

**ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ БИОФИЗИКА ВА
БИОКИМЁ ИНСТИТУТИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР
БЕРУВЧИ DSc.03/30.12.2019.В.01.13 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ**

ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ

КОМИЛОВА НАФИСА РАЖАБОВНА

**ПАРКИНСОН КАСАЛЛИГИНИНГ ИРСИЙ ШАКЛЛАРИДА
МИТОФАГИЯ ВА АУТОФАГИЯ ЖАРАЁНЛАРИНИ
ФАОЛЛАШТИРИШ, ҲУЖАЙРАЛАРНИ ҲИМОЯ ҚИЛИШНИНГ
УСТУВОР ЙЎНАЛИШИ СИФАТИДА**

03.00.02 – Биофизика ва радиобиология

**БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ БЎЙИЧА ФАЛСАФА ДОКТОРИ (PhD)
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

Тошкент - 2022

Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси автореферати мундарижаси
Contents of dissertation abstracts of doctor of philosophy (PhD) Оглавление
автореферата диссертации доктора философии (PhD)

Комилова Нафиса Ражабовна

Паркинсон касаллигининг ирсий шаклларида митофагия ва аутофагия жараёнларини фаоллаштириш, хужайраларни химоя қилишнинг устувор йўналиши сифатида.....3

Komilova Nafisa Rajabovna

Activation of mitophagy and autophagy in familial forms of Parkinson's disease, as a potential strategy for cell protection.....21

Комилова Нафиса Ражабовна

Активация процессов митофагии и аутофагии при наследственных формах болезни Паркинсона, как потенциальная стратегия защиты клеток.....39

Эълон қилинган ишлар рўйхати

Список опубликованных работ

List of published works.....43

**ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ БИОФИЗИКА ВА
БИОКИМЁ ИНСТИТУТИ ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР
БЕРУВЧИ DSc.03/30.12.2019.В.01.13 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ**

ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ

КОМИЛОВА НАФИСА РАЖАБОВНА

**ПАРКИНСОН КАСАЛЛИГИНИНГ ИРСИЙ ШАКЛЛАРИДА
МИТОФАГИЯ ВА АУТОФАГИЯ ЖАРАЁНЛАРИНИ
ФАОЛЛАШТИРИШ, ҲУЖАЙРАЛАРНИ ҲИМОЯ ҚИЛИШНИНГ
УСТУВОР ЙЎНАЛИШИ СИФАТИДА**

03.00.02 – Биофизика ва радиобиология

**БИОЛОГИЯ ФАНЛАРИ БЎЙИЧА ФАЛСАФА ДОКТОРИ (PhD)
ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

Тошкент - 2022

Фалсафа доктори (PhD) диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида В2021.3.PhD/В624 рақам билан рўйхатга олинган.

Диссертация иши Ўзбекистон Миллий университетда бажарилган.

Диссертация автореферати уч тилда (Ўзбек, инглиз ва рус (резюме)) Илмий кенгашнинг веб-саҳифасида (www.ibb-nuu.uz) ва «ZiyoNet» Ахборот-таълим порталида (www.ziynet.uz) жойлаштирилган.

Илмий раҳбар:

Мирходжаев Улугбек Закирович
биология фанлари доктори, профессор

Расмий оппонентлар:

Мерзляк Пётр Григорьевич
биология фанлари доктори

Баев Артём Юрьевич
биология фанлари бўйича фалсафа доктори (PhD)

Етакчи ташкилот:

Тошкент педиатрия тиббиёт институти

Диссертация ҳимояси Ўзбекистон Миллий университети Биофизика ва биокимё институти ҳузуридаги илмий даражалар берувчи DSc.03/30.12.2019.В.01.13 рақамли Илмий кенгашнинг 2022 йил «13» апрел соат 14⁰⁰ даги мажлисида бўлиб ўтади (Манзил: 100174, Тошкент шаҳри, Олмазор тумани, Талабалар шаҳарчаси, Университет кўчаси, 174-уй. Тел.: (99871) 246-68-96).

Диссертация билан Ўзбекистон Миллий университети Биофизика ва биокимё институти Ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин (№ 33 рақами билан рўйхатга олинган). Манзил: 100174, Тошкент шаҳри, Олмазор тумани, Талабалар шаҳарчаси, Университет кўчаси, 174-уй. Тел.: (99871) 246-68-96, e-mail: ibb-nuu@mail.ru; tamurjon2281@mail.ru.

Диссертация автореферати 2022 йил «24» март кuni таркатилди.

(2022 йил «24» март даги № 1 рақамли реестр баённомаси)



Сабилов Равшан Заирович
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш раиси, б.ф.д., академик

Позилев Маъмуржон Комилжонович
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш илмий котиби, б.ф.д.

Ахмеджанов Искандар Гулимович
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш қошидаги илмий семинар раиси, б.ф.д., профессор

КИРИШ (Фалсафа доктори (PhD) диссертация аннотацияси)

Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати. Паркинсон касаллиги (ПК) – учраш частотаси бўйича иккинчи ўринда турувчи (Алцгеймер касаллигидан кейин) ва дунёнинг барча нукталарида учровчи нейродегенератив касаллик ҳисобланади. Касаллик ер юзи аҳолисининг 0,3% ни қамраб олиб, ёш ортиб бориши билан касаллик учраш ҳолатлари ортиб боради: 55 ёшдан кейин 1% ва 70 ёшдан ошган аҳоли ўртасида 4% гача етиши мумкин. Бироқ «Паркинсон касаллиги бўйича ишчи гуруҳи» халқаро ассоциациясининг маълумотларига кўра яқин йилларда Паркинсон касаллиги меҳнат қобилиятидаги инсонларга ҳам сезиларли таъсир кўрсата бошлайди. Ҳозирда бу касаллик 50 ёшгача беморларининг ҳар ўнтасидан биттаси ва 40 ёшгача бўлганлар ўртасида ҳар йигирматадан бирида учрайди. Шу муносабат билан ушбу касаллик патогенезининг молекуляр механизмларини тадқиқ қилиш ва даволашнинг самарали усулларини ишлаб чиқиш муҳим илмий ва амалий аҳамият касб этади.

Сўнгги йилларда дунёнинг етакчи илмий марказларида аутофагия жараёнини фаоллаштириш орқали кўплаб касалликлар, хусусан, Паркинсон каби нейродегенератив касалликларни даволаш мақсадида дори воситаларни янги авлодларини яратишга қаратилган тадқиқотлар кенг миқёсида олиб борилмоқда. Патология жараёнларининг кечиши аутофагия – ҳужайранинг шикастланган оксил ва органеллаларни тозалаш хусусиятининг издан чиқиши билан боғлиқдир. Шикастланган митохондрияларни зарарсиз йўл билан тозалаш усули ҳисобланган митофагия жараёнининг издан чиқиши, бунинг оқибатида эса аутофагия жараёнининг бузилиши аввало, бош миянинг қора моддасидаги, қолаверса марказий асаб тизимининг бошқа қисмларидаги дофамин синтезловчи нейронларнинг тобора ортиб боровчи ўлимига сабаб бўлади. Турли хил патологияларда аутофагия жараёнларини фаоллаштириш бўйича эришилган ютуқларга қарамай, замонавий тиббиёт уларнинг молекуляр механизмларини аниқлашни тақазо этмоқда.

Республикамызда нейродегенератив касалликларда ҳужайраларда юзага келадиган патологик ўзгаришларни тадқиқ қилиш бўйича фундаментал ва амалий изланишлар олиб борилмоқда. Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш бўйича Ҳаракатлар стратегиясида «фармацевтика саноатини янада ривожлантириш, аҳоли ва тиббиёт муассасаларининг арзон, сифатли дори воситалари ва тиббиёт буюмлари билан таъминланишини яхшилаш»¹ вазибалари белгилаб берилган. Бу борада аҳоли орасида тобора ортиб бораётган Паркинсон касаллигида ҳужайра апаптозининг молекуляр механизмларини асослашга қаратилган тадқиқотлар асосий ўрин тутуди.

Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2019 йил 6 майдаги ПҚ-4310-сон «Тиббиёт ва фармацевтика таълими ва илм-фани тизимини янада ривожлантириш чора-тадбирлари тўғрисида» ги Қарори ва 2020 йил 12

¹Ўзбекистон Республикаси Президентининг «Ўзбекистон Республикасини янада ривожлантириш Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида»ги ПФ-4947-сонли фармони

августдаги ПҚ-4805-сон «Кимё ва биология йўналишларида узлуксиз таълим сифатини ва илм-фан натижадорлигини ошириш чора-тадбирлари тўғрисида» ги Қарори ҳамда мазкур фаолиятга тегишли бошқа меъёрий-ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишга ушбу диссертация тадқиқоти муайян даражада хизмат қилади.

Тадқиқотнинг республика фан ва технологиялари ривожланишининг асосий устувор йўналишларига мослиги. Мазкур тадқиқот республика фан ва технологиялар ривожланишининг VI «Тиббиёт ва фармакология» устувор йўналишига мувофиқ бажарилган.

Муаммонинг ўрганилганлик даражаси. Ҳозирда дунёнинг йирик илмий тадқиқот марказларининг олимлари томонидан касаллик келиб чиқишининг механизмлари ва турли хил даволаш йўллари кенг тадқиқ қилинмоқда. Жумладан, ПҚ нинг асосий хусусиятларидан бири бу агрегацияланувчи оксиллар ва оксил табиатли киритмаларнинг хужайрада тўпланиши бўлиб, муҳим патогенетик аҳамияти аниқланган (Xilouri, Stefanis, 2010). Шунингдек, патоген α -синуклеин оксили тўпланиб Леви таначаларини ҳосил қилганлиги (Recasens, Dehay, 2014), A53T, A30P ва E46K мутацияларидан бири натижасида α -синуклеин патоген хусусиятга эга бўлиши тавсифланган (Singleton et al., 2003). Аномал шаклдаги α -синуклеиннинг АТФ синтаза ферменти билан таъсирлашуви РТР (Permeability Transition Pore) очилишига ва шу орқали нейронларнинг дегенерациясига сабаб бўлиши қайд қилинган (Abramov et al., 2018). Митофагия ва аутофагия жараёнлари хужайра ичи рН ўзгариши натижасида иницирланиши аниқланган (Berezhnov et al., 2016).

МДХ давлатлари миқёсида олиб борилган тадқиқотларга кўра ПҚ биринчи клиник симптомлари ушбу касалликнинг авж олиш тезлигини белгилаб беради (Левин О.С ва ҳаммуал., 2012). Жумладан, касалликда кузатиловчи титроқ, дастлабки ўн йил ичида аста секин авж олиши ҳақида хулоса қилинади (Иллариошкин С.Н ва ҳаммуал., 2012). Сўнгги йилларда, ПҚ беморларининг ҳаёт тарзига мотор (гипокинезия, тремор) ва мотор бўлмаган (психологик, сенсор, уйку бузилиши) симптомлар таъсир қилиши аниқланган нофармокологик даволаш усуллари кенгайиб бормоёда (Камакинова А.Б., 2015). Ушбу тадқиқотларда олинган натижалар ва ютуқларга қарамадан ирсийланувчи турдаги Паркинсон касаллигида хужайра даражасида аутофагия ва митофагиянинг ролини баҳолашга оид бир қатор саволлар камроқ ўрганилган.

Ўзбекистон Республикасида Паркинсон касаллиги юзасидан илмий тадқиқотларни Х.М.Халимова ва бошқалар олиб борган (2010; 2011; 2012). Беморларнинг 15-20% да паркинсонизм ирсият билан боғлиқлиги аниқланган (Маджидова Ё.Н., 2011). Тиббиётнинг неврология соҳасида (14.00.13–Неврология) ўзбек миллатига мансуб кишиларда ПҚ ривожланишида молекуляр-генетик полиморфизмнинг роли, хусусан PARK1, A53T ва PARK2 генидаги T240M мутациялар, LRRK2 генидаги G2019S мутацияларининг Паркинсон касаллиги ва васкуляр паркинсонизмнинг клиник белгилари

билан ўзаро боғлиқлиги тадқиқ этилган (М.М.Раимова 2017). Сўнгги йилларда ПК этиологияси, патогенези ва патофизиологияси масалаларини ишлаб чиқишга қаратилган биокимёвий ва молекуляр-генетик тадқиқотлар давом этмоқда. Бироқ мазкур ишлар паркинсонизмнинг турли хил шакллариининг диагностик критерийлари ва даволаш оптимизациясига қаратилган бўлиб, ҳужайра даражасида касаллик келиб чиқиши ва ривожланишининг молекуляр механизмларини ёритиб бермаган. Паркинсон касаллигини ҳужайра даражасида тадқиқ қилиш амалга оширилмаган. Юқорида таъкидлаб ўтилганларга боғлиқ ҳолатда, Паркинсон касаллигининг ирсий шаклларида ҳужайрани ўлимдан сақлаб қолувчи митофагия, аутофагия каби жараёнларни фаоллаштиришнинг янги йўллариини излаб топиш ва тадқиқ қилиш сўзсиз равишда қизиқиш уйғотади ва долзарб масала ҳисобланади.

Тадқиқотнинг диссертация бажарилган олий таълим муассасасининг илмий–тадқиқот ишлари режалари билан боғлиқлиги. Диссертация тадқиқоти Ўзбекистон Миллий университети биофизика кафедрасининг илмий тадқиқот ишлари режасининг «Мембранафаол бирикмалар таъсирининг ион механизмларини ўрганиш» илмий йўналиши ва Нейрология институтида (Лондон, Буюк Британия) №821522 «A quantitative approach towards the characterization of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease» (2019-2022) мавзусидаги илмий лойиҳа доирасида бажарилган

Тадқиқотнинг мақсади Паркинсон касаллигининг ирсий шаклларида эга ҳужайралардаги митофагия ва аутофагия жараёнларига лактат ва пируват каби моддаларнинг таъсирини аниқлашдан иборат.

Тадқиқотнинг вазифалари:

Паркинсон касаллигига олиб келувчи турли хил мутацияга эга ҳужайраларда цитоплазматик базал рН кўрсаткичини, ҳамда лактат ва пируват таъсирида цитоплазматик рН ўзгаришларини тадқиқ қилиш;

лактат ва пируватнинг ҳужайралардаги митофагия жараёнига таъсирини аниқлаш;

лактат ва пируват таъсирида индуцирланган аутофагия жараёнини тадқиқ қилиш;

Паркинсон касаллигига олиб келувчи турли хил мутацияга эга ҳужайралар ўлимига лактат ва пируватнинг таъсирини аниқлаш.

фибробласт ҳужайралари мембранаси орқали амалга ошадиган Ca^{2+} транспортига краун эфирларнинг таъсирини баҳолаш;

Тадқиқотнинг объекти Паркинсон касаллигига чалинган беморлардан олинган ва ҳар бири алоҳида A53T (SNCA), PINK1, PINK1/PARK2, SNCA трипликацияси ва PGK (фосфоглицераткиназа) генлари мутациясига эга фибробласт ҳужайралари ҳисобланади (1-жадвал).

Тадқиқотнинг предмети бўлиб лактат ва пируватнинг фибробласт ҳужайраларининг цитоплазматик рН кўрсаткичларига, митофагия ва аутофагия жараёнларига, ҳужайралар ўлимига таъсирини тадқиқ қилиш ҳисобланади.

Тадқиқотнинг усуллари. Тадқиқотда биофизикавий, биокимёвий, молекуляр – биологик (флуоресцент, конфокал микроскопия, вестерн блот, хужайралар бирламчи культураларини олиш), статистик таҳлил усулларидадан фойдаланилган. Шунингдек олинган маълумотларни қайта ишлаш ва визуализация қилиш учун Volocity, ZEN каби замонавий дастурлардан фойдаланилди.

Тадқиқотнинг илмий янгилиги қуйидагилардан иборат:

лактат ёки пируват таъсирида Паркинсон касаллигининг ирсий турлари бўлган хужайра линияларида дозага боғлиқ равишда хужайра ичи рН кўрсаткичи камайиши аниқланган;

лактат ёки пируват хужайраларнинг ҳар иккала яъни назорат ва тажриба линияларида митофагия ва аутофагияни фаоллаштириши аниқланган;

лактат ёки пируват A53T (SNCA), PINK1, PINK1/PARK2, SNCA трипликацияси мутацияларини сақловчи фибробласт хужайралари ўлимини камайтириши исботланган;

4',4''(5'')-дибутирил–добензо-18-краун-6 ва 4',4''(5'')-дивалерил–добензо-18-краун-6 каби краун эфирлар фибробласт хужайраида Ca^{2+} концентрациясини ошириши аниқланган;

Тадқиқотнинг амалий натижалари қуйидагилардан иборат:

Тажриба учун олинган хужайра линияларининг деярли барчасида лактат ёки пируват дозага боғлиқ равишда хужайра ичи рН ни сезиларли даражада камайтира олиши, фибробластларини лактат ёки пируватнинг миллимоляр концентрациялари билан инкубацияси уларда митофагия ва аутофагия жараёнларини фаоллаштириши тасдиқланган; лактат ёки пируват билан фибробластларни 24 соат давомида инкубацияси фибробластларнинг ҳар иккала яъни назорат ва тажриба линияларида хужайраларнинг ўлимини камайтириши исботланган.

Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги натижалар замонавий хужайра технологиялари лаборатория услублари ёрдамида олинганлиги, натижаларнинг статистик усуллар ёрдамида таҳлил қилинганлиги билан асосланади. Бу мутахассисларнинг эксперт хулосалари, шунингдек, миллий ва халқаро илмий конференциялардаги муҳокамалар, материалларнинг рецензиядан ўтадиган илмий журналларда нашр этилиши билан изоҳланади, бундан ташқари 1 та патент олиш учун Ўзбекистон Республикасининг интеллектуал мулк агентлигига ариза топширилган.

Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти. Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти шундан иборатки, олинган натижалар хужайра даражасида турли хилдаги ген мутациялари натижасида келиб чиқувчи ва наслдан – наслга берилувчи Паркинсон касаллигидаги митофагия ва аутофагиянинг ўрни ҳақида мавжуд билимлар таркибини тўлдиради.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти шундан иборатки, олинган натижалар Паркинсон касаллигининг ирсий шакллари билан оғриган беморлар учун лактат ва пируват асосида янги терапевтик воситаларни ишлаб чиқиш, беморларга жисмоний фаолликнинг таъсири юзасидан хулоса

килиш ва индивидуал машқлар асосида даволовчи терапияни амалга ошириш учун асос бўлади.

Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши. Паркинсон касаллигининг ирсийланувчи турларида митофагия ва аутофагия жараёнларини фаоллаштириш бўйича олинган илмий натижалар асосида:

лактат ёки пируватнинг хужайра ичи рН ўзгариши орқали Паркинсон хужайраларида митофагия ва аутофагия жараёнларини фаоллаштириши ва шу орқали хужайралар ўлимини камайтира олишини кўрсатувчи илмий натижалар №821522 сонли «A quantitative approach towards the characterisation of mitochondrial dysfunction in Parkinson's Disease» номли лойиҳада нейропротекция жараёнида митофагия ва аутофагиянинг ролини очиб берган (Лондон Нейрология институтининг 2021 йил 23 сентябраги маълумотномаси). Илмий натижаларни қўллаш Паркинсон касаллигини даволашда аутофагия жараёнининг аҳамиятини аниқлаш имконини берган;

ирсийланувчи Паркинсон касаллиги билан оғриган беморлардан олинган хужайра линияларида митофагия ва аутофагияни фаоллаштириш бўйича олинган аҳамиятли натижалардан №22-24-01043 сонли «Регуляция динамики митохондриальной сети при болезни Паркинсона» лойиҳасида нейродегенератив касалликларда митофагиянинг роли бўйича олинган натижаларни тўғри талқин қилишда фойдаланилган (Россия Фанлар Академияси Хужайра биофизикаси институтининг 2022 йил 19 январдаги маълумотномаси). Натижада ирсийланувчи Паркинсон касаллигида лактат ва пируват каби метаболитларнинг нейропротектор хусусиятини асослаш имкониятини берган;

лактат ва пируватнинг Паркинсон касаллигининг ирсий турларида митофагия ва аутофагияни фаоллаштира олишини баҳолаш борасида олинган натижалардан PZ-20170928599 рақамли «Ўзбекистон шароитларида сўвўтларини ўстириш технологияларини яратиш ва унинг асосида биологик фаол моддалар олиш» амалий лойиҳада *Dunaliella salina* AR-1 микросувўтидан олинган антиоксидантларнинг биологик таъсирини аниқлашда фойдаланилган (Ўзбекистон Республикаси Фанлар Академиясининг 2022 йил 25 январдаги №4/1255-174-сон маълумотномаси). Натижада *Dunaliella salina* AR-1 микросувўтидан олинган биологик фаол моддаларнинг антиоксидатив таъсирини асослаш имконини берган.

Тадқиқот натижаларининг апробацияси. Тадқиқот натижалари 3 та халқаро илмий–амалий анжуманларда муҳокамадан ўтказилди.

Тадқиқот натижаларининг эълон қилиниши. Диссертация мавзуси бўйича жами 7 та илмий ишлар чоп этилган, шулардан Scopus базасидаги юқори импакт факторли журналларда 1 та мақола, Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссиясининг фалсафа доктори (PhD) диссертацияларининг асосий илмий натижаларини чоп этиш тавсия этилган илмий нашрларда 4 та мақола, жумладан 3 таси республика ва 1 таси хорижий журналларда нашр этилган.

Диссертациянинг ҳажми ва тузилиши. Диссертация таркиби кириш, тўртта боб, хулосалар, фойдаланилган адабиётлар рўйхатидан иборат. Диссертациянинг ҳажми 116 бетни ташкил этган.

ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

Кириш қисмида диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати асосланган, тадқиқотнинг мақсади ва вазифалари, объект ва предметлари тавсифланган, республика фан ва технологиялари ривожланишининг устувор йўналишларига мослиги кўрсатилган, тадқиқотнинг илмий янгилиги ва амалий натижалари баён қилинган, олинган натижаларнинг илмий ва амалий аҳамияти очиб берилган, тадқиқот натижаларини амалиётга жорий қилиш, нашр этилган ишлар ва диссертация тузилиши бўйича маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг **«Наслдан наслга ўтувчи Паркинсон касаллиги турлари»** деб номланган биринчи бобида алоҳида ген мутацияси натижасида келиб чиқувчи ва айрим жараёнлари билан фарқ қилувчи Паркинсон касаллигининг механизмлари ҳақидаги умумий ва шунингдек, уларни умумлаштирувчи сигнал тизими мисолида бу митофагия ва аутофагия жараёнларининг турли ҳужайралардаги иштироки ва ушбу мутациялар натижасида келиб чиқадиган ҳужайра патологиялари борасида батафсил адабиётлар шарҳи келтирилган.

Диссертациянинг **«Митофагия ва аутофагия жараёнларининг умумий тавсифи ва Паркинсон касаллиги ривожланишидаги ўрни»** деб номланган иккинчи бобида митохондрияларда бўладиган ўзгаришларга бағишланган адабиётлар шарҳи келтирилган – жумладан, Паркинсонни келтириб чиқарувчи ҳар бир мутацияда кечадиган ўзгаришларнинг молекуляр механизмлари энг сўнги йиллардаги адабиётлардан фойдаланган ҳолда таҳлил қилинган. Митофагия ва аутофагия жараёнлари атрофлича ёритилган ва ушбу жараёнларнинг ҳужайра ҳаётини сақлаб қолиш ролини бажариш қобилиятига алоҳида эътибор қаратилган. Шунингдек бу бобда митохондрия мембрана потенциали (ММР) ва ҳужайра ички рН доимийлигини сақлаш механизмлари ҳам ёритилган. Шунингдек митофагия ва аутофагия каби иккала жараёнлар ўртасидаги боғлиқликка урғу берилган ҳолатда бугунги кунда митофагия ва аутофагия ҳақидаги замонавий тасаввурлар баён қилинган. 2000 йиллардан бошлаб аутофагия ва нейродегенератив касалликлар ўртасидаги боғлиқлик юзасидан қизгин тадқиқотлар амалга ошириб келинмоқда. Гарчи аутофагиянинг нейронлар учун протектив хусусиятлари ўз тасдиғини топаётган бўлсада, бу жараённи инициирловчи триггерлар масаласи бугунги кунгача долзарб бўлиб қолмоқда. Шу сабабли, биз тадқиқ этаётган метаболитлар истиқболда Паркинсон беморларини клиник даволашни персонализациясига ўз хиссасини қўшади.

Диссертациянинг **«Наслдан наслга ўтувчи Паркинсон касаллигида митофагия ва аутофагияни қайд этиш усуллари»** деб номланган учинчи

бобида тадқиқот амалга оширилган объектлар, услублар, ишда фойдаланилган қурилмалар, асбоб–ускуналар, биологик, физик–кимёвий ва статистик таҳлил услублари тавсифланган. Ишларинг кўпчилиги флуоресцент ва конфокал спектроскопиясига, шунингдек, вестерн блот усуллари ёрдамида амалга оширилган.

Диссертациянинг тўртинчи «**Лактат ва пируватнинг митофагия ва аутофагия жараёнларини фаоллаштириш орқали амалга ошувчи нейропротектив таъсири**» деб номланган бобида лактат ва пируватнинг турли хил мутацияга эга Паркинсон хужайра линияларига таъсири митофагия ва аутофагия жараёнларини фаоллаштириши билан боғлиқлигини кўрсатиб берувчи олинган натижалар келтирилган.

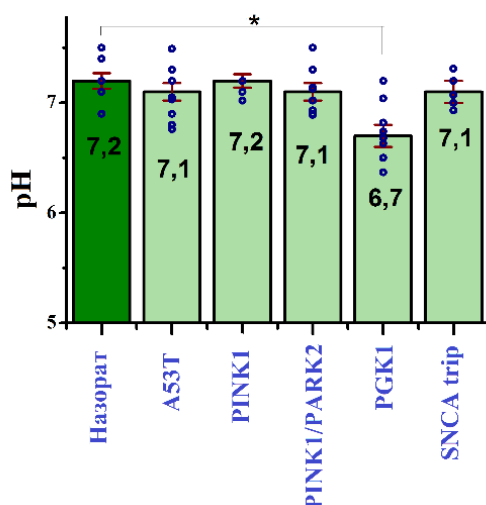
2016 йилда А.В.Бережнов ва А.Ю.Абрамовлар томонидан аниқланган хужайраиçi рН ўзгариши митофагия ва аутофагия жараёнларини фаоллаштирувчи триггер бўла олиши ҳақидаги тажрибаларнинг узвий давоми сифатида биз 5 хилдаги ген мутацияси натижасида келиб чиққан Паркинсон касаллиги билан оғриган беморлардан ажратиб олинган фибробластларда рН_{цит} ни ўзгартириш орқали митофагия ва аутофагияни фаоллаштирувчи метаболит сифатида лактат ва пируватнинг натрийли тузларини танлаб олдик ва улар таъсирида шикастланган митохондрияларнинг лизосомаларга колокализациясини ўрганиш бўйича тажрибаларни амалга оширдик.

1-жадвал

Тадқиқ этилган хужайра линиялари донорлари ҳақида маълумот

Хужайра линияси	Мутация тури	Ташхис	Ёш	Жинси
A53T	A53T гетерозигота SNCA гени	Паркинсон касаллиги оғир тури	51	Аёл
PINK1	гомозигота р.Try90Leufsx12 PINK1 гени	Паркинсон касаллиги	52	Аёл
PINK1/Park2	Park2/Pink1 қўшалок гетерозигота PARK2 R275W/WT + PINK1 р.Try90Leu fs*12/WT	Паркинсон касаллиги	75	Эркак
SNCA trip	SNCA гени трипликацияси	Паркинсон касаллиги эрта бошланган тури	55	Аёл
PGK-1	Фосфоглицераткиназа 1 тип мутацияси (с.1132A>C,р.Thy378Pro)			
Назорат 1		Соғлом донор	56	Аёл
Назорат 2		Соғлом донор	49	Аёл
Назорат 3		Соғлом донор	53	Эркак

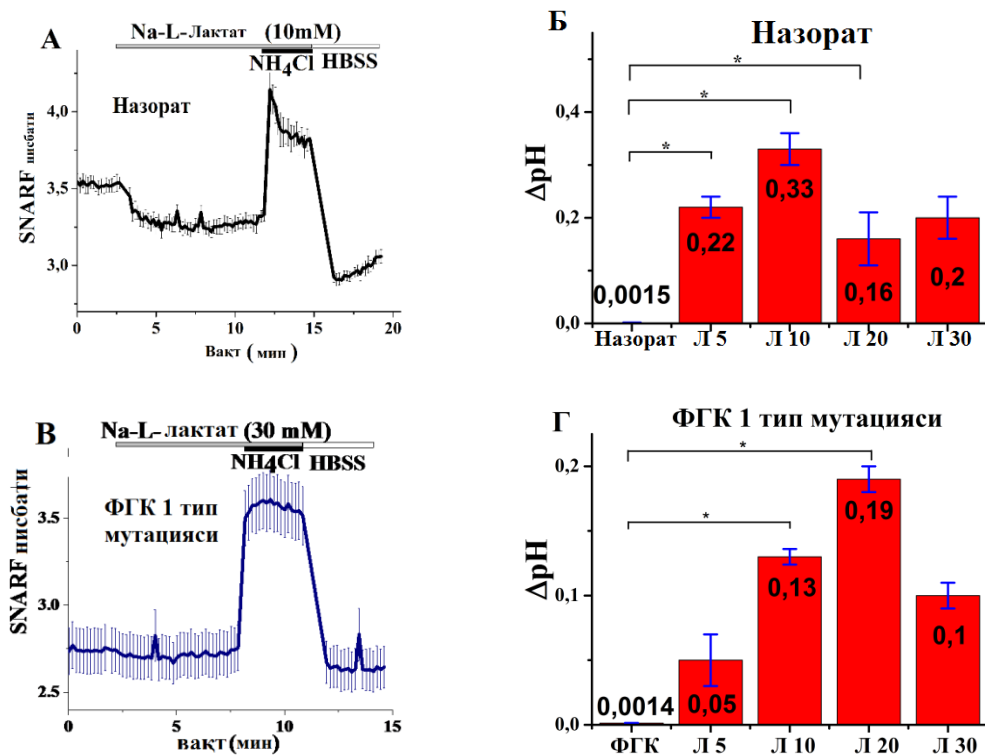
Паркинсон касаллигининг турли хил мутация типларига эга фибробластларнинг базал рН кўрсаткичи. Назорат ва тажриба гуруҳидаги фибробластларнинг цитозолидаги базал рН кўрсаткичини ўлчаш учун SNARF-1 флуоресцент индикаторидан фойдаланилди. Шуни аниқладикки, A53T (SNCA), PINK1, PINK1/PARK2 мутациялари ва SNCA трипликацияси мутациясида базал рН 7.1–7.2 га тенг бўлса, фосфоглицерат киназа 1 типдаги мутациясида хужайраичи базал рН кўрсаткичи назоратга нисбатан сезиларли даражада паст эканлиги аниқланди (n=40 хужайра; рН=6.7±0.1; p<0.05; 1-расм)



1-расм. Турли хил мутациялар келтириб чиқарувчи Паркинсон хужайраларида хужайраичи базал рН кўрсаткичи. N=3. n=40, *P< 0.05

Лактат концентрацияга боглиқ равишда Паркинсон хужайра линияларида цитоплазматик рН кўрсаткичини камайтиради.

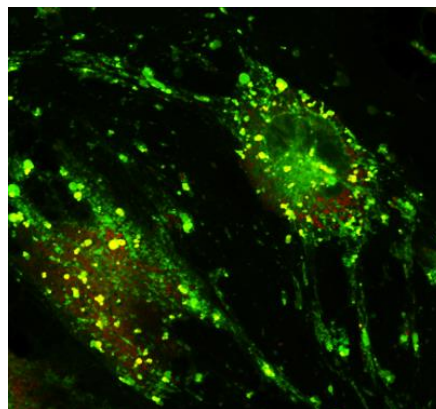
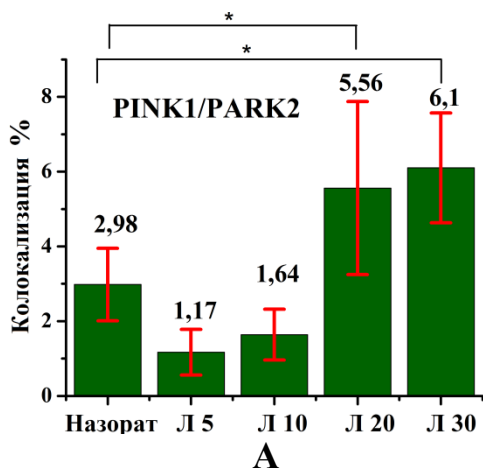
Инсон танасида энг кўп миқдорда учрайдиган метаболитларидан бири бўлган лактат концентрацияси жисмоний машқлар давомида кескин ортади ва 30 мМ гача етиши мумкин. рН нинг минимал кўрсаткичи Na⁺-L – лактат томизилганидан сўнг 2-3 дақиқадан кейин кузатилди ва аста секин қайта тикланди. Шундан сўнг SNARF-1 сигналини калибровкаси учун 10 мМ NH₄Cl қўшилади ва дарҳол ювиб ташланади. Худди шу усуллар билан лактатнинг 5,10,20,30 мМ концентрациялари таъсирида турли мутацияга эга хужайра линияларида рН ўзгаришлари қайд этилди. Назорат гуруҳида максимал таъсир 10 мМ да кузатилган бўлса (N=3; n=30 хужайра; 2-расм. А,Б), PINK1, PINK1/PARK2 мутацияларига Na⁺-L–лактат назоратга нисбатан кучлироқ таъсир қилгани кузатилди (N=3; n=30 хуж; p<0,05;). SNCA генининг A53T ва трипликация мутацияларига эга хужайраларда ҳам Na⁺-L – лактатга жавобан рН камайиши кузатилди. Ўрганилган хужайра линиялари ичида фақатгина PGK мутацияси хужайраларида хужайраичи базал рН кўрсаткичи жуда кам ўзгаргани қайд этилди (N=3; n=30 хуж; *p<0,05; 2-расм В, Г.)



2-расм А. 10 мМ Na Лактат таъсирида назорат хужайраларида цитоплазматик рН ўзгаришлари. **Б.** Na⁺-L-лактатнинг 5,10,20,30 мМ концентрациялари таъсирида назорат хужайра линияларида ΔрН ўзгаришлари **В.** 30 мМ Na⁺-L-лактат таъсирида фосфоглицерат киназа (ФГК) мутациясига эга хужайраларда цитоплазматик рН ўзгаришлари **Г.** Na⁺-L-лактатнинг 5,10,20,30 мМ концентрациялари таъсирида ФГК 1 тип мутацияли хужайра линияларида ΔрН ўзгаришлари. N=3; n=30 хуж; *p<0,05

Пируват таъсирида Паркинсон хужайра линияларидаги цитоплазматик рН камайиши. Пируватни (5-30 мМ) назорат ва ПК мутацияларига эга хужайраларга таъсир эттириш концентрациявий боғлиқлик асосида рН камайишига сабаб бўлди. Турли хил мутацияларга эга хужайра линияларининг ҳар бири пируватнинг ҳар хил концентрацияларига нисбатан хилма хил даражадаги рН камайишларини намоён этди. Хусусан, пируват таъсирида рН нинг энг қуйи даражаси PINK1 мутацияли фибробластларда 30 мМ да, PINK1/PARK2 линиясида 10 ва 30 мМ да кузатилган бўлса, A53T (SNCA) ва SNCA трипликацияси линияларида қўлланилган барча концентрацияларга нисбатан сезиларли камайиш кузатилди. Хусусан, рН_{цит} 20 ва 30 мМ концентрацияларда энг паст кўрсаткичга эга бўлди. Пируват таъсирида фосфоглицерат киназа 1 тип мутациясига эга хужайраларда хужайраичи базал рН кўрсаткичи ўзгариши лактат таъсиридан фарқли равишда сезиларли даражада камайиши аниқланди.

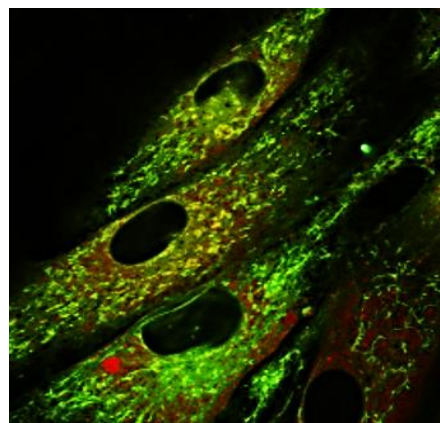
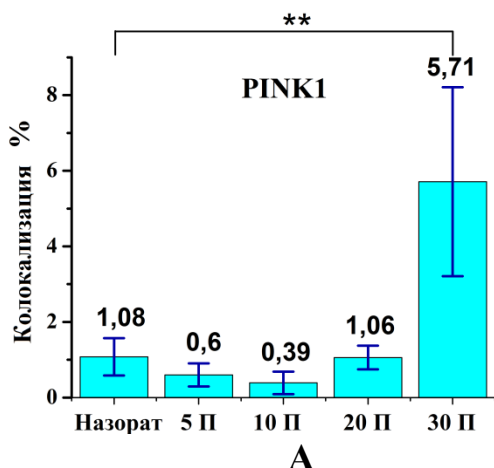
Лактат таъсирида фибробласт хужайраларида митофагия жараёнининг фаоллашуви. 2 соат давомида лактатнинг 4 хилдаги (5,10,20,30 мМ) концентрацияси билан инкубацияланган фибробластларда митохондрияларнинг лизосомаларга колокализация фоизини ҳисоблаш натижасида, лактат ҳар иккала назорат ва таъриба гуруҳидаги фибробластларда митофагия жараёнини фаоллаштириши аниқланди (3-расм А, Б).



Б

3-расм. PINK1/PARK2 мутацияли фибробластларда лактат таъсирида фаоллашган митофагия. А. PINK1/PARK2 мутацияли фибробластларда назорат ва лактатнинг ҳар хил концентрацияси таъсиридаги колокализация фоизи. Б. PINK1/PARK2 мутацияли фибробластларда 20 mM лактат таъсиридаги митофагия жараёни. N=3, * $p < 0,05$.

Пируват таъсирида фибробласт ҳужайраларида митофагия жараёнининг фаоллашуви. 5-10 mM пируват одатда ҳужайраларда оксидланишли фосфорланишни фаоллаштириш учун I комплекса боғлиқ бўлган нафас олиш жараёнларида субстрат сифатида қўлланилади. Назорат гуруҳидаги фибробластларда 5-30 mM пируват митохондрияларнинг лизосомаларга колокализациясини 10 mM дан бошлаб сезиларли даражада орттирди (10 mM да 0.81% дан 1.85% гача). Шунингдек бу ҳолат A53T (SNCA), PINK1, PINK1/PARK2 мутацияли ҳужайраларда ҳам кузатилди бироқ нисбатан юқори яъни 30 mM концентрацияда (4-расм).



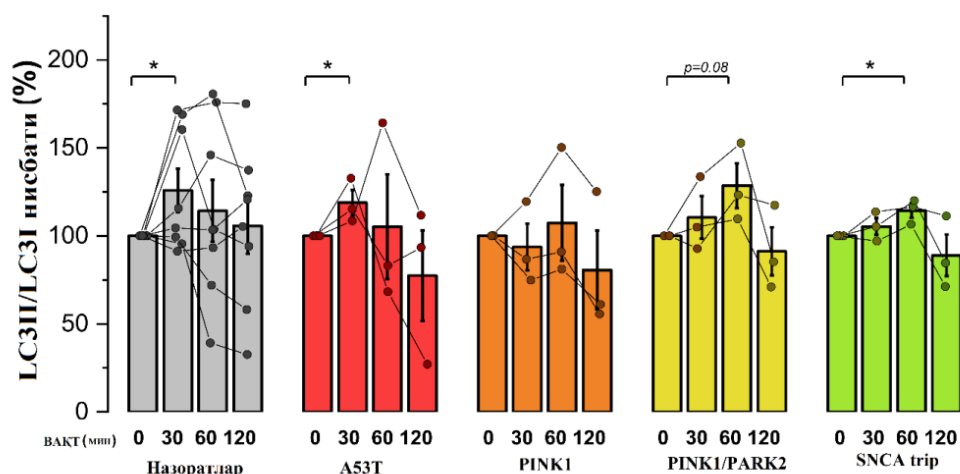
Б

4-расм. А. PINK1 мутацияли фибробластларда пируват таъсиридаги митофагия (%) N=3, * $p < 0,05$ Б. PINK1 фибробластларда 30 mM пируват таъсиридаги митофагия.

SNCA трипликацияси мутациясида эса пируват 5 mM дан бошлаб митофагияни фаоллаштира олиши аниқланди.

Соғлом ва Паркинсон касаллигининг ирсий шаклларида эга фибробласт ҳужайраларида лактат таъсирида аутофагия жараёнининг индуцирланиши. Аутофагия жараёнини баҳолаш учун аутофагосома маркери

бўлган LC3 маркерининг лизосомалар томонидан конверсияси ўрганилди. 30 мМ лактат билан инкубациялаш LC3II/I нисбатининг ортишига олиб келди, бу эса ўз навбатида аутофагосомалар сонининг ортганлигини англатади. Аутофагосомалар сонининг максимал миқдори 30-60 дақиқадан сўнг кузатилди ва сўнгра лизосомалар деградацияси туфайли аста секин камайиб боради (5-расм).

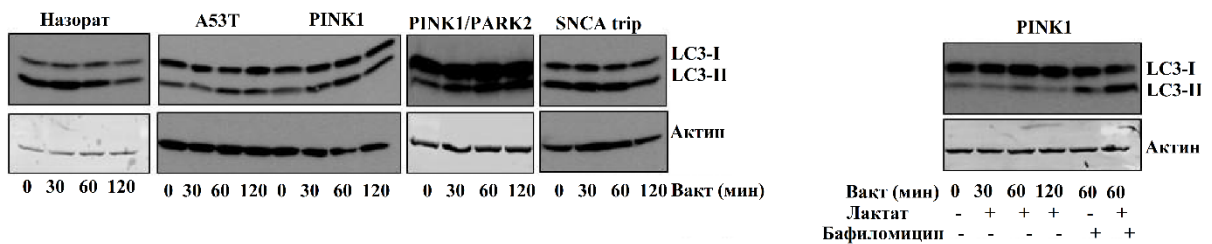
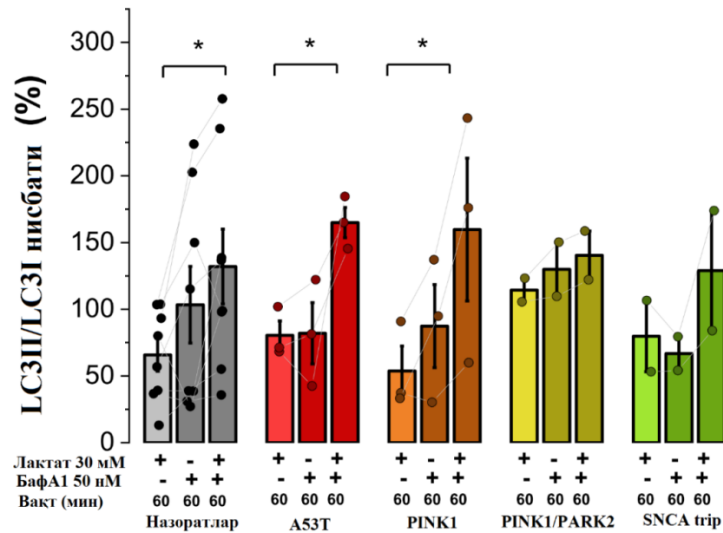


5-расм. 30 мМ Лактат таъсирида LC3II/I нисбатининг ўзгаришлари. N=3; * $p < 0,005$;

LC3II/I нисбатининг ортиши аутофагиянинг блоккланиши эмас, аксинча фаоллашиши туфайли амалга ошишини исботлаш мақсадида ҳужайралар V-ATФ аза ингибитори бўлган ва лизосомаларни ингибирловчи *бафиломицин A1* билан (50 нМ, 60 мин) ишлов берилди. Шундан сўнг *бафиломицин A1* мавжуд шароитда ҳам LC3II/I нисбатининг ортиши кузатилди (6-расм). Бу эса аутофагия лактат томонидан фаоллашганини англатади.

Биринчи ҳолда гарчи PINK1 мутациясига эга фибробластларда ўрганилган вақт бирликларида LC3 миқдори ортиши сезиларли бўлмаган бўлсада, 30 мМ лактат таъсирида аутофагия жараёнининг фаоллашганини англатувчи LC3II/I нисбатининг ортиши *бафиломицин A1* билан бирга қўлланилганда кузатилди. Бу эса биринчи ҳолда бу жараён қисқа вақт ичида юзага келиб, ўлчашдан бир оз эртaroқ амалга ошган бўлиши мумкин деган тахминга сабаб бўлди (6-расм).

Шундай қилиб, ташқаридан қўшилган 30 мМ лактат ҳатто қисқа вақт ичида қўлланилганда ҳам назорат гуруҳидаги ва ирсийланувчи ПК келтириб чиқарувчи генлар мутациясига эга фибробластларда аутофагияни фаоллаштиради.

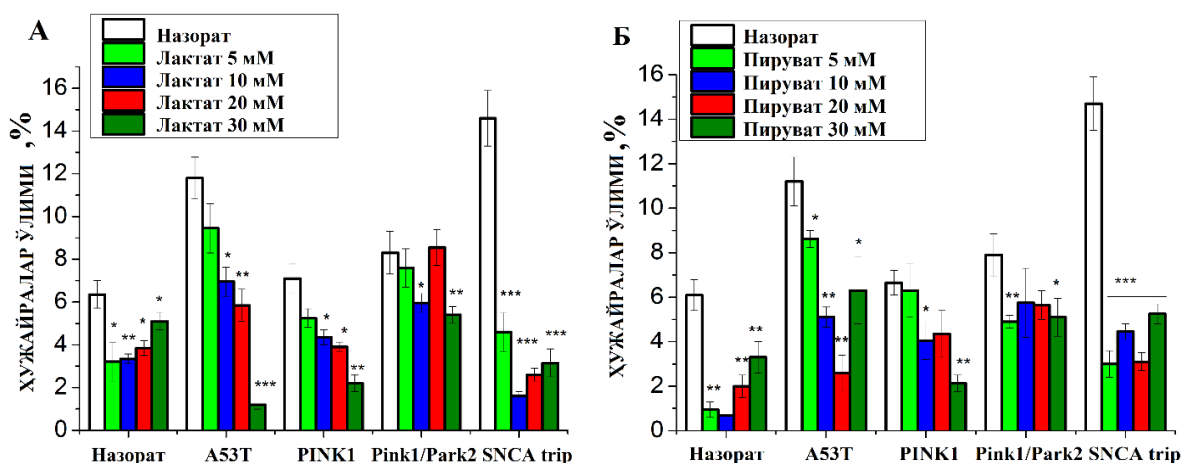


6-расм. 30 мМ лактат бафиломицин A1 билан бирга қўлланилганда аутофагия жараёнининг фаоллашганини англатувчи LC3II/I нисбатининг PINK1 хужайраларида ортиши. N=3; *p<0,005;

Лактат ва пируват таъсирида соғлом ва шу билан бирга Паркинсон касаллиги мутацияларини сақловчи фибробластларда хужайралар ўлимнинг камайиши. Соғлом ва шу билан бирга Паркинсон касаллиги мутацияларини сақловчи фибробласт хужайраларнинг одатдаги ҳолатда 6% га яқини нобуд бўлиши аниқланди. Бу кўрсаткич A53T (SNCA) мутацияли хужайра линиясида (9.8%, N=7;) SNCA трипликацияси мутациясида (11.4%, N=9;) юқорирок эканлигини кузатдик (7-расм А).

Лактатнинг турли хил (5,10,20,30 мМ) концентрацияси билан хужайраларни 24 соат давомида инкубация қилиш натижасида назорат гуруҳида 20 мМ концентрацияда $3.3 \pm 0.7\%$ га; (N=6; p<0.05); PINK1 мутациясида нисбатан юқори яъни 20 ва 30 мМ концентрацияда мос равишда $3.2 \pm 0.2\%$ ва $2.2 \pm 0.3\%$ (N=6; p<0.05). PINK1/PARK2 ва A53T мутациялари учун эса лактатнинг фақат 30 мМ концентрацияси хужайраларни ўлимдан самарали ҳимоя қила олиши аниқланди. SNCA трипликацияси мутациясига эга фибробластларни лактат билан инкубациясида эса барча концентрацияларда (5 дан 30 мМ гача) ижобий натижа олинди.

Шундай қилиб, ПК мутацияларига эга хужайраларни натрий лактат ва натрий пируват билан инкубация қилишнинг хужайралар учун токсиклиги кузатилмади, аксинча 20–30 мМ концентрацияларда хужайраларни ўлимдан ҳимоя қилиши аниқланди.

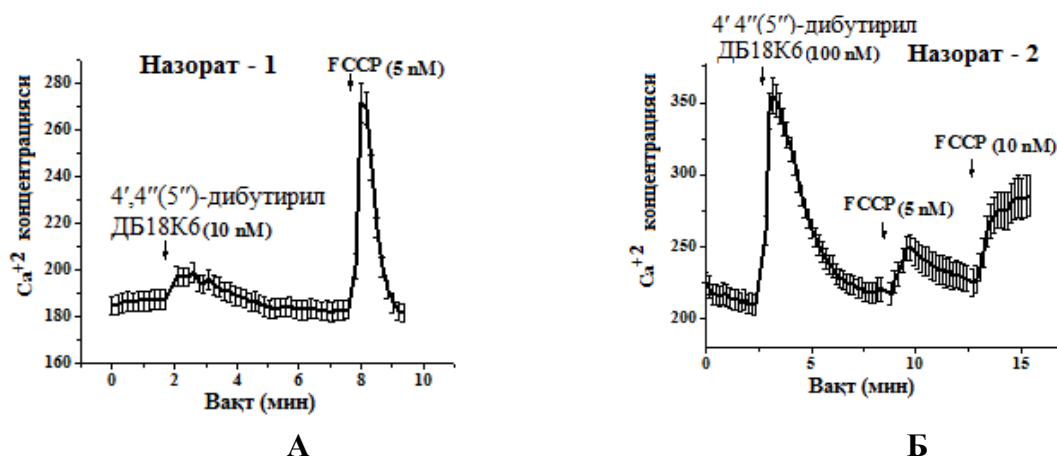


7-расм. А. Лактат таъсирида соғлом ва шу билан бирга Паркинсон касаллиги мутацияларини сақловчи фибробласт хужайралар ўлимининг камайиши. N=6; *p<0.05
 Б. Пируват таъсирида соғлом ва Паркинсон касаллиги мутацияларини сақловчи фибробласт хужайралар ўлимининг камайиши. N=7; *p<0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

Фибробластларни 24 соат давомида пируват билан инкубация қилиш назорат гуруҳи, A53T ва SNCA трипликацияси мутациясига эга хужайралар учун ҳар тўрттала концентрацияда ижобий натижа берган бўлса, PINK1 мутацияли фибробластларда 10 мМ дан бошлаб таъсир кўрсатди ва 30 мМ да максимумга эришди (2.1% ўлик хужайралар; N=7; p<0.001; 7-расм Б). Қизиқарли жиҳати, PINK1/PARK2 мутациясига эга фибробластларда 24 соатли пируват билан инкубация паст концентрацияларда (5-10 мМ) самараралироқ эканлиги маълум бўлди. Шундай қилиб, пируват ҳатто қисқа вақт ичида қўлланилганда ҳам назорат гуруҳидаги ва ирсийланувчи ПК келтириб чиқарувчи генлар мутациясига эга фибробластларда хужайраларни ўлимдан ҳимоя қилиши аниқланди.

Ионофор хусусиятларига эга краун эфирлар фибробласт хужайралари мембранаси орқали Ca²⁺ транспортини дозага боғлиқ равишда оширади. Митохондрияларни сифат жиҳатидан назорати хужайрада митохондриялар деградацияси яъни митофагия бошқарилувининг бир қанча йўллари ўз ичига олади ва шу орқали хужайранинг бутун ҳаёт фаолияти давомида уларнинг функционал фаолиятини таъминлаб туради. Ҳозирда митофагияни фаоллаштирувчи кўплаб механизмлар маълум. Улардан бири бу Ca²⁺ концентрациясидир. Ca²⁺ ва Паркинсон касаллиги ўртасидаги боғлиқлик борасидаги ҳозирда маълум билимлардаги бўшлиқлардан бири бу ПК келтириб чиқарувчи ген мутацияларининг қай тарзда дофаминергик нейронлардаги Ca²⁺ триггер жараёнларига таъсир кўрсатишидир. ПК келиб чиқишида дофамин етишмаслиги билан бир қаторда касалликни келтириб чиқарувчи ва ирсийланувчи мутацияларни летал бўлишида Ca²⁺ иштирокини ўрганиш лозим. Мутациялар натижасида оксил агрегатлари ҳосил бўлиш тезлиги, митофагия, аутофагия каби жараёнларга Ca²⁺ ионлари таъсирини ўрганишда махсус Ca²⁺ специфик ионофорлар (A23187) дан фойдаланилади. Биз ўз тажрибаларимизда Ca²⁺ нинг алтернатив ионофори сифатида 4',4'' (5'')-дибутирил–дибензо-18-краун-6 ва 4',4'' (5'')-дивалерил–дибензо-18-краун-6

каби краун эфирлардан фойдаландик (8-расм). Фойдаланилган краун эфирлар профессор А.К. Ташмухамедова томонидан тақдим этилган.



8-расм. 4',4''(5'')-дибутирил–добензо-18-краун-6 таъсирида фибробласт хужайраларида цитоплазматик Ca^{2+} концентрацияси ортиши. А. 10 nM концентрацияда назорат-1 хужайраларида $[Ca^{2+}]_{цит}$ миқдори ортиши. Б. 100 nM концентрацияда назорат-2 хужайраларида $[Ca^{2+}]_{цит}$ миқдори ортиши. N=3; n=30

Тажрибалар фибробласт хужайраларида амалга оширилди ва натижада ҳар иккала краун эфирлар дозига боғлиқ равишда мембрана орқали Ca^{2+} транспортини ошириб, цитоплазматик Ca^{2+} концентрациясини ошириши аниқланди (8-расм). Алоҳида таъкидлаб ўтиш лозимки, бунда 4',4''(5'')-дибутирил–добензо-18-краун-6 нинг таъсири кучлироқ намоён бўлди.

Паркинсон касаллиги, шунингдек, нормал қариш жараёнларида маҳаллий Ca^{2+} дефицити кузатилиши юзасидан кўплаб далиллар мавжудлигига қарамасдан, нейронлар стимуляцияси вақтида Ca^{2+} нинг айнан митохондриялар функциясини издан чиқариши ҳақидаги ғоялар ҳозиргача тўлиқ ўрганилмаган. Бу каби жараёнларни тадқиқ қилиш учун керакли инструментлар қаторига биз фойдаланган краун эфирларни ҳам киритиш мумкин.

Тадқиқотларимизда биз бош мия энергетик метаболизмида иштирок этувчи икки метаболит яъни лактат ва пируват концентрацияга боғлиқ равишда хужайра цитоплазмасини рН ни қисқа муддатга кислотали муҳит томон силжитишини аниқладик. Эътиборга лойиқ жиҳати шундаки, бундай рН ўзгаришлари турли хилдаги мутацияларга эга хужайраларда ҳам индуцирланиши аниқланди. Хужайраларнинг цитоплазматик рН га 30 mM лактат ёки пируватнинг максимал таъсирини, бош мия ишемияси вақтидаги хужайраичи $[pH]_{цит}$ нинг 6.5 га ёки ундан паст кўрсаткичгача тушишига солиштириш мумкин. $[pH]_{цит}$ кўрсаткичлари хужайраларда бир қатор жараёнларни бошқаради. Хусусан, нейронларда қисқа муддатли кислотали муҳит уларнинг фаоллигини сусайтиради (Sinning A., Hubner C.A. 2013). Фибробластларда эса бундай рН ўзгариши хужайра бўлиниш жараёнини ингибирлайди (Paris S., Pouyssegur J., 1984). Шунингдек, гарчи рН нинг камайиши апоптозни триггери бўла олиши мумкинлиги ҳақида далиллар мавжуд бўлсада (Schwartz L et al. 2020), биз ўз тажрибаларимизда хужайра

цитоплазмасида экспериментал юзага келтирилган ва бир неча дақиқаларда қайта тикланган рН ўзгаришлари назорат ва ирсий турдаги Паркинсон касаллигига эга фибробласт хужайраларида аксинча, фақатгина ижобий таъсирини кузатдик. Ўрганилган мутацияларга эга хужайраларда митохондриялар дисфункцияси ҳам кузатилиши туфайли (Abramov A.Y et al., 2017) лактат ва пируватнинг хужайра биоэнергетикаси таъсирини ҳам алоҳидла эътиборга олиш лозим (Gandhi S et.al, 2012). Шунингдек, лактат фибробластларда оксидланишли – фосфорланиш ва гликолиз ўртасида восита сифатида хужайраларнинг ҳаёт фаолиятида муҳим ўрин тутади (Kozlov A.M., 2020).

Паркинсон касаллиги билан боғлиқ мутациялар бош мианинг алоҳида қисмларида нейродегенератив жараёнларни индуцирлайди. Бош мианинг турли хил қисмларидан ажратиб олинган нейронлар ва астроцитларнинг энергия метаболизми, редокс тизими бир биридан фарқ қилади ва бу кўрсаткичлар митофагияга таъсир кўрсатиши мумкин (Cheng X.P.et.al., 2021). Паркинсон билан оғриган беморлардан олинган фибробластлар нейронларга нисбатан солиштирилганда Паркинсон мутацияларининг митохондриал метаболизмга таъсирини ўрганиш учун муҳим ва мос келувчи модел ҳисобланади (Abramov A.Y. et al., 2011). Шу сабабли, Паркинсон мутацияларига эга фибробластлардан фойдаланган ҳолда лактат ва пируватнинг митофагия ва аутофагия жараёнларига таъсирини ўрганиш мумкин.

Хужайра ички муҳитини FCCP ва нигерицин таъсирида кислотали муҳит томон ўзгариши PINK1 га боғлиқ ва боғлиқ бўлмаган ҳолда митофагия ва аутофагияни фаоллаштириши аниқланган (Berezhnov A.V. et al., 2016). Лактат ва пируватнинг миллимоляр концентрацияларида кузатилган $[pH]_{цит}$ ўзгаришлари FCCP нинг $10 \mu M$ ва нигерициннинг $1-3 \mu M$ концентрацияларида ҳам кузатилган. Бироқ, ушбу ионофорлардан фарқли равишда лактат ёки пируват таъсирида $[pH]_{цит}$ пасайиши хужайраларнинг ўлимини келтириб чиқармади.

PINK1 ва PARK2 га боғлиқ бўлган митофагия митохондриал мембрана потенциали кескин камайиб кетиши ёки бутунлай йўқолиши шароитида амалга ошади (Narendra & Youle 2011). Лактат ва пируват эса кўп ҳолларда ана шу митохондриал мембрана потенциалини қайта тиклайди (Abramov A.Y. & Angelova P.R., 2019; Erdelyi P. et.al. 2011). Шунингдек, инобатга олган ҳолда, лактат ёки пируватнинг митофагия ва аутофагия жараёнларига таъсири митохондриал мембрана потенциалига боғлиқ бўлмасдан, цитоплазматик $[pH]_{цит}$ нинг кислотали томонга ўзгарганлиги сабабли юзага келган. Биз ўз тажрибаларимизда PINK1 ва PARK2 генлари мутациясига эга хужайраларда ҳам лактат ва пируват таъсирида $[pH]_{цит}$ камайиши ва бунинг оқибатида митофагия ва аутофагия жараёнлари фаоллашишини аниқладик. Бу эса яна бир бор митофагиянинг PINK/Parkin га боғлиқ бўлмай, биз кўллаган моддаларнинг миллимоляр концентрациялари томонидан фаоллашганини тасдиқлайди. Бошқа турдаги мутацияга эга хужайраларда эса

митофагиянинг PINK/Parkin йўли иштирок этиши мумкинлигини эса рад эта олмаймиз.

Шунингдек, қондаги лактат миқдори ва хужайра цитоплазмасининг кислотали томон ўзгаришларига бир қатор омиллар сабаб бўлиб, улардан энг муҳим икки жараён: қисқа муддатли очлик (Dutta D et.al. 2014), ҳамда жисмоний машқлар (Volianitis S et al. 2018; Vainshtein A et.al. 2015) организм учун фойдали эканлиги маълум.

Биз ўз тажрибаларимизга асосланиб, Паркинсоннинг ирсийланувчи шакли ташхиси қўйилган беморларда жисмоний машқлар давомидаги лактат моддасининг ортиши митофагия ва аутофагия каби жараёнларни фаоллаштириш ва нейропротектив таъсир кўрсатиш орқали организмга фойдали эканлиги ҳақида хулоса қилишимиз мумкин.

ХУЛОСАЛАР

1. Лактат ва пируват A53T (SNCA), PINK1, PINK1/PARK2, SNCA трипликацияси мутацияларига эга хужайра линияларида цитоплазматик рН кўрсаткичини дозага боғлиқ равишда сезиларли даражада камайтириши аниқланди.

2. Лактат ва пируват 20 ва 30 мМ концентрацияларда назорат ва Паркинсон касаллиги мутацияларига эга хужайра линияларида митофагия жараёнини фаоллаштириши аниқланди. Бунда лактат ва пируват таъсири хужайралардаги базал митофагия даражасига боғлиқ эмаслиги қайд этилди.

3. 30 мМ лактат A53T (SNCA), PINK1, PINK1/PARK2, SNCA трипликацияси мутацияларига эга хужайра линияларида LC3II/I нисбатининг 150% ±5.6% га орттириб, аутофагия жараёни фаоллаштириши қайд этилди.

4. Узок муддат (24 соат) давомида фибробластларни лактат ёки пируват билан инкубация қилиш хужайралар ўлимини назорат хужайраларида (6% дан 3,3% га), A53T да (9,8% дан 1,2% га), PINK1 (6% дан 2,2%), PINK1/PARK2 (7,1% дан 5,4% га), SNCA трипликациясида (11,4% дан 1,6% га) камайтириши аниқланди

5. 10 нМ ва 100 нМ концентрацияларда 4',4''(5'')-дибутирил-дибензо-18-краун-6 ва 4',4''(5'')-дивалерил-дибензо-18-краун-6 эфирлари соғлом фибробластлар цитоплазматик Ca²⁺ миқдорини ошириши аниқланди.

6. Олинган натижалар Паркинсон касаллигида кузатиладиган митохондриялар дисфункцияси натижасида лактат миқдорининг ортиши ва шу лактатнинг шикастланган митохондрияларни камайтириши ўртасида манфий акс алоқа мавжудлигини намоён этди.

**SCIENTIFIC COUNCIL FOR AWARDING SCIENTIFIC DEGREES
DSc03/30.12.2019.B.01.13 AT THE INSTITUTE OF BIOPHYSICS AND
BIOCHEMISTRY OF THE NATIONAL UNIVERSITY OF UZBEKISTAN**

INSTITUTE OF BIOPHYSICS AND BIOCHEMISTRY

KOMILOVA NAFISA RAJABOVNA

**ACTIVATION OF MITOPHAGY AND AUTOPHAGY IN FAMILIAL
FORMS OF PARKINSON'S DISEASE, AS A POTENTIAL STRATEGY
FOR CELL PROTECTION**

03.00.02 – Biophysics and radiobiology

**DISSERTATION ABSTRACT OF THE DOCTOR OF PHILOSOPHY (PhD)
OF BIOLOGICAL SCIENCES**

Tashkent – 2022

The title of the dissertation of PhD has been registered with number B2021.3.PhD/B624 at the Supreme Attestation Commission of the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan.

The dissertation has been prepared at the National University of Uzbekistan.

The abstract of the dissertation in three (Uzbek, English and Russian (Resume)) languages has been placed on the website of the Scientific Council (www.ibb-nuu.uz) and on the website of «ZiyoNet» information and educational portal (www.ziynet.uz).

Scientific supervisor: **Mirkhodjaev Ulugbek Zakirovich**
doctor of biological sciences, professor

Official opponents: **Merzlyak Petr Grigoryevich**
doctor of biological sciences

Baev Artem Yuryevich
doctor of philosophy in biological sciences (PhD)

Leading organization: **Tashkent pediatric medical institute**

The dissertation will be defended on 13 April 2022 year 14⁰⁰ at the meeting of the Scientific Council DSc.03/30.12.2019.B.01.13 at the Institute of Biophysics and Biochemistry, at the National University of Uzbekistan at the following address: 100174, Tashkent city, Almazar district, Student's town, University st., 174. Phone: (99871) 262-68-96.

The dissertation has been registered at the Information Resource Centre of Institute of Biophysics and biochemistry, National University of Uzbekistan (registration number № 33). Address: 100174, Tashkent city, Olmazor district, Student's town, University st., 174. Phone: (99871) 262-68-96. e-mail: ibb-nuu@mail.ru.

The abstract of the dissertation has been distributed on «24» March 2022.
(Protocol at the register № 1 dated «24» March 2022).



Sabirov Ravshan Zairovich
Chairman of the Scientific Council Awarding
Scientific Degrees, D.B.Sc., academician

Pozilov Mamurjon Komiljonovich
Scientific secretary the Scientific Council
Awarding Scientific Degrees, D.B.Sc.

Axmedjanov Iskandar Gulyamovich
Chairman of the academic seminar under the
Scientific Council Awarding Scientific Degrees,
D.B.Sc., professor

INTRODUCTION (abstract of PhD dissertation)

The scientific relevance of the topic of the dissertation. Parkinson's disease (PD) is the world's second most prevalent neurological illness (after Alzheimer's disease). The condition affects 0.3 % of the world's population, and the disease's prevalence rises with age: it can reach 1% after the age of 55, and up to 4% among those over the age of 70. According to the «International Association of the Working Group» on Parkinson's Disease, the illness will begin to have a substantial influence on persons of working age in the next years. Currently, the condition affects one out of every ten individuals under the age of 50, and one out of every twenty patients under the age of 40. The research of molecular processes of disease pathogenesis and the development of efficient therapeutic strategies are both scientific and practical priorities in this area.

In recent years, the world's premier research institutes have been doing considerable research focused on developing new generations of medications that activate the autophagy process to treat a variety of disorders, including neurological diseases like Parkinson's. Autophagy, or the cell's capacity to eliminate damaged proteins and organelles, linked to the progression of disease processes. Increased death of dopamine-synthesizing neurons, primarily in the cerebral cortex and other parts of the central nervous system, caused by disruption of the mitophagy process, which is a method of mitochondria clearance in a harmless way, and the subsequent disruption of the autophagy process. Despite the advances gained in activating autophagy processes in many illnesses, molecular pathways must now be determined.

Basic and applied researches conducted in our country to study the pathogenic modifications that occur in cells with neurodegenerative disorders. «Further growth of the pharmaceutical industry, enhancing the provision of inexpensive, high-quality medications and medical supplies to the people and medical institutions»¹ according to the Action Strategy for the five priority areas of the Republic of Uzbekistan's future development. In this regard, study into the molecular processes of cell apoptosis in Parkinson's disease, which is becoming more prevalent in the population, is essential for social health.

This dissertation research contributes to the implementation of the tasks set out in the Decree of the President of the Republic of Uzbekistan №.4310 "On measures to further develop the system of medical and pharmaceutical education and science" and "On measures to improve the quality of education and scientific efficiency in the field of chemistry and biology" dated on August 12, 2020 № 4805.

Correspondence of research to the priority directions of development of science and technology of the Republic of Uzbekistan: This study conducted in

¹ Decree of the President of the Republic of Uzbekistan PF-4947 "On the Action Strategy for further development of the Republic of Uzbekistan"

line with the republic's VI priority for scientific and technological development "Medicine and Pharmacology".

Level of knowledge of the problem: Nowadays, the key mechanisms of Parkinson's disease and various ways of therapy are widely studied. The main feature of this disease is the accumulation of protein and protein inclusions prone to aggregation, which are markers of neurodegenerative diseases and have important pathogenetic significance (Xilouri, Stefanis, 2010). The accumulation of pathogenic α -synuclein occurs with the formation of Lewy bodies (Recasens, Dehay, 2014). α -synuclein becomes pathogenic due to its mutations A53T, A30P, and E46K (Singleton et al., 2003). In turn, these abnormal forms of α -synuclein interact with ATP synthase and open PTP, which leads to cell death of neurons (Abramov et al., 2018). In addition to mutant α -synuclein, Lewy bodies contain more than 90 other proteins, including such PD markers as proteins DJ-1, LRRK2, PARKIN, PINK-1, etc. (Seidel et al., 2010). It was established that mitophagy and autophagy can be initiated by the changes in intracellular pH (Berezhnov et al., 2016).

According to researches done in the Commonwealth of Independent States, the first clinical signs (Levin O.S. et al., 2012) determine the deterioration rate of Parkinson's disease symptoms. It is concluded that the tremor observed in the disease gradually increases during the first decade (Illarioshkin S.N. et al. 2012). Accumulating data suggests a nonpharmacological approach to treating Parkinson's disease (PD (Kamakinova A.B., 2015).

H.M. Khalimova and others (2010; 2011; 2012) conducted scientific research on Parkinson's disease in the Republic of Uzbekistan. Parkinsonism found to be genetic background in 15-20% of Uzbek population (Madjidova Yo. N., 2011). In the field of neurology (14.00.13–Neurology) the role of molecular-genetic polymorphisms of genes, in particular, T240M mutations in PARK1, Ala53Thr and PARK2 genes, has been shown to be the main mutations for the development of Parkinson's disease in Uzbek population (M.M. Raimova 2017). Biochemical and molecular-genetic research aiming at understanding Parkinson's disease origin, pathogenesis, and pathophysiology has been continuing in recent years. The above researches have concentrated on the diagnostic criteria and therapy optimization of distinct kinds of Parkinson's disease, and cannot explain the molecular processes of illness onset and progression at the cellular level.

Based on the aforementioned facts, the discovery for as well as investigation of new strategies of nonpharmacological treatment of PD through the activation of mitophagy and autophagy, which protect cells from death in genetic variants of Parkinson's disease, is definitely intriguing and relevant.

Relationship of dissertation research with research plans of the research institution where the dissertation was performed. The dissertation research has been carried out in the framework of a scientific direction of the department of

biophysics of the National university of Uzbekistan "Investigation of ionic mechanisms of membrane active compounds" and at the Institute of Neurology (London, UK) under the project "A quantitative approach to the characterization of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease" №21821522 (2019-2022).

The aim of the research work is the identification of effects lactate and pyruvate produce on mitophagy and autophagy in the hereditary forms of Parkinson's disease.

The objectives of the research work are as follows:

to study the influence of lactate and pyruvate on intracellular pH changes in the cells with Parkinson's disease mutations ;

to determine the effect of lactate or pyruvate on the process of mitophagy in the cell lines with Parkinson's disease mutations;

to identify the influence of lactate and pyruvate on cellular autophagy in Parkinson's patient's fibroblasts;

to study the effects of lactate and pyruvate on the level of cell death of the fibroblasts with various Parkinson's disease mutations;

to study the effect of crown ethers on the concentration of intracellular Ca²⁺ of fibroblasts.

The object of study is fibroblasts consistently expressing mutations in SNCA, PINK1, PINK1/PARK2 and PGK genes obtained from patients with Parkinson's disease and apparently healthy control cells.

The subject of the study is the determination of the effect of lactate or pyruvate on the cytoplasmic pH changes, mitophagy, autophagy processes and cell death of fibroblast cells.

Research methods. All experiments used biophysical, biochemical, molecular-biological (fluorescent, confocal microscopy, western blot, primary cell cultures) and statistical analysis methods. Modern software such as Volocity, ZEN also used to process and visualize the obtained data.

Scientific novelty of the research work is as follows:

lactate and pyruvate were proved to produce dose-dependent effect on the intracellular pH in the hereditary forms of Parkinson's disease;

higher concentrations of lactate and pyruvate were shown to activate mitophagy and autophagy in the cell lines under study;

lactate or pyruvate were proved to reduce cell death of fibroblasts;

4',4''(5'')-dibutyl-dibenzo-18-crown-6 and 4',4''(5'') divaleryl-dibenzo-18-crown-6 were shown to increase intracellular Ca²⁺ concentration in fibroblasts in a dose-dependent manner;

The practical results of the research are expressed in the following cases:

basal amounts of intracellular pH of the fibroblasts obtained from Parkinson's patients with mutations of genes A53T (SNCA), PINK1, PINK1/PARK2, and SNCA triplication were found to be almost the same as in control cell lines. The basal level of intracellular pH of cell lines with PGK

mutation significantly lower compared to control cells. It was found that lactate, pyruvate dose dependently could reduce the intracellular pH, and only in the cells with PGK mutation, these changes were found to be very small. Despite the differences in basal mitophagy levels, 20-30 mM lactate significantly increased mitophagy. Lactate found to activate the autophagy process in control and experimental cell lines at a concentration of 30 mM. Incubation of fibroblasts with lactate or pyruvate for 24 hours has showed reduction in the number of cell death in both control and experimental lines of fibroblasts;

The reliability of the research results confirmed by the fact that the experimental results obtained using modern laboratory equipment; statistical processing of the results was performed using the Student Criterion. Confirmation of the obtained results determined by experts, discussion of these results at national and international conferences, publication of research results in leading peer-reviewed journals. In addition, an application for a patent submitted to the Intellectual Property Agency of the Republic of Uzbekistan.

Scientific and practical significance of research results. The two metabolites involved in brain energy metabolism, pyruvate and lactate, have been found to shift cytosolic pH toward an acidic environment in a short period of time depending on concentration, and especially in cell lines with different genetic mutations. The scientific significance of the findings is that these findings complement existing knowledge about Parkinson's disease.

The practical significance of the results is that lactate and pyruvate can serve as a basis for a new therapeutic approach in the treatment of patients with familial forms of Parkinson's disease. Also, relied on the obtained results clinicians can develop more personalized medicine taking into account the effect of lactate on cells with different mutations of Parkinson's disease.

Implementation of the research results. Based on the scientific results about the activation of mitophagy and autophagy in the hereditary forms of Parkinson's disease:

the findings from the study were used in the project №821522 PD-MitoQUANT at the Innovative Medicine Initiative 2 JU «A quantitative approach towards the characterisation of mitochondrial dysfunction in Parkinson's Disease». The findings introduced into practice helped identify the role of autophagy in treatment of Parkinson's disease (letter from the Institute of Neurology, University College London, dated on 23th of September);

significant results achieved in assessment of the role of mitophagy and autophagy activation in the cell lines obtained from patients with hereditary forms of Parkinson's disease were used in the project №22-24-01043 "Regulation of the dynamics of the mitochondrial network in Parkinson's disease". And helped properly interpret the findings from research project performed at the Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences (reference dated January 19, 2022). As a result, activation of the mitophagy under the influence of metabolites

such as lactate and pyruvate has led to the assumption that they have neuroprotective effects for Parkinson's disease patients;

the findings from assessment of ability of lactate and pyruvate to activate mitophagy and autophagy in hereditary forms of Parkinson's disease were used in the research practical project PZ-20170928599 "Development of technology for the algae cultivation in the conditions of Uzbekistan and generation of bioactive substances on their basis" (reference of Uzbekistan Academy of Sciences of the №4/1255-174 dated January 25, 2022). The findings from metabolically induced mitophagy and activation of autophagy used for assessment of biological effects of antioxidants generated from *Dunaliella salina* AR-1 alga.

Approval of research results. The results of this study were discussed at 3 international scientific and practical conferences.

Publication of research results. On the topic of the dissertation, 7 printed works were published, of which 4 scientific articles, including 3 in republican and 1 in a foreign journal, recommended by the Higher Attestation Commission of the Republic of Uzbekistan for the publication of the main scientific results of the dissertation.

The structure and volume of the thesis. The dissertation consists of introduction, four chapters, conclusion and list of references. The volume of the dissertation is 116 pages.

MAIN CONTENT OF THE DISSERTATION

The introduction is based on the relevance and necessity of research, describes the goals and objectives, objects and subjects of research, its relevance to the priorities of science and technology of the republic, describes the scientific novelty and practical results of research, reveals the scientific and practical significance of research results. information on the structure of the dissertation, published works and dissertations.

The first chapter of the dissertation, entitled "**Familial forms of Parkinson's disease**" provides the mechanism of Parkinson's disease caused by individual gene mutations and differing in some processes, as well as their generalization of the signaling system a detailed literature review on cell pathologies resulting from mutations is provided. A review of the literature on Parkinson's disease and the resulting changes in cells, particularly mitochondria, including the molecular mechanisms of change in each mutation that causes Parkinson's disease are analyzed using the literature.

The second chapter of the dissertation, entitled "**Overview of mitophagy and autophagy pathways and their role in Parkinson's disease**", emphasizes the connection between these two processes and describes modern concepts of mitophagy and autophagy today. Mitophagy and autophagy processes are covered in detail, with particular emphasis on the ability of these processes to play a role in maintaining cell life. This chapter also discusses the mechanisms by which mitochondrial membrane potential (MMP) and intracellular pH stability are maintained. Since the 2000s, intensive research has been conducted on the link

between autophagy and neurodegenerative diseases. Although the protective properties of autophagy for neurons are being confirmed, the issue of triggers initiating this process remains relevant to this day. Therefore, the metabolites we are studying will contribute to the personalization of clinical treatment of Parkinson's patients in the future.

The third chapter of the dissertation, entitled "**Methods for identification of mitophagy and autophagy in hereditary forms of Parkinson's disease**" describes the objects, methods, devices used in the work, biological, physicochemical and statistical analysis methods. Much of our work has been done on fluorescent and confocal spectroscopy, as well as using western blot methods.

The fourth chapter of the dissertation, entitled "**Modification of processes mitophagy and autophagy in familial forms of Parkinson's disease**", presents the results showing that the effects of lactate and pyruvate on Parkinson's cell lines with different mutations are related to activation of mitophagy and autophagy processes.

Table 1

Donors information

Cell line	Mutation	Diagnosis	Age	Sex
A53T	A53T het in SNCA	Severe PD	51	Female
PINK1	homozygous p.Try90Leufs*12 in PINK1	PD	52	Female
PINK1/Park2	Park2/Pink1 double heterozygous PARK2 R275W/WT + PINK1 p.Try90Leu fs*12/WT	PD	75	Male
SNCA trip	Triplication in SNCA	Early-onset PD	55	Female
PGK-1	Phosphoglycerate kinase type 1 mutation (c.1132A>C,p.Thy378Pro)			
Control 1		Healthy Donor	56	Female
Control 2		Healthy Donor	49	Female
Control 3		Healthy Donor	53	Male

In the majority of Parkinson patients' fibroblasts, the basic intracellular pH found to be the same as in controls. SNARF-1 applied as a fluorescent probe to detect basal levels of cytosolic pH in healthy cells and patient fibroblasts with familial variants of Parkinson's disease. Intracellular $[pH]_{cyt}$ was shown to be in the range of 7.1-7.2 in cells with A53T (SNCA), PINK1, PINK1/PARK2 mutations, and SNCA triplication (Figure 1). Cytosolic basal pH was considerably lower in patient cells with Phosphoglycerate Kinase type 1 mutation (c.1132A>C, p.Thy378Pro) compared to control cells (N=3, n=40 cells; $pH=6.7\pm 0.1$; $p<0,05$; Figure 1).

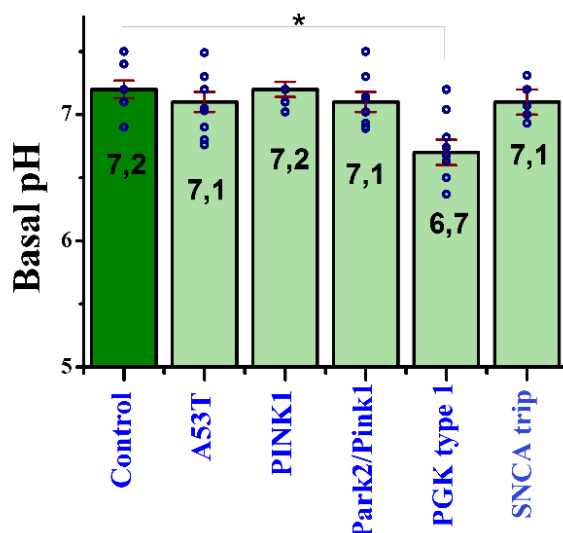


Figure 1. The basal levels of cytosolic pH of Parkinson's cells compared with control cells. N=3, *P< 0.05

Lactate dose-dependently decreases cytoplasmic pH in cells with hereditary forms of Parkinson's disease. During physical exercise, the concentration of one of the body's primary metabolites, lactate, can significantly rise and reach a concentration of up to 30 mM. The addition of sodium lactate (5–30 mM) to control fibroblasts significantly decreased their cytosolic pH. The lowest values were attained in 2-3 minutes with a delayed recovery of $[pH]_{cyt}$, after which 10 mM NH_4Cl was added and rinsed off for SNARF-1 signal calibration. A concentration of 10 mM lactate caused the greatest reduction in pH in control fibroblasts. (N=3; n=30 cells; Figure 2 A-B). In comparison to normal cells, the effect of sodium lactate on the $[pH]_{cyt}$ of fibroblasts with PINK1 or PINK1/PARK2 mutations was considerably higher (N=3; n=30 cells; $p<0,05$). In response to sodium lactate, cells with α -synuclein pathology–SNCA triplication or A53T mutation showed a considerable decrease in cytosolic pH.

Only one of the cell lines analyzed - patient cells with Phosphoglycerate kinase type 1 mutation - revealed no or very small reduction in intracellular pH in response to 5-30 mM sodium lactate (Figure 2 C-D). Thus, sodium lactate treatment can cause cytosolic acidification in control and fibroblasts from patients with familial Parkinson's disease.

Pyruvate dose-dependently causes acidification of cytosolic pH in cells with genetic forms of Parkinson's disease. When sodium pyruvate (5-30 mM) applied to control fibroblasts, it caused a dose-dependent reduction in intracellular pH. The effects of sodium pyruvate on cells with familial Parkinson's disease were comparable to the effects of lactate on the pH of these cells.

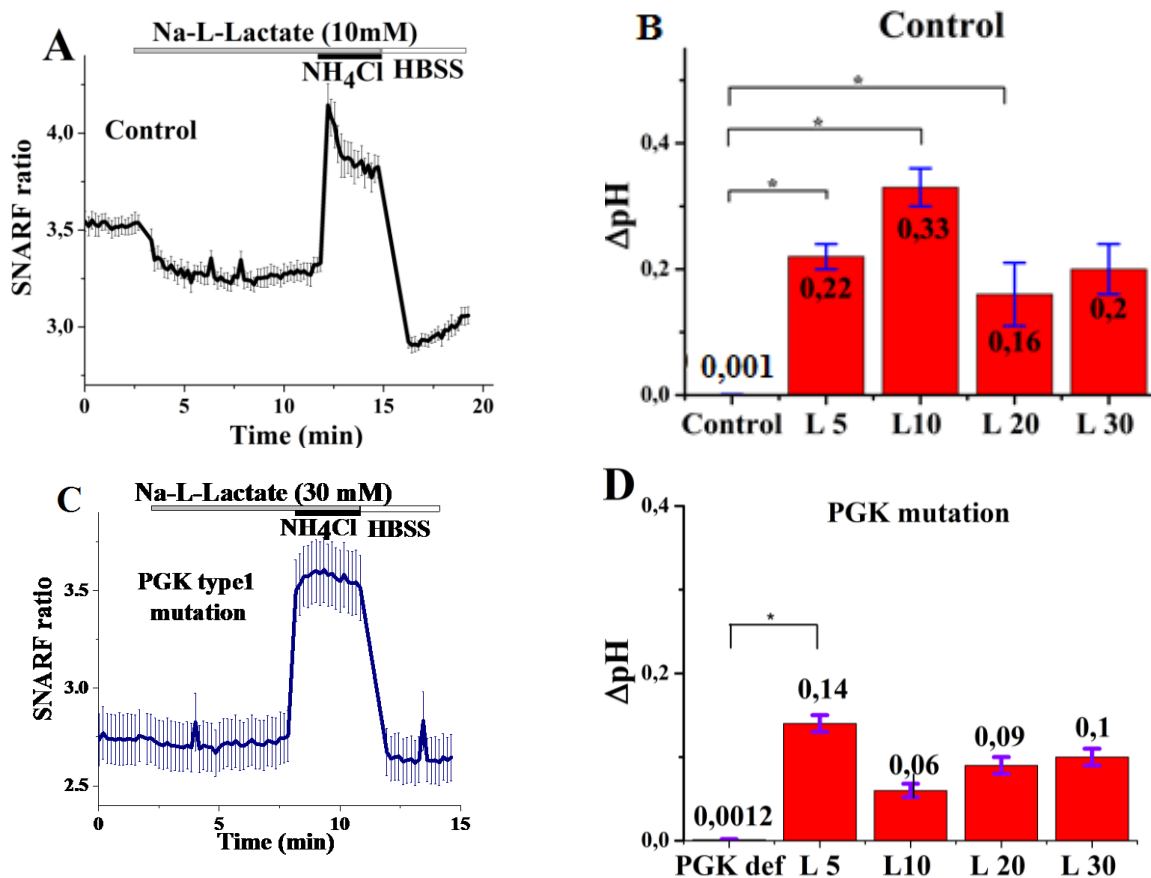


Figure 2. A. 10 mM Lactate reduce cytosolic pH in control cells. B. Lactate dose dependently reduce pH_{cyt} in control cell lines. C. The affect of 30 mM Na Lactate on the cells with PGK deficiency. D. ΔpH of cells with PGK deficiency in different concentrations of Lactate. N=3; n=30 cells; * $p < 0,05$

Thus, fibroblasts with PINK1 mutation showed a strong dose-dependence with the maximal decrease in $[pH]_{cyt}$ in response to 30 mM sodium pyruvate, also cells with PINK1/PARK2 mutation at the same concentration of pyruvate showed similar acidification of the cytosol of fibroblasts (Figure 3 A, B). Pyruvate treatment of fibroblasts with SNCA triplication exhibited a significant influence on cytosolic pH in all concentration ranges (5-30 mM), with a maximum drop at 20 mM pyruvate. Fibroblasts with A53T mutations similarly showed a considerable reduction in pH in response to 5-30 mM sodium pyruvate, with the highest values at 30 mM. Similarly to lactate studies, patient cells with Phosphoglycerate kinase type 1 mutation displayed only a very small reduction in intracellular pH in response to 5-30 mM sodium pyruvate. Hence, a millimolar concentration of pyruvate promoted short-term acidification of the cytosol in normal and familial Parkinson's disease cells.

Lactate enhanced mitophagy in both healthy and Parkinson's disease fibroblasts. To evaluate the effect of different lactate concentrations on mitophagy, we first treated the cells with lactate or pyruvate for 2 hours. Before the experiments stained cells with MitoTracker Green and LysoTracker Red to stain mitochondria and lysosomes, respectively. Using confocal microscopy obtained images of mitochondria colocalizing with lysosomal signal (Figure 3 A-B).

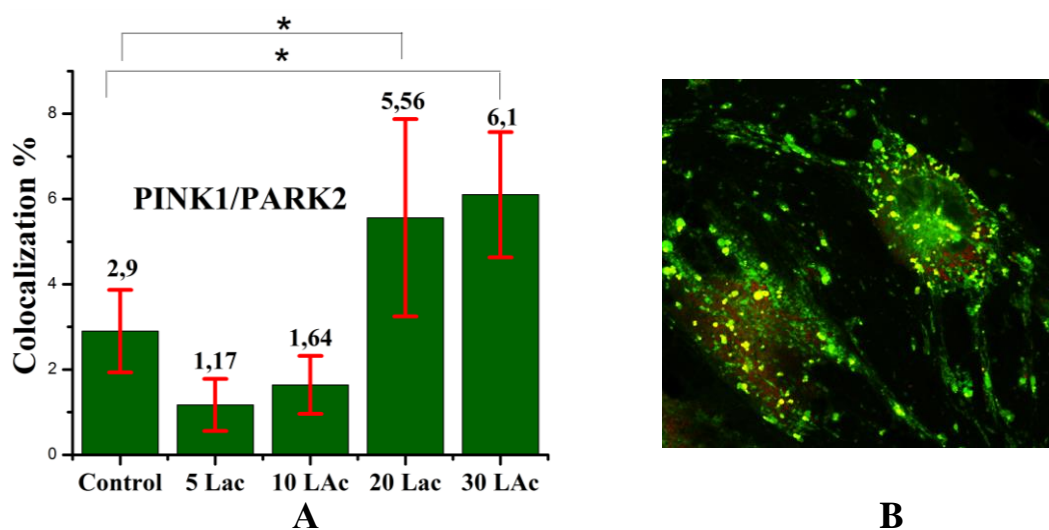


Figure 3. Lactate induced mitophagy in PINK1/PARK2 mutated fibroblasts. **A.** The Percentage of colocalization under the influence of different concentrations of lactate in PINK1/PARK2 mutated fibroblasts. **B.** PINK1/PARK2 fibroblasts treated with 20 mM lactate. N=3, n=60, *p<0,05.

In control fibroblasts, the initial level of mitophagy was 0.81% (N=3). Only at a dose of 30 mM treatment of cells with lactate resulted in a significant rise in colocalization (N= 3 experiments; p<0.05;). Notably, despite the fact that PINK1 is involved in the mitophagy process, fibroblasts with PINK1 mutation showed a basal level of mitophagy similar to normal cells - 1.08% (N=3;). 5-20 mM lactate reduced the fraction of mitochondria colocalizing with lysosomes, while 30 mM lactate increased mitophagy for a five times in these cells (N=3; to 5.46%; p<0.05;).

PINK1/PARK2 mutant fibroblasts displayed a greater baseline level of mitophagy - 2.9 % (N=3; Figure 3 A-B). Lower lactate concentrations–5-10 mM–decreased the fraction of mitochondria colocalizing with lysosomes in the same way that the PINK1 mutation did. Lactate concentrations of 20 mM and 30 mM, on the other hand, definitely increased mitophagy in fibroblasts with PINK1/PARK2 mutations.

Surprisingly, various cells with varying α -synuclein disease exhibited a variable influence on baseline mitophagy levels. Hence, fibroblasts with SNCA triplication had a reduced rate compared to control cells (0.30 %), but fibroblasts with the A53T mutation had a considerably higher percentage of colocalization - 7.9 % (N=3;). Incubation of these cells with lactate, on the other hand, raised the

level of mitophagy in fibroblasts with both forms of disease – in SNCA triplication starting at 10 mM and higher and in A53T starting at 20 mM and 30 mM.

Regardless of their basal levels of mitophagy, all of the fibroblasts studied showed considerably increased colocalization of mitochondria with lysosomes in response to the increasing lactate concentrations (20-30 mM).

Pyruvate increased mitophagy in control and PD patients' fibroblasts. 5-10 mM pyruvate usually applied as a substrate for complex I-related respiration, which used to activate oxidative phosphorylation in cells.

Starting at a dose of 10 mM, incubating control fibroblasts with 5-30 mM sodium pyruvate resulted in a considerable increase in the percentage of mitochondria colocalizing with lysosomes (from basal 0.81% to 1.85% for 10 mM, N=3; p<0.05;). Sodium pyruvate could similarly trigger mitophagy in PINK1 or PINK1/PARK2 mutant fibroblasts, but only at a dose of 30 mM (Figure 4 A-B). Thus, 30 mM pyruvate generated a 5-fold increase in colocalization (N=3;) in PINK1/PARK2-deficient fibroblasts, the proportion of mitophagy increased from 3.1 to 9.3 %. (N=3; p<0.05;).

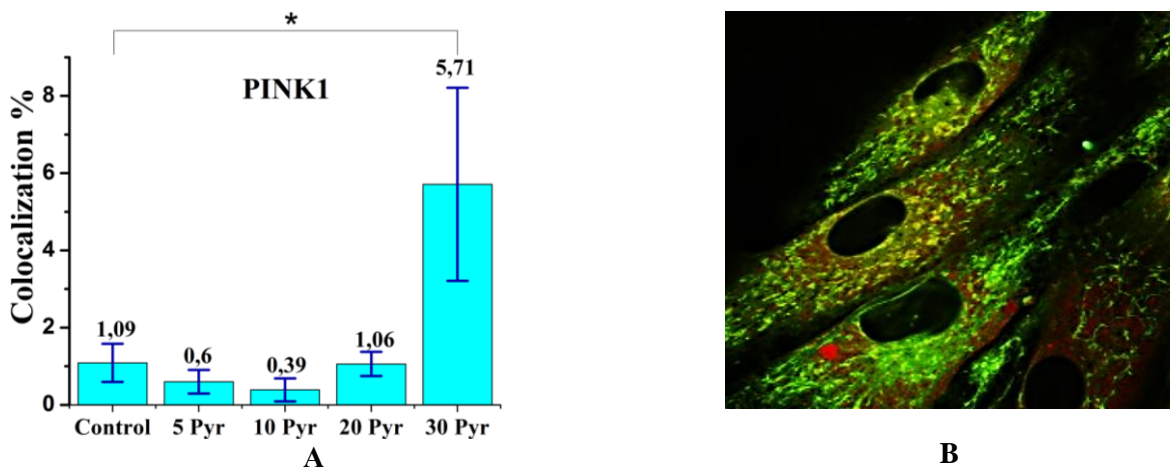


Figure 4. A. Percentage of colocalization after treatment with pyruvate in fibroblasts with PINK1 mutation. **B.** PINK1 fibroblasts treated with 20 mM pyruvate N=3, n=60, *p<0,05;

Surprisingly, the same tendency identified in trials with PINK1 and PINK1/PARK2 fibroblasts detected in experiments with A53T fibroblasts. It should be noted that the basal rate of mitophagy in these cells was much higher than in PINK1 or PINK1/PARK2-deficient fibroblasts (7.9% compared to 1.08% and 3.14%, respectively).

In fibroblasts with α -synuclein triplication, incubation of cells with sodium pyruvate significantly increased the percentage of mitochondria colocalizing with lysosomes starting from 5 mM. Although pyruvate induced a 2-3-fold increase in mitophagy in these fibroblasts, the percentage of colocalization rose only to 1.32%, compared to basal 0.36%.

Thus, incubation of control PD patient fibroblasts with millimolar concentrations of sodium pyruvate increased the level of mitophagy in these cells.

Lactate induced autophagy in control and fibroblasts with familial forms of PD. Autophagic flow measured by immunoblotting the lysosomal conversion of

the autophagosome marker LC3. Lactate (30 mM) caused an increase in the ratio LC3II/I, suggesting an increase in the number of autophagosomes, which peaked after 30-60 minutes, followed by a reduction, showing lysosomal destruction of the autophagosomes (Fig. 5).

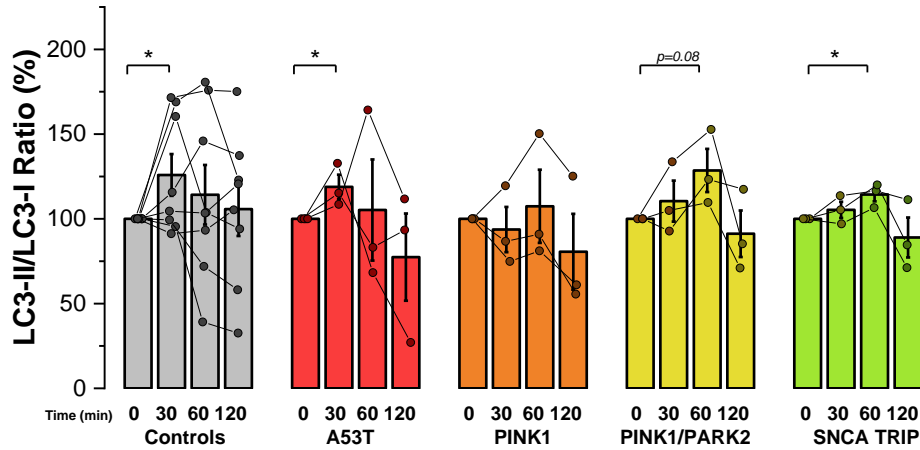


Figure 5. Changes in LC3-II/LC3-I ratio during the application of 30 mM Lactate. N=3; n=3, *p<0,005;

To confirm that the rise in LC3II/I was due to an increase in autophagic flow rather than a block, cells were treated with the V-ATPase inhibitor and lysosomal degradation inhibitor bafilomycin A1 (50 nM, 60min). In the presence of bafilomycin A1, the LC3II/I ratio increased significantly, demonstrating that lactate triggers the autophagic flux (Fig.6).

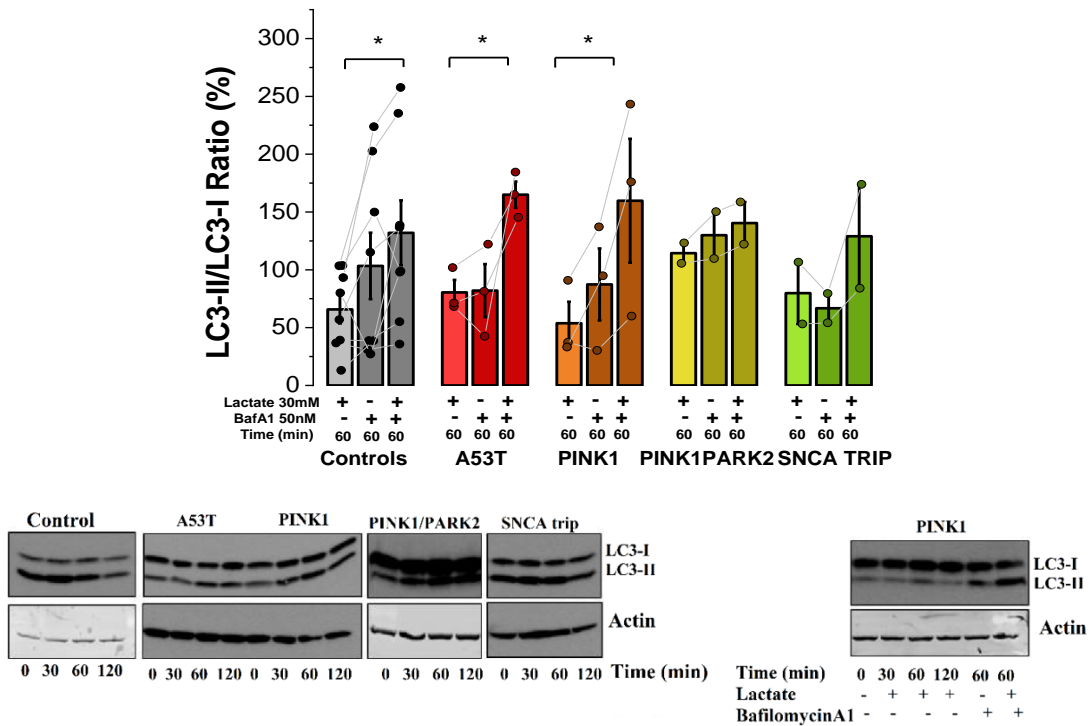


Figure 6. An increase in the LC3II/I ratio in cells, indicating activation of the autophagy process when 30 mM lactate is applied with bafilomycin A1.

Although no significant peak in LC3 levels was observed in PINK1 cells at the time points studied, a significant increase in the LC3II/I ratio clearly indicating autophagy activation in PINK1 mutated fibroblasts by 30 mM lactate occurred after co-treatment with bafilomycin A1, indicating that the peak may have occurred at a previous time point.

In healthy fibroblasts and fibroblasts with PD-related mutations, even a short exposure of 30 mM sodium lactate activates autophagy.

Lactate and pyruvate resulted in reduction of cell death in both healthy and fibroblasts with familial forms of Parkinson's disease. In control conditions, fibroblasts and cells with PD mutations had around 6% dead cells, with a larger proportion in A53T mutant cell lines (9.8%, N=7. Figure 7 A) and α -synuclein triplication (11.4%, N=9;). The number of dead fibroblasts in the control cultures is reduced after 24 hours of incubation with different doses of sodium lactate (to $3.3\pm 0.7\%$ at 20 mM; N=6; $p < 0.05$;). Incubation with lactate was protective only at higher doses – 20 mM and 30 mM – for cells with the PINK1 mutation (to $3.2\pm 0.2\%$ and $2.2\pm 0.3\%$ for 20mM and 30 mM; accordingly, N=6; $p < 0.05$;.) and only at concentration of 30 mM for PINK1/PARK2 mutation or fibroblasts with A53T mutation (Figure 7A). Incubation of fibroblasts with α -syn triplications in lactate lowered the number of dead cells over the whole concentration range – from 5 mM to 30 mM. Incubation of the patient's fibroblasts with millimolar concentrations of sodium lactate produced no toxic effects on the cells and was even protective at higher concentrations.

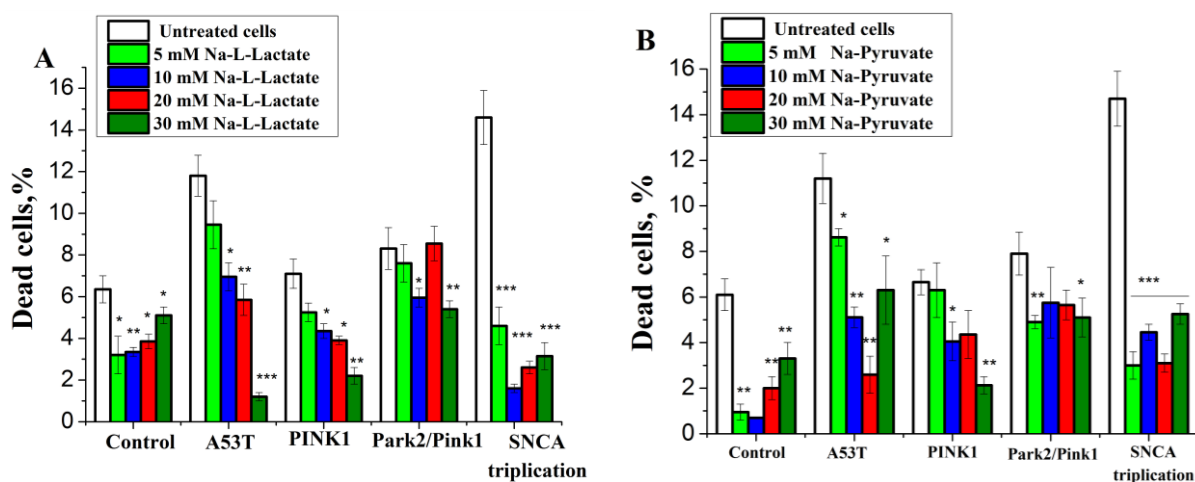


Fig. 7. Millimolar concentrations of sodium lactate and sodium pyruvate protect control and fibroblasts with familial PD against cell death. (A) Percentage of dead cells (labeled with PI) in control, and fibroblasts PINK1 mutation, PINK1/PARK2 mutations, A53T mutation and SNCA triplication after 24 h treatment with 5,10,20 or 30 mM sodium L-lactate. N=7; (B) Percentage of dead cells in cultures of human fibroblasts treated with 5, 10, 20, or 30-mM sodium pyruvate for 24 h. N=7. Values are represented as mean SD. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

Control cells, cells with the A53T mutation, and α -synuclein triplications were all protected after a 24-hour incubation with sodium pyruvate at doses ranging from 5 mM to 30 mM. (Figure 7B). Pyruvate, on the other hand, protected cells with the PINK1 mutation from concentrations as low as 10 mM and as high

as 30 mM (to 2.1 % dead cells; N=7; p<0.001;). Surprisingly, 24-hour incubation with PINK1/PARK2 mutant fibroblasts was protective only at lower doses (5-10 mM), but not at higher concentrations (20-30 mM). To conclude, sodium pyruvate protects against cell death both control fibroblasts and cells with Parkinson's disease mutations.

Crown ethers with ionophoretic properties dose-dependently increase Ca^{2+} transport across the fibroblast membranes. The regulation of mitochondrial quality includes several pathways of controlling the degradation of mitochondria or mitophagy, thereby ensuring their functional activity throughout the life of the cell. Many mechanisms are known to activate mitophagy. One of them is the concentration of Ca^{2+} . There are several major gaps in our knowledge of the involvement of Ca^{2+} in the neuronal degeneration found in Parkinson's disease. One of them is how genetic mutations linked to Parkinson's disease interact with Ca^{2+} -triggered processes in SNc DA neurons. Although DA neurons may have a key role, Ca^{2+} must be the leading candidate in rendering these mutations fatal. Filling these gaps might lead to new treatment approaches for avoiding or reducing the development of the disease, as well as techniques for “successful aging” in general. Specific ionophores like A23187 used to study the influence of Ca^{2+} ions on the rate of formation of protein aggregates, mitophagy, and autophagy abnormalities in inherited types of Parkinson's disease. We used crown ethers 4', 4'' (5'') - dibutyryl - dibenzo-18-crown-6 and 4', 4'' (5'') - dialeryl - dibenzo-18-crown-6, as an alternative for these specific ionophores. Crown ethers and their analogues, synthesized by Tashmukhamedova A.K. were used in the work.

Experiments carried out on fibroblast cells, and were found that both crown ethers in a dose-dependent manner increase the cytoplasmic concentration of Ca^{2+} by increasing Ca^{2+} transport across the membrane (Fig. 8). It should be noted that the effect of the crown ether 4', 4'' (5'') - dibutyryl - dibenzo-18-crown-6 was stronger (Fig.8).

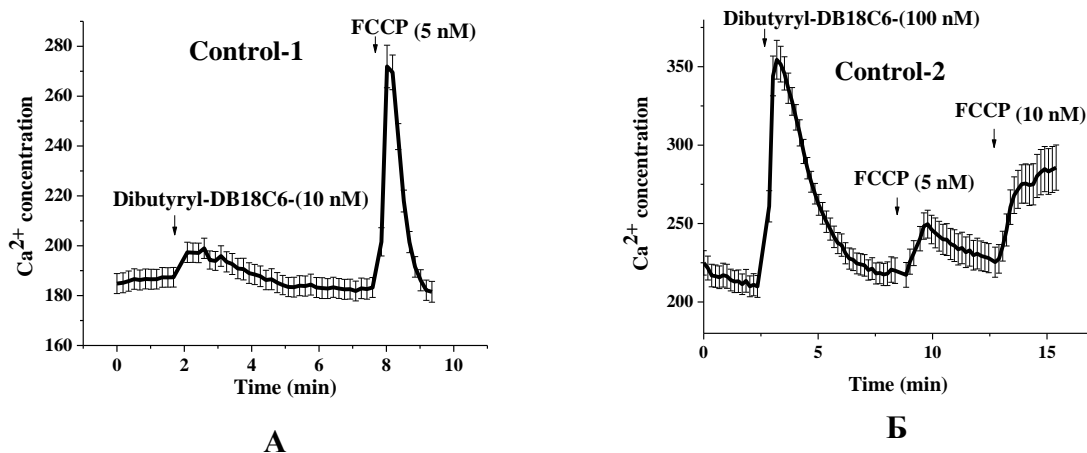


Figure 8. The effect of 4',4''(5'')-dibutyryl-dibenzo-18-crown-6 on the Ca^{2+} concentration in fibroblasts. **A.** The effect of 10 nM concentration on the $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ in control-1 cells. **Б.** The effect of 100 nM concentration on the $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ in control-1 cells. n=3.

Ca^{2+} mediated cellular stress has long been known to have a role in neurodegeneration, but it's typically thought of as a late-stage result of organelle damage caused by another stimulus.

The particular reliance of SNc DA neurons on voltage-dependent L-type Ca^{2+} channels in autonomous pacemaking implies that mitochondrial stress caused by persistent Ca^{2+} entry, rather than just a late stage consequence, may be responsible for their selective susceptibility. This idea is in line with the importance of mitochondria in current PD etiology models. This baseline stress might readily synergize with genetic alterations and environmental obstacles, hastening cellular aging and death. The idea that Ca^{2+} entry during pacemaking affects mitochondrial function is intriguing and consistent with localized impairments reported in normal aging and PD. The crown ethers that we investigated can be used as an alternative tools required carrying out this tests.

Intracellular pH regulation is a complicated mechanism that involves several enzymes, organelles, and, most importantly, cell metabolism (Brookes N.1997, Chesler M.2003). Lactate, for example, is assumed to play an important role in brain energy consumption as well as interactions between neurons and astrocytes (Tang F. et al. 2014, Magistretti PJ & Allaman I., 2018). Lactate concentrations can also rise quickly during exercise (Broskey NT et al. 2020), and lactate receptors can induce angiogenesis and neurogenesis (Morland C et.al. 2017). Lactate and pyruvate are both processed within cells and have the ability to impact intracellular pH. In light of this, we studied the dose-dependent effects of lactate and pyruvate on PD patient's fibroblasts intracellular. We also studied how changes in cytosolic pH may activate mitophagy and cell survival.

We discovered that pyruvate and lactate, two metabolites important in brain energy metabolism, might produce cytosol acidification in a concentration-dependent way. Notably, these pH changes may occur in cells with a wide range of genetic origins. The effects of 30 mM lactate or pyruvate on intracellular pH of cells were comparable to those of brain ischemia, in which $[\text{pH}]_{\text{cyt}}$ drops to 6.5 or lower (Rehncrona S.et.al. 1985). Changes in $[\text{pH}]_{\text{cyt}}$ regulate variety of cellular functions. Short-term cytosol acidification has been shown to diminish neuronal activity in neurons (Sinning A & Hubner C.A.2013), and low pH has been shown to inhibit cell proliferation in fibroblasts (Paris S & Pouyssegur J. 1984). Despite the fact that low pH has been shown to cause apoptosis (Schwartz L et al. 2020), profound acidification (which was restored in our experiments in minutes) showed only a positive cell-protective effect on control fibroblasts and cells with the genetic variant of Parkinson's disease in our experiment (Fig. 7). However, based on the mitochondrial dysfunction in cells with these mutations (Gandhi S. et al. 2009, Abramov AY et al. 2011), the effects of pyruvate and lactate on bioenergetics cannot be ruled out (Gandhi S et.al. 2012). Lactate can also induce

fibroblasts to switch from oxidative phosphorylation to glycolysis, which may affect fibroblast quality control (Kozlov AM et.al. 2020).

Parkinson's disease-related mutations induce neurodegeneration in specific brain regions, whereas the rate of energy consumption and redox balance of neurons and astrocytes in different brain areas vary, which may impact mitophagy (Cheng X.P. et al. 2021, Vinokurov A.Y.et.al. 2021). PD patients' fibroblasts, on the other hand, have been shown to be relevant models for studying the effects of PD mutations on mitochondrial metabolism with results comparable to neuronal (Abramov A.Y. et al. 2011), and despite some limitations, we can assess the effect of lactate and pyruvate on mitophagy and autophagy on cells with PD mutations using fibroblasts. Previously, it was shown that acidifying the cytosol with FCCP and nigericin induced mitophagy and autophagy, both PINK1-dependent and PINK1-independent (Berezhnov A.V.et.al. 2016). It should be noted that variations in $[pH]_{\text{cyt}}$ in response to millimolar sodium lactate and sodium pyruvate concentrations were equal to the mitophagy and autophagy-inducing effects of 10 μM FCCP and 1–3 μM nigericin. Cell death, however, was not caused by a decrease in $[pH]_{\text{cyt}}$ in response to lactate or pyruvate, as was observed using these ionophores.

Mitophagy induced by PINK1 and Parkin denotes a decrease of mitochondrial membrane potential (Narendra D.P.et.al.2011). Because lactate and pyruvate are largely used to restore mitochondrial membrane potential (Abramov et al. 2019, Erdelyi P. 2011), their effect on mitophagy and autophagy is independent of mitochondrial membrane potential and is mediated by intracellular acidification. Lactate and pyruvate successfully stimulated mitophagy and autophagy in cells without PINK1 or PINK1/PARK2 activity, demonstrating the presence of a PINK1/Parkin-independent mitophagy pathway activated by millimolar concentrations of these metabolites. However, we cannot rule out the involvement of PINK1-Parkin dependent pathways in cells with other types of mutations.

Lactate levels in the blood and intracellular acidification can be caused by a variety of factors, including calorie restriction and, most importantly, physical exercises (Dutta D.2014, Volianitis S.et.al. 2018, Vainshtein A, et.al. 2015). We hypothesize that raising lactate levels during physical exercise in Parkinson's disease patients may serve as a trigger for mitophagy and autophagy activation, hence causing neuroprotection.

CONCLUSIONS

1. Lactate and pyruvate effectively and dose-dependently reduced cytosolic pH in control cells and in cells with mutations in A53T (SNCA), PINK1, PINK1/PARK2 and SNCA triplication.

2. 20-30 mM of lactate and pyruvate increased the level of mitophagy in control cells and in cells with PD mutations. The effect of lactate and pyruvate was not dependent on the initial level of mitophagy in these cells.

3. Application of 30 mM lactate increased the LC3II/I ratio – to 150% \pm 5.6%, indicating activation of autophagic flux in healthy fibroblasts and fibroblasts with mutations in A53T (SNCA), PINK1, PINK1/PARK2 and SNCA triplication.

4. The long-term (24-hour) incubation with lactate or pyruvate reduced the level of cell death in control cells - from 6.4% to 1%, in A53T cells - from 9.8% to 1.2%, in PINK1 cells - from 6% up to 2.2%, in PINK1/PARK2 cells - from 7.1% to 5.4, in cells with SNCA triplication - from 11.4% to 1.6%.

5. Application of 10 nM and 100 nM of 4', 4''(5'') -dibutyryl-dibenzo-18-crown-6 and 4', 4'' (5'') -divaleryl-dibenzo-18-crown-6 increased the level of cytosolic Ca^{2+} in healthy fibroblasts;

6. Our results indicate the existence of negative feedback between malfunctioning of mitochondria and concomitant increased level of lactate during Parkinson's disease, and the ability of this lactate to reduce the level of damaged mitochondria in the cell.

**НАУЧНЫЙ СОВЕТ DSc.03/30.12.2019.B.01.13 ПО ПРИСУЖДЕНИЮ
УЧЕНЫХ СТЕПЕНЕЙ ПРИ ИНСТИТУТЕ БИОФИЗИКИ И
БИОХИМИИ ПРИ НАЦИОНАЛЬНОМ УНИВЕРСИТЕТЕ
УЗБЕКИСТАНА**

НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ УЗБЕКИСТАНА

КОМИЛОВА НАФИСА РАЖАБОВНА

**АКТИВАЦИЯ ПРОЦЕССОВ МИТОФАГИИ И АУТОФАГИИ ПРИ
НАСЛЕДСТВЕННЫХ ФОРМАХ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА, КАК
ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ СТРАТЕГИЯ ЗАЩИТЫ КЛЕТОК.**

03.00.02-Биофизика и радиобиология

**АВТОРЕФЕРАТ ДИССЕРТАЦИИ ДОКТОРА ФИЛОСОФИИ (PhD)
ПО БИОЛОГИЧЕСКИМ НАУКАМ**

Ташкент-2022

Тема диссертации доктора философии (PhD) зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан под номером B2021.3.PhD/B624

Диссертационная работа выполнена в Национальном Университете Узбекистана.

Автореферат диссертации на трех языках (узбекский, английский, русский (резюме)) размещен на веб-странице Научного совета (www.biochem.uz) и на Информационно-образовательном портале «Ziyonet» (www.ziyonet.uz).

Научный руководитель: Мирходжаев Улугбек Закирович
доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: Мерзляк Пётр Григорьевич
доктор биологических наук

Баев Артём Юрьевич
доктор философии по биологическим наукам (PhD)

Ведущая организация: Ташкентский педиатрический медицинский институт

Защита диссертации состоится «13» апреля 2022 г. в 14:00 часов на заседании Научного совета DSc.03/30.12.2019.B.01.13 по присуждению ученых степеней при Институте биофизики и биохимии Национального университета Узбекистана (Адрес: 100174, г.Ташкент, Алмазарский район, Студенческий городок, ул. Университетская, 174. Тел. 246-68-96.).

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Института биофизики и биохимии Национального университета Узбекистана (регистрационный номер № 13). Адрес: 100174, г. Ташкент, Алмазарский район, Студенческий городок, ул. Университетская, 174. Тел: (99871) 246-68-96. e-mail: ibb-nuu@mail.ru; tamurjon2281@mail.ru.

Автореферат диссертации разослан «24» марта 2022 года
(реестр протокола рассылки № «1» от 24 марта 2022).



Сабиров Равшан Заирович

Председатель Научного совета
по присуждению ученых степеней, д.б.н., академик

Позилев Маъмуржон Комилжонович

Ученый секретарь Научного совета
по присуждению ученых степеней, д.б.н.

Ахмеджанов Искандар Гулямович

Председатель Научного семинара при Научном совете
по присуждению ученых степеней, д.б.н., профессор

ВВЕДЕНИЕ (Аннотация диссертации доктора философии (PhD))

Целью исследования является исследование влияния лактата и пирувата на процессы митофагии и аутофагии при наследственных формах болезни Паркинсона.

Объектом исследования данной работы являются фибробласты стабильно экспрессирующие мутации в генах A53T (SNCA), PINK1, PINK1/PARK2, SNCA трипликация и PGK 1 типа выделенные из больных с болезнью Паркинсона и здоровые клетки контроля.

Научная новизна диссертационного исследования состоит в следующем:

доказано влияние лактата и пирувата в концентрационной зависимости на внутриклеточный pH при наследственных формах болезни Паркинсона.

показано что лактат или пируват в более высоких концентрациях активируют митофагию и аутофагию в изученных клеточных линиях.

доказано что лактат или пируват уменьшают клеточную смерть фибробластов с мутациями болезни Паркинсона.

показано что 4'4''(5'')-дибутирил–дибензо-18-краун-6 и 4'4''(5'')-дивалерил–дибензо-18-краун-6 дозозависимо увеличивают Ca^{2+} проницаемость плазматических мембран фибробластов.

Внедрение результатов исследования. На основании полученных научных результатов по активацию процессов митофагии и аутофагии при наследственных формах болезни Паркинсона:

результаты исследования были использованы в проекте №821522 «Количественный подход к характеристике митохондриальной дисфункции при болезни Паркинсона» для PD-MitoQUANT в IMI2 JU. Применение научных результатов позволило определить роль аутофагии в лечении болезни Паркинсона (справка Института Нейрологии от 23 сентября 2021 года). Применение научных результатов позволило интерпретировать пути активации митофагии и процессов аутофагии с помощью лактата или пирувата;

значимые результаты, полученные при изучении роли активации митофагии и аутофагии в клеточных линиях, полученных от больных наследственными формами болезни Паркинсона, были использованы в проекте №22-24-01043 «Регуляция динамики митохондриальной сети при болезни Паркинсона» и помогли правильно интерпретировать данные научного проекта (Института биофизики клетки РАН, справка от 19 января 2022 г.). Полученные результаты по активации митофагии и аутофагии под влиянием таких метаболитов, как лактат и пируват, дополнили данные о

протекторной роли умеренной активации митофагии при болезни Паркинсона. Полученные научные результаты позволили раскрыть механизмы процессов митофагии и аутофагии при нейродегенеративных заболеваниях;

результаты оценки способности лактата и пирувата активировать митофагию и аутофагию при наследственных формах болезни Паркинсона использованы в научно-практическом проекте № ПЗ-20170928599 «Разработка технологий выращивания водорослей в условиях Узбекистана и получения биологически активных веществ на их основе» (Справка АН РУз от 25 января 2022 г. № 4/1255-174). Применение результатов метаболически индуцированной митофагии и активации аутофагии было использовано для оценки биологических эффектов антиоксидантов, полученных из водоросли *Dunaliella salina* AR-1.

Структура и объем диссертации. Структура диссертации состоит из введения, четырех глав, заключения, списка использованной литературы. Объем диссертации составляет 116 страниц.

ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙХАТИ
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ
LIST OF PUBLISHED WORKS

I бўлим (I часть; Part I)

1. Mirkhodjaev U.Z., Yarishkin O.V., Sharafutdinova U.T., Toyirov U.B., Atamuratova (Komilova) N.R., Tashmukhamedova A.K., Tashmukhamedov B.A. Differentiation of membrane active crown ethers on the multilamellar layers // Bulletin of National University of Uzbekistan: Mathematics and Natural Sciences. – 2020. – V.3, № 3. – P. 344-360.

2. Mirkhodjaev U.Z., Yarishkin O.V., Sharafutdinova U.T., Toyirov U.B., Atamuratova (Komilova) N.R., Tashmukhamedova A.K., Tashmukhamedov B.A. Thermodynamics of complexation and membrane activity of crown ethers // Bulletin of National University of Uzbekistan: Mathematics and Natural Sciences. – 2020. – V.3, № 3. – P. 361-374.

3. Komilova N. R., Angelova P.R., Berezhnov A.V., Stelmashchuk O.A., Mirkhodjaev U.Z., Houlden H., Gourine A.V., Esteras N., Abramov A.Y. Metabolically induced intracellular pH changes activate mitophagy, autophagy, and cell protection in familial forms of Parkinson's disease // FEBS Journal. – 2021. – V.289, № 3. – P.699-711.

4. Komilova N.R., Angelova P.R., Abramov A.Y., Mirkhodjaev U.Z. Induction of mitophagy and autophagy through the changes of intracellular pH in the cells with PGK-1 mutation causing young onset parkinsonism. // Узбекский Биологический Журнал. – 2021. – V.4, № 3. – P. 23-29.

II бўлим (II часть; Part II)

5. Федотова Е.И., Комилова Н.Р., Надеев А.Д., Крицкая К.А., Абрамов А.Ю., Бережнов А.В. Закисление внутриклеточной среды активировывает митофагию и защищает клетки мозга в токсических и наследственных клеточных моделях болезни Паркинсона. // V Российский симпозиум с международным участием; «Клеточная сигнализация: итоги и перспективы» – Межд.конф. (Пушино 14-17 сентябрь, 2021 г.). – Россия, 2021 г.–С.122-123.

6. Komilova N.R., Angelova P.R., Abramov A.Y., Mirkhodjaev U.Z.. Application of lactate and pyruvate cause acidification of the intracellular environment and protects cellular models of Parkinson's disease with PGK- type 1 mutation // 14 th International Symposium on the chemistry of natural compounds. Acad. S.Yu.Yunusov Institute of the chemistry of Plant Substances AS RUz. (Tashkent, October 7-8. 2021.) – Tashkent, 2021.–P. 238.

7. Komilova N.R., Kuchkarova Z.Ya., Mirkhodjaev. U.Z. Neuroprotective effects of metabolic activated mitophagy for the patients with hereditary forms of Parkinson's disease. // Proceedings of the XI International Scientific Conference of young scientists, graduates, master and PhD students.–Intern.conf. (Minsk, December 2-3, 2021). Republic of Belarus, 2021.–P. 65.

Автореферат «Ўзбекистон Биология журналы» таҳририяида таҳрирдан ўтказилди