

УДК 577.29

# Индукция синтеза шаперонов в нейрональных клетках человека блокирует старение, вызванное окислительным стрессом

Е. А. Дутышева<sup>1</sup>, Л. С. Кузнецова<sup>1</sup>, И. А. Утепова<sup>2,3</sup>, Б. А. Маргулис<sup>1</sup>, И. В. Гужова<sup>1</sup>, В. Ф. Лазарев<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург Россия<sup>2</sup>Уральский Федеральный университет им. Первого президента России Б.Н. Ельцина, 620002, Екатеринбург Россия<sup>3</sup>Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, 620108, Екатеринбург Россия

\*E-mail: lazarev@incras.ru

Поступила в редакцию 08.10.2024

Принята к печати 19.11.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27531

**РЕФЕРАТ** Окислительный стресс сопровождается многими патологиями, характеризующиеся деградацией нейронов, приводя к более тяжелой форме течения этих заболеваний. Среди основных причин таких последствий – нарушение белкового гомеостаза и запуск необратимых процессов деградации клеточного цикла и клеточной физиологии, приводящих к старению. Нами предложен новый подход к борьбе со старением, вызванным окислительным стрессом, основанный на использовании низкомолекулярного индуктора синтеза шаперонов – одной из защитных систем клетки, регулирующей протеостаз и апоптоз. Представлены данные, демонстрирующие способность производного пирролилазина – RQ-29 – индуцировать накопление шаперонов в нейрональных клетках человека и предотвращать развитие старения, вызванного окислительным стрессом.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** окислительный стресс, сенесценция, шапероны, пирролилазины, апоптоз, нейропротекция.

## ВВЕДЕНИЕ

Окислительный стресс сопровождается подавляющее большинство патологий, характеризующихся деградацией нейронов, включая нейродегенеративные заболевания, черепно-мозговые травмы, инсульты и т.д. При этом, с одной стороны, появление активных форм кислорода (АФК) в нейрональных клетках вызывает повреждение белков, липидов и ДНК и, соответственно, провоцирует процессы клеточного старения, что в свою очередь повышает риск развития других сопутствующих заболеваний.

Основным источником и мишенью АФК в клетке являются митохондрии. АФК могут вызывать коллапс мембранного потенциала митохондрий, разрушение ультраструктуры митохондрий и истощение АТФ [1]. Повреждение митохондрий способно приводить к некрозу или апоптозу. Кроме того, окислительный стресс и митохондриальная дисфункция могут активировать пути p53/p21 и Rb/p16 [2]. Оба эти пути увеличивают экспрессию и активность β-галактозидазы, связанной со старением. Таким образом, борьба с повреждающими клетку послед-

ствиями окислительного стресса является важной частью терапии большинства нейродегенеративных процессов.

Один из важных факторов защиты нервных клеток – наличие белков теплового шока (HSP, шапероны). Эти белки играют значимую роль в предотвращении различных путей гибели клеток, они необходимы для таргетирования и разрушения поврежденных белков внутри клетки. Например, шаперон Hsp70 может предотвращать образование апоптосом, взаимодействовать с индуцирующим апоптоз фактором AIF и проапоптотическим белком Vim, а также препятствует активации каспаз-3 и -7 [3–5].

Другой шаперон, белок Hsp90, также подавляет активацию сигнальных систем клеточной смерти. Установлено, что Hsp90 препятствует образованию апоптосом, прикрепляясь к Araf-1, тем самым предотвращая его олигомеризацию и привлечение каспазы-9, необходимой для образования апоптосом [6]. Важно отметить, что как Hsp70, так и Hsp90 связывают денатурированные, неправильно свернутые белки, в том числе вследствие чрезмерного окис-

ления, и предотвращают их предрасположенность к образованию олигомеров и агрегатов [7].

Другие важные белки, необходимые для правильной работы шаперонной машины, – это кошапероны – полипептиды, содержащие j-домен, в частности Hsp40. Кошаперонные белки регулируют образование комплексов между Hsp70 и клиентскими белками, таким образом участвуя в распознавании и деградации денатурированных и окисленных белков [8].

В этом контексте интересен потенциал использования химических соединений для стимуляции белков теплового шока в качестве средства защиты нервной системы. Соединения, способные вызывать накопление шаперонов в клетках, продемонстрировали свою эффективность в моделях болезни Паркинсона [9] и Альцгеймера [10], вторичного повреждения после черепно-мозговой травмы [11] и многих других [12]. Ранее мы обнаружили, что некоторые соединения, относящиеся к классу пирролазинов, способны активировать синтез и накопление шаперонов, что приводило к терапевтическому эффекту в модели болезни Альцгеймера *in vitro* [13]. Одним из наиболее эффективных соединений является 3-(5-фенил-1H-пиррол-2-ил)хиноксалин-2(1H)-он (PQ-29). В данной работе мы изучили способность этого соединения предотвращать развитие старения, вызванного окислительным стрессом в нейрональных клетках человека.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Нейрональные клетки

Для подтверждения шаперон-индуцирующих и нейротекторных эффектов пирролазинов мы использовали мезенхимальные стволовые клетки, полученные из пульпы зуба человека (MSC-DP), как описано ранее [14]. Клетки MSC-DP получены из «Коллекции культур клеток позвоночных», поддержанной грантом Министерства образования и науки Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-683). Клетки культивировали в среде DMEM/F12 (Gibco, США) с добавлением 10% сыворотки плода крупного рогатого скота (FBS; Gibco, США), 100 ед./мл пенициллина и 0.1 мг/мл стрептомицина («БиолоТ», Россия) при температуре 37°C и 5% CO<sub>2</sub>.

Затем фенотип клеток изменяли на нейрональный (MSC-Neu), инкубируя в течение 5 дней в среде Neurobasal (BioinnLabs, Россия) с добавлением компонента Neuromax (PanEco, Россия), 3% сыворотки плода крупного рогатого скота, 100 ед./мл пенициллина и 0.1 мг/мл стрептомицина (PanEco). Нейрональный фенотип верифицировали, анализируя экспрессию панели маркеров зрелых нейронов

[15, 16], включая β3-тубулин, NeuN, MAP2, синаптофизин (Syn), PSD95 и NeuroD1, с использованием полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОТ-ПЦР).

### Выделение РНК и ПЦР в реальном времени

РНК выделяли с помощью ExtractRNA (АО «Евроген», Москва, Россия), а затем проводили обратную транскрипцию с помощью набора MMLVRT (АО «Евроген») в соответствии с инструкциями производителя. ОТ-ПЦР проводили с использованием системы детекции ПЦР в реальном времени CFX96 (BioRad, США) и qPCRMix-HSSYBR (АО «Евроген») в соответствии с протоколом производителя. Подлинность ампликонов подтверждали с помощью анализа кривой плавления. Последовательности праймеров представлены в *табл. 1*, все праймеры синтезированы в АО «Евроген». Параметры ПЦР были следующими: 5 мин предварительной денатурации при 95°C, затем 40 циклов по 30 с при 95°C, 30 с при 65°C и 30 с при 70°C. Данные анализировали на кратность изменения с использованием программного обеспечения BioRadCFX.

### Анализ старения

Активность β-галактозидазы в клетках MSC-DP или MSC-Neu оценивали с помощью набора β-Glo (Promega, Великобритания) в соответствии с инструкциями производителя. Затем измеряли сигнал люминесценции с помощью прибора VarioscanLux (ThermoFisherScientific, США).

Таблица 1. Праймеры, использованные в исследовании

Ген	Праймер, нуклеотидная последовательность
Актин	F – 5'-TCAATGTCCTCCAGCCATGTATGT-3'
	R – 5'-GTGACACCATCTCCAGAGTCC-3'
NeuN	F – 5'-CAAGGACGGTCCAGAAGGAG-3'
	R – 5'-GGTAGTGGGAGGTGAGGTCT-3'
MAP2	F – 5'-GGAGGGCGCTAAGTCCG-3'
	R – 5'-AAAATCTGGGCGCAGAAACTG-3'
NeuroD1	F – 5'-TCTTCCACGTTAAGCCTCCG-3'
	R – 5'-CCATCAAAGGAAGGGCTGGT-3'
β3-тубулин	F – 5'-CCATGAAGGAGGTGGACGAG-3'
	R – 5'-ACGTTGTTGGGGATCCAТC-3'
Syn	F – 5'-СТТCGCCATCTТОGССТТТG-3'
	R – 5'-ТCАCTCTCGGTCTTGTТGGC-3'
PSD95	F – 5'-GGATATGTGAACGGGACCGA-3'
	R – 5'-AAGCCCAGACCTGAGTTACC-3'
p16	F – 5'-АТАGТTACGGTСGGAGGCCG-3'
	R – 5'-CACGGGTСGGGTGAGAGTG-3'
p21	F – 5'-CTCAGAGGAGGCGCCATGT-3'
	R – 5'-CGCCATTAGCGCATCACAG-3'

### Электрофорез и вестерн-блот-анализ

Клетки MSC-Neu обрабатывали пероксидом водорода в концентрации 100 мкМ в течение 2 ч, а затем подвергали воздействию PQ-29 в концентрации 0,5, 2, 8 или 300 мкМ в течение 1 или 2 ч. После этого клетки лизировали, лизаты использовали для электрофореза и блотинга в соответствии с ранее описанным протоколом [17], результаты анализировали с помощью антител к Hsp40 (клон J32), Hsp70 (клон 3C5) [18], Hsp90 (ThermoFisherScientific, США) и тубулину (ThermoFisherScientific) в качестве контроля нагрузки. В качестве вторичных антител использовали конъюгированные с пероксидазой хрена козы антимышинные и козы антикроличьи антитела («Репертуар», Россия). Интенсивность полос рассчитывали в условных единицах (у. е.) с использованием программного обеспечения TotalLabQuant 1.0 (TotalLab, Gosforth, Великобритания), данные нормировали по средней интенсивности окрашивания тубулина.

### Анализ цитотоксичности

Цитотоксические эффекты PQ-29 оценивали, используя анализ активности дегидрогеназ по Моссману (МТТ), согласно [19].  $LC_{50}$  определяли на основе результатов эксперимента, в котором клетки MSC-Neu инкубировали с PQ-29 в концентрации от 0,05 до 1000 мкМ. После 48 ч инкубации проводили МТТ-тест. Каждый эксперимент проводили в четырех повторностях.

Для оценки развития процессов некроза и апоптоза клетки помещали в 96-луночный планшет и обрабатывали бромистым этидием и акридиновым оранжевым в фосфатно-солевом буфере (PBS) в концентрации 5 мг/мл для каждого красителя. Затем окрашенные клетки исследовали с помощью Zeiss Axioscope (Carl Zeiss, Германия).

### Статистический анализ

Рассчитывали среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение. Данные анализировали с использованием непараметрического теста Манна–Уитни с помощью программного обеспечения GraphPadPrism 8. Каждый эксперимент проводили минимум 3 раза. Величины  $p < 0,05$  считали статистически значимыми.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

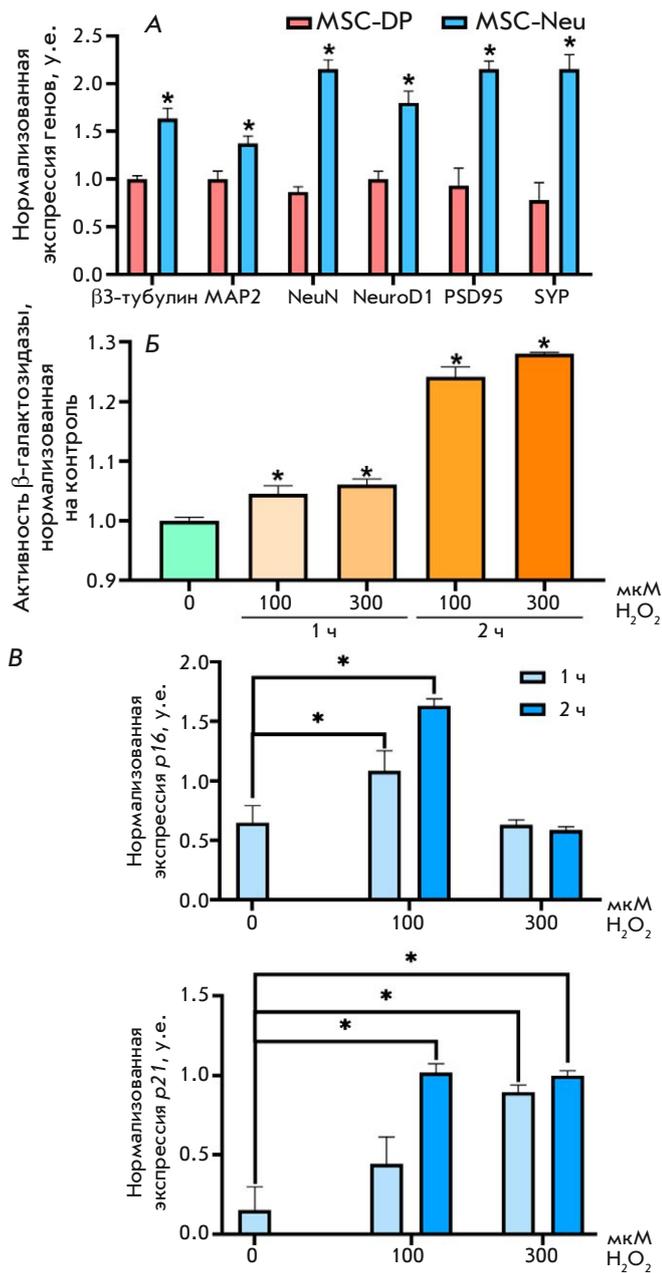
Первым этапом нашей работы стала проверка модели старения нейрональных клеток человека, индуцированного окислительным стрессом. С этой целью использовали мезенхимальные стволовые клетки человека из пульпы зуба MSC-DP, перепрограммированные в нейрональный фенотип – MSC-Neu.

Для проверки приобретения нейронального фенотипа MSC-Neu после процедуры дифференцировки мы анализировали с помощью ОТ-ПЦР маркеры нейронального фенотипа –  $\beta$ 3-тубулин, MAP2, синаптофизин, NeuroD1, PSD95 и NeuN. По данным ОТ-ПЦР количество мРНК исследуемых генов существенно возросло после дифференцировки. Так, экспрессия маркеров зрелых нейронов (а именно, синаптофизина, NeuroD1, PSD95, NeuN) увеличилась примерно в 3 раза (рис. 1А). Экспрессия более ранних нейрональных маркеров ( $\beta$ 3-тубулин, MAP2) также увеличилась, но не так значительно – примерно в 1,4–1,5 раза.

Далее мы проверили способность пероксида водорода вызывать старение в нейрональных клетках человека. Для этого клетки MSC-Neu культивировали в присутствии 100 или 300 мкМ пероксида водорода в течение 1 или 2 ч. Затем в клетках определяли активность известного маркера старения, фермента  $\beta$ -галактозидазы с помощью набора  $\beta$ -Glo (рис. 1Б). Обнаружено, что культивирование клеток MSC-Neu в присутствии пероксида водорода в течение 1 ч приводило к увеличению активности  $\beta$ -галактозидазы на 4,4 и 6,2% при использовании 100 и 300 мкМ пероксида водорода соответственно. Культивирование клеток MSC-Neu в присутствии 100 и 300 мкМ пероксида водорода в течение 2 ч привело к увеличению активности  $\beta$ -галактозидазы на 24,2 и 28,1% соответственно.

Для подтверждения релевантности изменения активности  $\beta$ -галактозидазы оценивали изменения в экспрессии генов белков p16 и p21, которые играют важную роль в двух ключевых каскадах, инициирующих старение. Используя метод ОТ-ПЦР, обнаружили, что инкубация клеток в присутствии 100 мкМ пероксида водорода в течение 1 ч привела к увеличению количества мРНК p16 и p21 в 1,68 и 2,93 раза соответственно, а в течение 2 ч – в 2,55 и 6,78 раза соответственно (рис. 1В). Использование более высоких концентраций пероксида водорода не вызвало увеличения количества мРНК p16 или p21, по-видимому, из-за высокой токсичности. В дальнейших экспериментах по моделированию старения, вызванного окислительным стрессом, мы культивировали MSC-Neu в присутствии 100 мкМ пероксида водорода в течение 2 ч.

Следующим этапом нашей работы стало изучение способности соединения PQ-29 (структурная формула представлена на рис. 2А) вызывать активацию синтеза и накопление шаперонов в нейрональных клетках, состарившихся в условиях окислительного стресса. Ранее мы установили способность PQ-29 индуцировать синтез шаперонов в нейрональных клетках, однако необходимо было убедиться,

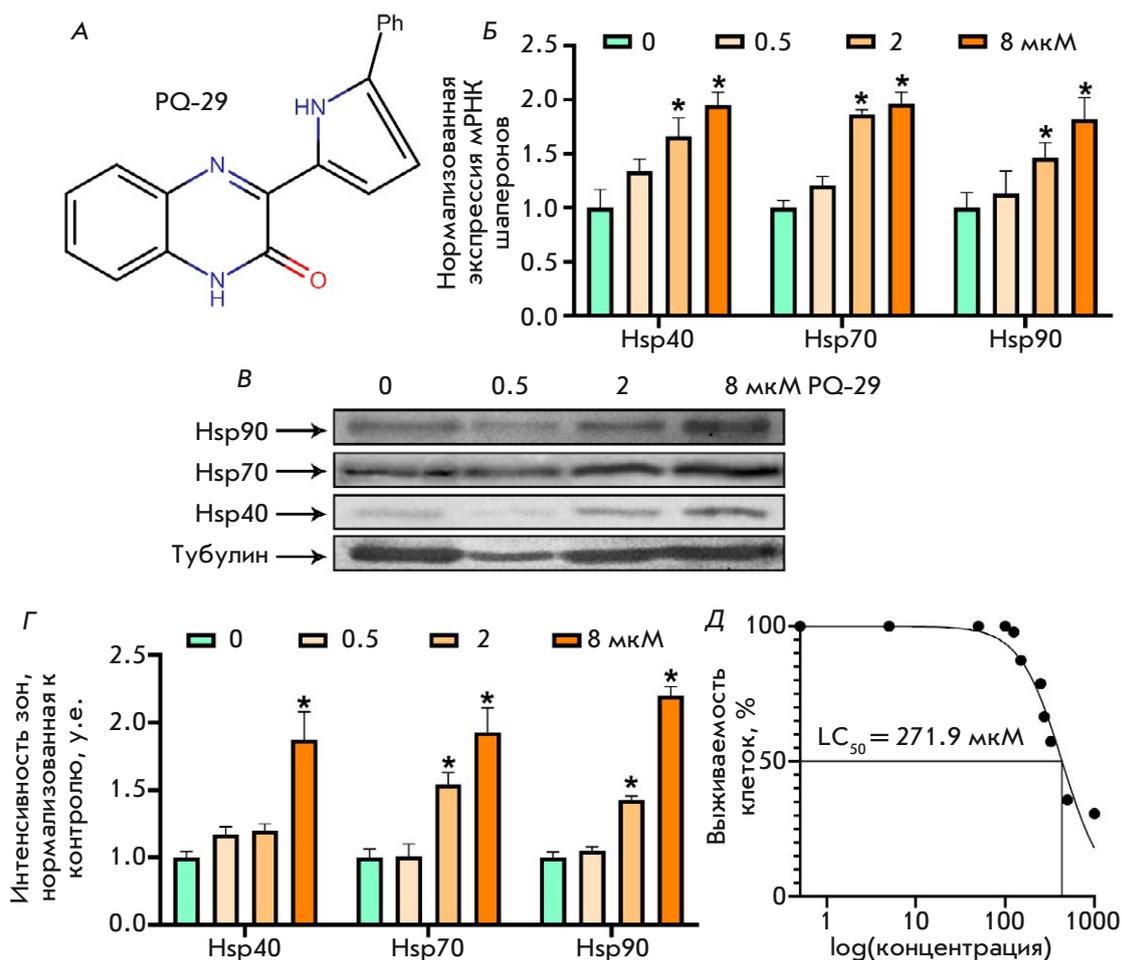


**Рис. 1.** Пероксид водорода вызывает старение в перепрограммированных человеческих нейронах MSC-Neu. А – анализ экспрессии нейрональных маркеров в клетках MSC-DP (до дифференцировки) и MSC-Neu (после дифференцировки). В качестве контроля использовали мРНК актина. Б – инкубация клеток MSC-Neu в течение 1 и 2 ч в присутствии пероксида водорода в концентрации 100 и 300 мкМ вызывает увеличение активности β-галактозидазы. В – инкубация клеток MSC-Neu в течение 1 и 2 ч в присутствии пероксида водорода в концентрации 100 и 300 мкМ вызывает увеличение уровней мРНК p16 (верхняя панель) и p21 (нижняя панель). Представлены средние значения ± стандартное отклонение из трех отдельных экспериментов, а наблюдаемые различия статистически значимы при \**p* < 0.05 (тест Манна–Уитни)

что PQ-29 может влиять и на стареющие клетки. Мы использовали метод ОТ-ПЦР для оценки количества мРНК шаперонов в клетках MSC-Neu, состарившихся в условиях окислительного стресса, после их культивирования в присутствии PQ-29 в течение 6 ч. Обнаружено, что экспрессия основных индуцибельных шаперонов, т.е. Hsp40, Hsp70 и Hsp90, увеличивалась после обработки клеток PQ-29, состарившихся в условиях окислительного стресса. Так, использование 8 мкМ PQ-29 вызвало увеличение количества мРНК Hsp40 в 1.95 раза, Hsp70 в 1.97 раза и Hsp90 в 1.82 раза (рис. 2Б). Далее с помощью вестерн-блоттинга оценили количество шаперонов в клетках MSC-Neu после их культивирования в присутствии PQ-29 в течение 24 ч. Показано, что использование 8 мкМ PQ-29 привело к увеличению количества Hsp40 в 1.87 раза, Hsp70 в 1.93 раза и Hsp90 в 2.2 раза (рис. 2В,Г).

Ранее мы установили, что PQ-29 обладает низкой цитотоксичностью [13], но нам нужно было убедиться, что его цитотоксичность не увеличится при воздействии на клетки, состаренные окислительным стрессом. Для этого с помощью метода МТТ определили величину LC<sub>50</sub> PQ-29 для клеток MSC-Neu, состаренных под воздействием окислительного стресса (рис. 2Д). Обнаружено, что величина LC<sub>50</sub> в таких условиях равна 271.9 мкМ. Таким образом, PQ-29 в использованных концентрациях не оказывал существенного цитотоксического эффекта на состаренные клетки.

На заключительном этапе работы изучали способность PQ-29 предотвращать старение и деградацию нейронов, вызванные окислительным стрессом. Стареющие под действием окислительного стресса клетки MSC-Neu культивировали с PQ-29 в различных концентрациях, а затем оценивали активность β-галактозидазы (с помощью набора β-Glo) и жизнеспособность клеток (окрашивание акридиновым оранжевым). Обнаружено, что PQ-29 в концентрации 2 и 8 мкМ предотвращал повышение активности β-галактозидазы, вызванное окислительным стрессом, на 9.4 и 24.3% соответственно (рис. 3А). Далее мы проанализировали уровень экспрессии генов белков p16 и p21 – известных маркеров старения – в стареющих клетках MSC-Neu в присутствии PQ-29. Оказалось, что PQ-29 в концентрации 8 мкМ предотвращал увеличение экспрессии p16, вызванное окислительным стрессом, на 78.3% (рис. 3Б, левая панель). Одновременно PQ-29 в концентрациях 2 и 8 мкМ предотвращал увеличение экспрессии p21 на 54.7 и 47.8% (рис. 3Б, правая панель). Наконец, с помощью окрашивания акридиновым оранжевым мы определили долю клеток, состарившихся из-за окислительного стресса, которые перешли в апоп-

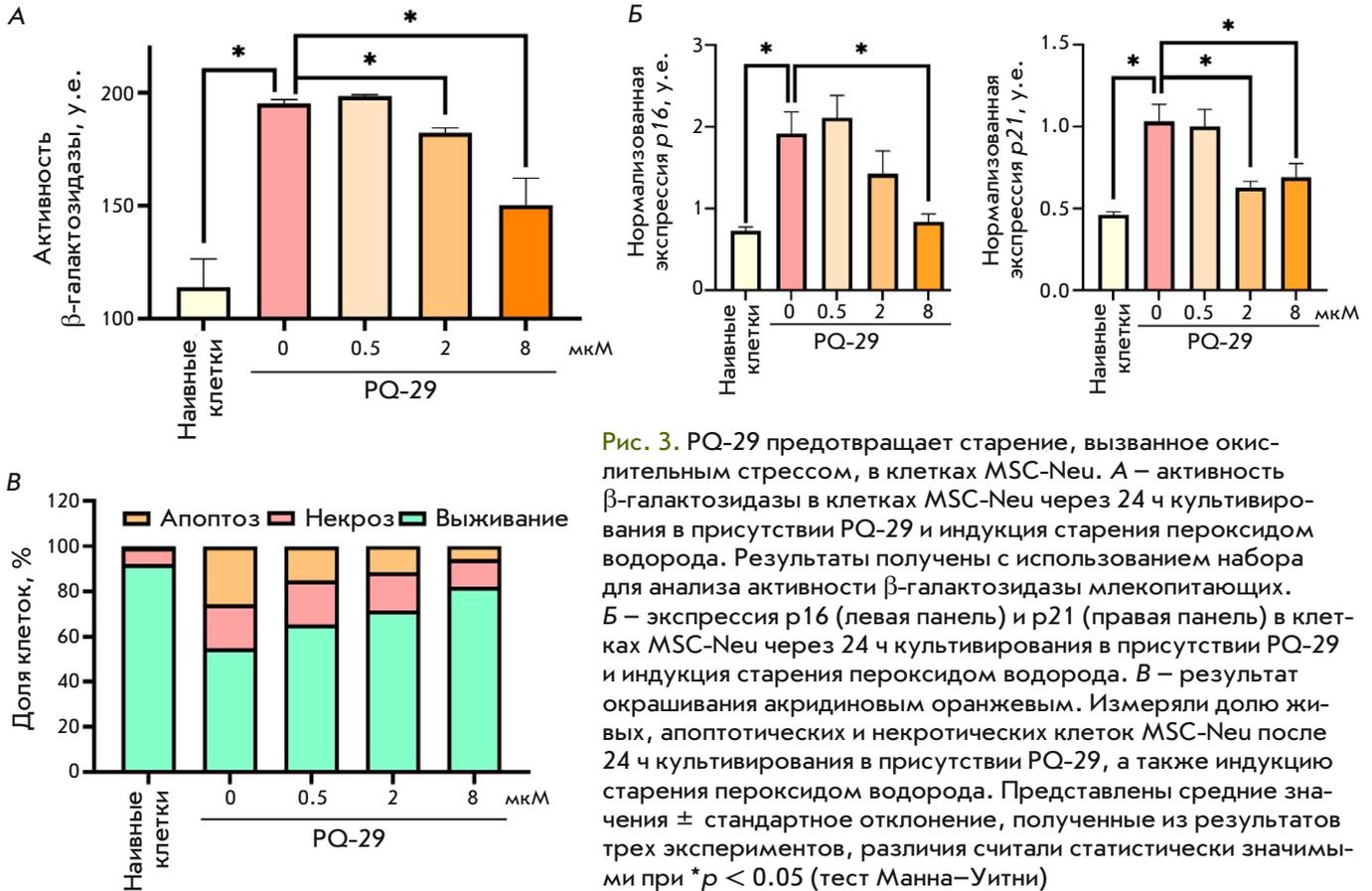


**Рис. 2.** PQ-29 увеличивает количество шаперонов в MSC-Neu при окислительном стрессе в нетоксичных дозировках. **А** – структурная формула PQ-29. **Б** – экспрессия шаперонов в клетках MSC-Neu после инкубации с PQ-29 в течение 6 ч. **В** – вестерн-блот-анализ содержания Hsp90, Hsp70 и Hsp40 в лизатах клеток MSC-Neu, инкубированных с PQ-29 в указанных концентрациях в течение 24 ч. В качестве контроля нагрузки использовали тубулин. Представлены репрезентативные изображения. **Г** – соотношение интенсивностей полос Hsp90, Hsp70 и Hsp40 и тубулина, нормализованные по отношению к контрольным клеткам. **Д** – определение LC<sub>50</sub> для PQ-29 при воздействии на культуру клеток MSC-Neu в условиях окислительного стресса. Приведены средние значения ± стандартное отклонение, вычисленные по результатам трех экспериментов, наблюдаемые различия статистически значимы при \**p* < 0.05 (тест Манна–Уитни)

тоз или некроз, и прояснили способность PQ-29 предотвращать гибель клеток. Показано, что PQ-29 в концентрации 2 и 8 мкМ предотвращал развитие как некроза, так и апоптоза нейрональных клеток. При этом доля некротических клеток снизилась с 19.6 до 17.1 и 12.2% (при использовании PQ-29 в концентрациях 2 и 8 мкМ соответственно), а доля апоптотических клеток – с 25.6 до 11.4 и 5.8% (при использовании 2 и 8 мкМ PQ-29 соответственно). Таким образом, применение PQ-29 в концентрации 2 и 8 мкМ приводило к увеличению доли наивных клеток с 54.7 до 71.5 и 82% соответственно (рис. 3В). Эти данные свидетельствуют о том, что PQ-29 способен предотвращать клеточное старение, вызванное окислительным стрессом.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Хорошо известно, что окислительный стресс – один из распространенных молекулярных механизмов, отсутствие адекватного ответа антиоксидантных систем клеток на который приводит к развитию разных патологий. Отчасти это связано с неспособностью систем белкового гомеостаза справляться с возрастающим количеством поврежденных или мутантных белков [20]. Другим механизмом негативного влияния окислительного стресса является запуск необратимых процессов нарушения клеточного цикла и клеточной физиологии, приводящих к старению. Одним из способов защиты клеток, в том числе нейрональных, испытывающих окислительный стресс, помимо антиоксидантов является использование ин-



**Рис. 3.** PQ-29 предотвращает старение, вызванное окислительным стрессом, в клетках MSC-Neu. **А** – активность β-галактозидазы в клетках MSC-Neu через 24 ч культивирования в присутствии PQ-29 и индукция старения пероксидом водорода. Результаты получены с использованием набора для анализа активности β-галактозидазы млекопитающих. **Б** – экспрессия p16 (левая панель) и p21 (правая панель) в клетках MSC-Neu через 24 ч культивирования в присутствии PQ-29 и индукция старения пероксидом водорода. **В** – результат окрашивания акридиновым оранжевым. Измеряли долю живых, апоптотических и некротических клеток MSC-Neu после 24 ч культивирования в присутствии PQ-29, а также индукцию старения пероксидом водорода. Представлены средние значения ± стандартное отклонение, полученные из результатов трех экспериментов, различия считали статистически значимыми при \* $p < 0.05$  (тест Манна–Уитни)

дукторов синтеза шаперонов, способных повышать устойчивость нейронов к окислительному стрессу (рис. 4). Аналогичные работы проводились и ранее. Например, показано, что индуктор синтеза шаперонов U133 повышает устойчивость клеток глиобластомы крысы С6 к воздействию АФК [17]. Более того, активация синтеза шаперонов снижает протеотоксическую нагрузку на клетки, вызванную окислительным стрессом [21].

С другой стороны, помимо снижения вызванной окислительным стрессом «острой» токсичности – окисления белков и липидов и активации апоптоза – важным фактором, оказывающим влияние на функционирование нейронов, являются отсроченные негативные процессы, в том числе запуск механизмов старения. Известно, что шапероны предотвращают активацию старения через сигнальные пути p53/p21 и Rb/p16 [2], однако исследования, в которых показана эта регуляция, проведены на опухолевых клетках и не могут считаться в полной мере релевантными в контексте нейродегенеративных процессов. Более того, по мере прогрессирования патологий различного генеза, как правило, наблюдается снижение экспрессии шаперонов в нейрональных клетках; в частности, этот

феномен установлен при черепно-мозговой травме, инсульте и болезни Альцгеймера.

Индукторы синтеза шаперонов давно и успешно изучаются в качестве перспективных нейропротекторных препаратов, в настоящее время один из индукторов шаперонов – Аринокломол – проходит клинические испытания [22]. Однако данные о возможном влиянии индукторов на процесс старения отсутствуют. В данной работе соединение PQ-29 предложено в качестве агента, способного активировать синтез ключевых шаперонов Hsp70 и Hsp90, а также кошаперона Hsp40. Использование PQ-29 позволило не только остановить отсроченный цитотоксический эффект окислительного стресса, но и предотвратить инициацию старения нейрональных клеток под воздействием АФК. Отдельно отметим, что параметр  $LC_{50}$  для PQ-29 при воздействии на старые нейроны оказался ниже, чем при воздействии на нейроны, не подверженные окислительному стрессу: 271 против 494 мкМ [10]. Это свидетельствует о том, что устойчивость клеток, стареющих под действием окислительного стресса, снижается из-за воздействия химических агентов.

Ранее мы синтезировали некоторые соединения пирролилазина (в том числе PQ-29) и установили их способность индуцировать синтез белков теплового

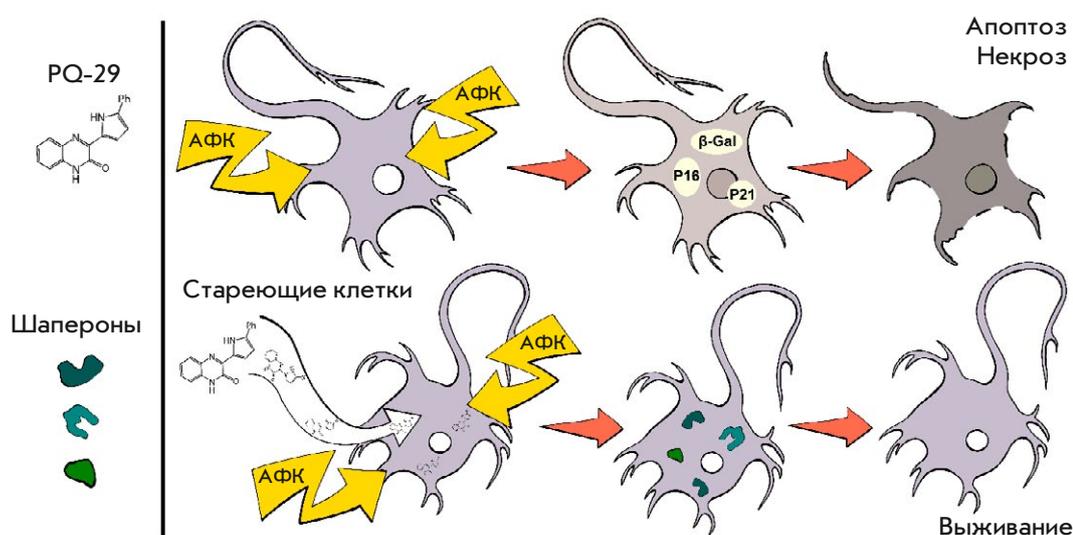


Рис. 4. Иллюстрация принципа действия низкомолекулярных индукторов синтеза шаперонов для защиты нейрональных клеток от окислительного стресса

шока и оказывать защитное действие на нейроны при болезни Альцгеймера или после черепно-мозговой травмы [11, 13, 23]. Кроме того, подтверждена способность производных пирролилазина индуцировать синтез шаперона Hsp70 как в молодых, так и в старых перепрограммированных нейронах человека MSCWJ-Neu. В представленном исследовании установлена способность производного пирролилазина PQ-29 предотвращать развитие старения, вызванного окислительным стрессом (рис. 4). В совокупности эти данные позволяют утверждать,

что подобные соединения обладают выраженной нейропротекторной активностью. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 23-74-10117 и проект № 22-13-00298 (синтез и очистка соединения PQ-29).*

*Авторы выражают благодарность А.М. Кольцовой за любезно предоставленные клетки MSC-DP, а также Т.В. Вонц за помощь с иллюстрациями.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hu Y., Shao Z., Cai X., Liu Y., Shen M., Yao Y., Yuan T., Wang W., Ding F., Xiong L. // *Spine (Phila. Pa. 1976)*. 2019. V. 44. P. 585–595.
- Zhang S., Liu W., Wang P., Hu B., Lv X., Chen S., Wang B., Shao Z. // *Mol. Cell. Biochem.* 2021. V. 476. P. 1979–1994.
- Guo Z., Song T., Wang Z., Lin D., Cao K., Liu P., Feng Y., Zhang X., Wang P., Yin F., et al. // *J. Biol. Chem.* 2020. V. 295. P. 12900–12909.
- Kroemer G. // *Sci. World J.* 2001. V. 1. P. 590.
- Komarova E.Y., Afanasyeva E.A., Bulatova M.M., Cheetham M.E., Margulis B.A., Guzhova I.V. // *Cell Stress Chaperones*. 2004. V. 9. P. 265–275.
- Pandey P., Saleh A., Nakazawa A., Kumar S., Srinivasula S.M., Kumar V., Weichselbaum R., Nalin C., Alnemri E.S., Kufe D., Kharbanda S. // *EMBO J.* 2000. V. 19. № 16. P. 4310–4322. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.16.4310>.
- Paul S., Mahanta S. // *Mol. Cell. Biochem.* 2014. V. 386. P. 45–61.
- Fan C.Y., Lee S., Cyr D.M. // *Cell Stress Chaperones*. 2003. V. 8. P. 309.
- Ekimova I.V., Plaksina D.V., Pastukhov Y.F., Lapshina K.V., Lazarev V.F., Mikhaylova E.R., Polonik S.G., Pani B., Margulis B.A., Guzhova I.V., et al. // *Exp. Neurol.* 2018. V. 306. P. 199–208.
- Zhao Y., Zhao H., Lobo N., Guo X., Gentleman S.M., Ma D. // *J. Alzheimers. Dis.* 2014. V. 41. P. 835–844.
- Dutyshcheva E.A., Mikeladze M.A., Trestsova M.A., Aksenov N.D., Utepova I.A., Mikhaylova E.R., Suezov R.V., Charushin V.N., Chupakhin O.N., Guzhova I.V., et al. // *Pharmaceutics*. 2020. V. 12. № 5. P. 414.
- Adachi H., Katsuno M., Waza M., Minamiyama M., Tanaka F., Sobue G. // *Int. J. Hyperthermia*. 2009. V. 25. № 8. P. 647–654.
- Dutyshcheva E.A., Utepova I.A., Trestsova M.A., Anisimov A.S., Charushin V.N., Chupakhin O.N., Margulis B.A., Guzhova I.V., Lazarev V.F. // *Eur. J. Med. Chem.* 2021. V. 222. P. 113577.
- Koltsova A.M., Zenin V.V., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Poljanskaya G.G. // *Tsitologiya*. 2018. V. 60. № 12. P. 955–968.
- Gingras M., Champigny M.F., Berthod F. // *J. Cell. Physiol.* 2007. V. 210. № 2. P. 498–506.
- Mature neuron markers. Abcam. <https://www.abcam.com/neuroscience/mature-neurons-markers-and-their-functions>.
- Lazarev V.F., Nikotina A.D., Mikhaylova E.R., Nudler E., Polonik S.G., Guzhova I.V., Margulis B.A. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2016. V. 470. № 3. P. 766–771.
- Meshalkina D.A., Shevtsov M.A., Dobrodumov A.V., Komarova E.Y., Voronkina I.V., Lazarev V.F., Margulis B.A., Guzhova I.V. // *Oncotarget*. 2016. V. 7. P. 7872.
- Mosmann T. // *J. Immunol. Methods*. 1983. V. 65. № 1–2. P. 55–63.
- Balchin D., Hayer-Hartl M., Hartl F.U. // *Science*. 2016. V. 353. № 6294. P. 4354.
- Ulrich K. // *Biochem. Soc. Trans.* 2023. V. 51. № 3. P. 1169–1177.
- Kirkegaard T., Gray J., Priestman D.A., Wallom K.L., Atkins J., Olsen O.D., Klein A., Drndarski S., Petersen N.H.T., Ingemann L., et al. // *Sci. Transl. Med.* 2016. V. 8. № 355. P. 355.
- Lazarev V.F., Dutyshcheva E.A., Mikhaylova E.R., Trestsova M.A., Utepova I.A., Chupakhin O.N., Margulis B.A., Guzhova I.V. // *Molecules*. 2022. V. 27. P. 8950.