

На правах рукописи

Вавилова Юлия Дмитриевна

**Изменение популяционного состава и характеристик системы шаперон-зависимого гомеостаза у циркулирующих клеток иммунной системы при развитии болезни Паркинсона**

Специальность 1.5.3 – Молекулярная биология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата наук

Москва – 2023

Работа выполнена в лаборатории клеточных взаимодействий отдела иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

**Научный руководитель:**

**Сапожников Александр Михайлович**, доктор биологических наук, профессор.

**Официальные оппоненты:**

**Гужова Ирина Владимировна** доктор биологических наук, руководитель отдела молекулярных и клеточных взаимодействий Института Цитологии Российской академии наук.

**Лебедева Ольга Сергеевна**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточной биологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального Медико-биологического Агентства».

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России.

Защита состоится «7» июня 2023 года в 11:00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, а также на сайте института [www.ibch.ru](http://www.ibch.ru).

Автореферат разослан \_\_\_\_\_ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор физико-математических наук  
В.А. Олейников



## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### *Актуальность темы исследования и степень ее разработанности*

Болезнь Паркинсона (БП) – распространенное нейродегенеративное заболевание, вызванное гибелью дофаминергических нейронов черной субстанции головного мозга. Вероятность развития БП возрастает с увеличением продолжительности жизни. Известно, что нейродегенерация головного мозга при БП связана с недостаточностью клеточного протеостаза, а именно, аутофагии, убиквитин-протеосомной системы или системы белков-шаперонов семейства 70 кДа (HSP70) (Lim and Tan, 2007; Witt, 2010; Hou et al., 2020). В настоящее время этиология БП до конца не изучена, и, как следствие, существующие подходы к лечению БП малоэффективны. Как и для большинства патологий, немаловажным аспектом в обеспечении эффективности проводимой терапии при БП являются диагностические мероприятия. В настоящее время одним из существенных ограничений в лечении БП является поздняя диагностика заболевания. Наблюдаемые клинические симптомы БП, на основе которых ставится диагноз, проявляются, когда количество дефектных/потерянных дофаминергических нейронов достигает уже 60-80%. Несмотря на многочисленные исследования этиологии и патогенеза БП, применяемые методы диагностики недостаточно оптимальны, в том числе для отслеживания прогрессирования заболевания.

Таким образом, остается актуальной потребность в выявлении проверенных биомаркеров с высокой степенью чувствительности и специфичности с целью улучшения диагностики БП. Для диагностики БП не рекомендуется применять единственный биомаркер, однако, в перспективе, их можно рационально комбинировать.

Диагностические биомаркеры клеток и плазмы крови являются оптимальными из-за их доступности и минимальной инвазивности. Несмотря на отсутствие прямой связи между мозгом и кровью за счет наличия гематоэнцефалического барьера, исследования подтверждают наличие периферических изменений при БП, однако результаты исследований противоречивы (Sala et al., 2014; Miki et al., 2018; Chang et al., 2020; El Haddad et al., 2020). В литературе имеются свидетельства, указывающие на возможную ассоциацию БП с инфекционной нагрузкой таких распространенных патогенов как цитомегаловирус (CMV), вирус простого герпеса типа 1, *Chlamydomytila pneumonia*, *Borrelia burgdorferi* и *Helicobacter pylori* (Bu et al., 2015).

Данная работа направлена на сравнительный анализ фенотипических изменений иммунных клеток периферической крови и системы их протеостаза у пациентов с БП для выявления значимых и стабильных показателей, с целью их возможного дальнейшего применения в диагностике БП на ранних стадиях.

*Цель исследования:* проанализировать популяционный состав иммунокомпетентных клеток периферической крови, изучить характеристики системы шаперон-зависимого гомеостаза и аутофагии в этих клетках у пациентов с болезнью Паркинсона.

*В рамках данной цели были сформулированы следующие задачи:*

1. Провести сравнительный анализ содержания пула белков HSP70 в интактных и после теплового шока мононуклеарных клетках периферической крови (РВМС) у пациентов с БП и здоровых добровольцев сходной с больными возрастной группы (ЗД).
2. Оценить различия в базальной экспрессии основных генов группы *HSPA*, кодирующих белки-шапероны семейства 70 кДа в лейкоцитах между пациентами с БП и ЗД.

3. Проанализировать взаимосвязь внутриклеточного содержания белка аутофагии p62 в РВМС и уровень спонтанного апоптоза этих клеток *in vitro* в группах пациентов с БП и ЗД.
4. Провести анализ ассоциации полученных данных о внутриклеточном содержании белков семейства HSP70, белка аутофагии p62, экспрессии генов группы *HSPA*, уровня спонтанного апоптоза в РВМС с манифестацией БП и оценить диагностическую значимость исследованных параметров для дифференциальной диагностики БП.
5. Провести сравнительный анализ Т-лимфоцитов и НК-клеток периферической крови, находящихся на разных стадиях дифференцировки, на фоне цитомегаловирусной инфекции в трех исследуемых группах: пациенты с БП, ЗД, здоровые молодые доноры (МД).

#### *Научная новизна работы*

В данной работе было показано увеличение транскрипционной активности стресс-индуцируемых генов *HSPA*, кодирующих белки-шапероны Hsp70 в мононуклеарных клетках крови на фоне БП. Впервые было обнаружено увеличение содержания основного белка аутофагии p62 в РВМС и выявлена положительная взаимосвязь между содержанием p62 в этих клетках и уровнем их спонтанного апоптоза. Выявлена диагностическая значимость комбинации уровня белка p62 и мРНК гена *HSPA6* для выявления БП. Установлено, что в периферической крови пациентов с БП снижено процентное содержание Т-клеток с признаками иммуностарения, а именно, терминально дифференцированных CD56<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и доли эффекторных Т-клеток памяти, повторно экспрессирующих CD45RA (TEMRA).

#### *Теоретическая и практическая значимость работы*

Теоретическая значимость данной работы заключается в расширении существующих представлений об изменениях протеостаза в клетках периферической иммунной системы при БП.

В данной работе впервые было показано, что болезнь Паркинсона ассоциирована с увеличением экспрессии гена *HSPA6* и внутриклеточного белка p62 в РВМС, а комбинация этих показателей может рассматриваться как потенциальный периферический биомаркер развития БП. Использование такого биомаркера в клинической практике может расширить существующие подходы в диагностике и анализе течения данного заболевания.

Обнаруженное снижение содержания Т-клеток с признаками иммуностарения в периферической крови пациентов с БП, может помочь определить направление дальнейших исследований аномалий периферической иммунной системы при нейродегенеративных заболеваниях.

#### *Основные положения, выносимые на защиту*

1. Транскрипционная активность стресс-индуцируемых генов группы *HSPA* повышена у пациентов с БП при отсутствии значительных изменений уровня белков HSP70 в РВМС.
2. Повышенный уровень спонтанного апоптоза культивируемых *in vitro* РВМС связан с накоплением внутриклеточного белка p62 в РВМС пациентов с БП.
3. Уровень белка p62 и уровень мРНК гена *HSPA6* в РВМС в комбинации могут рассматриваться в качестве потенциального биомаркера БП.
4. На фоне инфекции CMV у пациентов с БП в периферической крови наблюдается снижение доли терминально дифференцированных CD57<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и доли эффекторных Т-клеток памяти, повторно экспрессирующих CD45RA (TEMRA).

### *Апробация работы*

Основные результаты работы были представлены на российских и международных конференциях: XXXI, XXXII и XXXIII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (2019, 2020, 2021, Москва, Россия); российская конференция с международным участием "Физиология и биохимия сигнальных систем", посвященная 100-летию академика Т.М. Турпаева (2018, Москва, Россия); международный конгресс The 5<sup>th</sup> European Congress of Immunology (2018, Амстердам, Нидерланды); международная конференция по апоптозу the 26<sup>th</sup> Conference of the European Cell Death Organization (ECDO), "Cell death in disease: from small molecules to translational medicine" (2018, Санкт-Петербург, Россия), международный конгресс XXVI World Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders (2021, Location Virtual); международный конгресс the 6<sup>th</sup> European Congress of Immunology (2021, Location Virtual). По материалам работы опубликовано 3 статьи в рецензируемых журналах, публикация в продолжающемся сборнике (книга) и 8 тезисов.

### *Структура диссертации*

Диссертационная работа изложена на 100 страницах и состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 209 ссылок. Диссертация содержит 22 рисунка и 6 таблиц.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### **1 Литературный обзор**

Обзор литературы представлен в первой главе диссертации и включает в себя пять разделов. Первый раздел посвящен описанию патогенеза БП. Во втором разделе представлена имеющаяся информация о роли белков-шаперонов HSP70 и аутофагии при развитии БП. В третьем разделе собрана информация об имеющихся биохимических биомаркерах периферической крови, обнаруженных у пациентов с БП. В четвертом разделе описана роль системного и локального воспаления в патогенезе БП. Пятый раздел посвящен описанию иммуностарения на фоне инфекции CMV при БП.

### **2 Экспериментальная часть**

#### **2.1 Пациенты и этический комитет**

Данное исследование одобрено локальным комитетом по медицинской этике, научный центр неврологии (№ 11/14 от 19 ноября 2014 г.). Письменное информированное согласие было предоставлено всеми участниками. Были обследованы: 31 пациент с болезнью Паркинсона (пациенты с БП), 36 здоровых доноров того же возраста (ЗД) и 30 молодых здоровых доноров (МД). Демографические и клинические характеристики пациентов с БП и контрольной группы ЗД пожилого возраста, а также их CMV-статус представлены в таблице 1.

Таблица 1. Демографические и клинические характеристики пациентов с БП и здоровых доноров.

	Пациенты с БП n=31	Контроль n=36
Возраст (медиана)	59	56
Мужской пол (n)	13	12
MDS-UPDRS (среднее)	25 ± 8.7	н/п
Hoehn and Yahr (среднее)	2.7 ± 0.6	н/п
Продолжительность заболевания (среднее, годы)	7 ± 0.8	н/п
CMV IgG (% позитивных)	100 (31/31)	76 (25/33)

n-количество пациентов/доноров в группе. MDS-UPDRS - Movement Disorder Society-Unified Parkinson's Disease Rating Scale. ± - стандартное отклонение. Hoehn and Yahr – шкала, определяющая стадии БП. Н/п-не применялся

Группы пациентов с БП и ЗД не различались по возрасту и полу. Диагноз БП устанавливали в соответствии с критериями «Parkinson's Disease Society Brain Bank» (Банк мозга общества болезни Паркинсона)» (Hughes et al., 1992). Для определения стадий заболевания применяли шкалу Хена и Яра (Hoehn and Yahr); стадии были ≤ 3. Тяжесть клинической симптоматики оценивали по унифицированной шкале БП: MDS-UPDRS (The Movement Disorder Society-Unified Parkinson's Disease Rating Scale). Все пациенты получали карбидопу/леводопу в сочетании с терапией агонистами дофамина при отсутствии иммуносупрессивной терапии. Критериями исключения из когорты больных БП являлись острые инфекционные или аутоиммунные заболевания, выявленные в течение месяца до забора крови. У ЗД не было выявлено психических и неврологических заболеваний. Критериями исключения из группы ЗД являлись наличие в анамнезе неврологических и психических заболеваний и любые нарушения памяти.

## 2.2 Оценка внутриклеточного содержания пула HSP70 в PBMC у пациентов с БП

Внутриклеточный пул белков HSP70 был проанализирован в интактных PBMC пациентов с БП и в контрольной группе того же возраста, с помощью проточной цитофлуориметрии с использованием антител, специфичных к консервативному эпитопу, общему для конститутивного Hsc70 и стресс-индуцируемых Hsp70 белков (клон BRM-22) (Рисунок 1А). Отдельно была проведена оценка стресс-индуцируемого белка Hsp70-1 с помощью специфичных моноклональных антител (клон C92F3A-5) (Рисунок 1Б).

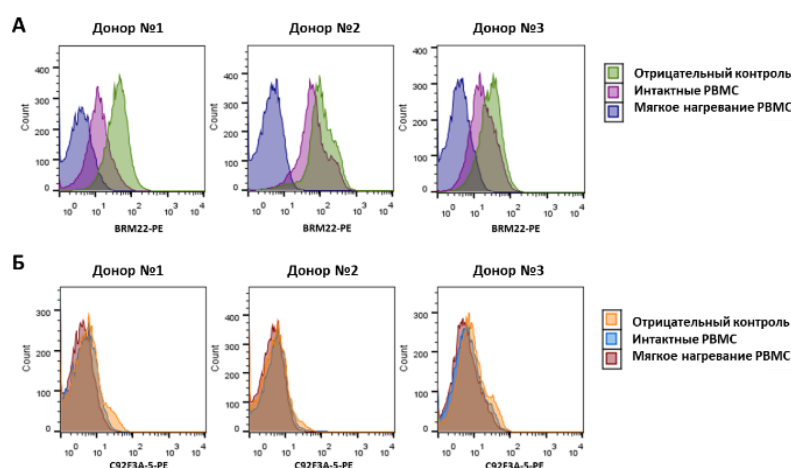


Рисунок 1. Уровень HSP70 в PBMC, измеренный с помощью метода проточной цитометрии. Показано окрашивание пула HSP70 в трех независимых экспериментах. (А) Анализ проведен с использованием моноклональных антител BRM-22, распознающих как конститутивный Hsc70, так и стресс-индуцируемые Hsp70. (Б) Анализ проведен с использованием специфических антител C92F3A-5, распознающих только стресс-индуцируемые Hsp70.

В интактных РВМС существенных различий в базальном уровне HSP70 ( $HSP70_{\text{basal}}$ ) между пациентами с БП и ЗД не наблюдалось (Рисунок 2А). Ранее нами была продемонстрирована модель измерения уровня HSP70 после кратковременной гипертермии клеток ( $HSP70_{\text{heat}}$ ), не связанного с синтезом белка *de novo*, отражающего обратимое увеличение доступности эпитопов HSP70 для связывания с антителами (Kovalenko *et al.*, 2014). В группах сравнения в РВМС был проанализирован уровень  $HSP70_{\text{heat}}$ , а также произведена оценка разницы между значениями  $HSP70_{\text{heat}}$  и  $HSP70_{\text{basal}}$  ( $\Delta HSP70 = HSP70_{\text{heat}} - HSP70_{\text{basal}}$ ). Данный показатель, по-видимому, отражает уровень HSP70, свободный для связывания в клетке с субстратом. Уровень  $HSP70_{\text{heat}}$ , а также значения  $\Delta HSP70$  в РВМС были сопоставимы у пациентов с БП и ЗД (Рисунок 2А). Однако, были выявлены значимые положительные корреляции между базальным уровнем HSP70 и уровнем  $HSP70_{\text{heat}}$  в РВМС как у пациентов с БП, так и у ЗД (Рисунок 2 Б, В). Таким образом, в когортах данного исследования не удалось выявить изменений содержания общего пула внутриклеточных шаперонов HSP70 в РВМС у пациентов с БП легкой и средней степени тяжести.

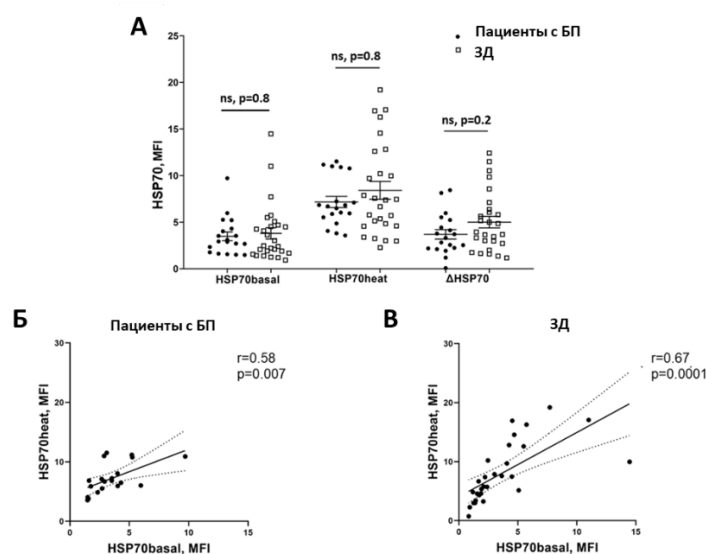


Рисунок 2. Внутриклеточный уровень пула HSP70 (Hsc70 + Hsp70) в РВМС. (А) базальный ( $HSP70_{\text{basal}}$ ) и индуцированный кратковременной гипертермией клеток ( $HSP70_{\text{heat}}$ ) уровень HSP70 и  $\Delta HSP70$  у пациентов с БП ( $n = 19$ ) по сравнению с группой ЗД ( $n = 27$ ); (Б, В) корреляционный анализ между базальным уровнем HSP70 и уровнем  $HSP70_{\text{heat}}$  в РВМС пациентов с БП (Б) и ЗД (В). Результаты представлены в виде средних значений интенсивности флуоресценции с поправкой на фоновую флуоресценцию контрольного образца (MFI — mean of fluorescence intensity). (А) Сплошной линией обозначено среднее значение ( $\pm$ SEM), знак ns (not significant) отражает статистически недостоверные отличия. В корреляционном анализе оценивали коэффициент корреляции Пирсона; пунктирной линией обозначен 95% доверительный интервал (Б, В).

Поскольку среди циркулирующих в крови иммунокомпетентных клеток распределение HSP70 в популяции полиморфноядерных нейтрофилов (PMN) существенно отличается от РВМС (Boyko *et al.*, 2017), у больных БП и ЗД были проанализированы значения  $\Delta HSP70$  в PMN. Однако, существенных различий в значениях  $\Delta HSP70$  в PMN между пациентами с БП и ЗД также не удалось обнаружить (Рисунок 3).

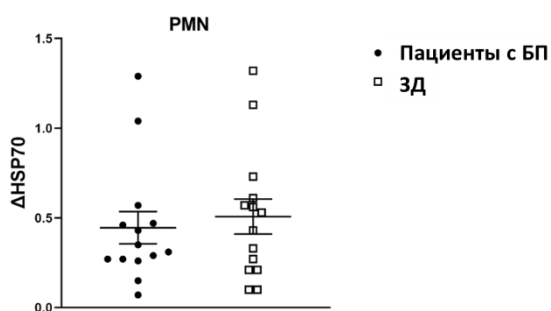


Рисунок 3. Уровень  $\Delta$ HSP70 в PMN у пациентов с БП (n = 14) по сравнению с группой ЗД (n = 14); ( $\Delta$ HSP70 = HSP70heat - HSP70basal). Сплошной линией обозначено среднее значение ( $\pm$ SEM).

### 2.3 Анализ транскрипционной активности генов HSPA в PBMC у пациентов с БП

Как правило, внутриклеточный уровень белков зависит от накопления и стабильности мРНК. Однако, в некоторых случаях накопление мРНК слабо коррелирует с количеством белка из-за несоответствия между транскрипционной и трансляционной активностью в клетке (Liu, Beyer and Aebersold, 2016). На следующем этапе работы был проведен анализ базовой транскрипционной активности генов *HSPA*, кодирующих белки HSP70, в PBMC пациентов с БП и ЗД с использованием количественной ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени. Относительный уровень транскрипционной активности гена *HSPA8*, кодирующего конститутивный белок Hsc70, не отличался между группами пациентов с БП и ЗД (Рисунок 4, таблица 2). Полученный результат по экспрессии *HSPA8* соответствует описанным выше результатам, свидетельствующим об отсутствии различий по уровню белка Hsc70 в PBMC у больных БП и ЗД (Рисунок 2А). Затем была оценена относительная базальная транскрипционная активность генов *HSPA1A/B* и *HSPA6*, кодирующих стресс-индуцируемые белки Hsp70-1 и Hsp70B' соответственно. Было обнаружено увеличение относительной базальной транскрипции стресс-индуцируемых генов *HSPA1A/B* и *HSPA6* в PBMC пациентов с БП по сравнению с ЗД (Рисунок 4А). Далее, чтобы различить гены *HSPA1A* и *HSPA1B*, которые кодируют изоформы белка Hsp70-1a и Hsp70-1b, соответственно, были подобраны специфические праймеры к 3'-UTR (3'-нетранслируемым областям) соответствующих генов, поскольку именно в этом регионе наблюдаются различия в последовательности исследуемых генов.

Анализ экспрессии генов *HSPA1A* и *HSPA1B* в PBMC показал, что экспрессия *HSPA1A* превалирует над *HSPA1B* (Рисунок 4Б). Повышенная экспрессия *HSPA1A/B*, наблюдаемая у пациентов с БП, могла быть опосредована вкладом изоформы *HSPA1A*, тогда как медианы значений уровня экспрессии *HSPA1B* в PBMC между пациентами с БП и ЗД были статистически недостоверными, была отмечена лишь тенденция к увеличению данной активности (Рисунок 4Б, таблица 2).

Также была оценена базальная транскрипционная активность гена *HSPA6*, кодирующего минорный стресс-индуцируемый белок Hsp70B' в PBMC всех участников исследования. Статистически значимое увеличение базальной транскрипционной активности гена *HSPA6* в PBMC наблюдалось у пациентов с БП по сравнению с ЗД (Рисунок 4А).



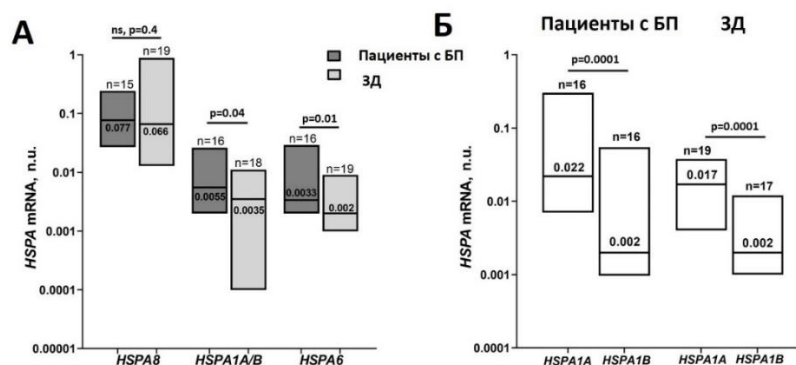


Рисунок 4. Относительная базальная экспрессия генов *HSPA8*, *HSPA1A/B*, *HSPA1A*, *HSPA1B* и *HSPA6* в PBMC, проанализированная с помощью количественной ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени (qRT-PCR). (А) Сравнение уровней мРНК *HSPA8*, *HSPA1A/B* и *HSPA6* у пациентов с БП и ЗД. (Б) Уровни мРНК генов *HSPA1A* и *HSPA1B* в PBMC у пациентов с БП и ЗД. Данные об уровнях мРНК генов *HSPA* нормализованы относительно уровня гена  $\beta$ -актина; использованы нормированные единицы (n.u., normalized units), данные представлены в виде медиан; верхняя и нижняя границы обозначают максимум и минимум, соответственно.

Корреляционный анализ показал достоверную положительную взаимосвязь между уровнями экспрессии гена *HSPA1A/B* и гена *HSPA6*, а также между *HSPA1A* и *HSPA6* в PBMC в обеих исследуемых группах: пациенты с БП ( $r=0,61$ ,  $p=0,013$ ;  $r=0,59$ ,  $p=0,0078$ , соответственно) и ЗД ( $r=0,55$ ,  $p=0,017$ ;  $r=0,69$ ,  $p=0,002$ , соответственно) (Рисунок 5).

Далее, для того чтобы удостовериться в специфичности увеличения экспрессии генов *HSPA* именно в PBMC, была проанализирована транскрипционная активность генов группы *HSPA* в PMN. Различий в уровне экспрессии генов *HSPA8*, *HSPA1A/B*, *HSPA1A*, *HSPA1B* и *HSPA6* в PMN между пациентами с БП и группой ЗД обнаружено не было (таблица 2).

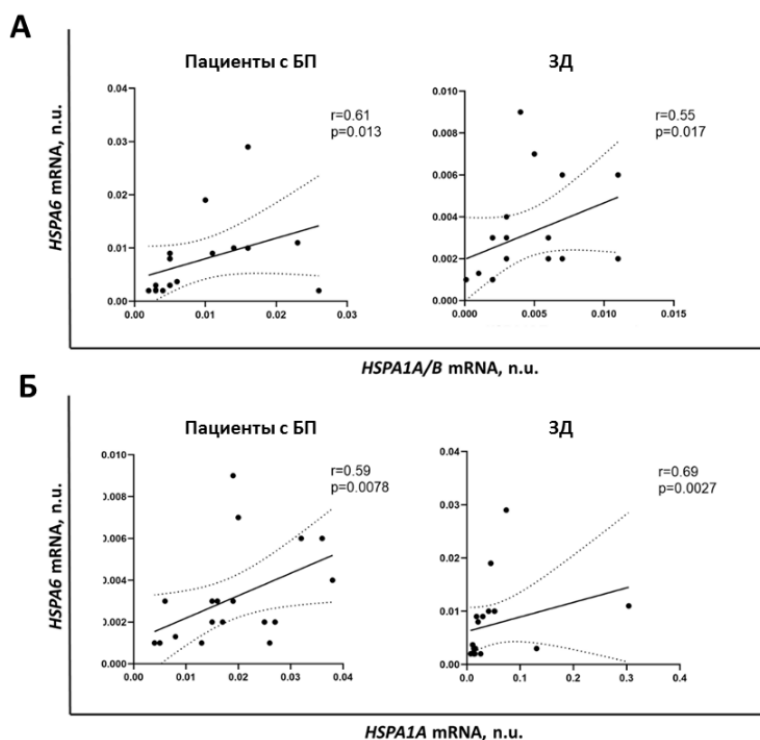


Рисунок 5. Оценка взаимосвязи транскрипционной активности генов *HSPA* в PBMC у пациентов с БП и ЗД с помощью корреляционного анализа. (А) Корреляции уровней экспрессии *HSPA1A/B* и *HSPA6*; (Б) *HSPA1A* и *HSPA6*. Данные уровней мРНК нормализованы к уровню гена  $\beta$ -актина, знак ns (not significant) отражает статистически недостоверные отличия. В корреляционном анализе оценивали коэффициент корреляции Пирсона; пунктирной линией обозначен 95% доверительный интервал.

Таблица 2. Нормализованный базовый уровень мРНК генов HSPA (медиана) в PBMC и в PMN у пациентов с БП по сравнению с ЗД.

Гены <i>HSPA</i> в PBMC	PD patients n=15	HD n=19	p-value
<i>HSPA8</i>	0.066	0.077	0.4
<i>HSPA1A/B</i>	0.0055	0.0035	0.04
<i>HSPA1A</i>	0.021	0.017	0.1
<i>HSPA1B</i>	0.002	0.002	0.9
<i>HSPA6</i>	0.0033	0.002	0.01
Гены <i>HSPA</i> в PMN	PD patients n=13	HD n=16	
<i>HSPA8</i>	0.014	0.015	0.8
<i>HSPA1A/B</i>	0.014	0.015	0.6
<i>HSPA1A</i>	0.058	0.055	0.4
<i>HSPA1B</i>	0.002	0.003	0.8
<i>HSPA6</i>	0.018	0.021	0.8

Таким образом, наблюдаемое увеличение относительной базальной транскрипционной активности генов *HSPA1A/B* и *HSPA6* при БП специфично только для PBMC, даже с учетом того, что в нестрессовых условиях PMN характеризовались более высоким уровнем базальной экспрессии генов *HSPA1A/B* и *HSPA6* (Рисунок 6).

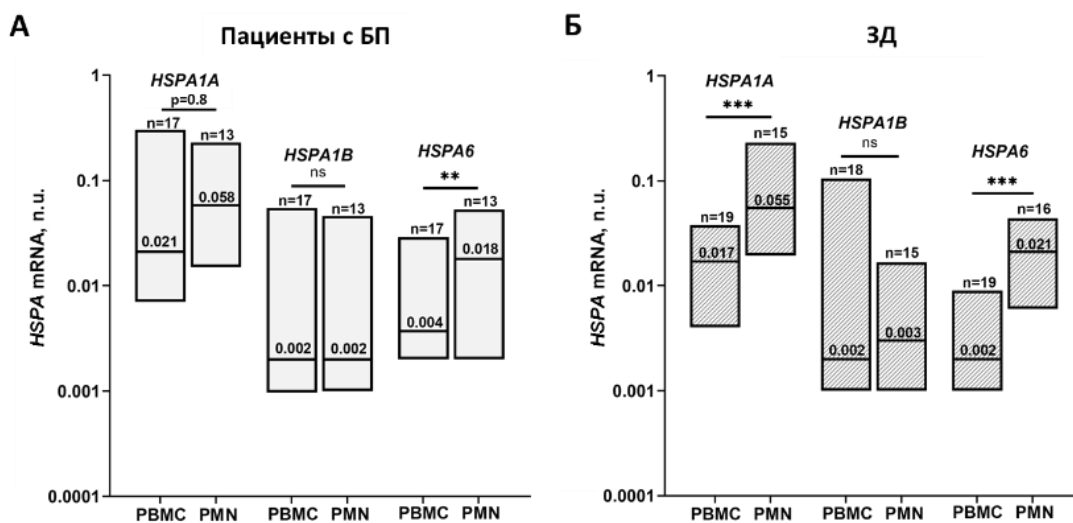


Рисунок 6. Сравнение базальной экспрессии стресс-индуцируемых генов *HSPA1A*, *HSPA1B* и *HSPA6* между популяциями PBMC и PMN. Анализ проведен у пациентов с БП (А), ЗД (Б). Сплошной линией обозначена медиана, верхняя и нижняя границы обозначают минимум и максимум, знак ns (not significant) отражает статистически недостоверные отличия. \*\*p < 0,01, \*\*\* p < 0,001.

## 2.4 Анализ содержания белка p62 в РВМС пациентов с БП и оценка уровня их спонтанного апоптоза в условиях *in vitro*

Для оценки аутофагии в РВМС был измерен базальный уровень белка p62 (Klionsky et al., 2021). Внутриклеточное содержание белка p62 было достоверно выше у пациентов с БП по сравнению с ЗД, что может свидетельствовать о регрессе аутофагического потока в РВМС при БП (Рисунок 7А). Поскольку аутофагия имеет решающее значение в индукции апоптоза (Boya et al., 2005) был проанализирован спонтанный апоптоз РВМС в исследуемых группах. Процентное содержание апоптотических клеток среди культивируемых *in vitro* РВМС было увеличено у пациентов с БП по сравнению с группой ЗД (Рисунок 7Б). Интересно, что у пациентов с БП выявлена умеренная положительная корреляция между базальным внутриклеточным содержанием белка p62 в РВМС и уровнем их спонтанного апоптоза в условиях *in vitro*, тогда как в группе ЗД такая взаимосвязь отсутствует (Рисунок 7 В, Г). Предположительно накопление белка p62 в РВМС пациентов с БП является предпосылкой для их апоптоза.

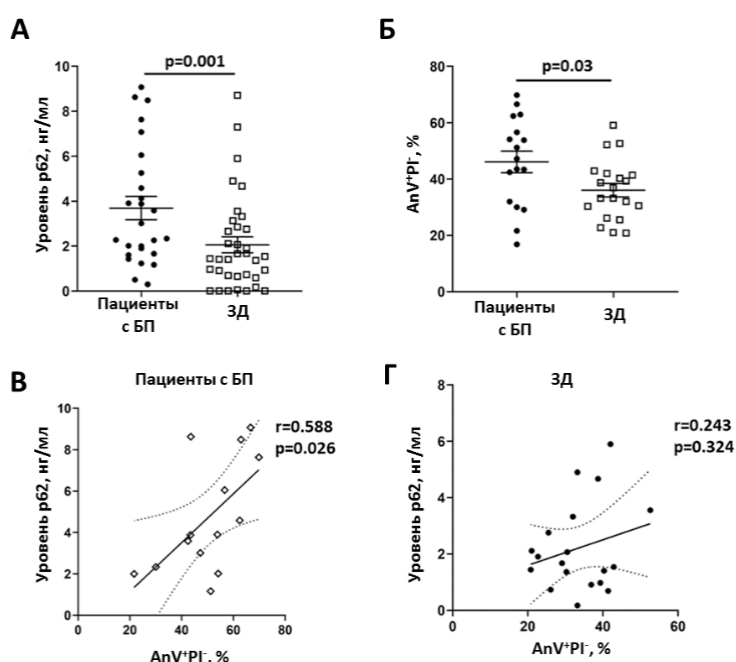


Рисунок 7. Внутриклеточный уровень белка p62 и процент спонтанного апоптоза в РВМС пациентов с БП, ЗД и их взаимосвязь. (А) Сравнение внутриклеточного уровня белка p62 (нг/мл) между пациентами с БП и группой ЗД. (Б) Процент апоптотических клеток среди РВМС в группах пациентов с БП и ЗД. (В) Анализ корреляции между процентным содержанием апоптотических клеток и уровнем p62 (нг/мл) в РВМС пациентов с БП и (Г) ЗД. Сплошной линией обозначено среднее значение ( $\pm$ SEM) (А, Б). В корреляционном анализе оценивали коэффициент корреляции Пирсона; пунктирной линией обозначен 95% доверительный интервал (В, Г).

## 2.5 Анализ диагностической значимости экспрессии стресс-ассоциированных генов HSPA и уровня белка p62 как дифференциальных биомаркеров БП

Чтобы оценить диагностическую значимость уровней мРНК генов *HSPA1A/B* и *HSPA6* и внутриклеточного уровня белка p62 в РВМС для различения людей с БП, был проведен анализ кривой рабочих характеристик приемника - receiver operating characteristic (ROC-анализ) и оценена площадь под ROC-кривой (AUC — the area under the ROC curve). AUC является важным статистическим показателем, который представляет собой вероятность правильного прогноза при наблюдении тестовой переменной (когда один объект случайным образом выбирается из группы наблюдений, а другой случайным

образом выбирается из контрольной группы). Уровень мРНК гена *HSPA1A/B* не позволял достоверно отличить пациентов с БП от ЗД из-за низкой специфичности (Рисунок 8).

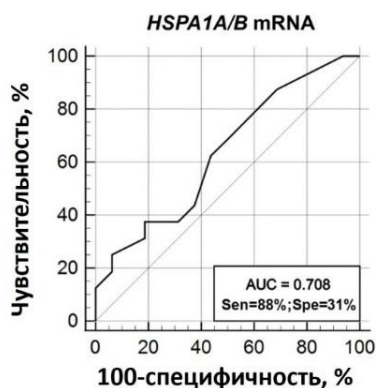


Рисунок 8. Биомаркер на основе мРНК гена *HSPA1A/B* в РВМС для выявления БП с чувствительностью 88,0% и специфичностью 31%.

Уровень мРНК *HSPA6* с пороговым нормализованным значением 0,003 и внутриклеточный уровень белка р62 с пороговым значением 1,9 нг/мл показали умеренную чувствительность и относительно низкую специфичность (Рисунок 9 А, Б). Затем был применен классификатор, основанный на методе «К ближайших соседей» – K Nearest Neighbors' (KNN), для комбинации двух потенциальных биомаркеров БП, внутриклеточного содержания белка р62 и уровня мРНК гена *HSPA6*. Анализ такой комбинации показал промежуточную чувствительность и высокую специфичность для дифференциальной диагностики БП (Рисунок 9В).

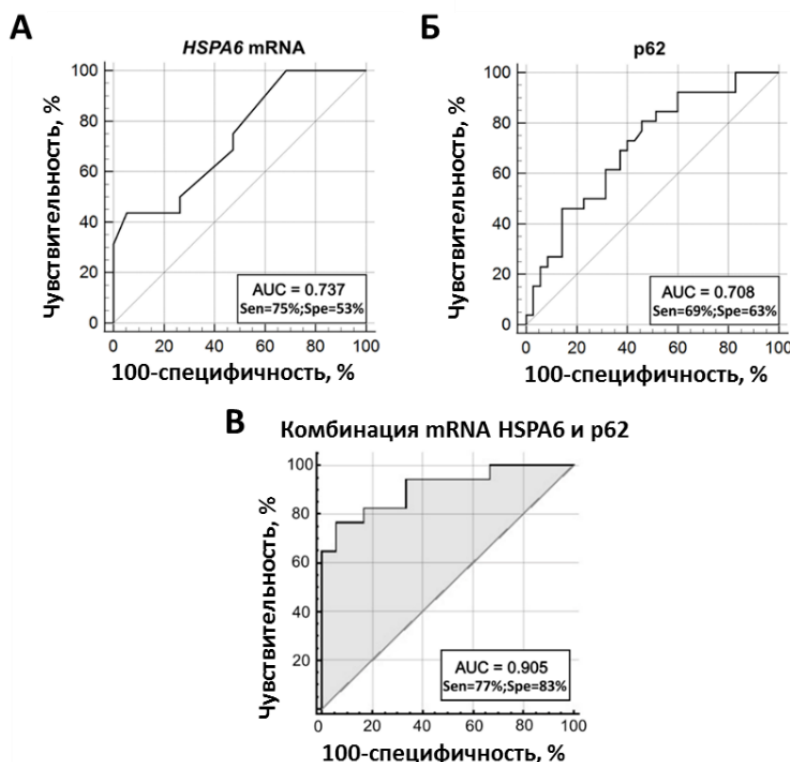


Рисунок 9. ROC-анализ, демонстрирующий уровень экспрессии генов группы *HSPA* и белка р62 в качестве потенциальных биомаркеров БП. (А) Уровень мРНК гена *HSPA6* в РВМС с 75,0% чувствительностью и 52,63% специфичностью. (Б) Уровень белка р62 в РВМС с 69,23% чувствительностью и 62,86% специфичностью. (с) Комбинация мРНК гена *HSPA6* и белка р62 с 77% чувствительностью и 83% специфичностью. AUC — the area under the ROC curve (площадь под ROC-кривой); Sen — чувствительность; Spe — специфичность.

Таким образом, основываясь на данных ROC-анализа можно заключить, что комбинация внутриклеточного содержания белка р62 и мРНК гена *HSPA6*, измеренных в РВМС, может рассматриваться в виде потенциальных биомаркеров БП на ранних/средних стадиях.

## 2.6 Сравнительный анализ распределения популяций Т-лимфоцитов и НК-клеток периферической крови у пациентов с БП и ЗД на фоне инфекции CMV

Известно, что инфекция CMV вызывает изменение субпопуляционного состава Т-клеток у здоровых доноров с накоплением более дифференцированных Т-лимфоцитов (Pourgheysari et al., 2007) и может выступать как потенциальный провокатор прогрессирования нейродегенерации при БП (Bu et al., 2015). Кроме того, CMV-инфекция вызывает значительную реконфигурацию репертуара НК-клеточных рецепторов, приводящую к накоплению так называемых адаптивно-подобных НК-клеток (Kovalenko et al., 2017). В связи с этим, в данном исследовании проанализирован серологический CMV-статус как пациентов с БП, так и здоровых лиц. Доля CMV-инфицированных индивидов составила 100% (31/31) в группе пациентов с БП и 76% (25/33) в группе ЗД ( $p=0,003$ ).

На первом этапе было проанализировано распределение популяций Т-лимфоцитов и НК-клеток с помощью метода проточной цитометрии в РВМС здоровых добровольцев, независимо от их серологического статуса CMV. Не выявлено существенных различий в пропорциях Т-клеток ( $CD3^+$ ), включая подмножества  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-клеток, и НК-клеток ( $CD3^-CD56^+$ ), между пациентами с БП и группой ЗД (Таблица 3). Так же не было обнаружено различий при сравнении тех же параметров между пациентами с БП и CMV-серопозитивными ЗД (Таблица 3).

Таблица 3. Процентное содержание Т-клеток ( $CD3^+$ ), включая субпопуляции  $CD4^+$  и  $CD8^+$ , и НК-клеток у пациентов с БП, группы ЗД и подгруппы CMV-серопозитивных ЗД.

Субпопуляция Пациенты (%)	Пациенты с БП		CMV-серопозитивные ЗД	p-уровень значимости	
	n=31	ЗД n=33		n=25	①vs②
	①	②	③		
$CD3^+$	$70.7 \pm 2.1$	$70.6 \pm 1.8$	$71.5 \pm 2.1$	0.9	0.7
$CD3^-CD56^+$	$13.9 \pm 1.7$	$12.1 \pm 1.3$	$11.8 \pm 1.5$	0.5	0.4
$CD3^+CD4^+CD8^-$	$66.6 \pm 1.9$	$63.5 \pm 1.9$	$63.6 \pm 2.4$	0.2	0.4
$CD3^+CD4^-CD8^+$	$25.5 \pm 1.5$	$27.9 \pm 1.8$	$28.76 \pm 2.3$	0.3	0.3

Значения представлены как среднее ( $\pm$ SEM), ①, ②, ③ - группы доноров. n- количество индивидов в группе.

Таким образом, не было выявлено каких-либо ассоциированных с БП изменений в общем содержании как Т-клеток ( $CD3^+$ ), так и их субпопуляций  $CD4^+$  и  $CD8^+$ , а также в содержании НК-клеток, на фоне инфекции CMV.

## 2.7 Анализ степени дифференцированности циркулирующих Т-клеток у пациентов с БП на фоне инфекции CMV

В группах пациентов с БП и ЗД была произведена оценка представленности Т-клеток на разных этапах дифференцировки с использованием следующей схемы разделения: наивные (naïve,  $CCR7^+CD45RA^+$ ), Т-клетки центральной памяти (TCM,  $CCR7^+CD45RA^-$ ), эффекторные Т-клетки памяти (TEM,  $CCR7^-CD45RA^-$ ) и эффекторные клетки памяти,

повторно экспрессирующие молекулу CD45RA (TEMRA, CCR7-CD45RA<sup>+</sup>). Стратегия гейтирования при анализе цитометрических данных представлена на рисунке 10.

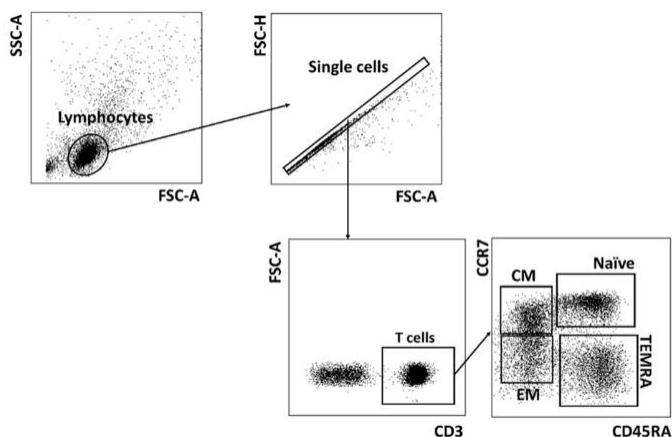


Рисунок 10. Стратегия гейтирования для субпопуляций Т-клеток (CD3<sup>+</sup>) на разных стадиях дифференцировки. Выделялись следующие субпопуляции: Naïve, TCM, TEM и TEMRA.

Доля CMV-негативных доноров в группе ЗД составила 24%, что соответствовало средней распространенности CMV-инфекций в общей популяции (Bate, Dollard and Cannon, 2010). В исследуемой репрезентативной когорте ЗД было обнаружено, что доля клеток TEMRA у CMV-серопозитивных доноров была выше, чем у CMV-серонегативных доноров (21,5% и 10,03% соответственно,  $p = 0,005$ ; принимая во внимание неравные выборки) (Рисунок 11А). Тем самым у ЗД продемонстрирован CMV-ассоциированный сдвиг дифференцировки Т-клеток в сторону клеток TEMRA.

Не было обнаружено существенных различий в доле наивных (naïve) Т-клеток и различных субпопуляций Т-клеток памяти (TCM, TEM, TEMRA) между пациентами с БП и группой ЗД (Таблица 5). Однако, доля клеток TEMRA была статистически значимо снижена у пациентов с БП по сравнению с CMV-серопозитивными индивидами из группы ЗД (рисунок 11Б, таблица 5). Различий в пропорциях наивных (naïve), TCM и TEM между пациентами с БП и CMV-серопозитивными ЗД не наблюдалось (Таблица 4).

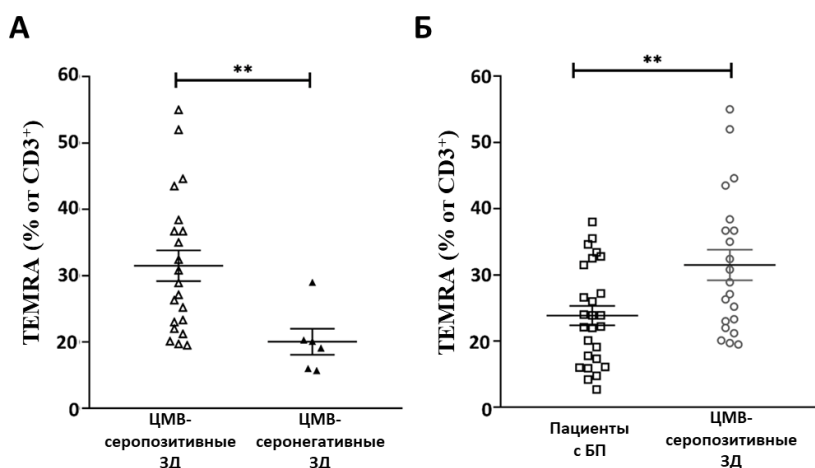


Рисунок 11. Доля клеток TEMRA в популяции CD3<sup>+</sup> клеток периферической крови. (А) доля клеток TEMRA у CMV-серопозитивных по сравнению с CMV-серонегативными индивидами из группы ЗД. (Б) Доля клеток TEMRA у пациентов с БП по сравнению с CMV-серопозитивными индивидами из группы ЗД. Сплошной линией обозначено среднее значение ( $\pm$ SEM). \*\* $p < 0,01$ .

Таблица 4. Процентное содержание наивных Т-клеток (naïve) и Т-клеток памяти (ТСМ, ТЕМ и ТЕМРА) в РВМС пациентов с БП по сравнению с ЗД и CMV-серопозитивными индивидами из группы ЗД.

Субпопуляция (% от Т-клеток)	Пациенты с БП		CMV- серопозитивные ЗД n=21	p-уровень значимости	
	с БП n=27 ①	ЗД n=27 ②		①vs②	①vs③
CCR7 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> (Naïve)	40.1 ± 2.8	37.3 ± 2.7	34.5 ± 3.1	0.5	0.1
CCR7 <sup>+</sup> CD45RA <sup>-</sup> (ТСМ)	29.8 ± 1.9	28.3 ± 1.9	28.4 ± 1.9	0.6	0.6
CCR7 <sup>-</sup> CD45RA <sup>-</sup> (ТЕМ)	15.0 ± 1.7	15.3 ± 1.1	15.4 ± 1.3	0.5	0.8
CCR7 <sup>-</sup> CD45RA <sup>+</sup> (ТЕМРА)	13.85 ± 1.8	18.95 ± 2.	21.50 ± 2.3	0.06	0.005

Значения представлены как среднее (±SEM), ①, ②, ③ - группы доноров. n-количество индивидов в группе.

## 2.8 Анализ экспрессии маркера терминальной дифференцировки CD57 и рецептора NKG2C в субпопуляциях CD56<sup>-</sup> и CD56<sup>+</sup> Т-клеток и НК-клеток у пациентов с БП

Фракция высокодифференцированных клеток ТЕМРА часто включает популяцию НКТ-подобных клеток с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> (далее CD56<sup>+</sup> Т-клетки). Известно о фенотипических и функциональных изменениях иммунных клеток во фракции CD56<sup>+</sup> у пациентов с различными инфекциями (Van Acker et al., 2017). В данной работе была произведена оценка распределения как CD56<sup>-</sup>, так и CD56<sup>+</sup> Т-клеток у пациентов с БП и ЗД. Стратегия гейтирования и репрезентативные данные доли CD57<sup>+</sup> клеток среди CD56<sup>-</sup> и CD56<sup>+</sup> Т-клеток одного донора показаны на рисунке 12.

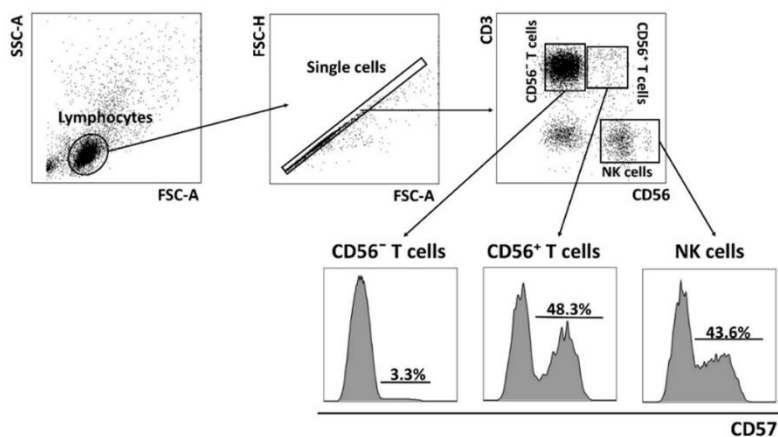


Рисунок 12. Анализ экспрессии маркера CD57 на Т- и НК-клетках. Представлена стратегия гейтирования и репрезентативное распределение CD57<sup>+</sup> клеток среди подмножеств CD56<sup>-</sup> и CD56<sup>+</sup> Т-клеток и НК-клеток.



Существенных различий в доле  $CD56^-$  и  $CD56^+$  Т-клеток между пациентами с БП и ЗД, а также CMV-серопозитивными ЗД выявлено не было (Таблица 5).

Известно, что при инфекции CMV увеличивается доля Т-клеток, экспрессирующих углеводный антиген CD57, являющийся маркером терминально дифференцированных, «стареющих» лимфоцитов (Xu and Larbi, 2017). Учитывая тот факт, что в данном исследовании все пациенты с БП были CMV-серопозитивными, была проанализирована доля  $CD57^+$  Т-клеток как во фракции  $CD56^-$ , так и в  $CD56^+$  Т-клеток. Доля  $CD57^+$  клеток среди всех  $CD3^+$  клеток не отличалась между основными группами сравнения (Рисунок 13А, таблица 5), но была снижена у пациентов с БП по сравнению с CMV-серопозитивными индивидами из группы ЗД (рисунок 13Б, таблица 5).

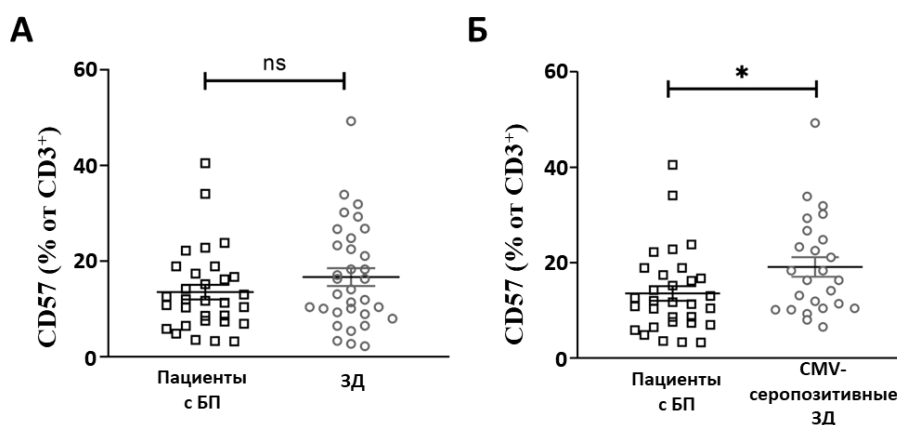


Рисунок 13. Сравнительный анализ процентного содержания  $CD57^+$  клеток в  $CD3^+$  Т-клетках. Сравнение проведено: (А) между пациентами с БП и всеми участниками из группы ЗД, включающей CMV-серопозитивных и CMV-серонегативных доноров; (Б) между пациентами с БП и только CMV-серопозитивными индивидами из группы ЗД. Сплошной линией обозначено среднее значение ( $\pm$ SEM). Знак ns (not significant) отражает статистически недостоверные отличия. \* $p < 0,05$ .

Затем более детально были проанализированы субпопуляции Т-клеток, в которых наблюдалось снижение количества  $CD57^+$  клеток. Было проведено сравнение процентного содержания  $CD57^+$  клеток в субпопуляциях  $CD56^-$  и  $CD56^+$  Т-клеток у CMV-серопозитивных и CMV-серонегативных индивидов из группы ЗД. Доля  $CD57^+CD56^-$  Т-клеток и  $CD57^+CD56^+$  Т-клеток у CMV-серопозитивных индивидов из группы ЗД была выше, чем у CMV-серонегативных (14,7 и 8,1;  $p = 0,01$ ; 70,7 и 48,1,  $p = 0,04$ , соответственно) (Рисунок 14А). В то же время, доли как  $CD57^+CD56^-$  Т-клеток, так и  $CD57^+CD56^+$  Т-клеток были ниже в группе пациентов с БП по сравнению с тем же показателем у CMV-серопозитивных индивидов из группы ЗД (Рисунок 14Б, таблица 5).

Поскольку персистирующая инфекция CMV в организме человека также связана с накоплением репликативно стареющих  $CD57^+$  адаптивно-подобных NK-клеток (Lopez-Vergès et al., 2011), мы проанализировали долю  $CD57^+$  среди NK-клеток в исследуемых когортах. Однако, у пациентов с БП не наблюдалось отклонений в пропорции  $CD57^+$ -экспрессирующих NK-клеток (Рисунок 14Б, таблица 5).



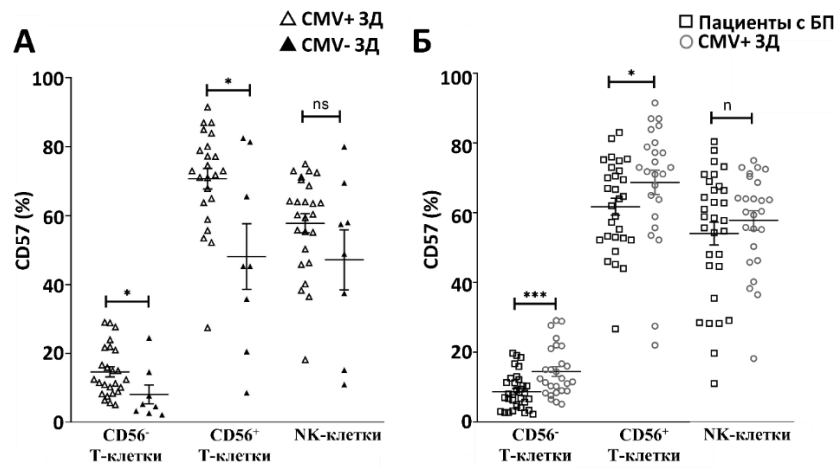


Рисунок 14. Сравнение процентного содержания  $CD57^+$  клеток в подмножествах  $CD56^-$ ,  $CD56^+$  Т-клеток и НК-клеток. Сравнение проведено: (А) между CMV-серопозитивными и CMV-серонегативными донорами из группы ЗД; (Б) между пациентами с БП и CMV-серопозитивными индивидами из группы ЗД. Сплошной линией обозначено среднее значение ( $\pm$ SEM). Знак ns (not significant) отражает статистически недостоверные отличия. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Ввиду отсутствия CMV-серонегативных индивидов с БП в исследуемой когорте, пациенты с БП были разделены на подгруппы с низкими и высокими значениями титров IgG к CMV. Были сформированы следующие подгруппы: пациенты с БП, имеющие низкий и высокий титр IgG к CMV; ЗД, имеющие низкий и высокий титр IgG к CMV (Рисунок 15А). Интересно, что в подгруппах пациентов с БП как с низким, так и с высоким уровнем CMV-специфических IgG наблюдалась сниженная доля  $CD57^+$  клеток в субпопуляции  $CD56^-$  Т-клеток по сравнению с подгруппами с низким и высоким уровнем IgG из группы ЗД (6,9 и 13,6,  $p = 0,02$ ; 9,3 и 15,9,  $p = 0,01$ , соответственно) (Рисунок 15Б). Однако, не было обнаружено различий в доле  $CD57^+$  клеток среди  $CD56^-$  Т-клеток между подгруппами с низким и высоким уровнем IgG к CMV между группой пациентов с БП и группой ЗД (6,9 и 9,3,  $p = 0,3$ ); (13,6 и 15,9,  $p = 0,4$ ) (Рисунок 15Б).

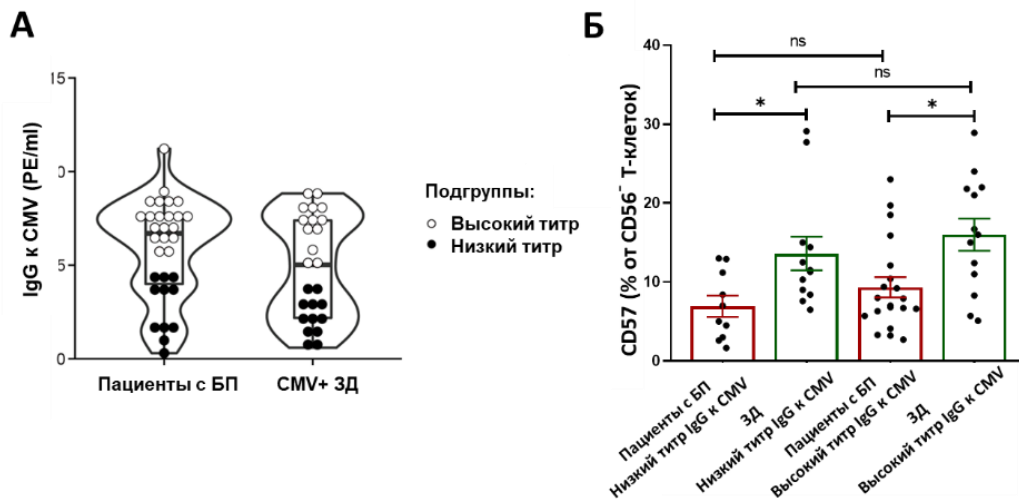


Рисунок 15. Анализ процентного содержания  $CD57^+$  Т-клеток при разделении участников исследования на подгруппы по значениям титров IgG к CMV среди пациентов с БП и ЗД. (А) Частотное распределение значений IgG к CMV у пациентов с БП и ЗД. (Б) Процентное содержание  $CD57^+$  клеток среди  $CD56^-$  Т-клеток у пациентов с БП и ЗД с низким и высоким титрами CMV-специфических IgG. Сплошной линией обозначено среднее значение ( $\pm$ SEM). Знак ns (not significant) отражает статистически недостоверные отличия. \* $p < 0,05$ .

Поскольку иммунный ответ на CMV часто приводит к накоплению Т- и адаптивно-подобных NK-клеток, экспрессирующих активирующий рецептор NKG2C (Lopez-Vergès et al., 2011), было проанализировано процентное содержание NKG2C<sup>+</sup> клеток во фракциях CD56<sup>-</sup> и CD56<sup>+</sup> Т-клеток и в NK-клетках у пациентов с БП и в группе ЗД. Как и ожидалось, доля NKG2C<sup>+</sup> среди NK-клеток была выше у CMV-серопозитивных по сравнению с CMV-серонегативными индивидами в группе ЗД (13,9 и 4,9, соответственно,  $p = 0,04$ ) (Рисунок 16А). Наблюдалась тенденция к повышенному уровню NKG2C-экспрессирующих Т-клеток, особенно в субпопуляции CD56<sup>+</sup> Т-клеток у CMV-серопозитивных индивидов из группы ЗД по сравнению с CMV-серонегативными донорами из той же группы. Однако различие было статистически недостоверным, возможно, из-за небольшого размера CMV-серонегативной группы (Рисунок 16А).

Затем было проведено сравнение доли клеток, экспрессирующих активирующий рецептор NKG2C, в субпопуляциях CD56<sup>-</sup> Т-клеток, CD56<sup>+</sup> Т-клеток и NK-клеток между группой пациентов с БП и группой ЗД. Доля NKG2C<sup>+</sup> NK-клеток была выше у пациентов с БП, чем в группе ЗД (Рисунок 16Б, таблица 5), что неудивительно, поскольку все участники исследования из группы БП были инфицированы CMV. В то же время, не было обнаружено различий в доле NKG2C<sup>+</sup> NK-клеток между CMV-серопозитивными индивидами из группы ЗД и группой пациентов с БП. Никаких различий в доле NKG2C<sup>+</sup> клеток в субпопуляциях CD56<sup>-</sup> и CD56<sup>+</sup> Т-клеток между CMV-серопозитивными индивидами из группы ЗД и пациентов с БП обнаружено не было (Рисунок 16В). Таким образом, индуцированное инфекцией CMV образование субпопуляций NK-клеток и Т-лимфоцитов, экспрессирующих NKG2C, не изменялось при БП.

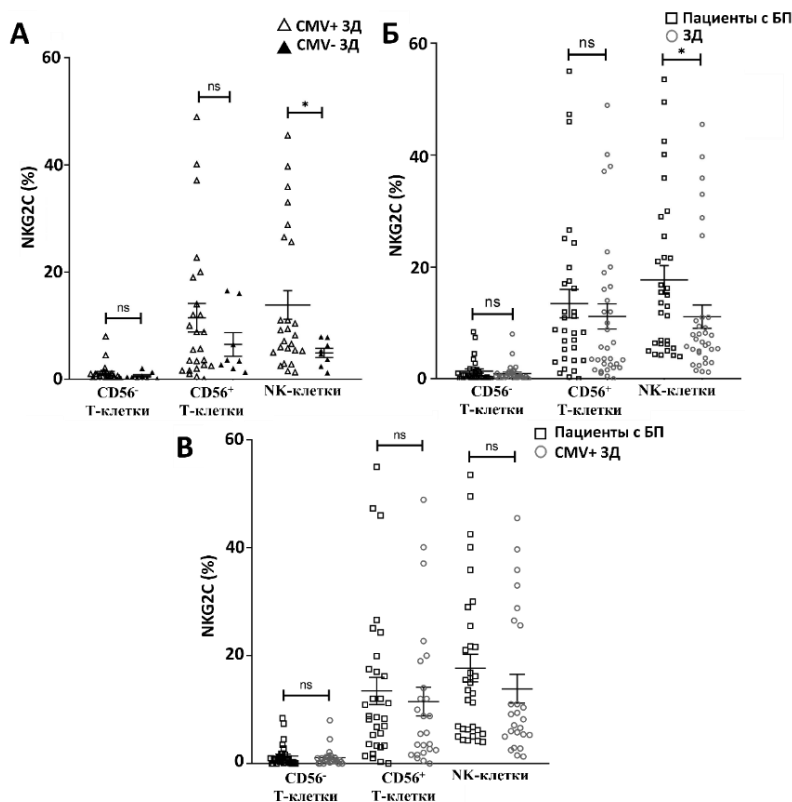


Рисунок 16. Процентное содержание NKG2C<sup>+</sup> клеток среди CD56<sup>-</sup> и CD56<sup>+</sup> Т-клеток и NK-клеток у CMV-серопозитивных и серонегативных доноров. Различия в доле NKG2C<sup>+</sup> клеток в CD56<sup>-</sup> и CD56<sup>+</sup> Т-клетках и NK-клетках между (А) CMV-серопозитивными и CMV-серонегативными индивидами из группы ЗД; (Б) между пациентами с БП и группой ЗД (CMV-сероположительные и CMV-отрицательные индивиды вместе взяты); (В) между пациентами с БП и CMV-серопозитивными донорами из группы ЗД. Сплошной линией обозначено среднее значение ( $\pm$ SEM). Знак ns (not significant) отражает статистически недостоверные отличия. \* $p < 0,05$ .

Таблица 5. Сравнение доли CD57<sup>+</sup> и NKG2C<sup>+</sup> клеток среди CD56<sup>-</sup>, CD56<sup>+</sup> Т-клеток и NK-клеток между пациентами с БП, группой ЗД и CMV-серопозитивными индивидами из группы ЗД.

Субпопуляции	Пациенты		CMV-серопозитивные ЗД n=25 ③	p-уровень значимости	
	с БП n=31 ①	ЗД n=33 ②		① vs ②	① vs ③
CD56 <sup>-</sup> Т-клетки	52.4 ± 2.2	52.9 ± 2.4	53.63 ± 2.7	0.9	0.6
CD56 <sup>+</sup> Т-клетки	3.9 ± 0.5	4.1 ± 0.6	4.7 ± 0.7	0.9	0.6
CD57 (% от CD3 <sup>+</sup> клеток)	13.52 ± 1.5	16.7 ± 1.9	19.1 ± 2.1	0.2	0.03
CD57 (% от CD56 <sup>+</sup> Т-клеток)	61.8 ± 2.4	62.1 ± 4.1	68.7 ± 3.5	0.3	0.03
CD57 (% от NK-клеток)	54.0 ± 3.2	55.2 ± 3.0	57.8 ± 2.8	0.8	0.5
NKG2C (% от CD56 <sup>-</sup> Т-клеток)	1.3 ± 0.4	0.9 ± 0.3	1.1 ± 0.3	0.3	0.6
NKG2C (% от CD56 <sup>+</sup> Т-клеток)	13.5 ± 2.5	11.6 ± 2.3	11.5 ± 2.5	0.5	0.6
NKG2C (% от NK-клеток)	17.7 ± 2.6	11.1 ± 2.1	13.8 ± 2.7	0.05	0.3

Значения представлены как среднее (±SEM), ①, ②, ③ - группы доноров. n-количество индивидов в группе.

## 2.9 Анализ доли CD57<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> Т-клеток в группе молодых здоровых доноров

Ввиду того, что на долю CD57-экспрессирующих как Т-, так и NK-клеток может влиять возраст человека (Pourgheysari et al., 2007), в исследование были дополнительно включены 30 молодых здоровых доноров (МД) (медиана возраста: 25 лет). 73% (22/30) индивидов из группы МД были серопозитивными по IgG к CMV, что достоверно отличалось от группы пациентов с БП по показателю CMV-серопозитивности (p = 0,001).

Аналогично проанализированной группе ЗД, доли CD57<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> и CD57<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> Т-клеток у CMV-серопозитивных индивидов из группы МД были выше по сравнению с CMV-серонегативными донорами (6,7 и 2,3, p = 0,01; 48,4 и 14,9, p = 0,0003, соответственно) (Рисунок 14А, рисунок 17А). Кроме того, было показано увеличение доли NKG2C<sup>+</sup> клеток во фракции CD56<sup>+</sup> Т-клеток и в NK-клетках у CMV-серопозитивных индивидов из группы МД по сравнению с CMV-серонегативными МД (18,9 и 3,6; p = 0,002; 17,8 и 5,6; p = 0,003, соответственно) (Рисунок 17Б).

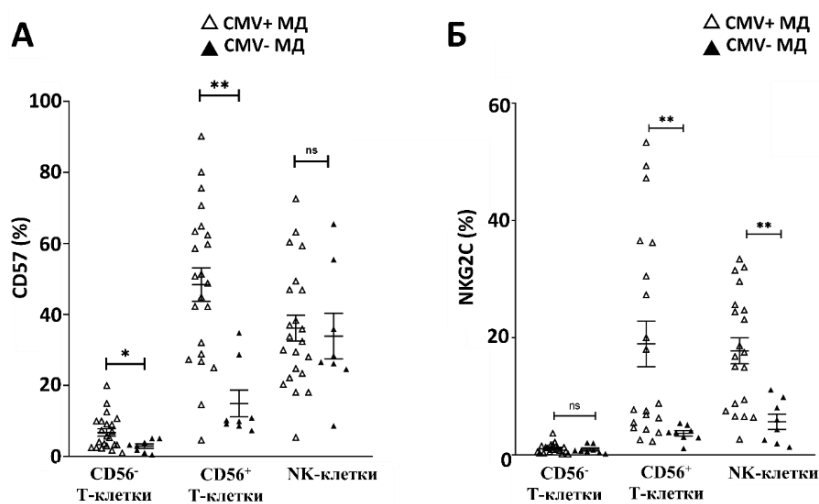


Рисунок 17. Доля клеток CD57<sup>+</sup> и NKG2C<sup>+</sup> у CMV-серопозитивных и CMV-серонегативных молодых здоровых доноров (МД). (А) Процентное содержание CD57<sup>+</sup> клеток во фракциях CD56<sup>-</sup> и CD56<sup>+</sup> Т-клеток и в NK-клетках; (Б) доля NKG2C<sup>+</sup> клеток в CD56<sup>-</sup> и CD56<sup>+</sup> Т-клетках и в популяции NK-клеток. Сплошной линией обозначено среднее значение ( $\pm$ SEM). Знак ns (not significant) отражает статистически недостоверные отличия. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

Как и ожидалось, доля CD57<sup>+</sup> клеток была ниже как в субпопуляции CD56<sup>-</sup>, так и в субпопуляции CD56<sup>+</sup> Т-клеток, а также в NK-клетках в группе МД по сравнению с группой пациентов с БП и группой ЗД (Рисунок 18А). Интересно, что не было никаких существенных различий в доле CD57-экспрессирующих CD56<sup>-</sup> Т-клеток у пациентов с БП по сравнению с CMV-серопозитивными индивидами из группы МД (7,0 и 5,5,  $p = 0,2$ ). В то же время, доли CD56<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> Т-клеток и CD57<sup>+</sup> NK-клеток оставались выше у пациентов с БП по сравнению с CMV-серопозитивными лицами из группы МД (61,8 и 48,4;  $p = 0,02$ ; 54,0 и 36,2;  $p = 0,0007$ , соответственно) (Рисунок 18Б). Таким образом, можно заключить, что у больных БП не наблюдалось феномена уменьшения доли CD56<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup> Т-клеток, опосредованного возрастом.

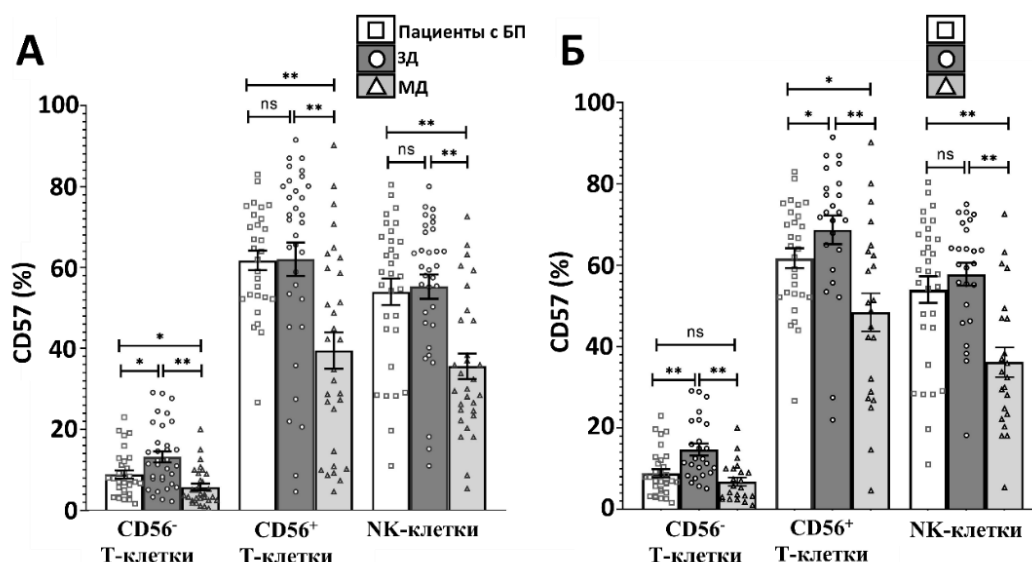


Рисунок 18. Процентное содержание CD57<sup>+</sup> клеток в субпопуляциях CD56<sup>-</sup> и CD56<sup>+</sup> Т- и NK-клеток у пациентов с БП, ЗД и МД в отношении персистенции CMV. Сравнение проведено: (А) в трех группах, включая CMV-серопозитивных и CMV-серонегативных индивидов; (Б) у пациентов с БП и CMV-серопозитивных индивидов из групп ЗД и МД. Сплошной линией обозначено среднее значение ( $\pm$ SEM). Знак ns (not significant) отражает статистически недостоверные отличия. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

### 3 Выводы

- 1) Показано, что болезнь Паркинсона характеризуется усилением транскрипционной активности стресс-индуцируемых генов *HSPA1A/B* и *HSPA6* в РВМС при отсутствии изменений внутриклеточного содержания белков семейства HSP70.
- 2) Продемонстрирована положительная взаимосвязь увеличения содержания основного белка аутофагии p62 в РВМС с повышенным уровнем спонтанного апоптоза в культуре РВМС *in vitro* у пациентов с БП.
- 3) Выявлена промежуточная чувствительность и высокая специфичность комбинации уровня белка p62 и уровня мРНК гена *HSPA6* в РВМС как биомаркера БП.
- 4) Установлено, что при БП отсутствует CMV-опосредованное увеличение доли терминально дифференцированных CD57<sup>+</sup> Т-клеток и эффекторных Т-клеток памяти, повторно экспрессирующих CD45RA (TEMRA).
- 5) У пациентов с БП не наблюдалось возраст-зависимого увеличения доли терминально дифференцированных CD56<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, поскольку процентное содержание этих клеток было соизмеримо с таковым в группе молодых здоровых добровольцев.

#### 4 Заключение

В рамках проведенной исследовательской работы было обнаружено, что в системе шаперонного гомеостаза и аутофагии в мононуклеарных клетках крови на фоне развития БП наблюдаются изменения. В РВМС пациентов с БП изменяется транскрипция стресс-индуцируемых генов группы *HSPA*, кодирующих белки-шапероны Hsp70, участвующие в процессе стабилизации и элиминации агрегированных белков, вовлеченных в патогенез БП. В исследовании системы аутофагии были зарегистрированы изменения в обороте белка p62, который также участвует в деградации неправильно свернутых белков при БП.

Очевидно, внутриклеточные уровни HSP70/Hsc70 и p62, связанные с протеостазом, в РВМС не являются надежными и специфическими маркерами БП по сравнению с их уровнями в черной субстанции головного мозга при БП. С другой стороны, повышенная экспрессия генов *HSPA1A/B* и *HSPA6* в РВМС может свидетельствовать о реакции клеток на стресс на фоне БП и, возможно, отражать процессы, происходящие в головном мозге.

Также было показано, что для БП характерно снижение периферического Т-клеточного иммуностарения даже на фоне инфекции CMV. Предположительно, развитию БП может способствовать клеточный иммунный ответ, формирующийся при предшествующих или сопутствующих вирусных инфекциях.

Указанные различия могут рассматриваться как потенциальные периферические биомаркеры развития БП, использование которых в клинической практике может расширить существующие подходы к диагностике и к анализу течения данного заболевания. К тому же, обнаруженные в данной работе изменения в периферических иммунных клетках у пациентов с БП, могут помочь определить направление дальнейших исследований аномалий иммунной системы при нейродегенеративных заболеваниях.

#### 4 Список работ, опубликованных по теме диссертации

##### Публикации в рецензируемых изданиях:

1. **Vavilova J.D.**, Boyko A.A., Ponomareva N.V., Fokin V.F., Fedotova E.Y., Streltsova M.A., Kust S.A., Grechikhina M.V., Bril E.V., Zimnyakova O.S., Kovalenko E.I., Sapozhnikov A.M. Reduced Immunosenescence of Peripheral Blood T Cells in Parkinson's Disease with CMV Infection Background. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(23):13119. <https://doi.org/10.3390/ijms222313119>
2. **Vavilova J.D.**, Boyko A.A., Troyanova N.I., Ponomareva N.V., Fokin V.F., Fedotova E.Y., Streltsova M.A., Kust S.A., Grechikhina M.V., Shustova O.A., Azhikina T.L., Kovalenko E.I., Sapozhnikov A.M. Alterations in Proteostasis System Components in Peripheral Blood Mononuclear Cells in Parkinson Disease: Focusing on the HSP70 and p62 Levels. *Biomolecules*. 2022; 12(4):493. <https://doi.org/10.3390/biom12040493>
3. **Вавилова Ю.Д.**, Бойко А.А., Коваленко Е.И., Гречихина М.В., Шустова О.А., Ажикина Т.Л., Сапожников А.М. Анализ ассоциации полиморфизма генов CLIC1, MSH5, C6orf26, C6orf25 с уровнем экспрессии гена HSPA1B. *Медицинская иммунология*. 2020; 22(4):779-784. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-AOT-1629>
4. Boyko A.A., Troyanova N.I., **Teterina J.D.**, Azhikina T.L., Vetchinin S.S., Kovalenko E.I., Sapozhnikov A.M. // Features of Stress-Induced Changes of HSP70 Expression in Populations of Immunocompetent Cells // Springer International Publishing AG, part of Springer Nature 2018, A. A. A. Asea, P. Kaur (eds.), *Heat Shock Proteins and Stress*, Heat Shock Proteins 15, 79-94. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-90725-3\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-90725-3_4)

##### Тезисы:

1. **Vavilova J.D.**, Boyko A.A., Grechikhina M.V., Kovalenko E.I., Sapozhnikov A.M. // FEBS Open Bio, 2021, 463. // Phenotypic changes in peripheral blood T lymphocytes in patients with Parkinson's disease.
2. **Vavilova J.D.**, Boyko A.A., Grechikhina M.V., Erokhina S.A., Streltsova M.A., Kovalenko E.I., Sapozhnikov A.M. // Conference: 6th European Congress of Immunology. Abstracts. Location Virtual. Date September 14, 2021, Eur. J. Immunol. 2021. 51, S1, 336. P0951. // The populations of peripheral blood T lymphocytes at different stages of differentiation in patients with Parkinson's disease.
3. **Вавилова Ю.Д.**, Бойко А.А., Стрельцова М.А., Ерохина С.А., Коваленко Е.И., Сапожников А.М. // XXXIII Зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", 2021, Москва. Тезисы докладов и стендовых сообщений, с. 194. // Отсутствие характерных возрастных фенотипических изменений в популяции Т-лимфоцитов периферической крови при болезни Паркинсона.
4. **Вавилова Ю.Д.**, Бойко А.А., Троянова Н.И., Гречихина М.В., Шустова О.А., Коваленко Е.И., Сапожников А.М. // XXXII Зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", 2020, Москва. Тезисы докладов и стендовых сообщений, с. 6. // Фенотипические изменения Т-лимфоцитов периферической крови у пациентов с болезнью Паркинсона.
5. **Тетерина Ю.Д.**, Бойко А.А., Троянова Н.И., Гречихина М.В., Шустова О.А., Коваленко Е.И., Сапожников А.М. // XXXI Зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", 2019, Москва. Тезисы докладов и стендовых сообщений, с. 166. // Сравнительный анализ апоптоза лейкоцитов периферической крови у пациентов с болезнью Паркинсона и здоровых доноров.

6. **Teterina J.D.**, Boyko A.A., Shustova O.A., Grechikhina M.V., Doronina E.V, Troyanova N.I., Kovalenko E.I., Sapozhnikov A.M. // Cell Death Discovery, 2019 // <https://doi.org/10.1038/s41420-018-0128-4> // Selected abstracts from the 26th Conference of the European Cell Death Organization (ECDO): Cell death in disease — from small molecules to translational medicine // A comparative study of apoptosis in peripheral blood leukocytes in patients with Parkinson's disease and healthy donors
7. **Teterina J.D.**, Boyko A.A., Troyanova N.I., Grechikhina M.V., Azhikina T.L., Kovalenko E.I., Sapozhnikov A.M. // Neurochemical Journal, 2018, Vol. 12, No. 4 // SUPPLEMENTARY MATERIALS The Biochemical Model of the Synapse in Turpaev's Studies D. A. Sakharov // Analysis of relationship of HSP70 expression in population of peripheral blood leukocytes with the course of Parkinson's disease.
8. **Teterina J.D.**, Boyko A.A., Shustova O.A., Grechikhina M.V., Doronina E.V., Troyanova N.I., Kovalenko E.I., Sapozhnikov A.M., // Biomembranes 2018, Dolgoprudny. Book of abstracts, p. 124. Journal of Bioenergetics and Biomembranes // <https://doi.org/10.1007/s10863-018-9775-7> // Parkinson's disease dependent alterations of phenotype of peripheral blood lymphocytes.