

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Безрукова А.И., Башарова К.С., Галкина Е.С., Епифановская О.С., Байдакова Г.В., Захарова Е.Ю., Пчелина С.Н., Усенко Т.С. (2026) 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. Биомедицинская химия, 72(1), 42-61.

DOI: 10.18097/PBMCR1616

В ходе данного исследования было оценено дозозависимое влияние ингибитора киназной активности mTOR Torin1 (25, 50, 100 и 200 нМ) и ингибитора белка STING H-151 (0,25; 0,5; 1 и 2 мкМ) на активность mTOR-сигналинга (уровни белков p-mTOR (Ser2448), p-RPS6 (Ser235/236)) и STING-сигналинга (уровни белков STING, p-TBK1 (Ser172)), а также на степень аутофагии по уровням белков BECN1, p62 и LC3B-II, лизосомную деградацию (уровень белка CTSD), активность лизосомных гидролаз (GALC, GCase, ASMase, GLA), концентрацию лизосфинголипидов (HexSph, LysoSM, LysoGb3), уровень различных форм белка альфа-синуклеина и степень апоптоза в первичной культуре макрофагов периферической крови неврологически здоровых индивидуумов, а также в клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y.

Также был оценен синергический эффект комбинированного ингибирования mTOR (Torin1) и STING (H-151) на активность mTOR-сигналинга (уровни белков p-mTOR (Ser2448), p-RPS6 (Ser235/236)) и STING-сигналинга (уровни белков STING, p-TBK1 (Ser172)), а также на процессы аутофагии (уровни белков BECN1, p62, LC3B-II), лизосомной деградации (уровень белка CTSD), активность лизосомных гидролаз (GALC, GCase, ASMase, GLA), концентрацию лизосфинголипидов (HexSph, LysoSM, LysoGb3), уровень различных форм белка альфа-синуклеина и степень апоптоза в первичной культуре макрофагов периферической крови неврологически здоровых индивидуумов, а также в клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y. Анализ синергизма для каждого параметра проводили методом HSA.

Таблица S1. Синергический эффект комбинации Torin1 + H-151 в первичной культуре макрофагов периферической крови

Белок / Маркер	mean_HSA	p_value	Индекс синергии
<i>Белки аутофагии</i>			
BECN1	-0.0065	9.42e-01	Аддитивность
GCase	-0.12	6.77e-02	Аддитивность
LC3B-II	-1.68	3.31e-08	Аддитивность
p62	0.21	4.32e-04	Аддитивность
p-RPS6	0.019	7.78e-01	Аддитивность
p-TBK1	0.18	2.40e-13	Аддитивность
i-CTSD	0.085	7.98e-05	Аддитивность
m-CTSD	1.51	6.41e-74	Аддитивность
mTOR	0.24	2.76e-04	Аддитивность
STING	-0.34	1.16e-03	Аддитивность
p-CTSD	-0.03	1.14e-03	Аддитивность
<i>Активность лизосомных гидролаз и концентрация лизосфинголипидов</i>			
ASMase	0.33	5.33e-01	Аддитивность
GCase	2.12	1.87e-01	Аддитивность
GLA	-0.31	7.83e-01	Аддитивность
GALC	0.59	2.67e-01	Аддитивность
LysoGb3	-1.41	3.81e-07	Аддитивность
HexSph	-1.06	3.20e-15	Аддитивность
LysoSM	0.023	2.78e-01	Аддитивность
<i>Апоптоз</i>			
Ранний апоптоз	-0.029	9.82e-01	Аддитивность
Поздний апоптоз	4.95	2.01e-01	Аддитивность
Некроз	0.94	4.12e-01	Аддитивность

Таблица S2. Синергический эффект комбинации Torin1 + H-151 в клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y

Белок / Маркер	mean_HSA	p_value	Индекс синергии
<i>Белки аутофагии</i>			
BECN1	0.533	2.01e-47	Аддитивность
GCase	-0.58	1.61e-28	Аддитивность
LC3-II	0.533	2.01e-47	Аддитивность
p62	0.44	2.32e-03	Аддитивность
p-RPS6	-0.30	4.40e-11	Аддитивность
p-TBK1	0.052	7.17e-16	Аддитивность
i.CTSD	0.533	2.01e-47	Аддитивность
m.CTSD	1.48	6.04e-18	Аддитивность
mTOR	0.21	1.60e-04	Аддитивность
STING	-0.36	2.88e-08	Аддитивность
p.CTSD	0.533	2.01e-47	Аддитивность
α-synuclein	-0.38	7.89e-07	Аддитивность
p-syn	-0.29	2.84e-02	Аддитивность
α-synuclein tetramer	-0.24	2.59e-16	Аддитивность
TH	-0.29	8.01e-15	Аддитивность
<i>Активность лизосомных гидролаз и концентрация лизосфинголипидов</i>			
ASMase	3.56	3.61e-01	Аддитивность
GCase	2.29	3.66e-01	Аддитивность
GLA	3.01	3.10e-02	Аддитивность
GALC	0.57	2.16e-03	Аддитивность
LysoGb3	-0.28	8.46e-02	Аддитивность
HexSph	-0.051	5.68e-02	Аддитивность
LysoSM	-0.12	1.45e-03	Аддитивность

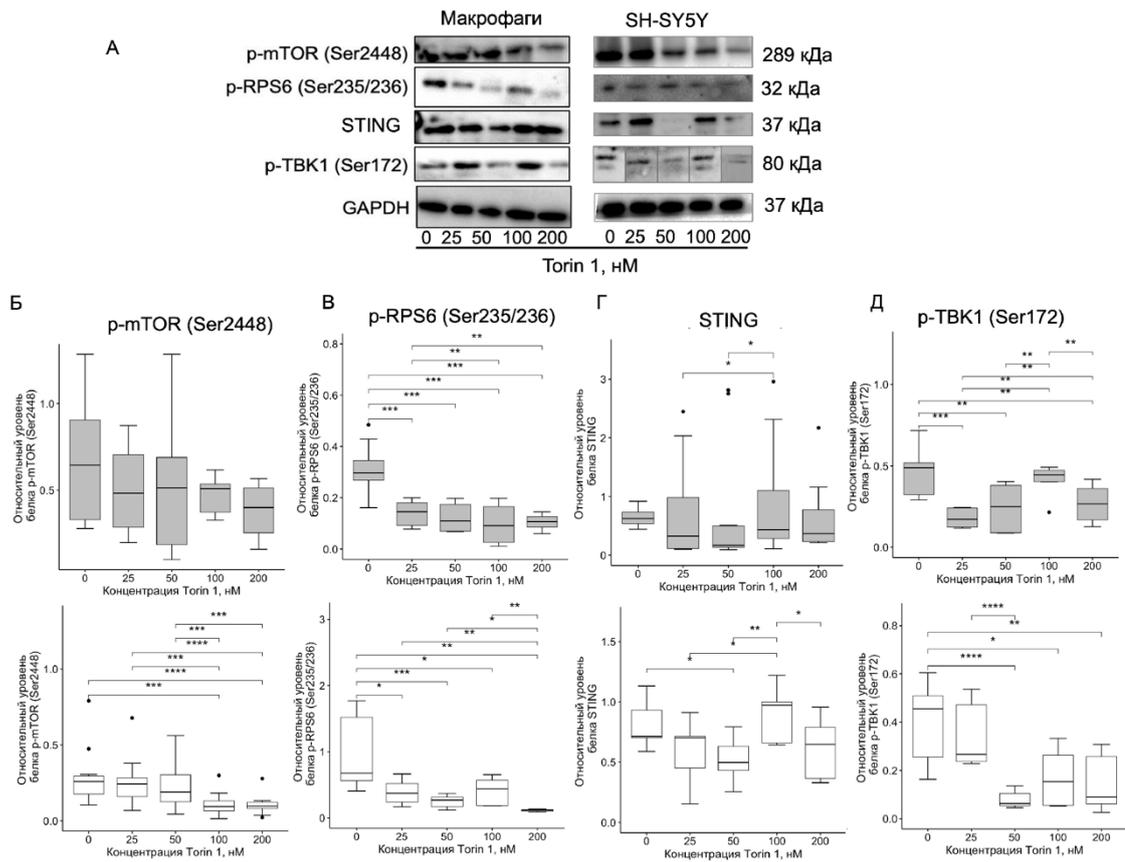


Рисунок S1. Оценка эффективности ингибирования протеинкиназы mTOR и белка STING малой молекулой Torin1 в дозозависимой манере в первичной культуре макрофагов периферической крови (макрофаги) (серый цвет) и клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y (SH-SY5Y) (белый цвет). А – данные вестерн-блоттинга; Б – относительный уровень p-mTOR (Ser2448); В – относительный уровень p-RPS6 (Ser235/236); Г – относительный уровень STING; Д – относительный уровень p-TBK1 (Ser172). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

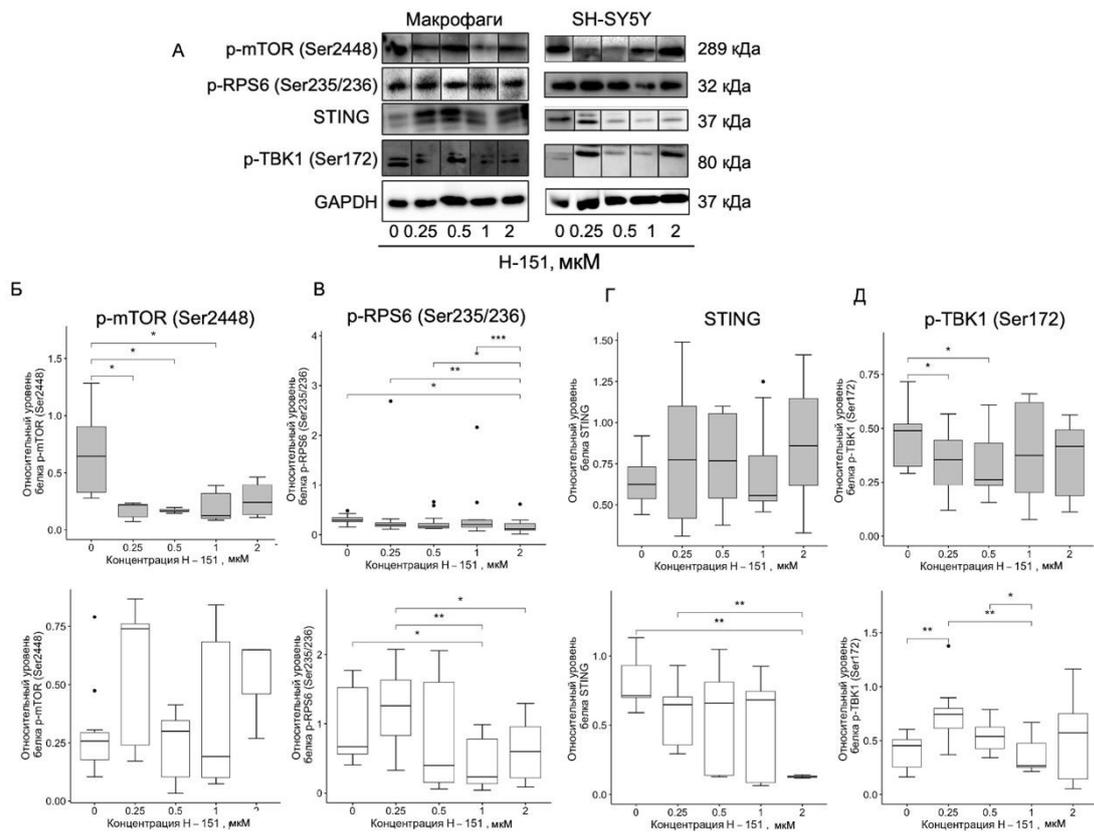


Рисунок S2. Оценка эффективности ингибирования протеинкиназы mTOR и белка STING малой молекулой H-151 в дозозависимой манере в первичной культуре макрофагов периферической крови (макрофаги) (серый цвет) и клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y (SH-SY5Y) (белый цвет). А – данные вестерн-блоттинга; Б – относительный уровень p-mTOR (Ser2448); В – относительный уровень p-RPS6 (Ser235/236); Г – относительный уровень STING; Д – относительный уровень p-TBK1 (Ser172). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

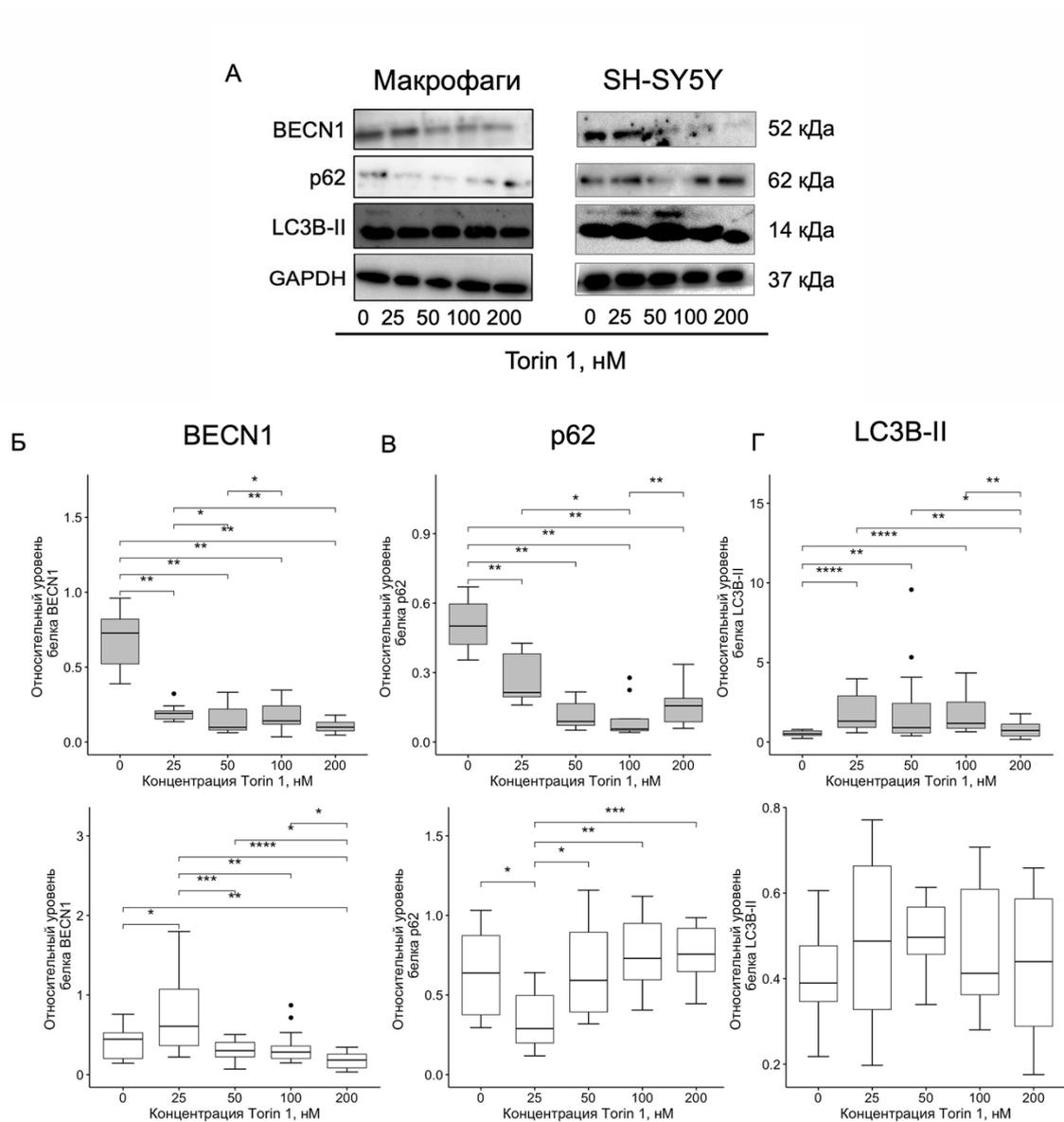


Рисунок S3. Оценка дозозависимого влияния ингибирования протеинкиназы mTOR и белка STING малой молекулой Torin 1 в первичной культуре макрофагов периферической крови (макрофаги) (серый цвет) и клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y (SH-SY5Y) (белый цвет) на основные этапы аутофагии. А – данные вестерн-блоттинга; Б – относительный уровень BECN1; В – относительный уровень p62; Г – относительный уровень LC3B-II. Т – Torin 1, Н – Н-151. * $p < 0.05$,

**

p<0.01,

p<0.001,

p<0.0001

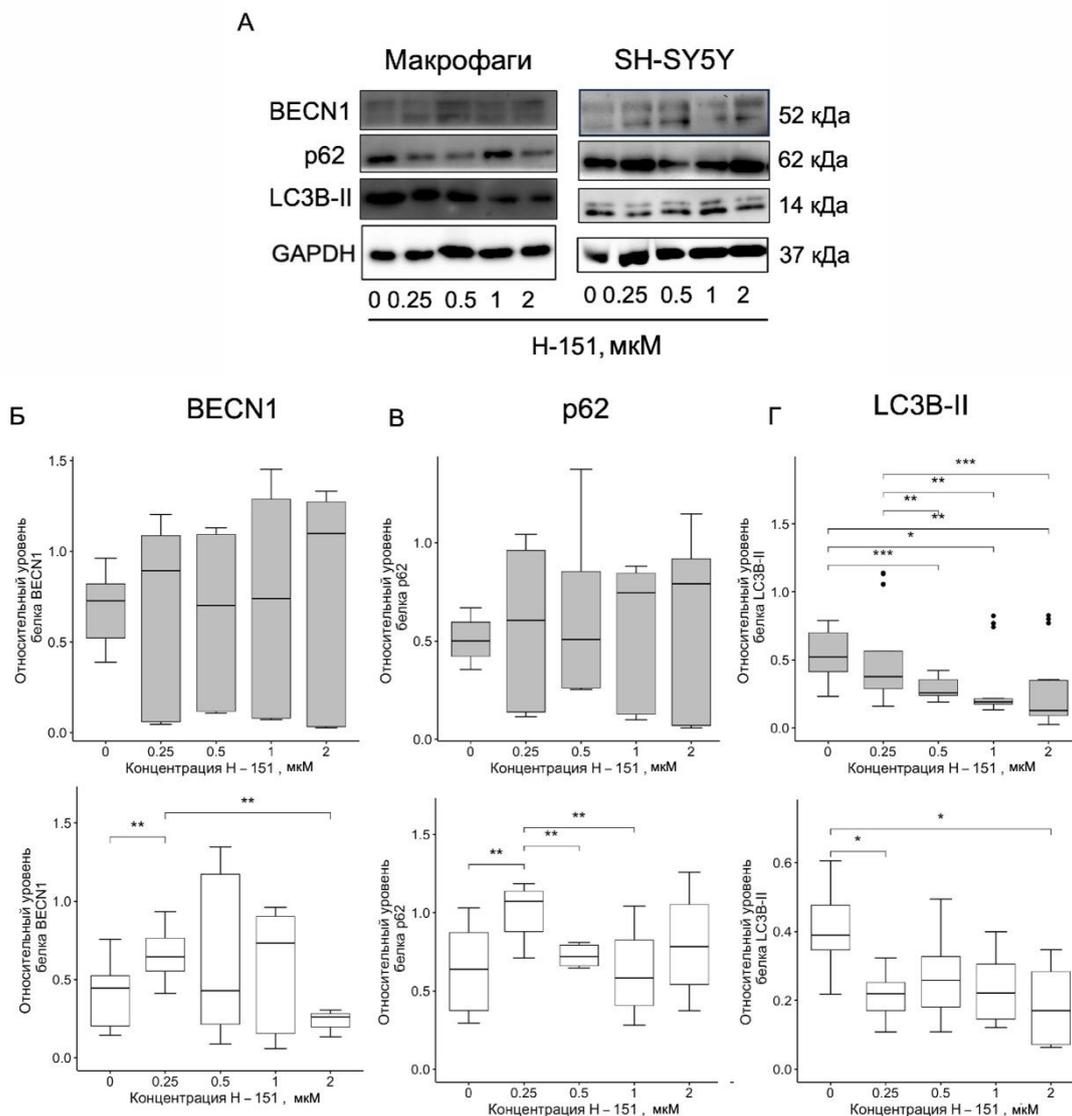


Рисунок S4. Оценка дозозависимого влияния ингибирования протеинкиназы mTOR и белка STING малой молекулой H-151 в первичной культуре макрофагов периферической крови (макрофаги) (серый цвет) и клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y (SH-SY5Y) (белый цвет) на основные этапы аутофагии. А – данные вестерн-блоттинга; Б – относительный уровень BECN1; В – относительный уровень p62; Г – относительный уровень LC3B-II. H – H-151. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

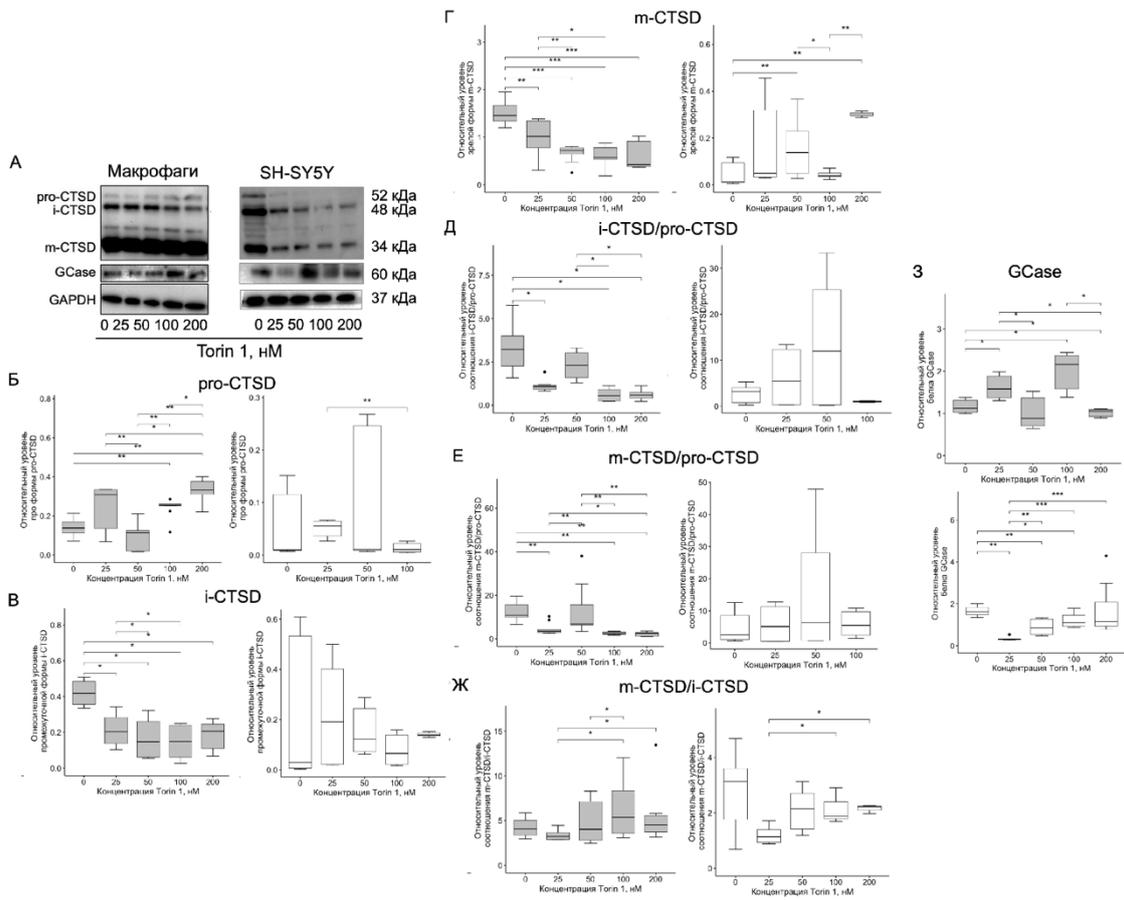


Рисунок S5. Оценка дозозависимого влияния ингибирования протеинкиназы mTOR и белка STING малой молекулой Torin 1 в первичной культуре макрофагов периферической крови (макрофаги) (серый цвет) и клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y (SH-SY5Y) (белый цвет) на лизосомную деградацию. А – данные вестерн-блоттинга; Б – относительный уровень pro-CTSD; В – относительный уровень i-CTSD; Г – относительный уровень m-CTSD; Д – относительный уровень соотношения i-CTSD/pro-CTSD; Е – относительный уровень соотношения m-CTSD/pro-CTSD; Ж – относительный уровень соотношения m-CTSD/i-CTSD; З – относительный уровень GCase. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

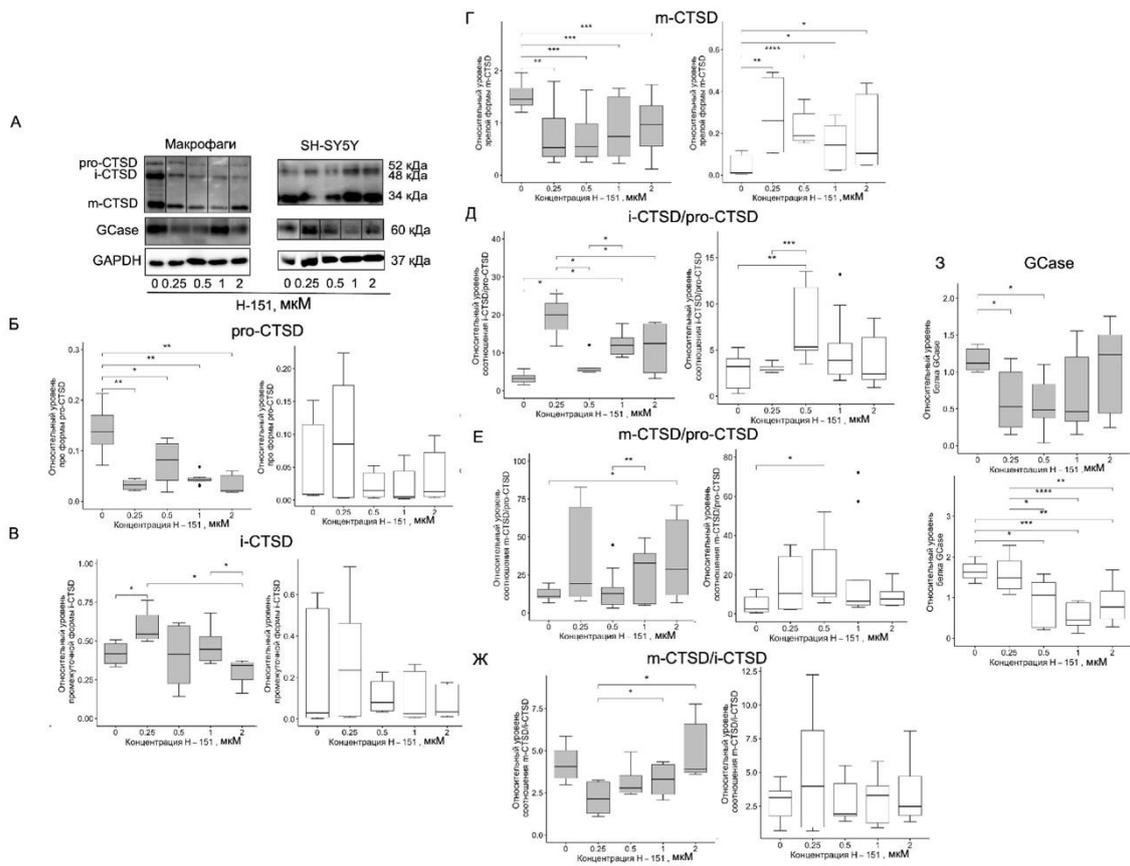


Рисунок S6. Оценка дозозависимого влияния ингибирования протеинкиназы mTOR и белка STING малой молекулой H-151 в первичной культуре макрофагов периферической крови (макрофаги) (серый цвет) и клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y (SH-SY5Y) (белый цвет) на лизсомную деградацию. А – данные вестерн-блоттинга; Б – относительный уровень pro-CTSD; В – относительный уровень i-CTSD; Г – относительный уровень m-CTSD; Д – относительный уровень соотношения i-CTSD/pro-CTSD; Е – относительный уровень соотношения m-CTSD/pro-CTSD; Ж – относительный уровень соотношения m-CTSD/i-CTSD; З – относительный уровень GCCase. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

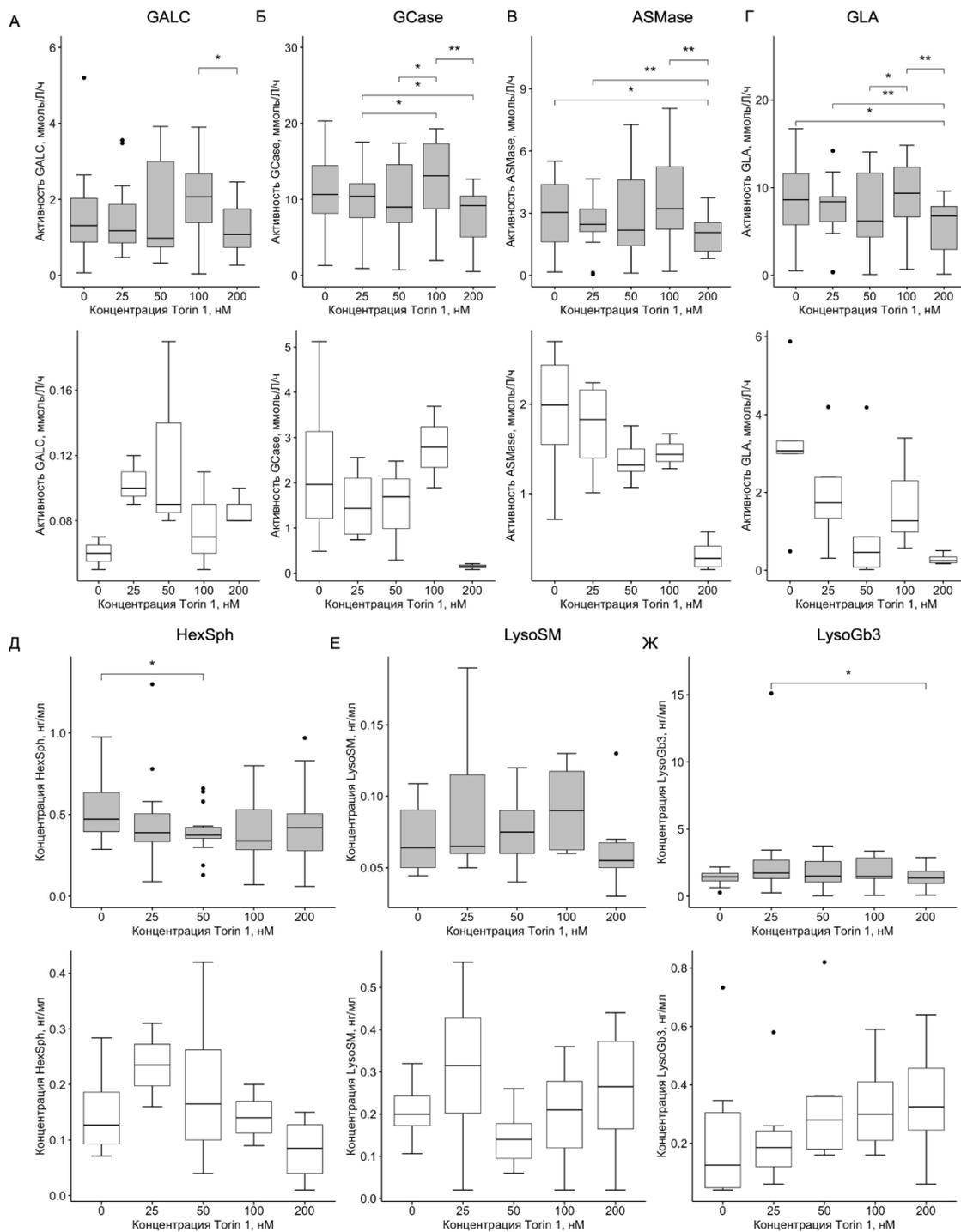


Рисунок S7. Оценка дозозависимого влияния ингибирования протеинкиназы mTOR и белка STING малой молекулой Torin 1 в первичной культуре макрофагов периферической крови (макрофаги) (серый цвет) и клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y (SH-SY5Y) (белый цвет) активность лизосомных ферментов и уровень лизосфинголипидов. А – GALC; Б – GCCase; В – ASMase; Г – GLA; Д – HexSph; Е – LysoSM; Ж – LysoGb3. * p<0.05, ** p<0.01

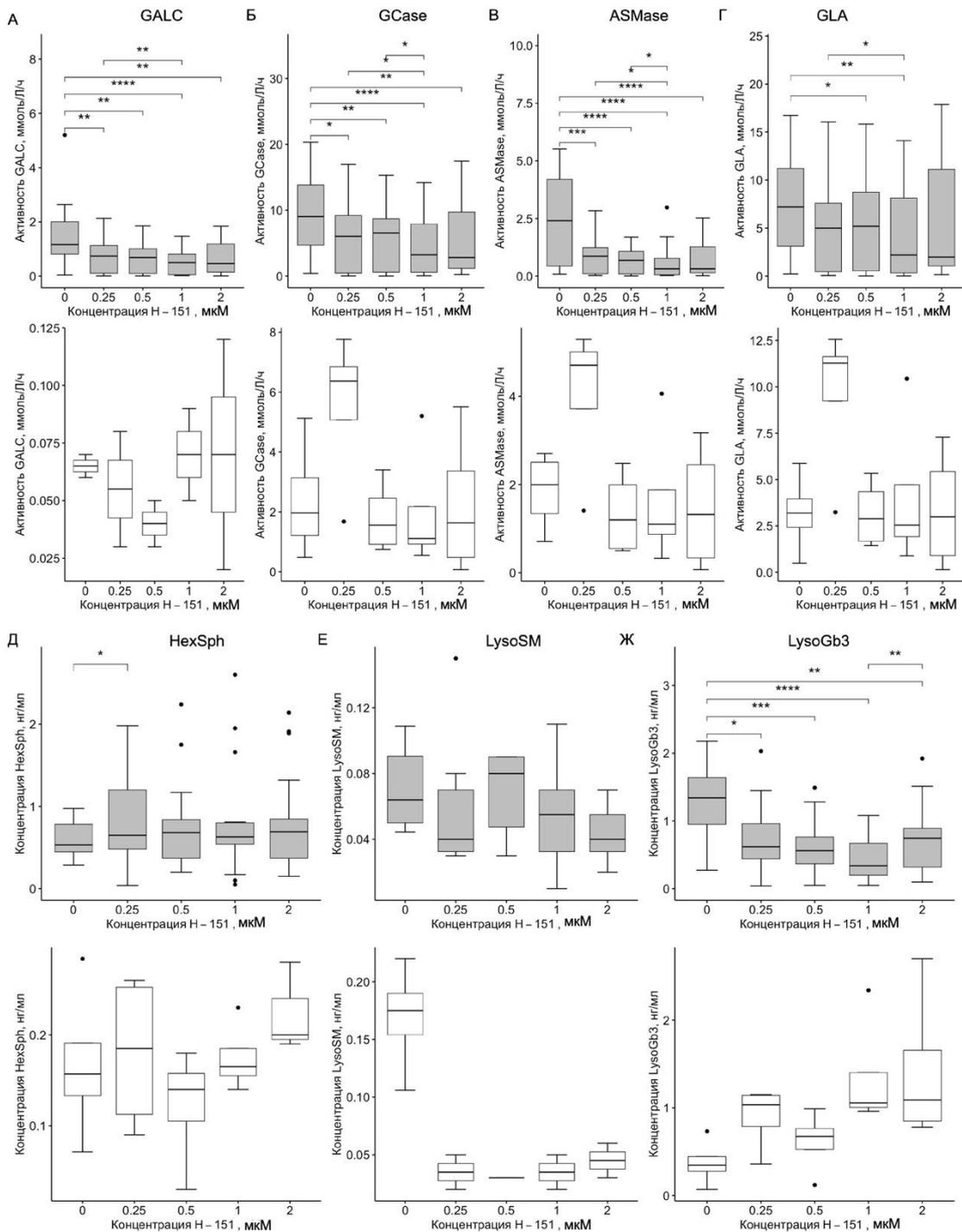


Рисунок S8. Оценка дозозависимого влияния ингибирования протеинкиназы mTOR и белка STING малой молекулой Н-151 в первичной культуре макрофагов периферической крови (макрофаги) (серый цвет) и клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y (SH-SY5Y) (белый цвет) активность лизосомных ферментов и уровень лизосфинголипидов. А – GALC; Б – GCCase; В – ASMase; Г – GLA; Д – HexSph; Е – LysoSM; Ж – LysoGb3 Т. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

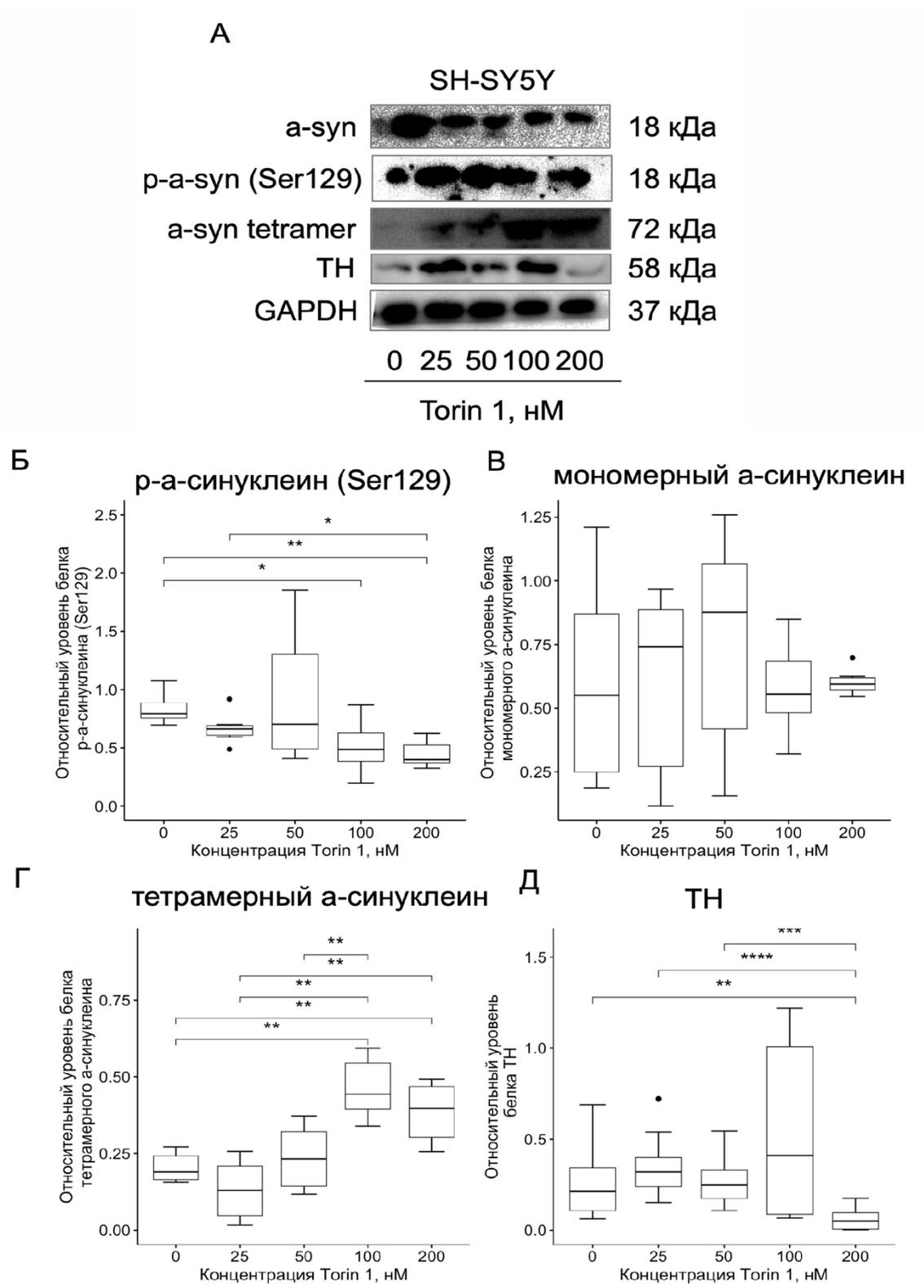


Рисунок S9. Оценка дозозависимого влияния ингибирования протеинкиназы mTOR и белка STING малой молекулой Torin 1 в клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y (SH-SY5Y) на уровень различных форм альфа-синуклеина и TH. А – данные вестерн-блота; Б – относительный уровень фосфорилированного альфа-синуклеина (Ser129); В – относительный уровень мономерного альфа-синуклеина; Г – относительный уровень тетрамерного альфа-синуклеина; Д – относительный уровень TH. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

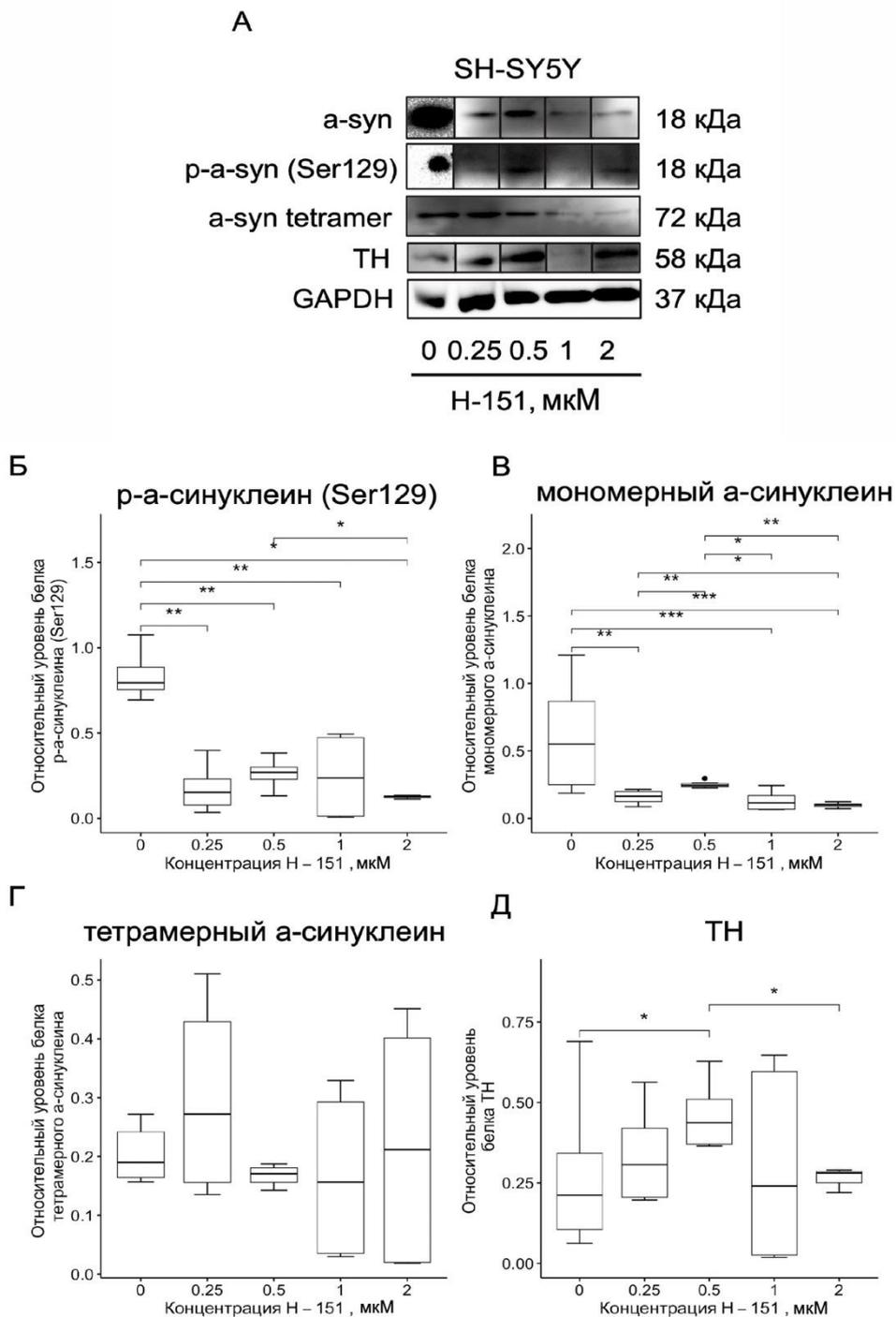


Рисунок S10. Оценка дозозависимого влияния ингибирования протеинкиназы mTOR и белка STING малой молекулой Н-151 в клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y (SH-SY5Y) на уровень различных форм альфа-синуклеина и ТН. А – данные вестерн-блота; Б – относительный уровень фосфорилированного альфа-синуклеина (Ser129); В – относительный уровень мономерного альфа-синуклеина; Г – относительный уровень тетрамерного альфа-синуклеина; Д – относительный уровень ТН. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.