинаций Torin 1 (50 нМ и 100 нМ) и H-151 (1 мкМ) по сравнению с только добавлением Torin 1 в соответствующих концентрациях (рис. 6Б). Различий в концентрациях LysoSM в лизатах первичной культуры макрофагов периферической крови и в концентрациях HexSph, LysoSM, LysoGb3 в лизатах клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y выявлено не было ($p > 0,05$) (рис. 6А–В).

Сочетанное влияние ингибиторов протеинкиназы mTOR Torin 1 и белка STING H-151 на уровень различных форм белка альфа-синуклеина и тирозингидроксилазы в клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y

В данной работе оценено сочетанное влияние ингибиторов протеинкиназы mTOR (Torin 1) и

белка STING (H-151) на уровень различных форм белка альфа-синуклеина и тирозингидроксилазы (ТН) в клетках нейробластомы SH-SY5Y (рис. 7А).

В клеточной линии SH-SY5Y комбинированное воздействие Torin 1 и H-151 при всех исследуемых концентрациях, а также монодействием Torin 1 (100 нМ) [32] и H-151 (0,5 мкМ и 1 мкМ) приводило к снижению фосфорилированного (Ser129) альфа-синуклеина по сравнению с необработанной культурой клеток (рис. 7Б). Комбинации Torin 1 (50 нМ) и H-151 (0,5 мкМ и 1 мкМ) снижали фосфорилированный (Ser129) альфа-синуклеин по сравнению только с Torin 1 в соответствующей концентрации, а микс Torin 1 (100 нМ) и H-151 (1 мкМ) напротив увеличивал уровень белка по сравнению с одиночным H-151 (1 мкМ) (рис. 7Б). Снижение мономерного альфа-синуклеина было отмечено при добавлении H-151 (1 мкМ), Torin 1 (50 нМ) [32] и H-151 (0,5 мкМ), Torin 1 (100 нМ) и H-151 (1 мкМ) по сравнению с клетками без веществ (рис. 7Б). Сочетанное действие препаратов также приводило к снижению мономерного альфа-синуклеина в различных комбинациях по сравнению с монодействием веществ, за исключением смеси Torin 1 (50 нМ) и H-151 (1 мкМ), которая увеличивала уровень мономерного альфа-синуклеина по сравнению с воздействием одного H-151 (1 мкМ) (рис. 7Б). Увеличение тетрамерного альфа-синуклеина отмечено при добавлении к клеткам SH-SY5Y Torin 1 (100 нМ) как по сравнению с необработанными клетками (как было показано ранее [32]),

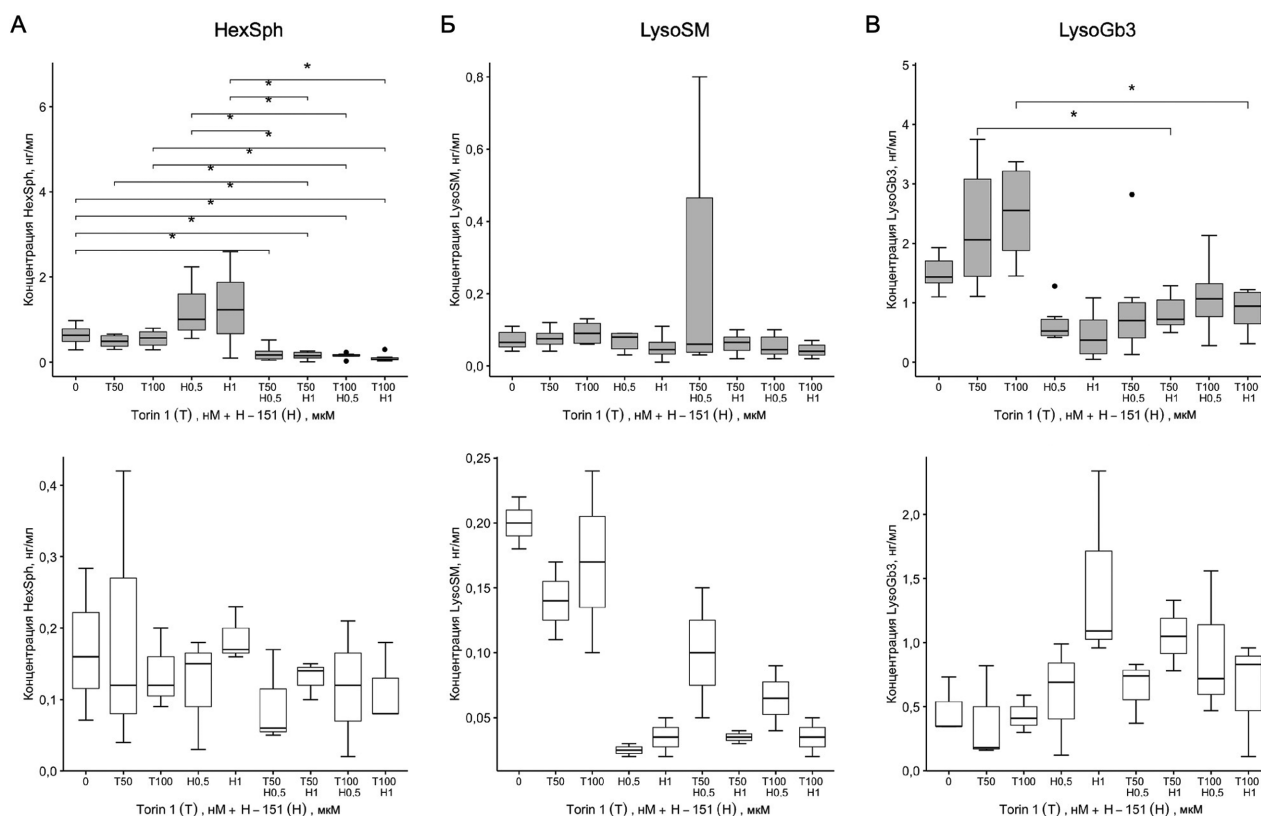


Рисунок 6. Оценка дозозависимого сочетанного влияния ингибирования протеинкиназы mTOR Torin 1 и белка STING H-151 в лизатах первичной культуры макрофагов (макрофаги) (серый цвет) и клеток линии SH-SY5Y (SH-SY5Y) (белый цвет) активность лизосомных ферментов и уровень лизосфинголипидов. А – HexSph; Б – LysoSM; В – LysoGb3. Т – Torin 1, Н – H-151. * $p < 0,05$.

так и по сравнению с комбинациями Torin 1 (100 нМ) и H-151 (0,5 мкМ и 1 мкМ) (рис. 7Г). Интересно отметить, что уровень TH увеличивался при воздействии комбинаций Torin 1 и H-151 во всех исследуемых концентрациях по сравнению с необработанной культурой клеток; более выраженное увеличение отмечено при добавлении смеси Torin 1 (100 нМ) и H-151 (1 мкМ) и Torin 1 (50 нМ) и H-151 (0,5 мкМ) по сравнению с моновоздействием H-151 (1 мкМ) и Torin 1 (50 нМ) ($p < 0,01$) соответственно (рис. 7Д).

Измерение уровня белка альфа-синуклеина в первичной культуре макрофагов периферической крови не проводили ввиду низкой чувствительности метода.

Дозозависимое влияние ингибиторов протеинкиназы mTOR Torin 1 и белка STING H-151 на степень апоптоза в первичной культуре макрофагов периферической крови

Полученные результаты не выявили статистически значимых изменений степени апоптоза при воздействии как отдельных ингибиторов Torin 1 и H-151, так и их комбинации ($p > 0,05$) (рис. 8А-Г).

Дополнительно нами был оценен синергический эффект комбинированного ингибирования mTOR и STING на маркеры аутофагии, активность лизосомных гидролаз, их субстратов, различных форм белка

альфа-синуклеина и степени апоптоза в первичной культуре макрофагов периферической крови и клеток линии SH-SY5Y методом HSA для каждого параметра (Дополнительные материалы, табл. S1, S2). Индекс синергии ранжировался следующим образом: < -10 — антагонизм, $[-10; 5]$ — аддитивность, $[5; 10]$ — умеренная синергия, > 10 — синергия. Был выявлен аддитивный эффект комбинированного ингибирования mTOR и STING на все исследуемые параметры в двух клеточных линиях.

ОБСУЖДЕНИЕ

В нашем исследовании впервые проведена оценка влияния сочетанного дозозависимого ингибирования путей mTOR (Torin 1) и STING (H-151) на ключевые параметры аутофаголизосомной системы, ассоциированные с патогенезом БП, в первичной культуре макрофагов периферической крови неврологически здоровых доноров и клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y. Было показано, что комбинированное воздействие на данные сигнальные пути приводит к активации аутофаголизосомной системы, снижению уровней мономерной и нейротоксичной фосфорилированной (Ser129) форм альфа-синуклеина наряду со снижением уровня лизосфинголипидов, а также повышению зрелой формы m-CTSD — фермента, играющего ключевую роль в деградации альфа-синуклеина.

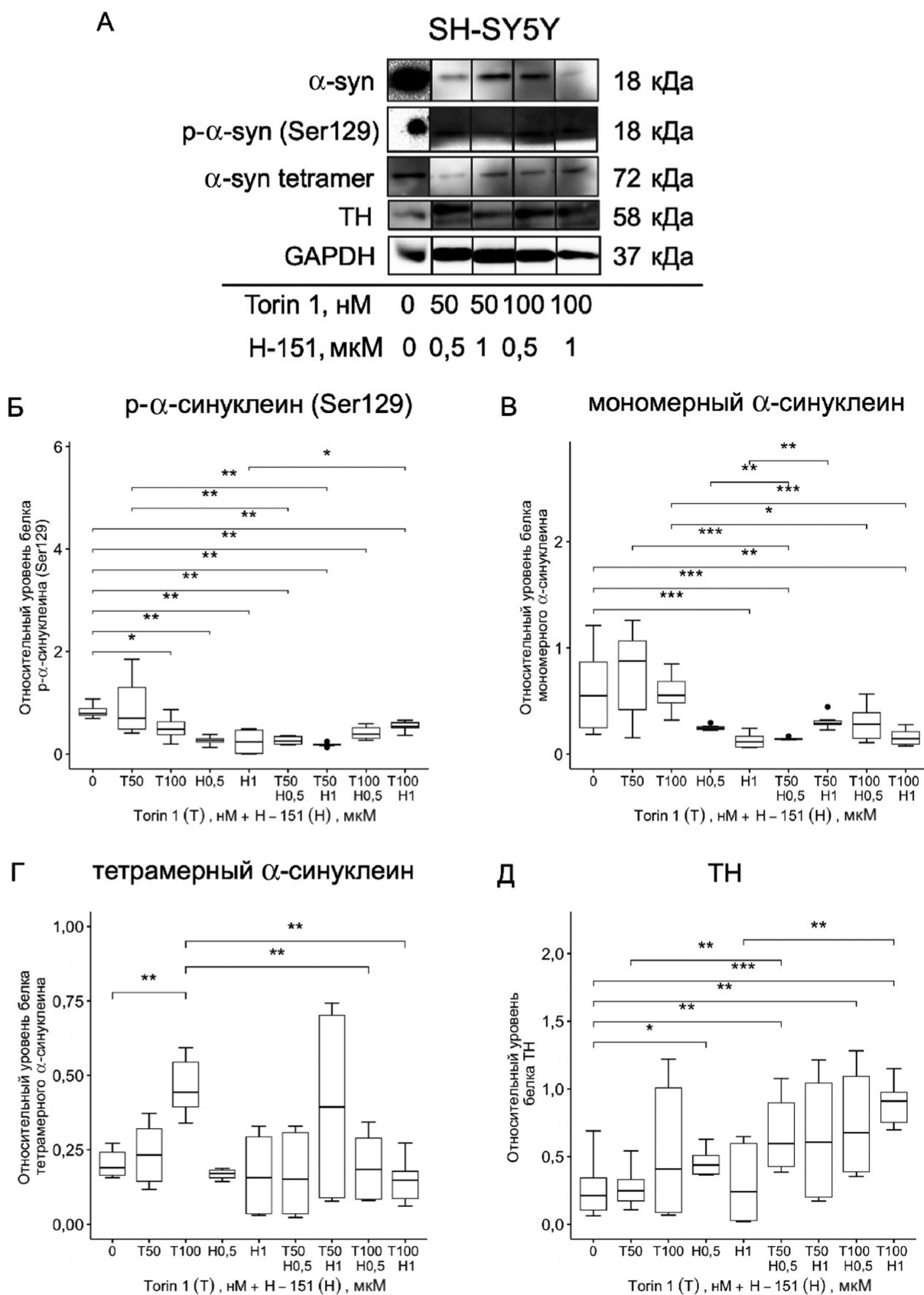


Рисунок 7. Оценка дозозависимого сочетанного влияния ингибирования протеинкиназы mTOR Torin 1 и белка STING H-151 в клетках линии SH-SY5Y (SH-SY5Y) на уровень различных форм альфа-синуклеина и TH. **А** – данные вестерн-блоттинга; **Б** – относительный уровень фосфорилированного альфа-синуклеина (Ser129); **В** – относительный уровень мономерного альфа-синуклеина; **Г** – относительный уровень тетрамерного альфа-синуклеина; **Д** – относительный уровень TH. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

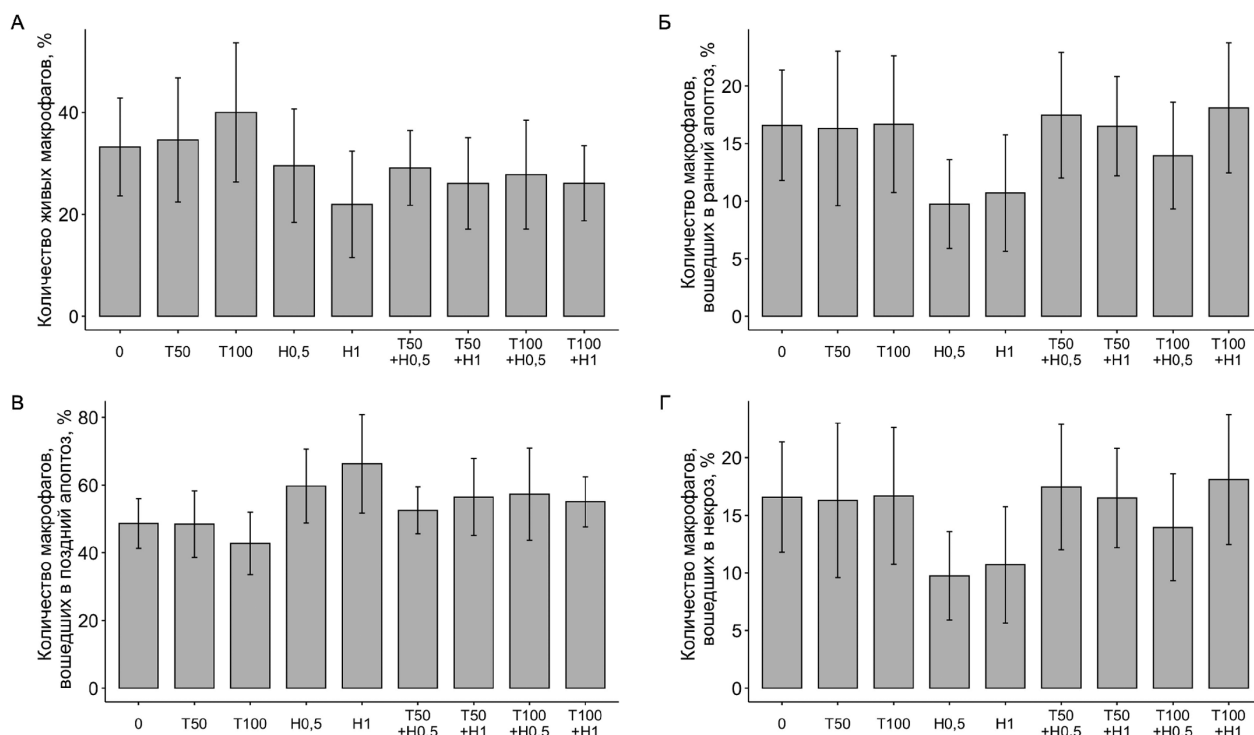


Рисунок 8. Оценка дозозависимого сочетанного влияния ингибирования протеинкиназы mTOR Torin 1 и белка STING H-151 в первичной культуре макрофагов периферической крови на степень апоптоза. **А** – количество живых клеток; **Б** – степень раннего апоптоза; **В** – степень позднего апоптоза; **Г** – степень некроза.

Несмотря на значительный прогресс в изучении патогенеза БП, молекулярные механизмы остаются неясными. Накопление патологических форм альфа-синуклеина считается ключевым событием при БП. Дефекты аутофагии и лизосомной деградации препятствуют его утилизации, и образующиеся агрегаты этого белка дополнительно нарушают работу митохондрий, приводя к нейровоспалению и дисфункции лизосом, формируя замкнутый круг. В этом контексте именно аутофагия и нейровоспаление рассматриваются как центральные процессы, способствующие гибели нейронов и прогрессированию БП [33–37].

Протеинкиназа mTOR, являясь одним из главных компонентов сигнального каскада PI3K/AKT/mTOR, отрицательно регулирует процесс аутофагии в клетке. Многочисленные работы на моделях БП и GBA1-БП показали, что ингибиторы mTOR усиливают аутофагический поток, стимулируют лизосомный биогеenez и снижают уровень патологических форм альфа-синуклеина [21, 32, 38–43]. Нарушение сигнального каскада PI3K/AKT/mTOR ранее было выявлено нами в ходе полнотранскриптомного анализа первичной культуры макрофагов периферической крови пациентов с GBA1-БП и тканей чёрной субстанции мышиной модели с 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин-индуцированным паркинсонизмом и кондурилол-бета-эпоксид-индуцированной дисфункцией GCase [20, 44]. Полученные нами данные также согласуются с результатами исследования посттрансляционного

протеома, проведённого на нейронах, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) пациентов с GBA1-БП; в ходе этого исследования было выявлено увеличение p-mTOR и других белков, ассоциированных с работой лизосом [22].

В настоящем исследовании применение Torin 1 в первичной культуре макрофагов периферической крови сопровождалось снижением уровней BECN1 и p62 при увеличении липидированной формы LC3B-II. Это отражает активацию аутофагии и подтверждает данные других исследований о влиянии Torin 1 на основные белки аутофагии LC3B и p62 в нейронах, дифференцированных из ИПСК пациентов с GBA1-БП и первичной культуре кортикальных астроцитов мыши [21, 33]. В клетках линии нейробластомы SH-SY5Y Torin 1 также увеличивал LC3B-II и приводил к снижению фосфорилированного альфа-синуклеина (Ser129) на фоне увеличения тетрамерной формы этого белка [32], однако влияние на BECN1 и p62 было менее выраженным.

STING, в свою очередь, является центральным медиатором врождённого иммунного ответа и одним из основных активаторов нейровоспаления [45]. Данный белок, взаимодействуя преимущественно с митохондриальной ДНК в цитоплазме клетки, изменяет свою конформацию и приобретает способность связываться с киназой TBK1, которая фосфорилирует и активирует факторы транскрипции интерферона I типа. Недавно проведённое

исследование показало, что STING-индуцированная аутофагия предшествует активации TBK1 и секреции интерферонов I типа, что позволяет рассматривать аутофагию как изначальную функцию STING в процессе эволюции [46]. Более того, активация STING может индуцировать липидирование LC3B независимо от ULK1, VPS34 и BECN1 (классических белков-активаторов образования LC3B-II). В настоящее время ингибиторы STING рассматриваются как перспективные терапевтические стратегии при заболеваниях, связанных с гиперактивацией врождённого иммунного ответа, включая аутоиммунные синдромы (например, SAVI-синдром (STING-ассоциированная васкулопатия с ранним началом), системную красную волчанку) [47, 48] и нейродегенеративных заболеваниях, где хроническая активация cGAS (Cyclic GMP-AMP synthase, синтаза циклического GMP-AMP) STING способствует развитию нейровоспаления и может усиливать патологию, связанную с альфа-синуклеином (включая БП) [49–51]. На модельных животных с дисфункцией GCase малые молекулы-ингибиторы STING, включая H-151, демонстрируют способность снижать активность STING, снижать нейровоспаление и нейродегенерацию нейронов коры головного мозга [52].

В настоящем исследовании фармакологическое ингибирование STING H-151 не влияло на уровень BECN1 и p62 в первичной культуре макрофагов периферической крови и клеточной линии SH-SY5Y, однако приводило к снижению LC3B-II в первичной культуре макрофагов периферической крови и тенденции к снижению в клетках линии SH-SY5Y. Эти данные позволяют предположить, что STING преимущественно контролирует стадию формирования аутофагосом, а не экспрессию регуляторных белков, что согласуется с предыдущими результатами о регуляции белка STING процессов аутофагии [53, 54]. Ранее было показано, что фармакологическое ингибирование STING или нокаут его гена снижает воспаление, уровень фосфорилированного альфа-синуклеина (Ser129) и выраженность нейродегенерации в моделях БП *in vivo* [49, 55]. Это также отражалось в нашем исследовании *in vitro*, а именно снижение мономерного и фосфорилированного (Ser129) альфа-синуклеина в клетках линии SH-SY5Y при воздействии ингибитора H-151.

Важно подчеркнуть, что между аутофагией и нейровоспалением существует функциональная взаимосвязь. Нарушение аутофагического потока приводит к накоплению повреждённых митохондрий и высвобождению митохондриальной ДНК, что активирует путь cGAS-STING и вторично запускает NLRP3-инфламасому [56]. Это сопровождается повышенной секрецией провоспалительных цитокинов, что было показано на клеточных и животных моделях БП и ассоциируется с двигательными и когнитивными нарушениями [57]. Более того, фактор некроза опухоли α (TNF- α), экспрессия которого усиливается при активации STING, способен подавлять аутофагический поток

в микроглии и нейронах через активацию mTOR, что сопровождается гиперэкспрессией лизосомных маркеров LAMP1 и LAMP2 [58]. Перекрестное взаимодействие STING- и mTOR-сигналинга реализуется также через транскрипционные факторы семейства MIT/TFE, регулирующие биогенез лизосом и аутофагию [59]. В нормальных условиях фосфорилирование MIT/TFE киназой mTOR удерживает их в цитоплазме, тогда как острая активация STING способствует их дефосфорилированию и транслокации в ядро, что приводит к экспрессии генов аутофаголизосомного пути и активации аутофагии [46, 59]. Однако при БП и других нейродегенеративных заболеваниях хроническая активация STING сопровождается устойчивой секрецией провоспалительных цитокинов, которые через активацию mTOR подавляют аутофагический поток и усугубляют лизосомную дисфункцию [60]. Таким образом, STING выполняет двойную роль. При остром ответе он может временно активировать аутофагию, но при длительной активации становится фактором её нарушения и поддержания хронического воспаления. Совокупность этих данных позволяет рассматривать mTOR и STING как ключевые узлы регуляции клеточного гомеостаза и перспективные терапевтические мишени при БП. Интересно подчеркнуть, что TBK1 может напрямую активировать mTOR [61], а ингибирование mTOR снижает уровень STING и выработку интерферонов I типа в мононуклеарных клетках периферической крови пациентов с системной красной волчанкой [62]. В нашем исследовании ингибирование H-151 снижало p-mTOR (Ser2448), а воздействие Torin 1 приводило к снижению p-TBK1 (Ser172) в первичной культуре макрофагов периферической крови, что дополнительно подчёркивает перекрёстное взаимодействие mTOR- и STING-сигнальных каскадов.

Таким образом, одновременная модуляция двух выше описываемых молекулярных путей может быть перспективной стратегией для терапии СБП и GBA1-БП, что подтверждается клиническими исследованиями NCT06612593 и NCT04127578. Недавно начавшееся клиническое исследование по репозиционированию препарата цилостазола для пациентов с перемежающейся хромотой для терапии БП (NCT06612593) подтверждает перспективность стратегии использования мультиплексной терапии. Было показано, что цилостазол способен ингибировать активацию сигнального пути STING, препятствуя его транслокации из эндоплазматического ретикула в аппарат Гольджи, что сопоставимо по эффективности с действием селективного ингибитора H-151 STING [63]. В отношении регуляции пути mTOR показано, что цилостазол активирует каскад SIRT1 \rightarrow LKB1 \rightarrow AMPK, что приводит к ингибированию mTOR, восстановлению аутофагического потока и деградации патологических белков [64]. В другом клиническом исследовании (NCT04127578) терапии пациентов с GBA1-БП предлагается использовать комбинацию аденоассоциированного вируса, несущего нормальную копию гена *GBA1*, с метилпреднизолоном —

кортикостероидом, предотвращающим высвобождение в организме веществ, вызывающих воспаление, и сиролimusом (рапамицином) — каноническим ингибитором киназы mTOR.

В нашем исследовании мы оценили влияние одновременного ингибирования работы STING и активности mTOR малыми молекулами на параметры аутофаголизосомной системы и уровень различных форм белка альфа-синуклеина на первичной культуре макрофагов периферической крови человека и клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y. Одновременное применение Torin 1 и H-151 приводило к активации ранних этапов аутофагии в обеих культурах — как в первичной культуре макрофагов периферической крови, так и в клеточной линии SH-SY5Y. Этот эффект проявлялся в увеличении BECN1 и накоплении p62 при снижении LC3B-II как по сравнению с необработанными культурами клеток, так и с единичным воздействием ингибиторов, что указывает на возможное замедление стадии созревания аутофагосом. Результаты согласуются с ранее опубликованными данными о том, что ингибирование mTOR активирует иницирующие этапы аутофагии, тогда как ингибирование пути STING может влиять на созревание и деградацию аутофагосом. Эффект комбинации Torin 1 и H-151 определяется как типом клеток, так и исходным состоянием аутофагической системы, что подчёркивает важность учёта клеточного контекста при интерпретации результатов и разработке терапевтических стратегий, нацеленных на модуляцию аутофагии.

В данном исследовании нами было оценено влияние ингибирования mTOR (Torin 1) и STING (H-151), а также их сочетанного воздействия, на активность лизосомных гидролаз (GALC, GCase, ASMase, GLA) и уровни их субстратов (HexSph, LysoSM, LysoGb3). Повышение уровня данных лизосфинголипидов наблюдается при лизосомных болезнях накопления (ЛБН; болезнь Краббе, болезнь Гоше, болезнь Ниманна-Пика тип А/В, болезнь Фабри). Нарушения mTOR- и STING-сигналинга были продемонстрированы не только при БП, но и ЛБН, где также наблюдалась гиперактивация mTOR-субстратов (p-RPS6) и STING-ассоциированных белков (p-TBK1) [21, 38, 65], а также нарушение лизосомной деградации, хронической активацией воспаления и нейродегенерации [66–69].

В первичной культуре макрофагов периферической крови комбинированное ингибирование восстанавливало лизосомную функцию и нормализовало липидный обмен, что проявлялось в снижении концентрации HexSph, тенденцией к уменьшению LysoGb3 по сравнению с монотерапией и без воздействия веществ, подтверждая синергический эффект mTOR и STING в регуляции метаболизма сфинголипидов. Учитывая, что накопление липидов и изменение липидного состава мембран могут индуцировать конформационные перестройки белка альфа-синуклеина, способствуя его липид-индуцированной олигомеризации и амилоидогенезу, восстановление лизосомной функции

может ограничивать данные патологические процессы, ассоциированные с патогенезом БП. Полученные результаты согласуются с данными о роли mTOR в регуляции лизосомной функции [70]. Также они подтверждают влияние STING не только на воспалительные процессы и аутофагию, но и на обмен липидов [71–73]. Важно отметить и обратное влияние: на первичной культуре глиальных клеток мыши с дисфункцией GCase и накоплением лизосфинголипидов была показана активация пути STING [52]. Учитывая роль липидов в инициации агрегации альфа-синуклеина [74–78], их снижение может служить важным нейропротективным механизмом.

Особое значение в нашем исследовании имеет выявленное увеличение зрелой формы m-CTSD при комбинированном ингибировании mTOR и STING по сравнению с единичным воздействием ингибиторов и без добавления веществ. CTSD был выбран в качестве маркера активности лизосом, поскольку этот фермент широко представлен в головном мозге и играет ключевую роль в поддержании лизосомно-зависимого белкового гомеостаза, включая деградацию патологических форм альфа-синуклеина [79, 80]. В моделях БП его гаплонедостаточность приводит к лизосомной дисфункции и межклеточной передаче агрегатов альфа-синуклеина [81]. Наши данные показывают, что повышение уровня зрелого m-CTSD в первичной культуре макрофагов периферической крови и клеточной линии SH-SY5Y при комбинированном применении ингибиторов mTOR и H-151 можно рассматривать как положительный маркер восстановления лизосомной функции. При этом в нейробластоме наблюдалось снижение уровня как мономерного, так и фосфорилированного по серину 129 альфа-синуклеина, что указывает на эффективность комбинированного ингибирования mTOR и H-151 в снижении патогенных форм белка.

Интересно, что комбинированное ингибирование не оказывало проапоптотического действия в первичной культуре макрофагов периферической крови, что указывает на относительную безопасность такой стратегии [82–85].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В исследовании показано, что одновременное применение ингибиторов mTOR (Torin 1) и STING (H-151) влияет на аутофагию и связанные с ней процессы. В нейроноподобных клетках SH-SY5Y комбинированное воздействие приводило к активации ранних этапов нативной аутофагии, проявлявшейся в повышении уровней BECN1 и p62 при снижении LC3B-II, что может указывать на инициацию аутофагического процесса при возможном замедлении стадии созревания аутофагосом. Одновременно наблюдалось усиление лизосомной деградации, подтверждённое увеличением зрелой формы m-CTSD. В первичной культуре макрофагов периферической крови сочетанное применение Torin 1 и H-151 также сопровождалось снижением LC3B-II при отсутствии

значимых изменений уровней BECN1 и p62, что может отражать активацию ранних этапов аутофагии и нормализацию аутофагического потока. Кроме того, комбинированное ингибирование оказывало нормализующее влияние на липидный обмен, что также подтверждалось увеличением зрелой формы m-CTSD и снижением сфинголипида HexSph, и не сопровождалось активацией апоптоза, что свидетельствует о сохранении клеточной жизнеспособности при одновременном воздействии Torin 1 и H-151. Полученные результаты подчёркивают различия в клеточном ответе при воздействии одинаковыми малыми молекулами, что согласуется с ранее опубликованными данными, полученными при моделировании БП на различных клеточных моделях *in vitro*, включая нейроноподобные линии клеток (SH-SY5Y, LUHMES), первичные нейроны, глиальные клетки и микроглию [86–88].

Таким образом, результаты показывают, что одновременное таргетирование mTOR- и STING-сигнальных путей оказывает действие сразу на несколько звеньев патологического каскада, включая аутофагию, метаболизм сфинголипидов и снижение уровня мономерного альфа-синуклеина и его потенциально нейротоксичных фосфорилированных по остатку Ser129 форм. Эти данные подтверждают потенциал такого подхода для коррекции нарушений, характерных для нейродегенеративных заболеваний, в частности БП. Для дальнейшего развития данного направления необходимы дополнительные исследования с применением пациент-специфичных клеточных моделей *in vitro* и модельных животных для оценки эффективности и безопасности комбинированного ингибирования при патологии и на организменном уровне.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность всем добровольцам и участникам исследования за их ценное участие и помощь. Исследование проведено с использованием оборудования центра коллективного пользования «Метаболом» ФГБНУ МГНЦ (Москва, Россия).

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 24-25-00212).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Образцы периферической крови для настоящего исследования были получены в соответствии с принципами Хельсинкской декларации и действующими этическими стандартами. Все добровольцы подписали письменное информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено Этическим комитетом Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова Минздрава России (протокол № 275, от 04.09.2023).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Дополнительные материалы доступны в электронной версии статьи на сайте журнала (pbmc.ibmc.msk.ru).

ЛИТЕРАТУРА

1. Funayama M., Nishioka K., Li Y., Hattori N. (2023) Molecular genetics of Parkinson's disease: contributions and global trends. *J. Hum. Genet.*, **68**(3), 125–130. DOI: 10.1038/s10038-022-01058-5
2. Schneider S.A., Alcalay R.N. (2020) Precision medicine in Parkinson's disease: emerging treatments for genetic Parkinson's disease. *J. Neurol.*, **267**(3), 860–869. DOI: 10.1007/s00415-020-09705-7
3. Schneider S.A., Alcalay R.N. (2017) Neuropathology of genetic synucleinopathies with parkinsonism: review of the literature. *Mov. Disord.*, **32**(11), 1504–1523. DOI: 10.1002/mds.27193
4. Dorsey E.R., Bloem B.R. (2018) The Parkinson pandemic — a call to action. *JAMA Neurol.*, **75**(1), 9–10. DOI: 10.1001/jamaneurol.2017.3299
5. Calabresi P., Mechelli A., Natale G., Volpicelli-Daley L., di Lazzaro G., Ghiglieri V. (2023) Alpha-synuclein in Parkinson's disease and other synucleinopathies: from overt neurodegeneration back to early synaptic dysfunction. *Cell Death Dis.*, **14**(3), 176. DOI: 10.1038/s41419-023-05672-9
6. Lu J., Wu M., Yue Z. (2020) Autophagy and Parkinson's disease. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1207**, 21–51. DOI: 10.1007/978-981-15-4272-5_2
7. Tansey M.G., Wallings R.L., Houser M.C., Herrick M.K., Keating C.E., Joers V. (2022) Inflammation and immune dysfunction in Parkinson disease. *Nat. Rev. Immunol.*, **22**(11), 657–673. DOI: 10.1038/s41577-022-00684-6
8. Pajares M., Rojo A.I., Manda G., Bosca L., Cuadrado A. (2020) Inflammation in Parkinson's disease: mechanisms and therapeutic implications. *Cells*, **9**(7), 1687. DOI: 10.3390/cells9071687
9. Bezrukova A.I., Basharova K.S., Emelyanov A.K., Rybakov A.V., Miliukhina I.V., Pchelina S.N., Usenko T.S. (2025) Autophagy process in Parkinson's disease depends on mutations in the *GBA1* and *LRRK2* genes. *Biochem. Genet.*, DOI: 10.1007/s10528-025-11125-z
10. Minchev D., Kazakova M., Sarafian V. (2022) Neuroinflammation and autophagy in Parkinson's disease — novel perspectives. *Int. J. Mol. Sci.*, **23**(23), 14997. DOI: 10.3390/ijms232314997
11. Zhang W., Xiao D., Mao Q., Xia H. (2023) Role of neuroinflammation in neurodegeneration development. *Signal Transduct. Target. Ther.*, **8**, 267. DOI: 10.1038/s41392-023-01486-5
12. Moors T., Paciotti S., Chiasserini D., Calabresi P., Parnetti L., Beccari T., van de Berg W.D.J. (2016) Lysosomal dysfunction and α -synuclein aggregation in Parkinson's disease: diagnostic links. *Mov. Disord.*, **31**(6), 791–801. DOI: 10.1002/mds.26562
13. Путьшев А.Б., Тендитник М.В., Овсякова М.В., Акоюн А.А., Дубровина Н.И., Тихонова М.А. (2021) Восстановление паркинсоноподобных нарушений путём активации аутофагии через mTOR-зависимый и mTOR-независимый механизмы в рамках фармакологической и трансгенной

- моделей болезни Паркинсона у мышей. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, **171**(4), 429–435. DOI: 10.47056/0365-9615-2021-171-4-429-435 [Pupyshv A.B., Tenditnik M.V., Ovsyukova M.V., Akopyan A.A., Dubrovina N.I., Tikhonova M.A. (2021) Restoration of Parkinson's disease-like deficits by activating autophagy through mTOR-dependent and mTOR-independent mechanisms in pharmacological and transgenic models of Parkinson's disease in mice. Bull. Exp. Biol. Med., **171**(4), 425–430. DOI: 10.1007/s10517-021-05242-z]
14. Khan M.R., Yin X., Kang S.-U., Mitra J., Wang H., Ryu T., Brahmachari S., Karuppagounder S.S., Kimura Y., Jhaldiyal A., Kim H.H., Gu H., Chen R., Redding-Ochoa J., Troncoso J., Na C.H., Ha T., Dawson V.L., Dawson T.M. (2024) Enhanced mTORC1 signaling and protein synthesis in pathologic α -synuclein cellular and animal models of Parkinson's disease. Sci. Transl. Med., **15**(724), eadd0499. DOI: 10.1126/scitranslmed.add0499
 15. Xu J., Ao Y.-L., Huang C., Song X., Zhang G., Cui W., Wang Y., Zhang X.-Q., Zhang Z. (2022) Harmol promotes α -synuclein degradation and improves motor impairment in Parkinson's models via regulating autophagy-lysosome pathway. NPJ Parkinsons Dis., **8**, 100. DOI: 10.1038/s41531-022-00361-4
 16. Ge Y., Huang M., Yao Y.-M. (2018) Autophagy and proinflammatory cytokines: interactions and clinical implications. Cytokine Growth Factor Rev., **43**, 38–46. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2018.07.001
 17. Usenko T.S., Nikolaev M.A., Miliukhina I.V., Bezrukova A.I., Senkevich K.A., Gomzyakova N.A., Beltceva Y.A., Zalutskaya N.M., Gracheva E.V., Timofeeva A.A., Petrova O.A., Semenov A.V., Lubimova N.E., Totolyan A.A., Pchelina S.N. (2020) Plasma cytokine profile in synucleinopathies with dementia. J. Clin. Neurosci., **78**, 323–326. DOI: 10.1016/j.jocn.2020.04.058
 18. Милухина И.В., Усенко Т.С., Сенкевич К.А., Николаев М.А., Тимофеева А.А., Агапова Е.А., Семенов А.В., Любимова Н.Е., Тотолян А.А., Пчелина С.Н. (2019) Цитокиновый профиль плазмы крови пациентов болезнью Паркинсона, ассоциированной с мутациями в гене *GBA*. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, **168**(10), 404–407. [Miliukhina I.V., Usenko T.S., Senkevich K.A., Nikolaev M.A., Timofeeva A.A., Agapova E.A., Semenov A.V., Lubimova N.E., Totolyan A.A., Pchelina S.N. (2020) Plasma cytokines profile in patients with Parkinson's disease associated with mutations in *GBA* gene. Bull. Exp. Biol. Med., **168**(4), 423–426.] DOI: 10.1007/s10517-020-04723-x
 19. Bu X.-L., Wang X., Xiang Y., Shen L.-L., Wang Q.-H., Liu Y.-H., Jiao S.-S., Wang Y.-R., Cao H.-Y., Yi X., Liu C.-H., Deng B., Yao X.-Q., Xu Z.-Q., Zhou H.-D., Wang Y.-J. (2015) The association between infectious burden and Parkinson's disease: a case-control study. Parkinsonism Relat. Disord., **21**(8), 877–881. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2015.05.015
 20. Usenko T., Bezrukova A., Basharova K., Panteleeva A., Nikolaev M., Kopytova A., Miliukhina I., Emelyanov A., Zakharova E., Pchelina S. (2021) Comparative transcriptome analysis in monocyte-derived macrophages of asymptomatic *GBA* mutation carriers and patients with *GBA*-associated Parkinson's disease. Genes, **12**(10), 1545. DOI: 10.3390/genes12101545
 21. Mubariz F., Saadin A., Lingenfelter N., Sarkar C., Banerjee A., Lipinski M.M., Awad O. (2023) Dereglulation of mTORC1-TFEB axis in human iPSC model of *GBA1*-associated Parkinson's disease. Front. Neurosci., **17**, 1152503. DOI: 10.3389/fnins.2023.1152503
 22. Bogetofte H., Ryan B.J., Jensen P., Schmidt S.I., Vergoossen D.L.E., Barnkob M.B., Kiani L.N., Chughtai U., Heon-Roberts R., Caiazza M.C., McGuinness W., Márquez-Gómez R., Vowles J., Bunn F.S., Brandes J., Kilfeather P., Connor J.P., Fernandes H.J.R., Caffrey T.M., Meyer M., Cowley S.A., Larsen M.R., Wade-Martins R. (2023) Post-translational proteomics platform identifies neurite outgrowth impairments in Parkinson's disease GBA-N370S dopamine neurons. Cell Rep., **42**(3), 112180. DOI: 10.1016/j.celrep.2023.112180
 23. Chen S., Saeed A.F.U.H., Liu Q., Jiang Q., Xu H., Xiao G.G., Rao L., Duo Y. (2023) Macrophages in immunoregulation and therapeutics. Signal Transduct. Target. Ther., **8**, 207. DOI: 10.1038/s41392-023-01452-1
 24. Xicoy H., Wieringa B., Martens G.J.M. (2017) The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. Mol. Neurodegener., **12**, 10. DOI: 10.1186/s13024-017-0149-0
 25. Kopytova A.E., Rychkov G.N., Nikolaev M.A., Baydakova G.V., Cheblokov A.A., Senkevich K.A., Bogdanova D.A., Bolshakova O.I., Miliukhina I.V., Bezrukikh V.A., Salogub G.N., Sarantseva S.V., Usenko T.C., Zakharova E.Y., Emelyanov A.K., Pchelina S.N. (2021) Ambroxol increases glucocerebrosidase (GCase) activity and restores GCase translocation in primary patient-derived macrophages in Gaucher disease and parkinsonism. Parkinsonism Relat. Disord., **84**, 112–121. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2021.02.003
 26. Усенко Т.С., Башарова К.С., Безрукова А.И., Николаев М.А., Милухина И.В., Байдакова Г.В., Захарова Е.Ю., Пчелина С.Н. (2022) Селективное ингибирование киназной активности LRRK2 как подход к терапии болезни Паркинсона. Медицинская генетика, **21**(12), 26–29. [Usenko T.S., Basharova K.S., Bezrukova A.I., Nikolaev M.A., Miliukhina I.V., Baydakova G.V., Zakharova E.Y., Pchelina S.N. (2022) Selective inhibition of LRRK2 activity as an approach to the treatment of Parkinson's disease. Medical Genetics, **21**(12), 26–29.] DOI: 10.25557/2073-7998.2022.12.26-29
 27. Kopytova A.E., Rychkov G.N., Cheblokov A.A., Grigor'eva E.V., Nikolaev M.A., Yarkova E.S., Sorogina D.A., Ibatullin F.M., Baydakova G.V., Izyumchenko A.D., Bogdanova D.A., Boitsov V.M., Rybakov A.V., Miliukhina I.V., Bezrukikh V.A., Salogub G.N., Zakharova E.Y., Pchelina S.N., Emelyanov A.K. (2023) Potential binding sites of pharmacological chaperone NCGC00241607 on mutant β -glucocerebrosidase and its efficacy on patient-derived cell cultures in Gaucher and Parkinsons disease. Int. J. Mol. Sci., **24**(10), 9105. DOI: 10.3390/ijms24109105
 28. Martínez M.-A., Rodríguez J.-L., Lopez-Torres B., Martínez M., Martínez-Larrañaga M.-R., Maximiliano J.-E., Anadón A., Ares I. (2020) Use of human neuroblastoma SH-SY5Y cells to evaluate glyphosate-induced effects on oxidative stress, neuronal development and cell death signaling pathways. Environ. Int., **135**, 105414. DOI: 10.1016/j.envint.2019.105414
 29. Usenko T.S., Timofeeva A., Beletskaya M., Basharova K., Baydakova G., Bezrukova A., Grunina M., Emelyanov A., Miliukhina I., Zakharova E., Pchelina S. (2024) The effect of p.G2019S mutation in the *LRRK2* gene on the activity of lysosomal hydrolases and the clinical features of Parkinson's disease associated with p.N370S mutation in the *GBA1* gene. J. Integr. Neurosci., **23**(1), 16. DOI: 10.31083/j.jin2301016
 30. Usenko T.S., Senkevich K.A., Basharova K.S., Bezrukova A.I., Baydakova G.V., Tyurin A.A., Beletskaya M.V., Kulabukhova D.G., Grunina M.N., Emelyanov A.K., Miliukhina I.V., Timofeeva A.A., Zakharova E.Y., Pchelina S.N. (2023) LRRK2 exonic variants are associated with lysosomal

- hydrolase activities and lysosphingolipid alterations in Parkinson's disease. *Gene*, **882**, 147639. DOI: 10.1016/j.gene.2023.147639
31. *R Core Team* (2025) R: a language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
 32. Безрукова А.И., Башарова К.С., Байдакова Г.В., Захарова Е.Ю., Пчелина С.Н., Усенко Т.С. (2024) Влияние дозозависимого ингибирования протеинкиназы mTOR на уровень белков аутофаголизосомной системы и альфа-синуклеина в первичной культуре макрофагов периферической крови человека и клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y — оценка перспектив терапии болезни Паркинсона. *Биохимия*, **89**(7), 1248–1262. DOI: 10.31857/S0320972524070085 [Bezrukova A.I., Basharova K.S., Baydakova G.V., Zakharova E.Y., Pchelina S.N., Usenko T.S. (2024) Dose-dependent alterations of lysosomal activity and alpha-synuclein in peripheral blood monocyte-derived macrophages and SH-SY5Y neuroblastoma cell line by upon inhibition of mTOR protein kinase — assessment of the prospects of Parkinson's disease therapy. *Biochemistry (Moscow)*, **89**(7), 1300–1312. DOI: 10.1134/S0006297924070113]
 33. Kulkarni A., Dong A., Kulkarni V.V., Chen J., Laxton O., Anand A., Maday S. (2020) Differential regulation of autophagy during metabolic stress in astrocytes and neurons. *Autophagy* **16**(9), 1651–1667. DOI: 10.1080/15548627.2019.1703354
 34. Arotcarena M.-L., Teil M., Dehay B. (2019) Autophagy in synucleinopathy: the overwhelmed and defective machinery. *Cells*, **8**(6), 565. DOI: 10.3390/cells8060565
 35. Lin K.-J., Lin K.-L., Chen S.-D., Liou C.-W., Chuang Y.-C., Lin H.-Y., Lin T.-K. (2019) The overcrowded crossroads: mitochondria, alpha-synuclein, and the endo-lysosomal system interaction in Parkinson's disease. *Int. J. Mol. Sci.*, **20**(21), 5312. DOI: 10.3390/ijms20215312
 36. Долгачева Л.П., Федотова Е.И., Абрамов А.Ю., Бережнов А.В. (2017) Альфа-синуклеин и дисфункция митохондрий при болезни Паркинсона. *Биологические мембраны*, **34**(5), 4–14. DOI: 10.7868/S0233475517050012 [Dolgacheva L.P., Fedotova E.I., Abramov A.Y., Berezhnov A.V. (2018) Alpha-synuclein and mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochemistry (Moscow) Suppl. Ser. A Membr. Cell. Biol.*, **12**, 10–19. DOI: 10.1134/S1990747818010038]
 37. Sepilveda D., Cisternas-Olmedo M., Arcos J., Nassif M., Vidal R.L. (2022) Contribution of autophagy-lysosomal pathway in the exosomal secretion of alpha-synuclein and its impact in the progression of Parkinson's disease. *Front. Mol. Neurosci.*, **15**, 805087. DOI: 10.3389/fnmol.2022.805087
 38. Brown R.A., Voit A., Srikanth M.P., Thayer J.A., Kingsbury T.J., Jacobson M.A., Lipinski M.M., Feldman R.A., Awad O. (2019) mTOR hyperactivity mediates lysosomal dysfunction in Gaucher's disease iPSC-neuronal cells. *Dis. Model. Mech.*, **12**(10), dmm038596. DOI: 10.1242/dmm.038596
 39. Zhuang X.-X., Wang S.-F., Tan Y., Song J.-X., Zhu Z., Wang Z.-Y., Wu M.-Y., Cai C.-Z., Huang Z.-J., Tan J.-Q., Su H.-X., Li M., Lu J.-H. (2020) Pharmacological enhancement of TFEB-mediated autophagy alleviated neuronal death in oxidative stress-induced Parkinson's disease models. *Cell Death Dis.*, **11**(2), 128. DOI: 10.1038/s41419-020-2322-6
 40. Jiang T.-F., Zhang Y.-J., Zhou H.-Y., Wang H.-M., Tian L.-P., Liu J., Ding J.-Q., Chen S.-D. (2013) Curcumin ameliorates the neurodegenerative pathology in A53T α -synuclein cell model of Parkinson's disease through the downregulation of mTOR/p70S6K signaling and the recovery of macroautophagy. *J. Neuroimmune Pharmacol.*, **8**(1), 356–369. DOI: 10.1007/s11481-012-9431-7
 41. Bové J., Martínez-Vicente M., Vila M. (2011) Fighting neurodegeneration with rapamycin: mechanistic insights. *Nat. Rev. Neurosci.*, **12**(8), 437–452. DOI: 10.1038/nrn3068
 42. Malagelada C., Jin Z.H., Jackson-Lewis V., Przedborski S., Greene L.A. (2010) Rapamycin protects against neuron death in *in vitro* and *in vivo* models of Parkinson's disease. *J. Neurosci.*, **30**(3), 1166–1175. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3944-09.2010
 43. Dehay B., Bové J., Rodríguez-Muela N., Perier C., Recasens A., Boya P., Vila M. (2010) Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson's disease. *J. Neurosci.*, **30**(37), 12535–12544. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1920-10.2010
 44. Usenko T., Bezrukova A., Rudenok M.M., Basharova K., Shadrina M.I., Slominsky P.A., Zakharova E., Pchelina S. (2023) Whole transcriptome analysis of substantia nigra in mice with MPTP-induced parkinsonism bearing defective glucocerebrosidase activity. *Int. J. Mol. Sci.*, **24**(15), 12164. DOI: 10.3390/ijms241512164
 45. Hussain B., Xie Y., Jabeen U., Lu D., Yang B., Wu C., Shang G. (2022) Activation of STING based on its structural features. *Front. Immunol.*, **13**, 808607. DOI: 10.3389/fimmu.2022.808607
 46. Gui X., Yang H., Li T., Tan X., Shi P., Li M., Du F., Chen Z.J. (2019) Autophagy induction via STING trafficking is a primordial function of the cGAS pathway. *Nature*, **567**(7747), 262–266. DOI: 10.1038/s41586-019-1006-9
 47. Wang Y., Wang F., Zhang X. (2021) STING-associated vasculopathy with onset in infancy: a familial case series report and literature review. *Ann. Transl. Med.*, **9**(2), 176. DOI: 10.21037/atm-20-6198
 48. Hagiwara A.M., Moore R.E., Wallace D.J., Ishimori M., Jefferies C.A. (2021) Regulation of cGAS-STING pathway — implications for systemic lupus erythematosus. *Rheumatol. Immunol. Res.*, **2**(3), 173–184. DOI: 10.2478/rir-2021-0023
 49. Hinkle J.T., Patel J., Panicker N., Karuppagounder S.S., Biswas D., Belington B., Chen R., Brahmachari S., Pletnikova O., Troncoso J.C., Dawson V.L., Dawson T.M. (2022) STING mediates neurodegeneration and neuroinflammation in nigrostriatal α -synucleinopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **119**(15), e2118819119. DOI: 10.1073/pnas.2118819119
 50. Standaert D.G., Childers G.M. (2022) Alpha-synuclein-mediated DNA damage, STING activation, and neuroinflammation in Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **119**(17), e2204058119. DOI: 10.1073/pnas.2204058119
 51. Huang Y., Liu B., Sinha S.C., Amin S., Gan L. (2023) Mechanism and therapeutic potential of targeting cGAS-STING signaling in neurological disorders. *Mol. Neurodegener.*, **18**, 79. DOI: 10.1186/s13024-023-00672-x
 52. Wang R., Sun H., Cao Y., Zhang Z., Chen Y., Wang X., Liu L., Wu J., Xu H., Wu D., Mu C., Hao Z., Qin S., Ren H., Han J., Fang M., Wang G. (2024) Glucosylceramide accumulation in microglia triggers STING-dependent neuroinflammation and neurodegeneration in mice. *Sci. Signal.*, **17**(829), eadk8249. DOI: 10.1126/scisignal.adk8249
 53. Schmid M., Fischer P., Engl M., Widder J., Kerschbaum-Gruber S., Slade D. (2024) The interplay between autophagy and cGAS-STING signaling and its implications for cancer. *Front. Immunol.*, **15**, 1356369. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1356369.

54. Zhang Z., Zhou H., Ouyang X., Dong Y., Sarapultsev A., Luo S., Hu D. (2022) Multifaceted functions of STING in human health and disease: from molecular mechanism to targeted strategy. *Signal. Transduct. Target. Ther.*, **7**, 394. DOI: 10.1038/s41392-022-01252-z
55. Wang B., Wang Y., Qiu J., Gao S., Yu S., Sun D., Lou H. (2023) The STING inhibitor C-176 attenuates MPTP-induced neuroinflammation and neurodegeneration in mouse parkinsonian models. *Int. Immunopharmacol.*, **124**(Pt A), 110827. DOI: 10.1016/j.intimp.2023.110827
56. Hu X., Zhang H., Zhang Q., Yao X., Ni W., Zhou K. (2022) Emerging role of STING signalling in CNS injury: inflammation, autophagy, necroptosis, ferroptosis and pyroptosis. *J. Neuroinflammation*, **19**, 242. DOI: 10.1186/s12974-022-02602-y
57. Cheng J., Liao Y., Dong Y., Hu H., Yang N., Kong X., Li S., Li X., Guo J., Qin L., Yu J., Ma C., Li J., Li M., Tang B., Yuan Z. (2020) Microglial autophagy defect causes Parkinson disease-like symptoms by accelerating inflammasome activation in mice. *Autophagy*, **16**(12), 2193–2205. DOI: 10.1080/15548627.2020.1719723
58. Jin M.M., Wang F., Qi D., Liu W.W., Gu C., Mao C.J., Yang Y.P., Zhao Z., Hu L.F., Liu C.F. (2018) A critical role of autophagy in regulating microglia polarization in neurodegeneration. *Front. Aging Neurosci.*, **10**, 378. DOI: 10.3389/fnagi.2018.00378
59. Huang T., Sun C., Du F., Chen Z.J. (2025) STING-induced noncanonical autophagy regulates endolysosomal homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **122**(8), e2415422122. DOI: 10.1073/pnas.2415422122
60. Dhapola R., Paidlewar M., Kumari S., Sharma P., Vellingiri B., Medhi B., HariKrishnaReddy D. (2025) cGAS-STING and neurodegenerative diseases: a molecular crosstalk and therapeutic perspective. *Int. Immunopharmacol.*, **159**, 114902. DOI: 10.1016/j.intimp.2025.114902
61. Bodur C., Kazyken D., Huang K., Ekim Ustunel B., Siroky K.A., Tooley A.S., Gonzalez I.E., Foley D.H., Acosta-Jaquez H.A., Barnes T.M., Steinhilber G.K., Cho K.-W., Lumeng C.N., Riddle S.M., Myers M.G. Jr, Fingar D.C. (2018) The IKK-related kinase TBK1 activates mTORC1 directly in response to growth factors and innate immune agonists. *EMBO J.*, **37**(1), 19–38. DOI: 10.15252/embj.201696164
62. Murayama G., Chiba A., Kuga T., Makiyama A., Yamaji K., Tamura N., Miyake S. (2020) Inhibition of mTOR suppresses IFN α production and the STING pathway in monocytes from systemic lupus erythematosus patients. *Rheumatology*, **59**(10), 2992–3002. DOI: 10.1093/rheumatology/keaa060
63. Zheng Z.-H., Wang J.-J., Lin J.-G., Ye W.-L., Zou J.-M., Liang L.-Y., Yang P.-L., Qiu W.-L., Li Y.-Y., Yang S.-J., Zhao M., Zhou Q., Li C.-Z., Li M., Li Z.-M., Zhang D.-M., Liu P.-Q., Liu Z.-P. (2024) Cytosolic DNA initiates a vicious circle of aging-related endothelial inflammation and mitochondrial dysfunction via STING: the inhibitory effect of Cilostazol. *Acta Pharmacol. Sin.*, **45**, 1879–1897. DOI: 10.1038/s41401-024-01281-0
64. El-Marasy S.A., Abo El-Nasr N.M.E., ElMosbah D.E., Elbaset M. (2025) Cilostazol ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity via modulation of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway and autophagy in rats. *Toxicol. Mech. Methods*, **35**(9), 1496–1509. DOI: 10.1080/15376516.2025.2545577
65. Tang Z., Xing C., Araszkievicz A., Yang K., Huai W., Jeltema D., Dobbs N., Zhang Y., Sun L.O., Yan N. (2025) STING mediates lysosomal quality control and recovery through its proton channel function and TFEB activation in lysosomal storage disorders. *Mol. Cell.*, **85**(8), 1624–1639.e5. DOI: 10.1016/j.molcel.2025.03.008
66. Borsche M., König I.R., Delcambre S., Petrucci S., Balck A., Brüggemann N., Zimprich A., Wasner K., Pereira S.L., Avenali M., Deuschle C., Badanjak K., Ghelfi J., Gasser T., Kasten M., Rosenstiel P., Lohmann K., Brockmann K., Valente E.M., Youle R.J., Grünewald A., Klein C. (2020) Mitochondrial damage-associated inflammation highlights biomarkers in PRKN/PINK1 parkinsonism. *Brain*, **143**(10), 3041–3051. DOI: 10.1093/brain/awaa246
67. Frosch M., Prinz M. (2024) Novel pathomechanistic insights into lysosomal storage disorders: how neuron-intrinsic cGAS-STING signaling drives disease progression. *Signal Transduct. Target Ther.*, **9**, 203. DOI: 10.1038/s41392-024-01901-5
68. Hancock-Cerutti W., Wu Z., Xu P., Yadavalli N., Leonzino M., Tharkeshwar A.K., Ferguson S.M., Shadel G.S., de Camilli P. (2022) ER-lysosome lipid transfer protein VPS13C/PARK23 prevents aberrant mtDNA-dependent STING signaling. *J. Cell Biol.*, **221**(7), e202106046. DOI: 10.1083/jcb.202106046
69. Chu T.-T., Tu X., Yang K., Wu J., Repa J.J., Yan N. (2021) Tonic prime-boost of STING signalling mediates Niemann-Pick disease type C. *Nature*, **596**(7873), 570–575. DOI: 10.1038/s41586-021-03762-2
70. Martini-Stoica H., Xu Y., Ballabio A., Zheng H. (2016) The autophagy-lysosomal pathway in neurodegeneration: a TFEB perspective. *Trends. Neurosci.*, **39**(4), 221–234. DOI: 10.1016/j.tins.2016.02.002
71. Vila I.K., Laguette N. (2023) The unexpected role of the STING protein in lipid metabolism. *Comptes Rendus Biologies*, **346**, 29–33. DOI: 10.5802/crbiol.110
72. Abe T., Barber G.N. (2014) Cytosolic-DNA-mediated, STING-dependent proinflammatory gene induction necessitates canonical NF- κ B activation through TBK1. *J. Virol.*, **88**(10), 5328–5341. DOI: 10.1128/jvi.00037-14
73. Decout A., Katz J.D., Venkatraman S., Ablasser A. (2021) The cGAS-STING pathway as a therapeutic target in inflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol.*, **21**(9), 548–569. DOI: 10.1038/s41577-021-00524-z
74. Mazzulli J.R., Xu Y.-H., Sun Y., Knight A.L., McLean P.J., Caldwell G.A., Sidransky E., Grabowski G.A., Krainc D. (2011) Gaucher disease glucocerebrosidase and α -synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies. *Cell*, **146**(1), 37–52. DOI: 10.1016/j.cell.2011.06.001
75. Kiechle M., Grozdanov V., Danzer K.M. (2020) The role of lipids in the initiation of α -synuclein misfolding. *Front. Cell Dev. Biol.*, **8**, 562241. DOI: 10.3389/fcell.2020.562241
76. Galvagnion C. (2017) The role of lipids interacting with α -synuclein in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Parkinsons Dis.*, **7**(3), 433–450. DOI: 10.3233/JPD-171103
77. Galvagnion C., Brown J.W.P., Ouberai M.M., Flagmeier P., Vendruscolo M., Buell A.K., Sparr E., Dobson C.M. (2016) Chemical properties of lipids strongly affect the kinetics of the membrane-induced aggregation of α -synuclein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**(26), 7065–7070. DOI: 10.1073/pnas.1601899113
78. Battis K., Xiang W., Winkler J. (2023) The bidirectional interplay of α -synuclein with lipids in the central nervous system and its implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *Int. J. Mol. Sci.*, **24**(17), 13270. DOI: 10.3390/ijms241713270
79. Qiao L., Hamamichi S., Caldwell K.A., Caldwell G.A., Yacoubian T.A., Wilson S., Xie Z.-L., Speake L.D., Parks R., Crabtree D., Liang Q., Crimmins S., Schneider L., Uchiyama Y., Iwatsubo T., Zhou Y., Peng L., Lu Y., Standaert D.G., Walls K.C., Shacka J.J., Roth K.A., Zhang J.

- (2008) Lysosomal enzyme cathepsin D protects against alpha-synuclein aggregation and toxicity. *Mol. Brain*, **1**, 17. DOI: 10.1186/1756-6606-1-17
80. Koike M., Shibata M., Ohsawa Y., Nakanishi H., Koga T., Kametaka S., Waguri S., Momoi T., Kominami E., Peters C., von Figura K., Saftig P., Uchiyama Y. (2003) Involvement of two different cell death pathways in retinal atrophy of cathepsin D-deficient mice. *Mol. Cell. Neurosci.*, **22**(2), 146–161. DOI: 10.1016/S1044-7431(03)00035-6
81. Bae E.-J., Yang N.Y., Lee C., Kim S., Lee H.-J., Lee S.-J. (2015) Haploinsufficiency of cathepsin D leads to lysosomal dysfunction and promotes cell-to-cell transmission of α -synuclein aggregates. *Cell Death Dis.*, **6**(10), e1901. DOI: 10.1038/cddis.2015.283
82. Kim Y.C., Guan K.-L. (2015) mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. *J. Clin. Invest.*, **125**(1), 25–32. DOI: 10.1172/JCI173939
83. Sarkar S. (2013) Regulation of autophagy by mTOR-dependent and mTOR-independent pathways: autophagy dysfunction in neurodegenerative diseases and therapeutic application of autophagy enhancers. *Biochem. Soc. Trans.*, **41**(5), 1103–1130. DOI: 10.1042/BST20130134
84. Kang R., Zeh H.J., Lotze M.T., Tang D. (2011) The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ.*, **18**(4), 571–580. DOI: 10.1038/cdd.2010.191
85. Zhu Z., Yang C., Iyaswamy A., Krishnamoorthi S., Sreenivasmurthy S.G., Liu J., Wang Z., Tong B.C.-K., Song J., Lu J., Cheung K.-H., Li M. (2019) Balancing mTOR signaling and autophagy in the treatment of Parkinson's disease. *Int. J. Mol. Sci.*, **20**(3), 728. DOI: 10.3390/ijms20030728
86. Falkenburger B.H., Saridaki T., Dinter E. (2016) Cellular models for Parkinson's disease. *J. Neurochem.*, **139**(Suppl 1), 121–130. DOI: 10.1111/jnc.13618
87. Martirosyan A., Ansari R., Pestana F., Hebestreit K., Gasparyan H., Aleksanyan R., Hnatova S., Poovathingal S., Marneffe C., Thal D.R., Kottick A., Hanson-Smith V.J., Guelfi S., Plumbly W., Belgard T.G., Metzakopian E., Holt M.G. (2024) Unravelling cell type-specific responses to Parkinson's disease at single cell resolution. *Mol. Neurodegener.*, **19**, 7. DOI: 10.1186/s13024-023-00699-0
88. Booth H.D.E., Hirst W.D., Wade-Martins R. (2017) The role of astrocyte dysfunction in Parkinson's disease pathogenesis. *Trends Neurosci.*, **40**(6), 358–370. DOI: 10.1016/j.tins.2017.04.001

Поступила в редакцию: 15.12.2025.
 После доработки: 10.02.2026.
 Принята к печати: 16.02.2026.

SIMULTANEOUS INHIBITION OF mTOR AND STING AS AN APPROACH TO REDUCE ALPHA-SYNUCLEIN AND LYSOPHINGOLIPID LEVELS IN PERIPHERAL BLOOD MONOCYTE-DERIVED MACROPHAGES AND THE SH-SY5Y CELL LINE: IMPLICATIONS FOR THERAPY OF PARKINSON'S DISEASE

A.I. Bezrukova^{1,2}, K.S. Basharova^{1,2}, E.S. Galkina¹, O.S. Epifanivskaya³, G.V. Baydakova⁴, E.Yu. Zakharova⁴, S.N. Pchelina^{1,2}, T.S. Usenko^{1,2,*}

¹Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of NRC “Kurchatov Institute”, 1 mkr. Orlova roshcha, Gatchina, Leningrad region, 188300 Russia; *e-mail: usenko_ts@pnpi.nrcki.ru
²First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, 6-8 L'va Tolstogo str., Saint Petersburg, 197022 Russia
³Raisa Gorbacheva Memorial Research Institute for Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation, 6-8 L'va Tolstogo str., Saint Petersburg, 197022 Russia
⁴Medical Genetic Research Center, 1 Moskvorechye str., Moscow, 115478 Russia

The combined effects of two inhibitors, Torin 1, acting on mTOR, a key regulator of autophagy, and H-151, inhibiting STING, a key regulator of inflammation, on the autophagolysosomal system, have been studied in a primary culture of peripheral blood macrophages from healthy donors and the SH-SY5Y neuroblastoma cell line. Combined use of these drugs resulted in a decrease in the levels of lysosphingolipids, triggering alpha-synuclein oligomerization, as well as a decrease in the levels of monomeric and neurotoxic phosphorylated (Ser129) alpha-synuclein and an increase in tyrosine hydroxylase. These results open new prospects for the use of combination therapy with these proposed drugs in the treatment of both diseases associated with lysosomal dysfunction and neurodegenerative pathologies.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

Keywords: Parkinson's disease; mTOR; STING; alpha-synuclein; lysosomal hydrolase activity; autophagy

Funding. This research was funded by the Russian Science Foundation (project no. 24-25-00212).

Received: 15.12.2025; revised: 10.02.2026; accepted: 16.02.2026.