

Активация аутофагии в периферических моноклеарных клетках при боковом амиотрофическом склерозе

И.А. Кочергин, А.И. Тухватулин, Д.Ю. Логунов, М.Н. Захарова

ФГБНУ «Научный центр неврологии»; ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр
эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ (Москва)

Введение. Накопление внутриклеточных белковых агрегатов является одним из ключевых звеньев в патогенезе бокового амиотрофического склероза (БАС). Аутофагия – это сложный процесс, в ходе которого компоненты клетки и органеллы транспортируются внутрь лизосом и подвергаются деградации. Нарушение процессов аутофагии выявлено при различных нейродегенеративных заболеваниях. Изменения аутофагии могут наблюдаться не только в ЦНС, но и в моноклеарных клетках периферической крови (РВМС). Белок LC3 является основным маркером аутофагии.

Цель исследования. Определить содержание белка LC3 в РВМС пациентов с БАС, а также провести анализ взаимосвязи между этим параметром и клиническими характеристиками заболевания.

Материал и методы. В исследование включены 66 пациентов с достоверным диагнозом БАС и 15 здоровых добровольцев. Всем пациентам был проведен сбор анамнеза, неврологический осмотр, оценена функция внешнего дыхания. Из крови пациентов и здоровых доноров выделены РВМС. Полученные клетки лизировали и проводили вестерн-блоттинг с использованием антител к LC3.

Результаты. Выявлено повышение уровня LC3-I в РВМС у пациентов с БАС по сравнению с контрольной группой ($p < 0,001$). У пациентов с пояснично-крестцовой формой при 2 стадии БАС и медленном темпе прогрессирования заболевания отмечено повышение уровня LC3-I/LC3-II. Тенденция к увеличению уровня LC3-II наблюдалась при бульбарной форме и 3 стадии заболевания.

Заключение. Результаты исследования впервые выявили, что в РВМС пациентов с БАС имеется тенденция к более высокому уровню активности аутофагии, чем у здоровых добровольцев.

Ключевые слова: аутофагия, боковой амиотрофический склероз, нейродегенеративные заболевания, биомаркеры, моноклеарные клетки периферической крови.

Введение

Боковой амиотрофический склероз (БАС) – нейродегенеративное заболевание ЦНС, характеризующееся поражением как верхнего, так и нижнего мотонейронов. В последнее десятилетие БАС относят к конформационным болезням, т.е. группе заболеваний, в основе патогенеза которых лежит нарушение трехмерной структуры белков, приводящее к образованию нерастворимых внутриклеточных включений [1]. В составе внутриклеточных включений при БАС идентифицированы агрегаты супероксиддисмутазы-1 (СОД-1), ДНК-связывающего белка 43 (TDP-43), ассоциированного с саркомерой белка (FUS), α -синуклеина и других протеинов [2, 3].

Одним из механизмов, позволяющим элиминировать внутриклеточные агрегаты белков, является аутофагия – процесс, в ходе которого внутренние компоненты клетки транспортируются внутрь лизосом и в них подвергаются деградации. Важную роль в инициации аутофагии играют легкие цепи 3 ассоциированного с микротрубочками протеина 1 (LC3). В ходе посттрансляционной модификации данный белок теряет С-концевой фрагмент и конъюгиру-

ется с фосфатидилэтаноламином, превращаясь сначала в LC3-I, а затем в LC3-II. Общее количество LC3-II напрямую коррелирует с активностью аутофагии в клетке [4].

Нарушения процессов аутофагии выявлены при различных нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезни Паркинсона, Гентингтона, Альцгеймера, прионных заболеваниях, болезни Ниманна-Пика тип С. В нейронах спинного мозга при БАС выявлено повышение количества аутофагосом. При БАС выявлено изменение аутофагии на этапах распознавания белкового субстрата, везикулярного транспорта и протеолитического расщепления содержимого аутофагосом [5–7]. Остается невыясненным, являются ли указанные изменения нормальной адаптивной реакцией нейронов на накопление внутриклеточных белковых агрегатов или патологическим процессом, возникшим вследствие первичного нарушения механизма аутофагии. Кроме того, большинство работ, посвященных процессам аутофагии при БАС выполнено на культурах клеток и лабораторных животных, так как получение образцов ЦНС у пациентов сопряжено с высоким риском осложнений. Однако недавно было показано, что моноклеарные клетки периферической крови (РВМС) могут являться подходящей

моделью для изучения процессов аутофагии при нейродегенеративных заболеваниях. Например, у пациентов с болезнью Паркинсона выявлена активация аутофагии в ПВМС, аналогичная таковой в клетках черной субстанции [8].

Цель нашей работы – определение содержания основного маркера аутофагии – белка LC3 в ПВМС пациентов с БАС, а также анализ взаимосвязи между этим параметром и клиническими характеристиками заболевания.

Материалы и методы

В исследование были включены 66 пациентов с БАС, проходивших обследование в Научном центре неврологии: 46 (69,7%) мужчин и 20 (30,3%) женщин. Контрольную группу составили 15 здоровых добровольцев: 8 (53,3%) мужчин и 7 (46,7%) женщин. Возраст пациентов с БАС колебался от 25 до 70 лет, медиана составила 52,5 [45; 61] лет. В группе добровольцев минимальный возраст составил 31 год, максимальный – 66 лет, медиана – 45 [40; 54] лет. Исследуемая и контрольная группы существенно не отличались между собой по половозрастным характеристикам. Критериями включения в группу пациентов с БАС были: возраст от 18 до 70 лет, диагноз достоверный БАС в соответствии с критериями El Escorial [9], отсутствие других неврологических, онкологических, аутоиммунных, тяжелых соматических или инфекционных заболеваний в течение месяца до забора материала.

Исследование было одобрено Локальным этическим комитетом Научного центра неврологии. От испытуемых было получено информированное согласие на участие в исследовании.

У всех пациентов был проведен сбор анамнеза, неврологический осмотр. Также оценивались такие характеристики, как форма заболевания (бульбарная, шейно-грудная, пояснично-крестцовая), стадия заболевания [10], возраст дебюта, оценка по шкале ALSFRS-R [11], темп прогрессирования (быстрый или медленный) [12], индекс массы тела (ИМТ), отношение форсированной жизненной емкости легких (ФЖЕЛ) к должной форсированной жизненной емкости легких (ФЖЕЛ/ДФЖЕЛ).

У обследованных пациентов и добровольцев натощак проведен забор крови из кубитальной вены в 9 мл пробирки с КЗЭДТА. В течение 4 час после взятия крови проводилось выделение ПВМС при помощи “Histopaque-1077” (Sigma-Aldrich, США) в соответствии со стандартной методикой. Подсчет клеток осуществляли в камере Горяева. Лизис клеток проводили при помощи лизис-буфера Promega Cat.# E153A (Promega, США) с добавлением ингибиторов протеаз в соответствии с рекомендациями производителя. Концентрацию белка в клеточном лизате определяли по методу Брэдфорда.

Разделение белков проводили в денатурирующих условиях в 12,5% полиакриламидном геле Sprint Next Gel® (Amresco, США). Перенос белка осуществляли на нитроцеллюлозную мембрану с размером пор 20 мкм. Вестерн-блоттинг проводили на оборудовании BioRad (BioRad, США) по стандартной методике. Нитроцеллюлозную мембрану обрабатывали антителами к LC3 (sc-28266, Santa Cruz Biotechnology, США) и внутреннему контролю – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе (GAPDH, sc-47724, Santa Cruz Biotechnology, США). В качестве вторичных антител ис-

пользовали козы антитела против иммуноглобулинов кролика и мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (Santa Cruz Biotechnology, США) и визуализировали бэнды методом усиленной хемилюминесценции (ECL, BioRad). Сигнал регистрировали на рентгеновской пленке при выдержке в течение 15 мин. Оцифрованные изображения подвергали количественной оценке при помощи программного обеспечения Image Studio Lite (LI-COR, США).

Статистическая обработка результатов проводилась при помощи программного пакета IBM SPSS Statistics 20 (IBM, США). Данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей – Me [LQ; HQ]. Нормальность распределения количественного признака проверялась методом Шапиро-Уилка. Так как у всех исследованных показателей распределение отличалось от нормального, использовали непараметрические методы. Сравнение двух независимых групп по количественному признаку проводилось с использованием критерия Манна-Уитни. Сравнение трех и более групп независимых данных проводили с помощью критерия Краскела-Уоллеса с последующим апостериорным анализом с использованием критерия Манна-Уитни. Корреляционный анализ проводили по методу Спирмена. Для определения диагностической ценности исследованных параметров применен ROC-анализ (Receiver Operating Characteristic). Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Результаты работы

Среди обследованных пациентов шейно-грудная форма заболевания была выявлена у 34 (51,5%) пациентов, бульбарная – у 17 (25,8%), пояснично-крестцовая – у 15 (22,7%). Продолжительность заболевания составила от 6 мес до 3 лет, медиана 2 [1,5; 2] года. У 15 (22,7%) пациентов отмечен быстрый темп прогрессирования БАС (потеря более 10 баллов по шкале ALSFRS-R в течение года). У 19 (28,8%) заболевание было на 2 стадии (патологический процесс поражает 2 региона ЦНС), у 47 (71,2%) – на 3 стадии (вовлечено 3 региона ЦНС, но нет потребности в гастростоме или неинвазивной вентиляции легких). Бульбарные нарушения отмечались у 37 (56,1%) пациентов. Поражения ядер других черепных нервов (преимущественно лицевого нерва в виде слабости мимической мускулатуры) выявлены у 34 (51,5%) пациентов. Медиана отношения ФЖЕЛ/ДФЖЕЛ составила 82,5% [75; 94], оценка по шкале ALSFRS-R – 38 [33; 42] балла. Не выявлено статистически значимых различий клинико-демографических параметров между группами с различной формой течения БАС (табл. 1).

Уровень LC3-I/GAPDH, а также соотношения LC3-I/LC3-II в ПВМС у пациентов с БАС были статистически значимо выше, чем у здоровых добровольцев. Уровень LC3-II не отличался между исследуемыми группами (рис. 1).

При анализе уровня маркеров аутофагии у пациентов с различными формами БАС по сравнению с группой здоровых доноров было выявлено повышение содержания LC3-I при всех формах заболевания. Уровень LC3-I в ПВМС статистически значимо не отличался между группами пациентов с различными формами БАС. При бульбарной форме БАС отмечено повышение уровня LC3-II по сравнению со здоровыми добровольцами. Соотношение LC3-I/LC3-II в группе пациентов с пояснично-крестцовой формой было статистически значимо выше, чем у пациентов с бульбарной формой и в группе здоровых доноров (рис. 2).

таблица 1: Демографическая и клиническая характеристики пациентов с различными формами БАС.

Характеристики пациентов	Формы заболевания		
	бульбарная (n=17)	шейно-грудная (n=34)	пояснично-крестцовая (n=15)
Возраст, лет	58 [53; 64]	54,5 [44; 58]	51 [44; 57]
Пол			
мужчины	11 (64,7%)	24 (70,6%)	11 (73,3%)
женщины	6 (35,3%)	10 (29,4%)	4 (26,7%)
Возраст дебюта заболевания, лет	56 [53; 63]	51,5 [41; 56]	48 [42; 55]
Продолжительность заболевания, лет	1,5 [1; 2]	2 [2; 3]	2 [1; 2]
Тип прогрессирования			
быстрый	4 (23,5%)	8 (23,5%)	3 (20%)
медленный	13 (76,5%)	26 (76,5%)	12 (80%)
Стадия заболевания			
2	7 (41,2%)	6 (17,7%)	6 (40,0%)
3	10 (58,8%)	28 (82,4%)	9 (60,0%)
ИМТ, кг/м ²	24,7 [22,4; 26,9]	24,2 [21,8; 27,8]	25,6 [22,8; 28]
ФЖЕЛ/ДФЖЕЛ, %	91 [79; 98,2]	78 [73; 89]	83 [80; 104]
ALSFRS-R, баллы	37 [33; 43]	38 [33; 40]	40 [36; 42]

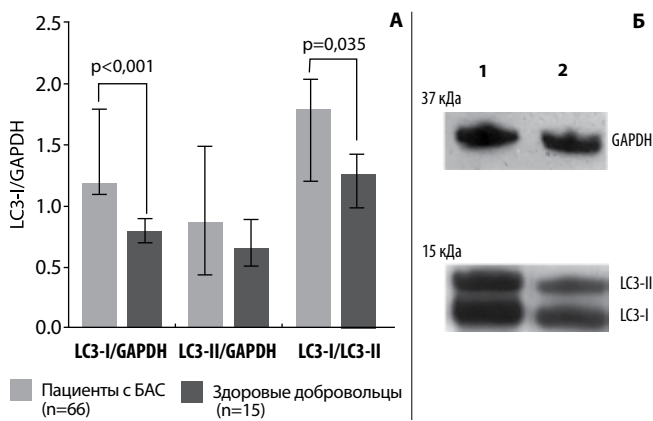


рис. 1: Содержание LC3-I и LC3-II в PBMC пациентов с БАС и здоровых доноров: А – диаграмма уровня LC3-I, LC3-II; Б – пример результатов вестерн-блоттинга белков LC3-I, LC3-II и GAPDH у пациента с БАС (1) и здорового донора (2).

Уровень LC3-II у пациентов с 3 стадией заболевания был выше, чем у пациентов со 2 стадией БАС или у здоровых доноров. Отношение LC3-I/LC3-II по сравнению с контролем было выше у пациентов со 2 стадией болезни. Как при 2, так и при 3 стадии заболевания уровень LC3-I был выше, чем в контрольной группе (рис. 3).

При медленном темпе прогрессирования БАС отмечено более высокое содержание LC3-I по сравнению с быстрым темпом развития заболевания и с контрольной группой. Уровень LC3-II не отличался между исследуемыми и контрольной группами. Отношение LC3-I/LC3-II в группе с медленным темпом развития заболевания превышало значения данного параметра у здоровых добровольцев. Не выявлено статистически значимых различий между LC3-I/LC3-II в группах с медленным и быстрым темпом развития БАС (рис. 4).

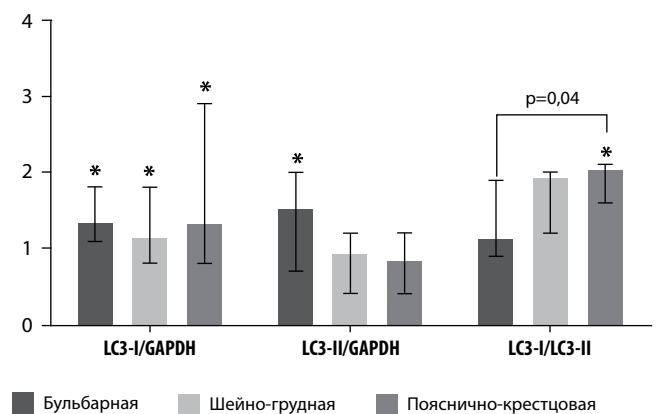


рис. 2: Содержание LC3-I и LC3-II в PBMC пациентов с различными формами БАС: * – статистически значимое отличие от группы здоровых добровольцев при $p < 0,05$.

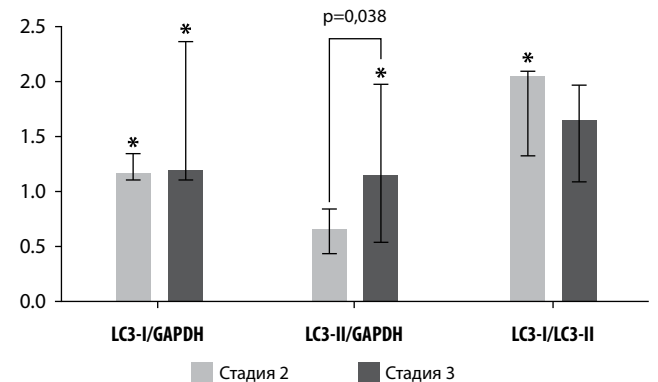


рис. 3: Содержание LC3-I и LC3-II в PBMC пациентов с различными стадиями БАС: * – статистически значимое отличие от группы здоровых добровольцев при $p < 0,05$.

таблица 2: Результаты ROC-анализа.

	AUC (95% ДИ)	Порог отсечения	Специфичность (95% ДИ)	Чувствительность (95% ДИ)	p
LC3-I/GAPDH	0,806 (0,714–0,898)	>0,93	100 (93–100)	77,3 (65,3–86,7)	<0,001
LC3-II/GAPDH	0,648 (0,532–0,765)	>0,97	100 (78,2–100)	47 (34,6–59,7)	0,765
LC3-I/LC3-II	0,686 (0,542–0,830)	>1,63	53 (40,3–65,4)	86,7 (59,5–98,3)	0,830

Примечание: ДИ – доверительный интервал, AUC – площадь под ROC-кривой (area under ROC curve).

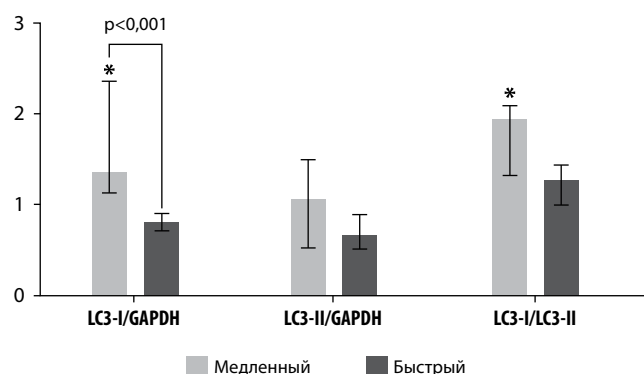


рис. 4: Содержание LC3-I и LC3-II в PBMC пациентов с различным типом прогрессирования БАС: * – статистически значимое отличие от группы здоровых добровольцев при $p < 0,05$.

При корреляционном анализе между уровнем маркеров аутофагии и возрастом пациентов, продолжительностью заболевания, ИМТ, ФЖЕЛ/ДФЖЕЛ, оценкой по шкале ALSFRS-R не выявлено зависимостей с коэффициентом корреляции более 0,25 или менее $-0,25$. Также не было выявлено влияния пола пациентов или добровольцев на уровень LC3.

Для исследования возможности использования уровня LC3 в PBMC в качестве биомаркера для диагностики БАС был проведен ROC-анализ. Наилучший результат классификации был получен при использовании уровня LC3-I/GAPDH, позволившего добиться очень хорошей диагностической ценности модели с площадью под ROC-кривой более 0,8. LC3-II/GAPDH и LC3-I/LC3-II не продемонстрировали столь высокой диагностической ценности. Подробные результаты ROC-анализа представлены в табл. 2.

Обсуждение

Увеличение уровня LC3-I у пациентов с БАС свидетельствует об увеличении активности процессов аутофагии. Нарастание соотношения LC3-I/LC3-II может свидетельствовать о высоком уровне инициации аутофагии при нормальном протекании дальнейших стадий этого процесса, таких как везикулярный транспорт, слияние с лизосомами и протеолитическая деградация содержимого аутолизосом [4]. Накопление нерастворимых скоплений белка стимулирует процессы аутофагии. Показано, что ассоциированные с развитием БАС мутации в генах TDP-43 и FUS могут приводить к индукции образования аутолизосом [13, 14]. Ак-

тивация аутофагии в нейронах спинного мозга ранее была обнаружена у трансгенных мышей линии SOD1G93A [15], а также в секционном материале пациентов, страдавших БАС [16]. При БАС внутриклеточные белковые агрегаты обнаруживают не только в нейронах, но и в других соматических клетках, в т.ч. в лимфоцитах [17, 18]. Таким образом, накопление белковых агрегатов в PBMC могло стимулировать в них активацию процессов аутофагии. Аналогичные изменения в PBMC при нейродегенеративных заболеваниях ранее были выявлены у пациентов с болезнью Паркинсона [8].

Следует отметить, что в нашей работе у пациентов с пояснично-крестцовой формой БАС, для которой характерно наиболее медленное прогрессирование неврологической симптоматики и большая продолжительность жизни, отношение LC3-I/LC3-II было статистически значимо выше, чем в контрольной группе и при бульбарной форме БАС. Также уровень LC3-I/LC3-II был выше на более ранних стадиях БАС. Кроме того, в группе пациентов с медленным темпом прогрессирования заболевания зарегистрировано повышение параметров LC3-I и LC3-I/LC3-II. Наиболее вероятно, что выявленная нами активация макроаутофагии в PBMC при БАС может быть защитной реакцией в ответ на накопление внутриклеточных агрегатов белка. На основании полученных результатов можно предположить, что высокий уровень активности аутофагии защищает клетки от гибели и способствует более медленному прогрессированию и более продолжительному течению заболевания.

Повышение уровня LC3-II, а также уменьшение отношения LC3-I/LC3-II может свидетельствовать о нарушении слияния аутолизосом и лизосом и, следовательно, незавершенной аутофагии, приводящей к накоплению большого числа аутолизосом внутри клетки [4]. Ассоциированные с БАС мутации TDP-43 вызывают незавершенную аутофагию посредством влияния на сигнальный каскад mTORC1 [13, 19]. Нарушение везикулярного транспорта, неоднократно выявленное при БАС, способствует формированию незавершенной аутофагии из-за невозможности слияния аутолизосом и лизосом. Мутации в генах ESCRT, выявленные при фронтотемпоральной деменции, также приводят к незавершенной аутофагии. При невозможности полноценного протекания всех стадий аутофагии активация данного процесса приводит лишь к чрезмерному накоплению аутолизосом в цитоплазме клеток, что, в свою очередь, способствует активации апоптоза и последующей гибели клетки [14, 20]. При излишнем накоплении аутолизосом внутри клеток активируются процессы образования экзосом. В результате этого агрегаты белков, обладающих приноподобной активностью, могут быть экскретированы

в межклеточное пространство и захвачены здоровыми клетками, что способствует дальнейшему распространению патологического процесса и увеличивает скорость прогрессирования заболевания [14, 21]. В нашей работе тенденция к увеличению уровня LC3-II и снижению показателя LC3-I/LC3-II была отмечена у пациентов с бульбарной формой, для которой характерно наиболее быстрое нарастание симптоматики и меньшая продолжительность жизни. Кроме того, более высокий уровень LC3-II зафиксирован при 3 стадии заболевания, когда патологический процесс уже поразил 3 региона ЦНС.

Аналогичное исследование уровня маркеров аутофагии, проведенное G. Sala и соавторами, не выявило существенных различий между уровнем LC3-II у пациентов с БАС и здоровых доноров [22]. В их работе не был отдельно проанализирован уровень LC3-I и соотношение LC3-I/LC3-II. Также в исследовании G. Sala и соавторов было включено только 15 пациентов, что могло повлиять на статистическую значимость результатов. Кроме того, значительно отличаются демографические и клинические характеристики

пациентов, включенных в наше исследование и описанных в работе G. Sala и соавторов. Результаты проведенного нами ROC-анализа позволяют считать уровень LC3-I перспективным биомаркером для диагностики БАС.

Результаты проведенного нами исследования впервые выявили, что в РВМС пациентов с БАС имеется тенденция к более высокому уровню активности аутофагии, чем у здоровых добровольцев. Было показано, что активация аутофагии может играть защитную функцию при БАС, замедляя темпы прогрессирования заболевания. Тем не менее при неполноценно протекающих процессах аутофагии ее активация, наоборот, может привести к усугублению заболевания и ускорить распространение патологического процесса в ЦНС. Выявленные изменения маркеров аутофагии в РВМС при БАС позволяют предположить, что дальнейшие исследования в этом направлении могут способствовать разработке новых подходов к диагностике и лечению нейродегенеративных заболеваний.

Конфликт интересов отсутствует.

References

- Illarionovskiy S.N. [The conformational diseases of the brain]. Moscow: Yanus-K; 2003. (in Russ).
- Monahan Z., Shewmaker F., Pandey U.B. Stress granules at the intersection of autophagy and ALS. *Brain Res.* 2016; 1649(Pt B): 189–200. DOI: 10.1016/j.brainres.2016.05.022. PMID: 27181519.
- Lee J.K., Shin J.H., Lee J.E., Choi E.J. Role of autophagy in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta.* 2015; 1852(11): 2517–24. DOI: 10.1016/j.bbdis.2015.08.005. PMID: 26264610.
- Klionsky D.J., Abdelmohsen K., Abe A. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy.* 2016; 12(1): 1–222. DOI: 10.1080/15548627.2015.1100356. PMID: 26799652.
- Nixon R.A. The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat Med.* 2013; 19(8): 983–97. DOI: 10.1038/nm.3232. PMID: 23921753.
- Cipolat Mis M.S., Brajkovic S., Frattini E. et al. Autophagy in motor neuron disease: Key pathogenetic mechanisms and therapeutic targets. *Mol Cell Neurosci.* 2016; 72: 84–90. DOI: 10.1016/j.mcn.2016.01.012. PMID: 26837042
- Klyushnikov S.A. [Niemann-Pick disease, type C lysosomal pathology in violation of lipid intracellular transport]. *Atmosfera Nervnye bolezni.* 2014(1): 4–14. (in Russ).
- Prigione A., Piazza F., Brighina L. et al. Alpha-synuclein nitration and autophagy response are induced in peripheral blood cells from patients with Parkinson disease. *Neurosci Lett.* 2010; 477(1): 6–10. DOI: 10.1016/j.neulet.2010.04.022. PMID: 20399833
- Brooks B.R., Miller R.G., Swash M., Munsat T.L. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* 2000; 1(5): 293–9. PMID: 11464847.
- Roche J.C., Rojas-Garcia R., Scott K.M. et al. A proposed staging system for amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 2012; 135(Pt 3): 847–52. DOI: 10.1093/brain/awr351. PMID: 22271664.
- Gordon P.H., Miller R.G., Moore D.H. ALSFRS-R. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* 2004; 5 (Suppl 1): 90–3. DOI: 10.1080/17434470410019906. PMID: 15512883.
- Bromberg M.B. *Nomenclature and Classification of Motor Neuron Disease.* Oxford, UK: 'Oxford University Press'; 2014. DOI: 10.1093/med/9780199783113.003.0002.
- Ying Z., Xia Q., Hao Z. et al. TARDBP/TDP-43 regulates autophagy in both MTORC1-dependent and MTORC1-independent manners. *Autophagy.* 2016; 12(4): 707–8. DOI: 10.1080/15548627.2016.1151596. PMID: 27050460.
- Filimonenko M., Stuffers S., Raiborg C. et al. Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease. *J Cell Biol.* 2007; 179(3): 485–500. DOI: 10.1083/jcb.200702115. PMID: 17984323.
- Morimoto N., Nagai M., Ohta Y. et al. Increased autophagy in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Brain Res.* 2007; 1167: 112–7. DOI: 10.1016/j.brainres.2007.06.045. PMID: 17689501.
- Sasaki S. Autophagy in spinal cord motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2011; 70(5): 349–59. DOI: 10.1097/NEN.0b013e3182160690. PMID: 21487309.
- De Marco G., Lupino E., Calvo A. et al. Cytoplasmic accumulation of TDP-43 in circulating lymphomonocytes of ALS patients with and without TARDBP mutations. *Acta Neuropathol.* 2011; 121(5): 611–22. DOI: 10.1007/s00401-010-0786-7. PMID: 21120508.
- De Marco G., Lomartire A., Calvo A. et al. Monocytes of patients with amyotrophic lateral sclerosis linked to gene mutations display altered TDP-43 subcellular distribution. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2016. DOI: 10.1111/nan.12328. PMID: 27178390.
- Xia Q., Wang H., Hao Z. et al. TDP-43 loss of function increases TFEB activity and blocks autophagosome-lysosome fusion. *EMBO J.* 2016; 35(2): 1 21–42. DOI: 10.15252/embj.201591998. PMID: 26702100.
- Xie Y., Zhou B., Lin M.Y., Sheng Z.H. Progressive endolysosomal deficits impair autophagic clearance beginning at early asymptomatic stages in fALS mice. *Autophagy* 2015; 11(10): 1934–6. DOI: 10.1080/15548627.2015.1084460. PMID: 26290961.
- Djeddi A., Michelet X., Culetto E. et al. Induction of autophagy in ESCRT mutants is an adaptive response for cell survival in *C. elegans*. *J Cell Sci.* 2012; 125(Pt 3): 685–94. DOI: 10.1242/jcs.091702. PMID: 22389403.
- Sala G., Tremolizzo L., Melchionda L. et al. A panel of macroautophagy markers in lymphomonocytes of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler.* 2012; 13(1): 119–24. DOI: 10.3109/17482968.2011.611139. PMID: 21916798.

Activation of autophagy in peripheral blood mononuclear cells in amyotrophic lateral sclerosis

I.A. Kochergin, A.I. Tikhvatulin, D.Yu. Logunov, M.N. Zakharova

Research Center of Neurology (Moscow);

N.F. Gamaleya Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology, the Ministry of Healthcare of the Russian Federation

Keywords: autophagy, amyotrophic lateral sclerosis, neurodegenerative diseases, biomarkers, peripheral blood mononuclear cells.

Introduction. Accumulation of intracellular protein aggregates is one of the key processes in pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Autophagy is a complex process during which cell components and organelles are transferred inside lysosomes and are degraded. Autophagy disturbance was found to take place in various neurodegenerative diseases. Autophagy alteration can be observed not only in the central nervous system but also in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Protein LC3 is the key marker of autophagy.

Objective. To determine protein LC3 concentration in PBMCs of ALS patients and to analyze the relationship between this parameter and clinical characteristics of the disease.

Materials and methods. The study involved 66 patients with definite ALS and 15 healthy volunteers. Past medical history

was elicited in all patients; neurological examination and the pulmonary function test were performed. PBMCs were isolated from blood of patients and healthy volunteers. The cells were lysed and subjected to Western blot analysis using anti-LC3 antibodies.

Results. The LC3-I level in PBMCs of ALS patients was increased compared to that in the control group ($p < 0.001$). The LC3-I/LC3-II level was elevated in patients with the lumbosacral form of ALS (stage II ALS and the slow rate of disease progression). The tendency towards increased LC3-II level was observed for the bulbar form and stage III ALS.

Conclusions. The results demonstrated for the first time that PBMCs of ALS patients tend to exhibit a higher level of autophagy activity compared to healthy volunteers.

Контактный адрес: Кочергин Иван Александрович – асп. 6-го неврол. отд. ФГБНУ НЦН. 125367, Москва, Волоколамское ш., д. 80. Тел: +7 (495) 490-24-13, e-mail: i.a.kochergin@yandex.ru;

Тухватулин А.И. – ст. науч. сотр. лаб. клеточной микробиологии ФГБУ ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи;

Захарова М.Н. – зав. 6-м неврол. отд. ФГБНУ «Научный центр неврологии»;

Логунов Д.Ю. – зам. директора ФГБУ ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи.