

**Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ИБХ РАН)**

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

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор
Сапожников Александр Михайлович

Москва, 2023 г.

Оглавление	
Список сокращений	4
Введение.....	6
1. Обзор литературы	13
1.1. Болезнь Паркинсона. Патогенез.....	13
1.1.1. α -Синуклен как главный патогенетический фактор развития БП	14
1.2. Клеточный протеостаз при БП.....	15
1.2.1. Белки теплового шока.....	17
1.2.2. Семейство HSP70 при БП.....	18
1.2.3 Шаперон-опосредованная аутофагия при БП	19
1.2.4. Макроаутофагия при БП.....	20
1.3. Биохимические биомаркеры БП в периферической крови	23
1.4. Роль системного и локального воспаления в патогенезе БП.....	26
1.5. Иммуностарение на фоне инфекции CMV	29
1.5.1. CMV и БП	33
2. Материалы и методы	36
2.2. Пациенты и этический комитет	36
2.3. Моноклональные антитела	37
2.4. Выделение РВМС из периферической донорской крови и подготовка образцов	38
2.5. Цитометрический анализ поверхностных маркеров лимфоцитов	38
2.6. Цитометрический анализ внутриклеточного уровня HSP70	39
2.7. Цитометрический анализ апоптоза РВМС.....	39
2.8. Экстракция РНК, синтез кДНК и измерение транскрипции генов группы <i>HSPA</i> методом qRT-PCR в PMN и РВМС.....	40
2.9. Измерение серологического статуса CMV	42
2.10. Иммуноферментный анализ р62.....	42
2.11. Статистическая обработка данных	42
3. Результаты	44
3.1. Оценка внутриклеточного содержания пула HSP70 в РВМС у пациентов с БП.....	44

3.2. Анализ транскрипционной активности генов <i>HSPA</i> в РВМС у пациентов с БП	47
3.3. Анализ содержания белка р62 в РВМС пациентов с БП и оценка уровня их спонтанного апоптоза в условиях <i>in vitro</i>	51
3.4. Анализ диагностической значимости экспрессии стресс-ассоциированных генов <i>HSPA</i> и уровня белка р62 как дифференциальных биомаркеров БП	52
3.5. Сравнительный анализ распределения популяций Т-лимфоцитов и НК-клеток периферической крови у пациентов с БП и ЗД на фоне инфекции CMV.....	55
3.6. Анализ степени дифференцированности циркулирующих Т-клеток у пациентов с БП на фоне инфекции CMV	56
3.7. Анализ экспрессии маркера терминальной дифференцировки CD57 и рецептора NKG2C в субпопуляциях CD56 ⁻ и CD56 ⁺ Т-клеток и НК-клеток у пациентов с БП.....	59
3.8. Анализ доли CD57 ⁺ CD56 ⁻ Т-клеток в группе молодых здоровых доноров.....	66
4. Обсуждение результатов.....	69
Выводы	79
Заключение	80
Благодарности.....	81
Список литературы	82
Приложение	100

Список сокращений

БП – болезнь Паркинсона

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДМСО – диметилсульфоксид

ЗД – здоровые доноры, сопоставимые по возрасту с группой пациентов с БП

кДНК – комплементарная цепь ДНК

МД – здоровые молодые доноры

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ТЛ – тельцами Леви

ФНО – фактор некроза опухоли

ЦНС – центральная нервная система

АРС – allophycosyanin (аллофикоцианин)

Atg – autophagy related (связанные с аутофагией)

CMV – cytomegalovirus (цитомегаловирус)

FITC – fluorescein isothiocyanate (флуоресцеинизотиоцианат)

HIV – human immunodeficiency virus (вирус *иммунодефицита* человека)

HSPs – heat shock proteins (семейство белков теплового шока)

HSP70 – heat shock proteins 70 (белки-шапероны семейства 70 кДа)

Hsc70 – heat shock cognate protein 70 (конститутивный белок-шаперон семейства 70 кДа)

Hsp70 – heat shock protein 70 (индуцируемые белки-шапероны семейства 70 кДа)

LAMP2A – lysosomal-associated membrane protein 2 (связанный с мембраной лизосомы белок 2)

LC3 – microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (ассоциированный с микротрубочками цитозольный белок)

ROC – receiver operating characteristic

PBMC – peripheral blood mononuclear cells (мононуклеарные клетки периферической крови)

PBS – phosphate buffered saline (натрий-фосфатный буфер, pH 7.2)

PE – phycoerythrin (фикоэритрин)

PMN – polymorphonuclear neutrophils (полиморфноядерные нейтрофилы)

Введение

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) [1–3]. 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% [4]. Несмотря на многочисленные исследования этиологии и патогенеза, применяемые методы диагностики недостаточно оптимальны и не учитывают особенности каждого пациента, 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. В настоящее время для диагностики БП не рекомендуется применять единственный биомаркер, однако, в перспективе, их можно рационально комбинировать [5].

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 [6–9]. В литературе имеются свидетельства, указывающие на возможную ассоциацию БП с инфекционной нагрузкой таких распространенных патогенов как цитомегаловирус (CMV), вирус простого герпеса типа 1, *Chlamydomphila pneumonia*, *Borrelia burgdorferi* и *Helicobacter pylori* [10].

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-индуцированных 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⁻CD57⁺ 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

которого 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 как периферической иммунной системы, так и процессов в ЦНС, связанных с нейродегенеративными заболеваниями.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Транскрипционная активность стресс-индуцированных 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⁺ 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 5th European Congress of Immunology (2018, Амстердам, Нидерланды); международная конференция по апоптозу the 26th 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 6th European Congress of Immunology (2021, Location Virtual).

По материалам работы опубликовано 4 статьи в рецензируемых журналах и 8 тезисов.

Статьи в рецензируемых журналах:

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, 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. Phenotypic changes in peripheral blood T lymphocytes in patients with Parkinson's disease. FEBS Open Bio (2021), 463.
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 1- 4, 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.

1. Обзор литературы

1.1. Болезнь Паркинсона. Патогенез

Болезнь Паркинсона (БП) - нейродегенеративное двигательное заболевание, затрагивающее население всего мира, по распространенности занимающее второе место после болезни Альцгеймера. Данное заболевание было впервые описано Джеймсом Паркинсоном в 1817 году в публикации «Эссе о дрожащем параличе» [11]. Клинически БП характеризуется замедленностью движений (брадикинезией), тремором покоя, мышечной ригидностью, постуральной нестабильностью, нарушением баланса и координации. Брадикинезия является основным диагностически-значимым клиническим симптомом БП [12]. Помимо нарушений двигательной активности, многие пациенты испытывают широкий спектр немоторных симптомов, таких как гипосмия, нарушения сна (быстрое движение глаз во время сна), депрессия, запор и другие вегетативные нарушения [13], которые иногда предшествуют типичному двигательному расстройству.

Существует две формы БП: семейная и спорадическая. Семейная форма БП составляет 10–12% случаев, наследуется и развивается в раннем (до 45 лет) возрасте. Однако чаще встречается спорадическая (идиопатическая) форма БП, причины возникновения которой определяются сложными взаимосвязями между генетической предрасположенностью организма и факторами окружающей среды [14]. Спорадическая форма БП является исключительно возрастным заболеванием. Примерно 1% людей старше 60 лет страдают БП, а в возрасте 80 лет распространенность возрастает до 3% [15]. В развитых странах ежегодный прирост заболеваемости составляет 14 случаев на 100 000 человек в общей популяции, а для лиц старше 65 лет 160 случаев на 100 000 человек [16]. На сегодняшний день старение представляет собой наиболее значимый фактор риска развития БП [17].

1.1.1. α -Синуклен как главный патогенетический фактор развития БП

БП характеризуется дегенерацией дофаминергических нейронов в черной субстанции (*substantia nigra*), а именно в части *Pars compacta* среднего мозга, что приводит к снижению выработки нейромедиатора дофамина и к появлению первичных двигательных симптомов заболевания. Процессу нейродегенерации предшествует накопление в нейронах внутриклеточных белковых цитоплазматических включений, называемых тельцами Леви (ТЛ) [18]. ТЛ представляют собой внутринейрональные круглые эозинофильные включения с гиалиновым ядром и бледным периферическим ореолом, могут состоять из более чем 90 белков [19]. Однако основными компонентами ТЛ являются белки – α -синуклеин и убиквитин [18]. α -Синуклеин представляет собой белок состоящий 140 аминокислот. Он довольно распространен в нейронах в головного мозга (1% цитозольного белка) и локализуется пресинаптических окончаниях, непосредственной близости от синаптических пузырьков, поэтому, предполагается, что его основная роль заключается в контроле высвобождения нейромедиаторов [20]. По-видимому, в норме, в нейронах α -синуклеин существует в равновесии между различными конформационными и/или олигомерными состояниями [21] (Рисунок 1).

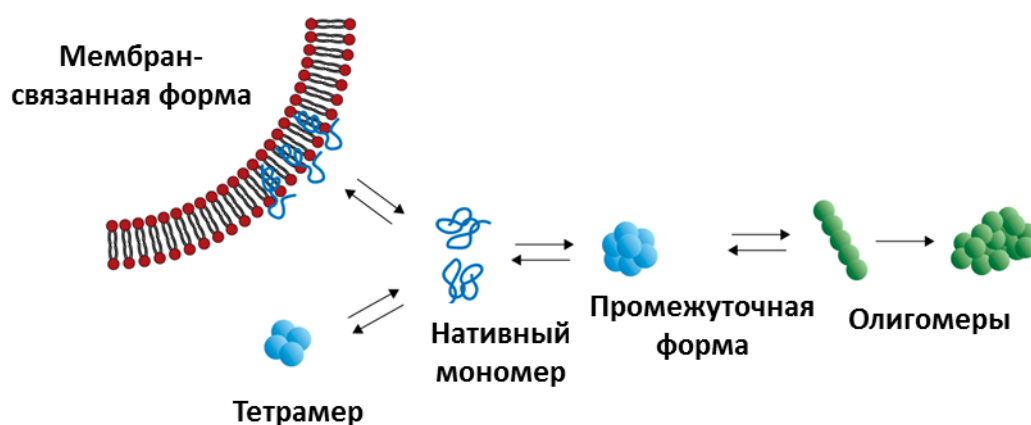


Рисунок 1. Конформационные варианты α -синуклеина.

В моделях *in vitro* было показано, что окислительный стресс [22], посттрансляционные модификации (укорочение, ацетилирование, фосфорилирование, окисление, нитрозилирование, гликирование или гликозилирование) [23], протеолиз [24], жирные кислоты [25], фосфолипиды и ионы металлов [22] модулируют структуру α -синуклеина и индуцируют его олигомеризацию и накопление в ТЛ [23].

Несмотря на то, что α -синуклеин считается внутриклеточным белком, было показано, что он способен к переносу между клетками, и, было предположено, что α -синуклеин обладает прионоподобным механизмом, действующем при прогрессировании БП [26]. Отложение α -синуклеина играет ключевую роль в патогенезе синуклеинопатий, включающих БП, связанного с токсическим действием олигомеризированного α -синуклеина в составе амилоидных структур на нейрональные клетки [27]. Токсичность α -синуклеина проявляется через разные механизмы: это белок может изменять функции митохондрий и эндоплазматического ретикулума, транспорта в комплексе Гольджи и нарушать процесс аутофагии в различных модельных системах [20].

1.2. Клеточный протеостаз при БП

Нативная конформация клеточных белков кодируется их аминокислотными последовательностями, однако многие белки нуждаются в «доработке» с помощью молекулярных шаперонов в биологически релевантное состояние [28]. С другой стороны, при невозможности рефолдинга или необходимости снизить количество внутриклеточных белков в норме должна работать система деградации и утилизации белков. Таким образом, поддержание интактного протеома (протеостаз), требует не только строгого контроля начальной продукции и фолдинга белка, но и поддержания его конформации, контроля количества и внутриклеточной локализации и, наконец, удаления путем протеолитической деградации [29].

Существует несколько систем клеточного протеостаза в клетках млекопитающих: система молекулярных шаперонов, убиквитин-протеасомная система и три типа аутофагии: макроаутофагия, микроаутофагия и шаперон-опосредованная аутофагия [30,31] (Рисунок 2). Баланс этих систем влияет на правильное функционирование механизмов синтеза/модификации/транспорта белков, начиная с формирующихся полипептидов и заканчивая утилизацией поврежденных или ненужных белков. В итоге стареющие клетки, параллельно с накоплением дефектных белков, постепенно утрачивают механизмы протеостаза, что приводит к дегенерации клеток, ряду возрастных патологий и, в конечном счете, к гибели [32].

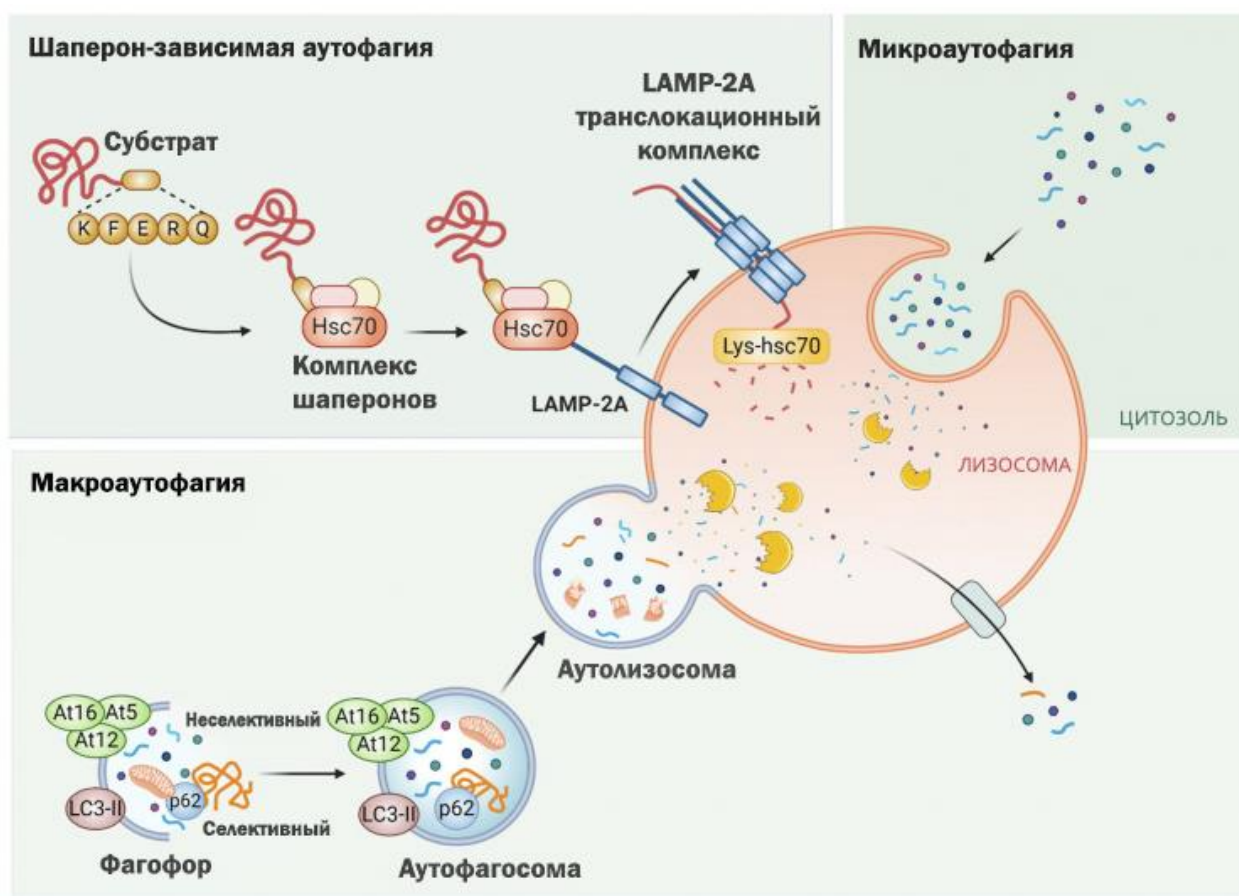


Рисунок 2. Схематическое изображение трех типов внутриклеточной аутофагии: шаперон-опосредованная аутофагия, микроаутофагия и макроаутофагия. С частичными изменениями из: Andrade-Tomaz M. et al. The Role of Chaperone-Mediated Autophagy in Cell Cycle Control and Its Implications in Cancer // Cells. 2020. Vol. 9, № 9

1.2.1. Белки теплового шока

Одной из систем, обеспечивающей внутриклеточный протеостаз является система белков теплового шока (HSPs), и, в частности, HSP70, осуществляющих фолдинг, рефолдинг, деградацию и элиминацию белковых субстратов [33,34]. У человека, в состав этого семейства HSP70 входят несколько белков с молекулярной массой 66-78 кДа, в большей степени гомологичных между собой, но кодируемых разными генами *HSPA* (<http://www.genenames.org>). Наиболее распространенным в клетке белком семейства HSP70 является конститутивно экспрессирующийся белок Hsc70, продукт гена *HSPA8*. Также пул HSP70 включает органелл-специфические белки: митохондриальный HSP75/mortalin и ассоциированный с эндоплазматическим ретикуломом ER/HSP78/BIP [35]. Помимо Hsc70, важную роль в клетке играют стресс-индуцированные HSP70: превалирующий в клетке Hsp70-1 и минорный Hsp70B'. Среди Hsp70-1 различают две белковые изоформы, Hsp70-1a и Hsp70-1b, отличающиеся друг от друга двумя аминокислотами, и кодируемые генами *HSPA1A* и *HSPA1B*, соответственно. Эти изоформы считаются взаимозаменяемыми по своим функциям из-за сходства их генных структур [36]. Базальная экспрессия генов *HSPA1A* и *HSPA1B* имеет различную интенсивность в тканях организма, однако сходные базовые уровни мРНК *HSPA1A* регистрировали в клетках крови и головного мозга [37]. Другой стресс-индуцированный белок семейства HSP70 — Hsp70B', кодируется геном *HSPA6*. Ген *HSPA6* встречается только в геноме человека и поэтому не изучался на животных моделях нейродегенеративных заболеваний [38]. Интересно, что белок Hsp70B' не обнаруживается в интактных клетках, и его экспрессия гораздо более тесно связана со стрессом по сравнению с другими стресс-индуцированными белками семейства HSP70, особенно при гипертермии [39]. В нервной ткани головного мозга белки теплового шока (HSPs) экспрессируются при патологических состояниях, таких как ишемия, нейродегенерация, эпилепсия, травма и другие [40]. Было обнаружено что Hsp70 защищает клетки при

болезни Гентингтона, удаляя/изолируя два внутриклеточных компонента белковых агрегатов: полиглутаминовые цепи мутантного белка гентингтина и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы [41]. Также было показано, что Hsp70 предотвращает агрегацию окисленного GAPDH и снижает вызванную гипоксией гибель клеток глиобластомы крысы [42].

Помимо белков-шаперонов HSP70, существуют белки HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 и HSP27, экспрессия которых обнаруживалась в нейронах, клетках глии и эндотелиальных клетках в ответ на гипертермию [43].

1.2.2. Семейство HSP70 при БП

Продемонстрированы защитные функции для внутриклеточных и экзогенно добавленных HSP70 при индуцированной α -синуклеином токсичности как *in vitro*, так и *in vivo*. Филаменты α -синуклеина способны связываться с протеасомой и избирательно препятствовать ее активности *in vitro*, тогда как рекомбинантный человеческий HSP70 был способен связывать α -синуклеиновые филаменты и ослаблять их ингибирующую активность. Вместе с тем, в условиях гипертермии прослеживается положительная корреляция между экспрессией HSP70 в фибробластах, продуцирующих α -синуклеин, и усилением протеосомной активности [44].

HSP70 могут секретироваться клетками во внеклеточное пространство и способствовать устойчивости клеток к стрессу вследствие связывания с чувствительными клетками-реципиентами. Например, HSP70 может секретироваться глиальными клетками, а затем захватываться соседними нейронами [45,46]. Возможно, это происходит из-за дефицита экспрессии HSP70 в нейронах, вследствие нарушения их транскрипции их. Было показано, что цитоплазма нейронов в области синапса может иметь дефицит в HSPs из-за снижения их синтеза *de novo* и недостаточно быстрой доставки их в область синапса [47]. Одним из решений этой проблемы может быть синтез HSPs глиальными клетками, находящимися рядом с синапсом. Такие клетки высвобождают белки HSPs во внеклеточную жидкость для их дальнейшего поглощения их нейронами [46,48]. До конца этот процесс секреции HSPs

глиальными клетками и поглощения их нейронами не изучен, однако есть предположения, что захваченные нейронами HSPs проявляют в них свои цитопротективные свойства и обеспечивают защиту от программированной клеточной гибели (апоптоза) [49]. Например, на клеточной модели БП была продемонстрирована нейропротективная роль белков HSP70 [50,51]. Интересно, что при нокдауне гена *HSPA1A*, кодирующего стресс-индуцированный белок Hsp70-1 - в дофаминергических нейронах черной субстанции зарегистрировано почти двукратное увеличение гибели нейронов. Фармакологическая активация фактора транскрипции генов *HSPA* и усиленная экспрессия стресс-индуцируемого белка Hsp70 приводила к увеличению числа нейронов и предотвращала двигательные нарушения экспериментальных животных [52].

Как описано выше, внутриклеточное увеличение α -синуклеина способствует прогрессии БП. Однако вопрос о способе деградации α -синуклеина в нейронах остается спорным. Предполагается, что и убиквитин-протеасомная система, и система аутофагии, (главным образом макроаутофагия и шаперон-опосредованная аутофагия), вносят вклад в обмен α -синуклеина [53].

1.2.3 Шаперон-опосредованная аутофагия при БП

При шаперон-опосредованной аутофагии (chaperone mediated autophagy (CMA)) происходит направленный транспорт частично денатурировавшихся белков из цитоплазмы в лизосомы для их дальнейшей деградации/протеолиза. Для CMA характерна выборочная утилизация белков с представленным на них мотивом KFERQ, распознающимся белком Hsc70 и обнаружена пока только у млекопитающих [34]. Так, с помощью Hsc70, происходит направленная доставка белков на лизосомальную мембрану, где белок разворачивается и транслоцируется внутрь лизосом с помощью белка мембраны лизосом LAMP2A [54] (Рисунок 2).

Было продемонстрировано, что α -синуклеин дикого типа эффективно разлагается в лизосомах с помощью СМА, но при наличии мутаций в генах, кодирующих этот белок, его способность деградировать с помощью этой системы снижается, несмотря на высокое сродство к рецептору [55]. Мутантный α -синуклеин может блокировать лизосомальное поглощение и деградацию других субстратов, утилизирующихся тем же способом. Блокада СМА приводит к компенсаторной активации макроаутофагии, которая в условиях стресса не может поддерживать достаточную деградацию внутриклеточных белков. Таким образом, мутантный α -синуклеин ингибирует деградацию других долгоживущих цитозольных белков, что может способствовать дополнительному клеточному стрессу [56]. В посмертных образцах головного мозга пациентов с БП уровень экспрессии связанных с СМА белков LAMP2A и Hsc70 был значительно снижен, а тельца Леви в тех же образцах содержали белки, связанные с аутофагией. Это свидетельствует о снижении активности СМА в головном мозге при БП и подтверждает роль аутофагии в патогенезе этого заболевания и формировании ТЛ [57].

1.2.4. Макроаутофагия при БП

Известно, что при недостаточности СМА, происходит усиление макроаутофагии [58]. Макроаутофагия (далее аутофагия) – эволюционно древний способ деградации поврежденных органелл и белков в эукариотических клетках, от дрожжей до млекопитающих. Основные белки, вовлеченные в аутофагию – это связанные с аутофагией белки – Atg (от autophagy related). С их помощью происходят стадии инициации, элонгации, созревания и слияния аутофагосом [59,60]. Иницируется аутофагия посредством взаимодействия двух внутриклеточных систем, подобных системе конъюгации убиквитина. В первую систему входит взаимодействие белков Atg5-Atg12, важную роль в которой играет белок Atg7, активирующий убиквитин-подобный белок Atg12. Затем, белок Atg12 транспортируется на белок Atg10 и ковалентно связывается с белком Atg5 [61,62]. Вместе, белки

Atg12 и Atg5 образуют комплекс с белком Atg16 (Atg12-Atg5-Atg16), участвующий в дальнейшем удлинении фагофоры. После формирования аутофагосомы этот комплекс диссоциирует [63]. Во вторую систему входит ассоциированный с микротрубочками цитозольный белок с фосфатидилэтаноламином (LC3-II), который посттрансляционно расщепляется протеазой Atg4 для образования цитозольной формы LC3-I. Затем LC3-I конъюгируется с PE при помощи белков Atg7 и Atg3. Исходом второй реакции является образование связанной с аутофагосомой формы LC3-II [64,65]. Связанный с мембраной фагофор LC3-II необходим для их расширения и закрытия с последующим формированием аутофагосом. Важно, что LC3-II остается конъюгированным с аутофагосомами на протяжении всего их существования [66]. Следовательно, уровень LC3-II коррелирует с внутриклеточным количеством аутофагосом [64]. Затем, находящийся внутри аутофагосомы LC3-II, деградирует внутри аутолизосомы, тогда как LC3-II внешней мембраны аутофагосом отсоединяется от нее и от фосфотидилэтаноламина при помощи протеазы Atg4 и может вновь вступать в реакцию [67].

Нарушения аутофагической функции ассоциированы с рядом заболеваний человека, включая нейродегенеративные [40]. Отличные от контроля изменения аутофагии были обнаружены у пациентов с БП: в нейронах черной субстанции было увеличено количество аутофагических вакуолей [71].

При недостатке питательных веществ процесс аутофагии неспецифичен и деградировать могут как белки, так и органеллы. Однако аутофагия также может быть специфичной для некоторых белков, связывающих деградирующий «груз» и мембрану аутофагосомы. Таким связующим компонентом является белок убиквитин-связывающий белок p62, также называемый sequestosome-1, кодирующийся геном *SQSTM1*. Функция белка p62 заключается в присоединении агрегированных и убиквитинированных

белков и направлении их в аутофагосому для дальнейшего протеолиза [72] (Рисунок 2). Белок p62 был обнаружен в ТЛ при БП, в нейрофибриллярных клубочках при болезни Альцгеймера и в агрегатах гентингина при болезни Гентингтона [73–76]. Этот адаптерный белок также имеет LC3-связывающий мотив, что позволяет ему вместе с грузом специфично деградировать в процессе аутофагии [77]. Таким образом белок p62 является связующим компонентом между белком LC3 и убиквитинированным субстратом, подвергающимся деградации в сформированной аутофагосомой, и может быть использован в качестве маркера процесса аутофагии [78]. LC3-II, находящийся на внутренней мембране аутофагосом, деградирует внутри аутолизосомы. Повышенный уровень LC3 (маркера аутофагосом), наблюдался в посмертных образцах мозга пациентов с БП [79]. При оценке деградации белков с помощью аутофагии в РВМС пациентов с БП было выявлено снижение этого процесса через основные пути аутофагии (аутофагия, СМА, общая функция лизосом) по сравнению со здоровыми людьми [80]. Методами полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и Вестерн-блот анализа в РВМС пациентов с БП было выявлено увеличение уровня некоторых белков, регулирующих процесс аутофагии (ULK1, Beclin1, и autophagy/beclin1 regulator 1). Напротив, уровень мРНК генов, кодирующих эти белки был значительно снижен [8], что указывает на компенсаторное подавление их экспрессии в связи с их внутриклеточным накоплением. Интересно, что в этой же работе, внутриклеточный уровень содержания найденных белков коррелировал с повышенными уровнями α -синуклеина в РВМС при БП [8]. Было показано, что в РВМС пациентов с БП наблюдаются повышенные уровни белка LC3 [81]. Кроме того, более высокие уровни мРНК и белка LC3 были обнаружены в лейкоцитах пациентов со спорадической формой БП [82]. Таким образом, базальный уровень активности аутофагии может быть ниже у пациентов с БП. Интересно, что нокадаун гена α -синуклеина приводил к усилению аутофагии. Физиологическая индукция аутофагии (голоданием) была связана со значительным снижением уровней α -синуклеина, а

ингибирование аутофагии 3-метиладенином или нокдаун ATG5 приводил к значительному увеличению уровня α -синуклеина [83]. Авторы данной работы предполагают, что α -синуклеин в сочетании с белками аутофагии можно рассматривать как потенциальные биомаркеры БП.

Таким образом, до сих пор нет четкого понимания того, отражаются ли процессы, происходящие в центральной нервной системе при БП, в циркулирующих клетках иммунной системы. Однако, обнаружение такой взаимосвязи даст возможность использования малоинвазивной диагностики БП на ранней стадии, а также персонализированного подхода к терапии этого заболевания.

1.3. Биохимические биомаркеры БП в периферической крови

Исследования новых биомаркеров при БП ограничены многими проблемами, основной из которых является доступность образцов областей нейродегенерации для валидации результатов исследований. Как известно, биомаркеры дают представление о конкретном заболевании, помогают оценить прогресс и результаты лечения. Биомаркером может являться физический, химический или биологический параметр.

К потенциальным биохимическим биомаркерам БП периферической крови можно отнести мочевую кислоту и глутатион, которые были снижены в плазме крови у пациентов с БП по сравнению с контрольной группой [84]. В недавнем исследовании 624 пациентов с БП были определены биомаркеры периферической крови (сыворотки), предсказывающие прогноз БП. Было выявлено снижение уровня аполипопротеина А1, повышение уровня С-реактивного белка и снижение уровня витамина D. Уровни этих биомаркеров коррелировали ухудшением двигательной активности пациентов (по шкале MDS-UPDRS) [85]. Имеются высококачественные и воспроизводимые доказательства того, что плазменный уровень витамина D ниже у пациентов с БП по сравнению с контрольной группой [86,87].

Производные мочевой кислоты – ураты представляют собой анионную форму мочевой кислоты (2, 6, 8-триоксипурин), преобладающую при нейтральном рН как внутриклеточно, так и во всех жидкостях организма. Урат синтезируется ксантиноксидоредуктазой путем последовательного окисления гипоксантина до ксантина, а затем до урата. Мочевая кислота является важным эндогенным антиоксидантом и обнаруживается в высоких концентрациях в головном мозге и сыворотке крови [88,89]. Результаты метаанализа показали более низкий уровень мочевой кислоты в сыворотке крови у пациентов с БП, чем у здоровых людей [90]. Таким образом, уровень мочевой кислоты в сыворотке крови может быть потенциальным биомаркером БП.

Гомоцистеин представляет собой природную аминокислоту, образующуюся в результате процесса метилирования. Уровень гомоцистеина зависит от концентрации фолиевой кислоты и некоторых генетических факторов. Было показано, что гомоцистеин вызывает нейровоспаление, активируя астроциты и микроглию, которые высвобождают ряд факторов, приводящих к локальному воспалению в головном мозге и гибели нейронов. Повышенная концентрация общего гомоцистеина в плазме и спинномозговой жидкости считается фактором риска БП [91].

Так как считается, что основную роль в патогенезе БП играют ТЛ образующиеся, в основном, из посттрансляционно модифицированного α -синуклеина, стоит рассматривать этот белок как потенциальный биомаркер БП. И, действительно, в этом аспекте α -синуклеин изучен достаточно подробно. α -синуклеин экспрессируется многими тканями, и известно, что существует двунаправленное движение этого белка между кровью и мозгом [92]. Уровни α -синуклеина исследовали в плазме, сыворотке, эритроцитах и в мононуклеарных клетках периферической крови при БП. Как оказалось, основным источником α -синуклеина плазмы крови или сыворотки являются эритроциты [93]. В недавнем исследовании «случай-контроль» сообщалось о повышенных уровнях α -синуклеина в периферической крови (в плазме и

сыворотке) при БП по сравнению с контрольной группой того же возраста и его уровни в сыворотке коррелировали с клинической тяжестью заболевания [94]. В других исследованиях также наблюдалось повышение уровня α -синуклеина в плазме пациентов с БП по сравнению с контрольной группой, но корреляция этого параметра со степенью двигательной инвалидности была различной [95]. Тем не менее, несколько других исследований либо показали снижение уровня α -синуклеина в плазме у пациентов с БП по сравнению с контрольной группой, либо не смогли обнаружить какой-либо существенной разницы в этом параметре между двумя группами [96,97]. Такие противоречивые результаты позволяют предположить, что α -синуклеин в плазме крови не является полезными в качестве биомаркера для диагностики и/или прогнозирования БП, и по-видимому, зависит от каждого индивидуального случая БП. Основываясь на полученных результатах, сложно понять отражают ли изменения уровня α -синуклеина в жидкостях организма патологию БП в головном мозге. Кроме того, белок может существовать в мономерной и множественных олигомерных формах, а также в посттрансляционно модифицированных формах, что может усложнить измерение этого белка.

Одной из биорегуляторных молекул, посредством которых нейроны и микроглия взаимодействуют при воспалении, является фракталкин (CX3CL1). Фракталкин представляет собой белок из 373 аминокислот, который секретируется нейронами и существует как в связанной с мембраной, так и в растворимой формах. Связанная с мембраной форма служит молекулой адгезии для привлечения и адгезирования лейкоцитов из кровяного русла. Растворимая форма действует как провоспалительный хемоаттрактант, проявляя противовоспалительный и нейропротекторный эффект в месте локального воспаления, а также снижает апоптоз нейронов. Таким образом, низкие уровни фракталкина способствуют нейровоспалению, что приводит к нейродегенерации при БП [98]. Поэтому, целесообразно рассматривать

фракталкин как потенциальный биомаркер БП и более детально изучить его содержание в биологических жидкостях.

Считается, что БП является гетерогенным заболеванием и до конца не известно какие факторы способствуют прогрессии и ухудшению клинической картины пациентов. В настоящее время отсутствуют надежные модели на животных и подходящий дизайн клинических испытаний, оценка гетерогенности заболевания при планировании клинических испытаний [99]. Учитывая это, можно предположить, что нарушения в СМА присутствует у одних пациентов с БП, но отсутствует у других. Следовательно, разработка надежных биомаркеров дисфункции СМА необходима для дифференциальной диагностики БП, что возможно приведет к разработке новых подходов к лечению этого заболевания. Так как диагностические биомаркеры периферической крови или плазмы человека являются оптимальными из-за их доступности и минимальной инвазивности, целесообразным является изучение патологических процессов при БП не только в головном мозге и на животных моделях, но и на периферии, например, в клетках иммунной системы. Интересно, что в периферических мононуклеарных клетках крови пациентов с БП были обнаружены признаки нарушения функции СМА: снижение уровня экспрессии белка Hsc70, без изменения экспрессии LAMP2A [7]. В то же время, в другой работе было обнаружено снижение уровня LAMP2A, однако исследование экспрессии Hsc70 не проводили [82].

1.4. Роль системного и локального воспаления в патогенезе БП

Взаимодействия нейронов, глии и микроокружения являются ключевыми для поддержания нейронального гомеостаза в центральной нервной системе (ЦНС), а сбои в этом гомеостатическом балансе могут привести к нейродегенеративным процессам, таким как БП. В настоящее время роль воспалительных процессов в гибели дофаминовых нейронов вышла на первый план при нейродегенерации. В физиологических условиях

микроглия и астроглия постоянно контролируют гомеостаз головного мозга путем высвобождения нейротрофических факторов, удаления синаптического глутамата, ремоделирования и изменения формы синапсов и т. д. Однако клетки глии сами могут активироваться различными факторами, секретируемыми поврежденными нейронами или белковыми агрегатами, что приводит к стойкому нейровоспалению. Глиоз является типичным патологическим признаком многих нейродегенеративных заболеваний, и новые данные указывают на то, что устойчивая активация микроглии и астроцитов играет центральную роль в дофаминергической дегенерации при БП [100].

Хотя хроническое нейровоспаление может не являться инициирующим фактором во всех случаях БП, однако, оно, по-видимому, является кофактором прогрессирования заболевания [101]. Установлено, что развитие БП связано с процессами хронического воспаления в ткани головного мозга — нейровоспалением [102–104]. Однако, в последнее время в качестве причины прогрессии БП также рассматривается хроническое периферическое воспаление. Является ли нейровоспаление провоцирующим фактором или следствием нейродегенеративного прогрессирования, пока неясно [105,106]. Дело в том, что нейровоспаление сопровождается хроническим системным воспалением при БП, а усугубление нейродегенерации показано на фоне периферического воспаления [107,108]. И наоборот, активированная микроглия при БП сама по себе может быть источником провоспалительных медиаторов, способствующих нейротоксическим эффектам и усугубляющих нейродегенерацию [109,110]. Более того, активированная микроглия индуцирует экспрессию молекул МНС класса I в катехоламинергических нейронах человека, что делает их восприимчивыми к гибели клеток в присутствии цитотоксических Т-лимфоцитов [111].

С другой стороны, можно предположить, что клетки головного мозга могут реагировать на сигналы периферических иммунокомпетентных клеток,

например, при системной активации цитокиновой сети [112,113]. Примечательно, что повышенные уровни цитокинов, включая IL1 β , IL2, IL6, IFN γ и TNF α , а также более высокое количество CD4⁺ лимфоцитов были обнаружены в сыворотке и спинномозговой жидкости у пациентов с БП [114]. У пациентов с БП были обнаружены повышенные сывороточные уровни ФНО- α и его рецептора 1 по сравнению с контрольной группой, а уровни цито/хемокинов достоверно коррелировали с со стадией заболевания по шкале UPDRS III [115]. Также предполагается, что повышенная концентрация ИЛ-6 в плазме коррелирует с повышенным риском БП [116]. ЦНС традиционно считается иммунологически привилегированной, защищенной от проникновения патогенов и иммунных клеток гематоэнцефалическим барьером (ГЭБ). Однако связь между ЦНС и периферией оказывается более подвижной, чем предполагалось ранее [117]. Повышенная проницаемость ГЭБ, наблюдаемая при БП, может способствовать инфильтрации головного мозга активированными моноцитами, макрофагами и Т-лимфоцитами в зоне нейровоспаления [118]. Так, в мышинной модели БП была продемонстрирована инфильтрация головного мозга Т-клетками и усугубление нейродегенерации при наличии периферического воспаления [119]. В данной работе была продемонстрирована важная роль Т-лимфоцитов на иммунодефицитных мышцах с отсутствием зрелых Т-лимфоцитов (мыши Rag1^{-/-} и Tcrb^{-/-}), у которых была выявлена сниженная восприимчивость к МРТР-индуцированной дофаминергической нейродегенерации. Было описано, что провоспалительные цитокины, включая IL-1 β и ФНО, способствуют нейродегенерации. Эти цитокины индуцируют синтез хемокинов в паренхиме головного мозга, вызывая, в свою очередь, рекрутирование нейтрофилов и моноцитов из кровотока. IL-1 β сам по себе может индуцировать рекрутирование клеток в головной мозг [120].

Астроциты, экспрессирующие МНСII, были идентифицированы в непосредственной близости от CD4⁺ Т-клеток в посмертной ткани головного

мозга пациентов с БП, а культивированные астроциты человека, подвергшиеся воздействию предварительно сформированных фибрилл α -синуклеина, экспрессировали костимулирующие молекулы (CD80, CD86, и CD40) для формирования иммунологического синапса с Т-клетками [121]. Все это указывает на способность к дальнейшей активации CD4⁺ Т-клеток в очаге нейровоспаления. Также было продемонстрировано, что у мышей, микроглия, подвергшаяся воздействию α -синуклеина, увеличивала экспрессию МНСII, активировалась и индуцировала пролиферацию CD4⁺ Т-клеток. Кроме того, нокаут МНС-II предотвращал активацию микроглии и потерю дофаминергических клеток у этих мышей [122].

Клетки периферической иммунной системы могут отражать процессы, происходящие в головном мозге при БП. Например, нарушение синтеза дофамина, метаболизма α -синуклеина и некоторые измененные функции митохондрий были обнаружены в периферических Т-клетках при БП [81,123,124]. В последнее десятилетие появляется все больше свидетельств роли Т-клеток в патогенезе БП. Нарушение ГЭБ обычно наблюдается в патогенезе БП, что дает возможность периферическим иммунным клеткам проникать в головной мозг. Например, на мышинной модели БП была показана инфильтрация Т-клетками ЦНС [105]. Развитие БП сопровождается изменением соотношения основных субпопуляций циркулирующих лимфоцитов, однако наблюдаемые литературные данные все еще противоречивы [125–127].

Таким образом, центральные или системные воспалительные процессы следует рассматривать как факторы риска развития и прогрессирования БП.

1.5. Иммуностарение на фоне инфекции CMV

Продолжительность жизни всего населения мира постепенно увеличивается. В 2025 году в мире будет около 1,2 миллиарда человек в возрасте старше 60 лет, а к 2050 году оно увеличится до 2 миллиардов [128]. Однако, увеличение продолжительности жизни не всегда совпадает с

улучшением ее качества. В пожилом возрасте люди часто имеют хронические заболевания, вплоть до инвалидности. Физиологическое старение затрагивает все системы организма человека, в том числе и на иммунную систему.

Изменения в иммунной системе, происходящие на фоне физиологического старения, называются «immunosenescence» (далее иммуностарение). Это термин был впервые введен Роем Уолфордом. Такие факторы как, генетика, пол, возраст, хроническое воспаление могут способствовать старению иммунной системы [129,130]. Иммуностарение подразумевает изменения как, врожденной так и адаптивной иммунной системы. Иммуностарение сопровождается постепенным снижением устойчивости к инфекциям и ухудшением чувствительности к вакцинам, снижением количества наивных Т-клеток, увеличением количества терминально дифференцированных Т-клеток, уменьшением разнообразия репертуара Т-клеток [131]. Известно, что Т клетки наиболее подвержены функциональным и фенотипическим изменениям при иммуностарения [132], представляя собой терминальные стадии адаптивных иммунных клеток памяти. Было показано, что старение связано с увеличением количества клеток памяти, особенно среди CD8⁺, в меньшей степени среди CD4⁺ [133]. Исследования доказывают роль вирусов, особенно герпес вирусов, в прогрессии старения иммунной системы [134]. Частным признаком старения является хроническое воспаление на фоне персистирующей инфекций. Продемонстрирован вклад вирусной нагрузки, особенно вирусов герпеса в старении иммунной системы [134]. Например, серопозитивность к CMV, по-видимому, связана со многими функциональными изменениями Т- и НК-клеток [135]. Показано, что старение Т-клеточного звена иммунитета может привести к клиническим последствиям, в том числе к нейродегенерации у пожилых людей [136].

По мере накопления при старении менее функционально активных НК- и Т-клеток часто компенсаторной увеличивается доля клеток, сочетающих

черты как врожденных, так и адаптивных элементов иммунной системы [137]. Например, стареющие терминально дифференцированные клетки TEMRA приобретают черты NK-клеток, включая повышенную регуляцию CD56, основного маркера, используемого для идентификации NK-клеток. Т-клетки, экспрессирующие CD56, образуют гетерогенное подмножество так называемых NKT-подобных ($CD3^+CD56^+$) клеток [138]. Эти клетки у пожилых людей используют приобретенный механизм NK-клеток для поддержания быстрого эффекторного ответа против опухолевых клеток и инфекций [138]. CD56 также экспрессируется некоторыми $\gamma\delta$ Т-клетками. Описаны изменения количества, фенотипа и функции иммунных клеток во фракции $CD56^+$ у пациентов с различными инфекциями [138].

Инфекция CMV относится к нейротропным вирусам, которые вызывают воспаление ЦНС либо путем проникновения в мозг через поврежденный ГЭБ или по периферическим нервам, либо путем активации врожденной и адаптивной иммунной системы хозяина на периферии [139]. Доля населения, инфицированного CMV, зависит от социально-экономического статуса и составляет от 60 до 70% в промышленно развитых странах [136]. Исследования тканей головного мозга, пораженных CMV, показывают, что основными местами локализации CMV являются базальные ганглии, промежуточный мозг и ствол головного мозга [140]. Примечательно, что была обнаружена связь между наличием CMV и болезнью Альцгеймера [141].

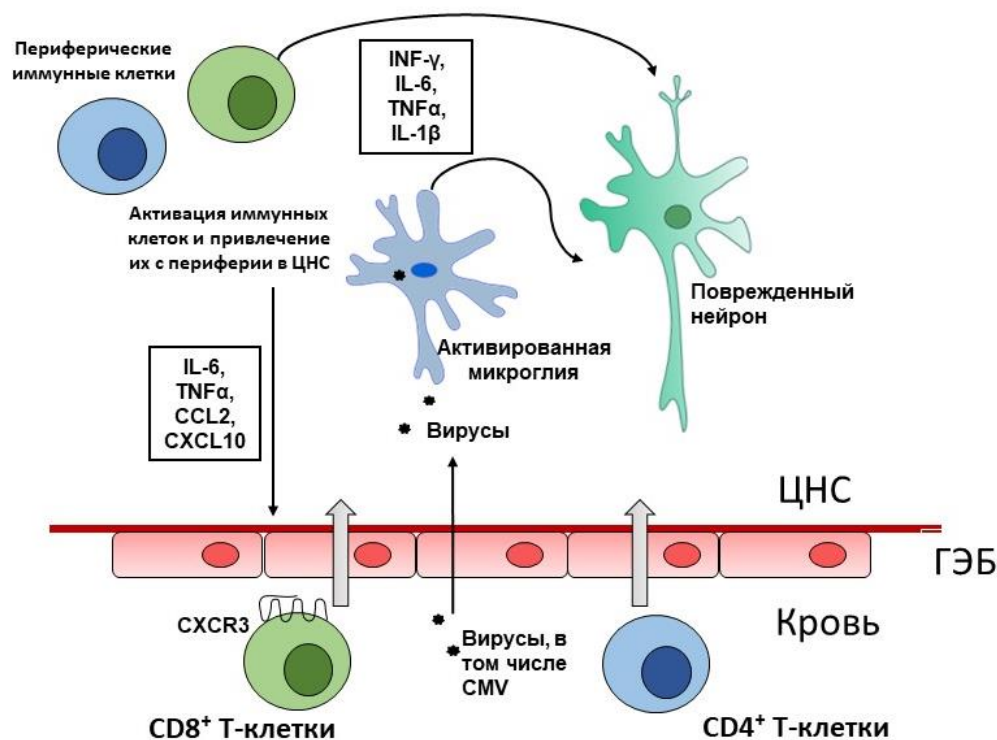


Рисунок 3. Схематичное изображение механизма локального воспаления в головном мозге при болезни Паркинсона. ГЭБ-гематоэнцефалический барьер, ЦНС-центральная нервная система. CMV-цитомегаловирус.

Одно из наиболее частых последствий CMV-инфекции — это «инфляция» Т-клеточной памяти. Этот термин подразумевает увеличение количества антиген-специфических Т-клеток памяти на фоне инфекции CMV с течением времени. Этот термин впервые был описан группой М. Дж. Реддехейза [142]. CMV-специфичные Т-клетки у CMV-серопозитивных людей могут составлять в периферической крови, в среднем от 10% клеток памяти, как CD8⁺, так и CD4⁺, и, у некоторых индивидов, доходить до 50% [143]. CMV-инфекция вызывает массивную инфляцию терминально дифференцированных CMV-специфических CD8⁺ Т-клеток и экспансию адаптивно-подобных NK-клеток, характеризующихся экспрессией активирующего рецептора NKG2C и маркера CD57 [144]. Было показано, что доля NKG2C⁺ NK-клеток и CMV-специфических CD8⁺ Т-клеток взаимосвязаны: истощение NKG2C⁺ NK-клеток увеличивает экспансию CMV-специфических CD8⁺ Т-клеток, и наоборот [144]. Кроме того, была

обнаружена связь между CMV-специфической реакцией CD8⁺ Т-клеток и увеличением доли NKG2C⁺ NK-клеток, экспрессирующих молекулу CD57 [145]. Интересно, что как в подмножествах CD56⁺, так и в CD56⁻ большая часть NKG2C⁺ Т-клеток имели фенотип высокодифференцированных клеток памяти CD8⁺ T_{EMRA} [146]. К тому же CMV может стимулировать репликативное старение Т-клеток [147]. Известно, что Т-клетки многократно реплицируются из-за повторной стимуляции антигенами, в том числе CMV-антигенами, затем дифференцируются, теряют способность к пролиферации и могут достигать стадии репликативного старения [148]. Репликативное старение Т-клеток представляет собой терминальное состояние, характеризующееся нарушением регуляции иммунной функции, потерей костимулирующей молекулы CD28, укорочением теломер и повышенной продукцией провоспалительных цитокинов [149].

Дифференцированные Т-клетки часто экспрессируют на своей поверхности антиген CD57, сульфатированный гликоэпитоп, физиологические лиганды которого остаются неизвестными. Способность к пролиферации у CD57⁺ Т-клеток нарушена [148]. CD57 в Т-лимфоцитах обычно используют как маркер репликативного старения [150]. Можно заключить, что CMV-позитивность связана с изменениями общего фенотипа репертуара Т-клеток у доноров пожилого возраста, включая увеличение доли CD57⁺ клеток и снижение экспрессии CD28⁺ и CD27⁺, т.е. фенотипический профиль, характерный для иммунного старения [151].

1.5.1. CMV и БП

Некоторые инфекции можно рассматривать как возможные пусковые механизмы нейровоспаления. При БП регистрировали сдвиги в субпопуляциях Т-клеток, вовлеченных в иммуностарение и контроль инфекции CMV. Например, было показано, что в CD8⁺ фракции Т-клеток у пациентов с БП, наблюдалось снижение процента клеток CD57⁺ и увеличение доли клеток CD28⁺ [127], то есть при БП наблюдалось отсутствие

иммуностарения Т-клеток. Хроническая латентная CMV-инфекция была связана с увеличением количества репликативно стареющих CD8⁺ Т-лимфоцитов у здоровых людей, тогда как на фоне БП этого сдвига не наблюдалось [152]. По-видимому, при БП изменен CD8⁺ Т-клеточный ответ на CMV инфекцию.

Известно, что клеточное старение также связано с увеличением количества ингибиторов циклин-зависимой киназы p16^{INK4a} и p21^{CIP1/Waf1} [153,154]. В недавнем исследовании было отмечено значительное снижение уровня экспрессии маркера клеточного старения p16 в CD8⁺ Т-клетках пациентов с БП по сравнению с контролем, а различий в экспрессии гена p21 между группами не наблюдалось [155]. Снижение экспрессии p16 у пациентов с БП по сравнению с контролем является дополнительным свидетельством ослабления старения CD8⁺ Т-клеток при БП. Более активный и менее дифференцированный профиль Т-клеток может быть обусловлен усилением ответа на специфические антигены, ассоциированные с БП, например, α-синуклеин. Результаты недавних исследований на людях позволяют предположить, что эпитопы α-синуклеина распознаются аутореактивными Т-лимфоцитами при БП [156]. Это может свидетельствовать о том, что «аномальное» иммунное старение может способствовать развитию БП, а маркеры старения Т-клеток требуют дальнейшего изучения в качестве потенциальных биомаркеров БП.

Предполагается, что инфекционные агенты могут вызывать начальную сенсibilизацию головного мозга. Несколько вирусов, включая грипп, Коксаки и герпес, связаны с острым и хроническим паркинсонизмом [157–159]. Действительно, больные БП часто страдают инфекционными заболеваниями, а основными причинами смерти являются пневмония и респираторные инфекции [160]. Показана взаимосвязь генетической изменчивости в области локуса HLA-DR и поздней манифестации БП. Выявленная закономерность подчеркивает важность иммунного компонента в развитии БП, к тому же, изменчивость локуса HLA-DR может предрасполагать

к хроническим инфекциям и длительной антигенной циркуляции в организме [161].

Таким образом, инфекция CMV является широко распространенной, нейротропной и изменяющий периферический иммунный профиль человека, инфекцией. Поэтому актуальными являются исследования в области влияния CMV на состав иммунных клеток при БП.

2. Материалы и методы

2.2. 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), 33 здоровых донора того же возраста (ЗД) и 30 молодых здоровых доноров (МД). Демографические и клинические характеристики пациентов с БП и контрольной группы здоровых доноров пожилого возраста, а также их SMV-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
SMV 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 контроля не различались по возрасту и полу. Диагноз БП устанавливали в соответствии с критериями «Parkinson's Disease Society Brain Bank» (Банк мозга общества болезни Паркинсона)» [162]. 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.

2.3. Моноклональные антитела

Для поверхностного окрашивания РВМС использовали следующие мышинные флуоресцентно-меченые антитела против человека: CD56-APC (clone N901, Beckman Coulter, Miami, FL, USA), CD4-FITC (clone RPA-T4, Sony Biotechnology, San Jose, CA, USA), CD57-PE (clone HCD57, Sony Biotechnology, San Jose, CA, USA), NKG2C-PE (clone 134591, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), CD3-PerCP (clone HIT3a, Sony Biotechnology, San Jose, CA, USA), CD3-FITC (clone FIT3a, Sony Biotechnology, San Jose, CA, USA), CD3-APC (clone F OKT3, Sony Biotechnology, San Jose, CA, USA) CD8-PerCP (clone SK1, Sony Biotechnology, San Jose, CA, USA), CD45RA-APC (clone HI100, Sony Biotechnology, San Jose, CA, USA), CD197-FITC (clone G043H7, Sony Biotechnology, San Jose, CA, USA), CD56-APC-Vio770 (clone REA196, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany).

В работе были использованы следующие панели моноклональных антител, конъюгированных с флуорохромом, к поверхностным маркерам иммунных клеток для пациентов с БП и группы ЗД: CD4-FITC, CD3-PE, CD8-PERCP (панель 1); CD3-FITC, CD57-PE, CD56-APC (панель 2); CD3-FITC, NKG2C-PE, CD56-APC (панель 3); CD197-FITC, CD3-PerCP, CD45RA-APC (панель 4).

Использовали следующую панель моноклональных антител, конъюгированных с флуорохромом, для группы МД: CD4-FITC, CD57-PE, CD8-PERCP, CD3-APC, CD56-APC-Vio770.

2.4. Выделение РВМС из периферической донорской крови и подготовка образцов

РВМС выделяли с помощью градиентного центрифугирования со стандартным раствором фиколла (ПанЭко, Москва, Россия) (плотность 1,077). РВМС дважды отмывали ($400\times g$, 15 мин) в фосфатно-солевом буфере Дульбекко (DPBS). Для поверхностного флуоресцентного иммунного окрашивания клетки инкубировали с антителами в течение 30 минут на льду в РВА буфере (PBS, содержащем 0,5% BSA (бычий сывороточный альбумин) (Serva, Heidelberg, Germany) и 0,01% азида натрия (AMRESCO, Inc. (VWR International, LLC), Аврора, Колорадо, США), а затем дважды отмывали в том же буфере.

2.5. Цитометрический анализ поверхностных маркеров лимфоцитов

Цитофлуориметрический анализ РВМС проводился на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (BD Biosciences, Франклин Лейкс, Нью-Джерси, США), оснащенный лазерами с длиной волны 488 и 640 нм и MACSQuant 10, оснащенного тремя лазерами с длинами волн 405, 488 и 635 нм. Полученные данные обрабатывали в программе FlowJo (версия vX.0.7, FlowJo LLC, Oregon, США).

Лимфоциты различали путем гейтирования клеток с использованием прямого и бокового рассеяния. Затем были выбраны единичные клетки с использованием площади прямого рассеяния в зависимости от высоты. CD56⁻ Т-клетки, CD56⁺ Т-клетки и субпопуляции NK-клеток идентифицировали путем гейтирования CD56 и CD3. В клетках CD3⁺ были определены следующие субпопуляции: наивные Т-клетки (CCR7⁺CD45RA⁺), Т-клетки центральной памяти (CCR7⁺CD45RA⁻), эффекторные Т-клетки памяти (CCR7⁻CD45RA⁻) и терминальные эффекторные Т-клетки памяти (CCR7⁻CD45RA⁺).

2.6. Цитометрический анализ внутриклеточного уровня HSP70

Внутриклеточный уровень HSP70 определяли с помощью непрямого иммунофлуоресцентного окрашивания. Для ряда образцов РВМС проводили процедуру нагревания на водяной бане (43°C в течение 10 мин). Перед внутриклеточным окрашиванием лейкоциты фиксировали и пермеабелизировали раствором Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния, США). После двух последующих промывок DPBS, содержащим 0,2% BSA и 0,1% Triton X-100, фиксированные пермеабелизированные клетки окрашивали моноклональными антителами BRM-22 (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США), распознающими как стресс-индуцированные Hsp70-1, так и конститутивный Hsc70. Ряд образцов лейкоцитов был окрашен Hsp70-1-специфическими антителами C92F3A-5 (Stressgen, Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA). Затем клетки инкубировали со вторыми PE-конъюгированными антителами к Fab-фрагментами IgG. Внутриклеточные уровни HSP70 определяли с использованием проточной цитометрии как среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) с поправкой на фоновую флуоресценцию контрольных образцов (клетки, обработанные только вторичными PE-конъюгированными антителами) по формуле: $(MFI_{sample}/MFI_{control}) - 1$.

2.7. Цитометрический анализ апоптоза РВМС

РВМС ресуспендировали в RPMI 1640 с 10% фетальной телячьей сыворотки в концентрации $0,5 \times 10^6$ клеток/мл на лунку. Клетки инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 20 ч для оценки спонтанного апоптоза. Апоптоз детектировали с помощью аннексина V-AF647 (Invitrogen, Сан-Хосе, Калифорния, США) и йодида пропидия (PI, Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США). РВМС анализировали с помощью проточной цитометрии после инкубации с аннексином V-AF647 в течение 15 мин при комнатной температуре и добавлением раствора PI (2 мкг/мл). Подвергшихся апоптозу РВМС определяли как аннексин V-положительные, PI-отрицательные клетки.

2.8. Экстракция РНК, синтез кДНК и измерение транскрипции генов группы *HSPA* методом qRT-PCR в PMN и PBMC

РНК была получена из 6×10^6 клеток PMN (полиморфноядерные нейтрофилы) или PBMC с использованием наборов AllPrep DNA/RNA (QIAGEN, МД, США) в соответствии с инструкциями производителя. Синтез кДНК проводили с использованием праймера oligo-dT и обратной транскриптазы MINT (Евроген, Москва, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Дизайн праймеров для ПЦР (5'-3') осуществляли с помощью «NCBI primer blast» [163]. Поскольку последовательности генов *HSPA1A* и *HSPA1B* высокоомологичны, праймеры, специфичные для этих генов, были выбраны в 3'-UTR (3'-нетранслируемой области) (Рисунок 4).

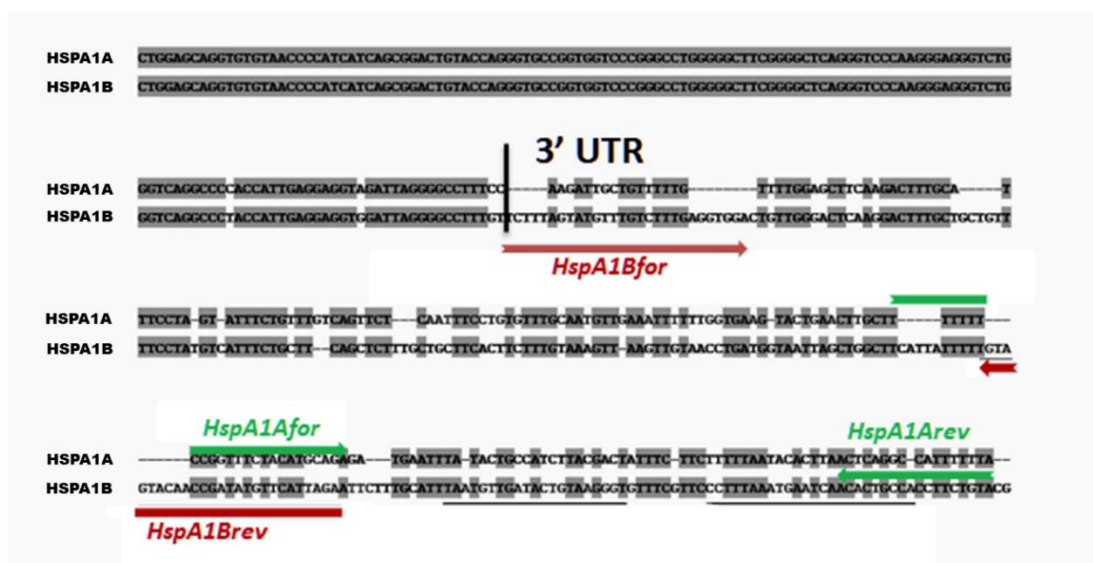


Рисунок 4. Дизайн праймеров для дискриминации экспрессии *HSPA1A* и *HSPA1B*.

Способность наборов праймеров *HSPA1A* for-rev и *HSPA1B* for-rev различать *HSPA1A* и *HSPA1B* была подтверждена секвенированием по Сэнгеру ПЦР-фрагментов, полученных путем амплификации матрицы кДНК с соответствующими праймерами.

Список пар праймеров, использованных в исследовании, приведен в таблице 2.

Таблица 2. Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе.

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер	Длина фрагмента
<i>HSPA8</i>	TGCTGCTCTTGGATGTCA CT	AAGGTCTGTGTCTGCTTG GT	112bp
<i>HSPA1A/B</i>	AGGTGCAGGTGAGCTAC AAG	CTCGGCGATCTCCTTCAT C	92bp
<i>HSPA1A</i>	TTTTTCCGGTTTCTACAT GCAG	CAACTTAAAAAATGGCCT GAGT	96bp
<i>HSPA1B</i>	TCTTTAGTATGTTTGTCTT TGAGGTGG	TGGCAGTGTTGATTCATT TAAAGG	239bp
<i>HSPA6</i>	ACCCAGGTGTATGAGGG TGA	TCTATCTGGGGGACTCCA CG	107bp
<i>β-actin</i>	CACCACACCTTCTACAAT GAG	GTCTCAAACATGATCTGG GTC	119bp

ПЦР в реальном времени проводили с использованием амплификатора с детекцией флуоресценции LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Мангейм, Германия). Каждый образец для проведения qRT-PCR (конечный объем составил 25 мкл) содержал 5 мкл коммерческой реакционной смеси qPCRmix-*HS SYBR*, 1 мкл 3 mM праймеров (прямого и обратного), 0.5 мкл кДНК и 17.5 мкл подготовленной (очищенной от РНК) воды. Используемый протокол проведения qRT-PCR: прединкубация (95°C, 5 мин), затем 40 циклов, включающих режимы денатурации (95°C, 10 с), отжига праймеров (60°C, 10 с), и удлинения ДНК (72°C, 10 с). Каждую точку для амплификации вносили в триплетах. Для коррекции количества внесенного материала в каждой временной точке анализ результатов проводился с нормализацией по эндогенному референс-гену β -актина.

2.9. Измерение серологического статуса CMV

Венозную кровь собирали в вакуумные пробирки, содержащие гель с активатором свертывания и гель (APEXLAB, Москва, Россия). Пробирки оставляли для свертывания на 30 мин, затем центрифугировали при 3000 об/мин и удаляли сыворотку, после чего хранили при -80 °С до проведения анализа на IgG CMV с использованием набора ИФА (Вектор-Бест, Новосибирск, Россия) в соответствии с протоколом производителя.

2.10. Иммуноферментный анализ р62

Количественное измерение р62 проводили в образцах РВМС, которые были предварительно лизированы в RIPA cell lysis buffer 2 (Enzo Life Sciences, Нью-Йорк, США) (образцы хранились при температуре -80 °С до анализа) с использованием высоковалидированного набора для количественного ИФА р62 (ADI-900-212-0001, Enzo Life Sciences, Нью-Йорк, США) в соответствии с инструкциями производителя.

2.11. Статистическая обработка данных

Статистический анализ был выполнен с использованием пакета программ GraphPad Prizm (версия 8.0.1) (StatSoft Inc., Талса, Оклахома, США). Для данных с нормальным распределением были выполнены t-тесты и данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего (SEM). Для ненормального распределения данных был использован U-критерий Манна-Уитни и данные представлены в виде медианы. Корреляционный анализ проводился с использованием корреляционного теста Пирсона для данных с нормальным распределением и корреляционного теста Спирмена для данных с ненормальным распределением. Для разделения данных на подгруппы был выполнен метод кластеризации k-средних с использованием базовой функции языка R (kmeans со стандартными параметрами). ROC-кривые (receiver operating characteristic) и AUC - площадь под кривой (area under the curve) рассчитывались для оценки диагностической чувствительности и специфичности экспрессии генов *HSPA* и внутриклеточного уровня р62 при

БП. Пороговое значение для ROC-анализа было определено с использованием индекса Юдена. Алгоритм KNN - ближайших соседей (K Nearest Neighbor) был применен для представления и прогнозирования значимости двух одновременных независимых параметров для различения БП и ЗД.

3. Результаты

3.1. 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, не страдающей БП – здоровые доноры (ЗД) с помощью проточной цитофлуориметрии с использованием антител, специфичных к консервативному эпитопу, общему для конститутивного Hsc70 и стресс-индуцированных Hsp70 белков (BRM-22). Отдельно была проведена оценка стресс-индуцированных белков Hsp70 с помощью моноклональных антител C92F3A-5 (Рисунок 5).

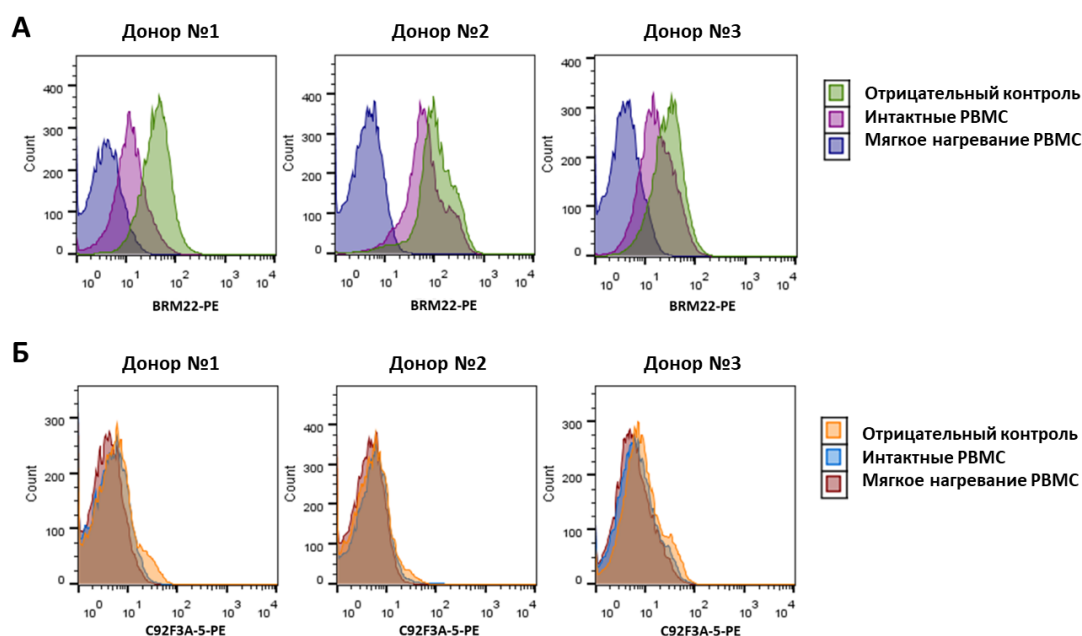


Рисунок 5. Уровень HSP70 в PBMC, измеренный с помощью метода проточной цитометрии. Показано окрашивание пула HSP70 в трех независимых экспериментах. (А) Анализ проведен с использованием моноклональных антител BRM-22, распознающих как конститутивный Hsc70, так и стресс-индуцированные Hsp70. (Б) Анализ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

В интактных PBMC существенных различий в базальном уровне HSP70 ($HSP70_{\text{basal}}$) между пациентами с БП и ЗД не наблюдалось (Рисунок 6А). 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 [164]. В группах сравнения в РВМС был проанализирован уровень $HSP70_{heat}$, а также произведена оценка разницы между значениями $HSP70_{heat}$ и $HSP70_{basal}$ ($\Delta HSP70 = HSP70_{heat} - HSP70_{basal}$). Данный показатель, по-видимому, отражает уровень HSP70, свободный для связывания в клетке с субстратом. Уровень $HSP70_{heat}$, а также значения $\Delta HSP70$ в РВМС были сопоставимы у пациентов с БП и ЗД (Рисунок 6А). Однако, были выявлены значимые положительные корреляции между базальным уровнем HSP70 и уровнем $HSP70_{heat}$ в РВМС как у пациентов с БП, так и у ЗД (Рисунок 6 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.

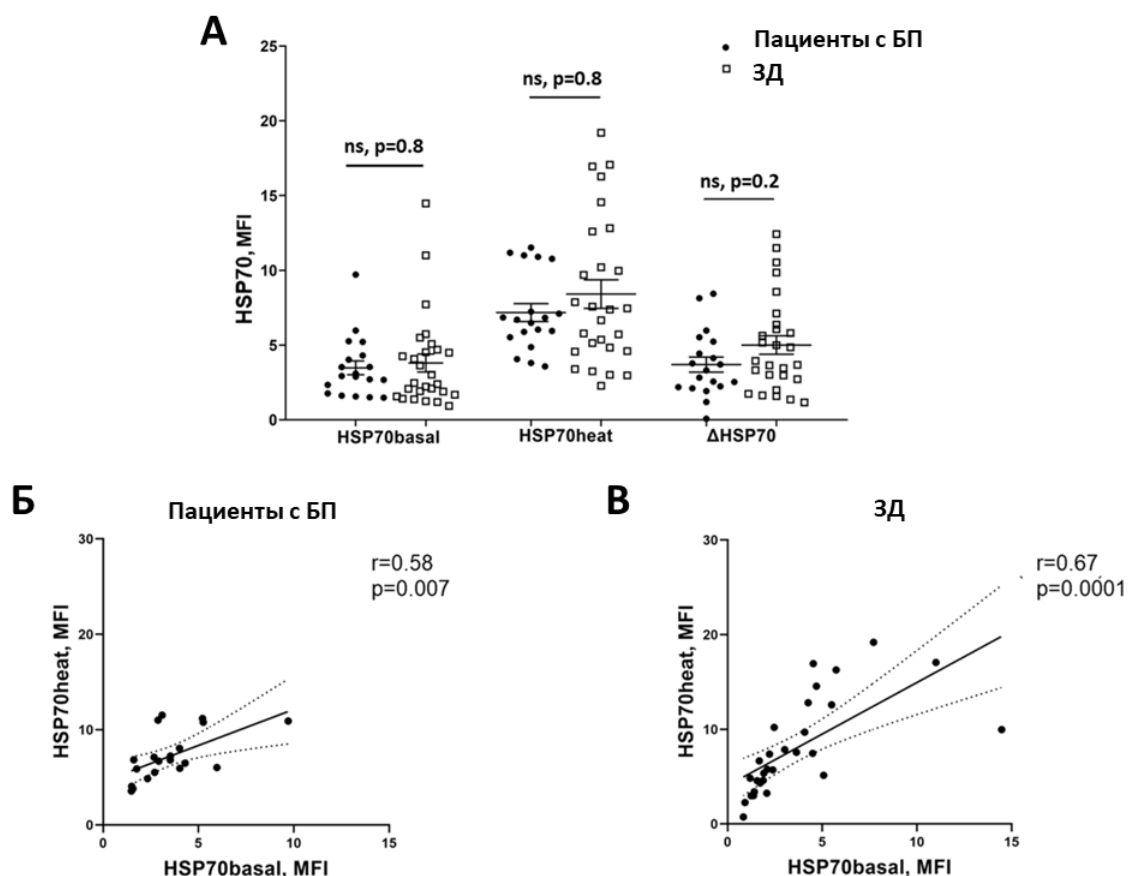


Рисунок 6. Внутриклеточный уровень пула HSP70 (Hsc70 + Hsp70) в PBMC. (А) базальный (HSP70_{basal}) и индуцированный кратковременной гипертермией клеток (HSP70_{heat}) уровень HSP70 и ΔHSP70 у пациентов с БП ($n = 19$) по сравнению с группой ЗД ($n = 27$); (Б, В) корреляционный анализ между базальным уровнем HSP70 и уровнем HSP70_{heat} в PBMC 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 PBMC [165], у больных БП и ЗД были проанализированы значения ΔHSP70 в PMN. Однако, существенных различий в значениях ΔHSP70 в PMN между пациентами с БП и ЗД также не удалось обнаружить (Рисунок 7).

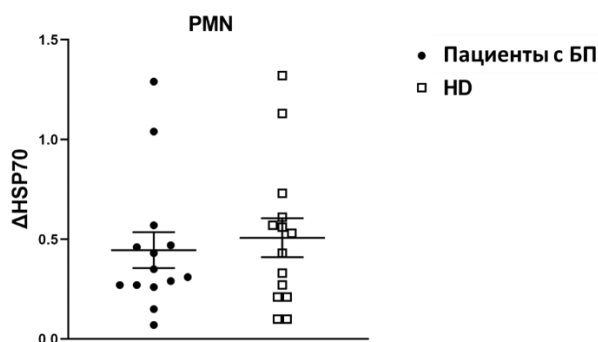


Рисунок 7. Уровень Δ HSP70 в PMN у пациентов с БП ($n = 14$) по сравнению с группой ЗД ($n = 14$); (Δ HSP70 = HSP70_{heat} - HSP70_{basal}). Сплошной линией обозначено среднее значение (\pm SEM).

3.2. 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 [166]. 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 8, таблица 3). 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 6А). Затем была оценена относительная базальная транскрипционная активность генов *HSPA1A/B* и *HSPA6*, кодирующих стресс-индуцированные белки Hsp70-1 и Hsp70B' соответственно. Было обнаружено увеличение относительной базальной транскрипции стресс-индуцированных генов *HSPA1A/B* и *HSPA6* в PBMC пациентов с БП по сравнению с ЗД (Рисунок 8А). 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 (Материалы и методы, пункт 2.7, рисунок 4).

Анализ экспрессии генов *HSPA1A* и *HSPA1B* в PBMC показал, что экспрессия *HSPA1A* превалирует над *HSPA1B* (Рисунок 8Б). 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 8Б, таблица 3).

Также была оценена базальная транскрипционная активность гена *HSPA6*, кодирующего минорный стресс-индуцированный 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 8А).

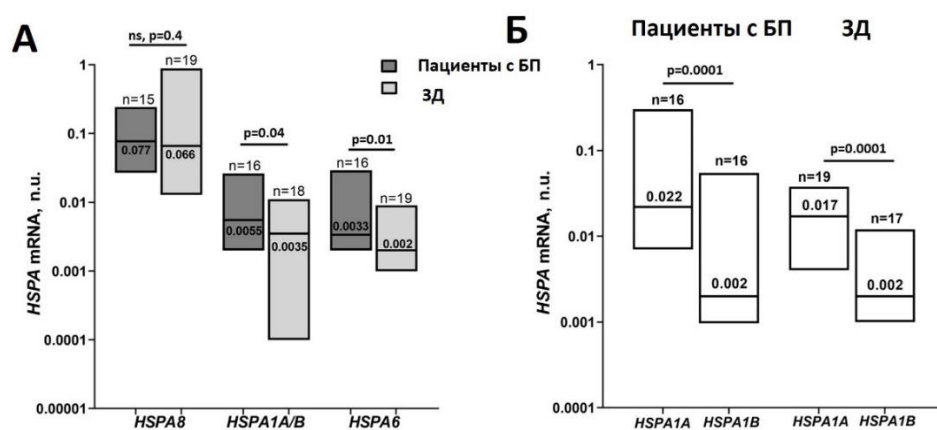


Рисунок 8. Относительная базальная экспрессия генов *HSPA8*, *HSPA1A/B*, *HSPA1A*, *HSPA1B* и *HSPA6* в PBMC, проанализированная с помощью количественной ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени (qRT-PCR). (А) Сравнение уровней мРНК *HSPA8*, *HSPA1A/B* и *HSPA6* у пациентов с БП и ЗД. (Б) Уровни мРНК генов *HSPA1A* и *HSPA1B* в PBMC у пациентов с БП и ЗД. Данные об уровнях мРНК генов *HSPA* нормализованы относительно уровня гена β -актина; использованы нормированные единицы (п.у., normalized units), знак ns (not significant) отражает статистически недостоверные отличия, 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 9).

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 6).

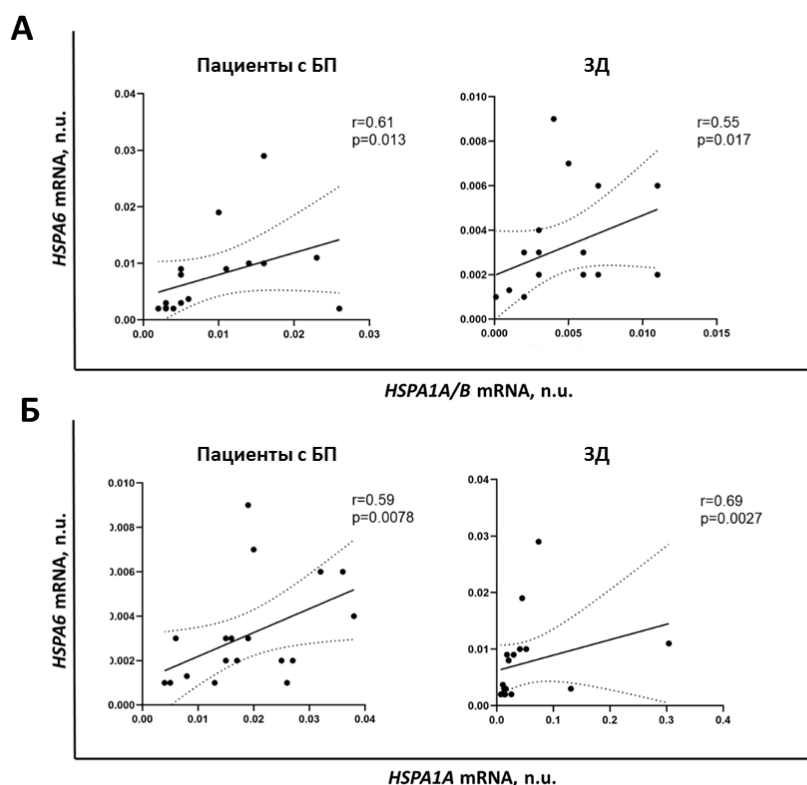


Рисунок 9. Оценка взаимосвязи транскрипционной активности генов *HSPA* в PBMC у пациентов с БП и ЗД с помощью корреляционного анализа. (А) Корреляции уровней экспрессии *HSPA1A/B* и *HSPA6*; (Б) *HSPA1A* и *HSPA6*. Данные уровней мРНК нормализованы к уровню гена β -актина, знак ns (not significant) отражает статистически недостоверные отличия. В корреляционном анализе оценивали коэффициент корреляции Пирсона; пунктирной линией обозначен 95% доверительный интервал.

Таблица 3. Нормализованный базовый уровень мРНК генов HSPA (медиана) в PBMC и в PMN у пациентов с БП по сравнению с ЗД.

Гены HSPA 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 HSPA 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 10).

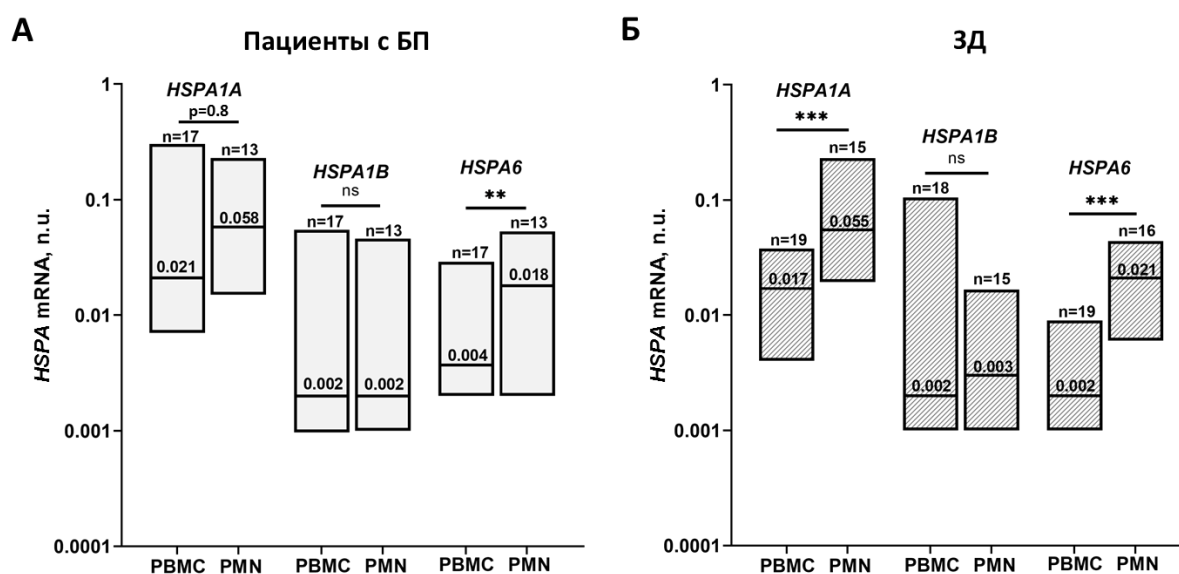


Рисунок 10. Сравнение базальной экспрессии стресс-индуцированных генов *HSPA1A*, *HSPA1B* и *HSPA6* между популяциями PBMC и PMN. Анализ проведен у пациентов с БП (А), ЗД (Б). Сплошной линией обозначена медиана, верхняя и нижняя границы обозначают минимум и максимум, знак ns (not significant) отражает статистически недостоверные отличия. **p < 0,01, *** p < 0,001.

3.3. 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 [167]. 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 11А). Поскольку аутофагия имеет решающее значение в индукции апоптоза [168] был проанализирован спонтанный апоптоз РВМС в исследуемых группах. Процентное содержание апоптозных клеток среди культивируемых *in vitro* РВМС было увеличено у пациентов с БП по сравнению с группой ЗД (Рисунок 11Б). 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 отсутствовала (Рисунок 11 В, Г). Предположительно накопление белка p62 в РВМС пациентов с БП является предпосылкой для их апоптоза.

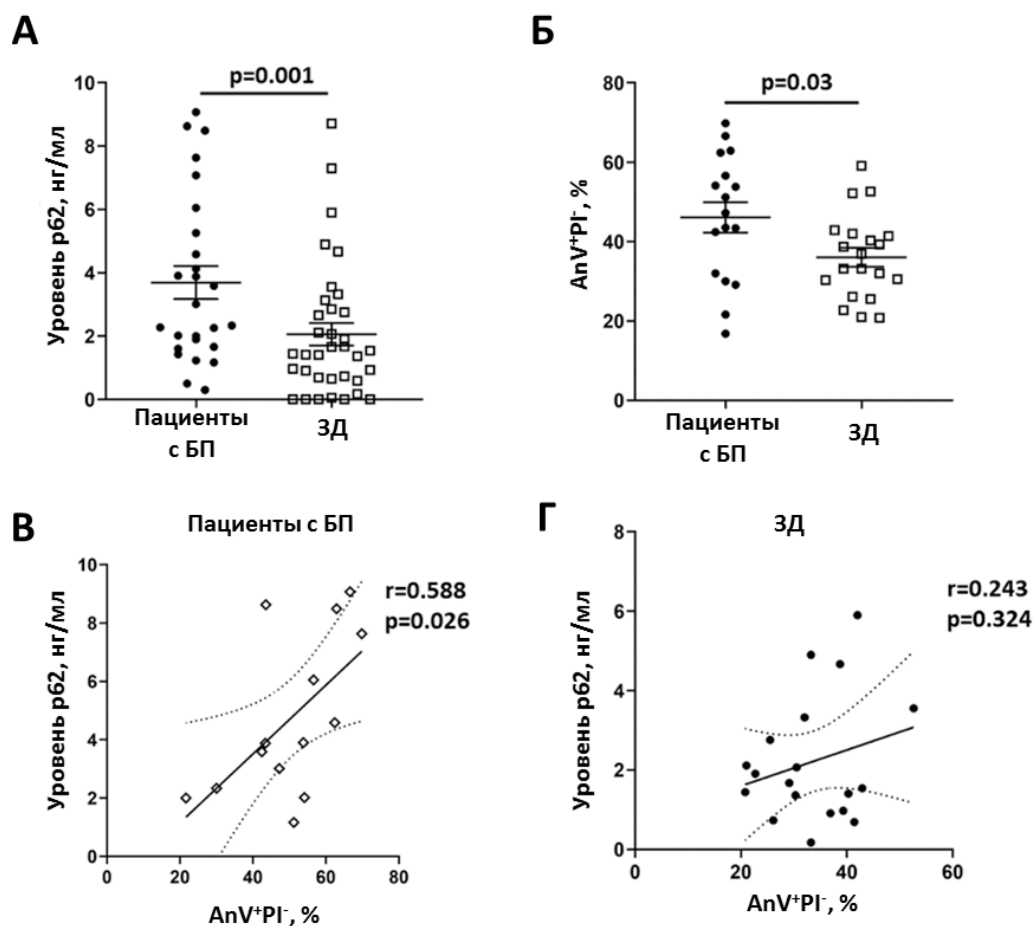


Рисунок 11. Внутриклеточный уровень белка p62 и процент спонтанного апоптоза в RBMC пациентов с БП, ЗД и их взаимосвязь. (А) Сравнение внутриклеточного уровня белка p62 (нг/мл) между пациентами с БП и группой ЗД. (Б) Процент апоптотических клеток среди RBMC в группах пациентов с БП и ЗД. (В) Анализ корреляции между процентным содержанием апоптотических клеток и уровнем p62 (нг/мл) в RBMC пациентов с БП и (Г) ЗД. Сплошной линией обозначено среднее значение (\pm SEM). В корреляционном анализе оценивали коэффициент корреляции Пирсона; пунктирной линией обозначен 95% доверительный интервал (В, Г).

3.4. 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 RBMC 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 12).

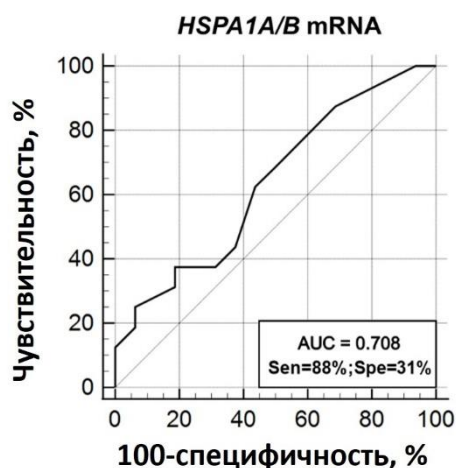


Рисунок 12. Биомаркер на основе мРНК гена *HSPA1A/B* в РВМС для различения БП с чувствительностью 88,0% и специфичностью 31%.

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 13 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*, для выявления БП. Анализ такой комбинации показал промежуточную чувствительность и высокую специфичность для дифференциальной диагностики БП (Рисунок 13В).

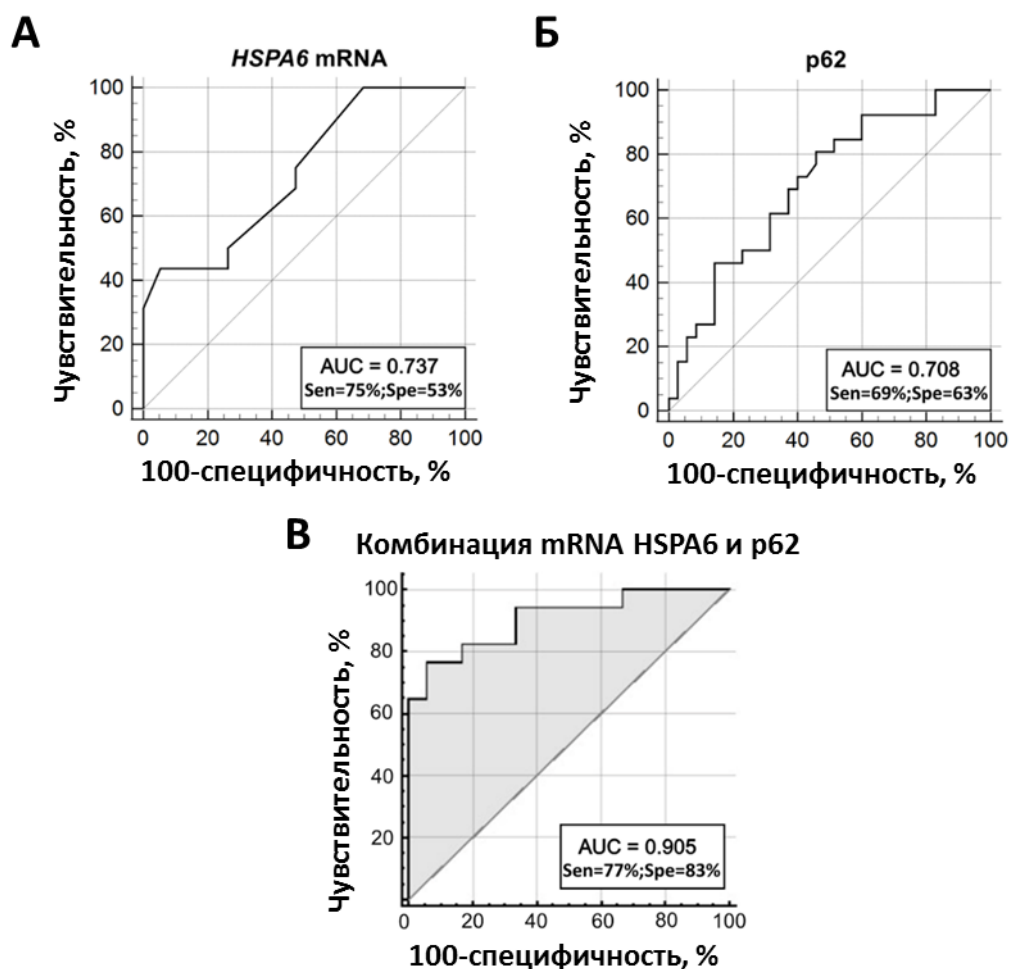


Рисунок 13. ROC-анализ, демонстрирующий уровень экспрессии генов группы *HSPA* и белка p62 в качестве потенциальных биомаркеров БП. (А) Уровень мРНК гена *HSPA6* в РВМС с 75,0% чувствительностью и 52,63% специфичностью. (Б) Уровень белка p62 в РВМС с 69,23% чувствительностью и 62,86% специфичностью. (с) Комбинация мРНК гена *HSPA6* и белка p62 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 p62 и мРНК гена *HSPA6*, измеренных в РВМС, может рассматриваться в виде потенциальных биомаркеров для различения БП на ранних/средних стадиях.

3.5. 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 [151] и может выступать как потенциальный провокатор прогрессирования нейродегенерации при БП [10]. Кроме того, CMV-инфекция вызывает значительную реконфигурацию репертуара НК-клеточных рецепторов, приводящую к накоплению так называемых адаптивно-подобных НК-клеток [169]. В связи с этим, в данном исследовании проанализирован серологический CMV-статус как пациентов с БП, так и здоровых лиц. Доля CMV-инфицированных индивидов составили 100% (31/31) в группе пациентов с БП и 76% (25/33) в группе ЗД ($p=0,003$).

На первом этапе было проанализировано распределение субпопуляций 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 4). Так же не было обнаружено различий и при сравнении тех же параметров между пациентами с БП и только CMV-серопозитивными ЗД (Таблица 4).

Таблица 4. Процентное содержание Т-клеток (CD3⁺), включая субпопуляции CD4⁺ и CD8⁺, и NK-клеток у пациентов с БП, группы ЗД и CMV-серопозитивных ЗД.

Субпопуляция (%)	Пациенты с БП		CMV-серопозитивные ЗД	p-уровень значимости	
	n=31	ЗД n=33		①vs②	①vs③
	①	②	③		
CD3 ⁺	70.7 ± 2.1	70.6 ± 1.8	71.5 ± 2.1	0.9	0.7
CD3 ⁺ CD56 ⁺	13.9 ± 1.7	12.1 ± 1.3	11.8 ± 1.5	0.5	0.4
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻	66.6 ± 1.9	63.5 ± 1.9	63.6 ± 2.4	0.2	0.4
CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺	25.5 ± 1.5	27.9 ± 1.8	28.76 ± 2.3	0.3	0.3

Значения представлены как среднее (±SEM), ①, ②, ③ - группы доноров.

n- количество индивидов в группе.

Таким образом, не было выявлено какого-либо ассоциированного с БП изменения как в общем содержании Т-клеток (CD3⁺), так и их субпопуляций CD4⁺ и CD8⁺, а также NK-клеток, на фоне инфекции CMV.

3.6. 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⁺). Стратегия гейтирования при анализе цитометрических данных представлена на рисунке 14.

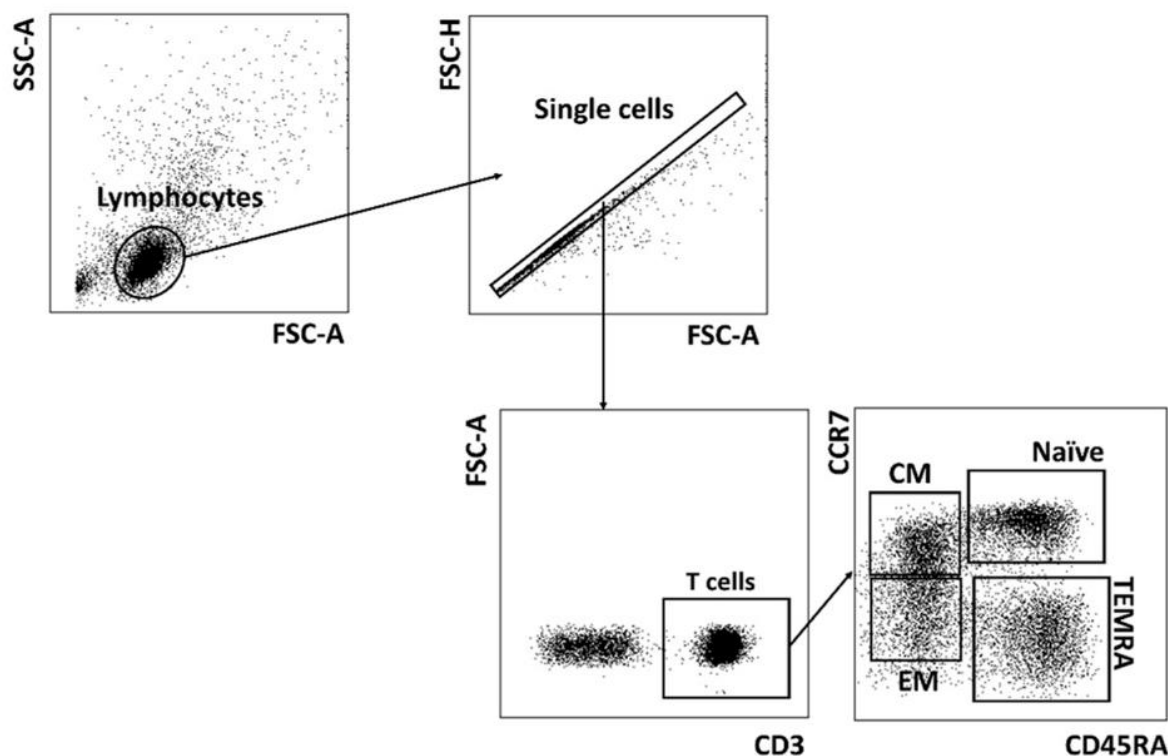


Рисунок 14. Стратегия гейтирования для субпопуляций Т-клеток ($CD3^+$) на разных стадиях дифференцировки. Выделялись следующие субпопуляции: Naïve, TCM, TEM и TEMRA.

Доля CMV-негативных доноров в группе ЗД составила 24%, что соответствовало средней распространенности CMV-инфекций в общей популяции [170]. 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 15А). Тем самым у ЗД продемонстрирован CMV-ассоциированный сдвиг дифференцировки Т-клеток в сторону клеток TEMRA у ЗД.

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 15Б, таблица 5).

Различий в пропорциях наивных (naïve), ТСМ и ТЕМ между пациентами с БП и CMV-серопозитивными ЗД не наблюдалось (Таблица 5).

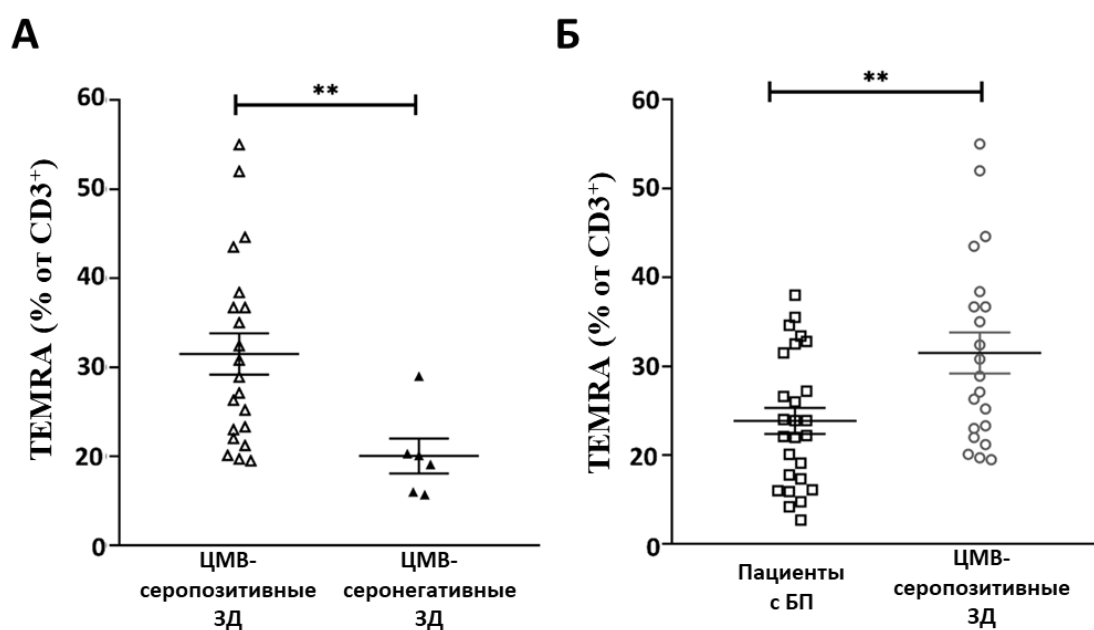


Рисунок 15. Доля клеток TEMRA в популяции CD3⁺ клеток периферической крови. (А) доля клеток TEMRA у CMV-серопозитивных по сравнению с CMV-серонегативными индивидами из группы ЗД. (Б) Доля клеток TEMRA у пациентов с БП по сравнению с CMV-серопозитивными индивидами из группы ЗД. Сплошной линией обозначено среднее значение (\pm SEM). ** $p < 0,01$.

Таблица 5. Процентное содержание наивных Т-клеток (naïve) и Т-клеток памяти (Т_{СМ}, Т_{ЕМ} и Т_{ЕМРА}) в РВМС пациентов с БП по сравнению с ЗД и СМV-серопозитивными индивидами из группы ЗД.

Субпопуляция (% от Т-клеток)	Пациенты с БП n=27 ①	ЗД n=27 ②	СМV- серопозитивные ЗД n=21 ③	p-уровень значимости	
				①vs②	①vs③
CCR7 ⁺ CD45RA ⁺ (Naïve)	40.1 ± 2.8	37.3 ± 2.7	34.5 ± 3.1	0.5	0.1
CCR7 ⁺ CD45RA ⁻ (Т _{СМ})	29.8 ± 1.9	28.3 ± 1.9	28.4 ± 1.9	0.6	0.6
CCR7 ⁻ CD45RA ⁻ (Т _{ЕМ})	15.0 ± 1.7	15.3 ± 1.1	15.4 ± 1.3	0.5	0.8
CCR7 ⁻ CD45RA ⁺ (Т _{ЕМРА})	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.

3.7. Анализ экспрессии маркера терминальной дифференцировки CD57 и рецептора NKG2C в субпопуляциях CD56⁻ и CD56⁺ Т-клеток и НК-клеток у пациентов с БП

Фракция высокодифференцированных клеток Т_{ЕМРА} часто включает популяцию НКТ-подобных клеток с фенотипом CD3⁺CD56⁺ (далее CD56⁺ Т-клетки). Известно о фенотипических и функциональных изменениях иммунных клеток во фракции CD56⁺ у пациентов с различными инфекциями [138]. В данной работе была произведена оценка распределения как CD56⁻, так и CD56⁺ Т-клеток у пациентов с БП и ЗД. Стратегия гейтирования и репрезентативные данные доли CD57⁺ клеток среди CD56⁻ и CD56⁺ Т-клеток одного донора показаны на рисунке 16.

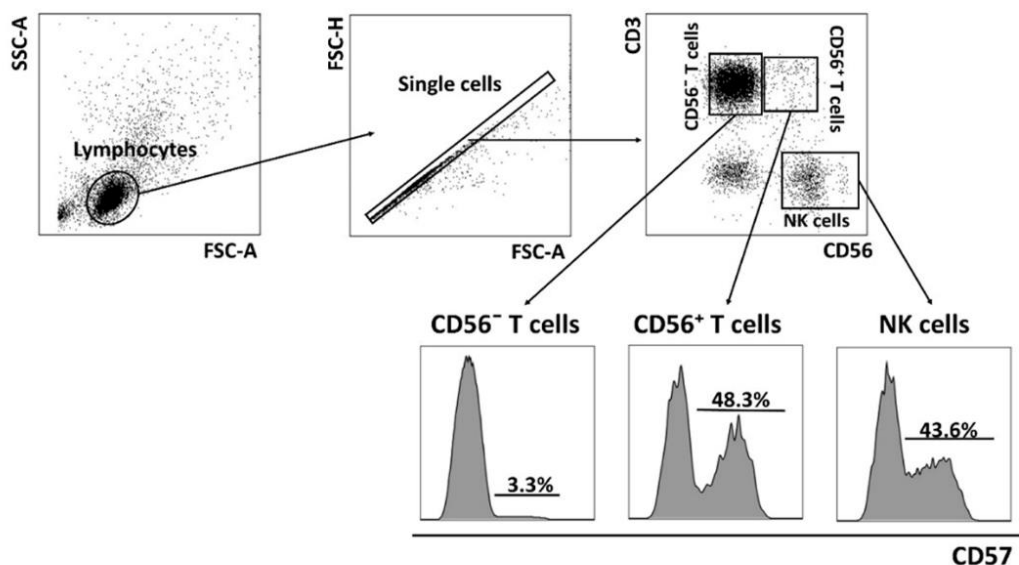


Рисунок 16. Анализ экспрессии маркера CD57 на Т- и NK-клетках. Представлена стратегия гейтирования и репрезентативное распределение CD57⁺ клеток среди подмножеств CD56⁻ и CD56⁺ Т-клеток и NK-клеток.

Существенных различий в доле CD56⁻ и CD56⁺ Т-клеток между пациентами с БП и ЗД, а также CMV-серопозитивными ЗД выявлено не было (Таблица 6).

Известно, что при инфекции CMV увеличивается доля Т-клеток, экспрессирующих углеводный антиген CD57, являющийся маркером терминально дифференцированных, «стареющих» лимфоцитов [171]. 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 17А, таблица 6), но была снижена у пациентов с БП по сравнению с CMV-серопозитивными индивидами из группы ЗД (рисунок 17Б, таблица 6).

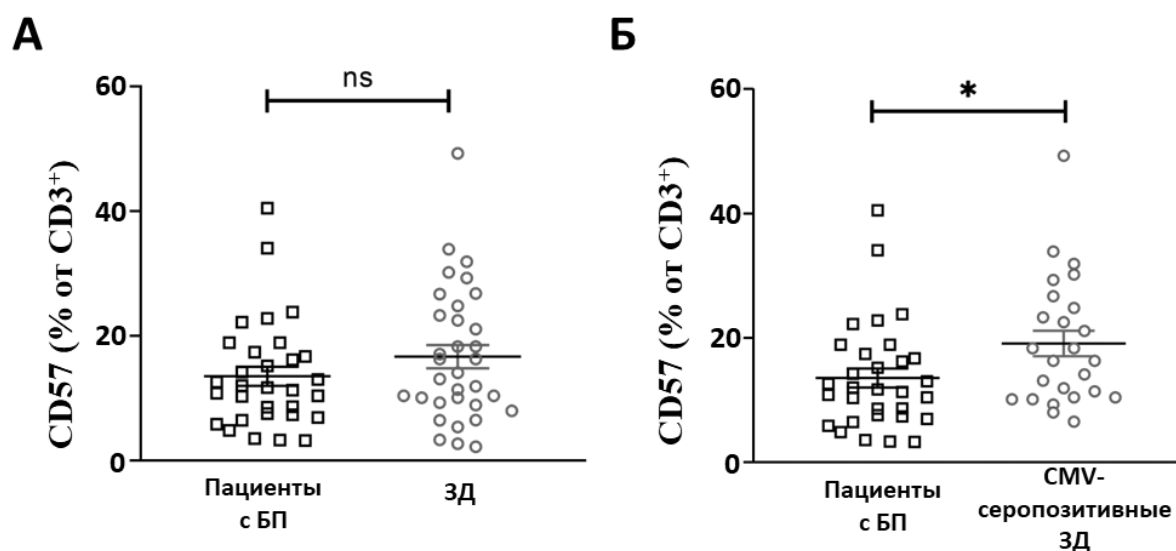


Рисунок 17. Сравнительный анализ процентного содержания $CD57^+$ клеток в $CD3^+$ Т-клетках. Сравнение проведено: (А) между пациентами с БП и всеми участниками из группы ЗД, включающей CMV-серопозитивных и CMV-серонегативных доноров; (Б) между пациентами с БП и только CMV-серопозитивными индивидами из 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 18А). 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 18Б, таблица 6).

Поскольку персистирующая инфекция CMV в организме человека также связана с накоплением репликативно стареющих $CD57^+$ адаптивно-подобных НК-клеток [172], мы проанализировали долю $CD57^+$ среди НК-клеток в исследуемых когортах. Однако, у пациентов с БП не наблюдалось отклонений в пропорции $CD57^+$ -экспрессирующих НК-клеток (Рисунок 18Б, таблица 6).

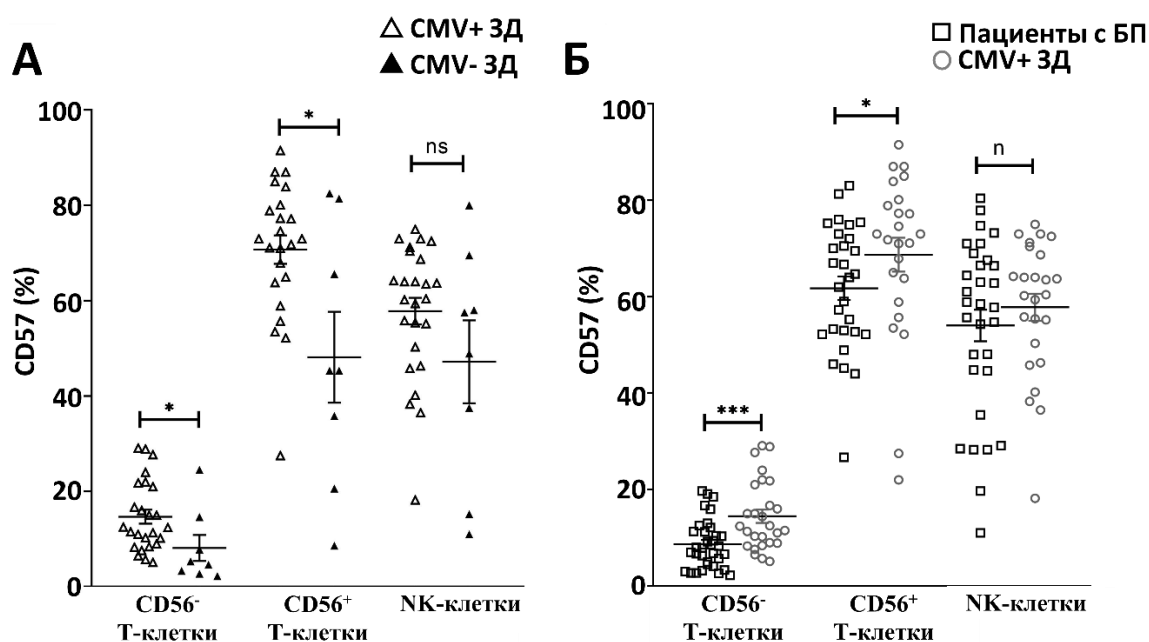


Рисунок 18. Сравнение процентного содержания CD57⁺ клеток в подмножествах CD56⁻, CD56⁺ Т-клеток и NK-клеток. Сравнение проведено: (А) между CMV-серопозитивными и CMV-серонегативными донорами из группы ЗД; (Б) между пациентами с БП и CMV-серопозитивными индивидами из группы ЗД. Сплошной линией обозначено 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 19А). 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 19Б). 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 19Б).

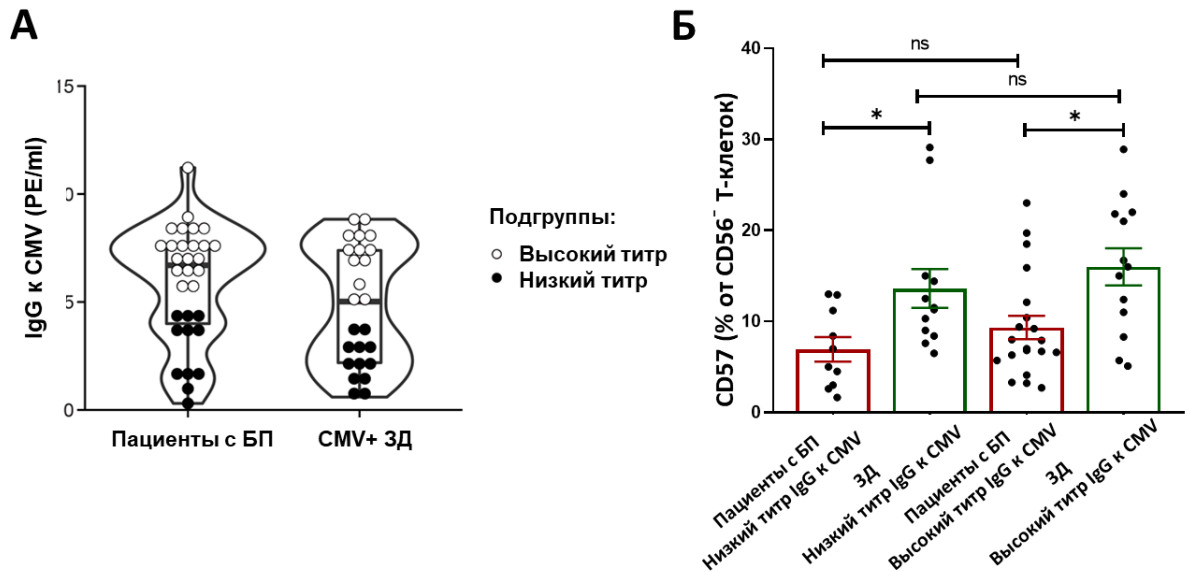


Рисунок 19. Анализ процентного содержания CD57⁺ Т-клеток при разделении участников исследования на подгруппы по значениям титров IgG к CMV среди пациентов с БП и ЗД. (А) Частотное распределение значений IgG к CMV у пациентов с БП и ЗД. (Б) Процентное содержание CD57⁺ клеток среди CD56⁻ Т-клеток у пациентов 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 НК-клеток, экспрессирующих активирующий рецептор NKG2C [172], было проанализировано процентное содержание NKG2C⁺ клеток во фракциях CD56⁻ и CD56⁺ Т-клеток и в НК-клетках у пациентов с БП и в группе ЗД. Как и ожидалось, доля NKG2C⁺ среди НК-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 20А). Наблюдалась тенденция к повышенному уровню NKG2C-экспрессирующих Т-клеток, особенно в субпопуляции CD56⁺ 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 20А).

Затем было проведено сравнение доли клеток, экспрессирующих активирующий рецептор NKG2C, в субпопуляциях CD56⁻ Т-клеток, CD56⁺ Т-клеток и НК-клеток между группой пациентов с БП и группой ЗД. Доля NKG2C⁺ НК-клеток была выше у пациентов с БП, чем в группе ЗД (Рисунок

20Б, таблица 6), что неудивительно, поскольку все участники исследования из группы БП были инфицированы CMV. В то же время, не было обнаружено различий в доле NKG2C⁺ NK-клеток между CMV-серопозитивными индивидами из группы ЗД и группой пациентов с БП. Никаких различий в доле NKG2C⁺ клеток в субпопуляциях CD56⁻ и CD56⁺ Т-клеток между CMV-серопозитивными индивидами из группы ЗД и пациентов с БП обнаружено не было (Рисунок 20В). Таким образом, индуцированное инфекцией CMV образование субпопуляций NK-клеток и Т-лимфоцитов, экспрессирующих NKG2C, не изменялось при БП.

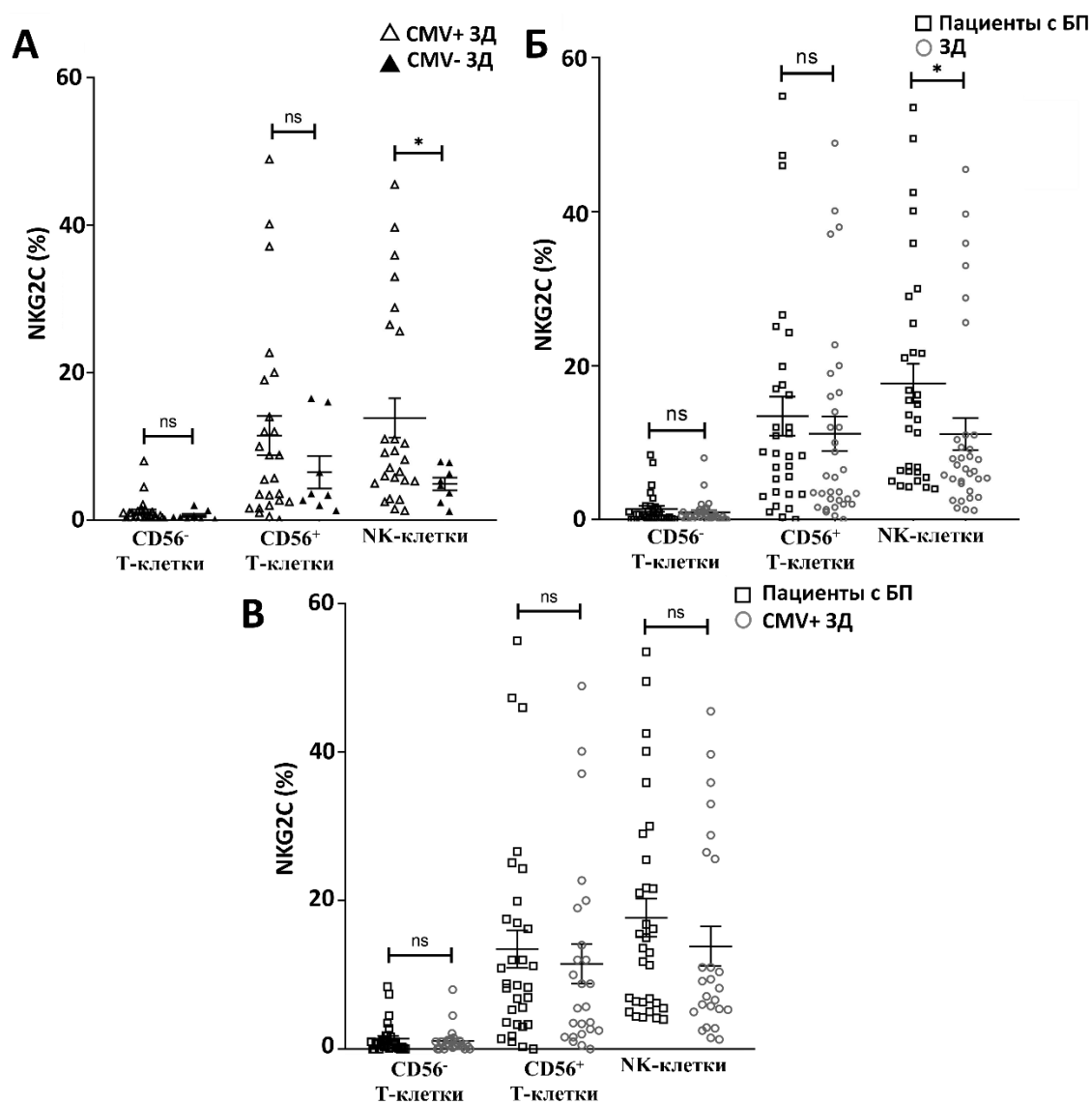


Рисунок 20. Процентное содержание NKG2C⁺ клеток среди CD56⁻ и CD56⁺ Т-клеток и NK-клеток у CMV-серопозитивных и серонегативных доноров. Различия в доле NKG2C⁺ клеток в CD56⁻ и CD56⁺ Т-клетках и NK-клетках между (А) CMV-серопозитивными и CMV-серонегативными индивидами из группы ЗД; (Б) между пациентами 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 6. Сравнение доли CD57⁺ и NKG2C⁺ клеток среди CD56⁻, CD56⁺ Т-клеток и NK-клеток между пациентами с БП, группой ЗД и CMV-серопозитивными индивидами из группы ЗД.

Субпопуляции	Пациенты с БП n=31 ①	ЗД n=33 ②	CMV- серопозитивные ЗД n=25 ③	p-уровень значимости	
				① vs ②	① vs ③
CD56 ⁻ Т-клетки	52.4 ± 2.2	52.9 ± 2.4	53.63 ± 2.7	0.9	0.6
CD56 ⁺ Т-клетки	3.9 ± 0.5	4.1 ± 0.6	4.7 ± 0.7	0.9	0.6
CD57 (% от CD3 ⁺ клеток)	13.52 ± 1.5	16.7 ± 1.9	19.1 ± 2.1	0.2	0.03
CD57 (% от CD56 ⁺ 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 ⁻ Т-клеток)	1.3 ± 0.4	0.9 ± 0.3	1.1 ± 0.3	0.3	0.6
NKG2C (% от CD56 ⁺ 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.

3.8. Анализ доли CD57⁺CD56⁻ Т-клеток в группе молодых здоровых доноров

Виду того, что на долю CD57-экспрессирующих как Т-, так и NK-клеток может влиять возраст человека [151], 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⁺CD56⁻ и CD57⁺CD56⁺ 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 18А, рисунок 21А). Кроме того, было показано увеличение доли NKG2C⁺ клеток во фракции CD56⁺ 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 21Б).

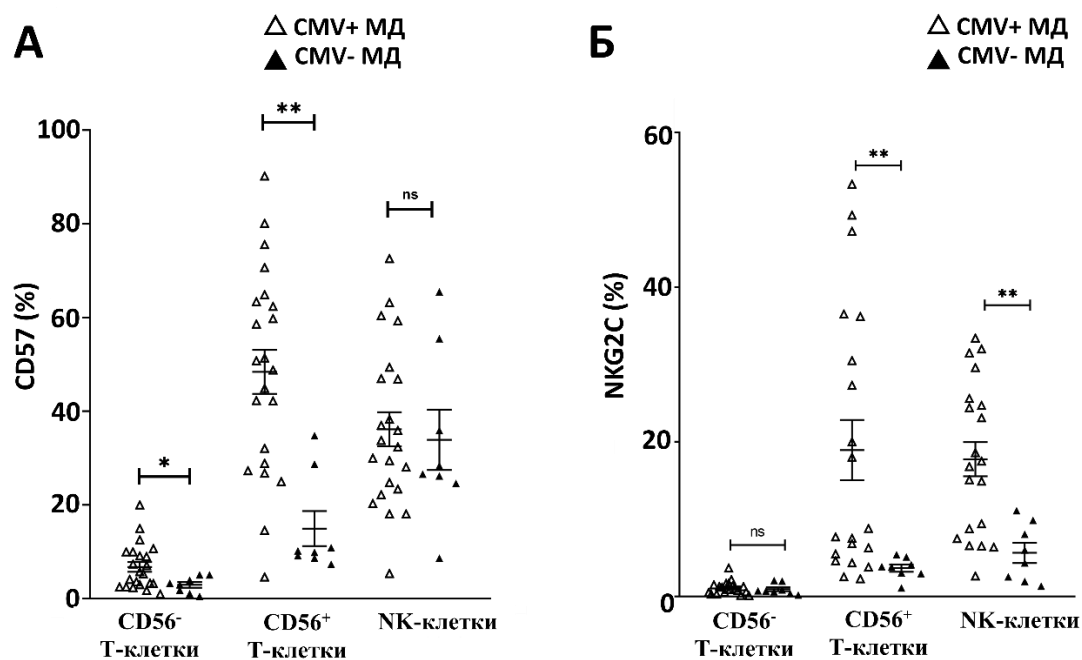


Рисунок 21. Доля клеток CD57⁺ и NKG2C⁺ у CMV-серопозитивных и CMV-серонегативных молодых здоровых доноров (МД). (А) Процентное содержание CD57⁺ клеток во фракциях CD56⁻ и CD56⁺ Т-клеток и в NK-клетках; (Б) доля NKG2C⁺ клеток в CD56⁻ и CD56⁺ Т-клетках и в популяции NK-клеток. Сплошной линией обозначено среднее значение (\pm SEM). Знак ns (not significant) отражает статистически недостоверные отличия. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Как и ожидалось, доля CD57⁺ клеток была ниже как в субпопуляции CD56⁻, так и в субпопуляции CD56⁺ Т-клеток, а также в NK-клетках в группе МД по сравнению с группой пациентов с БП и группой ЗД (Рисунок 22А). Интересно, что не было никаких существенных различий в доле CD57-экспрессирующих CD56⁻ 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⁺CD57⁺ Т-клеток и CD57⁺ 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 22Б). Таким образом, можно

заклучить, что у больных БП не наблюдалось феномена уменьшения доли $CD56^-CD57^+$ Т-клеток, опосредованного возрастом.

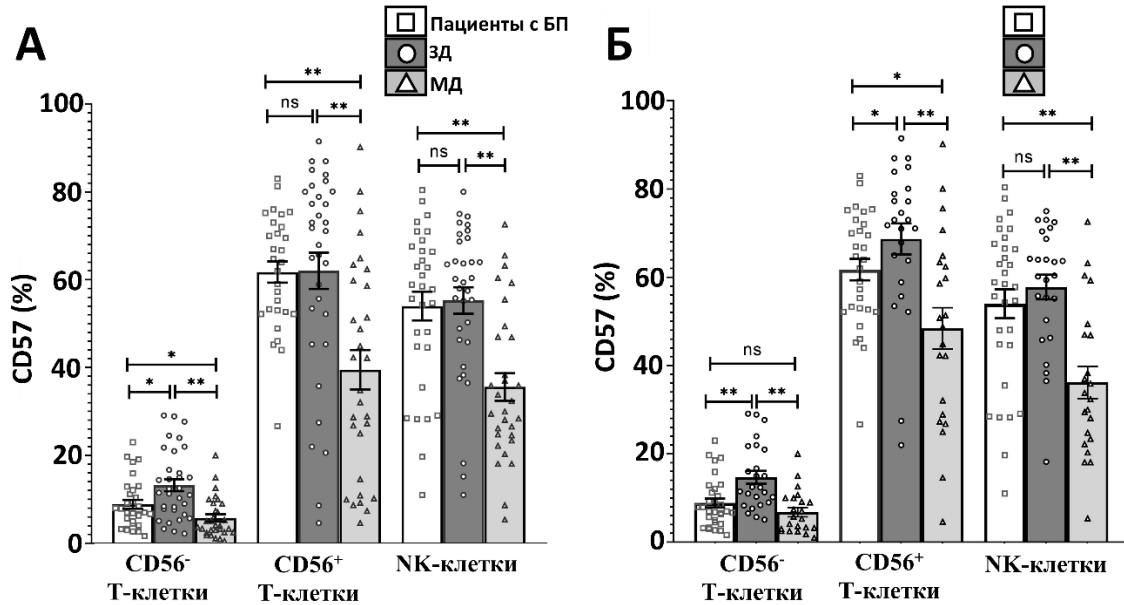


Рисунок 22. Процентное содержание $CD57^+$ клеток в субпопуляциях $CD56^-$ и $CD56^+$ Т- и NK-клеток у пациентов с БП, ЗД и МД в отношении персистенции CMV. Сравнение проведено: (А) в трех группах, включая CMV-серопозитивных и CMV-серонегативных индивидов; (Б) у пациентов с БП и CMV-серопозитивных индивидов из групп ЗД и МД. Сплошной линией обозначено среднее значение (\pm SEM). Знак ns (not significant) отражает статистически недостоверные отличия. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4. Обсуждение результатов

Основываясь на том, что БП – нейродегенеративное расстройство, связанное с нарушением регуляции протеостаза в клетках головного мозга, а именно, шаперон-опосредованного фолдинга, аутофагической и лизосомальной деградации белков, в этом исследовании были проанализированы изменения двух важных основных компонентов системы внутриклеточного протеостаза: шаперонных белков семейства HSP70 и медиатора макроаутофагии – белка p62 в периферических мононуклеарах при БП.

Показано, что уровень HSP70 повышается с возрастом в мононуклеарных клетках крови человека [173], а уровень Hsc70 и экспрессия кодирующего его гена *HSPA8*, значительно снижены в PBMC пациентов с БП [7,174]. Однако, в нашей когорте пациентов с идиопатической БП мы не выявили значительных изменений базального уровня белков HSP70 (Hsc70 + Hsp70-1) в свежесыводенных PBMC по сравнению с ЗД. Учитывая то, что в клетках PBMC уровень Hsc70 превалирует среди пула белков HSP70 [37,165] и Hsp70-1 детектируется в следовых количествах (Рисунок 5), можно заключить об отсутствии критических нарушений со стороны синтеза Hsc70 в PBMC на фоне БП (Рисунок 6).

Учитывая, что практически все внутриклеточные белки HSP70 *in vivo* находятся в связанном с субстратом состоянии: (в различных комплексах с другими белками, транскрипционными факторами, нуклеотидами и мембранами [175,176], некоторые эпитопы HSP70 могут быть скрыты от специфических антител и, в неденатурирующих условиях, такие белки могут только частично обнаруживаться с помощью проточной цитометрии. Поэтому дополнительно был проанализирован уровень HSP70 сразу после кратковременного нагревания клеток (HSP70_{heat}), и который, по-видимому, был связан с лучшей доступностью эпитопов субстрат-связывающего домена HSP70 для антител [164], а также уровень Δ HSP70 (разница между HSP70_{heat}

и HSP70_{basal}), отражающий количество HSP70, свободного от субстрата. Значение дельта (Δ HSP70) может значительно увеличиваться с возрастом, что ранее было продемонстрировано на примере популяции гранулоцитов [164]

Несмотря на то, что БП связана со старением и нарушением фолдинга белков, значения Δ HSP70 не отличались между пациентами с БП и ЗД в популяции РВМС.

Отсутствие различий в уровне экспрессии *HSPA8* между группами в данном исследовании соответствовало полученным результатам по внутриклеточному содержанию HSP70.

Когорты пациентов с БП значительно различаются в исследованиях, поскольку идиопатическая форма БП имеет сложную этиологию, включающую множество факторов, таких как образ жизни, генетика и окружающая среда [177]. Расхождение между исследованиями может быть объяснено различными клиническими характеристиками идиопатических случаев БП, включенных в исследования. По-видимому, выявленное в другом исследовании снижение уровня внутриклеточного белка Hsc70 в РВМС, не превышающее 20% [7], свидетельствует о том, что демографические и клинические характеристики когорты больных могут быть критическим фактором для выявления дефицита Hsc70, регулятора шаперон-ассоциированного фолдинга белков в этих клетках. Эта точка зрения была подтверждена отсутствием какой-либо корреляции между уровнем экспрессии Hsc70 в РВМС и степенью прогрессирования БП (оценка UPDRS III и продолжительность заболевания) [7] и, в целом, означала, что уровень Hsc70 в РВМС не может быть использован в качестве биомаркера БП.

В отличие от экспрессии конститутивного гена *HSPA8*, в данной работе было показано, что экспрессия стресс-индуцированных генов *HSPA* была повышена в РВМС у пациентов с БП (Рисунок 8). Транскрипционная активность гена *HSPA1A/B* была статистически значимо выше у пациентов с

БП по сравнению со здоровыми людьми того же возраста. Возможно, этому увеличению, в основном, способствовала изоформа *HSPA1A*. С другой стороны, у некоторых индивидов повышению уровня экспрессии *HSPA1A/B* в группе пациентов с БП мог способствовать повышенный уровень экспрессии изоформы *HSPA1B*. Ранее была продемонстрирована SNP-зависимая вариабельность транскрипционной активности *HSPA1B*. На когорте российской популяции наблюдались более высокие уровни экспрессии *HSPA1B* в РВМС доноров, гомозиготных по определенным генам, по сравнению с гетерозиготными [178] (Приложение, Таблица П1, рисунок П1).

Уровень транскрипта *HSPA6* был повышен у пациентов с БП по сравнению с ЗД (Рисунок 8). Считается, что основные стресс-индуцированные гены *HSPA6* и *HSPA1A* происходят от одного и того же предкового гена [179], однако повышенная экспрессия гена *HSPA6* является индикатором наиболее сильного клеточного стресса. Помимо этого, белок *HSPA6* проявляет определенные особенности при нацеливании на белковые субстраты, которые не наблюдаются для *HSPA1A* [180]. Одновременное и взаимосвязанное повышение уровня мРНК генов *HSPA1A/B*, в частности *HSPA1A* и *HSPA6* в РВМС, подтверждено в нашем исследовании сильной положительной корреляцией между этими значениями в группах пациентов с БП и ЗД (Рисунок 9). Также было отмечено, что такое усиление экспрессии генов *HSPA1A/B* и *HSPA6* при БП характерно только для РВМС. Во фракции PMN такого изменения не наблюдалось (Таблица 3), несмотря на то, что эти клетки отличаются от РВМС более высокими уровнями базальной экспрессии этих генов [165]. Можно заключить, что стресс-индуцированный ответ со стороны *HSPA* в РВМС может быть следствием клеточного стресса, наблюдаемого при БП. Участие воспалительно-опосредованного стресса (например, оксидативного стресса) в развитии БП подтверждается многочисленными исследованиями [181–183]. Описаны последствия окислительного стресса для лизосомальной деградации в РВМС пациентов с БП [81].

Поскольку в основе патогенеза БП, наряду с другими изменениями, лежит изменение в активности процессов аутофагии в пораженных клетках головного мозга и уровень связанного с аутофагией белка p62 был обнаружен в ТЛ посмертной ткани головного мозга пациентов с БП [184], актуальной задачей было проследить, происходят ли аналогичные изменения в РВМС. Ранее, уровень белка p62 в качестве периферического маркера БП не рассматривался. В этой работе было выявлено, что, уровень внутриклеточного белка p62 в РВМС был значительно выше у больных БП по сравнению с ЗД (Рисунок 11), что сопоставимо с ранее продемонстрированной сверхэкспрессией гена *P62/SQSTM1* в РВМС пациентов с БП [9]. Интересно, что в настоящем исследовании уровень белка p62 в РВМС положительно коррелировал с уровнем спонтанного апоптоза РВМС в группе пациентов с БП (Рисунок 11). Аутофагический-лизосомальный путь играет критическую роль в апоптозе посредством p62-опосредованной регуляции полиубиквитинирования и агрегации С-терминального цитозольного Fas/CD95 [185] или посредством активации каспазы-8 [186]. Было показано, что при БП CD4⁺ Т-клетки периферической крови обладают повышенной чувствительностью к Fas-индуцированному апоптозу [187]. Поскольку p62 участвует как в путях аутофагии, так и в путях апоптоза, повышенный уровень p62 у пациентов с БП может усиливать предрасположенность РВМС к спонтанному апоптозу.

Участие p62 в аутофагии и прогрессировании БП можно рассматривать с разных сторон. Сигнальный адаптер p62 является медиатором важных клеточных функций благодаря своей способности взаимодействовать с различными сигнальными мессенджерами и является составной частью комплекса mTORC1, необходимого для активации передачи сигналов аутофагии [188]. Взаимодействие, модифицированной фосфотидилэтаноламином, формы белка LC3 (LC3-II) и p62 является центральным событием аутофагии и имеет решающее значение для

формирования аутофагосом [189]. Было показано, что конверсия LC3-I в LC3-II повышена в РВМС при БП [81]. В другой работе выявили повышенную экспрессию гена LC3, а также увеличенный уровень белка LC3-II в лейкоцитах пациентов с БП, что указывает на накопление аутофагосом [82]. Было выявлено снижение удельного количества аутофагических вакуолей в РВМС пациентов с БП по сравнению со здоровыми субъектами [190]. Модуляция внутриклеточной передачи сигналов, участвующих в выживании, росте, пролиферации и метаболизме нейронов при БП, указывает на то, что активность аутофагии, связанная с p62, регулируется на посттрансляционном и транскрипционном уровнях [191]. Например, экспрессия гена *p62/SQSTM1*, захватывающего субстрат, сильно зависит от транскрипционного фактора EB (TFEB) [192]. Более того, TFEB-опосредованные пути участвуют в устойчивости к окислительному стрессу, стимулируя биогенез лизосом и регулируя аутофагические белки [193]. Функция, связанная с белком p62, не ограничивается только оборотом аутофагических лизосом. Неспособность элиминировать p62 посредством аутофагии может привести к токсическому усилению окислительного стресса и повреждению ДНК в некоторых тканях [194]. Учитывая, что индуцируемый стрессом клеточный белок p62 служит селективным рецептором аутофагии для рекрутирования в лизосому и участвует в реакции на окислительный стресс активацией mTORC1-пути, можно предположить, что выявленное нами повышенное накопление p62 в РВМС пациентов с БП может происходить за счет нарушения вышестоящих путей регуляции p62.

Основываясь на ROC-анализе, мы пришли к выводу, что экспрессия гена *HSPA1A/B* не может достоверно отличить больных с БП от ЗД (Рисунок 12), а повышенный уровень мРНК *HSPA6* или уровень внутриклеточного белка p62 сами по себе не могут рассматриваться как надежные биомаркеры БП из-за недостаточной специфичности (Рисунок 13 А, Б). В то же время, базальная транскрипционная активность *HSPA6* в сочетании с уровнем белка p62 имеет

потенциальное диагностическое значение при дифференциальной диагностике БП (Рисунок 13 В). Очевидно, что внутриклеточные уровни HSP70/Hsc70, связанные с протеостазом, в РВМС не являются надежными и специфическими маркерами БП по сравнению с их уровнями в черной субстанции при БП. С другой стороны, повышенная экспрессия генов *HSPA1A/B* и *HSPA6* в РВМС может свидетельствовать о реакции клеток на оксидативный стресс на фоне БП. Таким образом, мы предполагаем, что комбинированное измерение экспрессии гена *HSPA6* и уровня белка p62 как комплексного биомаркера может иметь диагностическое значение для дифференциации БП.

Одним из направлений данного исследования было изучение дифференцировки и старения периферических лимфоцитов, которые играют важную роль в противовирусной защите при персистенции CMV, и их взаимосвязь с БП. Ассоциация некоторых вирусов с патогенезом БП показана в ряде работ [10,139,157], однако литературных данных о роли инфекции CMV в развитии БП недостаточно. Доля CMV-серопозитивных индивидов варьирует в разных странах от 50% до 100% [195]. В нашем исследовании в контрольной группе здоровых доноров (ЗД) доля CMV-серопозитивных индивидов составила 76%, что, по-видимому, характерно для населения России. Однако все участники данного исследования из группы пациентов сопоставимого возраста с БП были CMV-серопозитивными, что может указывать на возможную взаимосвязь между CMV-инфекцией и развитием БП, хотя такое предположение нуждается в подтверждении на более крупных выборках.

Известно, что при БП повышена проницаемость ГЭБ, что может способствовать проникновению цитокинов, хемокинов и клеток периферической иммунной системы из кровотока в ЦНС [196,197]. Т-клетки могут проникать в ЦНС через ГЭБ, например, при нейровоспалении [119]. Лимфоциты ограничивают очаг повреждения нейронов, вызванного

инфекцией, механическим повреждением или нейродегенеративными процессами [198].

В свою очередь инфекция CMV, может влиять на дифференцировку как Т-, так и НК-клеток периферической крови и вызывать их функциональные и фенотипические изменения [149,199,200]. В связи с этим в данной работе было проанализировано распределение и дифференцировка этих клеток.

Известно, что серопозитивность по IgG к CMV связана с изменением общего репертуара Т-клеток у здоровых доноров пожилого возраста [151]. Поэтому, в данной работе были проанализированы Т-клетки на разных стадиях дифференцировки, включая наивные Т-клетки и Т-клетки памяти. Т-клетки памяти представляют собой гетерогенную клеточную популяцию, которая состоит из Т-клеток центральной памяти (TCM), обладающие высоким потенциалом самообновления, но низкой секреторной активностью, эффекторных Т-клетки памяти (TEM) и эффекторных Т-клеток памяти, повторно экспрессирующие CD45RA (TEMRA), характеризующихся ограниченной пролиферативной способностью, но высокой секреторной активностью широкого спектра цитокинов после активации [201]. В этом исследовании не было выявлено существенных различий в доле наивных, TCM, TEM и TEMRA субпопуляций среди CD3⁺ Т-клеток периферической крови между пациентами с БП и группой ЗД (Таблица 5). Учитывая, что CMV-серопозитивность способствует экспансии субпопуляции TEMRA среди Т-клеток (так называемой инфляцией) [136], была проанализирована выборка только среди здоровых доноров с CMV-серопозитивным статусом. При сравнении только CMV-серопозитивных индивидов из группы ЗД с группой пациентов с БП было обнаружено достоверное снижение доли CD3⁺ TEMRA клеток у пациентов с БП (Рисунок 15Б).

Реконфигурация репертуара НК-клеток, вызываемая инфекцией CMV, включает накопление так называемых адаптивно-подобных НК-клеток, экспрессирующих активирующий рецептор NKG2C и молекулу CD57

[169,202]. Однако нами не было обнаружено каких-либо различий в экспрессии активирующего рецептора NKG2C ни в Т-лимфоцитах, ни в НК-клетках (Рисунок 20) между группой пациентов с БП и ЗД. Хотя повышенная экспрессия NKG2C часто связана с индуцированной CMV Т- и НК-клеточной пролиферацией, что было показано ранее [144] и продемонстрировано в данной работе на когортах здоровых пожилых и здоровых молодых доноров (Рисунок 20, Рисунок 21). Таким образом, ответы, связанные с экспрессией рецептора NKG2C на Т- и НК-клетках на фоне инфекции CMV, по-видимому, не изменяются при БП. Также в этом исследовании не наблюдалось изменений доли CD57⁺ НК-клеток у пациентов с БП по сравнению с ЗД (Рисунок 18).

Дополнительный анализ дифференцировки Т-лимфоцитов и НК-клеток производился с учетом экспрессии молекулы адгезии CD56, которая повышается на поздних стадиях дифференцировки Т-клеток (НКТ-подобные клетки). Несмотря на то, что различные инфекции могут провоцировать экспансию субпопуляции CD56⁺ Т-клеток [138], не удалось обнаружить изменений в процентном содержании менее дифференцированной CD56⁻ и более дифференцированной CD56⁺ Т-клеточной субпопуляции при БП, а также при сравнении группы пациентов с БП с только CMV-серопозитивными индивидами ЗД (Таблица 5). Этот факт указывает на то, что более дифференцированные CD56⁺ Т-клетки (НКТ-подобные клетки), которые имеют некоторые общие фенотипические и функциональные черты с НК-клетками [146], по-видимому, не участвуют в патогенезе или в прогрессировании БП, даже на фоне CMV инфекции.

В данной работе в когортах здоровых молодых (МД) и здоровых пожилых доноров (ЗД) на фоне инфекции CMV было зарегистрировано увеличение доли стареющих, CD57⁺ Т-клеток, что соответствует с ранее опубликованными данными [203], а также было выяснено, что данные изменения затрагивают субпопуляцию как CD56⁻, так и CD56⁺ Т-клеток (Рисунок 18 А, рисунок 21 А).

С другой стороны, у пациентов с БП доля $CD57^+$ Т-клеток была снижена по сравнению с ЗД того же возраста, даже на фоне CMV-инфекции (Рисунок 17). В данной работе впервые было показано, что снижение доли терминально дифференцированных, $CD57^+$ Т-клеток было более выражено именно в субпопуляции $CD56^-$ Т-клеток пациентов с БП в сравнении с аналогичной по возрасту группой ЗД (Рисунок 18). Обнаруженное снижение доли $CD57^+$ Т-клеток не зависело от уровня сывороточного CMV-специфического IgG, а значит, не зависело от времени инфицирования и/или интенсивности CMV-реактивации. В то же время, это не исключает потенциальной роли CMV-инфекции как триггера БП на начальных стадиях.

Нарушения возрастного старения Т-клеток при БП были показаны ранее [127]. В данной работе доля $CD57^+$ клеток среди $CD56^-$ Т-клеток была на уровне значений у CMV-серопозитивных когорты МД (Рисунок 22). Можно заключить, что у пациентов с БП не наблюдается возраст-зависимого увеличения доли терминально дифференцированных $CD56^-CD57^+$ Т-лимфоцитов.

Существует несколько возможных объяснений снижения содержания $CD57^+$ Т-клеток у пациентов с БП. Во-первых, $CD57^+CD56^-$ и $CD57^+CD56^+$ Т-клетки при БП на фоне CMV могут более интенсивно мигрировать из кровотока в разные ткани. Например, была показана повышенная миграционная активность стареющих $CD8^+CD57^+$ Т-клеток в нелимфоидные ткани, опосредованная хемокиновым рецептором CX3CR1 на фоне инфекции, вызываемой вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) [204]. Было высказано предположение, что эффекторные $CD8^+CD57^+$ Т-клетки, экспрессирующие CX3CR1, привлекаются в головной мозг при повышенной регуляции лиганда CX3CR1 - CX3CL1 в астроцитах у ВИЧ-инфицированных пациентов с деменцией [205]. К тому же, нейровоспаление и нарушение ГЭБ могут способствовать инфильтрации пораженного участка головного мозга, недавно обнаруженными α -синуклеин специфичными Т-клетками при БП [206]. Таким

образом, нельзя исключить что наблюдаемая при БП повышенная проницаемость ГЭБ может способствовать инфильтрации головного мозга активированными CD57⁺ Т-клетками из периферической крови.

С другой стороны, инфекция CMV характеризуется накоплением CMV-специфических CD8⁺ Т-клеток путем дифференцировки, отличной от образования классических CD8⁺ Т-клеток памяти, образующихся после перенесенных острых респираторных вирусных инфекций [207]. Нельзя исключить потерю молекулы CD57 Т-клетками при БП. Показано, что в специфических условиях *in vitro* терминально дифференцированные CD57⁺ НК-клетки человека могут приобретать фенотип CD57⁻ [208]. Учитывая то, что уровни α -синуклеина в сыворотке у пациентов с БП были выше по сравнению со здоровыми донорами [94], а доля α -синуклеин-реактивных Т-клеток у пациентов с БП увеличивается [209], можно предположить, что из-за стимуляции Т-клеток специфическим антигеном, CD57⁺ Т-клетки у пациентов с БП также способны терять углеводный антиген CD57 и становиться CD57⁻ Т-клетками.

Выводы

- 1) Показано, что болезнь Паркинсона характеризуется усилением транскрипционной активности стресс-индуцированных 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⁺ 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⁻CD57⁺ Т-лимфоцитов, поскольку процентное содержание этих клеток было соизмеримо с таковым в группе молодых здоровых добровольцев.

Заключение

В рамках проведенной исследовательской работы было обнаружено, что в системе шаперонного гомеостаза и аутофагии в мононуклеарных клетках крови на фоне развития БП наблюдаются различия между группами пациентов с БП и здоровых доноров. В РВМС пациентов с БП изменяется транскрипция стресс-индуцированных 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.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю проф., д.б.н А.М. Сапожникову за предоставленную возможность на базе его лаборатории осуществить данную работу, ценные методические и научные указания, а также научному сотруднику лаборатории клеточных взаимодействий ИБХ РАН, к.б.н. А.А. Бойко за всестороннюю поддержку, помощь в организации исследования, обсуждение результатов и написание статей. Ведущему научному сотруднику, д.б.н. Т.Л. Ажикиной за предоставление возможности выполнения части экспериментальной работы в лаборатории структуры и функций генов человека ИБХ РАН, за ценные методические рекомендации. Отдельная благодарность выражается старшему научному сотруднику, к.б.н. Е.И. Коваленко за грамотную, планомерную, аргументированную методическую помощь и наставничество на всех этапах выполнения данной работы, за обучение искусству письма и грамотного изложения материала. Автор благодарит сотрудника научного центра неврологии, д.м.н. Пономареву Н.В. и сотрудника федерального клинического центра им. А.И. Бурназяна, к.м.н. Бриль Е.В. за помощь в подборе добровольцев для исследуемых групп.

Список литературы

1. Hou X. et al. Autophagy in Parkinson's Disease // *Journal of Molecular Biology*. 2020. Vol. 432, № 8.
2. Witt S.N. Hsp70 molecular chaperons and Parkinson's disease // *Biopolymers*. 2010.
3. Lim K.L., Tan J.M.M. Role of the ubiquitin proteasome system in Parkinson's disease // *BMC Biochem. BioMed Central*, 2007. Vol. 8, № Suppl 1. P. S13.
4. Bernheimer H. et al. Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington Clinical, morphological and neurochemical correlations // *J Neurol Sci. J Neurol Sci*, 1973. Vol. 20, № 4. P. 415–455.
5. Sharma S. et al. Biomarkers in Parkinson's disease (recent update) // *Neurochem Int. Neurochem Int*, 2013. Vol. 63, № 3. P. 201–229.
6. Chang C.W. et al. Plasma and Serum Alpha-Synuclein as a Biomarker of Diagnosis in Patients With Parkinson's Disease // *Front Neurol. Front Neurol*, 2020. Vol. 10.
7. Sala G. et al. Reduced expression of the chaperone-mediated autophagy carrier hsc70 protein in lymphomonocytes of patients with Parkinson's disease // *Brain Res*. 2014.
8. Miki Y. et al. Alteration of autophagy-related proteins in peripheral blood mononuclear cells of patients with Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, 2018. Vol. 63. P. 33–43.
9. El Haddad S. et al. Disturbed expression of autophagy genes in blood of Parkinson's disease patients // *Gene. Elsevier*, 2020. Vol. 738. P. 144454.
10. Bu X. Le et al. The association between infectious burden and Parkinson's disease: A case-control study // *Parkinsonism Relat Disord*. 2015.
11. Parkinson J. *NEUROPSYCHIATRY CLASSICS An Essay on the Shaking Palsy* Member of the Royal College of Surgeons PREFACE // *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2002. Vol. 14, № 2.
12. Ling H. et al. Hypokinesia without decrement distinguishes progressive supranuclear palsy from Parkinson's disease // *Brain*. 2012.
13. D.A. G., A.J. L., A. S. What are the most important nonmotor symptoms in patients with Parkinson's disease and are we missing them? // *Movement Disorders*. 2010.

14. Shadrina M.I., Slominsky P.A., Limborska S.A. Molecular mechanisms of pathogenesis of Parkinson's disease // *Int Rev Cell Mol Biol*. 2010. Vol. 281, № C. P. 229–266.
15. Nussbaum R.L., Ellis C.E. Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease // *New England Journal of Medicine*. 2003.
16. Hirtz D. et al. How common are the “common” neurologic disorders? // *Neurology*. 2007.
17. Hindle J. V. Ageing, neurodegeneration and Parkinson's disease // *Age and Ageing*. 2010.
18. Spillantini M.G. et al. α -synuclein in Lewy bodies [8] // *Nature*. 1997.
19. Wakabayashi K. et al. The Lewy body in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. // *Molecular neurobiology*. 2013.
20. Stefanis L. α -Synuclein in Parkinson's Disease // *Cold Spring Harb Perspect Med*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012. Vol. 2, № 2.
21. Ullman O., Fisher C.K., Stultz C.M. Explaining the Structural Plasticity of α -Synuclein // *J Am Chem Soc*. American Chemical Society, 2011. Vol. 133, № 48. P. 19536.
22. Hashimoto M. et al. Oxidative stress induces amyloid-like aggregate formation of NACP/ α -synuclein in vitro // *Neuroreport*. *Neuroreport*, 1999. Vol. 10, № 4. P. 717–721.
23. Andringa G. et al. Tissue transglutaminase catalyzes the formation of α -synuclein crosslinks in Parkinson's disease // *FASEB J*. *FASEB J*, 2004. Vol. 18, № 7. P. 932–934.
24. Li W. et al. Aggregation promoting C-terminal truncation of α -synuclein is a normal cellular process and is enhanced by the familial Parkinson's disease-linked mutations // *Proc Natl Acad Sci U S A*. National Academy of Sciences, 2005. Vol. 102, № 6. P. 2162.
25. Perrin R.J. et al. Exposure to long chain polyunsaturated fatty acids triggers rapid multimerization of synucleins // *J Biol Chem*. *J Biol Chem*, 2001. Vol. 276, № 45. P. 41958–41962.
26. Henchcliffe C., Dodel R., Beal M.F. Biomarkers of Parkinson's disease and Dementia with Lewy bodies // *Prog Neurobiol*. Pergamon, 2011. Vol. 95, № 4. P. 601–613.

27. Conway K.A. et al. Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both α -synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: Implications for pathogenesis and therapy // Proceedings of the National Academy of Sciences. National Academy of Sciences, 2000. Vol. 97, № 2. P. 571–576.
28. Balchin D., Hayer-Hartl M., Hartl F.U. In vivo aspects of protein folding and quality control // Science. Science, 2016. Vol. 353, № 6294.
29. Klaips C.L., Jayaraj G.G., Hartl F.U. Pathways of cellular proteostasis in aging and disease // Journal of Cell Biology. The Rockefeller University Press, 2018. Vol. 217, № 1. P. 51–63.
30. Cuervo A.M. Autophagy: Many paths to the same end // Molecular and Cellular Biochemistry. 2004. Vol. 263, № 1. P. 55–72.
31. Kocaturk N.M., Gozuacik D. Crosstalk between mammalian autophagy and the ubiquitin-proteasome system // Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2018.
32. Margulis B. et al. Molecular Chaperones and Proteolytic Machineries Regulate Protein Homeostasis in Aging Cells // Cells 2020, Vol. 9, Page 1308. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2020. Vol. 9, № 5. P. 1308.
33. Xilouri M., Stefanis L. Chaperone mediated autophagy to the rescue: A new-fangled target for the treatment of neurodegenerative diseases // Molecular and Cellular Neuroscience. 2015. Vol. 66, № PA. P. 29–36.
34. Cuervo A.M. Chaperone-mediated autophagy: Dice's "wild" idea about lysosomal selectivity // Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2011. Vol. 12, № 8. P. 535–541.
35. Agarraberes F.A., Dice J.F. A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation // J Cell Sci. The Company of Biologists, 2001. Vol. 114, № 13. P. 2491–2499.
36. Kampinga H.H. et al. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins // Cell Stress Chaperones. 2009. Vol. 14, № 1. P. 105–111.
37. Daugaard M., Rohde M., Jäättelä M. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions // FEBS Lett. No longer published by Elsevier, 2007. Vol. 581, № 19. P. 3702–3710.
38. Noonan E.J. et al. Hsp70B' regulation and function // Cell Stress Chaperones. Cell Stress Chaperones, 2007. Vol. 12, № 4. P. 393–402.

39. Khalouei S., Chow A.M., Brown I.R. Stress-induced localization of HSPA6 (HSP70B) and HSPA1A (HSP70-1) proteins to centrioles in human neuronal cells // *Cell Stress Chaperones*. 2014. Vol. 19, № 3. P. 321–327.
40. Yenari M. a. Heat shock proteins and neuroprotection. // *Adv Exp Med Biol*. 2002. Vol. 513. P. 281–299.
41. Guzhova I. V. et al. Novel mechanism of Hsp70 chaperone-mediated prevention of polyglutamine aggregates in a cellular model of huntington disease // *Hum Mol Genet*. Hum Mol Genet, 2011. Vol. 20, № 20. P. 3953–3963.
42. Mikeladze M.A. et al. Disruption of the Complex between GAPDH and Hsp70 Sensitizes C6 Glioblastoma Cells to Hypoxic Stress // *Int J Mol Sci*. Int J Mol Sci, 2021. Vol. 22, № 4. P. 1–16.
43. Foster J.A., Brown I.R. Differential induction of heat shock mRNA in oligodendrocytes, microglia, and astrocytes following hyperthermia // *Molecular Brain Research*. 1997. Vol. 45, № 2. P. 207–218.
44. Lindersson E. et al. Proteasomal inhibition by alpha-synuclein filaments and oligomers // *J Biol Chem*. J Biol Chem, 2004. Vol. 279, № 13. P. 12924–12934.
45. Tytell M., Greenberg S.G., Lasek R.J. Heat shock-like protein is transferred from glia to axon // *Brain Res*. 1986. Vol. 363, № 1. P. 161–164.
46. Guzhova I. et al. In vitro studies show that Hsp70 can be released by glia and that exogenous Hsp70 can enhance neuronal stress tolerance // *Brain Res*. 2001. Vol. 914, № 1–2. P. 66–73.
47. Tonkiss J., Calderwood S.K. Regulation of heat shock gene transcription in neuronal cells. // *Int J Hyperthermia*. 2005. Vol. 21, № 5. P. 433–444.
48. Chen S., Brown I.R. Translocation of constitutively expressed heat shock protein Hsc70 to synapse-enriched areas of the cerebral cortex after hyperthermic stress // *J Neurosci Res*. 2007. Vol. 85, № 2. P. 402–409.
49. Calderwood S.K. Evolving connections between molecular chaperones and neuronal function // *International Journal of Hyperthermia*. 2005. Vol. 21, № 5. P. 375–378.
50. Li H. et al. Neuroprotective effects of increasing levels of HSP70 against neuroinflammation in Parkinson's disease model by inhibition of NF- κ B and STAT3 // *Life Sci*. 2019.

51. Klucken J. et al. Hsp70 reduces α -synuclein aggregation and toxicity // *Journal of Biological Chemistry*. 2004. Vol. 279, № 24. P. 25497–25502.
52. Ekimova I. V. et al. New HSF1 inducer as a therapeutic agent in a rodent model of Parkinson's disease // *Exp Neurol*. 2018.
53. Xilouri M., Brekk O.R., Stefanis L. α -Synuclein and protein degradation systems: a reciprocal relationship. // *Molecular neurobiology*. 2013.
54. Kaushik S., Cuervo A.M. Chaperone-mediated autophagy: A unique way to enter the lysosome world // *Trends in Cell Biology*. 2012. Vol. 22, № 8. P. 407–417.
55. Martinez-Vicente M. et al. Dopamine-modified α -synuclein blocks chaperone-mediated autophagy // *J Clin Invest*. 2008. Vol. 118. P. 777.
56. Cuervo A.M. et al. Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. // *Science*. 2004. Vol. 305, № 5688. P. 1292–1295.
57. Alvarez-Erviti L. et al. Chaperone-mediated autophagy markers in Parkinson disease brains // *Arch Neurol*. 2010. Vol. 67, № 12. P. 1464–1472.
58. Massey A.C. et al. Consequences of the selective blockage of chaperone-mediated autophagy // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006. Vol. 103, № 15. P. 5805–5810.
59. Klionsky D.J. et al. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes // *Developmental Cell*. 2003. Vol. 5, № 4. P. 539–545.
60. Klionsky D.J. et al. A comprehensive glossary of autophagy-related molecules and processes (2nd edition) // *Autophagy*. 2011. Vol. 7, № 11. P. 1273–1294.
61. Mizushima N. et al. A protein conjugation system essential for autophagy // *Nature*. 1998. Vol. 395, № 6700. P. 395–398.
62. Ohsumi Y. Molecular dissection of autophagy: Two ubiquitin-like systems // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2001. Vol. 2, № 3. P. 211–216.
63. Mizushima N. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate // *J Cell Sci*. 2003. Vol. 116, № 9. P. 1679–1688.
64. Kabeya Y. et al. Erratum: LC3, a mammalian homolog of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing (EMBO Journal (2000) 19 (5720-5728)) // *EMBO Journal*. 2003. Vol. 22, № 17. P. 4577.

65. Tanida I., Ueno T., Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy // *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2004. Vol. 36, № 12. P. 2503–2518.
66. Nakatogawa H., Ichimura Y., Ohsumi Y. Atg8, a Ubiquitin-like Protein Required for Autophagosome Formation, Mediates Membrane Tethering and Hemifusion // *Cell*. 2007. Vol. 130, № 1. P. 165–178.
67. Tanida I. et al. HsAtg4B/HsApg4B/autophagin-1 cleaves the carboxyl termini of three human Atg8 homologues and delipidates microtubule-associated protein light chain 3- and GABAA receptor-associated protein-phospholipid conjugates // *Journal of Biological Chemistry*. 2004. Vol. 279, № 35. P. 36268–36276.
68. Ravikumar B. et al. Regulation of Mammalian Autophagy in Physiology and Pathophysiology // *Physiol Rev*. 2010. Vol. 90, № 4. P. 1383–1435.
69. Mizushima N. et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion // *Nature*. 2008. Vol. 451, № 7182. P. 1069–1075.
70. Rubinsztein D.C. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration // *Nature*. 2006. Vol. 443, № 7113. P. 780–786.
71. Anglade P. Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease // *Histol Histopathol*. 1997.
72. Komatsu M. et al. Homeostatic Levels of p62 Control Cytoplasmic Inclusion Body Formation in Autophagy-Deficient Mice // *Cell*. 2007. Vol. 131, № 6. P. 1149–1163.
73. Ravikumar B. et al. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease // *Nat Genet*. 2004. Vol. 36, № 6. P. 585–595.
74. Kuusisto E., Salminen A., Alafuzoff I. Ubiquitin-binding protein p62 is present in neuronal and glial inclusions in human tauopathies and synucleinopathies // *Neuroreport*. 2001. Vol. 12, № 10. P. 2085–2090.
75. Kuusisto E., Salminen A., Alafuzoff I. Early accumulation of p62 in neurofibrillary tangles in alzheimer's disease: Possible role in tangle formation // *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2002. Vol. 28, № 3. P. 228–237.
76. Watanabe Y. et al. p62/SQSTM1-Dependent Autophagy of Lewy Body-Like α -Synuclein Inclusions // *PLoS One*. 2012. Vol. 7, № 12.

77. Pankiv S. et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy*[S] // *Journal of Biological Chemistry*. 2007. Vol. 282, № 33. P. 24131–24145.
78. Nishida Y. et al. Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy // *Nature*. 2009. Vol. 461, № 7264. P. 654–658.
79. Dehay B. et al. Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson's disease // *Journal of Neuroscience*. 2010.
80. Papagiannakis N. et al. Autophagy dysfunction in peripheral blood mononuclear cells of Parkinson's disease patients // *Neurosci Lett. Neurosci Lett*, 2019. Vol. 704. P. 112–115.
81. Prigione A. et al. Alpha-synuclein nitration and autophagy response are induced in peripheral blood cells from patients with Parkinson disease // *Neurosci Lett*. 2010. Vol. 477, № 1. P. 6–10.
82. Wu G. et al. Altered expression of autophagic genes in the peripheral leukocytes of patients with sporadic Parkinson's disease // *Brain Res*. 2011.
83. Colasanti T. et al. Role of alpha-synuclein in autophagy modulation of primary human T lymphocytes // *Cell Death & Disease* 2014 5:5. Nature Publishing Group, 2014. Vol. 5, № 5. P. e1265–e1265.
84. Bogdanov M. et al. Metabolomic profiling to develop blood biomarkers for Parkinson's disease // *Brain. Brain*, 2008. Vol. 131, № Pt 2. P. 389–396.
85. Lawton M. et al. Blood Biomarkers With Parkinson's Disease Clusters and Prognosis: The Oxford Discovery Cohort // *Movement Disorders*. John Wiley & Sons, Ltd, 2020. Vol. 35, № 2. P. 279–287.
86. Ding H. et al. Unrecognized vitamin D3 deficiency is common in Parkinson disease // *Neurology*. Wolters Kluwer Health, Inc. on behalf of the American Academy of Neurology, 2013. Vol. 81, № 17. P. 1531–1537.
87. Rimmelzwaan L.M. et al. Systematic Review of the Relationship between Vitamin D and Parkinson's Disease // *J Parkinsons Dis. J Parkinsons Dis*, 2016. Vol. 6, № 1. P. 29–37.
88. Maragakis N.J., Rothstein J.D. Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease // *Nat Clin Pract Neurol. Nat Clin Pract Neurol*, 2006. Vol. 2, № 12. P. 679–689.

89. Tian Y. et al. The association between serum uric acid levels, metabolic syndrome and cardiovascular disease in middle aged and elderly Chinese: results from the DYSlipidemia International Study // *BMC Cardiovasc Disord.* *BMC Cardiovasc Disord*, 2015. Vol. 15, № 1.
90. Shen L., Ji H.F. Low uric acid levels in patients with Parkinson's disease: evidence from meta-analysis // *BMJ Open.* *BMJ Open*, 2013. Vol. 3, № 11.
91. Rozycka A. et al. Homocysteine Level and Mechanisms of Injury in Parkinson's Disease as Related to MTHFR, MTR, and MTHFD1 Genes Polymorphisms and L-Dopa Treatment // *Curr Genomics.* *Curr Genomics*, 2013. Vol. 14, № 8. P. 534–542.
92. Sui Y.T. et al. Alpha synuclein is transported into and out of the brain by the blood–brain barrier // *Peptides (N.Y.). Elsevier*, 2014. Vol. 62. P. 197–202.
93. Barbour R. et al. Red blood cells are the major source of alpha-synuclein in blood // *Neurodegener Dis.* *Neurodegener Dis*, 2008. Vol. 5, № 2. P. 55–59.
94. Chang C.-W. et al. Plasma and Serum Alpha-Synuclein as a Biomarker of Diagnosis in Patients With Parkinson's Disease // *Front Neurol.* *Frontiers*, 2020. Vol. 0. P. 1388.
95. Lee P.H. et al. The plasma alpha-synuclein levels in patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy // *J Neural Transm (Vienna).* *J Neural Transm (Vienna)*, 2006. Vol. 113, № 10. P. 1435–1439.
96. Li Q.X. et al. Plasma alpha-synuclein is decreased in subjects with Parkinson's disease // *Exp Neurol.* *Exp Neurol*, 2007. Vol. 204, № 2. P. 583–588.
97. Shi M. et al. Significance and confounders of peripheral DJ-1 and alpha-synuclein in Parkinson's disease // *Neurosci Lett.* *Neurosci Lett*, 2010. Vol. 480, № 1. P. 78–82.
98. Desforges N.M. et al. Fractalkine Mediates Communication between Pathogenic Proteins and Microglia: Implications of Anti-Inflammatory Treatments in Different Stages of Neurodegenerative Diseases // *Int J Alzheimers Dis.* *Hindawi Limited*, 2012. Vol. 2012.
99. Campbell P., Morris H., Schapira A. Chaperone-mediated autophagy as a therapeutic target for Parkinson disease // *Expert Opinion on Therapeutic Targets.* 2018.
100. Kam T.I. et al. Microglia and astrocyte dysfunction in parkinson's disease // *Neurobiol Dis.* *Neurobiol Dis*, 2020. Vol. 144.

101. Chen Z., Trapp B.D. Microglia and neuroprotection // *J Neurochem*. John Wiley & Sons, Ltd, 2016. Vol. 136. P. 10–17.
102. Gelders G., Baekelandt V., Van der Perren A. Linking neuroinflammation and neurodegeneration in parkinson's disease // *Journal of Immunology Research*. 2018.
103. Pajares M. et al. Inflammation in Parkinson's Disease: Mechanisms and Therapeutic Implications // *Cells*. 2020.
104. Ransohoff R.M. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration // *Science*. 2016.
105. Doty K.R., Guillot-Sestier M.V., Town T. The role of the immune system in neurodegenerative disorders: Adaptive or maladaptive? // *Brain Research*. Elsevier, 2015. Vol. 1617. P. 155–173.
106. Tansey M.G., Goldberg M.S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: Its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention // *Neurobiology of Disease*. Academic Press, 2010. Vol. 37, № 3. P. 510–518.
107. Collins L.M. et al. Contributions of central and systemic inflammation to the pathophysiology of Parkinson's disease // *Neuropharmacology*. Pergamon, 2012. Vol. 62, № 7. P. 2153–2167.
108. García-Domínguez I. et al. Peripheral Inflammation Enhances Microglia Response and Nigral Dopaminergic Cell Death in an in vivo MPTP Model of Parkinson's Disease // *Front Cell Neurosci*. 2018.
109. Lv M. et al. Roles of inflammation response in microglia cell through Toll-like receptors 2/interleukin-23/interleukin-17 pathway in cerebral ischemia/reperfusion injury // *Neuroscience*. 2011.
110. Perry V.H. Innate inflammation in Parkinson's disease. // *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012. Vol. 2, № 9.
111. Cebrián C. et al. MHC-I expression renders catecholaminergic neurons susceptible to T-cell-mediated degeneration // *Nat Commun*. Nat Commun, 2014. Vol. 5.
112. Qin L. et al. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration // *Glia*. 2007.
113. Goncharova L.B., Tarakanov A.O. Molecular networks of brain and immunity // *Brain Research Reviews*. Elsevier, 2007. Vol. 55, № 1. P. 155–166.

114. Brodacki B. et al. Serum interleukin (IL-2, IL-10, IL-6, IL-4), TNFalpha, and INFgamma concentrations are elevated in patients with atypical and idiopathic parkinsonism // *Neurosci Lett*. *Neurosci Lett*, 2008. Vol. 441, № 2. P. 158–162.
115. Varchetta S. et al. Unique immunological profile in patients with COVID-19 // *Cell Mol Immunol*. Nature Publishing Group, 2021. Vol. 18, № 3. P. 1.
116. Chen H. et al. Peripheral inflammatory biomarkers and risk of Parkinson's disease // *Am J Epidemiol*. *Am J Epidemiol*, 2008. Vol. 167, № 1. P. 90–95.
117. Ferrari C.C., Tarelli R. Parkinson's disease and systemic inflammation // *Parkinsons Dis*. 2011. Vol. 2011. P. 436813.
118. Rentzos M. et al. Circulating interleukin-15 and RANTES chemokine in Parkinson's disease // *Acta Neurol Scand*. 2007.
119. Brochard V. et al. Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease // *Journal of Clinical Investigation*. 2009.
120. Anthony D.C. et al. Age-related effects of interleukin-1 beta on polymorphonuclear neutrophil-dependent increases in blood-brain barrier permeability in rats // *Brain*. *Brain*, 1997. Vol. 120 (Pt 3), № 3. P. 435–444.
121. Rostami J. et al. Astrocytes have the capacity to act as antigen-presenting cells in the Parkinson's disease brain // *J Neuroinflammation*. BioMed Central Ltd., 2020. Vol. 17, № 1. P. 1–18.
122. Harm A.S. et al. MHCII is required for α -synuclein-induced activation of microglia, CD4 T cell proliferation, and dopaminergic neurodegeneration // *J Neurosci*. *J Neurosci*, 2013. Vol. 33, № 23. P. 9592–9600.
123. Nagai Y. et al. Decrease of the D3 dopamine receptor mRNA expression in lymphocytes from patients with Parkinson's disease // *Neurology*. 1996. Vol. 46, № 3. P. 791–795.
124. Migliore L. et al. Oxidative damage and cytogenetic analysis in leukocytes of Parkinson's disease patients // *Neurology*. 2002. Vol. 58, № 12. P. 1809–1815.
125. Baba Y. et al. Alterations of T-lymphocyte populations in Parkinson disease // *Parkinsonism Relat Disord*. 2005.
126. Chen Y. et al. Clinical correlation of peripheral CD4+-cell sub-sets, their imbalance and Parkinson's disease // *Mol Med Rep*. 2015.

127. Williams-Gray C.H. et al. Abnormalities of age-related T cell senescence in Parkinson's disease // *J Neuroinflammation*. 2018.
128. Aiello A. et al. Immunosenescence and its hallmarks: How to oppose aging strategically? A review of potential options for therapeutic intervention // *Front Immunol*. Frontiers Media S.A., 2019. Vol. 10, № SEP. P. 2247.
129. Pawelec G. Hallmarks of human "immunosenescence": Adaptation or dysregulation? // *Immunity and Ageing*. BioMed Central, 2012. Vol. 9, № 1. P. 1–4.
130. Ostan R. et al. Gender, aging and longevity in humans: an update of an intriguing/neglected scenario paving the way to a gender-specific medicine // *Clin Sci (Lond)*. Portland Press Ltd, 2016. Vol. 130, № 19. P. 1711.
131. Franceschi C. et al. Biomarkers of immunosenescence within an evolutionary perspective: The challenge of heterogeneity and the role of antigenic load // *Exp Gerontol*. 1999. Vol. 34, № 8. P. 911–921.
132. Nikolich-Žugich J. The twilight of immunity: emerging concepts in aging of the immune system // *Nature Immunology* 2017 19:1. Nature Publishing Group, 2017. Vol. 19, № 1. P. 10–19.
133. Le Saux S., Weyand C.M., Goronzy J.J. Mechanisms of Immunosenescence - Lessons from Models of Accelerated Immune Aging // *Ann N Y Acad Sci*. NIH Public Access, 2012. Vol. 1247, № 1. P. 69.
134. Pawelec G. et al. Human immunosenescence: is it infectious? // *Immunol Rev*. John Wiley & Sons, Ltd, 2005. Vol. 205, № 1. P. 257–268.
135. Jergović M., Contreras N.A., Nikolich-Žugich J. Impact of CMV upon immune aging: facts and fiction // *Medical Microbiology and Immunology* 2019 208:3. Springer, 2019. Vol. 208, № 3. P. 263–269.
136. Fülöp T., Larbi A., Pawelec G. Human T Cell Aging and the Impact of Persistent Viral Infections // *Front Immunol*. Frontiers Media SA, 2013. Vol. 4, № SEP.
137. Pereira B.I., Akbar A.N. Convergence of innate and adaptive immunity during human aging // *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A., 2016. Vol. 7, № NOV. P. 445.
138. Van Acker H.H. et al. CD56 in the immune system: More than a marker for cytotoxicity? // *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A., 2017. Vol. 8, № JUL. P. 892.

139. Deleidi M., Isacson O. Viral and inflammatory triggers of neurodegenerative diseases // *Science Translational Medicine*. American Association for the Advancement of Science, 2012. Vol. 4, № 121.
140. Ludlow M. et al. Neurotropic virus infections as the cause of immediate and delayed neuropathology // *Acta Neuropathologica*. Springer, 2016. Vol. 131, № 2. P. 159–184.
141. Bu X.L. et al. A study on the association between infectious burden and Alzheimer's disease // *Eur J Neurol*. 2015.
142. Holtappels R. et al. Enrichment of Immediate-Early 1 (m123 /pp89) Peptide-Specific CD8 T Cells in a Pulmonary CD62L lo Memory-Effector Cell Pool during Latent Murine Cytomegalovirus Infection of the Lungs // *J Virol*. American Society for Microbiology, 2000. Vol. 74, № 24. P. 11495–11503.
143. Klenerman P., Oxenius A. T cell responses to cytomegalovirus // *Nature Reviews Immunology* 2016 16:6. Nature Publishing Group, 2016. Vol. 16, № 6. P. 367–377.
144. Grutza R. et al. NKG2C pos NK Cells Regulate the Expansion of Cytomegalovirus-Specific CD8 T Cells // *The Journal of Immunology*. 2020.
145. Bayard C. et al. Coordinated expansion of both memory T cells and NK cells in response to CMV infection in humans // *Eur J Immunol*. 2016.
146. Kovalenko E.I. et al. Surface NKG2C Identifies Differentiated $\alpha\beta$ T-Cell Clones Expanded in Peripheral Blood // *Front Immunol*. 2021.
147. Pawelec G., Larbi A., Derhovanessian E. Senescence of the Human Immune System // *J Comp Pathol*. 2010.
148. Xu W., Larbi A. Markers of T cell senescence in humans // *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2017. Vol. 18, № 8. P. 1742.
149. P. Chou J., B. Effros R. T Cell Replicative Senescence in Human Aging // *Curr Pharm Des*. 2013.
150. Focosi D. et al. CD57 + T lymphocytes and functional immune deficiency // *J Leukoc Biol*. 2010. Vol. 87, № 1. P. 107–116.
151. Pourghesari B. et al. The Cytomegalovirus-Specific CD4 + T-Cell Response Expands with Age and Markedly Alters the CD4 + T-Cell Repertoire // *J Virol*. American Society for Microbiology, 2007. Vol. 81, № 14. P. 7759–7765.

152. Kouli A. et al. T lymphocyte senescence is attenuated in Parkinson's disease // *J Neuroinflammation*. BioMed Central Ltd, 2021. Vol. 18, № 1. P. 1–11.
153. Pustavoitau A. et al. Role of senescence marker p16 INK4a measured in peripheral blood T-lymphocytes in predicting length of hospital stay after coronary artery bypass surgery in older adults // *Exp Gerontol*. Exp Gerontol, 2016. Vol. 74. P. 29–36.
154. Rutten E.P.A. et al. Various Mechanistic Pathways Representing the Aging Process Are Altered in COPD // *Chest*. Chest, 2016. Vol. 149, № 1. P. 53–61.
155. Kouli A. et al. T lymphocyte senescence is attenuated in Parkinson's disease // *J Neuroinflammation*. BioMed Central, 2021. Vol. 18, № 1. P. 228.
156. Sulzer D. et al. T cells from patients with Parkinson's disease recognize α -synuclein peptides // *Nature*. Nature, 2017. Vol. 546, № 7660. P. 656–661.
157. Jang H. et al. Viral parkinsonism // *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. Elsevier, 2009. Vol. 1792, № 7. P. 714–721.
158. Rohn T.T., Catlin L.W. Immunolocalization of influenza a virus and markers of inflammation in the human Parkinson's disease brain // *PLoS One*. 2011.
159. Takahashi M. et al. The substantia nigra is a major target for neurovirulent influenza A virus. // *J Exp Med*. 1995.
160. D'Amelio M. et al. Long-term survival of Parkinson's disease: a population-based study // *J Neurol*. J Neurol, 2006. Vol. 253, № 1. P. 33–37.
161. Hamza T.H. et al. Common genetic variation in the HLA region is associated with late-onset sporadic Parkinson's disease // *Nat Genet*. Nat Genet, 2010. Vol. 42, № 9. P. 781.
162. Hughes A.J. et al. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: A clinico-pathological study of 100 cases // *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1992.
163. Ye J. et al. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. // *BMC Bioinformatics*. BioMed Central, 2012. Vol. 13, № 1. P. 134.
164. Kovalenko E.I. et al. ROS production, intracellular HSP70 levels and their relationship in human neutrophils: effects of age. // *Oncotarget*. Impact Journals, LLC, 2014. Vol. 5, № 23. P. 11800–11812.

165. Boyko A.A. et al. HSP70 in human polymorphonuclear and mononuclear leukocytes : comparison of the protein content and transcriptional activity of HSPA genes // Cell Stress Chaperones. Cell Stress and Chaperones, 2017. P. 67–76.
166. Liu Y., Beyer A., Aebersold R. On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance // Cell. Cell Press, 2016. Vol. 165, № 3. P. 535–550.
167. Klionsky D.J. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition) 1 // Autophagy. Autophagy, 2021. Vol. 17, № 1. P. 1–382.
168. Boya P. et al. Inhibition of Macroautophagy Triggers Apoptosis // Mol Cell Biol. American Society for Microbiology, 2005. Vol. 25, № 3. P. 1025–1040.
169. Kovalenko E.I. et al. Identification of Human Memory-Like NK Cells // Curr Protoc Cytom. Curr Protoc Cytom, 2017. Vol. 79. P. 9.50.1-9.50.11.
170. Bate S.L., Dollard S.C., Cannon M.J. Cytomegalovirus seroprevalence in the United States: The national health and nutrition examination surveys, 1988-2004 // Clinical Infectious Diseases. Oxford Academic, 2010. Vol. 50, № 11. P. 1439–1447.
171. Xu W., Larbi A. Molecular Sciences Markers of T Cell Senescence in Humans. 2017.
172. Lopez-Vergès S. et al. Expansion of a unique CD57+NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection // Proceedings of the National Academy of Sciences. National Academy of Sciences, 2011. Vol. 108, № 36. P. 14725–14732.
173. Njemini R. et al. Basal and infection-induced levels of heat shock proteins in human aging // Biogerontology. Springer, 2007. Vol. 8, № 3. P. 353–364.
174. Papagiannakis N. et al. Lysosomal alterations in peripheral blood mononuclear cells of Parkinson's disease patients // Movement Disorders. 2015. Vol. 30, № 13.
175. Gao X. et al. Human Hsp70 Disaggregase Reverses Parkinson's-Linked α -Synuclein Amyloid Fibrils // Mol Cell. Cell Press, 2015. Vol. 59, № 5. P. 781–793.
176. Hartl F.U., Hayer-Hartl M. Protein folding. Molecular chaperones in the cytosol: From nascent chain to folded protein // Science. American Association for the Advancement of Science, 2002. Vol. 295, № 5561. P. 1852–1858.

177. Pang S.Y.Y. et al. The interplay of aging, genetics and environmental factors in the pathogenesis of Parkinson's disease // *Translational Neurodegeneration* 2019 8:1. BioMed Central, 2019. Vol. 8, № 1. P. 1–11.
178. Vavilova Y.D. et al. Analysis of the association of the polymorphism of the CLIC1, MSH5, C6orf26, C6orf25 genes with the expression level of the HSPA1B gene // *Medical Immunology (Russia). Russian Association of Allergologists and Clinical Immunologists, St. Petersburg Regional Branch (SPb RAACI)*, 2020. Vol. 22, № 4. P. 779–784.
179. Brocchieri L., Conway De Macario E., Macario A.J.L. Hsp70 genes in the human genome: Conservation and differentiation patterns predict a wide array of overlapping and specialized functions // *BMC Evol Biol. BioMed Central*, 2008. Vol. 8, № 1. P. 1–20.
180. Deane C.A.S., Brown I.R. Differential Targeting of Hsp70 Heat Shock Proteins HSPA6 and HSPA1A with Components of a Protein Disaggregation/Refolding Machine in Differentiated Human Neuronal Cells following Thermal Stress // *Front Neurosci. Frontiers Media SA*, 2017. Vol. 11, № APR.
181. Prigione A. et al. Oxidative stress in peripheral blood mononuclear cells from patients with Parkinson's disease: negative correlation with levodopa dosage // *Neurobiol Dis. Neurobiol Dis*, 2006. Vol. 23, № 1. P. 36–43.
182. Wei Z. et al. Oxidative Stress in Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis // *Front Mol Neurosci. Frontiers Media S.A.*, 2018. Vol. 11. P. 236.
183. Puspita L., Chung S.Y., Shim J.W. Oxidative stress and cellular pathologies in Parkinson's disease // *Molecular Brain* 2017 10:1. BioMed Central, 2017. Vol. 10, № 1. P. 1–12.
184. Zatloukal K. et al. p62 Is a Common Component of Cytoplasmic Inclusions in Protein Aggregation Diseases // *Am J Pathol. Elsevier*, 2002. Vol. 160, № 1. P. 255–263.
185. Jung K.T., Oh S.H. Polyubiquitination of p62/SQSTM1 is a prerequisite for Fas/CD95 aggregation to promote caspase-dependent apoptosis in cadmium-exposed mouse monocyte RAW264.7 cells // *Scientific Reports* 2019 9:1. Nature Publishing Group, 2019. Vol. 9, № 1. P. 1–13.

186. Lee S.H. et al. p62/SQSTM1-induced caspase-8 aggresomes are essential for ionizing radiation-mediated apoptosis // *Cell Death & Disease* 2021 12:11. Nature Publishing Group, 2021. Vol. 12, № 11. P. 1–10.
187. Calopa M. et al. Apoptosis of peripheral blood lymphocytes in Parkinson patients // *Neurobiol Dis.* 2010.
188. Duran A. et al. p62 Is a Key Regulator of Nutrient Sensing in the mTORC1 Pathway // *Mol Cell. Cell Press*, 2011. Vol. 44, № 1. P. 134–146.
189. Yoshii S.R., Mizushima N. Monitoring and Measuring Autophagy // *International Journal of Molecular Sciences* 2017, Vol. 18, Page 1865. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2017. Vol. 18, № 9. P. 1865.
190. Biagioni F. et al. An attempt to dissect a peripheral marker based on cell pathology in Parkinson's disease // *J Neural Transm. Springer*, 2021. Vol. 128, № 10. P. 1599–1610.
191. Calvo-Garrido J. et al. SQSTM1/p62-Directed Metabolic Reprogramming Is Essential for Normal Neurodifferentiation // *Stem Cell Reports. Cell Press*, 2019. Vol. 12, № 4. P. 696–711.
192. Rusmini P. et al. Trehalose induces autophagy via lysosomal-mediated TFEB activation in models of motoneuron degeneration // *Autophagy. Taylor and Francis Inc.*, 2019. Vol. 15, № 4. P. 631–651.
193. Bartlett J.J. et al. Doxorubicin impairs cardiomyocyte viability by suppressing transcription factor EB expression and disrupting autophagy // *Biochemical Journal. Portland Press*, 2016. Vol. 473, № 21. P. 3769–3789.
194. Korolchuk V.I. et al. Autophagy Inhibition Compromises Degradation of Ubiquitin-Proteasome Pathway Substrates // *Mol Cell. Cell Press*, 2009. Vol. 33, № 4. P. 517–527.
195. Cannon M.J., Schmid D.S., Hyde T.B. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection // *Rev Med Virol. Rev Med Virol*, 2010. Vol. 20, № 4. P. 202–213.
196. R S., S M., SI V.-F. Systemic inflammation and the brain: novel roles of genetic, molecular, and environmental cues as drivers of neurodegeneration // *Front Cell Neurosci. Front Cell Neurosci*, 2015. Vol. 9, № FEB.
197. Al-Bachari S. et al. Blood–Brain Barrier Leakage Is Increased in Parkinson's Disease // *Front Physiol. Frontiers Media SA*, 2020. Vol. 11.

198. Schetters S.T.T. et al. Neuroinflammation: Microglia and T Cells Get Ready to Tango // *Front Immunol. Frontiers*, 2018. Vol. 0, № JAN. P. 1905.
199. Weltevrede M. et al. Cytomegalovirus persistence and T-cell immunosenescence in people aged fifty and older: A systematic review // *Experimental Gerontology*. Pergamon, 2016. Vol. 77. P. 87–95.
200. Cox M. et al. Potential Impact of Human Cytomegalovirus Infection on Immunity to Ovarian Tumours and Cancer Progression // *Biomedicines*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 2021. Vol. 9, № 4.
201. Mahnke Y.D. et al. The who's who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets // *European Journal of Immunology*. 2013. Vol. 43. P. 2797–2809.
202. Guma M. et al. Imprint of human cytomegalovirus infection on the Nk cell receptor repertoire // *Blood*. 2011.
203. Hassouneh F. et al. Functional Changes of T-Cell Subsets with Age and CMV Infection // *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 9973. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2021. Vol. 22, № 18. P. 9973.
204. Priol Y. Le et al. High Cytotoxic and Specific Migratory Potencies of Senescent CD8+CD57+ Cells in HIV-Infected and Uninfected Individuals // *The Journal of Immunology*. American Association of Immunologists, 2006. Vol. 177, № 8. P. 5145–5154.
205. CF P. et al. Enhanced expression of fractalkine in HIV-1 associated dementia // *J Neuroimmunol. J Neuroimmunol*, 2001. Vol. 115, № 1–2. P. 168–175.
206. Garretti F. et al. Autoimmunity in parkinson's disease: The role of α -synuclein-specific T cells // *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A., 2019. Vol. 10, № FEB. P. 303.
207. Vieira Braga F.A. et al. Molecular characterization of HCMV-specific immune responses: Parallels between CD8+ T cells, CD4+ T cells, and NK cells // *Eur J Immunol*. Wiley-VCH Verlag, 2015. Vol. 45, № 9. P. 2433–2445.
208. MA S. et al. Analysis of NK cell clones obtained using interleukin-2 and gene-modified K562 cells revealed the ability of “senescent” NK cells to lose CD57 expression and start expressing NKG2A // *PLoS One*. PLoS One, 2018. Vol. 13, № 12.

209. Lindestam Arlehamn C.S. et al. α -Synuclein-specific T cell reactivity is associated with preclinical and early Parkinson's disease // Nature Communications 2020 11:1. Nature Publishing Group, 2020. Vol. 11, № 1. P. 1–11.

Приложение

Таблица П1. Полиморфизмы генов *CLIC1*, *MSH5*, *Сборf26*, *Сборf25* и средние значения уровней экспрессии генов группы *HSPA*, нормализованных на экспрессию β -актина.

Генотип <i>CLIC1</i> rs400547 Intron	Генотип <i>MSH5</i> rs1150793 Intron	Генотип <i>Сборf26</i> rs707936 Downstream	Генотип <i>MSH5</i> rs707915 Intron	Генотип <i>Сборf25</i> rs376510 Promoter	Кол-во доноров (N)	Средний уровень транскрипции генов группы <i>HSPA</i> (относительно уровня транскрипции β -актина)				
						<i>HSPA1A/B</i>	<i>HSPA1A</i>	<i>HSPA1B</i>	<i>HSPA6</i>	<i>HSPA8</i>
G/G	A/A	G/G	T/T	C/C	12	0.0084(±0.0016)	0.0347(±0.006)	0.0031(±0.0009)	0.0062(±0.002)	0.0949(±0.022)
A/G	A/G	A/G	T/A	C/T	3	0.0074(±0.0061)	0.0266(±0.02)	0.0010(±0.0003)	0.0058(±0.0045)	0.0717(±0.05)
A/A	G/G	A/G	T/A	T/T	1	0.0020	0.0058	0.0006	0.0029	0.0253

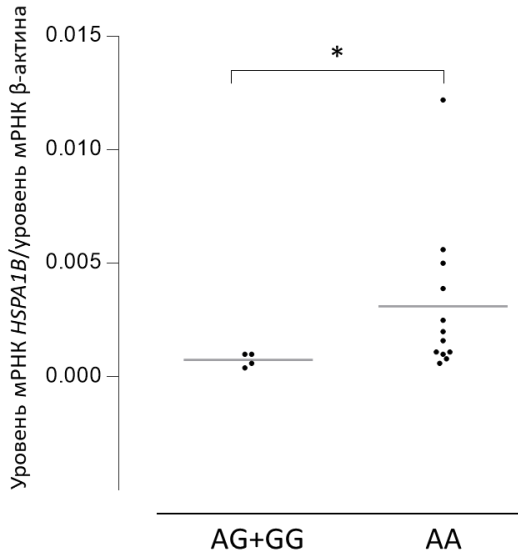


Рисунок П1. Ассоциация генотипов AG/GG (rs1150793) и AA (rs1150793) гена *MSH5* с базальным уровнем транскрипции гена *HSPA1B*. *P<0.05.