

**Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НАУЧНЫЙ ЦЕНТР НЕВРОЛОГИИ»**

На правах рукописи

**Бадлаева Алина Станиславовна**

**Взаимосвязь митохондриальной и аутофагоцитарной дисфункции в нейронах  
головного мозга при старении**

1.5.22. Клеточная биология

3.3.2. Патологическая анатомия

**диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук**

Научные руководители:  
доктор медицинских наук, профессор Сухоруков Владимир Сергеевич  
доктор медицинских наук, профессор Гулевская Татьяна Сергеевна

Москва – 2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

|                                                                                                                                          |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>ВВЕДЕНИЕ .....</b>                                                                                                                    | <b>4</b>  |
| <b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....</b>                                                                                     | <b>10</b> |
| <b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>                                                                                                   | <b>11</b> |
| 1.1. Морфологические изменения нервной ткани головного мозга при старении .....                                                          | 11        |
| 1.2. Актуальные аспекты изучения клеточных механизмов старения головного мозга.....                                                      | 13        |
| 1.3. Роль аутофагоцитарной дисфункции в процессе старения.....                                                                           | 15        |
| 1.4. Роль митохондриальной дисфункции в процессе старения.....                                                                           | 21        |
| 1.5. Взаимодействие митохондрий и системы аутофагоцитоза .....                                                                           | 27        |
| <b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ .....</b>                                                                                                  | <b>36</b> |
| 2.1. Материал исследования .....                                                                                                         | 36        |
| 2.2. Методы исследования .....                                                                                                           | 38        |
| <b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>                                                                                         | <b>44</b> |
| 3.1. Морфологические изменения структурных компонентов ткани головного мозга человека при старении.....                                  | 44        |
| 3.2. Морфологические изменения головного мозга экспериментальных животных при старении.....                                              | 56        |
| 3.3. Обсуждение результатов морфологических изменений головного мозга человека и лабораторных животных при старении.....                 | 58        |
| 3.4. Электронно-микроскопическое исследование нейронов головного мозга экспериментальных животных при старении .....                     | 64        |
| 3.5. Обсуждение результатов электронно-микроскопического исследования.....                                                               | 66        |
| 3.6. Иммуногистохимическое исследование маркеров митохондриальной и аутофагоцитарной дисфункции в нейронах головного мозга человека..... | 68        |

|                                                                                                                                                             |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.7. Иммуногистохимическое исследование маркеров митохондриальной и аутофагоцитарной дисфункции в нейронах головного мозга экспериментальных животных ..... | 81  |
| 3.8. Обсуждение результатов иммуногистохимического исследования .....                                                                                       | 93  |
| <b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b> .....                                                                                                                                     | 100 |
| <b>ВЫВОДЫ</b> .....                                                                                                                                         | 106 |
| <b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....                                                                                                                              | 109 |

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность темы**

Во всех странах мира отмечается феномен старения населения. По данным Всемирной Организации Здравоохранения к 2050 году число людей старше 60 лет удвоится и составит 22% [29;71;121]. Старение является одним из основных факторов риска для развития многих возраст-ассоциированных нейродегенеративных заболеваний, а большинство морфологических проявлений старения схожи с нейродегенеративными изменениями и различаются между собой главным образом количественно [4;52]. Однако в литературе представлены противоречивые данные об изменениях стареющего головного мозга [35;39;48; 99;101;116]. Все вышеизложенное отражает актуальность изучения морфологических изменений и морфометрических параметров структурных элементов головного мозга при старении с целью их последующего использования в качестве контрольных показателей при изучении нейродегенеративных заболеваний.

В настоящее время старение расценивается как многофакторный процесс, который характеризуется снижением функции клеток вследствие накопления повреждений с течением времени. По данным многих исследований было показано, что маркерами старения являются генетические и эпигенетические альтерации, биоэнергетический дефицит и окислительный стресс, измененный протеостаз, а также нарушение соотношения процессов анаболизма и катаболизма, неэффективный синтез, деградация органелл [16;56;88;92;98].

Одну из ключевых ролей в регулировании старения занимают митохондрии и аутофагия. Известно, митохондрии и компоненты системы аутофагии активно участвуют в координации обменных процессов и поддержании гомеостаза, поскольку именно они являются источниками энергии и строительных белков [50].

Исследование вышеописанных звеньев клеточного гомеостаза представляется наиболее перспективным в энергозависимой нервной ткани,

имеющей максимальное внутриклеточное представительство митохондрий. Актуальность изучения данного вопроса также связана и с огромной значимостью системы обновления цитоплазмы для постмитотической нейрональной популяции. Поддержание базального уровня аутофагии критически важно для обеспечения функционирования нервных клеток, а его снижение может приводить к агрегации белков – ключевому патогенетическому механизму таких нейродегенеративных заболеваний как болезни Паркинсона и Альцгеймера [57;113;150;164]. Следовательно, морфофункциональные особенности нервной ткани определяют важность митохондриально-аутофагоцитарного взаимодействия в поддержании функционального пула нейронов.

Ввиду всего вышеперечисленного чрезвычайно важной задачей в настоящее время является исследование взаимосвязи между ключевыми маркерами, отражающими функциональное состояние митохондрий и аутофагии, и их вклада в старение для последующего определения фармацевтических мишеней.

**Цель:** определение взаимосвязи между параметрами морфофункционального состояния митохондрий и компонентов системы аутофагоцитоза в нейронах головного мозга в процессе старения.

#### **Задачи исследования:**

1. Выявить гистологические особенности серого и белого вещества головного мозга человека и лабораторных животных при старении.
2. Определить состояние митохондрий в нейронах стареющего головного мозга человека и лабораторных животных с помощью иммуногистохимического метода.
3. Оценить состояние макроаутофагии и шаперон-индуцированной аутофагии в нейронах головного мозга человека и лабораторных животных при старении с использованием метода иммуногистохимии.
4. Провести ультраструктурную оценку митохондрий и компонентов системы аутофагоцитоза в процессе старения головного мозга лабораторных животных.

5. Определить корреляционные взаимосвязи между полученными данными и выявить значимые гистологические маркеры нарушения взаимодействия митохондрий и системы аутофагоцитоза при старении.

### **Научная новизна**

Проведена оценка и детальное сравнение морфометрических параметров серого и белого вещества головного мозга человека и лабораторных животных при старении. При моделировании «физиологического» старения показано увеличение глиального индекса преимущественно за счет пролиферации глии, что в сочетании с незначительным уменьшением числа нейронов в моторной коре и стриатуме мышей, подтверждает важную роль сердечно-сосудистых заболеваний в гибели нейронов головного мозга человека с течением времени.

Проведено сравнение интенсивности окрашивания иммуногистохимических маркеров в перикарионе нейронов моторной коры, стриатума и гиппокампа человека и лабораторных животных двух возрастных групп, что позволило не только оценить состояние митохондрий и различных типов аутофагии, но и определить корреляционные взаимоотношения между ними.

В работе впервые выявлена прямая корреляционная зависимость между маркерами макроаутофагии LC3B, шаперон-индуцированной аутофагии HSP70 и LAMP2A и маркером АТФ-синтазы АТР5А1; обратная корреляционная зависимость между маркерами шаперон-индуцированной аутофагии и маркером системы контроля качества митохондрий DJ-1.

Показано увеличение интенсивности окрашивания маркера АТФ-синтазы, что в сочетании с данными электронно-микроскопического исследования подтверждает увеличение размеров митохондрий в качестве компенсаторно-приспособительной реакции при старении.

Обнаруженный нами характер экспрессии маркеров шаперон-индуцированной аутофагии и макроаутофагии позволят предположить активное участие различных механизмов утилизации дисфункциональных белков для обеспечения выживаемости нейронов с течением времени. С другой стороны,

результаты окрашивания иммуногистохимических маркеров двух типов аутофагии в сочетании с их корреляционным анализом, косвенно свидетельствуют о развивающейся с возрастом аутофагоцитарной дисфункции.

В работе комплексно исследованы, детально описаны и подробно проиллюстрированы морфологические проявления сенильных изменений нервной ткани и сосудистой системы в структурах головного мозга человека, вовлеченных в патогенез возраст-ассоциированных нейродегенеративных заболеваний.

### **Теоретическая и практическая и значимость**

Диссертация вносит вклад в разработку концепции клеточных и молекулярных механизмов старения головного мозга человека. Полученные данные помогут углубить и расширить знания о том, каким образом нейроны накапливают повреждения в процессе старения, а также послужат основой для изучения патогенеза заболеваний, связанных с возрастом, в частности, таких патологических процессов как нейродегенерация. Исследование вносит существенный вклад в представления о возрастных изменениях митохондриальной и аутофагоцитарной активности в нервной ткани человека и лабораторных животных, что является необходимой основой для развития трансляционных технологий в области клинического изучения старения.

Практическая значимость исследования состоит в определении биомаркеров и предикторов старения клеточных элементов нервной ткани, а полученные результаты будут иметь значение для разработки новых патологоанатомических маркеров, необходимых для дифференциальной диагностики возраст-ассоциированных заболеваний, а также для развития новых технологий профилактики и таргетной терапии возрастных нарушений.

### **Методология и методы исследования**

Работа была основана на изучении аутопсийного материала коры предцентральной извилины, стриатума, гиппокампа и черного вещества 30 больных в возрасте от 75 до 94 лет, причиной смерти которых явилась тромбоэмболия легочной артерии, и 10 больных в возрасте от 35 до 44 лет,

причиной смерти которых явилась внезапная сердечная смерть. Основными критериями исключения для каждой из возрастных групп явились выраженный стеноз прецеребральных и церебральных артерий, а также установленные в анамнезе двигательные и когнитивные нарушения. В настоящей работе также использовался материал головного мозга 10 самцов беспородной мышей в возрасте 2 месяцев и 10 – в возрасте 18 месяцев.

Для решения поставленных задач был проведен анализ макроскопических параметров сенильных изменений головного мозга; обзорная световая микроскопия с применением гистологических и гистохимических методов окрашивания; иммуногистохимическое исследование с последующим определением интенсивности окрашивания маркеров ШИА HSP70, LAMP2A, маркера макроаутофагии LC3B, маркера V ферментного комплекса дыхательной цепи митохондрий ATP5A1, а также маркера контроля качества митохондрий DJ-1; метод электронной микроскопии. Для статистического анализа полученных результатов использовали GraphPad Prism 9.3.1 (Dotmatics, США) и StatTech 3.0.6 (ООО "Статтех", Россия).

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Показаны региональные и видовые различия патоморфологических сенильных изменений в сером и белом веществе головного мозга человека и лабораторных животных при сохранении общих типовых проявлений нейродегенерации.

2. Обнаружено снижение эффективности системы контроля качества митохондрий при старении, что объясняет выявленное уменьшение количества митохондрий в нейронах головного мозга на фоне компенсаторного увеличения объема сохранных органелл и повышения активности в них синтеза АТФ.

3. В нейронах стареющего головного мозга человека и лабораторных животных имеет место значительное повышение активности как шаперон-индуцируемой аутофагии, так и макроаутофагии, что свидетельствует о нарастании общей аутофагоцитарной активности и, учитывая корреляцию этих



изменений с увеличением синтеза АТФ, может быть связано с оксидативным стрессом в этих клетках.

4. Корреляции между изученными иммуногистохимическими маркерами макроаутофагии, шаперон-индуцированной аутофагии, АТФ-синтазы и маркера системы контроля качества митохондрий свидетельствует о существовании связи между митохондриями и компонентами системы аутофагии, которая имеет сложный двунаправленный характер и может иметь компенсаторно-приспособительный характер для поддержания функционального пула нейронов при старении.

#### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность полученных результатов в данной научной работе обусловлена четкой постановкой цели; комплексным подходом к выполнению поставленных задач с использованием различных методов исследования, таких как морфометрия, гистохимия и иммуногистохимия, электронная микроскопия; использованием корректных методов статистического анализа.

Материалы диссертации доложены на XVII Международной (XXVI Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (г. Москва, 17 марта 2022 г.), Нейрофоруме-2022 и V Национальном конгрессе по болезни Паркинсона и расстройствам движений (г. Москва, 23-24 июня 2022 г.), 34-м Европейском конгрессе патологов (Швейцария, г. Базель, 3-7 сентября 2022 г.), V Национальном конгрессе по регенеративной медицине (г. Москва, 23-25 ноября 2022 г.), XVIII Международной (XXVII Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции (г. Москва, 16 марта 2023 г.), Нейрофоруме-2023(г. Москва, 22-23 июня 2023 г.).

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК– активные формы кислорода

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

мтДНК – митохондриальная дезоксирибонуклеиновая кислота

СОД – супероксиддисмутаза

цАМФ–циклический аденозинмонофосфат

ШИА – шаперон-индуцированная аутофагия

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

АТР5А1 – АТФ-синтаза,  $\alpha$ -субъединица

DJ-1– белок 7 болезни Паркинсона

HSP70 – белок теплового шока 70

LAMP2A– лизосомно-ассоциированный мембранный белок 2A

LC3B – легкая цепь 3B белка, ассоциированного с микротрубочками 1A/1B

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Морфологические изменения нервной ткани головного мозга при старении

Старение головного мозга тесно связано с атрофическими процессами различной степени выраженности, что оказывает значительное влияние как на макро, так и на микроскопическую картину. К макроскопическим характеристикам старения головного мозга можно отнести уменьшение его массы и объема ввиду прогрессирующей потери нейронов, дегенеративных изменений синапсов, нейритов, а также миелиновых волокон, уменьшение толщины коры полушарий большого мозга (преимущественно префронтальной области) и мозжечка [9;31;130]. Вышеописанные процессы способствуют атрофии извилин с расширением борозд, формированию как наружной, так внутренней гидроцефалии [46].

Изменения, связанные со старением, также выявляются и в мозговых оболочках головного мозга. Твердая мозговая оболочка утолщается, подвергается склерозированию и местами срастается с костями черепа; мягкая и паутинная оболочки мозга также становятся толще. Возрастные изменения хориоидных сплетений проявляются склерозом, образованием кист, а также петрификацией, прогрессирующей с возрастом [1].

На микроскопическом уровне старение нервной ткани характеризуется уменьшением числа нейронов (главным образом в коре полушарий большого мозга, мозжечке, гиппокампе) и пролиферацией астроцитов (преимущественно в лобных долях и гиппокампе) [1;46]. Однако по данным некоторых научных работ выявлено лишь незначительное сокращение количества нейронов при инволютивных изменениях головного мозга [101;116].

В связи с гибелью нейронов возникает один из типичных морфологических признаков стареющего мозга – разрежение клеток серого вещества и формирование спонгиозного состояния ткани мозга. Пустоты в участках полного исчезновения нейронов заполняются элементами глии по типу

изоморфного или анизоморфного глиоза [1;4]. Таким образом, сенильные изменения затрагивают не только серое, но и белое вещество головного мозга. В последнем также могут быть обнаружены кривлюры (расширенные периваскулярные пространства Вирхова-Робена) и крахмалистые тельца, являющиеся дегенеративной формой астроцитарной глии [4].

С возрастом нейроны могут уменьшаться в размерах с последующим тотальным хроматолизом, гиперхроматозом и превращением в «клетки-тени». В цитоплазме перикариона уменьшается количество вещества Ниссля, отмечается накопление пигмента липофусцина. Последний представляет собой желто-коричневый зернистый материал, состоящий из белков, жиров и углеводов и образующийся при нарушении окислительно-восстановительных реакций [3].

Для возрастной инволюции головного мозга также характерно обнаружение сенильных бляшек в виде аргирофильной бесструктурной массы амилоида, окруженной глиальными клетками и переплетением утолщенных аксонов [1]. Обычно сенильные бляшки могут быть обнаружены рядом с сосудами микроциркуляторного русла коры.

В цитоплазме нейронов при сенильных изменениях также возможно обнаружить цитоплазматические и внутриядерные включения (тельца), обладающие характерной формой, размером и тинкториальными свойствами. К цитоплазматическим включениям относятся тельца Леви, Лафора, Пика и Хирано. В ядрах клеток черного вещества можно выявить тельца Маринеско, в составе которых определяются компоненты убиквитин/протеасомной системы деградации белков [2].

В сосудах микроциркуляторного русла могут обращать на себя внимание истончение мышечных элементов в сосудистой стенке, формирование конволютов (капиллярных и микрососудистых формаций с несколькими просветами), признаки амилоидной ангиопатии, характеризующейся накоплением  $\beta$ -амилоидного пептида в корковых и лептоменингеальных артериях среднего и мелкого калибра [6]. В стареющем головном мозге венозное русло также

претерпевает различные изменения, например, происходит утолщение стенки сосудов, что приводит к изменению ее эластических свойств. Этот процесс ремоделирования расценивается авторами как проявление церебральной микроангиопатии [4;105] и носит название «венозный коллагеноз».

Несмотря на разнообразие микроскопических изменений белого и серого вещества и сосудистого русла, в настоящее время имеются противоречивые данные, посвященные комплексному изучению структурных элементов при возрастной инволюции [35;39;48;99;101;116]. К тому же, большинство описанных сенильных изменений и изменений, связанных с возраст-ассоциированными нейродегенеративными процессами, могут быть идентичны между собой, а их главным отличием является степень выраженности того или иного морфологического признака.

Следовательно, определение микроскопических характеристик серого и белого вещества в компонентах головного мозга в процессе старения является важной задачей, так как полученные данные могут быть использованы в качестве референсных показателей при исследовании нейродегенеративных заболеваний. Кроме того, необходимо отметить, что обнаруженные различия в количественных и качественных инволютивных характеристиках головного мозга могут быть обусловлены особенностями клеточных механизмов старения, которые также требуют дальнейшего изучения.

## **1.2. Актуальные аспекты изучения клеточных механизмов старения головного мозга**

По мере усовершенствования методов исследования в клеточной и молекулярной биологии, а также развития других фундаментальных дисциплин, сформировалось большое количество теорий старения, которые в той или иной мере применимы и к старению нервной ткани головного мозга. В настоящее время наиболее актуальным является комплексный подход к изучению проблемы, а наиболее перспективной является объединенная теория, согласно которой существует генетическая детерминированность этого процесса, проявляющаяся

снижением энергетического уровня в клетках за счет увеличения продукции активных форм кислорода (АФК), нарушением соотношения анаболизма и катаболизма, изменением репаративных процессов, активацией инфламмасом (специализированных белковых комплексов, запускающих каскад воспалительных реакций), подавлением клеточной пролиферации и формированием сенесцентного фенотипа клеток, возникающего при блокировке клеточного цикла и характеризующегося увеличенным размером клеток, снижением их функциональной активности и ответа на различные факторы роста, повышенной активностью  $\beta$ -галактозидазы, а также паракринными изменениями [18;41;43;56;58;92;98].

За последние десятилетия также было показано, что старение головного мозга на клеточном уровне ассоциировано с накоплением дефектных ультраструктурных компонентов клетки и поврежденных нейротоксичных белков. Следовательно, обеспечение функционального пула нейронов головного мозга при старении ассоциировано с адаптивным напряжением системы аутофагоцитоза [96;97;98;102].

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что в координации обменных процессов и поддержании внутриклеточного гомеостаза принимают участие и митохондрии [26;53;61;77;123]. Дисфункциональные органеллы могут оказывать влияние на старение и развитие возраст-ассоциированных нейродегенеративных заболеваний как за счет сниженной продукции АТФ и выработки АФК, так и посредством инициации каскада апоптотических и воспалительных реакций, активации инфламмасом, нарушения процесса передачи сигнала между синапсами [21;53;54;61;77].

Митохондриальная дисфункция, сниженный митохондриальный биогенез и нарушения в системе «контроля качества» митохондрий (комплекс факторов, отвечающих за поддержание структурно-функциональной активности митохондрий) могут нарушать процесс передачи сигнала между органеллами, например, между внешней митохондриальной мембраной и эндоплазматическим

ретикулумом [89]. АФК, основным источником которых являются митохондрии, вызывают различные клеточные повреждения, однако за последнее десятилетие появились данные, свидетельствующие о том, что выработка активных форм кислорода является своеобразным компенсаторным процессом в ответ на клеточный стресс и повреждения [15].

С учетом вышеперечисленных данных можно сделать вывод о том, что в постмитотических популяциях клеток, к которым относятся нервная ткань, клеточный гомеостаз в первую очередь обеспечивается поддержанием специализированной цитоплазмы. Этот процесс контролируется несколькими системами, среди которых следует выделить систему «контроля качества» митохондрий и систему аутофагии. Следовательно, ввиду морфофункциональных особенностей нервной ткани, митохондрии и аутофагоцитоз играют одну из ключевых ролей в поддержании функционального пула этих клеточных популяций.

### **1.3. Роль аутофагоцитарной дисфункции в процессе старения**

Поддержание тканевого гомеостаза в постмитотических клеточных популяциях в процессе старения обеспечивается за счет утилизации дисфункциональных белков и органелл посредством аутофагии [164]. Аутофагия (аутофагоцитоз) – это фундаментальный процесс, задачей которого является деградация широкого спектра цитозольных субстратов (от отдельных белков и крупных белковых агрегатов до целых органелл) для последующего синтеза энергии, внутриклеточных строительных белков и новых ферментов. Различают два основных вида аутофагии – макроаутофагию и шаперон-индуцированную аутофагию (ШИА)[78].

#### ***1.3.1. Макроаутофагия***

Макроаутофагия – это основной путь аутофагии, который играет важную роль в поддержании клеточного гомеостаза [160]. Этот процесс является основным защитным механизмом, который позволяет клеткам функционировать даже при воздействии таких факторов стресса как энергетическая депривация и

гипоксия, отсутствие факторов роста, воздействие активных форм кислорода, повреждение ДНК. Задачей аутофагии является переработка собственных компонентов клетки с последующим синтезом энергии, внутриклеточных строительных белков и новых ферментов [14].

Процесс аутофагии начинается со сборки фагофора (Рисунок 1) – мембранной структуры, которая захватывает из цитоплазмы специфический субстрат, например, цитозольные белки, митохондрии, рибосомы, которые более устойчивы к деградации посредством убиквитин-подобной системой конъюгации [14]. Регуляция активности аутофагии обеспечивается за счет сигнального пути PI3K/AKT/mTOR, чувствительного к количеству аминокислот и ростовых факторов в клетке, а также за счет сигнального пути AMPK, реагирующего на уровень АТФ [148;150].

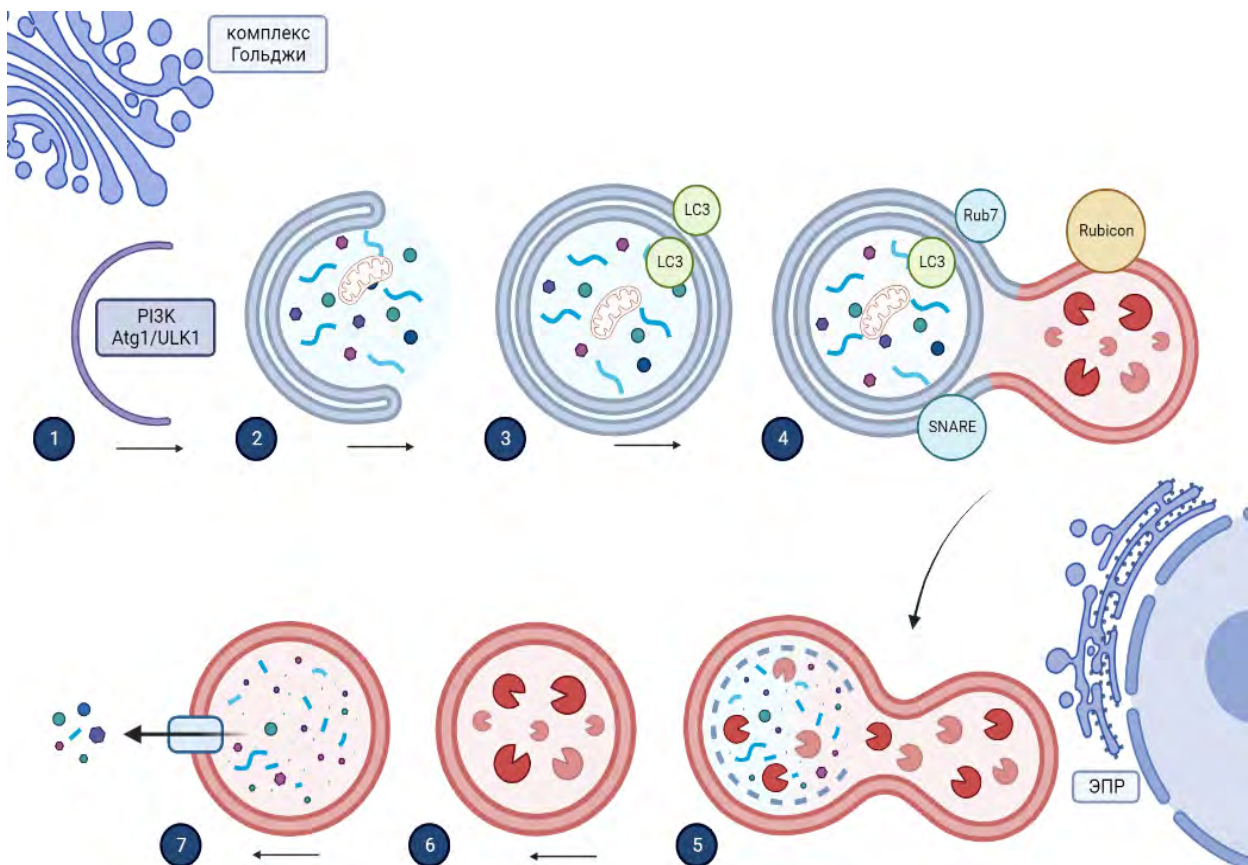


Рисунок 1 – Схематичное изображение процесса макроаутофагии. 1 – формирование фагофора посредством PI3K и Atg1/ULK1; 2 – секвестрация субстрата для утилизации и увеличение размера фагофора, 3 – формирование



аутофагосомы посредством LC3-комплекса, расположенного на ее внешней и внутренней мембране; 4 – докинг аутофагосомы и лизосомы за счет Rab7, RUBICON, SNARE, а также элиминация LC3 с наружной мембраны аутофагосомы; 5 – слияние аутофагосомы и лизосомы; 6 – формирование аутолизосомы и гидролитическое расщепление доставленного субстрата; 7 – экспорт вновь образованных макромолекул обратно в цитоплазму. Разработано автором.

Потенциальными источниками для построения самой структуры фагофора являются комплекс Гольджи, эндосомы, эндоплазматический ретикулум, митохондрии и клеточная мембрана. Сборка фагофора *de novo* обеспечивается посредством двух инициаторных белковых комплексов, расположенных в цитоплазме клетки. Это PI3K (class III PI3K complex I), состоящий из протеинов, каталитических и регуляторных субъединиц, а также комплекс Atg1/ULK1, локализованный в непосредственной близости к эндоплазматическому ретикулуму [59;107;148]. На следующем этапе происходит рекрутирование белков семейства Atg (autophagy-related proteins), нуклеация изолирующей мембраны и образование фагофора. Постепенно расширяясь и удлиняясь, вышеописанный ультраструктурный комплекс формирует двумембранную аутофагосому, важную роль в регуляции образования которой играет убиквитин-подобная система конъюгации LC3, расположенная на внутреннем и внешнем слое мембраны фагофора [107].

Впоследствии докинг (лиганд-рецепторное взаимодействие) аутофагосомы с лизосомой (одномембранной везикулой, отделившейся от аппарата Гольджи и содержащей кислые гидролазы) приводит к формированию аутолизосомы. Этот процесс регулируется различными белками, например, Rab7, RUBICON, SNARE, расположенными как на мембране аутофагосомы, так и на мембране лизосомы [59;107;111;148;162]. В просвете аутолизосомы субстрат подвергается деградации с последующим образованием макромолекул, которые снова попадают в цитозоль для включения в метаболические процессы клетки [148;162].

Следует отметить, что фаголизосомы расположены перинуклеарно, в то время как аутофагосомы локализуются в цитоплазме повсеместно и транслоцируются в перинуклеарную область клетки при помощи системы микротрубочек [148;150].

В исследованиях *in vivo* и *in vitro* было выявлено, что в нейронах созревание аутофагосом происходит в терминальных ветвлениях аксонов, где в дальнейшем они транспортируются в сому нейрона ретроградным путем для слияния с лизосомой. Под воздействием неблагоприятных внешних факторов при старении в аксонах происходит избыточное созревание аутофагосом, которое превышает скорость их клиренса. В результате аутофагосомы накапливаются в аксонах, что приводит к отеку и «веретеновидной» трансформации отростков нейронов [134].

### ***1.3.2. Шаперон-индуцированная аутофагия***

Шаперон-индуцированная аутофагия – вид селективной аутофагии, направленный на удаление белков, содержащих мотив KFERQ. Такие белки распознаются и соединяются с цитозольным комплексом шаперона HSP70 и его кошаперонами HSP40 и HSP90 [17;162]. Образовавшийся комплекс присоединяется к мембранному рецептору LAMP2A, который способствует перемещению субстрата в просвет лизосомы с дальнейшим ферментативным гидролизом (Рисунок 2). Этот тип аутофагоцитоза активируется в условиях длительной (более 10 часов) энергетической депривации, а также в ответ на окислительный стресс или снижение активности макроаутофагии [84;159].

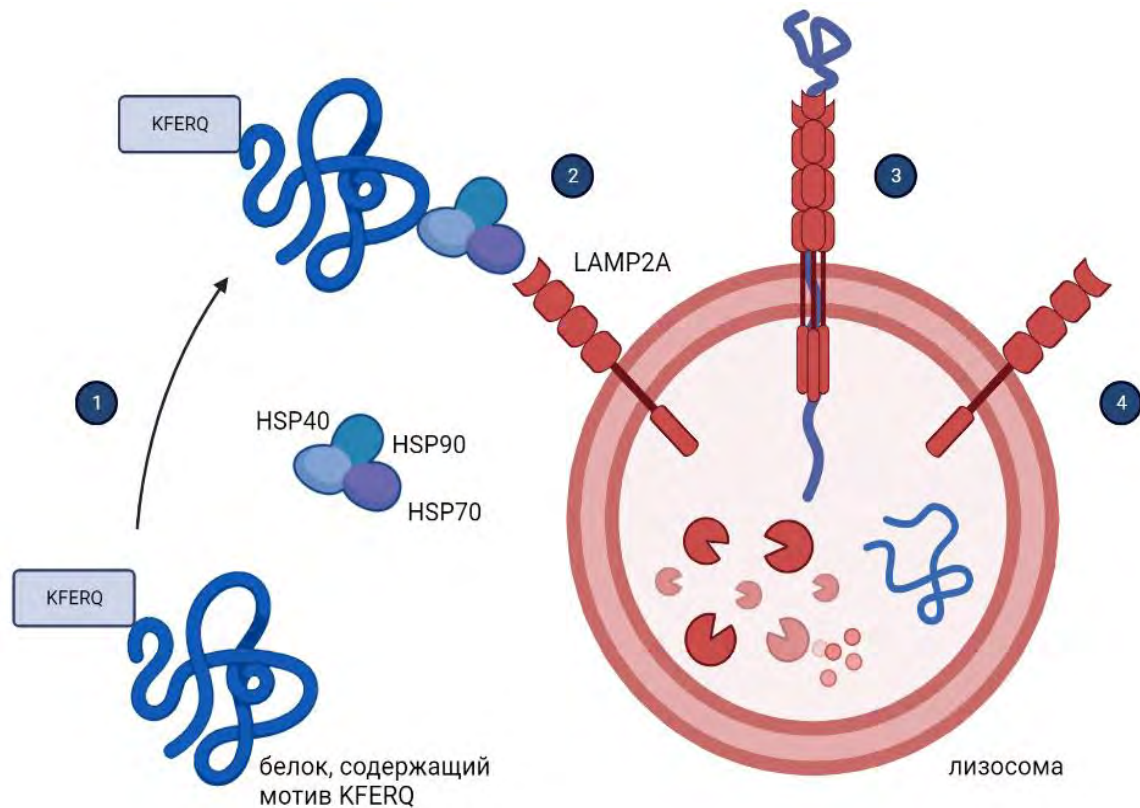


Рисунок 2 – Схематическое изображение шаперон-индуцированной аутофагии. 1 – соединение шаперона HSP70, кошаперонов HSP40, HSP90 с белком, содержащим KFERQ-мотив; 2 – взаимодействие вновь образованного комплекса с рецептором LAMP2A; 3 – мультимеризация LAMP2A, образование канала и транслокация белка в просвет лизосомы; 4 – деградация белка с помощью лизосомальных протеаз и деполимеризация рецептора LAMP2A. Разработано автором.

Учитывая эти данные, можно сделать вывод о том, что ШИА является важным механизмом удаления агрегированных функциональных долгоживущих цитоплазматических белков, что крайне важно для поддержания высокоспециализированной цитоплазмы постмитотических клеточных популяций, таких как нейроны. Кроме того, известно, что система шаперонов участвует и в поддержании протеостаза [17;162]. В свою очередь, нарушение ШИА приводит к неправильному фолдингу белков и, как следствие, нарушению утилизации конформационно дефектных белков, обладающих нейротоксичностью. Этот процесс лежит в основе многих нейродегенеративных заболеваний. Так, например, нарушенная функция ШИА является патогенетиче

ским звеном при болезни Альцгеймера и приводит к аккумуляции тау-белков и  $\beta$ -амилоида,  $\alpha$ -синуклеина при болезни Паркинсона, мутантного белка polyQ-хантингтина при хорее Гентингтона, а также белка TDP-43 при фронтотемпоральной деменции [24;47;94;124;147].

Более того, ШИА может опосредованно контролировать качество митохондрий при помощи удаления из цитоплазмы дисфункционального белка DJ-1, регулирующего митохондриальный биогенез и содержащего KFERQ последовательность аминокислот [60;139;150;151;152]. Следовательно, данный тип аутофагии играет значительную роль в поддержании энергонезависимой нервной ткани.

### ***1.3.3. Потенциальные механизмы аутофагоцитарной дисфункции при старении***

В настоящее время существуют данные, указывающие на то, что на фоне изменения активности аутофагии в процессе старения сенильные проявления на клеточном уровне могут быть связаны с нарушением протеостаза, митохондриальной дисфункцией и накоплением активных форм кислорода, а также нестабильностью клеточного генома [162].

Для неделящихся клеток, таких как нейроны, аутофагия является важным регулятором клеточного гомеостаза посредством поддержания протеостаза – совокупности механизмов для обеспечения нормального функционирования клеточных белков. С течением времени изменения в системе аутофагоцитоза могут приводить к накоплению агрегированных белков и поврежденных органелл, обладающих нейротоксичностью. Все вышеперечисленное препятствует правильному аксональному транспорту, ремоделированию дендритов и аксонов, что снижает пластичность нервной ткани [28;96;106].

Другим фактором, который может нарушить внутриклеточный гомеостаз с течением времени, является гиперпродукция активных форм кислорода. В ответ на изменение окислительно-восстановительного потенциала в клетке происходит индукция аутофагии, которая направлена на снижение количества активных форм

кислорода [36], основными источниками которых являются митохондрии. Этот процесс обеспечивается селективной утилизацией поврежденных форм данных органелл – митофагией [7;55].

Митофагия – процесс избирательной утилизации поврежденных митохондрий посредством аутофагосомальной деградации [59]. В результате нарушения процесса митофагии в клетке происходит накопление дисфункциональных митохондрий и, как следствие, гиперпродукция АФК. Последние способствуют повреждению как внутриклеточных органелл, так и отдельных клеток. Особенно подвержены повреждению АФК сами митохондрии. Это обусловлено недостатком гистонов и менее эффективными процессами репарации митохондриальной ДНК (мтДНК), что делает ее склонной к накоплению большого количества мутаций [57;85].

Кроме того, существует несколько исследований, доказывающих, что аутофагия является важным процессом в поддержании генетического аппарата клетки. Во-первых, с помощью аутофагии может быть обеспечена стабильность генома за счет ее участия в деградации микроядер [36]. Кроме того, мишенью аутофагии могут являться ретротранспозоны, что в свою очередь предотвращает новые вставки в геном. Также известно, что снижение активности аутофагии способствует накоплению комплекса p53 и трансформирующего белка RHOA, что приводит к анеупloidии и многоядерности клеток вследствие нарушения цитоскелета и сократительного кольца при клеточном делении [28].

Несмотря на многие исследования в области клеточной и молекулярной биологии, указывающие на роль аутофагии в процессах возрастной инволюции и возраст-ассоциированных заболеваний, механизмы ее влияния на старение организма изучены недостаточно и представляют важную цель для будущих исследований в области геронтологии.

#### **1.4. Роль митохондриальной дисфункции в процессе старения**

Нервная ткань является одной из наиболее энергозависимых тканей всего организма. Уровень энергии в нервных клетках поддерживается путем

окислительного фосфорилирования, происходящего в митохондриях, что позволяет нейронам поддерживать электрохимический градиент и нейротрансмиттерную активность [54]. Помимо энергетической функции, митохондрии играют важную роль в поддержании кальциевого гомеостаза, крайне необходимого для синаптической передачи и пластичности нейронов. Кроме всего вышеперечисленного, митохондрии участвуют в орнитинном цикле, биосинтезе гема, синтезе стероидов, регуляции апоптоза, противовирусной защите, а также регуляции процессов дифференцировки и пролиферации клеток [19;21;26;122].

Многие исследования доказывают, что митохондриальная дисфункция может рассматриваться как типовой патологический процесс, тесно связанный с биологией старения [11]. К изменениям, характеризующим данное состояние, можно отнести прогрессирующую дезорганизацию структуры митохондрий, избыточную продукцию АФК, накопление мутаций митохондриальной ДНК, подавление ферментов комплексов дыхательной цепи и нарушение функции окислительного фосфорилирования, снижение продукции АТФ с развитием биоэнергетического дефицита [90;110;145;153].

Следовательно, выявление взаимодействия между вышеупомянутыми ключевыми маркерами дисфункции митохондрий и их относительным вкладом в старение представляется крайне важной задачей для установления фармацевтических мишеней при изменениях головного мозга, вызванных возрастной инволюцией.

#### ***1.4.1. Изменение морфологии митохондрий с возрастом***

Митохондрии являются динамичными органеллами и характеризуются постоянным ремоделированием митохондриальной архитектуры. С развитием современных технологий на смену концепции статичности и изолированности митохондрий, пришло понятие структурно-морфологического динамизма. Такие свойства митохондрий как подвижность и пластичность позволяют им адаптироваться к метаболическим изменениям в клетке [104].

Морфологический переход от отдельной органеллы к сложным трубчатым митохондриальным сетям регулируется белками, контролирующими деление (Drp1, hFis1, эндофилин B1) и слияние (например, митофузинами 1 и 2). Известно, что ассоциированный с делением белок hFis1 связан с клеточной сенесценцией и процессом старения в целом [90;103; 163]. Об этом свидетельствуют данные, полученные при использовании РНК-интерференции для уменьшения экспрессии вышеописанного белка, что приводило к изменению формы митохондрий, снижению их мембранного потенциала, повышению образования АФК и повреждению ДНК [90].

Результаты исследований, полученные при помощи электронной микроскопии, свидетельствуют в пользу прогрессирующей с возрастом митохондриальной дезорганизации, наиболее выраженной в постмитотических клетках. К структурным изменениям митохондрий, связанным со старением, можно отнести уменьшение общего количества митохондрий, увеличение их размера и уменьшение количества митохондриальных крист [90]. Пространство внутри митохондрий становится более плотным, отмечается деформация крист и утрата митохондриальных гранул, гомогенизация матрикса с накоплением в нем хлопьевидного материала, фокусов обызвествления, обнаруживаются дефекты наружной митохондриальной мембраны [11].

В соответствии с типом ткани, типом клеток и внутриклеточной локализацией, при старении митохондрии могут характеризоваться различной формой и величиной. Такие структурно-функциональные различия были обнаружены в нейронах фронтальной коры, где эти органеллы имели тенденцию к слиянию, в то время как в CA1 и зубчатой извилине гиппокампа митохондрии приобретали более мелкие, сферические формы. В аксонах митохондрии были округлой формы и небольшого размера, в дендритах же они имели удлиненную форму и имели большее количество трубчатых крист [54].

Таким образом, митохондриальная динамика формирует важный механизм клеточной адаптации и во многом влияет на жизненный цикл клетки, а изменение

экспрессии белков слияния и деления, приводящее к изменению морфологии этих органелл, играет значимую роль в патофизиологии старения клетки [128].

#### 1.4.2. Окислительный стресс и биоэнергетический дефицит

В начале 1950-х годов Harman предложил «свободнорадикальную теорию старения» и утверждал, что свободные радикалы, образующиеся в митохондриях как побочные продукты нормального обмена веществ, могут быть причиной старения и ассоциированных с возрастом дегенеративных заболеваний [76;118].

Считается, что большая часть внутриклеточных АФК образуется при окислительно-восстановительных реакциях в дыхательной цепи митохондрий. Во время дыхания супероксид-анионы и органические свободные радикалы образуется в основном за счет «утечки» электронов с ферментных комплексов I и III дыхательной цепи митохондрий (Рисунок 3). Вследствие этого примерно 2-5% поступающего кислорода переходит в активные формы, к которым относится супероксид анион-радикал, перекись водорода, гидроксильный радикал, синглетный кислород [15;76].

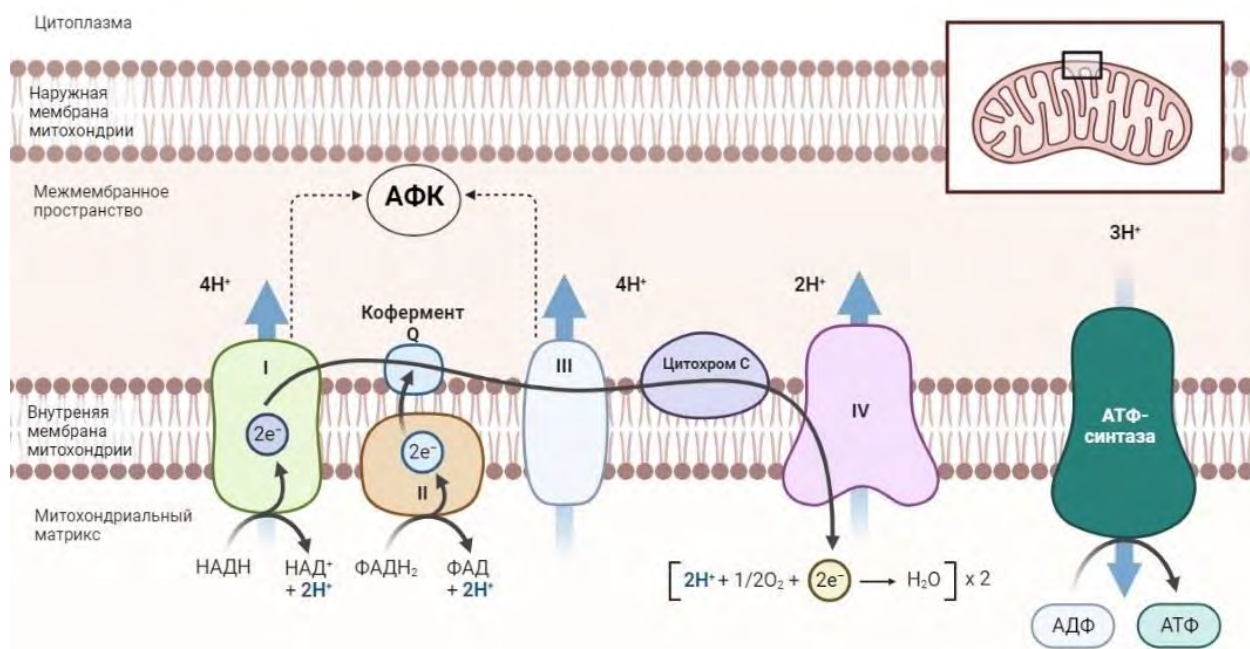


Рисунок 3 – Схематичное изображение дыхательной электротранспортной цепи митохондрий, состоящей из НАДН-дегидрогеназного комплекса (ферментный комплекс I), сукцинатдегидрогеназы (ферментный комплекс II), кофермента Q,



комплекса цитохромов b-c1 (ферментный комплекс III), цитохром C, цитохромоксидаза (ферментный комплекс IV) и АТФ-синтаза (ферментный комплекс V). При «утечке» электронов с I и III ферментных комплексов образуются активные формы кислорода. Разработано автором.

Митохондрии, являясь основным источником АФК, более всех других органелл подвержены их воздействию. Для предотвращения негативных эффектов данных токсичных метаболитов, в митохондриях существуют антиоксидантные ферменты, нейтрализующие АФК, например, супероксиддисмутаза (СОД), пероксидаза, глутатионпероксидаза [76].

При митохондриальной дисфункции происходит нарушение процессов детоксикации АФК, способствующее их избыточному накоплению и развитию окислительного стресса, который индуцирует повреждение мембран митохондрий, электронтранспортной цепи (посредством инактивации железо-серных центров комплекса I – III) и митохондриальной ДНК с развитием биоэнергетического дефицита [125]. Среди различных типов клеток нейроны наиболее уязвимы к истощению АТФ, поскольку большинство их функций напрямую зависят от наличия энергии, получаемой при метаболизме митохондрий [75;87; 102].

В настоящее время существует все больше доказательств того, что определенную роль в снижении дыхательной функции митохондрий в стареющих постмитотических клетках играет накопление с возрастом мутаций митохондриальной ДНК (мтДНК) [83; 158]. Это может быть связано с тем, что митохондриальный геном кодирует 13 гидрофобных полипептидных цепей ферментных комплексов митохондриальной цепи переноса электронов, необходимых для нормального функционирования системы окислительного фосфорилирования [42]. Поврежденная мтДНК не вызывает изменений в биохимическом профиле клетки до тех пор, пока мутантная нагрузка не достигнет определенного уровня. Если мутировавшая молекула мтДНК реплицируется с дальнейшим развитием клональной экспансии, в такой клетке может происходить

подавление активности ферментных комплексов I-V, нарушение окислительного фосфорилирования и снижение продукции АТФ соответственно [32;68]. Формирование биоэнергетического дефицита может привести к гибели клеток, а также клеточной и тканевой дисфункции [90].

Совокупность вышеописанных данных свидетельствует о наличии корреляционной связи между старением и накоплением мутаций митохондриальной ДНК, нарушением окислительного фосфорилирования, биоэнергетическим дефицитом, а также избыточной продукцией АФК, что и легло в основу «митохондриальной теории» старения. Однако в настоящее время также существуют данные о том, что АФК могут принимать участие во внутриклеточном сигналинге. Например, АФК являются сигнальными молекулами при активации транскрипционных белков при иммунном ответе, апоптозе и делении клетки [67;70;129].

Таким образом, свободные радикалы и другие АФК в зависимости от воздействующих на клетку внешних факторов могут либо способствовать процессу адаптации, либо инициировать прямое деструктивное действие на клеточные структуры, что и является одним из признаков старения организма.

#### ***1.4.3. Нарушение системы «контроля качества» митохондрий***

К другим механизмам, приводящим к дефектной биоэнергетике, можно отнести угнетение процессов митофагии и митохондриального биогенеза [45].

Митофагия – процесс селективной утилизации митохондрий посредством аутофагосомальной деградации. Митофагии предшествует деполяризация митохондриальной мембраны, что свидетельствует о специфичности удаления именно поврежденных форм [11]. Такие дисфункциональные органеллы способствуют снижению уровня АТФ в клетке, увеличивают продукцию активных форм кислорода, а при деструкции – запускают механизмы апоптоза, что делает своевременное удаление поврежденных митохондрий крайне значимым для поддержания клеточного гомеостаза. Прогрессирующее с возрастом снижение митофагии приводит к митохондриальной дисфункции и

старению [73;136], а исследования последних десятилетий показали, что многие нейродегенеративные болезни связаны с нарушенной митофагией, приводящей к накоплению нейротоксичных белковых агрегатов [57].

Митохондриальный биогенез можно рассматривать как рост и деление ранее существовавших митохондрий, сопровождающиеся изменениями числа, размера и массы митохондрий. Митохондриальный биогенез требует синтеза белков и липидов, а также репликации мтДНК и включает в себя скоординированную экспрессию митохондриальных и ядерных генов. Специфический механизм митохондриального биогенеза сложен и связан с транскрипционной сетью, включающей в себя ДНК-связывающие факторы и коактиваторы [63].

В транскрипционной сети центральную роль занимает коактиватор PGC-1 $\alpha$ , который координирует многочисленные ДНК-связывающие факторы и интегрирует разнообразные сигналы, влияющие на митохондриальный биогенез [63;64]. По данным исследования, опубликованного в 2019 году J.F. Halling, была показана роль p53-опосредованной блокировки PGC-1 $\alpha$  с дальнейшим развитием аномального митохондриального биогенеза [64]. Последний, как известно, тесно связан со старением и такими нейродегенеративными заболеваниями, как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз [64].

Хотя до конца остается неясным, является ли митохондриальный биогенез причиной или вторичной реакцией на нейродегенерацию и клеточную сенесценцию, повышение уровня PGC-1 $\alpha$  и индукция митохондриального биогенеза лекарственными средствами значительно улучшает физиологические показатели в моделях лабораторных животных [63;69], что делает поиск эффективных подходов к усилению митохондриального биогенеза крайне перспективным.

### **1.5. Взаимодействие митохондрий и системы аутофагоцитоза**

Известно, что митохондрии и компоненты системы аутофагии выступают в качестве фундаментальных сигнальных платформ, которые регулируют многие

ключевые процессы для поддержания адекватного функционирования клетки как единой системы [50;65;119;135].

Несмотря на клеточную компартментализацию, между митохондриями и аутофагией существует тесная взаимосвязь, необходимая для координации различных процессов внутри клетки [126;135]. На основании последних исследований можно предположить, что их нарушенное перекрестное взаимодействие сказывается критически на клеточных функциях [126]. В связи с этим, изучение изменений взаимосвязи между митохондриями и аутофагией может дать представление о механизмах старения, а также возраст-ассоциированных заболеваниях.

#### ***1.5.1. Митохондрии и формирование фагофора***

До сих пор вопрос о том, что именно является строительным материалом для сборки фагофора на этапе инициации остается открытым. Считается, что источником для формирования мембраны фагофора могут быть такие органеллы как эндоплазматический ретикулум (ЭПР), аппарат Гольджи, плазматическая мембрана, эндосомы [119;143]. Однако по данным последних исследований этот список был также дополнен митохондриями.

В настоящее время существует ряд доказательств, подтверждающих роль митохондрий в аутофагосомном биогенезе в условиях энергетической депривации. Известно, что белки, регулирующие процесс сборки фагофора (например, Beclin 1) экспрессируются не только в ЭПР, но и в митохондриях. Beclin 1 является частью про-аутофагического комплекса PI3K класса III, который участвует в инициации сборки фагофора. Ранее считалось, что инициация Beclin 1-зависимой аутофагии регулируется исключительно на уровне ЭПР, но последние данные свидетельствуют в пользу того, что значительный вклад в образование Beclin 1-зависимой аутофагосомы вносят митохондрии [119;154].

Другим белком, который может связывать митохондрии с формированием аутофагосом, является эндофилин B1. В нормальных условиях данный белок находится в цитозоле клетки, а в условиях стресса может рекрутироваться на

внешней митохондриальной мембране, где он активирует ранее описанный инициаторный комплекс PI3K класса III через связывание адаптера Beclin 1 [119].

### ***1.5.2. Митохондрии как регуляторы активности аутофагии***

Регуляция активности аутофагии при помощи митохондрий контролируется посредством сигнальных путей AMPK и mTOR, которые зависят от уровня энергии в клетке, а снижение уровня АТФ может индуцировать аутофагию AMPK/mTOR-зависимым образом. АФК, которые также являются митохондриальным продуктом, могут оказывать влияние на процесс аутофагии через аутофагический белок ATG4, чувствительный к окислительно-восстановительному потенциалу [119].

Однако обнаружена и обратная связь, при которой эти сигнальные пути могут регулировать функции и биогенез митохондрий. Например, фармакологическое ингибирование mTOR влияет на метаболизм митохондрий и снижает окислительное фосфорилирование [119].

### ***1.5.3. Митофагия***

Кроме вышеперечисленных механизмов взаимосвязи между митохондриями и аутофагией, также необходимо отметить, что митохондрии могут являться непосредственным субстратом для лизосомы. Такой вид селективной утилизации митохондрий посредством лизосомальной деградации носит название митофагии [45; 65].

Митофагия является сложным многокомпонентным процессом, обеспечивающим контроль качества и количества митохондрий путем элиминации поврежденных форм этих органелл. Как было уже упомянуто выше (раздел 3.3), митофагия ограничивает выработку активных форм кислорода, накопление мутаций мтДНК, а также препятствует снижению продукции АТФ. Таким образом, этот тип селективной макроаутофагии контролирует различные факторы, которые могут способствовать старению и нейродегенерации [141].

В настоящее время в нервной ткани различают несколько типов митозагии: PINK1–Parkin-зависимая митозагия, PINK1–Parkin-независимая митозагия и транскеллюлярная митозагия.

### 1. PINK1-Parkin-зависимая митозагия

Первым событием в контроле качества митохондрий с помощью данного подтипа митозагии является выявление поврежденных митохондрий с деполяризованным мембранным потенциалом (Рисунок 4). По сравнению со здоровыми митохондриями они накапливают PTEN-индуцированную киназу 1 (PINK1) на внешней мембране, где она связывает и активирует Parkin (PARK2) посредством фосфорилирования его серинового остатка (Ser65). В дальнейшем вышеописанный каскад реакций приводит к убиквитинированию митохондриальных белков (например, митофузина 1, митофузина 2), встроенных в наружную мембрану митохондрий. С Parkin-убиквитинированными митохондриальными субстратами связывается убиквитин-связывающий адаптер p62, затем образованный белковый комплекс соединяется с белком LC3, расположенным на аутофагосоме [136].

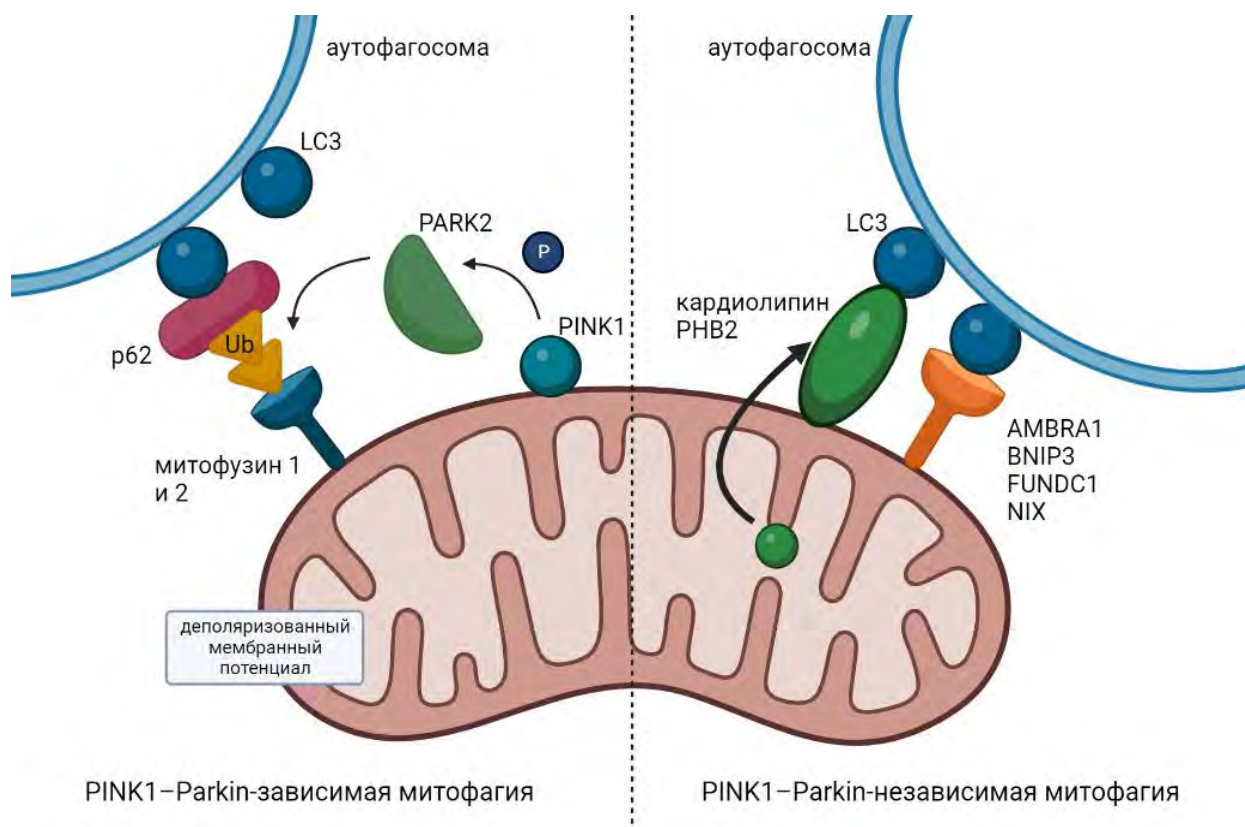


Рисунок 4 – Схематичное изображение различных типов митофагии. Разработано автором.

## 2. PINK1-Parkin-независимая митофагия

PINK1-Parkin-независимая (рецептор-опосредованная) митофагия (Рисунок 4) активируется при определенных условиях (например, токсины или гипоксия) через митохондриальные рецепторы, содержащие мотивы LIR. К ним относятся белки внешней митохондриальной мембраны, например, AMBRA1, BNIP3, FUNDC1 и NIX, а также белки внутренней митохондриальной мембраны, такие как кардиолипин и PNH2. Впоследствии вышеперечисленные рецепторы митофагии связываются с аутофагосомным белком LC3, опосредуя митофагию [138].

## 3. Трансцеллюлярная митофагия

Результаты ряда исследований продемонстрировали экзоцитоз митохондрий из клеток с их последующим эндоцитозом/фагоцитозом. В головном мозге нейроны высвобождают митохондрии в синапсах, затем внеклеточные митохондрии поглощаются глиальными клетками путем фагоцитоза [49;108]. Это явление называется трансцеллюлярной митофагией (Рисунок 5). Кроме того, был описан обратный процесс митохондриального транспорта от глиальных клеток к нейронам, что позволяет расценивать этот процесс как альтернативный метод передачи сигналов между клетками. Точный механизм трансклеточной митофагии в нейронах плохо изучен, но можно предположить важную роль белка UCP2, который участвует в регуляции выработки активных форм кислорода [66;85].

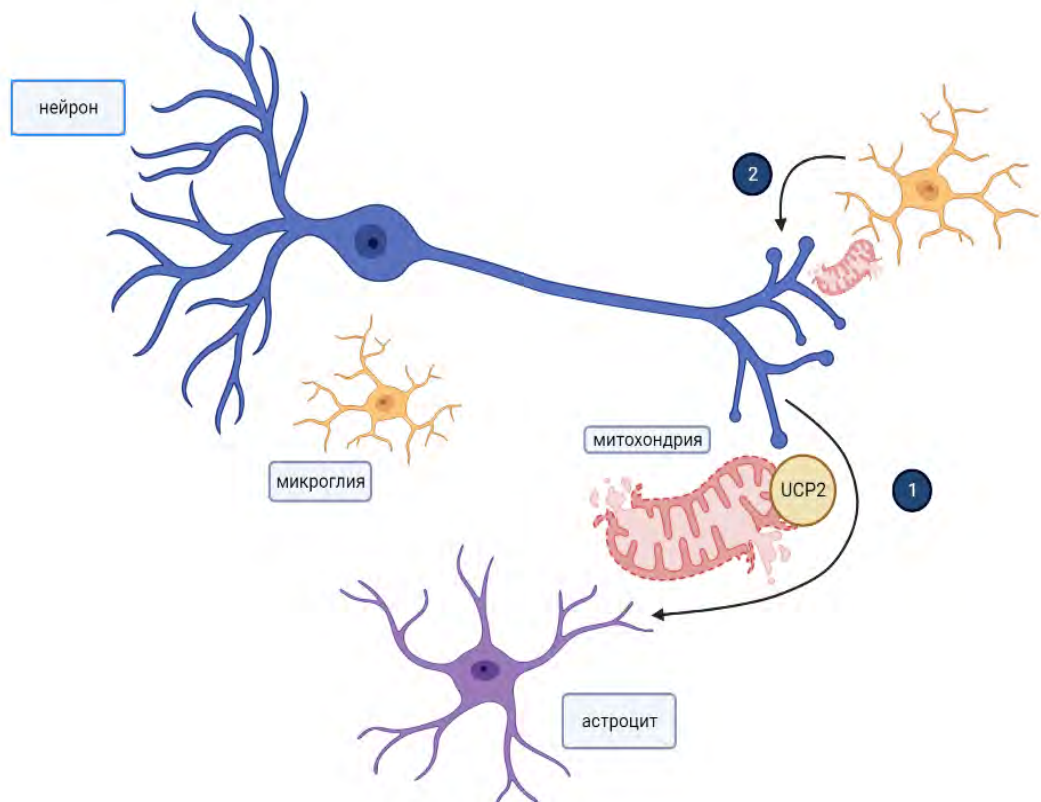


Рисунок 5 – Схематичное изображение трансцеллюлярной митохондриальной коммуникации. 1 – поврежденные митохондрии подвергаются экзоцитозу в синапсах, затем внеклеточные органеллы захватываются соседними глиальными клетками посредством эндоцитоза или фагоцитоза; 2 – обратный процесс митохондриального транспорта от глиальных клеток к нейронам. Разработано автором.

Митофагия является сложным многокомпонентным процессом, обеспечивающим контроль качества и количества митохондрий путем элиминации поврежденных форм этих органелл. Таким образом, митофагия ограничивает выработку активных форм кислорода, накопление мутаций мтДНК, а также препятствует снижению продукции АТФ. Следовательно, этот тип селективной макроаутофагии контролирует различные факторы, которые могут привести к старению и нейродегенерации [141].

Так, в трансгенной линии мышей, экспрессировавшей митохондриально-целевую форму белка Keima (mtKeima), было показано, что уровень митофагии снижается с возрастом в нейронах зубчатой фации гиппокампа [137]. Модели



старения с использованием *Drosophila melanogaster* и *Caenorhabditis elegans* показали увеличение продолжительности жизни при гиперэкспрессии ключевых маркеров PINK1-Parkin-зависимой митофагии [120]. В исследовании, проведенном на мышах в возрасте 24 месяцев, было выявлено увеличение содержания паркина как в ткани головного мозга, так и в сосудах головного мозга [93;144]. У стареющих мышей с нокаутом *Parkin* была обнаружена нарушение стабильности микротрубочек и гибель дофаминовых нейронов, что подчеркивает роль *Parkin* в регуляции подвижности митохондрий [112]. Кроме того, на клеточных моделях было показано, что нейроны подвержены апоптозу в отсутствие PINK1, что подтверждает роль последнего в выживании нейронов при старении [156].

В работе Sere (2014) при изучении митофагии были получены противоречивые данные. При изучении мышинной модели старения и болезни Альцгеймера в гиппокампе было отмечено снижение уровня AMBRA1. Кроме того, в трансгенной модели болезни Альцгеймера это снижение происходило у мышей в более раннем возрасте. Однако в неокортексе обнаруживались повышенные уровни AMBRA1, Beclin1 и LC3II [127].

#### **1.5.4. Митохондрии и ШИА**

Еще одним способом взаимодействия между митохондриями и аутофагией является процесс, упомянутый ранее – ШИА. В рамках этого механизма белки с определенной аминокислотной последовательностью KFERQ распознаются и связываются с белком HSP70. В дальнейшем лизосомальный рецептор LAMP2A, расположенный на лизосоме, связывается с вновь образованным комплексом из субстрата и шаперонов, который затем перемещается из цитозоля в просвет лизосомы и подвергается расщеплению [84].

Одним из примеров белков, содержащих мотив KFERQ, является белок DJ-1. Его роль в клетке крайне важна, так как DJ-1 выполняет в клетке такие функции как, контроль митохондриального биогенеза и защита митохондрий от повреждений при воздействии на них АФК. Известно, что мутация в гене DJ-1

приводит к митохондриальным дефектам и ассоциирована с аутосомно-рецессивным типом наследования болезни Паркинсона [109].

Нефункционирующие белки DJ-1, поврежденные активными формами кислорода, элиминируются из клетки посредством ШИА. Таким образом, данный тип аутофагоцитоза играет важную роль в контроле качества митохондрий и поддержании митохондриального гомеостаза в процессе старения.

Вышеописанные данные позволяют предположить, что взаимодействие между митохондриями и аутофагией осуществляется по принципу «обратной связи» (Рисунок 6). С одной стороны, аутофагия индуцируется для защиты от различных типов митохондриального стресса, помогая таким образом противодействовать гиперпродукции активных форм кислорода, а также адаптировать энергетический метаболизм к различным требованиям клетки.

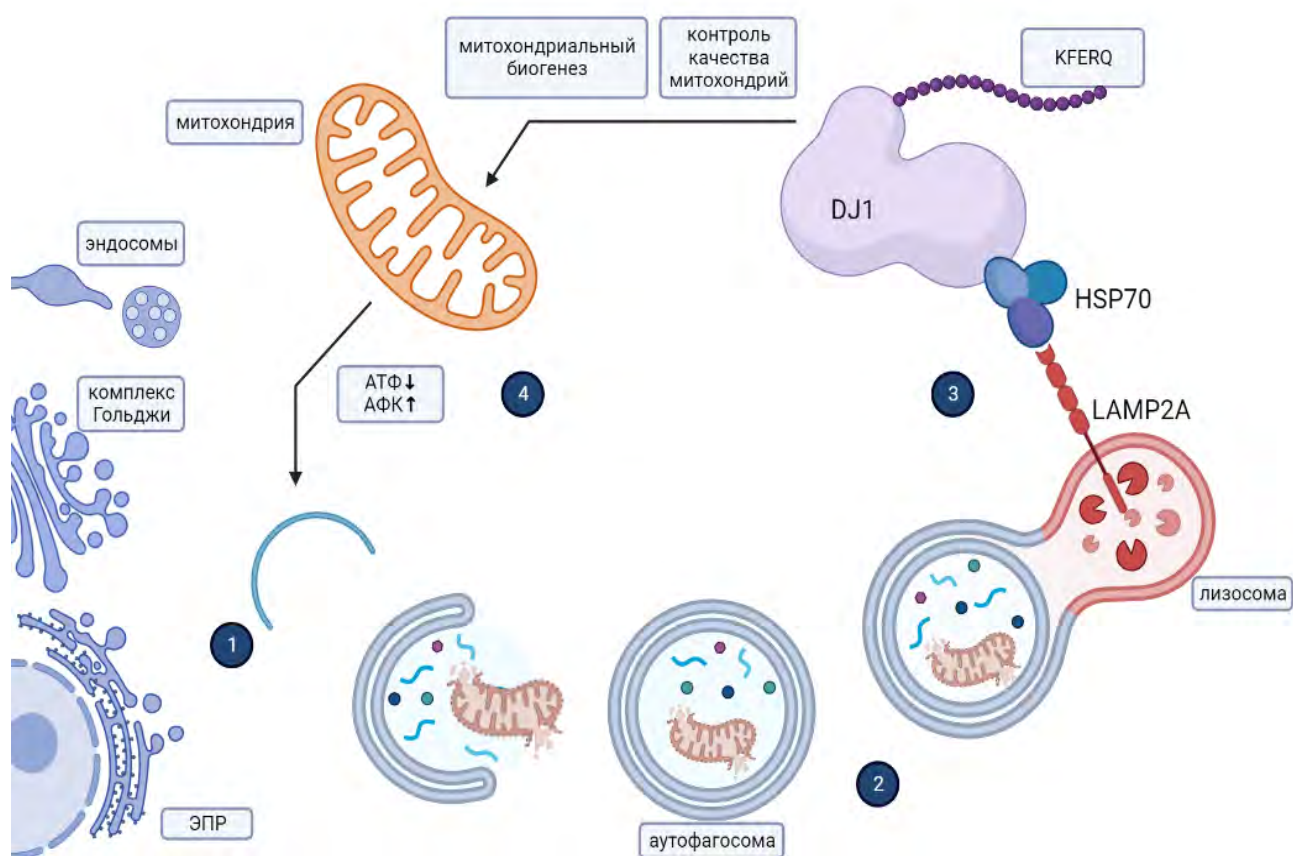


Рисунок 6 – Взаимосвязь митохондрий и аутофагии. 1 – формирование фагофора при помощи митохондрии, ЭПР, комплекса Гольджи и эндосом; 2 – регуляция контроля качества митохондрий при помощи митофагии; 3 – регуляция

митохондриального биогенеза и контроля качества митохондрий путем удаления дисфункционального белка DJ-1 посредством шаперон-индуцированной аутофагии; 4 – инициация формирования фагофора при помощи регуляции энергетического уровня в клетке. Разработано автором.

С другой стороны, изменение различных внутриклеточных параметров с помощью митохондрий может модулировать аутофагический процесс. Взаимодействие между митохондриями и различными типами аутофагии необходимо для постоянной корректировки клеточного энергетического обмена в различных патофизиологических условиях, что может оказывать влияние на старение [50;126].

На основании всего вышеперечисленного можно сделать вывод о том, что при старении головного мозга происходит сокращение объема не только серого, но и белого вещества из-за редукции нервных клеток, дегенерации синапсов, нейритов и миелиновых волокон, а большинство изменений, возникающие при старении головного мозга и нейродегенерации морфологически сходны между собой.

При изучении старения на клеточном уровне показано, что большая часть изменений связана с оксидативным стрессом, биоэнергетической недостаточностью, повреждением ультраструктурных компонентов клетки, агрегацией нейротоксических белков. Вышеуказанные процессы могут лежать в основе нейродегенеративных заболеваний, развивающихся с возрастом. Таким образом, поддержание функционального пула нейронов при старении мозга связано с адаптивным напряжением митохондрий, протеостазом и обновлением цитоплазмы нейронов за счет элиминации поврежденных белков и органелл. Однако следует отметить, что в настоящее время в литературе представлены немногочисленные и неоднозначные данные о механизмах взаимодействия между митохондриями и аутофагией в нейронах головного мозга при старении, что определяет актуальность изучения вышеупомянутой взаимосвязи.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

### 2.1. Материал исследования

#### 2.1.1. Секционный материал

Работа выполнена на базе лаборатории нейроморфологии Института мозга Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр неврологии» (ФГБНУ «НЦН»). В отделении патологической анатомии ГКБ №1 им Н.И. Пирогова проводился отбор аутопсийного материала в исследование. Критерии включения: умершие в возрасте 75 лет и более; группа контроля – умершие молодого возраста (35-44 лет). Критерии исключения (для всех возрастных групп): острый и перенесенный инсульт, хронические неврологические и нервно-мышечные болезни, заболевания сердечно-сосудистой и других систем с декомпенсацией (выраженной недостаточностью), острое течение инфекционных, инфекционно-аллергических и аутоиммунных заболеваний, злокачественные опухоли любой локализации III-IV стадии, алкоголизм и наркомания. Кроме того, в исследование не включались умершие с асимптомным гемодинамически значимым атеростенозом церебральных артерий (сужение просвета артерий на 70% и более), а также с артериальной гипертонией 2-3 степени в анамнезе.

Объектом исследования являлся головной мозг 30 умерших старческого возраста, среди которых 10 мужчин и 20 женщин; 10 – молодого возраста, среди которых было 7 мужчин и 3 женщины. Средний возраст умерших в старческом возрасте составил  $84 \pm 7$  лет. Средний возраст в группе молодого возраста составил  $41 \pm 4$  года. Непосредственной причиной смерти пациентов старческого возраста явилась тромбоэмболия легочной артерии, возникшая вследствие тромбоза глубоких вен нижних конечностей или малого таза при наличии у пациентов перелома шейки бедренной кости. Причиной смерти пациентов молодого возраста явилась внезапная сердечная смерть. В медицинской документации всех умерших отсутствовали указания на выраженные когнитивные нарушения и очаговую неврологическую симптоматику. Вместе с тем, у всех пациентов в возрасте 75 лет

и старше имелись клинические данные о наличии артериальной гипертонии 1 степени, у 25 пациентов этого возраста – ишемической болезни сердца в виде стенокардии напряжения, пароксизмальной мерцательной аритмии и постинфарктного кардиосклероза.

Для исследования использовался материал, полученный не позднее 6 часов с момента смерти. После извлечения головного мозга из полости черепа его взвешивали. Затем производили разрез на уровне ростральной половины среднего мозга, отделяя, тем самым ствол и мозжечок от полушарий большого мозга. При макроскопическом исследовании мозга выполняли фронтальные разрезы полушарий большого мозга и ствола с мозжечком толщиной 1 см и 0,5 см, соответственно. При исследовании учитывали такие признаки как сглаженность извилин и уплощение борозд, сужение коры полушарий большого мозга, расширение желудочковой системы, мелкоочаговые изменения в виде постинфарктных псевдокист. С помощью микрометра на вершине левой предцентральной извилины измеряли толщину коры. Кроме того, в каждом случае учитывали степень выраженности атеросклеротического стеноза (атеростеноза) экстракраниальных и интракраниальных артерий, включая артерии виллизиева круга, а также патологию сердца (увеличение массы и толщины миокарда, очаговые изменения, степень выраженности атеростеноза коронарных артерий).

В каждом случае для микроскопического исследования вырезались блоки длиной 2-2,5 см, шириной 1-1,5 см и толщиной 0,5-0,7 см в строго определенных областях головного мозга. Из фронтального среза полушарий большого мозга, выполненного на уровне предцентральных извилин, выделено по одному блоку из срединных частей коры и белого вещества левой предцентральной извилины и подлежащей скорлупы с участками белого вещества и бледного шара по её периферии. Из фронтального среза, выполненного на уровне средней трети гиппокампов, вырезался блок с гиппокампом левого полушария большого мозга. Из фронтального среза среднего мозга, выполненного на уровне середины нижних бугорков четверохолмия, выделен блок черного вещества левой

половины среднего мозга. В единичных случаях при наличии в скорлупе мелкоочаговых изменений блоки для исследования вырезали из контралатерального полушария большого мозга. Вырезанные блоки фиксировались в 10% растворе нейтрального забуференного формалина в течение 24 часов, после чего материал был обработан по стандартной методике (обезвоживание спиртом, обработка ксилолом) и залит в парафин.

### *2.1.2. Лабораторные животные*

Исследование проводили на 20 самцах беспородных мышей. Лабораторные животные массой 20-35 г содержались на базе вивария Института мозга ФГБНУ НЦН в стандартных условиях (12-часовой световой день, свободный доступ к пище и воде) в соответствии с руководством по содержанию и уходу за лабораторными животными (ГОСТ 33215-2014 от 01.07.2016). Всего было выделено 2 группы, различные по возрасту: 10 животных в возрасте 2 месяцев и 10 животных в возрасте 18 месяцев.

Все производящиеся с животными манипуляции отвечали правилам надлежащей лабораторной практики (Good Laboratory Practice – GLP) и требованиям биоэтики, а также были одобрены локальным этическим комитетом ФГБНУ НЦН (протокол №4-7/23 от 19.04.2023). Эвтаназия животных проводилась методом цервикальной дислокации с последующим обезглавливанием в соответствии с ГОСТ 33215-2014 и принципами, изложенными в руководстве Американской ветеринарно-медицинской ассоциации (AVMA) от 2020 г. Головной мозг лабораторных животных разрезался во фронтальной плоскости на уровне моторной коры со стриатумом; из стриатума выделены блоки размерами 0,5x0,1x0,1см для электронной микроскопии.

## **2.2. Методы исследования**

### *2.2.1. Гистологические и гистохимические методы*

С парафиновых блоков мозга человека и лабораторных животных с помощью микротомы получены срезы толщиной 5-6 мкм. Применялись

следующие окраски: гематоксилин и эозин, метод Ниссля (для дифференцированной оценки изменений нейронов), метод Ван-Гизона (для оценки соединительной ткани в стенке сосудов мозга), а также конго красный (для верификации наличия  $\beta$ -амилоида в веществе мозга и стенке сосудов) с последующей визуализацией окрашенных препаратов с помощью поляризационного микроскопа. При микроскопическом исследовании оценивались патологические изменения клеточных элементов нервной ткани, белого вещества и сосудов головного мозга.

### 2.2.2. Иммуногистохимический метод

При проведении иммуногистохимического исследования на предметные стекла с положительно заряженной поверхностью (SuperFrost Plus, Thermo Scientific) были нанесены парафиновые срезы толщиной 5 мкм. Затем стекла были помещены в термостат на сутки при 48°C.

Для исследования был использован набор из 5 антител, который, согласно литературным данным, в достаточной степени позволяет оценить функциональное состояние системы аутофагоцитоза и митохондрий в нейронах (Таблица 1). Кроме того, в срезах предцентральной извилины человека и моторной коры со стриатумом мыши проведена реакция с антителом к GFAP (2.2B10, Invitrogen), одним из наиболее значимых маркеров глиальных клеток.

Для каждого случая было получено 5 препаратов для окраски антител, приведенных в Таблице 1.

Таблица 1– Характеристика использованных антител

| Наименование антитела | Клон | Разведение | Функция маркера                                                                           |
|-----------------------|------|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| HSP70                 | JG1  | 1:100      | Белок теплового шока 70, участвующий в ШИА посредством связывания белков с мотивом KFERQ. |
| LAMP2A                | —    | 1:750      | Лизосомно-ассоциированный мембранный белок 2A, способствующий                             |

|        |              |        |                                                                                                                                                                                               |
|--------|--------------|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|        |              |        | перемещению субстрата внутрь лизосомы при ШИА.                                                                                                                                                |
| LC3B   | EPR<br>18709 | 1:3000 | Легкая цепь 3В белка, ассоциированного с микротрубочками 1А/1В. Белок входит в убиквитин – подобную систему конъюгации и участвует в элонгации фагофора и формировании мембраны аутофагосомы. |
| ATP5A1 | 7F9B<br>G1   | 1:100  | Альфа субъединица АТФ-синтазы (V ферментного комплекса внутренней мембраны митохондрий).                                                                                                      |
| DJ-1   | –            | 1:500  | Редокс-чувствительный белок, обеспечивающий контроль митохондриального биогенеза и защиту митохондрий от повреждений при оксидативном стрессе.                                                |

Стекла были окрашены при помощи иммуностейнера BenchMark XT (Ventana, Roche, Швейцария) с использованием стандартных протоколов (температура инкубации 37 градусов, время инкубации от 16 до 24 минут), панели детекции DAB Universal ultraView (Ventana, Roche, Швейцария) и метода ручного титрования. Подобная методика была использована для каждого из указанных антител. На начальном этапе исследования проводилась отработка титров антител.

### 2.2.3. Электронная микроскопия

Для электронно-микроскопического исследования использовали фрагменты размером 0,5x0,1x0,1см, взятые из стриатума мышей. Полученные образцы подвергались фиксации в 2% глутаровом альдегиде, которые затем постфиксировали в 1% растворе тетраоксида осмия, дегидратировали в



восходящей концентрации спиртов и заключали в эпоксидную смолу Епон. Ультратонкие срезы монтировали на медные сетки, контрастировали 1% спиртовым раствором уранилацетата и цитратом свинца и просматривали в просвечивающем электронном микроскопе JEOL JEM-1011 (JEOL Ltd., Япония).

#### *2.2.4. Морфометрия*

В гистологических срезах, окрашенных по методу Ниссля, определялось количество нейронов компактной части черного вещества мозга человека, внутреннего пирамидного слоя (слой V) коры предцентральной извилины мозга человека и моторной коры мыши, скорлупы человеческого мозга и стриатума мыши, CA1 пирамидного слоя гиппокампа человека и животных. Кроме того, для коры в срезах с иммуногистохимической реакцией на GFAP вычислялся глиальный индекс, представляющий собой отношение количества GFAP-позитивных клеток к количеству GFAP-негативных клеток.

Для получения цифровых изображений микропрепаратов (формат svx) использовали сканирующий микроскоп Aperio AT2 (Leica Biosystems, Германия). Морфометрия выполнялась на площади в 2 мм<sup>2</sup> и 1 мм<sup>2</sup> для человека и лабораторных животных, соответственно. Количественные показатели получены с помощью программы для морфометрии LeicaQWin 2.7 (Leica Microsystems, Германия).

Проведена полуколичественная оценка в срезах всех участков мозга человека и животных крахмалистых телец, нейронов с липофусцином, кривлюр (резко расширенных пространств Вирхова-Робена), сосудистых конволютов (капиллярных и микрососудистых формаций, образующих несколько просветов), капилляров и вен со склеротическими изменениями стенок. Использовалась оценка от 0 до 3 баллов, где 0 баллов – отсутствие признака, 1 балл – малое количество, 2 балла – умеренное количество, 3 балла – большое количество. Просматривалось не менее 10 полей зрения при увеличении  $\times 200$  (для нейронов и капилляров  $\times 400$ ).

Для иммуногистохимических маркеров был определен показатель интенсивности окрашивания, который оценивался в перикарионе 150 нейронов V слоя коры предцентральной извилины, стриатума, пирамидного слоя гиппокампа с учетом наличия в цитоплазме липофусцина. В программе Leica Qwin 2.7 (Leica Microsystems, Германия) измерелся показатель интенсивности окрашивания, выраженный в условных единицах в градации зеленого цвета на 8-битном изображении.

При электронной микроскопии вычислялось количество митохондрий на 100 мкм<sup>2</sup> площади цитоплазмы, площадь митохондрий и их периметр, степень их округлости, которая выражалась в условных единицах от 0 до 1, где 0 – абсолютно вытянутый объект, 1 – абсолютно круглый объект. Оценивалось распределение митохондрий в цитоплазме, представляющее собой отношение суммарной площади всех митохондрий в клетке к площади цитоплазмы этой клетки, т.е. процент цитоплазмы, занимаемый митохондриями. Морфометрию производили на фотографиях, сделанных при увеличении  $\times 5000$  (для определения площади цитоплазмы клетки) и  $\times 40000$  (для всех остальных параметров).

#### *2.2.5. Статистическая обработка результатов*

Для анализа данных использовались программы GraphPad Prism 9.3.1 (Dotmatics, США) и StatTech 3.0.6 (ООО «Статтех», Россия). Нормальное распределение количественных показателей проверяли с применением критерия Шапиро-Уилка. В случае нормального распределения количественные характеристики представлялись средними (M) и стандартными отклонениями (SD), а также границами 95% доверительного интервала (95% ДИ). В случае отсутствия нормального распределения количественные данные описывались медианой (Me) и межквартильным интервалом (Q1-Q3). Категориальные данные характеризовались абсолютными значениями и процентными долями.

Для сравнения двух групп с нормальным распределением по количественному показателю использовались t-критерий Стьюдента, а в случае неравных дисперсий применялся t-критерий Уэлча. Анализ сравнения двух групп

по количественному показателю, распределение которого отличалось от нормального, проводился с использованием U-критерия Манна-Уитни.

Для трех и более групп с нормальным распределением использовался однофакторный дисперсионный анализ с последующими апостериорными сравнениями по критерию Тьюки (при равенстве дисперсий). В случае, когда распределение отличалось от нормального, применялся критерий Краскела-Уоллиса для сравнения групп, а апостериорные сравнения проводились с помощью критерия Данна с поправкой Холма. Для сравнения процентных долей в анализе таблиц сопряженности, как четырехпольных, так и многопольных, использовались F-критерий Фишера и хи-квадрат Пирсона, соответственно.

Для оценки направления и степени связи между двумя количественными показателями были использованы различные методы в зависимости от характера их распределения. При наличии нормального распределения применялся коэффициент корреляции Пирсона, а в случае отличия распределения от нормального – коэффициент корреляции Спирмена. Для создания модели, прогнозирующей зависимость количественной переменной от факторов, использовался метод линейной регрессии.

Уровень статистической значимости был установлен на уровне  $p$  менее 0,05.

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1. Морфологические изменения структурных компонентов ткани головного мозга человека при старении

Во всех случаях группы лиц старческого возраста (75-94 лет) в экстракраниальных и/или интракраниальных артериях обнаружены липидные пятна и единичные атеросклеротические бляшки, суживающие просвет сосудов на 25-30%. В группе больных молодого возраста (35-44 лет) стенозирующего атеросклероза церебральных артерий не выявлено.

Результаты анализа массы сердца, согласно представленной Таблице 1, подтверждают наличие статистически значимых различий в зависимости от возраста. Масса сердца (г) умерших в возрасте 75-94 лет была на 17,6% больше по сравнению с массой сердца умерших в возрасте 35-44 лет, что косвенно подтверждает наличие артериальной гипертонии у больных старческого возраста.

Таблица 1 – Масса сердца в исследуемых возрастных группах

| Возрастная группа | Масса сердца, г |                                 |    | p        |
|-------------------|-----------------|---------------------------------|----|----------|
|                   | Me              | Q <sub>1</sub> – Q <sub>3</sub> | n  |          |
| 35-44 года        | 290             | 267 – 304                       | 10 | < 0,001* |
| 75-94 года        | 352             | 313 – 365                       | 30 |          |

\* –  $p < 0,05$ ; используемый метод: U-критерий Манна-Уитни.

К признакам артериальной гипертонии следует отнести наличие у этих же больных утолщения миокарда левого желудочка сердца – 1,3-1,5 см в средней части стенки желудочка, а также умеренный склероз артерий миокарда и периваскулярный склероз, выявленный при микроскопическом исследовании. При макроскопическом исследовании выявлены также стенозирующие атеросклеротические бляшки в дистальных отделах ветвей левой коронарной артерии и небольшие субэндокардиальные или интрамуральные рубцы в стенках левого желудочка.

Анализ массы головного мозга позволил выявить различия в двух возрастных группах ( $p < 0,001$ ). Масса головного мозга умерших в старческом возрасте ( $M=1222 \pm 91$  г) была ниже на 9,7% по сравнению с группой молодого

возраста ( $M=1354 \pm 37$  г). Атрофия извилин полушарий большого мозга в виде их уплощения, а также расширение субарахноидальных пространств и боковых желудочков (наружная и внутренняя гидроцефалия) обнаружены практически у каждого второго умершего старческого возраста (Таблица 2).

Таблица 2 – Макроскопические изменения головного мозга

| Показатель                            | Категории | Возрастная группа |                   | p      |
|---------------------------------------|-----------|-------------------|-------------------|--------|
|                                       |           | 35-44 года, n (%) | 75-94 года, n (%) |        |
| Атрофия извилин<br>большого мозга     | да        | 0 (0,0)           | 15 (50,0)         | 0,006* |
|                                       | нет       | 10 (100,0)        | 15 (50,0)         |        |
| Наружная и внутренняя<br>гидроцефалия | да        | 0 (0,0)           | 14 (46,7)         | 0,007* |
|                                       | нет       | 10 (100,0)        | 16 (53,3)         |        |
| Мелкоочаговые<br>изменения            | да        | 0 (0,0)           | 13 (43,3)         | 0,016* |
|                                       | нет       | 10 (100,0)        | 17 (56,7)         |        |

\* –  $p < 0,05$ ; используемый метод: точный критерий Фишера

Кроме того, в 13 случаях этой группы при макроскопическом исследовании мозга выявлены единичные мелкие организованные корковые и/или лакунарные инфаркты, которые, согласно клиническим данным, не сопровождались развитием очаговой неврологической симптоматики. Организованные корковые инфаркты представляли собой очаги западения коры диаметром около 1 см, расположенные на конвекситальной поверхности лобных и височных извилин. Лакунарные инфаркты в виде округлых полостей (псевдокист) размером 0,5-1 см локализовались в головке хвостатого ядра, глубоких отделах белого вещества полушарий большого мозга или мозжечка, верхней части основания моста.

В результате оценки толщины коры предцентральной извилины полушария большого мозга установлены существенные различия между возрастными группами. Толщина коры в группе 35-44 года составляла  $3882 \pm 310$  мкм, а в старческом возрасте она снижалась до  $2773 \pm 634$  мкм, т.е. в среднем на 28,5% ( $p < 0,001$ ). Между возрастными группами установлены также статистически значимые различия в количестве нейронов исследованных областей головного

мозга на единицу исследованной площади (Таблица 3). Результаты нашего исследования свидетельствуют об уменьшении числа нейронов при старении. Это снижение составляет 24,8% в черном веществе, 48,9% в скорлупе, 44,5% в зоне СА1 пирамидного слоя гиппокампа и 52,7% в слое V коры предцентральной извилины.

Таблица 3 – Количество нейронов в различных структурах головного мозга

| Область головного мозга          | Возраст<br>(годы) | Кол-во нейронов на 2 мм <sup>2</sup> |                                             | p        |
|----------------------------------|-------------------|--------------------------------------|---------------------------------------------|----------|
|                                  |                   | Me/<br>M ± SD                        | Q <sub>1</sub> – Q <sub>3</sub> / 95%<br>ДИ |          |
| Черное вещество                  | 35-44             | 346                                  | 328 – 442                                   | < 0,001* |
|                                  | 75-94             | 260                                  | 186 – 306                                   |          |
| Скорлупа                         | 35-44             | 145                                  | 129 – 193                                   | < 0,001* |
|                                  | 75-94             | 74                                   | 58 – 90                                     |          |
| Гиппокамп (пирамидный<br>слой)   | 35-44             | 698 ± 109                            | 621 – 776                                   | < 0,001* |
|                                  | 75-94             | 387 ± 116                            | 343 – 430                                   |          |
| Кора предцентральной<br>извилины | 35-44             | 220                                  | 188 – 250                                   | < 0,001* |
|                                  | 75-94             | 104                                  | 80 – 130                                    |          |

\* –  $p < 0,05$ ; используемые методы: *U-критерий Манна-Уитни, t-критерий Стьюдента.*

В целом, в разных полях зрения срезов этих участков мозга у лиц старческого возраста обнаружено «выпадение» как единичных нейронов, так и целых групп клеток (от 3 до 6). При старении в разных областях мозга выявлена не только убыль нейронов, но и их белковая дистрофия – хроматолиз, сморщивание, гиперхроматоз, а также формирование «клеток-теней» (Рисунок 1).

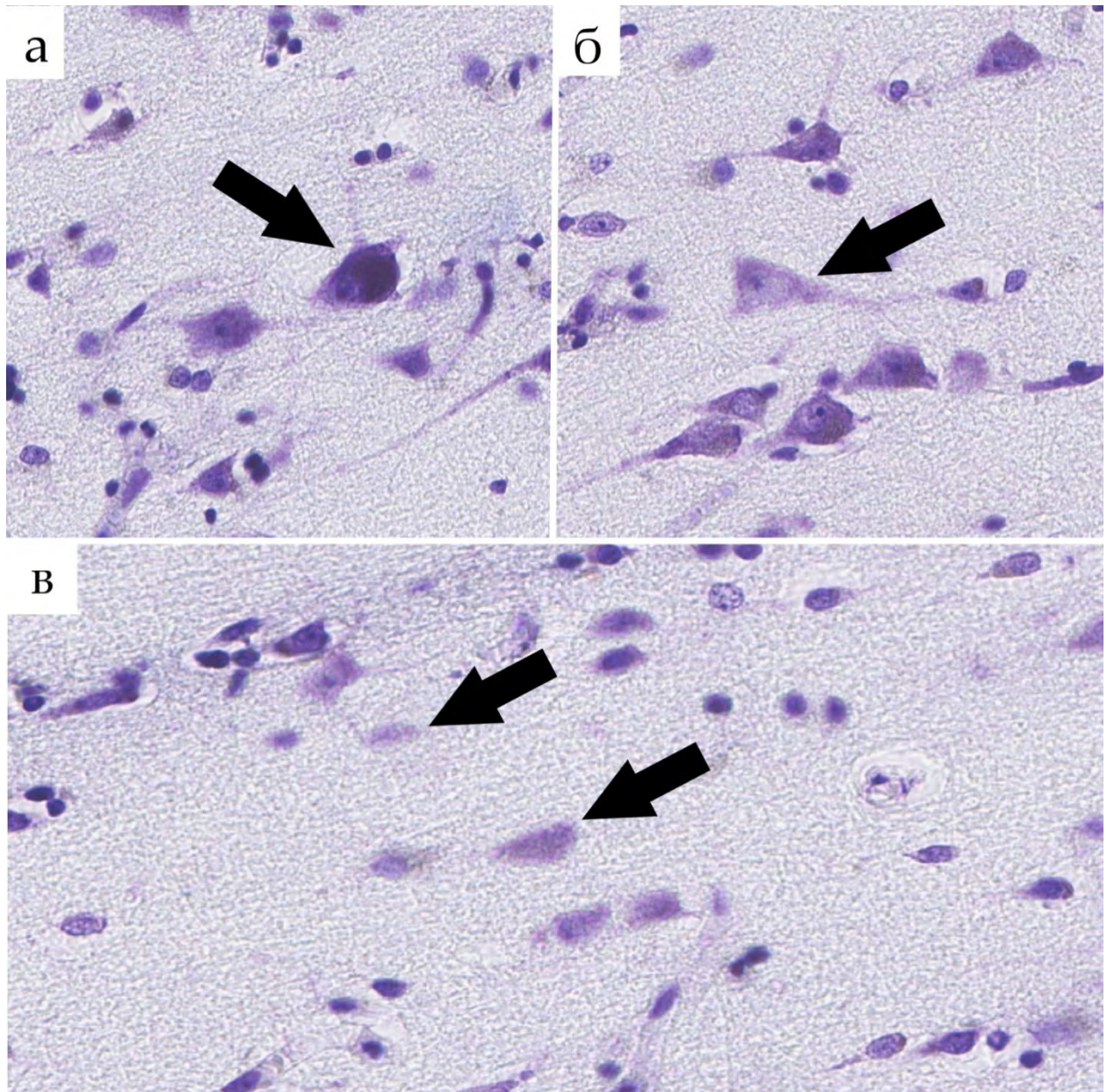


Рисунок 1 –Изменения пирамидных нейронов коры предцентральной извилины при старении. а – гиперхроматоз цитоплазмы нейрона со смещением ядра к периферии клетки (стрелка); б – нейрон с хроматолизом (стрелка); в – «клетки-тени» (стрелки). Окраска по методу Ниссля.  $\times 400$ .

Хроматолиз обнаружен в единичных нейронах мозга только одного умершего молодого возраста, тогда как у 70% лиц старческого возраста хроматолиз был выявлен в значительном количестве нейронов ( $p=0,02$ ). Наряду с диспротеинозами, выявлялась и липопигментная дистрофия, проявляющаяся в виде накопления в цитоплазме нейрона гранул липофусцина (Рисунок 2).



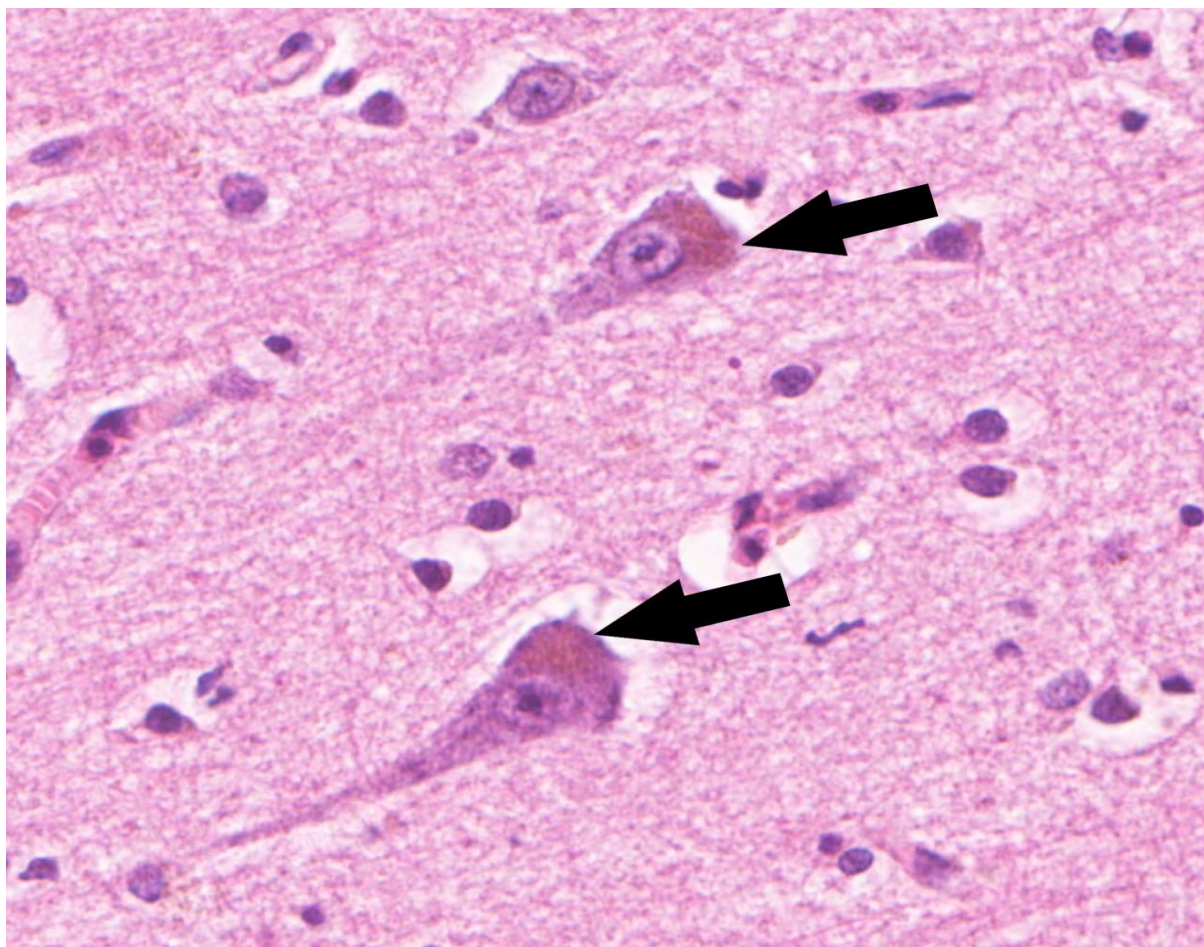


Рисунок 2 – Накопление гранулярного желто-коричневого пигмента в перикарионе (стрелки). Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 400$ .

Согласно полученным данным, различное количество нейронов с липофусцином обнаружено у всех лиц возрастной группы 75-94 лет, тогда как для группы лиц молодого возраста липофусциноз нейронов, весьма немногочисленных, не являлся постоянным признаком (Таблица 4).

Таблица 4 – Количество нейронов с липофусцином в исследуемых возрастных группах

| Категории | Возрастная группа |                   | p           |
|-----------|-------------------|-------------------|-------------|
|           | 35-44 года, n (%) | 75-94 года, n (%) |             |
| 0         | 3 (30,0)          | 0 (0,0)           | $< 0,001^*$ |
| +         | 7 (70,0)          | 6 (20,0)          | $< 0,001^*$ |
| ++        | 0 (0,0)           | 11 (36,7)         | $< 0,001^*$ |
| +++       | 0 (0,0)           | 13 (43,3)         | $< 0,001^*$ |

\* –  $p < 0,05$ ; используемый метод: Хи-квадрат Пирсона.



При микроскопическом исследовании в цитоплазме и ядрах нейронов выявлялись белковые включения. Так, в черном веществе при старении ( $n=2$ ) в перикарионе нейронов были выявлены тельца Леви. Они представляют собой включения округлой формы с интенсивно окрашенной центральной частью и более светлой периферией (Рисунок 3,а). Помимо включений в цитоплазме, выявлены округлые эозинофильные включения, сопоставимые по размеру с ядрышком – тельца Маринеско, которые располагались в нигростриарных нейронах у 8 лиц старческого возраста (Рисунок 3,б). При исследовании черном веществе обратили на себя внимание признаки гибели нигростриарных нейронов с наличием свободно лежащих зерен нейромеланина (Рисунок 3, в).

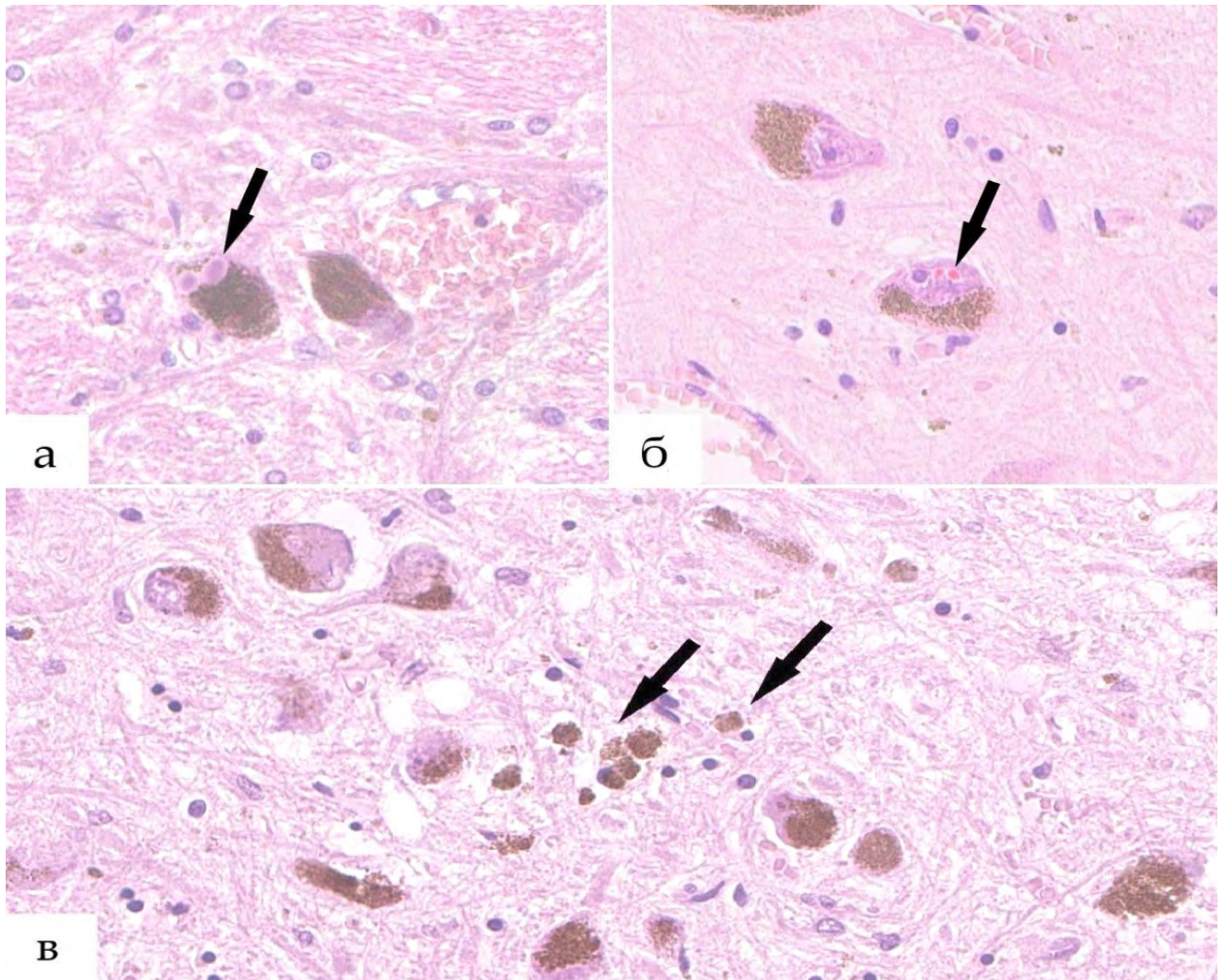


Рисунок 3 – Изменения нейронов черном веществе среднего мозга при старении. а – наличие в цитоплазме нигростриарного нейрона телец Леви (стрелка); б – два тельца Маринеско, расположенные возле ядрышка (стрелка); в – внеклеточно

расположенные зерна нейромеланина (стрелки), локализирующиеся в зоне гибели нигростриарных нейронов. Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 400$ .

У лиц старческого возраста в участках коры предцентральной извилины, пирамидного слоя гиппокампа, базального ядра и черного вещества месте гибели нейронов обнаружены пролиферация и гипертрофия астроцитов, часто с формированием глиальных узелков, а также с явлениями сателлитоза и нейронофагии. При анализе отношения плотности расположения глиальных клеток и нейронов установлено, что величина этого отношения (глиальный индекс) в группе умерших молодого возраста была в практически в 3,5 раза меньше по сравнению с группой умерших в старческом возрасте ( $p < 0,001$ ). Кроме того, в белом веществе всех исследованных участков мозга лиц исключительно старческого возраста обнаружено мелко- и крупнопористое разрежение миелина со значительным уменьшением количества глиальных клеток

(Рисунок

4,а).

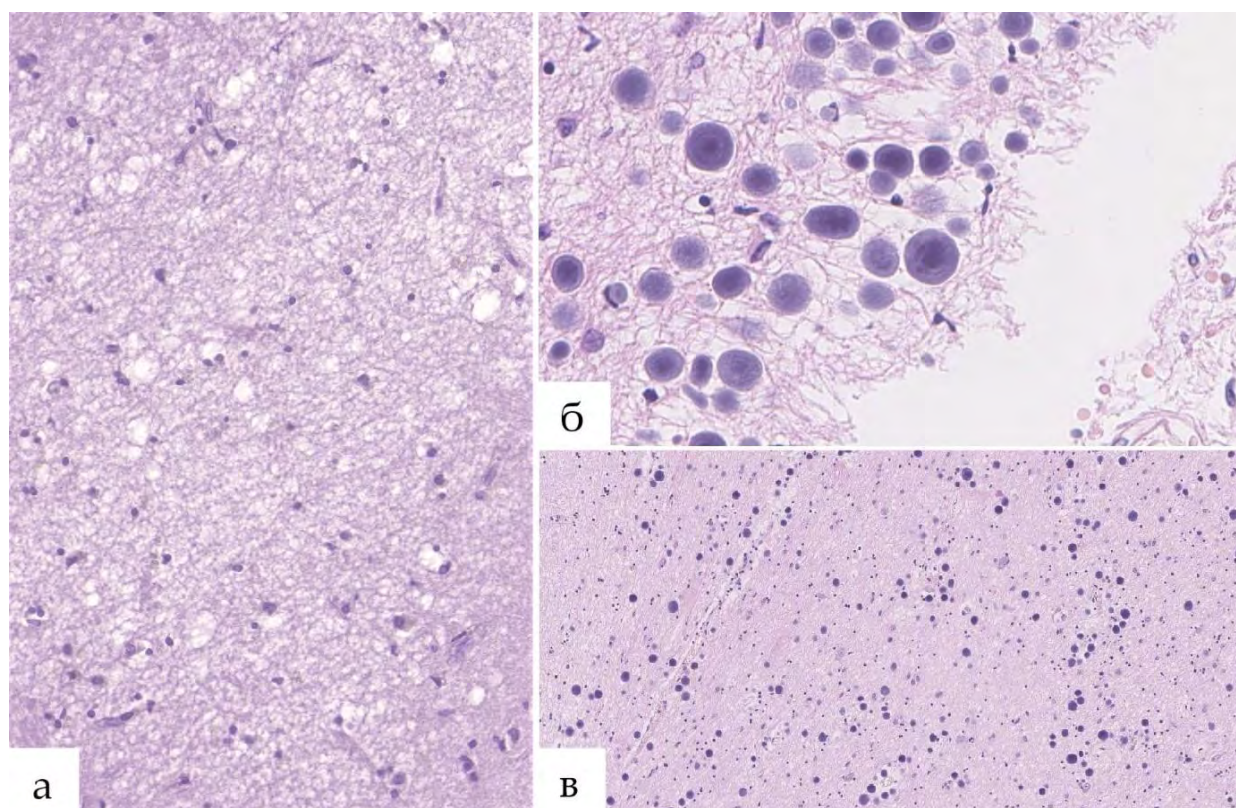


Рисунок 4 – Гистологические изменения предцентральной извилины при старении. а – разрежение миелина с редукцией глиальных клеток в белом веществе; б – скопление крахмалистых телец в поверхностных слоях коры; в –



скопления крахмалистых телец среди миелиновых волокон. Окраска гематоксилином и эозином. а, б –  $\times 400$ ; в –  $\times 80$ .

Наряду с количественными изменениями глиального компонента, имелись и дегенеративные изменения астроцитов в виде формирования крахмалистых телец, которые выявлялись в субпиальной зоне и белом веществе преимущественно в области сосудов (Рисунок 4, б, в). Крахмалистые тельца, чаще множественные, обнаружены в мозге у всех лиц старческого возраста, тогда как в мозге лиц молодого возраста они не встречались постоянно и, как правило, были единичными (Таблица 5).

Таблица 5 – Количество крахмалистых телец в исследуемых возрастных группах

| Категории | Возрастная группа |                   | p        |
|-----------|-------------------|-------------------|----------|
|           | 35-44 года, n (%) | 75-94 года, n (%) |          |
| 0         | 6 (60,0)          | 0 (0,0)           | < 0,001* |
| +         | 3 (30,0)          | 5 (16,7)          | < 0,001* |
| ++        | 1 (10,0)          | 9 (30,0)          | < 0,001* |
| +++       | 0 (0,0)           | 16 (53,3)         | < 0,001* |

\* –  $p < 0,05$ ; используемый метод: Хи-квадрат Пирсона.

Особое внимание обратил на себя такой специфический признак старения как сенильная бляшка. Они представляют собой области с измененными отростками нейронов и/или глиальных клеток, окружающие скопления  $\beta$ -амилоида (Рисунок 5). У 6 пожилых индивидов (из 30) было выявлено небольшое количество сенильных бляшек.

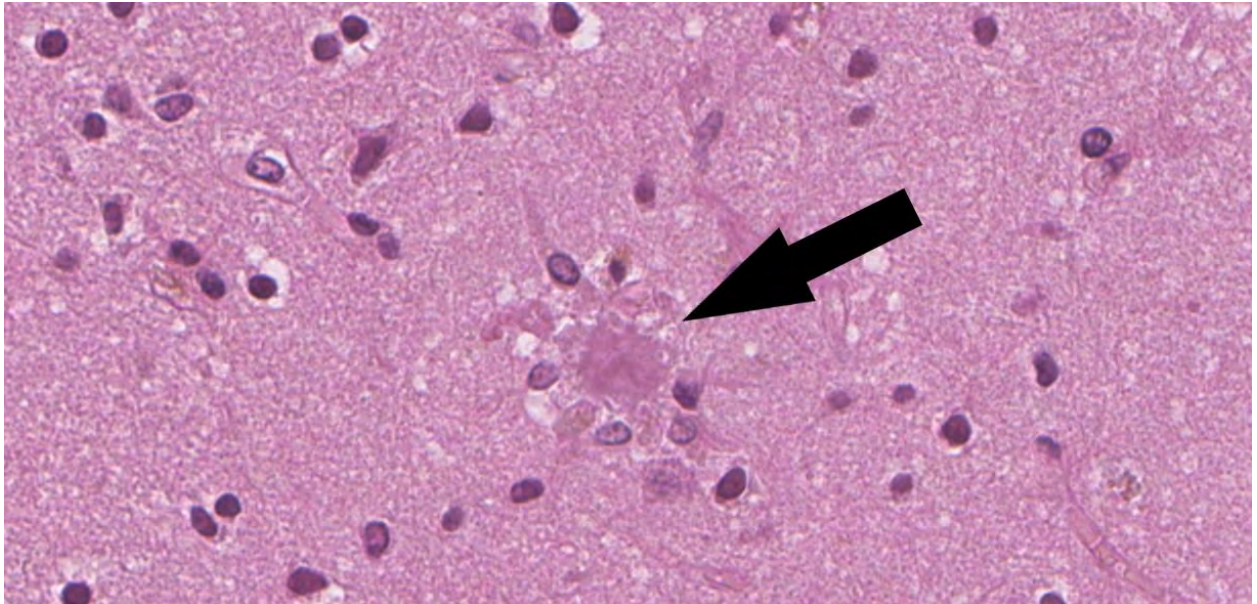


Рисунок 5 – Сенильная бляшка в коре предцентральной извилины (стрелка).  
Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 400$ .

Согласно данным проведенного исследования все компоненты сосудистой системы головного мозга, а также периваскулярные пространства с течением времени подвержены изменениям. В одних сосудах отмечался склероз и утолщение стенки, в других – ее истончение с признаками дистонии; выявлялись конволюты и кривлюры, периваскулярные кальцификаты (Рисунок 6).



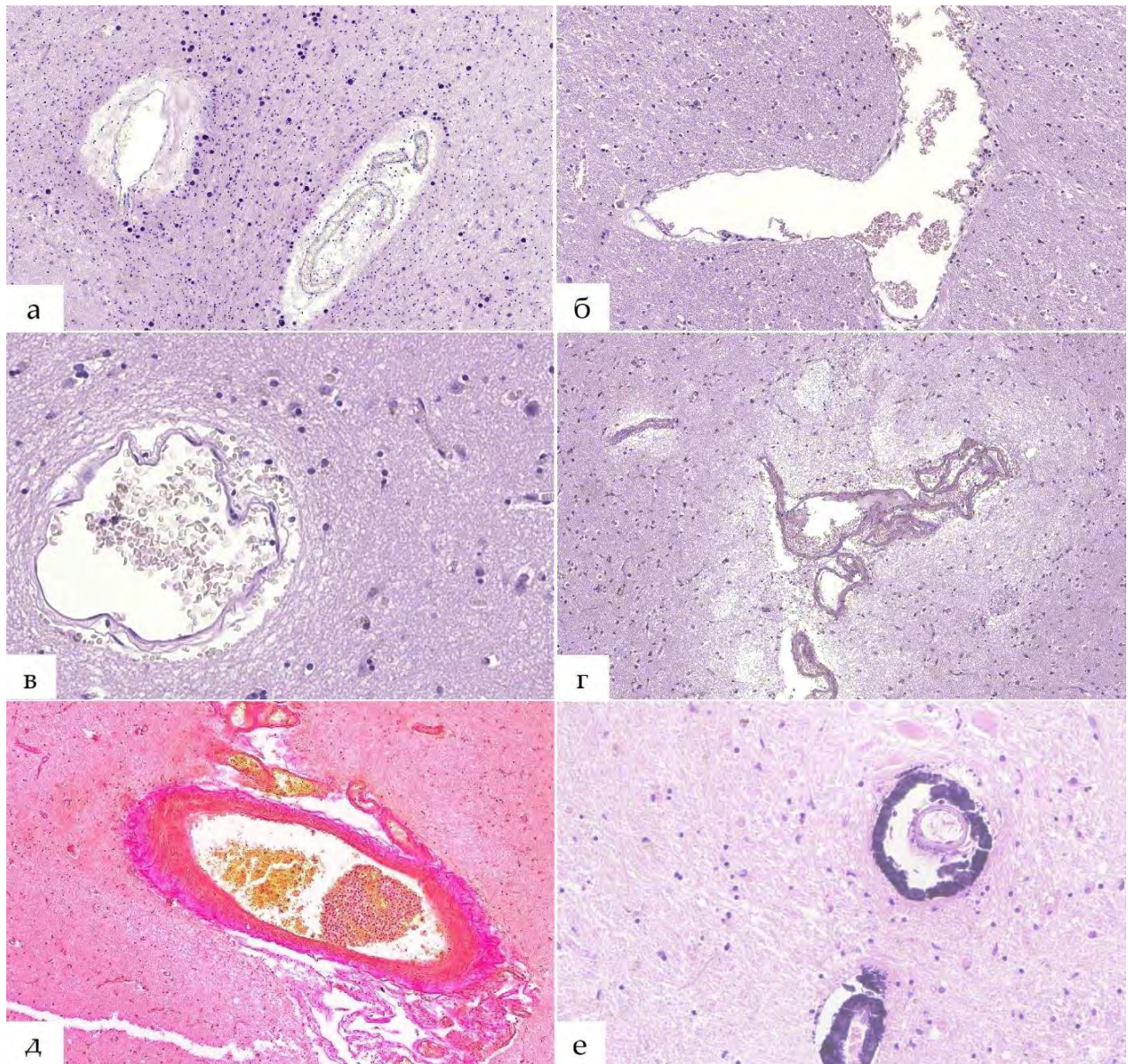


Рисунок 6 – Изменения интрацеребральных сосудов при старении. а – дилатированные периваскулярные пространства Вирхова-Робена в скорлупе; б, в – истонченная стенка сосудов в стриатуме и коре предцентральной извилины, соответственно; г – сосудистый конволют в скорлупе; д – склероз и утолщение стенки вены (фуксинофилия стенки сосуда вследствие избыточного количества коллагеновых волокон); е – периваскулярные петрификаты в стриатуме. Окраска гематоксилином и эозином (а, б, в, г, е), окраска по ван Гизону (в). а, г –  $\times 80$ ; б, в, д –  $\times 100$ ; е –  $\times 200$ .

Анализ изменений церебральных сосудов продемонстрировал статистически значимые различия между возрастными группами. Так, различное

количество капилляров с выраженным фиброзом стенки обнаружено у всех лиц старческого возраста и только у двух человек молодого возраста из 10 (Таблица 6).

Таблица 6 – Количество капилляров с фиброзом стенки в исследуемых возрастных группах

| Категории | Возрастная группа |                   | p        |
|-----------|-------------------|-------------------|----------|
|           | 35-44 года, n (%) | 75-94 года, n (%) |          |
| 0         | 8 (80,0)          | 0 (0,0)           | < 0,001* |
| +         | 2 (20,0)          | 11 (36,7)         | < 0,001* |
| ++        | 0 (0,0)           | 13 (43,3)         | < 0,001* |
| +++       | 0 (0,0)           | 6 (20,0)          | < 0,001* |

\* –  $p < 0,05$ ; используемый метод: Хи-квадрат Пирсона.

Сходные результаты получены и в отношении сосудистых конволютов, которые преимущественно в небольшом количестве располагались в коре предцентральной извилины и скорлупе. Эти патологические элементы в 4 раза чаще встречались в мозге умерших старческого возраста по сравнению с молодыми умершими (Таблица 7).

Таблица 7 – Количество конволютов в исследуемых возрастных группах

| Категории | Возрастная группа |                   | p      |
|-----------|-------------------|-------------------|--------|
|           | 35-44 года, n (%) | 75-94 года, n (%) |        |
| 0         | 8 (80,0)          | 5 (16,7)          | 0,003* |
| +         | 2 (20,0)          | 14 (46,7)         | 0,003* |
| ++        | 0 (0,0)           | 7 (23,3)          | 0,003* |
| +++       | 0 (0,0)           | 4 (13,3)          | 0,003* |

\* –  $p < 0,05$ ; используемый метод: Хи-квадрат Пирсона.

Сенильные изменения венозного русла головного мозга заключались в его ремоделировании в виде утолщения стенки сосудов вследствие склероза с облитерацией просвета. Одиночные или множественные склерозированные интрацеребральные вены обнаружены в базальном ядре и коре у подавляющего большинства лиц старческого возраста и только у одного умершего молодого

возраста (Таблица 8). Склеротическим изменениям, иногда с гиалинозом, подвергались также единичные артерии в разных участках мозга.

Таблица 8 – Количество вен со склерозом и утолщением стенки в исследуемых возрастных группах

| Категории | Возрастная группа |                   | p        |
|-----------|-------------------|-------------------|----------|
|           | 35-44 года, n (%) | 75-94 года, n (%) |          |
| 0         | 9 (90,0)          | 3 (10,0)          | < 0,001* |
| +         | 1 (10,0)          | 4 (13,3)          | < 0,001* |
| ++        | 0 (0,0)           | 14 (46,7)         | < 0,001* |
| +++       | 0 (0,0)           | 9 (30,0)          | < 0,001* |

\* –  $p < 0,05$ ; используемый метод: Хи-квадрат Пирсона

Что касается криблур, то они в различном количестве встречались как в сером, так и в белом веществе исследованных участков мозга практически у всех лиц старческого возраста (Таблица 9). Наличие единичных криблур отмечено менее чем в половине случаев группы лиц молодого возраста.

Таблица 9 – Количество криблур в исследуемых возрастных группах

| Категории | Возрастная группа |                   | p        |
|-----------|-------------------|-------------------|----------|
|           | 35-44 года, n (%) | 75-94 года, n (%) |          |
| 0         | 6 (60,0)          | 1 (3,3)           | < 0,001* |
| +         | 4 (40,0)          | 10 (33,3)         | < 0,001* |
| ++        | 0 (0,0)           | 10 (33,3)         | < 0,001* |
| +++       | 0 (0,0)           | 9 (30,0)          | < 0,001* |

\* –  $p < 0,05$ ; используемый метод: Хи-квадрат Пирсона.

Следует отметить, что у 7 умерших старческого возраста в участке скорлупы обнаружены немногочисленные периваскулярные петрификаты кольцевидной формы, однако в сопоставлении с группой лиц молодого возраста отмеченный гистологический феномен не имел статистической значимости ( $p = 0,161$ ).

Таким образом, в результате проведенного исследования получены убедительные данные о развитии в старческом возрасте атрофии головного мозга

вследствие определенных дистрофических процессов, приводящих к редукции нейронов и белого вещества с глиальной реакцией в ответ на гибель нервных клеток. Обнаружены отличительные признаки нейродегенерации в виде извращенного внутри- и внеклеточного синтеза белковых веществ. Установлено, что изменения нервной ткани в старческом возрасте сочетаются с изменениями интрацеребральных сосудов преимущественно склеротического характера.

### 3.2. Морфологические изменения головного мозга экспериментальных животных при старении

В результате оценки толщины моторной коры установлено её уменьшение на 12,9% у мышей в возрасте 18 месяцев (старческий возраст) по сравнению с группой этих животных в возрасте 2 месяцев (молодой возраст), что, однако, не имело статистической значимости (Таблица 10).

Таблица 10 – Гистологические изменения в исследуемых возрастных группах

| Показатель                                               | Возраст<br>(месяцы) | Полученные значения |                                             | p        |
|----------------------------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------------------------------|----------|
|                                                          |                     | Me/<br>M ± SD       | Q <sub>1</sub> – Q <sub>3</sub> /<br>95% ДИ |          |
| Толщина коры, мкм                                        | 2                   | 620 ± 57            | 560 – 679                                   | 0,012*   |
|                                                          | 18                  | 540 ± 44            | 503 – 577                                   |          |
| Количество нейронов<br>моторной коры в 1 мм <sup>2</sup> | 2                   | 247 ± 32            | 213 – 280                                   | 0,783    |
|                                                          | 18                  | 238 ± 75            | 175 – 301                                   |          |
| Количество нейронов<br>стриатума в 1 мм <sup>2</sup>     | 2                   | 333 ± 32            | 299 – 366                                   | 0,104    |
|                                                          | 18                  | 276 ± 74            | 214 – 337                                   |          |
| Количество нейронов<br>гиппокампа в 1 мм <sup>2</sup>    | 2                   | 730                 | 619 – 780                                   | 0,010*   |
|                                                          | 18                  | 540                 | 528 – 551                                   |          |
| Глиальный индекс                                         | 2                   | 0,86±0,09           | 1 – 2                                       | < 0,001* |
|                                                          | 18                  | 1,3±0,22            | 1 – 1                                       |          |

\* –  $p < 0,05$ ; используемые методы: *t*-критерий Стьюдента, *U*-критерий Манна-Уитни.

Согласно полученным данным, у лабораторных животных старческого возраста по сравнению с молодыми животными имелась только тенденция к



уменьшению нейронов слоя V моторной коры (на 3,25%) и стриатуме (на 17,1%). Вместе с тем, выявлены статистически значимые различия между возрастными группами при сравнении количества нейронов в зоне CA1 гиппокампа. Число нейронов у старых мышей было в 1,35 раза меньше, чем у молодых мышей. При изучении отношения плотности расположения глии и нейронов в коре, установлено увеличение значений глиального индекса в 1,5 раза в группе мышей в возрасте 18 месяцев по сравнению с группой мышей в возрасте 2 месяцев.

Следует отметить, что у всех 10 мышей старческого возраста в моторной коре выявлена белковая дистрофия некоторых нейронов в виде их сморщивания и гиперхроматоза (Рисунок 7).

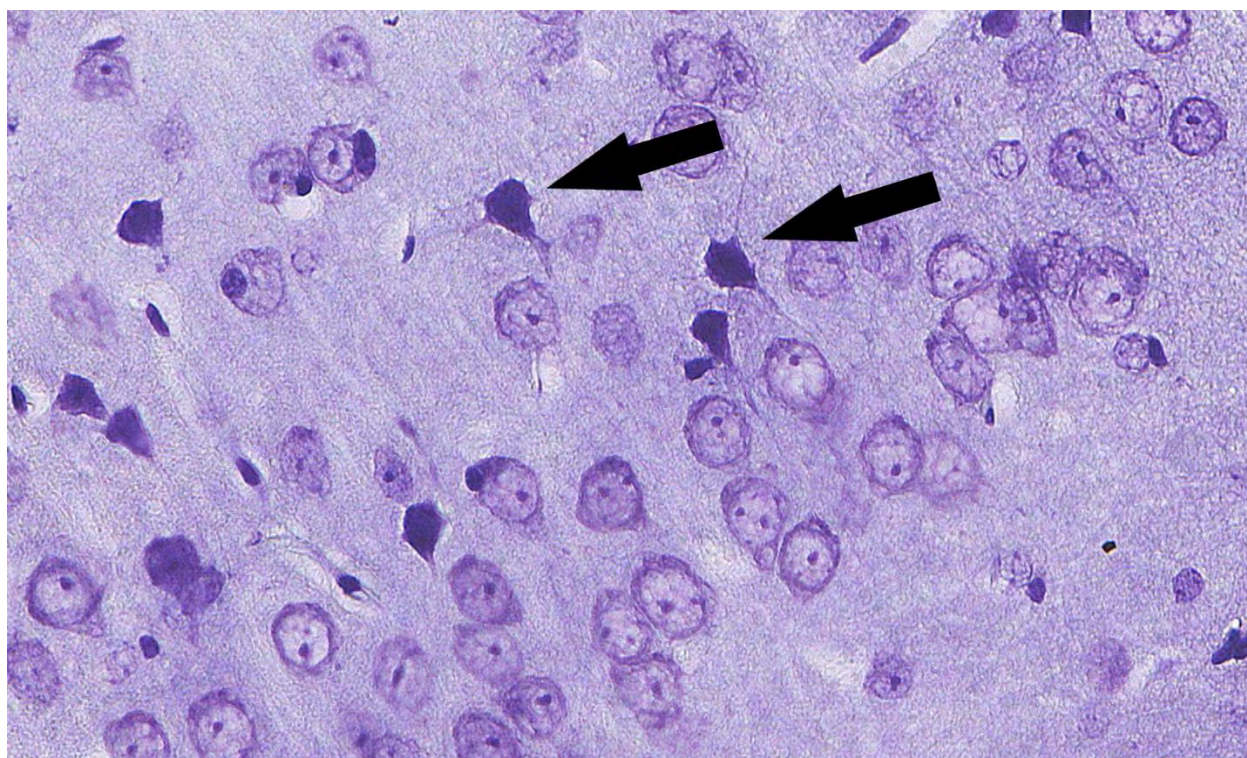


Рисунок 7 – Сморщивание и гиперхроматоз нейронов (стрелки) моторной коры мыши в возрасте 18 месяцев. Окраска по методу Ниссля.  $\times 400$ .

Кроме того, у 6 мышей этого возраста определялась липопигментная дистрофия отдельных нервных клеток моторной коры и стриатума, представленная перинуклеарным липофусцинозом. Отмеченные признаки диспротеиноза нейронов моторной коры обнаружены только в 2 случаях группы лабораторных животных молодого возраста (из 10), а липофусциноз нейронов в

случаях данной группы и вовсе отсутствовал. Обнаруженные в головном мозге людей старческого возраста внутриядерные и цитоплазматические включения в нейронах, сенильные бляшки, изменения интрацеребральных сосудов и периваскулярных пространств не выявлены в мозге данного вида лабораторных животных.

Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, что атрофические процессы в мозге мышей старческого возраста характеризуются только тенденцией к сокращению количества нейронов слоя V моторной коры и стриатума, но, вместе с тем, значительной гибелью нервных клеток пирамидного слоя гиппокампа. При этом, не смотря на отсутствие значимого уменьшения нейронов моторной коры, в ней отмечается выраженная глиальная реакция.

### **3.3. Обсуждение результатов морфологических изменений головного мозга человека и лабораторных животных при старении**

Согласно полученным результатам и анализу литературных данных старение головного мозга человека тесно связано с уменьшением его массы, атрофией извилин, расширением борозд, формированием наружной и внутренней гидроцефалии. При этом атрофические процессы в различных отделах головного мозга происходят неравномерно [23;140]. Так, более выраженную атрофию демонстрируют передние области полушарий большого мозга, онтогенетически более молодые и, соответственно, менее устойчивые к дегенерации, чем задние области [132]. В данном исследовании атрофия передних отделов полушарий большого мозга подтверждалась наличием истончения коры предцентральной извилины у лиц старческого возраста.

Однако для целостного понимания морфологии старения головного мозга необходимо учитывать не только характер сенильных изменений, но и степень их выраженности в отдельных церебральных структурах. Следует отметить, что в опубликованных ранее работах, изучающих количественные и качественные характеристики стареющего головного мозга, распространенным объектом исследования является такая структура как гиппокамп. При этом комплексное

изучение нескольких зон проводится редко [12;54]. В нашей работе выполнено гистологическое исследование нескольких областей мозга, которые по данным литературы в значительной степени подвержены дегенерации при старении – участок лобной доли, скорлупа, черное вещество, гиппокамп [8;23;25;132]. С изменениями этих структур во многом связана двигательная и мнестическая дисфункция в старческом возрасте.

Согласно результатам данного исследования, дегенеративные изменения при старении носят распространенный характер с вовлечением серого и белого вещества головного мозга, что, по-видимому, определяет развитие как наружной, так и внутренней гидроцефалии. При этом в исследованных участках мозга отмечалось уменьшение количества нейронов, наряду с необратимыми дистрофическими изменениями части оставшихся нервных клеток в виде их сморщивания с гиперхроматозом, липофусциноза, превращения в «клетки-тени». Аналогичные изменения клеточных элементов нервной ткани и белого вещества обнаружены в ранее проведенных работах [3;38]. Незначительная утрата нейронов в головном мозге при старении была обнаружена рядом автором [99;101;116]. Так, в одних исследованиях, в том числе с использованием стереологического анализа, потеря нейронов в ряде областей мозга оказалась либо не существенной [99;101;116], либо не превышающей 10% [114]. В этом случае связанная с возрастом потеря серого вещества может быть результатом уменьшения нейрона (немиелинизированных аксонов, глиальных клеток, дендритов и их ветвлений), тел нервных клеток и, вероятно, количества синапсов [79;115].

Результаты проведенного нами исследования согласуются с данными других авторов, которые указывают на значительную степень утраты нейронов при старении – 32-48% в разных отделах коры полушарий большого мозга и не менее 25-30% в черном веществе [5;8;23]. Вместе с тем, в выполненной работе не только подтверждена высокая степень выраженности редукции нейронов коры лобной доли и черной субстанции (почти 53% и 25%, соответственно), но и

установлена утрата нервных клеток в одном из базальных ядер и гиппокампе, сопоставимая с таковой в коре лобной доли (около 49% и 45%, соответственно).

Распространенный характер сенильных изменений клеточных элементов нервной ткани подчеркивает постоянное выявление крахмалистых телец, которые рассматриваются в качестве одного из показателей текущего нейродегенеративного процесса [117;131]. В качестве возможной функции им приписывают участие в поглощении и элиминации продуктов клеточного метаболизма [44]. Несмотря на очевидное происхождение крахмалистых телец из астроцитов, в составе этих структур обнаруживаются не только глиальные белки, но и нейронные [10;117]. Таким образом, крахмалистые тельца являются признаком деградации как глиоцитов, так и нервных клеток.

Заслуживает внимание установленный нами дуалистичный характер изменений глиальных клеток при старении: уменьшение, по-видимому, в основном олигодендроглиоцитов в белом веществе и резкая пролиферация, главным образом астроцитов, в нейронных структурах мозга. Проллиферация глии возникает в местах гибели нейронов (заместительный глиоз), что отмечается также другими авторами [3;9;99]. Кроме того, обнаружено увеличение глиальных клеток вблизи оставшихся нейронов (сателлитоз), преимущественно в области истонченных и разрушенных дендритов.

В некоторых случаях обнаружены сенильные бляшки, которые в небольшом количестве располагались в коре предцентральной извилины и редко в скорлупе, а также включения (тельца Леви и Маринеско), расположенные в отдельных нейронах черной субстанции. Эти феномены, наряду с крахмалистыми тельцами, считаются яркими признаками нейродегенерации, включая сенильную дегенерацию мозга [1;23;86]. Учитывая отсутствие у всех лиц старческого возраста деменции и выраженного паркинсонического синдрома, следует согласиться с мнением подавляющего большинства исследователей о том, что данные признаки при нейродегенеративных заболеваниях должны отличаться от

старения особенностями их локализации и главным образом количественными характеристиками.

Процессы дегенерации при старении не ограничиваются нервной тканью головного мозга, а захватывают и его сосудистую систему, в которой развивается целый комплекс деструктивных и адаптивных изменений. Установлено, что прогрессирующая редукция миоцитов в стенке артерий и вен приводит к их истончению и нарушению тонуса, но чаще обуславливает склероз и утолщение сосудистой стенки. Эти изменения сопровождаются облитерацией сосудов микроциркуляторного русла вследствие фиброза, что в определенной степени можно считать адаптивным ответом на уменьшение кровотока в проксимальных расположенных артериях с суженным просветом.

К адаптивным изменениям следует отнести также формирование конволютов, которое можно расценивать как попытку компенсации недостаточности кровообращения в мозге, возникающей на уровне микроциркуляторного русла. Обнаруженные склеротические и атрофические изменения сосудов сопровождались отложением солей кальция вокруг сосудов и особенно часто расширением периваскулярных пространств с формированием криблур, что, по мнению некоторых авторов, отражает выраженную дисфункцию гематоэнцефалического барьера [74;155]. Установленный в данной работе характер изменений интрацеребральных сосудов при старении отмечен и другими исследователями [1;3]. Некоторые из них считают, что ремоделирование сосудодого русла при возрастной инволюции выражено минимально, хотя эти изменения могут обуславливать повышение чувствительности мозга к оксидативному стрессу и другим факторам [1]. Однако другие авторы указывают на выраженную степень утраты капиллярного русла мозга при старении – от 15% до 50% в зависимости от области мозга [22;37]. Это указывает на существенную роль сосудистого компонента в прогрессировании сенильной атрофии мозга, которая может реализоваться, в том числе посредством гипоксических и ишемических изменений нейронов и других элементов нервной ткани.

Изменения церебральных сосудов и связанные с ними гипоксически-ишемические повреждения нервной ткани приобретают большое значение в случаях сочетания старения с сердечно-сосудистыми заболеваниями, что встречается весьма часто. Так, по данным Американской ассоциации кардиологов в 2019 году частота сердечно-сосудистых заболеваний, прежде всего ишемической болезни сердца и артериальной гипертонии, составила около 78% в возрастной группе 60-79 лет, а в возрастной группе 80 лет и старше частота сосудистой патологии достигала примерно 90% [30].

В последние годы стали появляться публикации, свидетельствующие о непосредственном вкладе сердечно-сосудистых болезней в развитие нейродегенеративной патологии. В частности, в настоящее время артериальная гипертония относится к доказанным факторам риска развития болезни Альцгеймера [29]. Согласно данным проведенного нами исследования, об определенном влиянии артериальной гипертонии и ишемической болезни сердца на морфологию сенильной дегенерации мозга свидетельствовали организованные бессимптомные инфаркты, характерные для этой сосудистой патологии [13]. Вполне вероятно, что высокая степень утраты нейронов могла быть связана с гипоксией и ишемией, обусловленной различными проявлениями ишемической болезни сердца, которая имелаась у лиц старше 75 лет, а также с гипертоническими изменениями интрацеребральных сосудов. При этом отсутствие деструктивных повреждений артерий, характерных для артериальной гипертонии (плазмо- и геморрагия в стенку, фибриноидный некроз), отражало характер течения этого заболевания с отсутствием резких и длительных подъемов артериального давления. В таких случаях гипертонические изменения артерий, вен и сосудов микроциркуляторного русла имеют преимущественно склеротический характер и практически не отличаются от сенильных изменений.

В данной работе, помимо исследования структурных компонентов вещества головного мозга человека при сенильной дегенерации, изучены поражения мозга мышц в условиях физиологического старения. Одним из проявлений, связанных

со старением лабораторных животных, явилась потеря нейронов моторной коры, стриатума и пирамидного слоя гиппокампа, причем, только для гиппокампа установлено статистически значимое различие в степени выраженности редукции нервных клеток между молодыми и старыми мышами (на 26% меньше у особей в возрасте 18 месяцев).

Следовательно, в условиях физиологического старения количество нейронов вышеуказанных зон мозга в целом не подвергается резко выраженному уменьшению. Вместе с тем, выявлено существенное увеличение количества глиальных клеток при незначительной редукции нейронов коры моторной коры (почти на 34%), что отражает важную роль нейроглии в поддержании функциональной активности нейронов.

Важно отметить отсутствие у лабораторных животных таких признаков как поражение сосудов, формирование крахмалистых телец и интранейрональных белковых включений, которые отмечались в мозге человека при старении.

Полученные данные согласуются с результатами предшествующих исследований других авторов, которые в качестве ведущего гистологического признака старения отмечают умеренный глиоз, возникающий на фоне нерезкой утраты нейронов мозга мышей [20; 112].

Менее выраженный характер сенильных изменений мозга лабораторных животных по сравнению с человеческим мозгом может объясняться целым рядом структурно-функциональных различий центральной нервной системы человека и мыши, а также отсутствием у животных сопутствующих заболеваний, особенно сердечно-сосудистых болезней, которые могут существенным образом модифицировать картину дегенерации мозга при старении. К межвидовому сходству, связанному со старением, наряду с глиозом и редукцией нейронов, следует также отнести липофусциноз и сморщивание с гиперхроматозом нейронов, обнаруженные во всех образцах мышей в возрасте 18 месяцев и отмеченные в литературе [12].

Таким образом, мозг мыши демонстрирует сходные с человеческим мозгом сенильные изменения. Небольшой размер мозга мыши, как и отсутствие коморбидных заболеваний, создают оптимальные условия для изучения на данной экспериментальной модели структурных особенностей мозга при физиологическом старении.

### 3.4. Электронно-микроскопическое исследование нейронов головного мозга экспериментальных животных при старении

При сопоставлении исследуемых характеристик митохондрий в нейронах изученного отдела мозга лабораторных животных двухвозрастных групп нами были обнаружены статистически значимые различия (Таблица 11).

Таблица 11 – Результаты электронно-микроскопического исследования митохондрий

| Показатель                                        | Возраст<br>(мес) | Полученные значения |           | p        |
|---------------------------------------------------|------------------|---------------------|-----------|----------|
|                                                   |                  | M ± SD              | 95% ДИ    |          |
| Количество митохондрий<br>на 100 мкм <sup>2</sup> | 2                | 39 ± 17,9           | 31–40     | < 0,001* |
|                                                   | 18               | 26 ± 13,7           | 19–25     |          |
| Объемная доля<br>митохондрий, %                   | 2                | 8,51 ± 0,56         | 6–8,5     | < 0,001* |
|                                                   | 18               | 5,43 ± 0,31         | 4,3–5,1   |          |
| Площадь митохондрий,<br>мкм <sup>2</sup>          | 2                | 0,216 ± 0,17        | 0,15–0,17 | 0,025*   |
|                                                   | 18               | 0,232 ± 0,18        | 0,16–0,19 |          |
| Фактор формы, у.е.                                | 2                | 0,661 ± 0,19        | 0,68–0,71 | 0,001*   |
|                                                   | 18               | 0,685 ± 0,19        | 0,71–0,73 |          |
| Периметр, мкм                                     | 2                | 1,76 ± 0,03         | 1,5–1,6   | 0,42     |
|                                                   | 18               | 1,79 ± 0,02         | 1,5–1,6   |          |

\* –  $p < 0,05$ ; используемый метод: *t*-критерий Стьюдента.

У старых мышей количество митохондрий на 100 мкм<sup>2</sup> оказалось на 32,8% ниже, чем у мышей в возрасте 2 месяцев. Кроме того, доля цитоплазмы, занятая митохондриями, в образцах старых лабораторных животных также оказалась на 36,4% меньше, чем в группе контроля.



В свою очередь, в нашей работе были обнаружены развивающиеся с возрастом изменения в структурной организации оставшихся митохондрий. Так, с возрастом площадь вышеописанных органелл увеличивалась на 6,9% (Таблица 11). Показатель их округлости также возрастал на 3,3%, соответственно, в стареющем головном мозге мышей преобладали митохондрии сферической формы (Рисунок 8).

Статистически значимых различий в периметре митохондрий между двумя возрастными группами нами обнаружено не было.

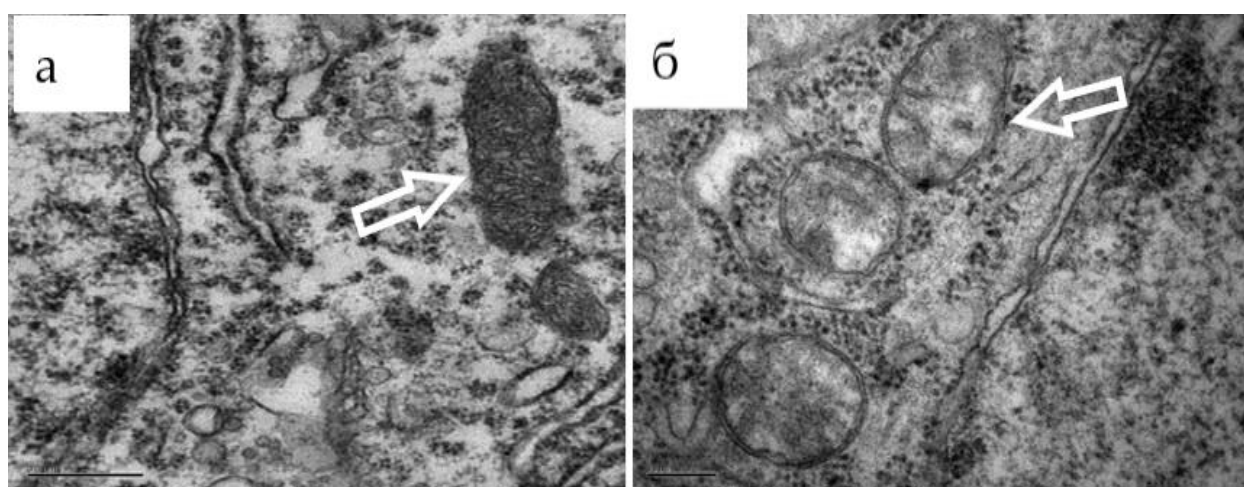


Рисунок 8 – Различная форма митохондрий в двух исследуемых возрастных группах лабораторных животных. а – удлиненная форма митохондрии (стрелка) у мышей в возрасте 2 месяцев; б – более округлая форма митохондрий (стрелка) у мышей в возрасте 18 месяцев, накопление в цитоплазме липофусцина (обозначено звездочкой).  $\times 40000$ .

Необходимо отметить, что во всех образцах, полученных от лабораторных животных в возрасте 18 месяцев, в цитоплазме нейронов было обнаружено накопление гранул липофусцина (Рисунок 8, а; Рисунок 9).

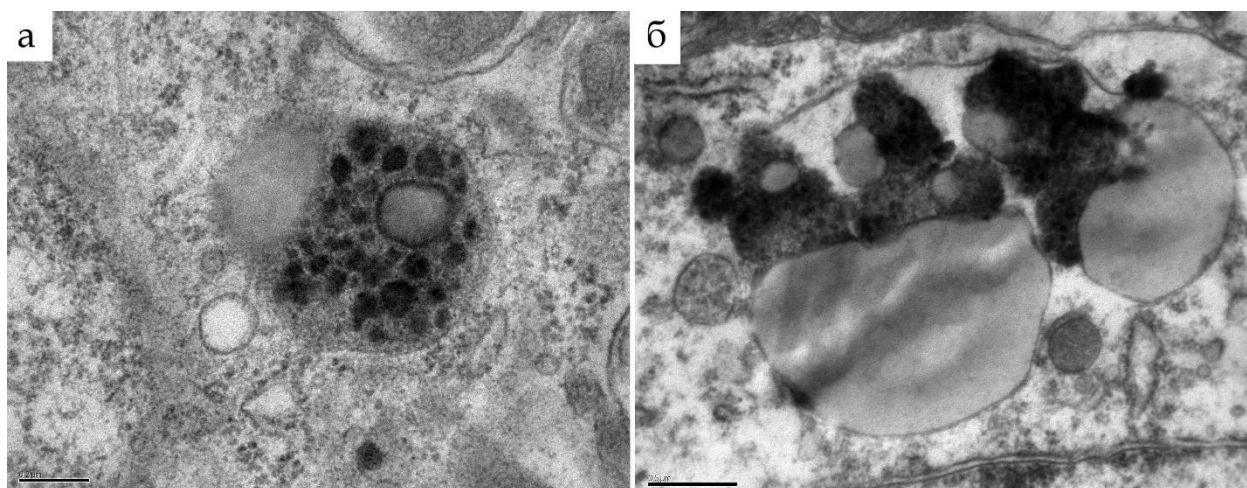


Рисунок 9 – Цитоплазматические включения. а, б – накопление пигмента липофусцина, состоящего из белковой и жировой фракции, в цитоплазме нейронов головного мозга мышей в возрасте 18 месяцев.  $\times 80000$ .

Достоверных различий между ультраструктурными характеристиками, отражающими активность компонентов аутофагоцитоза, обнаружено не было.

### 3.5. Обсуждение результатов электронно-микроскопического исследования

Известно, что отличительной ультраструктурной особенностью митохондрий от всех других внутриклеточных органелл является морфологический динамизм. Так, процессы, направленные на слияние этих органелл между собой, делают возможным образование разветвленных взаимосвязанных сетей внутри клетки. В свою очередь, смещение динамики митохондрий в сторону деления приводит к образованию большего количества морфофункциональных органелл [11]. Следовательно, митохондриальная динамика вносит значительный вклад в клеточную адаптацию и во многом влияет на жизненный цикл клетки.

В нашей работе при анализе данных электронной микроскопии было обнаружено снижение количества митохондрий на  $100 \text{ мкм}^2$  в 1,5 раза у лабораторных животных в возрасте 18 месяцев по сравнению с 2-месячными животными. Кроме того, результаты проведенного нами морфометрического исследования продемонстрировали снижение объемной доли митохондрий при старении, то есть соотношение суммарной площади всех митохондрий в клетке к площади цитоплазмы этой клетки снижалось с течением времени. Следовательно,

сокращение количества митохондрий и снижение объемной доли митохондрий в клетке закономерно приводит к уменьшению площади хондриома в нейронах стареющего головного мозга мышей.

При этом обращало на себя внимание одновременное увеличение площади вышеупомянутых органелл с  $0,216 \pm 0,17$  в 2 месяца до  $0,232 \pm 0,18$  в 18 месяцев, а также преобладание сферических форм митохондрий у мышей за счет увеличения их округлости с  $0,661 \pm 0,19$  в 2 месяца до  $0,685 \pm 0,19$  в 18 месяцев.

Полученные нами данные частично согласуются с результатами предыдущих исследований. Так, в работе К.Е. Stahon (2016) при старении нервной ткани головного мозга было выявлено снижение количества митохондрий с возрастом. Кроме того, в предыдущих исследованиях было выявлено изменение митохондриальной морфологии в зависимости от ткани, типа клеток и внутриклеточной локализации при старении [54;133]. Такие структурные различия были обнаружены в нейронах фронтальной коры, где эти органеллы имели тенденцию к слиянию, в то время как в CA1 и зубчатой извилине гиппокампа митохондрии приобретали сферические формы. В аксонах митохондрии были округлой формы и небольшого размера, в дендритах же они имели удлинённую форму и имели большее количество трубчатых крист [54; 133].

Вышеописанные результаты дают основание предполагать, что изменение митохондриальной морфологии при уменьшении объемной доли митохондрий в клетке является адаптацией к более низкому уровню энергии, возникающему в клетке при старении.

Таким образом, по данным литературы [133;142;146] и, по нашему мнению, пластичность митохондрий позволяют им адаптироваться к метаболическим изменениям в клетке, в то время как дисбаланс процессов митохондриальной динамики может привести к клеточной дисфункции и, как следствие, быть важным патологическим звеном в структуре нейродегенеративных заболеваний.

### 3.6. Иммуногистохимическое исследование маркеров митохондриальной и аутофагоцитарной дисфункции в нейронах головного мозга человека

#### 3.6.1. Результаты ИГХ выявления маркера HSP70

При изучении маркера HSP70 в двух возрастных группах различия в интенсивности его окрашивания были статистически значимы (Рисунок 10). В нейронах коры предцентральной извилины интенсивность окрашивания вышеуказанного белка у умерших старческого возраста была практически в 2,5 раза выше по сравнению с группой условного контроля ( $p=0,01$ ). Что касается результатов, полученных в нейронах полосатого тела и пирамидного слоя гиппокампа, то при старении уровень интенсивности окрашивания HSP70 был повышен в 2 раза ( $p<0,05$ ).

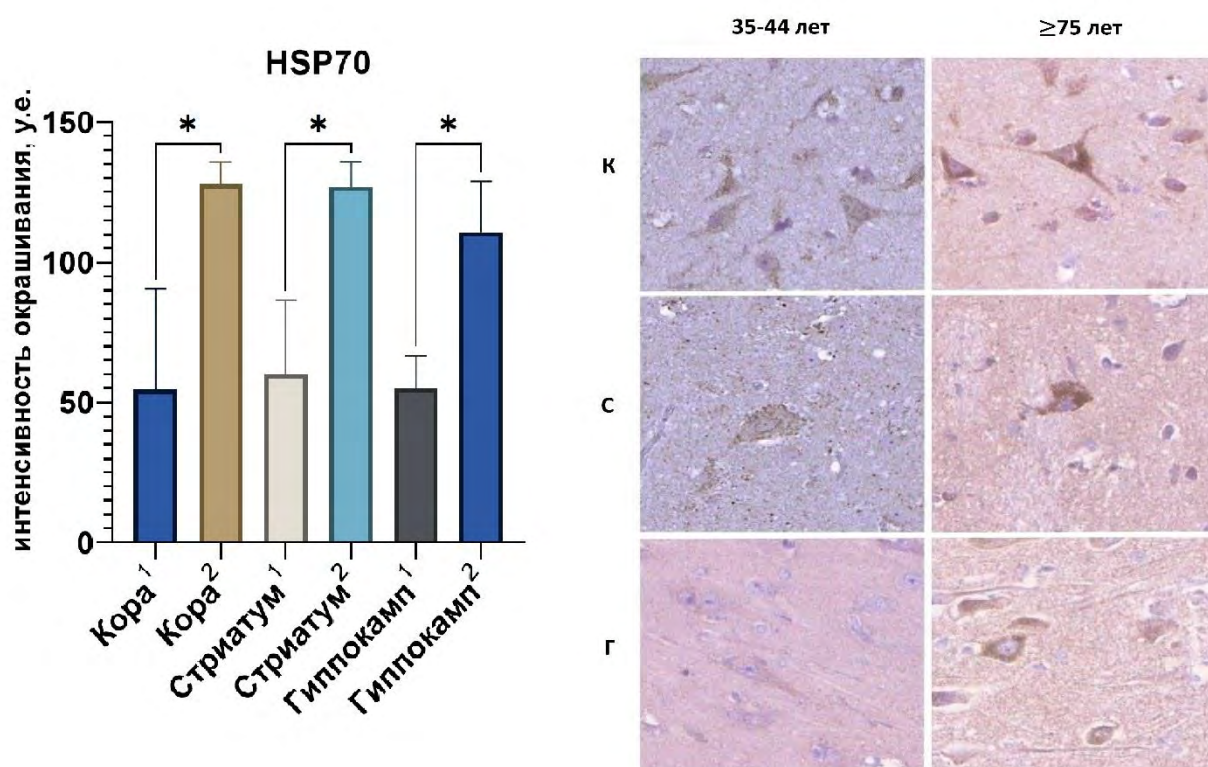


Рисунок 10– Результаты иммуногистохимического окрашивания с антителом к HSP70. <sup>1</sup> группа 35 – 44 лет, <sup>2</sup> группа старше 75 лет; К – нейроны V слоя коры предцентральной извилины, С – нейроны стриатума; Г – нейроны пирамидного слоя гиппокампа; \* –  $p < 0,05$ .  $\times 400$ .

### 3.6.2. Результаты ИГХ выявления маркера LAMP2A

При изучении интенсивности окрашивания второго маркера ШИА, LAMP2A, в нейронах коры, стриатума и гиппокампа стареющего головного мозга было обнаружено повышение этих значений, которое было статистически значимо (Рисунок 11). Так, в образцах, полученных от людей старческого возраста по сравнению со значениями в группе контроля в нейронах V слоя коры, стриатума и пирамидного слоя гиппокампа мы обнаружили, что уровень LAMP2A был повышен в 1,6, 1,8 и 1,5 раза в раза ( $p=0,01$ ,  $p=0,006$ ,  $p=0,025$ , соответственно).

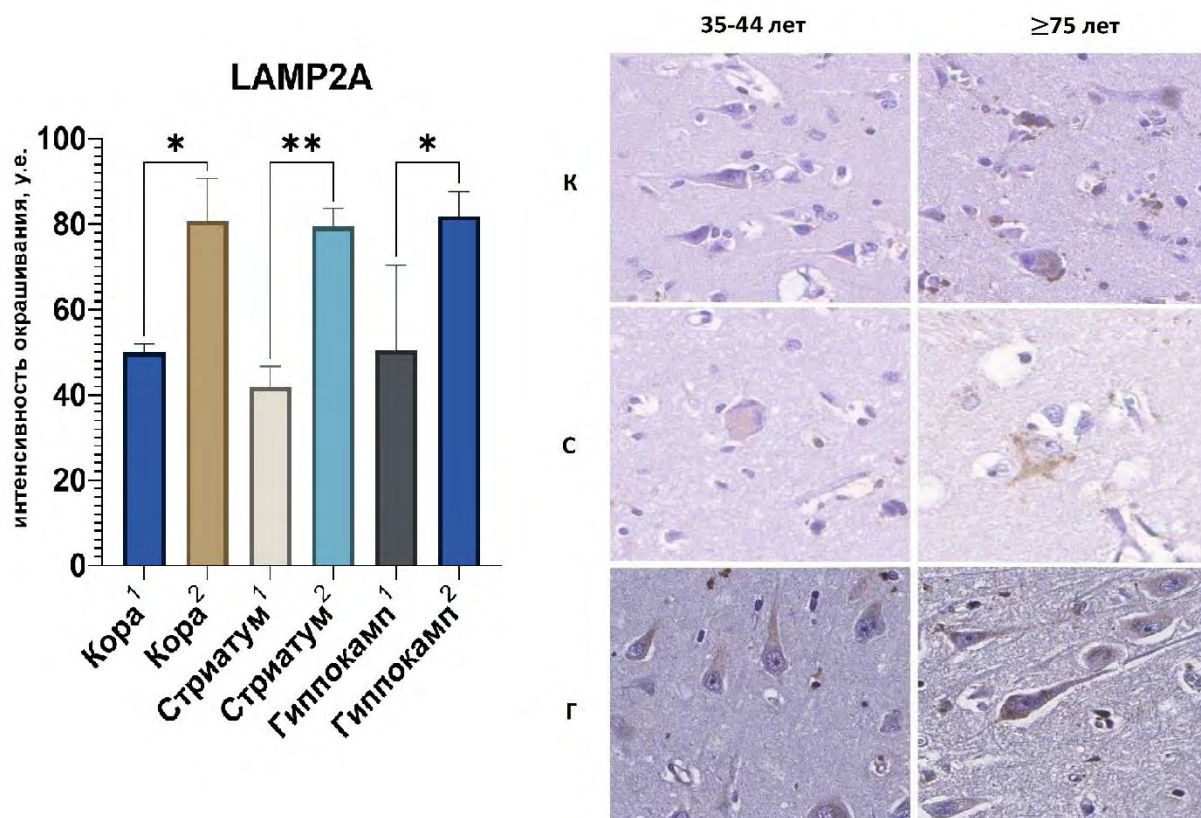


Рисунок 11– Результаты иммуногистохимического окрашивания с антителом к LAMP2A. <sup>1</sup> группа 35 – 44 лет, <sup>2</sup> группа старше 75 лет; К – нейроны V слоя коры предцентральной извилины, С – нейроны стриатума, Г – нейроны пирамидного слоя гиппокампа; \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,001$ .  $\times 400$ .

При сравнении двух маркеров ШИА было выявлено, что уровень окрашивания белка теплового шока 70 при возрастной инволюции увеличивался более интенсивно, чем уровень LAMP2A. Так, значения HSP70 были выше



относительного контроля на 59% (в коре), 54,6% (в стриатуме) и 52,9% (в гиппокампе), а LAMP2A – на 40,7%, 50% и 41,8% в аналогичных зонах.

### 3.6.3. Результаты ИГХ выявления маркера LC3B

При сравнении в двух возрастных группах интенсивности окрашивания маркера макроаутофагии LC3B полученные данные выявили повышенные уровни данного белка при старении головного мозга (Рисунок 12). Так, его показатель в нейронах коры предцентральной извилины была выше в 1,3 раза в группе лиц старческого возраста по сравнению с группой условного контроля ( $p=0,009$ ). Идентичные результаты были получены и для нейронов полосатого тела ( $p=0,025$ ) и гиппокампа ( $p=0,002$ ).

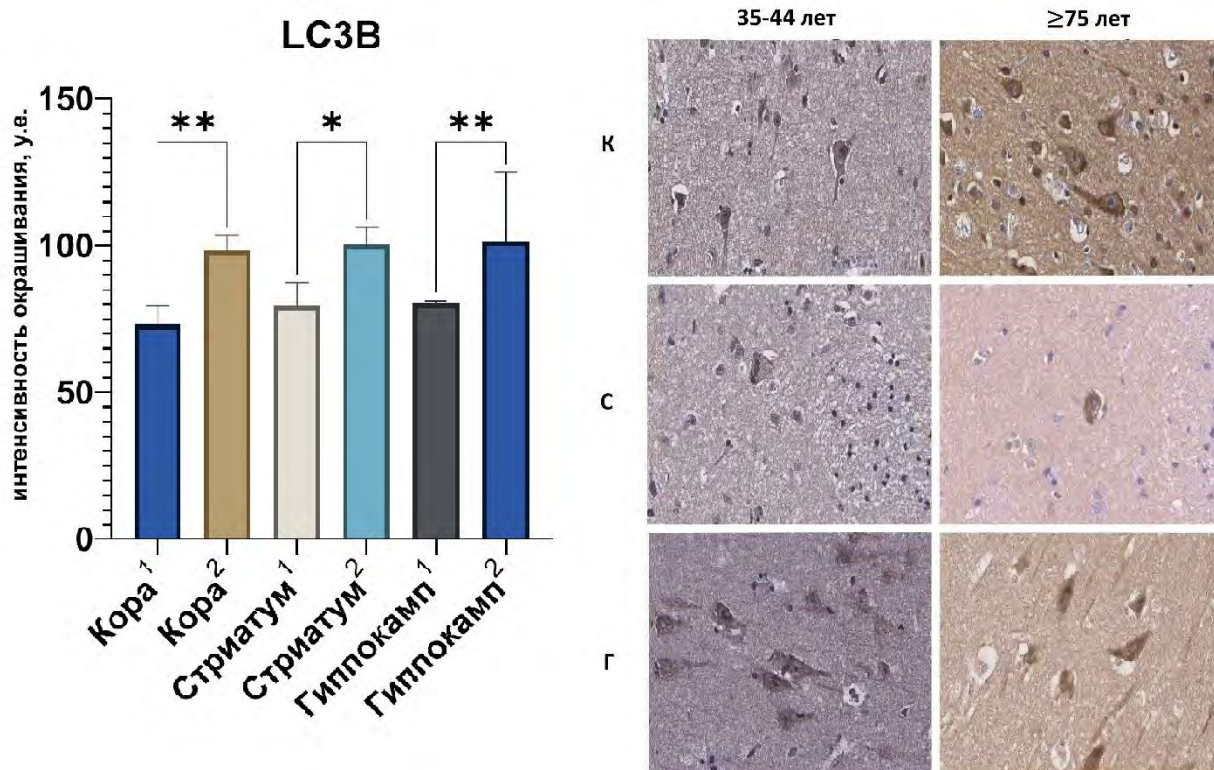


Рисунок 12– Результаты иммуногистохимического окрашивания с антителом к LC3B. <sup>1</sup> группа 35 – 44 лет, <sup>2</sup> группа старше 75 лет; К – нейроны V слоя коры предцентральной извилины, С – нейроны стриатума, Г – нейроны пирамидного слоя гиппокампа; \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,001$ .  $\times 400$ .

### 3.6.4. Результаты ИГХ выявления маркера АТР5А1

Анализ значений интенсивности окрашивания АТР5А1 продемонстрировал статистически значимые различия в пятом слое коры предцентральной извилины

и пирамидном слое гиппокампа в зависимости от возраста (Рисунок 13). При изучении показателя интенсивности окрашивания АТР5А1 в вышеперечисленных зонах было выявлено, что величина последней у умерших молодого возраста была практически на 20% и 25% ниже по сравнению с больными старческого возраста ( $p=0,03$  и  $p=0,01$ , соответственно). В нейронах полосатого тела в образцах старческого возраста отмечалось повышение АТР5А1 на уровне статической тенденции ( $p=0,32$ ) в 1,2 раза по сравнению со показателями в группе 35-44 лет.

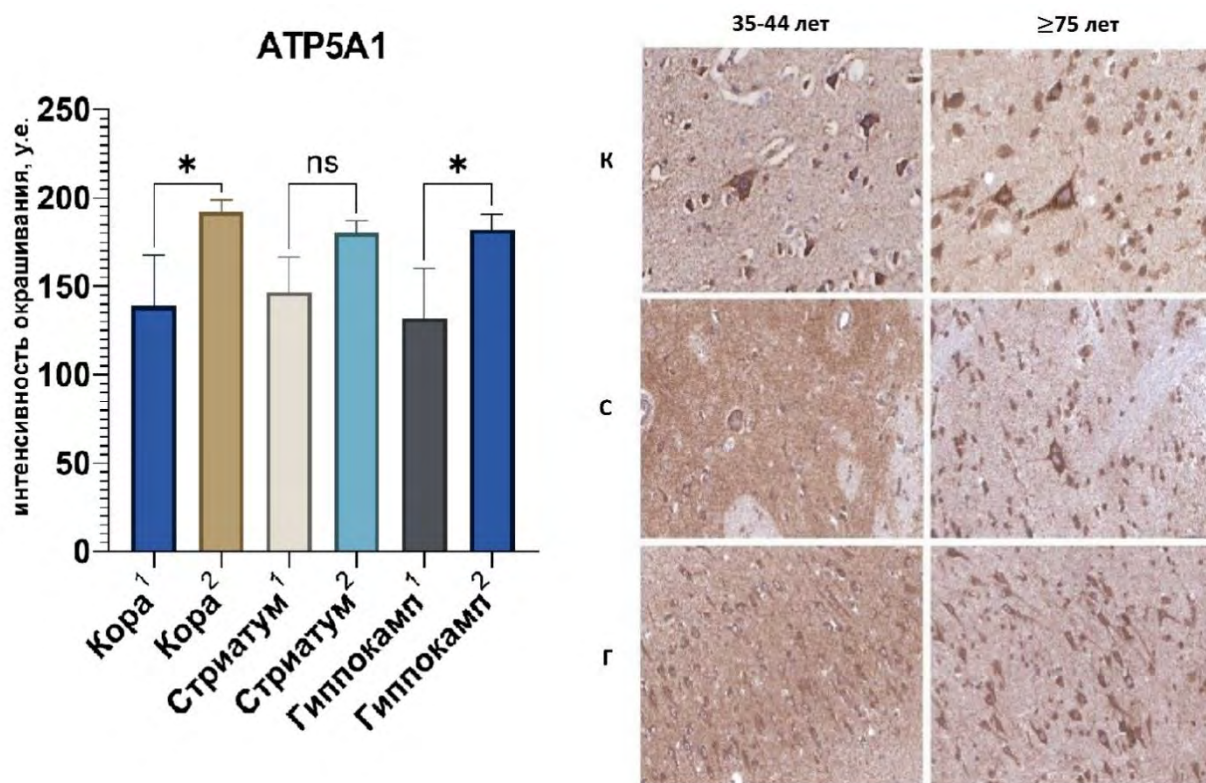


Рисунок 13— Результаты иммуногистохимического окрашивания с антителом к АТР5А1. <sup>1</sup> группа 35 – 44 лет, <sup>2</sup> группа старше 75 лет; К – нейроны V слоя коры предцентральной извилины, С – нейроны стриатума, Г – нейроны пирамидного слоя гиппокампа; ns –  $p \geq 0,05$ , \* –  $p < 0,05$ .  $\times 400$  (К,С),  $\times 200$  (Г).

### 3.6.5. Результаты ИГХ выявления маркера DJ-1

При исследовании маркера DJ-1 в зависимости от возраста показатели интенсивности окрашивания не были статистически значимы (Рисунок 14). Однако во всех изученных зонах в группе лиц старческого возраста отмечалась тенденция к снижению значений DJ-1. Так, при старении в нейронах коры предцентральной извилины интенсивность окрашивания вышеуказанного белка



была на 26% ( $p=0,17$ ), в полосатого тела – на 14% ( $p=0,78$ ), в пирамидном слое гиппокампа – на 12% ( $p=0,99$ ) ниже по сравнению с группой условного контроля.

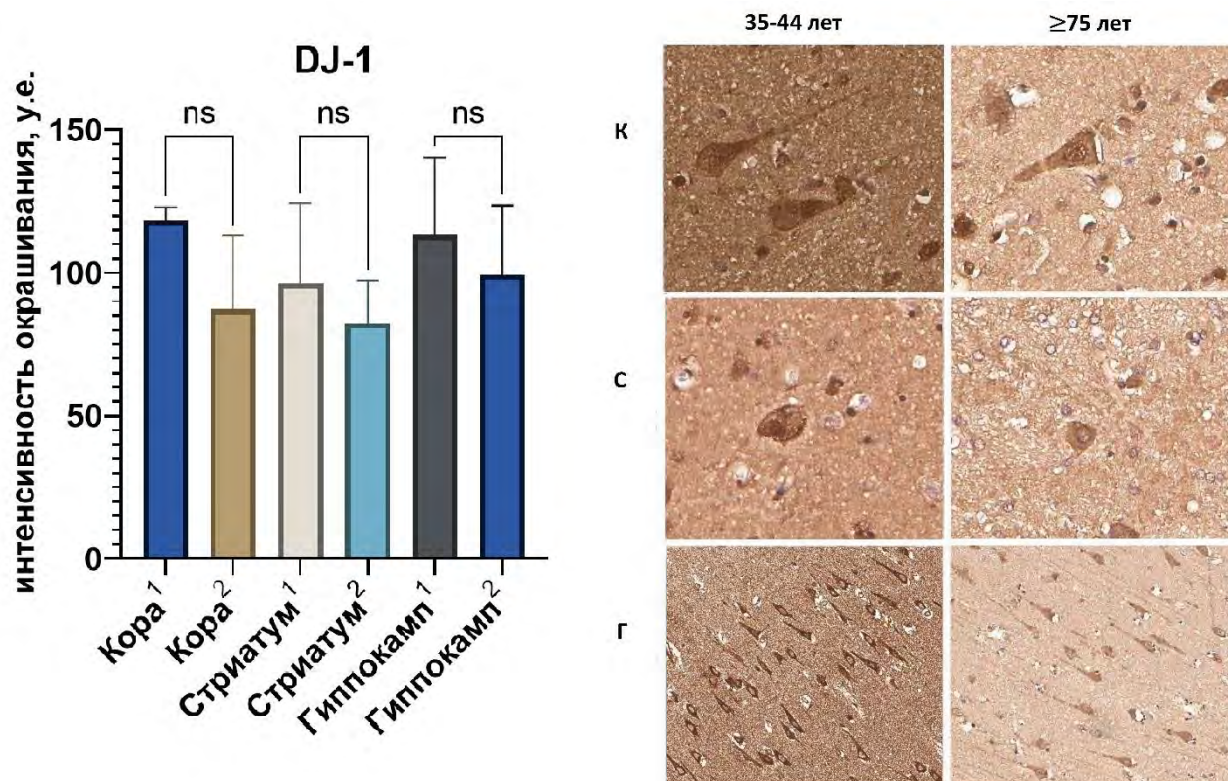


Рисунок 14– Результаты иммуногистохимического окрашивания с антителом к DJ-1. <sup>1</sup> группа 35 – 44 лет, <sup>2</sup> группа старше 75 лет; К – нейроны V слоя коры предцентральной извилины, С – нейроны стриатума, Г – нейроны пирамидного слоя гиппокампа; ns –  $p \geq 0,05$ .  $\times 400$  (К,С),  $\times 200$  (Г).

Необходимо отметить, что в нейронах коры, стриатума и гиппокампа статистически значимых различий интенсивность окрашивания маркеров макроаутофагии, ШИА, контроля качества митохондрий и внутренней митохондриальной мембраны в зависимости от возраста не было выявлено.

### 3.6.6. Корреляционный анализ взаимосвязи показателей маркеров шаперон-индуцированной аутофагии HSP70 и LAMP2A

При проведении корреляционного анализа взаимосвязи между показателями интенсивности окрашивания маркеров ШИА (HSP70 и LAMP2A) нами были получены результаты, которые отражены в Таблице 12.



Таблица 12 – Результаты корреляционного анализа взаимосвязи показателей HSP70 и LAMP2A.

| Исследуемый показатель     | Свойства корреляционной связи |                            |          |
|----------------------------|-------------------------------|----------------------------|----------|
|                            | $\rho/r_{xy}$                 | Теснота (по шкале Чеддока) | p        |
| HSP70 – LAMP2A (кора)      | 0,587                         | Заметная                   | < 0,001* |
| HSP70 – LAMP2A (стриатум)  | 0,727                         | Высокая                    | < 0,001* |
| HSP70 – LAMP2A (гиппокамп) | 0,502                         | Заметная                   | 0,006*   |

\* –  $p < 0,05$

При оценке связи показателей интенсивности окрашивания LAMP2A и HSP70, обнаруженных в нейронах коры и гиппокампа, было установлено, что связь между этими показателями является прямой изаметной. Так, в нейронах коры и гиппокампа увеличение показателя HSP70 на 1 приводит к увеличению показателя LAMP2A на 0,367 и 0,39, соответственно. Эта модель объясняет 49,6% и 38,2% наблюдаемой дисперсии LAMP2A в вышеуказанных зонах головного мозга. В нейронах стриатума корреляционный анализ продемонстрировал прямую связь между значениями интенсивности окрашивания LAMP2A и HSP70. Увеличение показателя HSP70 на 1 приводит к увеличению показателя LAMP2A на 0,433, что объясняет 77,0% наблюдаемой дисперсии LAMP2A.

### 3.6.7. Корреляционный анализ взаимосвязи показателей маркеров шаперон-индуцированной аутофагии HSP70, LAMP2A и маркера системы «контроля качества» митохондрий DJ-1

При проведении корреляционного анализа взаимосвязи показателей интенсивности окрашивания маркеров ШИА (HSP70 и LAMP2A) и показателя интенсивности окрашивания маркера системы «контроля качества» митохондрий (DJ-1) нами были получены следующие результаты (Таблица 13).

Таблица 13 – Результаты корреляционного анализа взаимосвязи показателей HSP70, LAMP2A, DJ-1

| Исследуемый показатель | Свойства корреляционной связи |                   |   |
|------------------------|-------------------------------|-------------------|---|
|                        | $\rho/r_{xy}$                 | Теснота (по шкале | p |

|                          |        | Чеддока)  |        |
|--------------------------|--------|-----------|--------|
| HSP70 – DJ-1 (кора)      | -0,576 | Заметная  | 0,012* |
| HSP70 – DJ-1(стриатум)   | -0,695 | Заметная  | 0,001* |
| HSP70 – DJ-1 (гиппокамп) | -0,189 | Слабая    | 0,326  |
| LAMP2A – DJ-1 (кора)     | -0,404 | Умеренная | 0,096  |
| LAMP2A – DJ-1(стриатум)  | -0,481 | Умеренная | 0,008* |
| LAMP2A – DJ-1(гиппокамп) | -0,436 | Умеренная | 0,018* |

\* –  $p < 0,05$

При оценке связи показателя интенсивности окрашивания маркера DJ-1 и показателя интенсивности окрашивания HSP70, которые обнаруживались в нейронах коры и стриатума, была установлена заметная обратная связь (Рисунок 15). Увеличение показателя HSP70 на 1 приводит к уменьшению показателя DJ-1 в нейронах коры на 0,352, в нейронах стриатума на 0,413. Эта модель объясняет 40,4% наблюдаемой дисперсии показателя интенсивности окрашивания DJ-1, обнаруженного в коре, и 50,8% наблюдаемой дисперсии показателя интенсивности окрашивания DJ-1, обнаруженного в стриатуме.

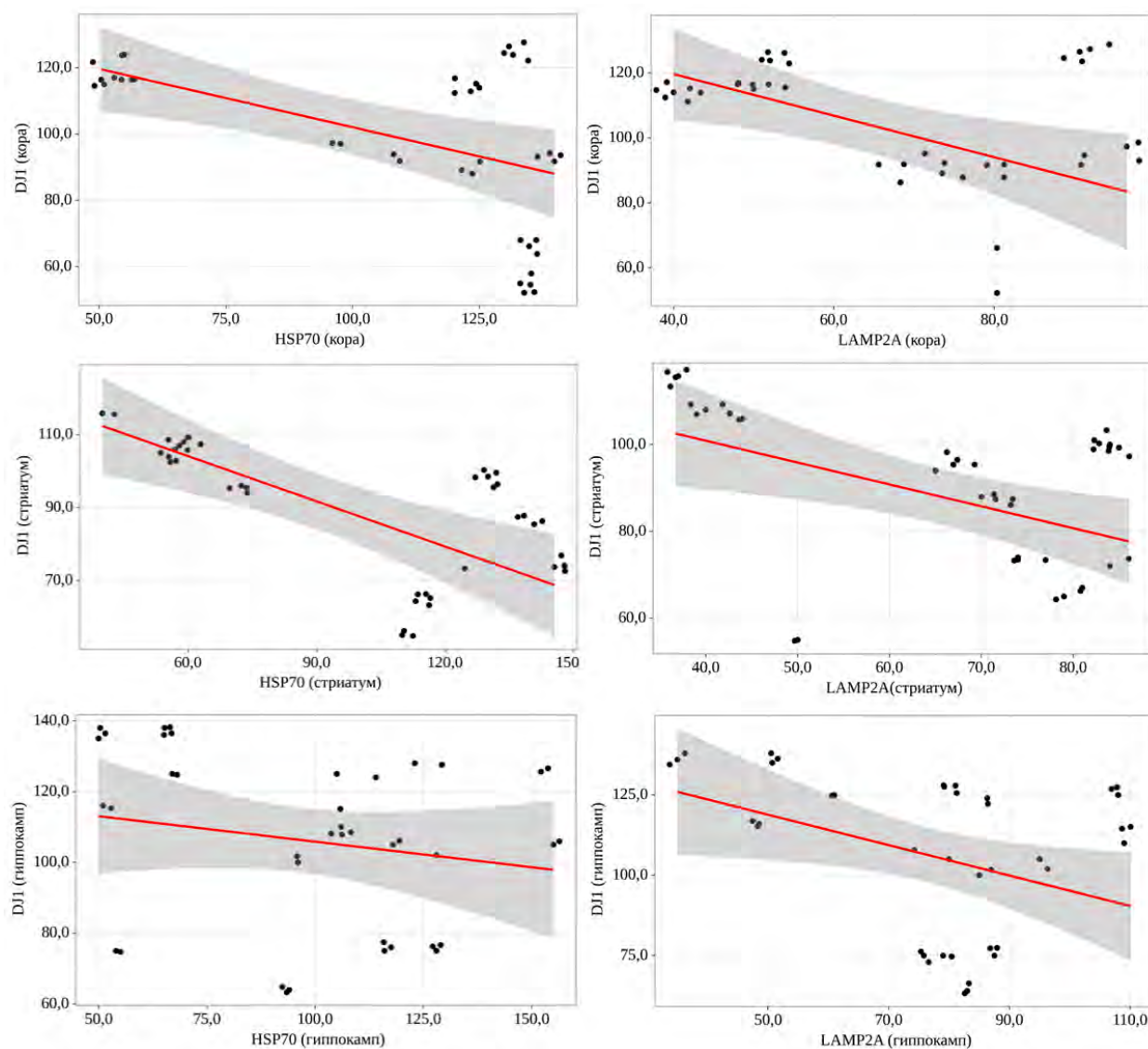


Рисунок 15 – Графики регрессионной функции, характеризующие зависимость показателя DJ-1 от показателей HSP70, LAMP2A в нейронах различных зон головного мозга человека.

Изучение взаимосвязи показателей интенсивности окрашивания DJ-1 и показателя HSP70 в нейронах пирамидного слоя гиппокампа продемонстрировало обратную корреляцию между маркерами (Рисунок 15). В пирамидном слое гиппокампа увеличение HSP70 на 1 приводит к уменьшению показателя DJ-1 на 0,149, что, в свою очередь, объясняет 3,7% наблюдаемой дисперсии показателя DJ-1.

При корреляционном анализе взаимосвязи показателя интенсивности окрашивания маркеров LAMP2A и DJ-1, обнаруженного во всех исследуемых структурах головного мозга, были получены аналогичные результаты (Рисунок

15). Увеличение показателя LAMP2A в коре на 1 приводит к уменьшению показателя DJ-1 на 0,638; в стриатуме на 0,504, в гиппокампе на 0,473, что, в свою очередь, объясняет 34,1% наблюдаемой дисперсии показателя интенсивности окрашивания DJ-1 в нейронах коры, стриатума – 23,4%, гиппокампа - 15,9%.

### 3.6.8. Корреляционный анализ взаимосвязи показателей маркеров шаперон-индуцированной аутофагии HSP70, LAMP2A и маркера V митохондриального комплекса ATP5A1

При проведении корреляционного анализа взаимосвязи между показателями интенсивности окрашивания маркеров ШИА и маркером АТФ-синтазы нами были получены результаты, которые отражены в Таблице 14.

Таблица 14 – Результаты корреляционного анализа взаимосвязи показателей HSP70, LAMP2A и ATP5A1

| Исследуемый показатель      | Свойства корреляционной связи |                            |          |
|-----------------------------|-------------------------------|----------------------------|----------|
|                             | $\rho/r_{xy}$                 | Теснота (по шкале Чеддока) | p        |
| HSP70 – ATP5A1 (кора)       | 0,575                         | Заметная                   | 0,001*   |
| HSP70 – ATP5A1 (стриатум)   | 0,534                         | Заметная                   | 0,003*   |
| HSP70 – ATP5A1 (гиппокамп)  | 0,847                         | Высокая                    | < 0,001* |
| LAMP2A – ATP5A1 (кора)      | 0,647                         | Заметная                   | < 0,001* |
| LAMP2A – ATP5A1 (стриатум)  | 0,417                         | Умеренная                  | 0,025*   |
| LAMP2A – ATP5A1 (гиппокамп) | 0,662                         | Заметная                   | < 0,001* |

\* –  $p < 0,05$

Оценка связи показателей интенсивности окрашивания HSP70 и ATP5A1, обнаруженных в нейронах коры и стриатума, установила, что связь между этими показателями является прямой и заметной. (Рисунок 16). Так, в нейронах вышеуказанных зон увеличение показателя HSP70 на 1 приводит к увеличению показателя ATP5A1 на 0,701 и 0,384, соответственно. Полученная модель объясняет 68,5% и 44,5% наблюдаемой дисперсии ATP5A1. Корреляционный анализ также продемонстрировал высокой тесноты прямую связь между

значениями интенсивности окрашивания HSP70 и ATP5A1, выявленными в нейронах гиппокампа (Рисунок 16). Увеличение показателя HSP70 на 1 приводит к увеличению показателя ATP5A1 на 0,834, что объясняет 68% наблюдаемой дисперсии этого маркера.

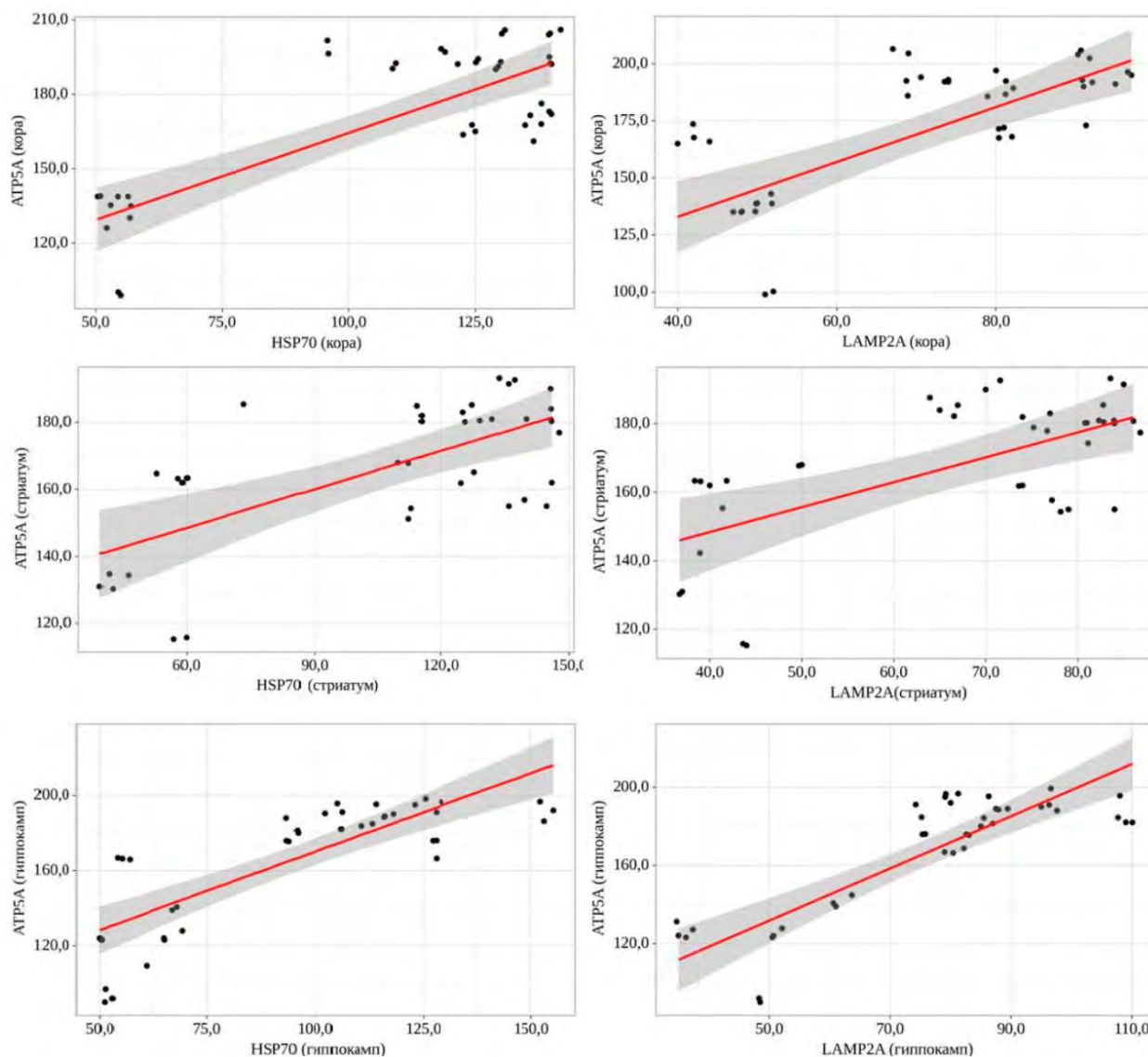


Рисунок 16 – Графики регрессионной функции, характеризующие зависимость показателя ATP5A1 от показателей HSP70 и LAMP2A в нейронах различных зон головного мозга человека.

Кроме того, в нейронах коры и гиппокампа была установлена заметная прямая связь между показателями интенсивности окрашивания LAMP2A и ATP5A1 (Рисунок 16). Увеличение показателя LAMP2A на 1 приводит к увеличению значения ATP5A1 на 1,201 и 1,335, соответственно. Полученная модель объясняет 54,7% наблюдаемой дисперсии ATP5A1 в нейронах коры и

69,5% – в нейронах гиппокампа. При оценке связи показателей интенсивности окрашивания LAMP2A и ATP5A1, обнаруженных в нейронах стриатума, была установлена умеренная прямая корреляция (Рисунок 17). При увеличении показателя LAMP2A на 1 следует ожидать увеличение показателя ATP5A1 на 0,727, что объясняет 39,0% наблюдаемой дисперсии ATP5A1.

### 3.6.9. Корреляционный анализ взаимосвязи показателей маркеров шаперон-индуцированной аутофагии HSP70, LAMP2A и маркера макроаутофагии LC3B

Нами был также выполнен корреляционный анализ взаимосвязи показателей интенсивности окрашивания маркеров ШИА HSP70, LAMP2A и маркера макроаутофагии LC3B в нейронах различных зон головного мозга человека (Таблица 15).

Таблица 15 – Результаты корреляционного анализа взаимосвязи показателей HSP70, LAMP2A и LC3B

| Исследуемый показатель    | Свойства корреляционной связи |                            |          |
|---------------------------|-------------------------------|----------------------------|----------|
|                           | $\rho/r_{xy}$                 | Теснота (по шкале Чеддока) | p        |
| HSP70 – LC3B (кора)       | 0,712                         | Высокая                    | < 0,001* |
| HSP70 – LC3B (стриатум)   | 0,616                         | Заметная                   | < 0,001* |
| HSP70 – LC3B (гиппокамп)  | 0,820                         | Высокая                    | < 0,001* |
| LAMP2A – LC3B (кора)      | 0,744                         | Высокая                    | < 0,001* |
| LAMP2A – LC3B (стриатум)  | 0,682                         | Заметная                   | < 0,001* |
| LAMP2A – LC3B (гиппокамп) | 0,613                         | Заметная                   | < 0,001* |

\* –  $p < 0,05$

Изучение связи показателей интенсивности окрашивания HSP70 и LC3B, обнаруженных в нейронах коры и гиппокампа, выявило прямую корреляционную зависимость (Рисунок 17). Так, в нейронах вышеуказанных зон увеличение показателя HSP70 на 1 приводит к увеличению показателя LC3B на 0,269 и 0,534, соответственно. Эта модель объясняет 53,2% наблюдаемой дисперсии LC3B в нейронах коры и 58,2% – в нейронах гиппокампа. Корреляционный анализ также продемонстрировал заметную прямую связь между значениями интенсивности

окрашивания вышеуказанных показателей, выявленными в нейронах стриатума (Рисунок 17). Увеличение показателя HSP70 на 1 приводит к увеличению LC3B на 0,252, что объясняет 42% наблюдаемой дисперсии изучаемого маркера макроавтофагии.

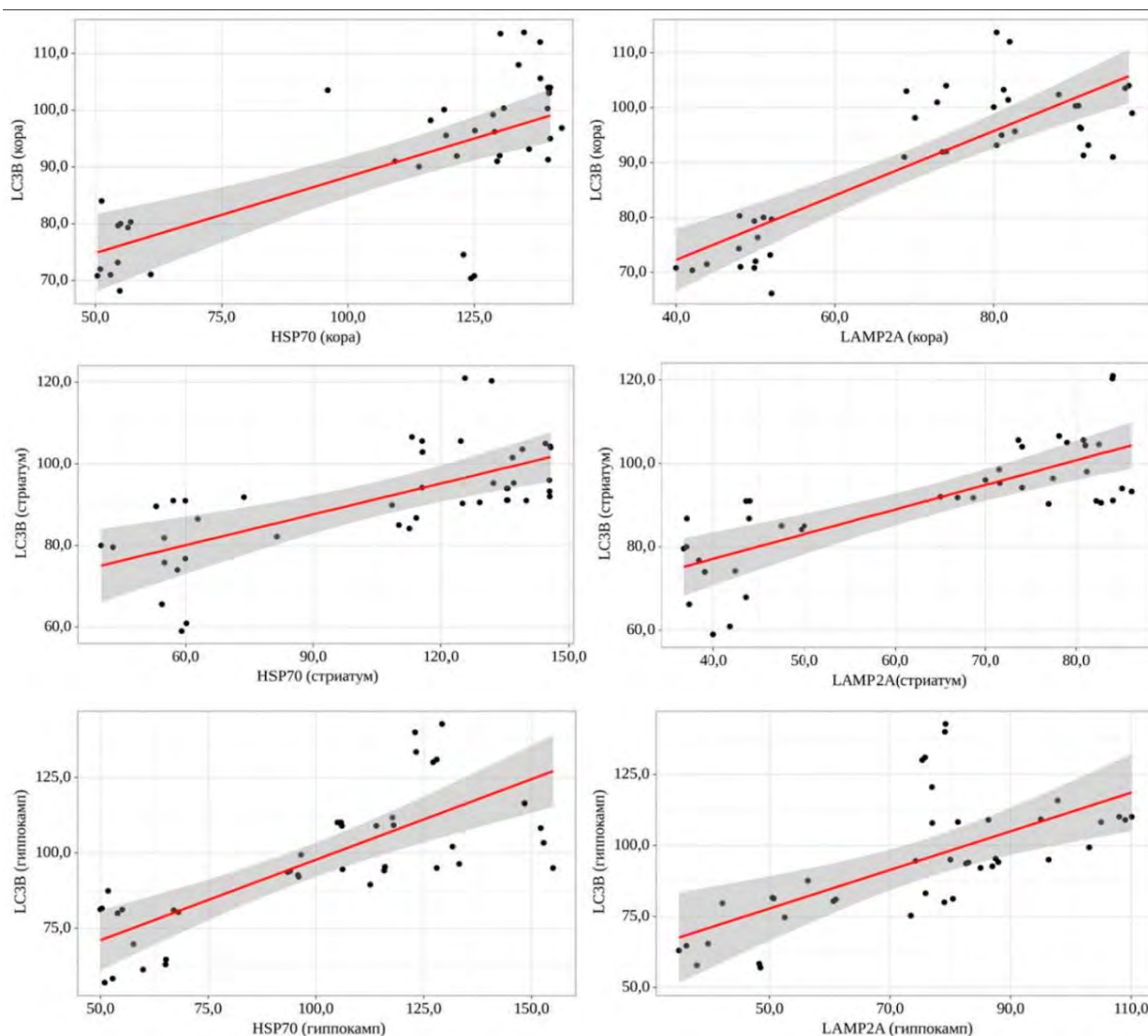


Рисунок 17– Графики регрессионной функции, характеризующие зависимость показателя LC3B от показателей HSP70, LAMP2A в нейронах различных зон головного мозга человека.

Между значениями интенсивности окрашивания маркеров LAMP2A и LC3B, обнаруженных в нейронах коры, также была установлена прямая связь (Рисунок 17). При увеличении показателя LAMP2A на 1 следует ожидать увеличение показателя LC3B на 0,587, что объясняет 68,9% наблюдаемой дисперсии LC3B. В нейронах стриатума и гиппокампа также была установлена



заметную прямую корреляцию между показателями интенсивности окрашивания вышеупомянутых маркеров (Рисунок 17). Увеличение значения LC3B на 1 приводит к увеличению показателя LC3B на 0,59 и 0,68, соответственно. Полученная модель объясняет 56,6% наблюдаемой дисперсии LC3B в нейронах стриатума и 37,6% – в нейронах гиппокампа.

### 3.6.10. Корреляционный анализ взаимосвязи показателей маркеров макроаутофагии LC3B и маркера V митохондриального комплекса АТР5А1

В нашей работе был также выполнен корреляционный анализ взаимосвязи показателей макроаутофагии LC3B и V митохондриального комплекса АТР5А1, определяемые в нейронах различных зон головного мозга человека (Таблица 16).  
Таблица 16 – Результаты корреляционного анализа взаимосвязи показателей LC3B и АТР5А1

| Исследуемый показатель    | Свойства корреляционной связи |                            |          |
|---------------------------|-------------------------------|----------------------------|----------|
|                           | $\rho/r_{xy}$                 | Теснота (по шкале Чеддока) | p        |
| LC3B – АТР5А1 (кора)      | 0,649                         | Заметная                   | < 0,001* |
| LC3B – АТР5А1 (стриатум)  | 0,238                         | Слабая                     | 0,215    |
| LC3B – АТР5А1 (гиппокамп) | 0,805                         | Высокая                    | < 0,001* |

\* –  $p < 0,05$

Анализ показателей интенсивности окрашивания вышеуказанных белков, измеренных в нейронах коры, установил заметную прямую связь. Так, увеличение LC3B на 1 приводит к увеличению значения показателя АТР5А1 на 1,561, что объясняет 46,2% наблюдаемой дисперсии показателя АТР5А1.

При оценке связи показателей интенсивности окрашивания АТР5А1 и LC3B, которые выявлялись в нейронах стриатума, была установлена прямая связь на уровне статистической тенденции. Увеличение показателя LC3B на 1 приводит к увеличению показателя маркера V митохондриального комплекса на 0,392, что объясняет 7,0% наблюдаемой дисперсии показателя АТР5А1. В нейронах пирамидного слоя гиппокампа увеличение показателя интенсивности окрашивания АТР5А1 на 1 приводит к увеличению показателя интенсивности

окрашивания маркера макроаутофагии LC3B на 1,224. Полученная модель объясняет 64,8% наблюдаемой дисперсии показателя ATP5A1.

Следовательно, выявленные при иммуногистохимическом исследовании повышенные уровни интенсивности окрашивания вышеуказанных маркеров, наличие корреляций между маркерами ШИА, макроаутофагии и АТФ-синтазы, а также между маркерами ШИА и контроля качества митохондрий, по всей видимости, вносят значительный вклад в обеспечение протеостаза и необходимого уровня энергии в клетках для поддержания выживаемости нейронов при старении.

### **3.7. Иммуногистохимическое исследование маркеров митохондриальной и аутофагоцитарной дисфункции в нейронах головного мозга экспериментальных животных**

#### *3.7.1. Результаты ИГХ выявления маркера HSP70*

Данные иммуногистохимического исследования продемонстрировали повышение интенсивности окрашивания двух маркеров ШИА (HSP70, LAMP2A) в образцах головного мозга лабораторных животных в возрасте 18 месяцев по сравнению с образцами молодых животных.

Во всех исследуемых зонах головного мозга старых и молодых мышей различия в интенсивности окрашивания маркера HSP70 были статистически значимы (Рисунок 18). Интенсивность окрашивания вышеуказанного белка в нейронах двигательной коры лабораторных животных в возрасте 18 месяцев была на 27,3% выше по сравнению с образцами, полученными от лабораторных животных в возрасте 2 месяцев ( $p=0,008$ ). В образцах стриатума и гиппокампа старых лабораторных животных по сравнению с образцами молодых мышей уровень интенсивности окрашивания HSP70 был на 22,9% ( $p=0,2$ ) и на 25,1% выше ( $p=0,02$ ), соответственно.

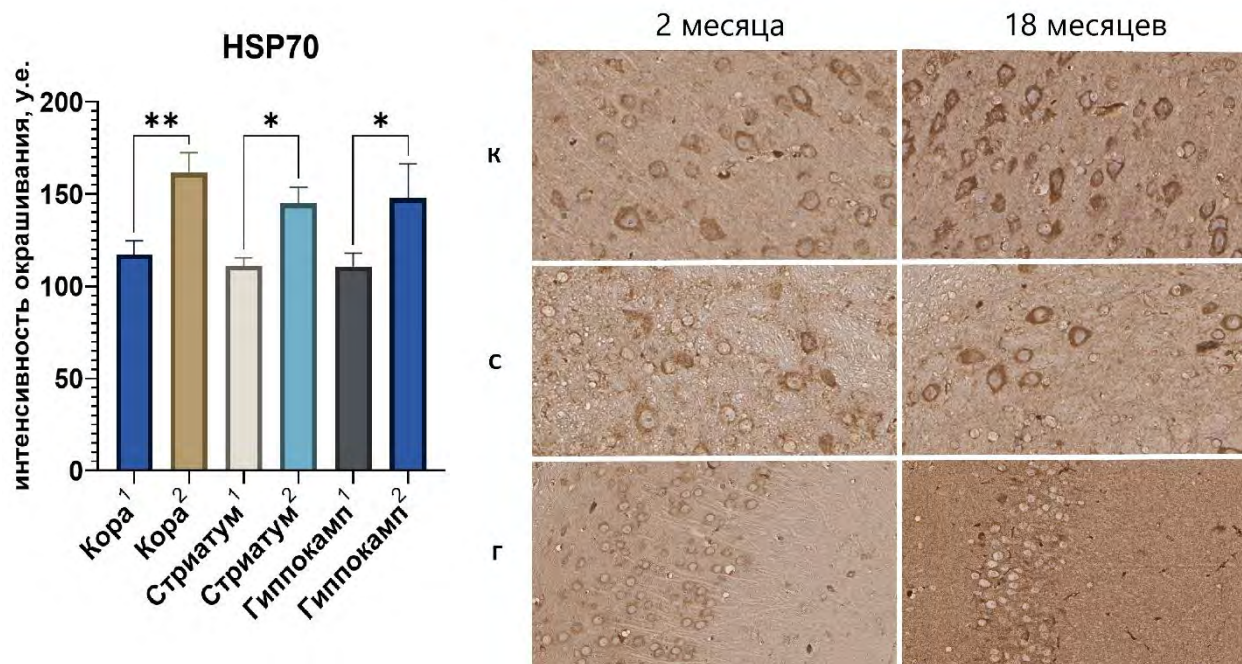


Рисунок 18 – Результаты иммуногистохимического окрашивания с антителом к HSP70. 1 – группа 2 месяца, 2 – группа 18 месяцев; К – нейроны моторной коры, С – нейроны стриатума, Г – нейроны пирамидного слоя гиппокампа; ns –  $p \geq 0,05$ , \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,001$ . Увеличение  $\times 400$  (К, С),  $\times 200$  (Г).

### 3.7.2. Результаты ИГХ выявления маркера LAMP2A

Мы обнаружили статистически значимые изменения интенсивности окрашивания маркера LAMP2A во всех исследованных областях в зависимости от возраста (Рисунок 19). Анализ значений интенсивности окрашивания LAMP2A в нейронах коры продемонстрировал, увеличение данного показателя у лабораторных животных в возрасте 18 месяцев на 25,9% по сравнению с лабораторными животными в возрасте 2 месяцев ( $p=0,02$ ). В нейронах стриатума и гиппокампа уровень интенсивности окрашивания белка LAMP2A в образцах мышей в возрасте 18 месяцев был на 26,5% ( $p=0,03$ ) и 20,9% ( $p=0,2$ ) больше по сравнению со значениями, полученными в группе мышей молодого возраста, соответственно.

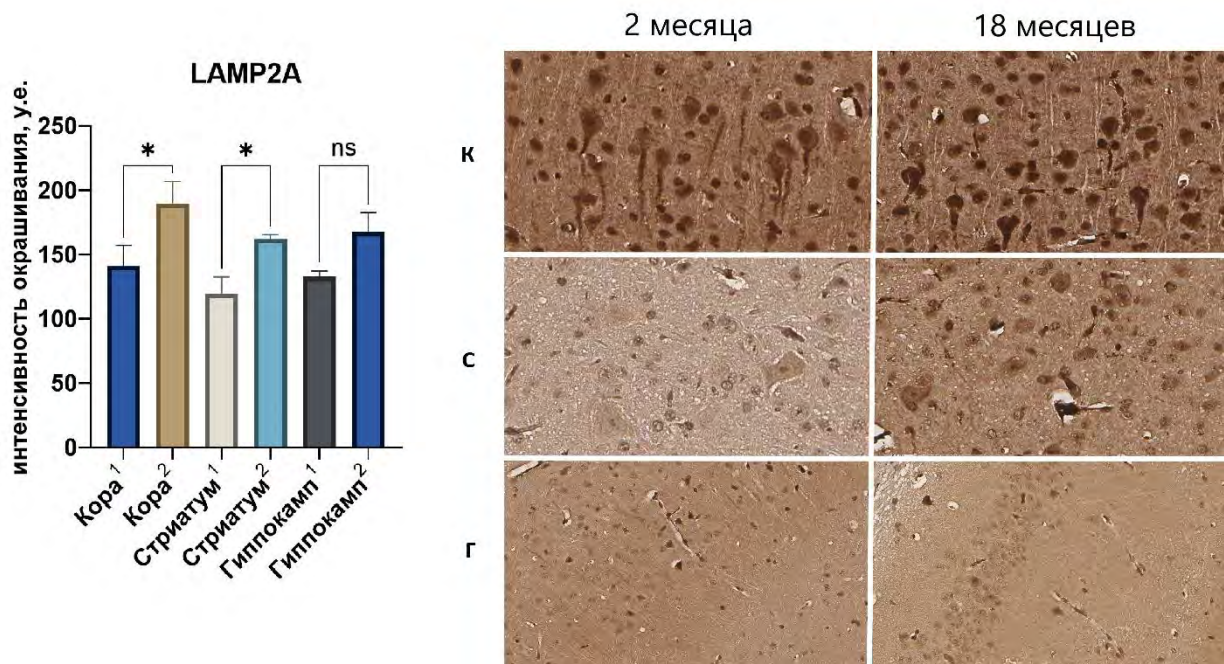


Рисунок 19 – Результаты иммуногистохимического окрашивания с антителом к LAMP2A. 1 – группа 2 месяца, 2 – группа 18 месяцев; К – нейроны моторной коры, С – нейроны стриатума, Г – нейроны пирамидного слоя гиппокампа; ns –  $p \geq 0,05$ , \* –  $p < 0,05$ .  $\times 400$  (К,С),  $\times 200$  (Г).

### 3.7.3. Результаты ИГХ выявления маркера LC3В

При анализе маркера макроаутофагии убиквитин-подобного белка LC3В в головном мозге мышей были выявлены статистически значимые различия вышеописанного показателя (Рисунок 20). В группе старых мышей величина интенсивности окрашивания LC3В в нейронах двигательной коры была выше в 1,25 раза по сравнению с группой молодых мышей ( $p=0,01$ ). Интенсивность окрашивания LC3В, измеренная в перикарионе нейронов стриатума и пирамидного слоя гиппокампа в образцах мышей в возрасте 18 месяцев была на 25,8% ( $p=0,01$ ) и 29,1% ( $p=0,02$ ) больше по сравнению со значениями, полученными в группе мышей в возрасте 2 месяцев, соответственно.



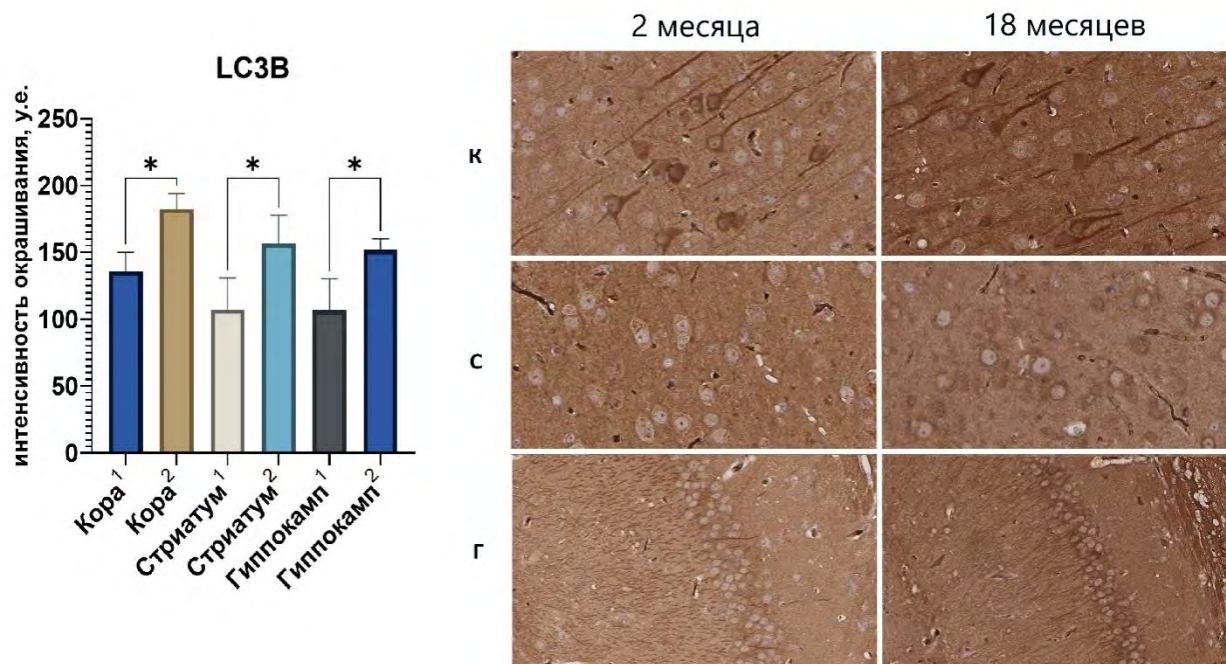


Рисунок 20 – Результаты иммуногистохимического окрашивания с антителом к LC3B. 1 – группа 2 месяца, 2 – группа 18 месяцев; К – нейроны моторной коры, С – нейроны стриатума, Г – нейроны пирамидного слоя гиппокампа; \* –  $p < 0,05$ .  $\times 400$  (К, С),  $\times 200$  (Г).

#### 3.7.4. Иммуногистохимическое исследование маркера *ATP5A1*

При анализе маркера АТФ-синтазы во всех исследуемых зонах головного мозга мышей статистически значимые различия обнаружены не были (Рисунок 21). Однако в группе лабораторных животных в возрасте 18 месяцев отмечалась тенденция к увеличению значений интенсивности окрашивания *ATP5A1*. Величина последней в нейронах двигательной коры была выше на 5% в группе старых лабораторных животных по сравнению с группой молодых мышей ( $p=0,99$ ). Идентичные результаты были получены и для нейронов в двух других исследуемых зонах. Показатели интенсивности окрашивания *ATP5A1* в нейронах стриатума и нейронах пирамидного слоя гиппокампа в образцах, полученных от мышей в возрасте 18 месяцев, был на 10,2% ( $p=0,83$ ) и 20,3% ( $p=0,13$ ) больше по сравнению со значениями, полученными в группе молодых мышей, соответственно.

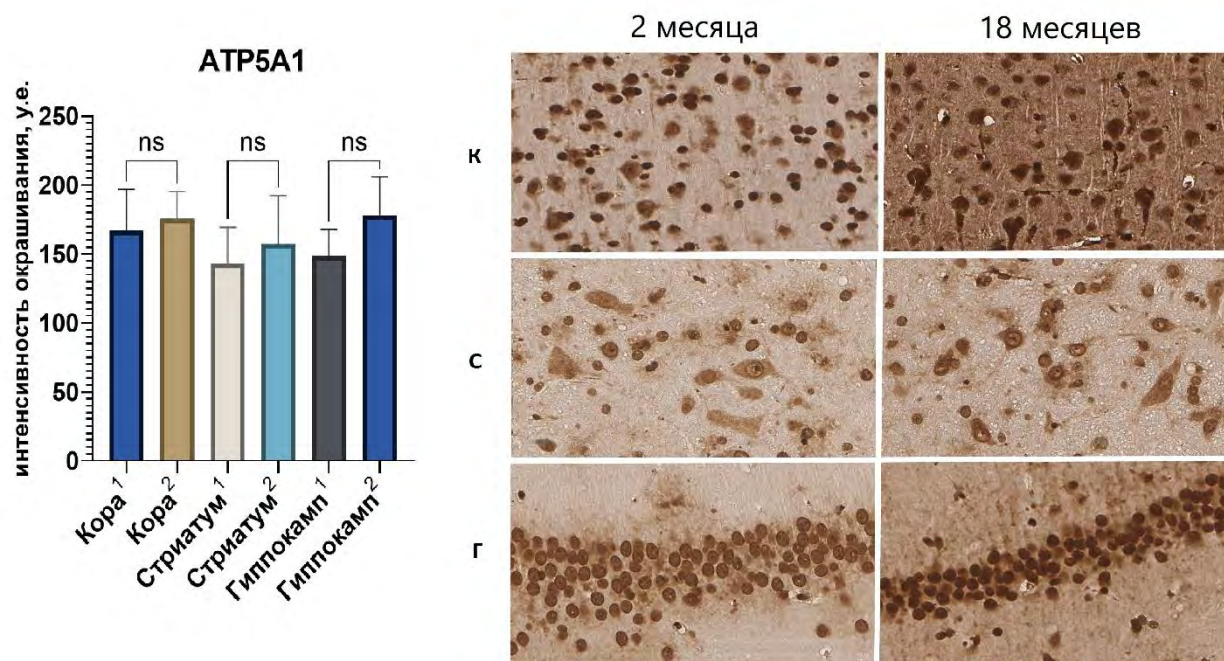


Рисунок 21 – Результаты иммуногистохимического окрашивания с антителом к ATP5A1. 1 – группа 2 месяца, 2 – группа 18 месяцев; К – нейроны моторной коры, С – нейроны стриатума. Г – нейроны пирамидного слоя гиппокампа; ns –  $p \geq 0,05$ .  $\times 400$ .

### 3.7.5. Результаты ИГХ выявления маркера DJ-1

При анализе показателей интенсивности окрашивания белка DJ-1 данного во всех исследуемых зонах были обнаружены статистически значимые различия в двух группах лабораторных животных (Рисунок 22). Уровень интенсивности окрашивания вышеуказанного маркера в нейронах коры головного мозга, полученных от лабораторных животных в возрасте 2 месяцев, был на 27,8% больше по сравнению со значениями, полученными в группе мышей 18 месяцев ( $p=0,02$ ). Показатели интенсивности окрашивания DJ-1 в нейронах стриатума и гиппокампа в образцах мышей в возрасте 2 месяцев, был на 38,4% ( $p=0,03$ ) и 23,9% ( $p=0,02$ ) больше по сравнению со значениями, полученными в группе мышей в возрасте 18 месяцев, соответственно.

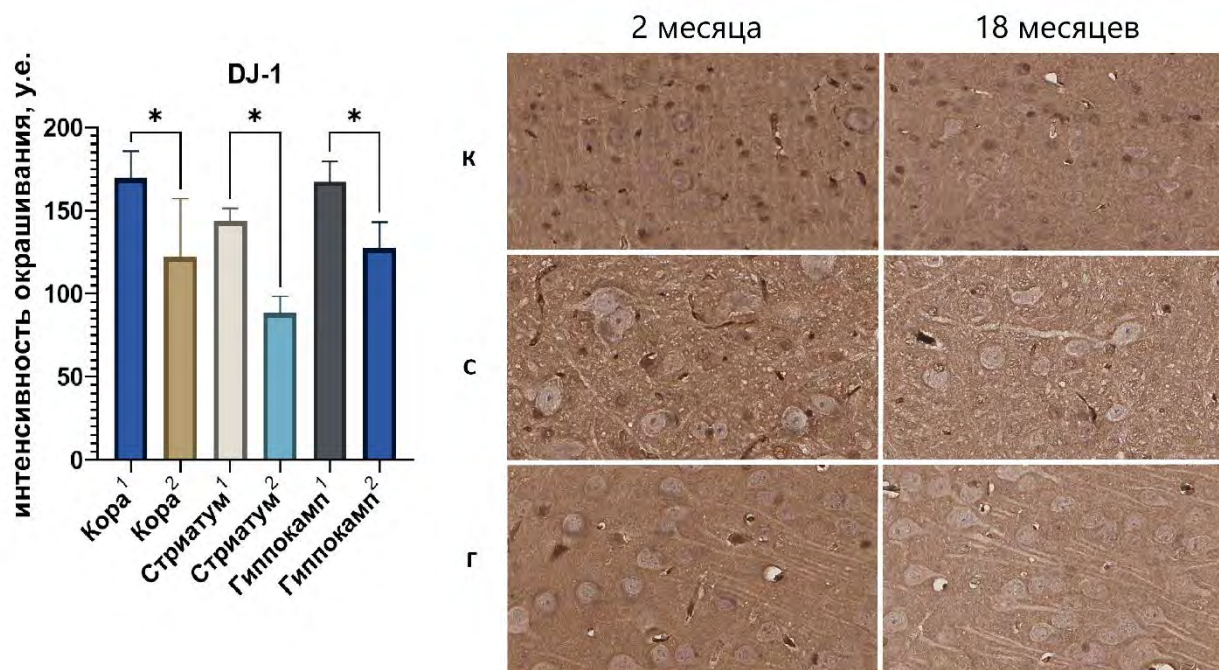


Рисунок 22 – Результаты иммуногистохимического окрашивания с антителом к DJ-1. 1 – группа 2 месяца, 2 – группа 18 месяцев; К – нейроны моторной коры, С – нейроны стриатума, Г – нейроны пирамидного слоя гиппокампа; \* –  $p < 0,05$ .  $\times 400$ .

Для каждого маркера статистически значимых различий в зависимости от возраста в нейронах коры, стриатума и гиппокампа не было обнаружено.

### 3.7.6. Корреляционный анализ взаимосвязи показателей маркеров шаперон-индуцированной аутофагии HSP70 и LAMP2A

При выполнении корреляционного анализа взаимосвязи между показателями интенсивности окрашивания маркеров ШИА (HSP70 и LAMP2A) нами были получены результаты, которые отражены в Таблице 17.

Таблица 17– Результаты корреляционного анализа взаимосвязи показателей HSP70 и LAMP2A

| Исследуемый показатель     | Свойства корреляционной связи |                            |        |
|----------------------------|-------------------------------|----------------------------|--------|
|                            | $\rho/r_{xy}$                 | Теснота (по шкале Чеддока) | p      |
| HSP70 – LAMP2A (кора)      | 0,859                         | Высокая                    | 0,001* |
| HSP70 – LAMP2A (стриатум)  | 0,808                         | Высокая                    | 0,015* |
| HSP70 – LAMP2A (гиппокамп) | 0,775                         | Высокая                    | 0,024* |

\* –  $p < 0,05$



Оценка связи показателей интенсивности окрашивания LAMP2A и HSP70, обнаруженных в нейронах всех исследованных зон головного мозга мышей, выявила прямую зависимость. Так, в нейронах коры, стриатума и гиппокампа увеличение показателя HSP70 на 1 приводит к увеличению показателя LAMP2A на 1,032, 1,375 и 0,593, соответственно. Данная модель объясняет 73,8, 65,3% и 60% наблюдаемой дисперсии LAMP2A в вышеуказанных зонах.

### 3.7.7. Корреляционный анализ взаимосвязи показателей маркеров шаперон-индуцированной аутофагии HSP70, LAMP2A и маркера системы «контроля качества» митохондрий DJ-1

При проведении корреляционного анализа взаимосвязи показателей интенсивности окрашивания маркеров ШИА (HSP70 и LAMP2A) и маркера системы контроля качества митохондрий (DJ-1) нами были получены следующие результаты (Таблица 18).

Таблица 18 – Результаты корреляционного анализа взаимосвязи показателей HSP70, LAMP2A, DJ-1

| Исследуемый показатель   | Свойства корреляционной связи |                            |          |
|--------------------------|-------------------------------|----------------------------|----------|
|                          | $\rho/r_{xy}$                 | Теснота (по шкале Чеддока) | p        |
| HSP70 – DJ-1 (кора)      | -0,592                        | Заметная                   | 0,042*   |
| HSP70 – DJ-1(стриатум)   | -0,846                        | Высокая                    | < 0,001* |
| HSP70 – DJ-1 (гиппокамп) | -0,867                        | Высокая                    | 0,001*   |
| LAMP2A – DJ-1 (кора)     | -0,334                        | Умеренная                  | 0,345    |
| LAMP2A – DJ-1(стриатум)  | -0,887                        | Высокая                    | 0,003*   |
| LAMP2A – DJ-1(гиппокамп) | -0,739                        | Высокая                    | 0,036*   |

\* –  $p < 0,05$

При оценке связи показателя интенсивности окрашивания маркеров DJ-1 и HSP70, которые обнаруживались в нейронах коры, была установлена заметная обратная корреляция (Рисунок 23). Увеличение показателя HSP70 приводит к уменьшению показателя DJ-1 на 0,909, что объясняет 35,1% наблюдаемой дисперсии показателя DJ-1.

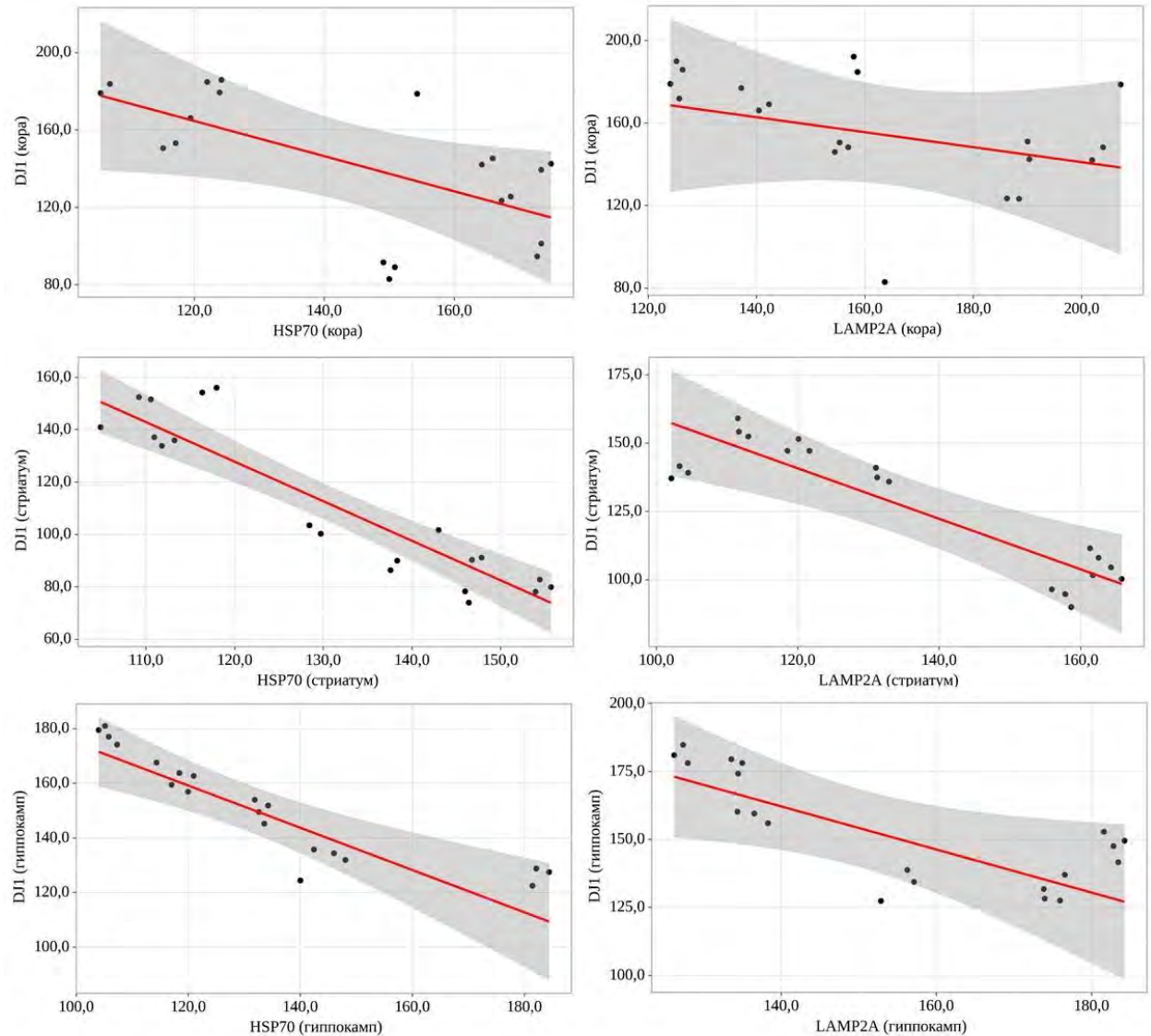


Рисунок 23 – Графики регрессионной функции, характеризующие зависимость показателя DJ-1 от показателей HSP70 и LAMP2A в нейронах различных зон головного мозга лабораторных животных.

При оценке связи показателя интенсивности окрашивания DJ-1 и показателя HSP70, которые выявлялись в нейронах стриатума и пирамидного слоя гиппокампа, также была установлена обратная связь (Рисунок 23). В стриатуме увеличение значения HSP70 на 1 приводит к уменьшению показателя DJ-1 на 1,509; в гиппокампе – на 0,773, что объясняет 88,5% наблюдаемой дисперсии показателя DJ-1 в нейронах стриатума и 75,2% – в нейронах гиппокампа.

Схожие результаты были получены при корреляционном анализе взаимосвязи показателя LAMP2A и DJ-1. Так, при оценке связи DJ-1 и LAMP2A,

интенсивность окрашивания которых была измерена в нейронах коры, была установлена обратная связь на уровне статистической тенденции (Рисунок 23). Увеличение показателя LAMP2A на 1 приводит к уменьшению показателя DJ-1 на 0,363. Эта модель объясняет 11,2% наблюдаемой дисперсии. При изучении связи вышеописанных показателей в нейронах стриатума и пирамидного слоя гиппокампа также была установлена обратная связь (Рисунок 23). Увеличение показателя LAMP2A в стриатуме на 1 приводит к уменьшению показателя DJ-1 на 0,924; в гиппокампе – на 0,792, что объясняет 78,7% наблюдаемой дисперсии показателя интенсивности окрашивания DJ-1 в нейронах стриатума и 54,6% - в нейронах гиппокампа.

### *3.7.8. Корреляционный анализ взаимосвязи показателей маркеров шаперон-индуцированной аутофагии HSP70, LAMP2A и маркера V митохондриального комплекса ATP5A1*

При проведении корреляционного анализа взаимосвязи показателей интенсивности окрашивания маркеров ШИА (HSP70 и LAMP2A) и маркера V митохондриального комплекса нами были получены следующие результаты (Таблица 19).

Таблица 19 – Результаты корреляционного анализа взаимосвязи показателей HSP70, LAMP2A и ATP5A1

| Исследуемый показатель      | Свойства корреляционной связи |                            |       |
|-----------------------------|-------------------------------|----------------------------|-------|
|                             | $\rho/r_{xy}$                 | Теснота (по шкале Чеддока) | p     |
| HSP70 – ATP5A1 (кора)       | 0,209                         | Слабая                     | 0,537 |
| HSP70 – ATP5A1 (стриатум)   | 0,532                         | Заметная                   | 0,092 |
| HSP70 – ATP5A1 (гиппокамп)  | 0,020                         | Нет связи                  | 0,956 |
| LAMP2A – ATP5A1 (кора)      | -0,010                        | Нет связи                  | 0,979 |
| LAMP2A – ATP5A1 (стриатум)  | 0,066                         | Нет связи                  | 0,877 |
| LAMP2A – ATP5A1 (гиппокамп) | -0,071                        | Нет связи                  | 0,880 |

В результате оценки связи показателей интенсивности окрашивания ATP5A1 и HSP70 в нейронах коры и вненейронах стриатума лабораторных животных была установлена прямая корреляционная связь на уровне статистической тенденции. Кроме того, во всех изученных зонах головного мозга мышей связи между показателями интенсивности окрашивания белка LAMP2A и белка ATP5A1 обнаружено не было.

### 3.7.9. Корреляционный анализ взаимосвязи показателей маркеров шаперон-индуцированной аутофагии HSP70, LAMP2A и маркера макроаутофагии LC3B

В нашем исследовании также был проведен корреляционный анализ для показателей интенсивности окрашивания маркеров ШИА HSP70, LAMP2A и маркера макроаутофагии LC3B в нейронах различных зон головного мозга мышей (Таблица 20).

Таблица 20– Результаты корреляционного анализа взаимосвязи показателей HSP70, LAMP2A и LC3B

| Исследуемый показатель    | Свойства корреляционной связи |                            |          |
|---------------------------|-------------------------------|----------------------------|----------|
|                           | $\rho/r_{xy}$                 | Теснота (по шкале Чеддока) | p        |
| HSP70 – LC3B (кора)       | 0,848                         | Высокая                    | < 0,001* |
| HSP70 – LC3B (стриатум)   | 0,563                         | Заметная                   | 0,057    |
| HSP70 – LC3B (гиппокамп)  | 0,667                         | Заметная                   | 0,035*   |
| LAMP2A – LC3B (кора)      | 0,839                         | Высокая                    | 0,002*   |
| LAMP2A – LC3B (стриатум)  | 0,784                         | Высокая                    | 0,021*   |
| LAMP2A – LC3B (гиппокамп) | 0,782                         | Высокая                    | 0,022*   |

\* –  $p < 0,05$

Результаты корреляционного анализа продемонстрировали высокой тесноты прямую связь между значениями интенсивности окрашивания маркеров HSP70 и LC3B в нейронах коры (Рисунок 24). Увеличение показателя HSP70 на 1 приводит к увеличению показателя LC3B на 0,974, что объясняет 71,9% наблюдаемой дисперсии изучаемого маркера макроаутофагии. При оценке связи показателей интенсивности окрашивания HSP70 и LC3B, обнаруженных в

нейронах стриатума и гиппокампа, также была установлена заметная прямая связь (Рисунок 24). Так, в нейронах вышеуказанных зон увеличение показателя HSP70 на 1 приводит к увеличению значения LC3B на 1,038 и 0,821, соответственно, что объясняет 31,6% наблюдаемой дисперсии в стриатума и 44,5% – в гиппокампе.

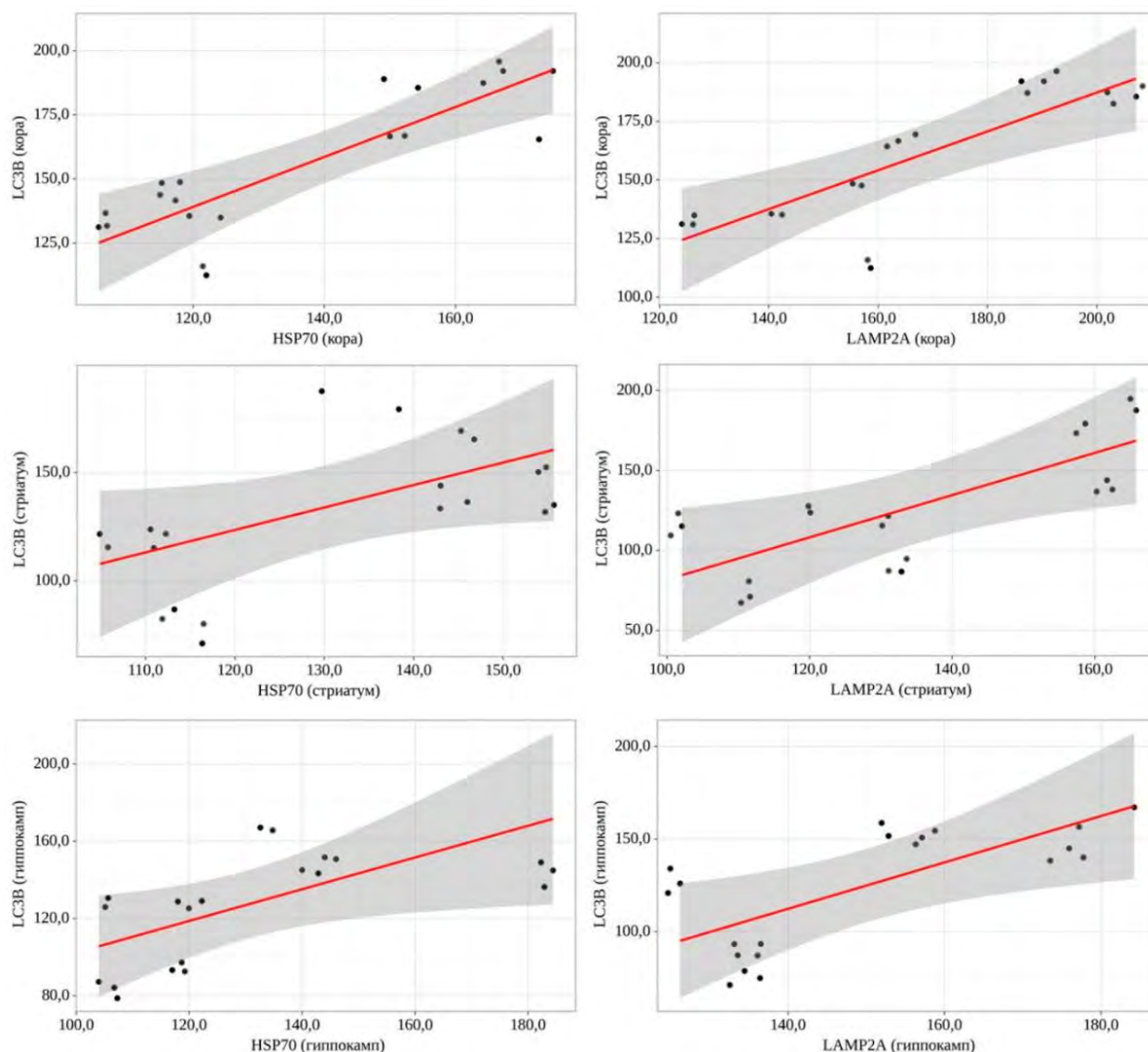


Рисунок 24 – Графики регрессионной функции, характеризующие зависимость показателя LC3B от показателей HSP70 и LAMP2A в нейронах различных зон головного мозга лабораторных животных.

Кроме того, при изучении взаимосвязи показателей интенсивности окрашивания LAMP2A и LC3B, обнаруженных в нейронах коры, стриатума и гиппокампа, также была установлена прямая корреляция (Рисунок 24). В нейронах вышеуказанных зон увеличение показателя LAMP2A на 1 приводит к увеличению показателя LC3B на 0,828, 1,321 и 1,252, соответственно. Полученная

модель объясняет 70,3% наблюдаемой дисперсии LC3В в нейронах коры, 61,5% - стриатума и 61,2% – в нейронах гиппокампа.

### *3.7.10. Корреляционный анализ взаимосвязи показателей маркера аутофагии LC3В и маркера V митохондриального комплекса АТР5А1*

При проведении корреляционного анализа взаимосвязи показателей интенсивности окрашивания маркера макроаутофагии LC3В и показателя интенсивности окрашивания маркера V митохондриального комплекса нами были получены результаты, которые отражены в Таблице 21.

Таблица 21 – Результаты корреляционного анализа взаимосвязи показателей LC3В, АТР5А1

| Исследуемый показатель    | Свойства корреляционной связи |                             |       |
|---------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-------|
|                           | $\rho/r_{xy}$                 | Теснота ( по шкале Чеддока) | p     |
| LC3В – АТР5А1 (кора)      | 0,336                         | Умеренная                   | 0,286 |
| LC3В – АТР5А1 (стриатум)  | 0,188                         | Слабая                      | 0,559 |
| LC3В – АТР5А1 (гиппокамп) | 0,489                         | Умеренная                   | 0,152 |

При оценке связи показателей интенсивности окрашивания АТР5А1 и LC3В, выявленных в нейронах коры, стриатума и гиппокампа, была установлена прямая связь на уровне статистической тенденции. Так, увеличение значения LC3В в нейронах коры на 1 приводит к увеличению АТР5А1 на 0,043, в нейронах гиппокампа – на 0,507, что объясняет 0,2% и 23,9% наблюдаемой дисперсии АТР5А1 в коре и гиппокампе, соответственно. Увеличение значений интенсивности окрашивания LC3В на 1 приводит к увеличению показателя АТР5А1 на 0,171. Полученная модель объясняет 3,5% наблюдаемой дисперсии показателя АТР5А1.

Результаты, полученные при сравнительном и корреляционном анализе в двух возрастных группах мышей, феноменологически сходны с результатами, полученными при анализе аутопсийного материала человека, что может свидетельствовать о компенсаторно-приспособительном характере уровней



маркеров различных подтипов аутофагии, АТФ-синтазы, а также системы контроля качества митохондрий для обеспечения выживаемости нейронов при старении.

### **3.8. Обсуждение результатов иммуногистохимического исследования**

Результаты предыдущих исследований подтверждают, что при возрастной инволюции накопление дефектных нейротоксичных белков происходит не только за счет их неправильного формирования пространственной структуры, но и за счет нарушения их элиминации из клетки [96]. Для большинства нейродегенеративных заболеваний вышеупомянутые процессы являются важным патогенетическим звеном [82;96;136]. Известно, что система шаперонов, состоящая из белков теплового шока, например, HSP70 и его кошаперонов, препятствует формированию и накоплению поврежденных форм белков. HSP70 не только обеспечивает правильную структуру белка, но и в процессе ШИА вместе с рецептором LAMP2A принимает участие в удалении белков со специфической последовательностью аминокислот KFERQ [33].

Большое количество работ, опубликованных за последнее время, посвящено изучению как самих механизмов ШИА, так и выполняемых ею функций. Несмотря на это, представленные в литературе научные данные о базальных уровнях основных маркеров этого селективного типа аутофагии в нейронах головного мозга представлены в небольшом количестве и нередко демонстрируют противоречивые результаты. К примеру, исследование, проведенное в 2011 году Ye и соавторами, выявило усиленную экспрессию тканевых маркеров ШИА в мозге при старении, однако в 2014 году Gleixner совместно с коллективом автором опубликовал в своей работе противоположные результаты [61;161].

Результаты нашего иммуногистохимического исследования демонстрируют увеличение интенсивности окрашивания маркеров ШИА в нейронах с возрастом, что частично совпадает с ранее опубликованными данными. В работах, целью которых явилось изучение ШИА, описаны более высокие значения белков теплового шока не только в нервной ткани головного мозга, но и в миокарде,

печеночной паренхиме и поперечно-полосатой мускулатуре. Тем не менее, исследование активности ШИА на биопсийном и аутопсийном материале ограничено и большая часть экспериментов основна на лабораторных моделях беспозвоночных и позвоночных животных [33;40;61;77;123;161].

Выявленные нами при иммуногистохимическом исследовании повышенные уровни маркеров ШИА в нейронах головного мозга при старении могут быть обусловлены следующим механизмом. Известно, что ШИА играет важную роль в поддержании гомеостаза внутри клетки, вследствие чего уровень активности его компонентов с течением времени может быть активирован в результате избыточного количества дисфункциональных белков и АФК [27;80]. Кроме того, при данном типе аутофагии происходит не только активация HSP70 и его кошаперонов, но и мультимеризация LAMP2A с формированием каналов для транслокации субстрата в просвет лизосомы, что объясняет обнаруженную в нашем исследовании прямую корреляционную связь между вышеописанными маркерами [27;80].

При старении нами были отмечены более низкие значения LAMP2A по сравнению HSP70. Полученные результаты могут быть объяснены следующими фактами. Во-первых, белки теплового шока принимают участие не только в ШИА, но также выполняют в клетке большое количество функций для обеспечения ее гомеостаза. Во-вторых, более низкие уровни LAMP2A могут быть связаны с его относительной недостаточностью: присоединение HSP70 к белкам с целевым аминокислотным мотивом происходит быстрее, чем транслокация образованного ими комплекса в просвет лизосомы. Таким образом, в клетке имеет место диссоциация между стадиями связывания субстрата и его перемещения в просвет лизосомы посредством LAMP2A, но эта гипотеза требует дальнейшего изучения.

Макроаутофагия – это основной путь аутофагии, который является защитным механизмом, позволяющим клеткам функционировать даже при воздействии таких факторов стресса как энергетическая депривация и гипоксия,

отсутствие факторов роста, воздействие активных форм кислорода, повреждение ДНК [78]. Опубликованные за последнее время работы, основной целью которых является изучение вклада макроаутофагии в старение нервной ткани головного мозга, главным образом выполнены на экспериментальных моделях, и, как и при исследовании ШИА, лишь небольшое количество данных получено на материале человека [51;81;95].

В нашей работе при анализе данных, полученных при иммуногистохимическом исследовании, было обнаружено, что при старении показатели интенсивности окрашивания белка LC3В в нейронах различных зон головного мозга человека и лабораторных животных увеличиваются, что, по всей вероятности, может объясняться следующим. Известно, что маркер, используемый нами для определения уровня макроаутофагии LC3В, расположен на внутреннем и внешнем слоях мембраны фагофора. При созревании аутофагосомы он удаляется с внешней поверхности, но остается на ее внутренней поверхности. Следовательно, уровень LC3В с относительной степенью вероятности может коррелировать с количеством аутофагосом. Однако интерпретация результатов измерений LC3В может быть затруднена, так как повышение его уровня может быть связано не только с активацией макроаутофагии, но и со снижением слияния аутофагосомы и лизосомы [96].

В настоящее время также появляются свидетельства того, что макроаутофагия может быть функционально связана с ШИА, а дисфункция одного из типов аутофагии приводит к компенсаторной активации другого [157]. Однако в нашем исследовании была обнаружена прямая связь между маркерами ШИА и макроаутофагии, что не коррелирует с данными литературы [157]. Возможно, это связано с вышеупомянутой сложностью интерпретации результатов LC3В, повышенный уровень которого может отражать как повышение активности макроаутофагии (за счет увеличения количества аутофагосом), так и ее снижение (за счет нарушения докинга аутофагосомы с лизосомой). Кроме того, полученные результаты положительной связи между

HSP70, LAMP2A и LC3B могут быть обусловлены более высокими показателями базального уровня всех вышеперечисленных тканевых маркеров в образцах лиц старческого возраста и старых лабораторных животных по сравнению с условным контролем.

Однако следует отметить, что при сравнении уровней интенсивности окрашивания маркера макроаутофагии LC3B с маркерами ШИА HSP70 и LAMP2A нами были выявлены относительно более высокие показатели последних. Это может свидетельствовать о том, что утилизация конформационно дефектных белков, накапливающихся с течением времени, в старческом возрасте происходит преимущественно при помощи селективного типа аутофагии.

Большинство процессов, играющих критическую роль в обеспечении гомеостаза, и, как следствие, нормальной работы клетки как единой системы, тесно связаны с фундаментальными сигнальными платформами. В качестве последних могут выступать митохондрии [50;91]. В свою очередь, митохондриальная дисфункция приводит к снижению продукции АТФ и, как следствие, биоэнергетическому дефициту за счет подавления активности ферментов дыхательной цепи и нарушения окислительного фосфорилирования. Эти процессы оказывают значительное влияние на функциональный пул нейронов, так как они уязвимы к истощению АТФ и большинство их функций напрямую зависит от наличия энергии, получаемой при метаболизме митохондрий [104;110].

В связи с вышеописанными данными, мы изучили маркер V ферментного комплекса митохондрий – АТФ-синтазу. Нами были выявлены повышенные показатели интенсивности окрашивания данного маркера в образцах головного мозга при старении. Полученные результаты могут быть связаны с увеличением размеров данных органелл и количества их крист, возникших при координации процессов деления и слияния вследствие контроля качества митохондрий.

Появляется все большее число доказательств физиологически значимой взаимосвязи митохондриальной и аутофагоцитарной активности [50;119].

Взаимодействие между митохондриями и аутофагоцитарной системой осуществляется несколькими путями, изучение которых может внести существенный вклад в представление о механизмах старения.

С целью исследования вышеописанной взаимосвязи нами был выполнен корреляционный анализ между маркерами ШИА HSP70 и LAMP2A и маркером АТФ-синтазы АТР5А1. Полученные результаты показали положительную прямую связь между вышеуказанными тканевыми маркерами в образцах аутопсийного материала. Однако в образцах лабораторных животных между HSP70 и АТР5А1 нами была выявлена слабая и заметная прямая связь в нейронах коры и стриатума, соответственно. Достоверной связи между LAMP2A и АТР5А1 в образцах головного мозга мышей обнаружено не было. Полученная нами взаимосвязь между HSP70 и маркером АТФ-синтазы, вероятно, ассоциирована с тем, что HSP70 имеет два домена: пептид-связывающий и АТФ-связывающий домен [72]. Исходя из названия, последний связывает АТФ, энергия которого необходима для соединения с другими белками [72]. Таким образом, для коррекции неправильного фолдинга белков при помощи системы шаперонов используются молекулы АТФ, что может быть обеспечено повышенными уровнями АТФ-синтазы.

Для изучения взаимосвязи между одним из основных белков макроаутофагии LC3B и маркером АТФ-синтазы АТР5А1, нами был выполнен корреляционный анализ, который продемонстрировал прямую связь между вышеуказанными тканевыми маркерами. Полученные результаты могут быть связаны со следующим механизмом.

Известно, что индукция макроаутофагии направлена на разрушение различных компонентов клетки, обеспечивая их переработку. При селективном типе макроаутофагии – митофагии, фрагментация органелл должна предшествовать их поглощению. Однако, в ответ на стимулы, которые индуцируют макроаутофагию, митохондрии удлиняются за счет слияния. Это обусловлено тем, что во время энергетической депривации в клетках происходит

быстрое повышение уровня цАМФ, что активирует протеинкиназу А. Последняя фосфорилирует Drp1 (белок, контролирующий деление митохондрий), удерживая его в цитозоле, и тем самым обеспечивает беспрепятственное слияние митохондрий [62]. Кроме того, удлинённые митохондрии характеризуются более компактным расположением крист, увеличенной димеризацией и активностью АТФ-синтазы, что способствует поддержанию выработки АТФ и, как следствие, обеспечению адекватного уровня энергии. Напротив, если элонгация митохондрий блокируется, они становятся дисфункциональными и «поглощают» цитоплазматический АТФ для поддержания своего мембранного потенциала, ускоряя апоптоза [62].

Видимо элонгация митохондрий препятствует их деградации при макроаутофагии. Ограничение митофагии может быть обусловлено стерическим фактором – удлинённые митохондрии не могут «поместиться» в аутофагосому. Кроме того, в длинных митохондриях может быть недостаточно PTEN-индуцированной киназы 1 (PINK1) на внешней мембране для каскада реакций и передачи сигнала аутофагосоме. Также митохондрии могут иметь важное значение для инициации сборки фагофора и формирования аутофагосомы, в связи с чем они могут быть исключены из процесса немедленной деградации [62].

Следовательно, обнаруженная при корреляционном анализе прямая связь между одним из основных белков макроаутофагии LC3В и маркером АТФ-синтазы может указывать на то, что при старении клетки пытаются повысить эффективность преобразования энергии посредством увеличения размеров митохондрий, которые демонстрируют более высокие уровни димеров АТФ-синтазы и повышение количества молекул АТФ. В свою очередь, вышеописанные изменения в морфологии и функции митохондрий являются важной частью аутофагической программы: если в ответ на биоэнергетический дефицит не происходит стереотипная реакция клетки (удлинение и активация митохондрий), последующая митохондриальная дисфункция может привести к клеточной гибели.

Другим механизмом взаимодействия между митохондриями и аутофагией является упомянутая ранее ШИА, которая опосредованно влияет на контроль качества митохондрий. Как было сказано ранее, при ШИА утилизируются белки, содержащие консервативный мотив KFERQ [34;149]. Известно, что белок DJ-1, основной задачей которого является контроль качества митохондрий при воздействии на них АФК, также содержит вышеупомянутую аминокислотную последовательность. Дефицит DJ-1 приводит к увеличению продукции АФК и повреждению митохондрий.

Обнаруженное нами в образцах старческого возраста незначительное снижение интенсивности окрашивания белка системы «контроля качества» митохондрий DJ-1 в сочетании с повышенным уровнем маркеров HSP70 и LAMP2A может быть обусловлено усиленной утилизацией его поврежденных форм за счет ШИА, что косвенно подтверждает развитие оксидативного стресса в нейронах головного мозга при старении. В пользу этого также свидетельствует наличие обратной связи между вышеупомянутыми маркерами при проведении корреляционного анализа.

Таким образом, полученные нами данные указывают на то, что ШИА утилизирует дисфункциональный поврежденный окислительными процессами белок DJ-1 и опосредованно участвует в поддержании митохондриального гомеостаза при старении нейронов головного мозга человека. Активность ШИА является необходимой для защиты морфологии и функции митохондрий при стрессе, что указывает на прямую регуляторную связь между аутофагией и функцией митохондрий.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные собственные результаты, а также данные литературы позволяют заключить, что старческие изменения головного мозга характеризуются уменьшением его массы, истончением коры головного мозга, расширением субарахноидальных пространств и желудочков с развитием наружной и внутренней гидроцефалии. Исходя из полученных данных, у лиц старческого возраста по сравнению с лицами молодого возраста выявлялось сокращение числа нейронов V слоя коры предцентральной извилины, стриатума, пирамидного слоя гиппокампа и черного вещества. При этом отмечалось увеличение глиального индекса. Вышеперечисленные изменения в глионейрональном соотношении свидетельствуют о том, что возникающее при старении увеличение глиального индекса отражает активацию нейроглии с целью поддержания функциональной активности нейронов.

В нашем исследовании снижение количества нейронов в определенной степени могло быть обусловлено цереброваскулярной недостаточностью в результате церебральной микроангиопатии, ассоциированной с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Это подтверждается обнаруженными нами в ряде случаев очаговыми изменениями вследствие ранее перенесенных мелких глубоких инфарктов, развитие которых связано с артериальной гипертензией. В свою очередь, наличие кардиосклероза может свидетельствовать в пользу кардиоэмболической этиологии ранее перенесенных мелких поверхностных инфарктов. Таким образом, невозможность полного исключения коморбидных и возрастных заболеваний определяет сложность изучения морфологических изменений, обусловленных исключительно старческими проявлениями.

Кроме того, при старении в единичных образцах головного мозга человека были обнаружены признаки, также характерные и для нейродегенерации: цитоплазматические (тельца Леви) и внутриядерные включения (тельца Маринеско), а также немногочисленные сенильные бляшки. Это подтверждает гипотезу об идентичности морфологических сенильных и нейродегенеративных

изменений, основное различие которых состоит в количественных характеристиках [9;31;130].

Важной особенностью старения головного мозга являлось наличие изменений в белом веществе в виде спонгиозного состояния ткани мозга и скопления в нем крахмалистых телец, которые представляют собой дегенеративную форму астроглии. При этом в белом веществе встречалась дилатация периваскулярных пространств с образованием кривлур. Скорее всего, в основе вышеперечисленных изменений лежит деструкция отростков астроцитов с высвобождением жидкости. Последняя движется по пространствам, расположенным вокруг сосудов, и отодвигает мозговую ткань от сосудистой адвентиции [3]. Кроме того, возникающие при старении атрофические изменения головного мозга, скорее всего, являются дополнительным фактором, который вносит вклад в формирование расширенных периваскулярных пространств [3].

Выраженные изменения в компонентах сосудистой системы головного мозга (интрацеребральных артериях и венах, сосудах микроциркуляторного русла) были обнаружены в образцах старческого возраста. Так, в одних сосудах отмечался фиброз и утолщение стенок, в других – их истончение. Кроме того, в коре и стриатуме при старении наблюдалось формирование сосудистых конволютов, что свидетельствует о компенсаторной реакции в ответ на гипоксию, развитие которой обусловлено гемодинамическими нарушениями.

При старении было отмечено утолщение стенок сосудов венозного русла с облитерацией их просвета. Вышеперечисленные изменения могут быть обозначены термином «венозный коллагеноз», являющийся отдельным типом церебральной микроангиопатии [105].

При изучении артериального русла при возрастной инволюции обращали на себя внимание очаги обызвествления, расположенные вокруг мелких артерий и артериол – периваскулярные петрификаты. Последние, наиболее вероятно, возникают в связи с развитием ишемии и гипоксии [100].

В нашей работе помимо исследования образцов головного мозга человека нами были выделены и различные возрастные поражения нервной ткани мышей. К межвидовому сходству, связанному со старением, можно отнести истончение коры, тенденцию к уменьшению количества нейронов и изменения в глионейрональном соотношении. Однако нами не было выявлено поражение сосудов микроциркуляторного русла, а также цитоплазматических и внутриядерных включений, сенильных бляшек.

Применение метода иммуногистохимии позволило провести оценку ШИА и макроаутофагии, выявить особенности состояния митохондрий и системы контроля их качества, а также определить гистологические маркеры взаимодействия митохондрий и системы аутофагоцитоза при старении.

Так, в нейронах стареющего головного мозга человека и лабораторных животных во всех исследованных зонах наблюдалось повышение интенсивности окрашивания как маркеров ШИА HSP70 и LAMP2A, так и маркера макроаутофагии LC3B, расположенного на аутофагосоме. Полученные нами результаты достаточно неожиданны в связи с тем, что повышение активности этих типов аутофагии по данным литературы имеет разнонаправленный характер: при угнетении одного из типов аутофагии происходит компенсаторная активация другого [96].

Таким образом, полученные нами результаты могут с одной стороны указывать на однонаправленную избыточную реакцию в ответ на стресс, возникающий в клетке с течением времени. Вероятно, это отражает компенсаторный характер изменений для поддержания функционального пула нейронов при старении. С другой стороны, при старении уровень интенсивности окрашивания изученного нами маркера макроаутофагии может быть повышен не за счет увеличения количества аутофагосом, а за счет блокировки связывания лизосом и аутофагосом, и, как следствие, избыточного накопления последних в цитоплазме. Следовательно, повышенный при старении уровень белка LC3B

может отражать не усиление активности макроаутофагии, а ее подавление, однако эта теория требует дальнейшего изучения.

Необходимо отметить, что средние показатели интенсивности окрашивания маркеров ШИА были выше, чем средние показатели маркера макроаутофагии. Эти данные могут свидетельствовать о том, что при старении ШИА является преимущественным способом элиминации дисфункциональных белков, которые накапливаются в цитоплазме клеток с течением времени. В целом, высокий уровень интенсивности окрашивания HSP70 в образцах стареющего головного мозга человека и мышей наиболее вероятно связан с наличием у HSP70 более широкого спектра функциональной активности и его участием в различных сигнальных путях для поддержания клеточного гомеостаза.

При изучении взаимосвязи между двумя ключевыми маркерами ШИА была выявлена прямая зависимость LAMP2A от HSP70. Вероятно, обнаруженная в нашем исследовании прямая корреляция связана с тем, что при ШИА вслед за активацией комплекса шаперонов происходит мультимеризация LAMP2A. Этот механизм позволяет образовать каналы для перемещения в просвет лизосомы субстрат, который затем подвергается аутофагической деградации. Однако при сопоставлении средних значений вышеописанных маркеров были выявлены более высокие показатели интенсивности окрашивания HSP70 по сравнению с LAMP2A в образцах стареющего головного мозга человека и лабораторных животных. Это может быть обусловлено более быстрым связыванием шаперонов с таргетным белком по сравнению с дальнейшим перемещением этого комплекса в просвет лизосомы посредством LAMP2A. Скорее всего, этот механизм диссоциации связан с развитием относительной недостаточности LAMP2A, но эта гипотеза требует дальнейшего исследования.

При иммуногистохимической оценке состояния митохондрий важной особенностью явился повышенный уровень маркера V комплекса внутренней мембраны митохондрий АТР5А1 в нейронах стареющего головного мозга человека во всех исследованных зонах, что, вероятно, отражает увеличение

размеров вышеупомянутых органелл и количества их крист. Подобные изменения могут иметь компенсаторный характер для интенсификации энергообмена. В то же время, в образцах старых мышей наблюдалась лишь тенденция к увеличению показателя АТР5А1 по сравнению с молодыми животными, но эти различия не были статистически значимы. Данные результаты, возможно, обусловлены тем, что у лабораторных животных отсутствовали признаки ангиопатии и как следствие, гипоксические изменения были выражены в меньшей степени.

Важной особенностью, обнаруженной при иммуногистохимическом исследовании, являлось незначительное снижение при старении интенсивности окрашивания белка системы «контроля качества» митохондрий DJ-1, что в сочетании с обратной связью с маркерами HSP70 и LAMP2A, возможно, свидетельствует об усиленной утилизации дисфункциональных форм DJ-1 посредством ШИА. Эти данные в совокупности с результатами предыдущих исследований, во-первых, подтверждают, что ШИА является критически значимым механизмом в поддержании адекватного морфофункционального состояния митохондрий и, во-вторых, увеличение количества АФК и развитие оксидативного стресса при возрастной инволюции головного мозга.

Иной характер имели показатели корреляции иммуногистохимических маркеров макроаутофагии LC3B и V митохондриального комплекса АТР5А1: интенсивность окрашивания АТР5А1 прямо коррелирует с LC3B. Выявленная взаимосвязь между маркерами макроаутофагии и АТФ-синтазы, вероятно, обусловлена определенным каскадом реакций, приводящих к слиянию митохондрий при стимуляции макроаутофагии. Это может указывать на то, что устранение биоэнергетического дефицита во время старения может происходить при помощи удлинения митохондрий, которые демонстрируют компактные кристы, высокие уровни АТФ-синтазы и увеличение количества молекул АТФ.

Кроме вышеперечисленных механизмов аутофагии, регулирующих состояние функционального пула митохондрий, также необходимо отметить, что митохондрии также могут влиять на аутофагию. Так, полученные результаты

иммуногистохимического исследования свидетельствуют об увеличении показателя интенсивности окрашивания ATP5A1, что прямо коррелирует с показателями интенсивности окрашивания HSP70 и LAMP2A. Полученные нами результаты, возможно, обусловлены тем, что для формирования правильной структуры белков посредством шаперонов требуются молекулы АТФ, достаточное количество которых может быть обеспечено повышенными уровнями АТФ-синтазы.

Анализ результатов электронно-микроскопического исследования нейронов лабораторных животных показал статистически значимое снижение количества митохондрий на единицу исследованной площади ( $p < 0,001$ ), а также уменьшение объемной доли митохондрий в цитоплазме клетки ( $p < 0,001$ ) при старении. Одновременно с этим отмечалось увеличение объема этих органелл.

Можно с большой долей вероятности предположить, что выявленные в нашем исследовании изменения количественных иммуногистохимических параметров и изменение морфологии митохондрий нейронов стареющего головного мозга, вероятно, имеют компенсаторно-приспособительный характер в условиях энергетической депривации и оксидативного стресса.

Следовательно, данные проведенного исследования свидетельствуют о том, что в различных структурах головного мозга человека и лабораторных животных сенильные проявления характеризуются вариативностью, часть из которых может быть схожа с признаками нейродегенерации, в тоже время, отличаясь от последней степенью выраженности этих изменений. Выявленные нами уровни маркеров различных типов аутофагии и состояния митохондрий, а также обнаруженная динамика корреляционных связей между ними, вероятно, способствуют выживанию нейронов в процессе возрастной инволюции за счет поддержания протеостаза и адекватного уровня энергии в клетках. Более глубокое исследование указанных белков при помощи различных методов клеточной и молекулярной биологии может способствовать пониманию механизмов старения.

## ВЫВОДЫ

1. Результаты проведенного комплексного морфологического и морфометрического исследования подтверждают, что при старении головного мозга человека происходит утрата крупных нейронов в таких структурах как кора предцентральной извилины, гиппокамп, базальные ядра и черная субстанция, с последующим развитием астроцитарного глиоза. Макроскопически отмечается снижение массы головного мозга и истончение коры полушарий большого мозга.

2. Микроскопически выявляются изменения ткани мозга, свойственные старению и феноменологически сходные с нейродегенеративными процессами позднего возраста, отличаясь от последних преимущественно количественно: статистически значимое уменьшение количества нейронов в результате их гибели в указанных областях; липопигментная дистрофия сохранившихся крупных нейронов; цитоплазматические включения (тельца Леви) и внутриядерные включения (тельца Маринеско) в отдельных нигростриарных нейронах; немногочисленные сенильные бляшки в коре мозга и базальных ядрах; спонгиозные изменения белого вещества с деструкцией миелиновых волокон и формированием резко расширенных периваскулярных пространств (криблор); изменения сосудов микроциркуляторного русла головного мозга (капиллярофиброз и артериолосклероз) с запустеванием их просветов, истончение стенок мелких артерий и вен с утратой их тонуса, периваскулярные петрификаты, образование конволютов, утолщение и склероз стенок перивентрикулярных вен (венозный коллагеноз), а также отложение в ткани мозга крахмалистых телец, характерных для патологической атрофии мозга.

3. В головном мозге стареющих мышей отмечена значительная гибель нейронов преимущественно в пирамидном слое коры гиппокампа при относительно незначительном сокращении их количества в V слое моторной коры и стриатуме на фоне глиальной реакции. При этом морфологических изменений ткани мозга, характерных для нейродегенеративных процессов у человека, не выявлено, что, возможно, обусловлено дополнительным влиянием на стареющий



головной мозг человека изменений, связанных с гораздо большей продолжительностью жизни и обусловленных, в том числе, коморбидными сосудистыми заболеваниями (артериальной гипертонией и атеросклерозом).

4. При электронно-микроскопическом исследовании нейронов головного мозга стареющих лабораторных животных выявлено снижение количества митохондрий по сравнению с таковым у молодых животных, при этом отмечено увеличение объема сохранных органелл (вероятно, компенсаторное), приобретающих сферическую форму.

5. На основании комплексного иммуногистохимического исследования с использованием маркера системы контроля качества митохондрий DJ-1, маркера АТФ-синтазы, а также маркеров шаперон-индуцированной аутофагии HSP70 и LAMP2A установлено, что в сохранных нейронах исследованных областей головного мозга человека и экспериментальных животных при старении имеет место достоверное уменьшение интенсивности окрашивания иммуногистохимического маркера DJ-1, что, в сочетании с обнаруженным достоверным увеличением интенсивности окрашивания маркера АТФ-синтазы и шаперон-индуцированной аутофагии, свидетельствует о снижении активности системы контроля качества митохондрий и развитии оксидативного стресса.

6. В нейронах исследованных областей головного мозга человека и лабораторных животных при старении выявлено повышение уровня интенсивности окрашивания маркера макроаутофагии – белка LC3В, расположенного на поверхности аутофагосом, что может быть как результатом увеличения количества аутофагосом, так и следствием нарушенной утилизации вышеописанных органелл лизосомами.

7. В результате комплексного изучения маркеров аутофагии в нейронах стареющего головного мозга человека и лабораторных животных установлено, что при старении преимущественным способом элиминации дисфункциональных белков, которые накапливаются с течением времени, является шаперон-индуцированная аутофагии, что проявляется в достоверном увеличении

интенсивности окрашивания иммуногистохимических маркеров HSP70 и LAMP2A , а также в их более высоких средних значениях по сравнению со средними показателями маркера макроаутофагии.

8. При изучении взаимосвязи митохондриальных маркеров и маркеров различных типов аутофагии в нейронах головного мозга человека выявлены следующие достоверные корреляции: обратная связь между интенсивностью окрашивания маркеров шаперон-индуцированной аутофагии и маркера системы контроля качества митохондрий DJ-1, а также прямая корреляция между интенсивностью окрашивания маркера АТФ-синтазы АТР5А1 с одной стороны и маркеров макроаутофагии и шаперон-индуцируемой аутофагии с другой, что, очевидно, является проявлением синхронизированного участия митохондрий и системы аутофагоцитоза в адаптации нейрона к возрастным изменениям.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Грибанов, А.В. Старение головного мозга человека: морфофункциональные аспекты / А.В. Грибанов, Ю.С. Джос, И.Н. Дерябина [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2017. – №2. – С. 3–7.
2. Григорьев, И.П. Распределение телец Маринеско в нейронах черного вещества головного мозга человека / И.П. Григорьев, В.В. Гусельникова, Е.Г. Сухорукова [и др.] // Морфология. – 2015. – №5. – С. 28–31.
3. Гулевская, Т.С. Морфологические изменения структурных элементов центральной нервной системы при нейродегенеративных заболеваниях позднего возраста и старении / Т.С. Гулевская, В.А. Моргунов // Нейродегенеративные болезни и старение. – М.: Медицина, 2001. – С. 277–342.
4. Гулевская, Т.С. Патологическая анатомия нарушений мозгового кровообращения при атеросклерозе и артериальной гипертензии / Т.С. Гулевская, В.А. Моргунов – М.: Медицина, 2009. – 296 с.
5. Дамулин, И.В. Гериатрические аспекты заболеваний нервной системы // Болезни нервной системы. Руководство для врачей / И.В. Дамулин, Н.Н. Яхно – М.: Медицина, 2001. – С. 432–456.
6. Добрынина, Л.А. Церебральная амилоидная ангиопатия / Л.А. Добрынина, Л.А. Калашникова, Р.Н. Коновалов [и др.] // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. – 2008. – №3. – С. 38–43.
7. Зенков, Н.К. Аутофагия как механизм защиты при окислительном стрессе / Н.К. Зенков, А.В. Чечушков, П.М. Кожин [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2019. – №2. – С. 195–214.
8. Иллариошкин, С.Н. Паркинсонизм и черная субстанция / С.Н. Иллариошкин, О.С. Левин, Е.Ю. Федотова [и др.] – М.: Атмосфера, 2019. – 304 с.
9. Ишунина, Т.А. Морфофункциональные изменения и компенсаторные механизмы в головном мозге человека при старении и болезни Альцгеймера / Т.А. Ишунина, И.Н. Боголепова, Д.Ф. Свааб // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2020. – №1. – С. 77–85.

10. Коржевский, Д.Э. Ядерный белок NeuN в амилоидных тельцах головного мозга / Д.Э. Коржевский, А.В. Гиляров // Морфология. – 2007. – №2. – С. 75–76.
11. Лукьянова Л.Д. Сигнальные механизмы гипоксии / Л.Д. Лукьянова – М.: РАН, 2019. – 215 с.
12. Максимова, К.Ю. Морфологические изменения нейронов в гиппокампе крыс при преждевременном старении / К.Ю. Максимова, Н.А. Стефанов, С.В. Логвинов // Бюллетень сибирской медицины. – 2014. – №13. – С. 56–61.
13. Максимова, М.Ю. Малые инфаркты головного мозга / М.Ю. Максимова, Т.С. Гулевская, В.А. Моргунов – М.: МЕДпресс–информ, 2023. – 300 с.
14. Моргунова, Г.В. Некоторые замечания, касающиеся взаимосвязи аутофагии, клеточного старения и ограничения клеточной пролиферации / Г.В. Моргунова, А.А. Клебанов, А.Н. Хохлов // Вестник Московского университета. – 2016. – №4. – С. 28–33.
15. Новиков, В.Е. Роль активных форм кислорода в физиологии и патологии клетки и их фармакологическая регуляция / В.Е. Новиков, О.С. Левченкова, Е.В. Пожилова // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2014. – №4. – С. 13–21.
16. Прошкина, Е.Н. Ключевые молекулярные механизмы старения, биомаркеры и потенциальные интервенции / Е.Н. Прошкина, И.А. Соловьёв, М.В. Шапошников [и др.] // Молекулярная биология. – 2020. – №6. – С. 883–921.
17. Пупышев, А.Б. Терапевтическая мишень торможения нейродегенерации: аутофагия / А.Б. Пупышев, Т.А. Короленко, М.А. Тихонова // Журнал высшей нервной деятельности. – 2016. – №5. – С. 515–540.
18. Ратушный, А.Ю. Клеточное старение и мезенхимальные стромальные клетки / А.Ю. Ратушный, Л.Б. Буравкова // Физиология человека. – 2020. – №1. – С. 100–110.
19. Сухоруков, В.С. Очерки митохондриальной патологии / В.С. Сухоруков – М.: Медпрактика–М, 2011. – 288 с.

20. Худоевков, Р.М. Морфологические изменения нейронов и нейроглии в головном мозге быстро стареющих мышей линии SAMP1 / Р.М. Худоевков, В.Н. Сальков, О.В. Сальникова [и др.] // Архив патологии. – 2014. – №2. – С. 22–25.
21. Abate, M. Mitochondria as playmakers of apoptosis, autophagy and senescence / M. Abate, A. Festa, M. Falco [et al.] // Semin Cell Dev Biol. – 2020. – №98. – P. 139–153.
22. Abernethy, W.B. Microvascular Density of the Human Paraventricular Nucleus Decreases with Aging but Not Hypertension / W.B. Abernethy, M.A. Bell, M. Morris [et al.] // Experimental Neurology. – 1993. – №2. – P. 270–274.
23. Adams, R.D. Principles of Neurology / R.D. Adams, M. Victor, A.H. Ropper – 6th ed. – NewYork: McGraw–Hill, 1997. – 1618 p.
24. Alfaro, I.E. Chaperone Mediated Autophagy in the Crosstalk of Neurodegenerative Diseases and Metabolic Disorders / I.E. Alfaro, A. Albornoz, A. Molina [et al.] // Front Endocrinol. – 2019. – №9. – P. 778.
25. Amenta, F. Astrocyte changes in aging cerebral cortex and hippocampus: a quantitative immunohistochemical study / F. Amenta, E. Bronzetti, M. Sabbatini [et al.] // Microsc Res Tech. – 1998. – №1. – P. 29–33.
26. Annesley, S.J. Mitochondria in Health and Disease / S.J. Annesley, P.R. Fisher // Cells. – 2019. – №7. – P. 680.
27. Auzmendi–Iriarte, J. Impact of Chaperone–Mediated Autophagy in Brain Aging: Neurodegenerative Diseases and Glioblastoma / J. Auzmendi–Iriarte, A. Matheu // Front Aging Neurosci. – 2021. – №12. – P. 630–743.
28. Barbosa, M.C. Hallmarks of Aging: An Autophagic Perspective / M.C. Barbosa, R.A. Grosso, C.M. Fader // Front Endocrinol. – 2019. – №9. – P. 790.
29. Beard, J.R. The World report on ageing and health: a policy framework for healthy ageing / J.R. Beard, A. Officer, I.A. de Carvalho [et al.] // Lancet. – 2016. – №387. – P. 2145–2154.

30. Benjamin, E.J. Heart disease and stroke statistics – 2019 update: a report from the American Heart Association / E.J. Benjamin, P. Muntner, A. Alonso [et al.] // *Circulation*. – 2019. – №10. – P. 56–528.
31. Blinkouskaya, Y. Brain aging mechanisms with mechanical manifestations / Y. Blinkouskaya, A. Caçoilo, T. Gollamudi [et al.] // *Mech Ageing Dev*. – 2021. – Vol.200. – P. 111575.
32. Boengler, K. Mitochondria and ageing: role in heart, skeletal muscle and adipose tissue / K. Boengler, M. Kosiol, M. Mayr [et al.] // *J CachexiaSarcopenia Muscle*. – 2017. – №3. – P. 349–369.
33. Bourdenx, M. Chaperone-mediated autophagy prevents collapse of the neuronal metastable proteome / M. Bourdenx, A. Martín-Segura, A. Scrivo [et al.] // *Cell*. – 2021. – №10. – P. 2696–2714.
34. Brekk, O.R. Impairment of chaperone-mediated autophagy affects neuronal homeostasis through altered expression of DJ-1 and CRMP-2 proteins / O.R. Brekk, M. Makridakis, P. Mavroei [et al.] // *Mol Cell Neurosci*. – 2019. – Vol.95. – P. 1–12.
35. Brody, H. Organization of the cerebral cortex. III. A study of aging in the human cerebral cortex / H. Brody // *J Comp Neurol*. – 1995. – №2. – P. 511–516.
36. Bu, W. Autophagy Contributes to the Maintenance of Genomic Integrity by Reducing Oxidative Stress / W. Bu, X. Hao, T. Yang [et al.] // *Oxid Med Cell Longev*. – 2020. – Vol.2020. – P. 1–14.
37. Buee, L. Pathological alterations of the cerebral microvasculature in Alzheimers disease and related dementing disorders / L. Buee, P.R. Hof, C. Bouras [et al.] // *ActaNeuropathologica*. – 1994. – №5. – P. 469–480.
38. Burke, S.N. Neural plasticity in the ageing brain / S.N. Burke // *Nat Rev Neurosci*. – 2006. – №10. – P. 30–40.
39. Cabello, C.R. Ageing of substantia nigra in humans: cell loss may be compensated by hypertrophy / C.R. Cabello, J.J. Thune, H. Pakkenberg [et al.] // *NeuropatholApplNeurobiol*. – 2002. – №4. – P. 283–291.

40. Calabrese, V. Increased expression of heat shock proteins in rat brain during aging: relationship with mitochondrial function and glutathione redox state / V. Calabrese, G. Scapagnini, A. Ravagna [et al.] // *Mech Ageing Dev.* – 2004. – №4. – P. 325–335.
41. Calcinotto, A. Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury / A. Calcinotto, J. Kohli, E. Zagato [et al.] // *Physiol Rev.* – 2019. – P. 1047–1078.
42. Calí, T. Play Around with mtDNA / T. Calí, M. Brini // *DNA Cell Biol.* – 2020. – №8. – P. 1369.
43. Campisi, J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: goodcitizens, bad neighbors / J. Campisi // *Cell.* – 2005. – №4. – P. 513–522.
44. Cavanagh, J.B. Corpora amylacea and the family of polyglucosan diseases / J.B. Cavanagh // *Brain Res Rev.* – 1999. – №2–3. – P. 265–295.
45. Chen, G. Mitophagy: An Emerging Role in Aging and Age-Associated Diseases / G. Chen, G. Kroemer, O. Kepp // *Front Cell Dev Biol.* – 2020. – №8. – P. 200.
46. Cornell, J. Microglia regulation of synaptic plasticity and learning and memory / J. Cornell, S. Salinas, H.Y. Huang [et al.] // *Neural Regen Res.* – 2022. – №4. – P. 705–716.
47. Corti, O. Autophagy in neurodegeneration: New insights underpinning therapy for neurological diseases / O. Corti, K. Blomgren, A. Poletti [et al.] // *J Neurochem.* – 2020. – №4. – P. 354–371.
48. Costa, K.M. The effects of aging on substantia nigra dopamine neurons / K.M. Costa // *J Neurosci.* – 2014. – №46. – P. 15133–4.
49. Davis, C.H. Transcellular degradation of axonal mitochondria / C.H. Davis, K.Y. Kim, E.A. Bushong [et al.] // *Proc Natl Acad Sci.* – 2014. – №26. – P. 9633–8.
50. Deus, C.M. Mitochondria–Lysosome Crosstalk: From Physiology to Neurodegeneration / C.M. Deus, K.F. Yambire, P.J. Oliveira [et al.] // *Trends Mol Med.* – 2020. – №1. – P. 71–88.
51. Dong, W. Influence of age-related learning and memory capacity of mice: different effects of a high and low caloric diet / W. Dong, R. Wang, L.N. Ma [et al.] // *Aging ClinExp Res.* – 2016. – №2. – P. 303–311.



52. Emery Thompson, M. Insights from evolutionarily relevant models for human ageing / M. Emery Thompson, A.G. Rosati, N. Snyder-Mackler // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* – 2020. – Vol.375. – P. 1–8.
53. Estaquier, J. The mitochondrial pathways of apoptosis / J. Estaquier, F. Vallette, J.L. Vayssiere [et al.] // *AdvExp Med Biol.* – 2012. – Vol.942. – P. 157–183.
54. Faitg, J. 3D neuronal mitochondrial morphology in axons, dendrites, and somata of the aging mouse hippocampus / J. Faitg, C. Lacefield, T. Davey [et al.] // *Cell Rep.* – 2021. – №6. – P. 1–11.
55. Fan, P. Molecular Regulation Mechanisms and Interactions Between Reactive Oxygen Species and Mitophagy / P. Fan, X.H. Xie, C.H. Chen [et al.] // *DNA Cell Biol.* – 2019. – №1. – P. 10–22.
56. Farr, J.N. The Spectrum of Fundamental Basic Science Discoveries Contributing to Organismal Aging / J.N. Farr, M. Almeida // *J Bone Miner Res.* – 2018. – №9. – P. 1568–1584.
57. Fivenson, E.M. Mitophagy in neurodegeneration and aging / E.M. Fivenson, S. Lautrup, N. Sun [et al.] // *Neurochem Int.* – 2017. – №109. – P. 202–209.
58. Fontana, L. Caloric restriction and cellular senescence / L. Fontana, J. Nehme, M. Demaria // *Mech Ageing Dev.* – 2018. – №176. – P. 19–23.
59. Garza–Lombó, C. Redox homeostasis, oxidative stress and mitophagy / C. Garza–Lombó, A. Pappa, M.I. Panayiotidis [et al.] // *Mitochondrion.* – 2020. – №51. – P. 105–117.
60. Ge, P. PINK1 and Parkin mitochondrial quality control: a source of regional vulnerability in Parkinson's disease / P. Ge, V.L. Dawson, T.M. Dawson // *MolNeurodegener.* – 2020. – №1. – P. 105–117.
61. Gleixner, A.M. Impact of aging on heat shock protein expression in the substantia nigra and striatum of the female rat / A.M. Gleixner, S.H. Pulugulla, D.B. Pant [et al.] // *Cell Tissue Res.* – 2014. – Vol.357. – P. 43–54.

62. Gomes, L.C. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability / L.C. Gomes, G. Di Benedetto, L. Scorrano // *Nat Cell Biol.* – 2011. – №5. – P. 589–598.
63. Gureev, A.P. Regulation of Mitochondrial Biogenesis as a Way for Active Longevity: Interaction Between the Nrf2 and PGC-1 $\alpha$  Signaling Pathways / A.P. Gureev, E.A. Shaforostova, V.N. Popov // *Front Genet.* – 2019. – №10. – P. 435.
64. Halling, J.F. PGC-1 $\alpha$  regulates mitochondrial properties beyond biogenesis with aging and exercise training / J.F. Halling, H. Jessen, J. Nøhr-Meldgaard [et al.] // *Am J PhysiolEndocrinolMetab.* – 2019. – №3. – P. 513–525.
65. Hamacher-Brady, A. Mitophagy programs: mechanisms and physiological implications of mitochondrial targeting by autophagy / A. Hamacher-Brady, N.R. Brady // *Cell Mol Life Sci.* – 2016. – №4. – P. 775–795.
66. Hayakawa, K. Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke / K. Hayakawa, E. Esposito, X. Wang [et al.] // *Nature.* – 2016. – №535. – P. 551–555.
67. Herb, M. Functions of ROS in Macrophages and Antimicrobial Immunity / Herb M., M. Schramm // *Antioxidants.* – 2021. – №2. – P. 313.
68. Herbst, A. Comment on: "Mitochondrial Mechanisms of Neuromuscular Junction Degeneration with Aging" / A. Herbst, J.M. Aiken, D. McKenzie [et al.] // *Cells.* – 2020. – №8. – P. 1796.
69. Hernandez-Segura, A. Hallmarks of Cellular Senescence / A. Hernandez-Segura, J. Nehme, M. Demaria // *Trends Cell Biol.* – 2018. – №6. – P. 436–453.
70. Hirata, Y. Reactive Oxygen Species (ROS) Signaling: Regulatory Mechanisms and Pathophysiological Roles / Y. Hirata // *YakugakuZasshi.* – 2019. – №10. – P. 1235–1241.
71. Hou, Y. Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease / Y. Hou, X. Dan, M. Babbar [et al.] // *Nat Rev Neurol.* – 2019. – №10. – P. 565–581.
72. Hubert, V. Modulating Chaperone-Mediated Autophagy and Its Clinical Applications in Cancer / V. Hubert, S. Weiss, A.J. Rees [et al.] // *Cells.* – 2022. – №16. – P. 2562.

73. Jang, J.Y. The role of mitochondria in aging / J.Y. Jang, A. Blum, J. Liu [et al.] // *J Clin Invest.* – 2018. – №9. – P. 3662–3670.
74. Javierre–Petit, C. Neuropathologic and Cognitive Correlates of Enlarged Perivascular Spaces in a Community-Based Cohort of Older Adults / C. Javierre–Petit, J.A. Schneider, A. Kapasi [et al.] // *Stroke.* – 2020. – №9. – P. 2825–2833.
75. Jha, M.K. Glia-neuron energy metabolism in health and diseases: New insights into the role of nervous system metabolic transporters / M.K. Jha, B.M. Morrison // *Exp Neurol.* – 2018. – V.309. – P. 23–31.
76. Ji, L.L. Oxidative stress: an evolving definition / L.L. Ji, D. Yeo // *Fac Rev.* – 2021. – №9. – P. 10–13.
77. Joseph, A.M. The impact of aging on mitochondrial function and biogenesis pathways in skeletal muscle of sedentary high- and low-functioning elderly individuals / A.M. Joseph, P.J. Adhihetty, T.W. Buford [et al.] // *Aging Cell.* – 2012. – №5. – P. 801–809.
78. Joshi, V. How autophagy can restore proteostasis defects in multiple diseases? / V. Joshi, A. Upadhyay, V.K. Prajapati [et al.] // *Med Res Rev.* – 2020. – №4. – P. 1385–1439.
79. Juraska J.M. Neuroanatomical changes associated with cognitive aging / J.M. Juraska, N.C. Lowry // *Current Topics in Behavioral Neurosciences.* – 2012. – V.10. – P. 137–162.
80. Juste, Y.R. Analysis of Chaperone-Mediated Autophagy / Y.R. Juste, A.M. Cuervo // *Methods Mol Biol.* – 2019. – V.1880. – P. 703–727.
81. Kallergi, E. Macroautophagy and normal aging of the nervous system: Lessons from animal models / E. Kallergi, V. Nikolettou // *Cell Stress.* – 2021. – №10. – P. 146–166.
82. Kanno, H. Chaperone-Mediated Autophagy in Neurodegenerative Diseases and Acute Neurological Insults in the Central Nervous System / H. Kanno, K. Handa, T. Murakami [et al.] // *Cells.* – 2022. – №7. – P. 1205.

83. Kauppila, T.E.S. Mammalian Mitochondria and Aging: An Update / T.E.S. Kauppila, J.H.K. Kauppila, N.G. Larsson // *Cell Metab.* – 2017. – №1. – P. 57–71.
84. Kaushik, S. The coming of age of chaperone-mediated autophagy / S. Kaushik, A.M. Cuervo // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2018. – №6. – P. 365–381.
85. Kondadi, A.K. Functional Interplay between Cristae Biogenesis, Mitochondrial Dynamics and Mitochondrial DNA Integrity / A.K. Kondadi, R. Anand, A.S. Reichert // *Int J Mol Sci.* – 2019. – №17. – P. 4311.
86. Krygowska-Wajs, A. Increased synphilin-1 expression in human elderly brains with substantia nigra Marinesco bodies / A. Krygowska-Wajs, T. Lenda, D. Adamek [et al.] // *Pharmacol Rep.* – 2018. – №6. – P. 914–924.
87. Kumar, A. Autophagy and Mitochondria: Targets in Neurodegenerative Disorders / A. Kumar, A. Dhawan, A. Kadam [et al.] // *CNS NeurolDisord Drug Targets.* – 2018. – №9. – P. 696–705.
88. Kunizheva, S.S. Current Trends and Approaches to the Search for Genetic Determinants of Aging and Longevity / S.S.Kunizheva, V.P. Volobaev, M.Y. Plotnikova [et al.] // *Russ J Genet.* – 2022. – №12. – P. 1427–1443.
89. Lau, D.H.W. Disruption of endoplasmic reticulum-mitochondria tethering proteins in post-mortem Alzheimer's disease brain / D.H.W. Lau, S. Paillusson, N. Hartopp [et al.] // *Neurobiol Dis.* – 2020. – V.143. – P. 105020.
90. Lee, H.C. Mitochondria and aging / H.C. Lee, Y.H. Wei // *AdvExp Med Biol.* – 2020. – №143. – P. 311–327.
91. Lee, Y.H. Targeting regulation of ATP synthase 5 alpha/beta dimerization alleviates senescence / Y.H. Lee, D. Choi, G. Jang [et al.] // *Aging.* – 2022. – №2. – P. 678–707.
92. Li, Z. Aging and age-related diseases: from mechanisms to therapeutic strategies / Z. Li, Z. Zhang, Y. Ren [et al.] // *Biogerontology.* – 2022. – №2. – P. 165–187.
93. Liang, W. Aging is associated with a decline in Atg9b-mediated autophagosome formation and appearance of enlarged mitochondria in the heart / W. Liang, A.G. Moyzis, M.A. Lampert [et al.] // *Aging Cell.* – 2020. – №8. – P. 13187.

94. Liao, Z. Dysfunction of chaperone-mediated autophagy in human diseases / Z. Liao, B. Wang, W. Liu [et al.] // *Mol Cell Biochem.* – 2021. – №3. – P. 1439–1454.
95. Liu, H. Rapamycin ameliorates age-related hearing loss in C57BL/6J mice by enhancing autophagy in the SGNs / H. Liu, F. Li, X. Li [et al.] // *Neurosci Lett.* – 2022. – №772. – P. 136493.
96. Loeffler, D.A. Influence of Normal Aging on Brain Autophagy: A Complex Scenario / D.A. Loeffler // *Front Aging Neurosci.* – 2019. – №11. – P. 49.
97. Loos, B. Augmenting brain metabolism to increase macro- and chaperone-mediated autophagy for decreasing neuronal proteotoxicity and aging / B. Loos, D.J. Klionsky, E. Wong // *Prog Neurobiol.* – 2017. – №156. – P. 90–106.
98. López-Otín, C. The hallmarks of aging / C. López-Otín, M.A. Blasco, L. Partridge [et al.] // *Cell.* – 2013. – №6. – P. 1194–1217.
99. Lowe, J. Ageing of the brain. *Greenfield's Neuropathology* / J. Lowe – 9 ed. – CRC Press, Taylor & Francis Group, 2015. – P. 849–857.
100. Marchiori, D.M. Skull Patterns, *Clinical Imaging* / D.M. Marchiori – 3 ed. – Mosby, 2014. – P. 988–1009.
101. Martínez-Pinilla, E. Regional and Gender Study of Neuronal Density in Brain during Aging and in Alzheimer's Disease / E. Martínez-Pinilla, C. Ordóñez, E. Del Valle [et al.] // *Front Aging Neurosci.* – 2016. – №8. – P. 213.
102. Mattson, M.P. Hallmarks of Brain Aging: Adaptive and Pathological Modification by Metabolic States / M.P. Mattson, T.V. Arumugam // *Cell Metab.* – 2018. – №6. – P. 1176–1199.
103. Meyer, J.N. Mitochondrial fusion, fission, and mitochondrial toxicity / J.N. Meyer, T.C. Leuthner, A.L. Luz // *Toxicology.* – 2017. – №391. – P. 42–53.
104. Miwa, S. Mitochondrial dysfunction in cell senescence and aging / S. Miwa, S. Kashyap, E. Chini [et al.] // *J Clin Invest.* – 2022. – №13. – P. 158447.
105. Moody, D.M. *Radiology* / D.M. Moody, W.R. Brown, V.R. Challa [et al.] // *J Clin Invest.* – 1995. – №2. – P. 469–476.

106. Moreno-Blas, D. Cortical neurons develop a senescence-like phenotype promoted by dysfunctional autophagy / D. Moreno-Blas, E. Gorostieta-Salas, A. Pommer-Alba [et al.] // *Aging*. – 2019. – №16. – P. 6175–6198.
107. Nakatogawa, H. Mechanisms governing autophagosome biogenesis / H. Nakatogawa // *Nat Rev Mol Cell Biol*. – 2020. – №8. – P. 439–458.
108. Narendra, D. Mitochondrial quality control mediated by PINK1 and Parkin: links to parkinsonism / D. Narendra, J.E. Walker, R. Youle // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. – 2012. – №11. – P. 11338.
109. Nash, Y. DJ-1 deficiency impairs autophagy and reduces alpha-synuclein phagocytosis by microglia / Y. Nash, E. Schmukler, D. Trudler [et al.] // *J Neurochem*. – 2017. – №5. – P. 584–594.
110. Natarajan, V. Mitochondrial Dysfunction in Age-Related Metabolic Disorders / V. Natarajan, R. Chawla, T. Mah [et al.] // *Proteomics*. – 2020. – №5–6. – P. 800404.
111. Nguyen, J.A. Better Together: Current Insights Into Phagosome-Lysosome Fusion / J.A. Nguyen, R.M. Yates // *Front Immunol*. – 2021. – №12. – P. 636078.
112. Noda, S. Loss of Parkin contributes to mitochondrial turnover and dopaminergic neuronal loss in aged mice / S. Noda, S. Sato, T. Fukuda [et al.] // *Neurobiol Dis*. – 2020. – №136. – P. 104717.
113. Overhoff, M. Mechanisms of neuronal survival safeguarded by endocytosis and autophagy / M. Overhoff, E. De Bruyckere, N.L. Kononenko // *J Neurochem*. – 2021. – №2. – P. 263–296.
114. Pakkenberg, B. Neocortical neuron number in humans: effect of sex and age / B. Pakkenberg, H.J. Gundersen // *The Journal of Comparative Neurology*. – 1997. – №2. – P. 312–320.
115. Pannese, E. Morphological changes in nerve cells during normal aging / E. Pannese // *Brain Structure and Function*. – 2011. – №2. – P. 85–89.
116. Peters, A. The absence of significant neuronal loss from cerebral cortex with age / A. Peters // *Neurobiol Aging*. – 1993. – №6. – P. 657–658.

117. Pisa, D. Corpora Amylacea of Brain Tissue from Neurodegenerative Diseases Are Stained with Specific Antifungal Antibodies / D. Pisa, R. Alonso, A. Rábano [et al.] // *Front Neurosci.* – 2016. – №10. – P. 86.
118. Pomatto, L.C.D. Adaptive homeostasis and the free radical theory of ageing / L.C.D. Pomatto, K.J.A. Davies // *Free Radic Biol Med.* – 2018. – №124. – P. 420–430.
119. Rambold, A.S. Mechanisms of mitochondria and autophagy crosstalk / A.S. Rambold, J. Lippincott-Schwartz // *Cell Cycle.* – 2011. – №23. – P. 4032–8.
120. Rana, A. Promoting Drp1-mediated mitochondrial fission in midlife prolongs healthy lifespan of *Drosophila melanogaster* / A. Rana, M.P. Oliveira, A.V. Khamoui [et al.] // *Nat Commun.* – 2017. – №1. – P. 448.
121. Rechel, B. How can health systems respond to population ageing? Technical report / B. Rechel, Y. Doyle, E. Grundy, M. McKee – 3 ed. – Copenhagen: World Health Organization Regional Office for Europe, 2009
122. Rossi, A. Calcium, mitochondria and cell metabolism: A functional triangle in bioenergetics / A. Rossi, P. Pizzo, R. Filadi // *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* – 2019. – №7. – P. 1068–1078.
123. Salway, K.D. Higher levels of heat shock proteins in longer-lived mammals and birds / K.D. Salway, E.J. Gallagher, M.M. Page [et al.] // *Mech Ageing Dev.* – 2011. – №6–7. – P. 287–97.
124. Samimi, N. Tau Abnormalities and Autophagic Defects in Neurodegenerative Disorders; A Feed-forward Cycle / N. Samimi, A. Asada, K. Ando // *Galen Med J.* – 2020. – №9. – P. 1681.
125. Sandhu, S.K. Mitochondrial electron transport chain complexes in aging rat brain and lymphocytes / S.K. Sandhu, G. Kaur // *Biogerontology.* – 2003. – №1. – P. 19–29.
126. Schiavi, A. The interplay between mitochondria and autophagy and its role in the aging process / A. Schiavi, N. Ventura // *Exp Gerontol.* – 2014. – №56. – P. 147–153.
127. Sepe, S. Expression of Ambra1 in mouse brain during physiological and Alzheimer type aging / S. Sepe, R. Nardacci, F. Fanelli [et al.] // *Neurobiol Aging.* – 2014. – №1. – P. 96–108.



128. Sharma, A. Causal roles of mitochondrial dynamics in longevity and healthy aging / A. Sharma, H.J. Smith, P. Yao [et al.] // *EMBO Rep.* – 2019. – №12. – P. 48395.
129. Sies, H. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents / H. Sies, D.P. Jones // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2020. – №7. – P. 363–383.
130. Sikora, E. Cellular Senescence in Brain Aging / E. Sikora, A.Bielak–Zmijewska, M. Dudkowska [et al.] // *Front Aging Neurosci.* – 2021. – №13. – P. 646924.
131. Singhrao, S.K. Corpora amylacea could be an indicator of neurodegeneration / S.K. Singhrao, J.W. Neal, G.R. Newman // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* – 1993. – №3. – P. 269–276.
132. Sowell, E.R. Mapping changes in the human cortex throughout the span of life / E.R. Sowell, P.M. Thompson, A.W. Toga // *Neuroscientist.* – 2004. – №4. – P. 372–392.
133. Stahon, K.E. Age-Related Changes in Axonal and Mitochondrial Ultrastructure and Function in White Matter / K.E. Stahon, C. Bastian, S. Griffith [et al.] // *J Neurosci.* – 2016. – №39. – P. 9990–10001.
134. Stavoe, A.K.H. Autophagy in Neurons / A.K.H. Stavoe, E.L.F. Holzbaur // *Annu Rev Cell Dev Biol.* – 2019. – №35. – P. 477–500.
135. Sukhorukov, V. Brain Neurons during Physiological Aging: Morphological Features, Autophagic and Mitochondrial Contribution / V. Sukhorukov, A. Magnaeva, T. Baranich [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2022. – №18. – P. 10695.
136. Sukhorukov, V. Impaired Mitophagy in Neurons and Glial Cells during Aging and Age-Related Disorders / V. Sukhorukov, D. Voronkov, T. Baranich [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2021. – №19. – P. 10251.
137. Sun, N. Measuring In Vivo Mitophagy / N. Sun, J. Yun, J. Liu [et al.] // *Mol Cell.* – 2015. – №4. – P. 685–696.
138. Swerdlow, N.S. Mitophagy and the Brain / N.S. Swerdlow, H.M. Wilkins // *Int J Mol Sci.* – 2020. – №24. – P. 9661.
139. Tanaka, K. The PINK1-Parkin axis: An Overview / K. Tanaka // *Neurosci Res.* – 2020. – №159. – P. 159.

140. Teissier, T. Normal ageing of the brain: Histological and biological aspects / T. Teissier, E. Boulanger, V. Deramecourt // *Revue Neurologique*. – 2020. – №9. – P. 649–660.
141. Tran, M. Defective Autophagy and Mitophagy in Aging and Alzheimer's Disease / M. Tran, P.H. Reddy // *Front Neurosci*. – 2021. – №14. – P. 612–757.
142. Trigo, D. Mitochondria, energy, and metabolism in neuronal health and disease / D. Trigo, C. Avelar, M. Fernandes [et al.] // *FEBS Lett*. – 2022. – №9. – P. 1095–1110.
143. Turco, E. Insights into autophagosome biogenesis from in vitro reconstitutions / E. Turco, S. Martens // *J Struct Biol*. – 2016. – №1. – P. 29–36.
144. Tyrrell, D.J. Aging Impairs Mitochondrial Function and Mitophagy and Elevates Interleukin 6 Within the Cerebral Vasculature / D.J. Tyrrell, M.G. Blin, J. Song [et al.] // *J Am Heart Assoc*. – 2020. – №23. – P. 1–13.
145. van der Rijt, S. Integrating the Hallmarks of Aging Throughout the Tree of Life: A Focus on Mitochondrial Dysfunction / S. van der Rijt, M. Molenaars, R.L. McIntyre, G.E. Janssens [et al.] // *Front Cell Dev Biol*. – 2020. – №8. – P. 1–12.
146. Vays, V. Progressive reorganization of mitochondrial apparatus in aging skeletal muscle of naked mole rats (*Heterocephalus glaber*) as revealed by electron microscopy: potential role in continual maintenance of muscle activity / V. Vays, I. Vangely, C. Eldarov [et al.] // *Aging*. – 2021. – №22. – P. 24524–24541.
147. Vendredy, L. Small heat shock proteins in neurodegenerative diseases / L. Vendredy, E. Adriaenssens, V. Timmerman // *Cell Stress Chaperones*. – 2020. – №4. – P. 679–699.
148. Walker, S.A. Autophagosome Biogenesis Machinery / S.A. Walker, N.T. Ktistakis // *Mol Biol*. – 2020. – №8. – P. 2449–2461.
149. Wang, B. Essential control of mitochondrial morphology and function by chaperone-mediated autophagy through degradation of PARK7 / B. Wang, Z. Cai, K. Tao [et al.] // *Autophagy*. – 2016. – №8. – P. 1215–1228.
150. Wang, J.L. Astrocytes autophagy in aging and neurodegenerative disorders / J.L. Wang, C.J. Xu // *Biomed Pharmacother*. – 2020. – V.122. – P. 1–13.

151. Wang, X.L. Mitophagy, a Form of Selective Autophagy, Plays an Essential Role in Mitochondrial Dynamics of Parkinson's Disease / X.L. Wang, S.T. Feng, Y.T. Wang [et al.] // *Cell MolNeurobiol.* – 2022. – №5. – P. 1321–1339.
152. Wang, Y. Mechanisms and roles of mitophagy in neurodegenerative diseases / Y. Wang, N. Liu, B. Lu // *CNS NeurosciTher.* – 2019. – №7. – P. 859–875.
153. Webb, M. Intimate Relations – Mitochondria and Ageing / M. Webb, D.P. Sideris // *Int J Mol Sci.* – 2020. – №20. – P. 75–80.
154. Wei, Y. Origin of the Autophagosome Membrane in Mammals / Y. Wei, M. Liu, X. Li [et al.] // *Biomed Res Int.* – 2018. – №24. – P. 1–9.
155. Weller, R. White matter changes in dementia: role of impaired drainage of interstitial fluid / R. Weller, C. Hawkes, R. Kalaria [et al.] // *BrainPathol.* – 2015. – №1. – P. 63–78.
156. Wood–Kaczmar, A. PINK1 is necessary for long term survival and mitochondrial function in human dopaminergic neurons / A. Wood–Kaczmar, S. Gandhi, Z. Yao [et al.] // *BrainPathol.* – 2008. – №6. – P. 2455.
157. Wu, H. Crosstalk Between Macroautophagy and Chaperone–Mediated Autophagy: Implications for the Treatment of Neurological Diseases / H. Wu, S. Chen, A.B. Ammar [et al.] // *BrainPathoMolNeurobiol.* – 2015. – №3. – P. 1284–1296.
158. Yan, C. Mitochondrial DNA: Distribution, Mutations, and Elimination / C. Yan, X. Duanmu, L. Zeng [et al.] // *Cells.* – 2019. – №4. – P. 379.
159. Yang, Q. Chaperone-Mediated Autophagy / Q. Yang, R. Wang, L. Zhu // *AdvExp Med Biol.* – 2019. – V.1206. – P. 435–452.
160. Yang, Y. Autophagy in axonal and dendritic degeneration / Y. Yang, M. Coleman, L. Zhang [et al.] // *Trends Neurosci.* – 2013. – №7. – P. 418–428.
161. Ye, W. Age-related increases of macroautophagy and chaperone–mediated autophagy in rat nucleus pulposus / W. Ye, K. Xu, D. Huang [et al.] // *Connect Tissue Res.* – 2011. – №6. – P. 472–478.
162. Yim, W.W. Lysosome biology in autophagy / W.W. Yim, N. Mizushima // *Cell Discov.* – 2020. – №6. – P. 6.

163. Yu, R. Human Fis1 regulates mitochondrial dynamics through inhibition of the fusion machinery / R. Yu, S.B. Jin, U. Lendahl [et al.] // EMBO J. – 2019. – №8. – P. 1–21.
164. Zhou, J. Changes in macroautophagy, chaperone-mediated autophagy, and mitochondrial metabolism in murine skeletal and cardiac muscle during aging / J. Zhou, S.Y. Chong, A. Lim [et al.] // Aging. – 2017. – №2. – P. 583–599.