

УДК: 612.017.1+616-09

## Экспрессия Toll-подобных рецепторов TLR2 и TLR4 типа на иммунных клетках и продукция про- и противовоспалительных цитокинов в трансгенной модели болезни Паркинсона у мышей

Идова Г.В., Альперина Е.Л., Жанаева С.Я., Тихонова М.А., Геворгян М.М.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины» 630060, Новосибирск, ул. Тимакова, д 4

Современные исследования свидетельствуют, что иммунно-воспалительные нарушения лежат в основе патогенеза болезни Паркинсона (БП), прогрессирующего нейродегенеративного заболевания, характеризующегося гибелью дофаминергических нейронов и накоплением агрегированного  $\alpha$ -синуклеина. В настоящее время отсутствуют данные об этих процессах на ранних доклинических стадиях развития БП. **Цель исследования** – анализ экспрессии TLR2 и TLR4 на циркулирующих моноцитах, Т- и В-клетках, а также периферической продукции провоспалительных (IFN $\gamma$ , IL-6, IL-17A) и противовоспалительных (IL-4 и IL-10) цитокинов у молодых трансгенных мышей A53T по сравнению с контрольными (WT) мышами.

**Материалы и методы:** Экспериментальной моделью БП служили мыши-самцы линии B6.CG-Tg(Prnp-SNCA\**A53T*)23MKle/J (A53T, 2,0–2,5 месяца), экспрессирующие мутацию A53T человеческого  $\alpha$ -синуклеина. Двигательную активность анализировали в тесте «открытое поле», используя автоматическую систему регистрации Noldus (Noldus Information Technology, Нидерланды). Координацию и баланс оценивали на аппаратно-программном комплексе «Ротарод» (ООО «Нейроботикс Трейдинг», Москва) при разной скорости вращения барабана. Уровень моноцитов, Т- и В-лимфоцитов и их субпопуляций в периферической крови, а также экспрессию TLR2 и TLR4 на этих клетках анализировали на проточном цитофлюориметре FACSCanto II (BD). Спонтанную и индуцированную митогенами продукцию провоспалительных (IFN $\gamma$ , IL-6, IL-17A) и противовоспалительных (IL-4 и IL-10) цитокинов в культуральном супернатанте мононуклеарных клеток (МНК) крови измеряли на мультиплексном анализаторе белков и нуклеиновых кислот (Milliplex Luminex 200, Merck Millipore).

**Результаты.** У молодых трансгенных A53T мышей не обнаружены признаки нарушения моторной функции, но выявлено повышение циркулирующих CD115<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> моноцитов, CD3<sup>+</sup> Т клеток, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Т хелперов (Th), а также снижение содержания CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т регуляторных (Treg) клеток по сравнению с контрольными WT мышами. Экспрессия TLR2 и TLR4 была повышена у таких животных только на Treg клетках и имела тенденция к увеличению TLR4 на моноцитах. Показано повышение спонтанной продукции провоспалительного цитокина IL-6 на фоне снижения спонтанной и стимулированной продукции противовоспалительного цитокина IL-10. Продукция IFN $\gamma$ , IL-17 и IL-4 у A53T мышей мало отличалась от WT мышей.

**Заключение.** У мышей A53T с гиперэкспрессией  $\alpha$ -синуклеина на ранней стадии паркинсонизма до проявления моторных нарушений наблюдаются изменения иммунных показателей, указывающие на развитие воспаления.

**Ключевые слова:** болезнь Паркинсона; трансгенные A53T мыши; моноциты; Т- и В-субпопуляции клеток; Toll-подобные рецепторы 2 и 4; провоспалительные и противовоспалительные цитокины.

**Для цитирования:** Идова Г.В., Альперина Е.Л., Жанаева С.Я., Тихонова М.А., Геворгян М.М. Экспрессия Toll-подобных рецепторов TLR2 и TLR4 типа на иммунных клетках и продукция про- и противовоспалительных цитокинов в трансгенной модели болезни Паркинсона у мышей. Патогенез 2022; 20(3): 38-43.

**DOI:** 10.25557/2310-0435.2022.03.38-43

**Для корреспонденции:** Идова Галина Вениаминовна, e-mail: galina-idova@mail.ru

**Финансирование:** Работа выполнена в рамках темы Государственного задания № 122042700001-9 и гранта РФФИ № 18-015-00226.

**Конфликт интересов:** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила:** 10.08.2022

## Expression of TLR2 and TLR4 Toll-like receptors on immune cells and production of pro- and anti-inflammatory cytokines in a transgenic mouse model of Parkinson's disease

Idova G.V., Alperina E.L., Zhanaeva S.Ya., Tikhonova M.A., Gevorgyan M.M.

Research Institute of Neurosciences and Medicine,  
Timakova St. 4, Novosibirsk 630117, Russian Federation

Current reports suggest that immuno-inflammatory disorders underlie the pathogenesis of Parkinson's disease (PD), a progressive neurodegenerative condition characterized by loss of dopaminergic (DA) neurons in the nigrostriatal system and accumulation of aggregated  $\alpha$ -synuclein. There is currently no evidence of the role of these processes at early preclinical stages of PD.

**The aim** of the study was to assess the expression of TLR2 and TLR4 on circulating monocytes, T and B cells, as well as on the peripheral production of pro-inflammatory (IFN $\gamma$ , IL-6, IL-17A) and anti-inflammatory (IL-4 and IL-10) cytokines in young A53T transgenic mice compared with the control WT mice.

**Methods.** Male mice of the B6.CG-Tg (Prnp-SNCA\**A53T*)23MKle/J strain (*A53T*, 2.0–2.5 months) expressing the *A53T* mutation of human  $\alpha$ -synuclein were used as an animal model of PD. Locomotor activity was studied in the open field test using the Noldus automatic registration system (Noldus Information Technology, the Netherlands). Motor coordination and balance were assessed with the “Rotarod” hardware-software complex (Neurobotics Trading LLC, Moscow, Russia) at different cylinder rotation speeds. Levels of monocytes, T- and B-lymphocytes and their subpopulations in the peripheral blood, as well as the expression of TLR2 and TLR4 on these cells, were measured with a FACSCanto II (BD) flow cytometer. Spontaneous and mitogen-induced production of pro-inflammatory (IFN $\gamma$ , IL-6, IL-17A) and anti-inflammatory (IL-4 and IL-10) cytokines in the culture supernatant of blood mononuclear cells (PBMCs) was measured using the multiplex analysis of proteins and nucleic acids (Milliplex Luminex 200, Merk Millipore).

**Results.** Young transgenic *A53T* mice did not show changes in the motor function. However, the numbers of circulating CD115<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> monocytes, CD3<sup>+</sup> T cells, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T helpers (Th) were increased, while the content of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory (Treg) cells was reduced compared to control WT mice. *A53T* mice also showed a higher expression of TLR2 and TLR4 only on Treg cells and a tendency to increased TLR4 expression on monocytes. An increase in spontaneous production of the pro-inflammatory cytokine IL-6 was associated with a decrease in spontaneous and stimulated production of the anti-inflammatory cytokine IL-10. The production of IFN $\gamma$ , IL-17 and IL-4 did not differ significantly between *A53T* and WT mice.

**Conclusion.** Changes in immunity parameters of *A53T* mice overexpressing  $\alpha$ -synuclein are observed at an early stage of parkinsonism, before the onset of motor disorders, indicating the development of inflammation.

**Keywords:** Parkinson's disease; *A53T* transgenic mice; monocytes; T- and B-cell subpopulations; toll-like receptors 2 and 4; proinflammatory and anti-inflammatory cytokines.

**For citation:** Idova G.V., Alperina E.L., Zhanaeva S.Ya., Tikhonova M.A., Gevorgyan M.M. [Expression of TLR2 and TLR4 Toll-like receptors on immune cells and production of pro- and anti-inflammatory cytokines in a transgenic mouse model of Parkinson's disease]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2022; 20(3): 38–43. (in Russian)

**DOI:** 10.25557/2310-0435.2022.03.38-43

**For correspondence:** Idova Galina Veniaminovna, e-mail: galina-idova@mail.ru.

**Funding:** The work was a part of the state assignment #122042700001-9 and the Russian Foundation for Basic Research grant #18-015-00226.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

**Received:** 10.08. 2022

## Введение

Болезнь Паркинсона (БП) — одно из наиболее распространённых неизлечимых нейродегенеративных заболеваний, которое проявляется с возрастом, и сопровождается широким спектром моторных и немоторных нарушений, существенно влияющих на качество жизни пациентов. Основными нейропатологическими признаками заболевания являются внутрицитоплазматическое накопление  $\alpha$ -синуклеина (тельца Леви) и гибель дофаминовых (ДА) нейронов в компактной зоне чёрной субстанции, приводящее к прогрессирующему дефициту нигростриарного ДА. Несмотря на большое число работ, посвященных изучению БП, механизмы возникновения нейродегенерации до конца не выявлены. При этом диагностика БП возможна только после проявления двигательных симптомов, которые появляются при повреждении 70–80% ДА нейронов. В последние годы получены доказательства, указывающие на ключевую роль в этом процессе иммунных механизмов и хронического воспаления, признаки которых обнаруживаются как в мозге, так и на периферии и могут предшествовать первым клиническим проявлениям [1–4].

Важную роль в сигнальных механизмах нейровоспаления и индукции синтеза цитокинов играют Toll-подобные рецепторы (TLR). Наряду с их установленной ролью во врожденном иммунитете, TLR являются ключевыми медиаторами воспаления, распознающими патогенные молекулы и эндогенные белки, которые экс-

прессируются различными субпопуляциями иммунных клеток, а также нейронами, астроцитами и микроглией [4, 5]. Применение экспериментальных моделей существенно расширяет возможности изучения вклада механизмов, участвующих в патогенезе данного заболевания. Широко используемой моделью БП являются мыши линии B6.CG – Tg(Prnp-SNCA\**A53T*)23MKle/J (*A53T*) с точечной мутацией *A53T*, которые характеризуются увеличением по мере старения экспрессией человеческого  $\alpha$ -синуклеина в структурах мозга [6].

В настоящее время практически отсутствуют данные о периферическом воспалении на ранних доклинических стадиях развития БП. Представляло интерес установить у молодых *A53T* мышей с гиперэкспрессией  $\alpha$ -синуклеина характер изменения экспрессии TLR на субпопуляциях циркулирующих иммунных клеток и периферической продукции цитокинов, т.е. потенциальных показателей, которые могут быть индикаторами возникновения и течения заболевания. Ранее было установлено, что у таких животных не изменяется двигательная активность, в отличие от более старых мышей *A53T*, но меняются эмоциональность и содержание в периферической крови Т и В клеток [7]. В связи с этим целью исследования являлся анализ экспрессии TLR2 и TLR4 на моноцитах, Т- и В-клетках периферической крови, а также продукции про-(IFN $\gamma$ , IL-6, IL-17A) и противовоспалительных (IL-4 и IL-10) цитокинов у молодых трансгенных мышей *A53T* по сравнению с исходной линией C57BL/6J дикого типа (WT).

## Материалы и методы исследования

В качестве экспериментальной модели БП использовали мыши-самцы линии B6.CG-Tg(Prnp-SNCA\**A53T*)23MKle/J (*A53T*), экспрессирующие мутацию *A53T* человеческого  $\alpha$ -синуклеина под контролем прионного промотера *Prnp*. Мыши *A53T* ( $n = 10$ ) и WT (контроль;  $n = 10$ ) в возрасте 2,0–2,5 месяца были получены из SPF-вивария ФИЦ Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск). Животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище. Исследования проводили с соблюдением принципов гуманности, изложенных в Директиве Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22.09.2010 г о защите животных, используемых для научных целей, и были одобрены Комитетом по биомедицинской этике НИИ нейронаук и медицины.

Двигательную активность анализировали в тесте «открытое поле» с использованием автоматической системы регистрации Noldus (Noldus Information Technology, Нидерланды). Каждую мышь помещали в центр поля, после чего в течение 10 мин регистрировали суммарный пройденный путь, время нахождения в центре арены, исследовательское поведение (по числу стоек) и эмоциональность (по количеству актов дефекации). Координацию движения и баланс оценивали на аппаратно-программном комплексе «Ротарод» (ООО «Нейроботикс Трейдинг», Москва) при разной скорости вращения барабана (5, 10 и 15 об/мин) с регистрацией во время каждого теста латентного времени падения.

У данных мышей на 7-й день после последнего тестирования поведения определяли в периферической крови различные иммунные показатели: содержание субпопуляций иммунных клеток, экспрессию TLR и продукцию цитокинов. Кровь собирали в пробирки с  $K_3$ EDTA (BD) сразу же после мгновенной декапитации мышей.

Процентное количество CD115<sup>+</sup>CD11b<sup>++</sup> моноцитов, а также CD3<sup>+</sup> Т-клеток, CD19<sup>+</sup> В-лимфоцитов и их субпопуляций CD3<sup>+</sup>4<sup>+</sup>Т-хелперов (Th) и CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> регуляторных (reg) Т-лимфоцитов, и CD19<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> reg В-лимфоцитов и экспрессию TLR2 и TLR4 на этих клетках анализировали с помощью меченых моноклональных антител многоэтапным гейтированием, используя многоцветный анализ: CD115 – APC/Cy7 и CD11b (моноциты) – PE/Cy7, CD3 (Т клетки) – FITC, CD4 (Th) – PerCP, CD19 (В лимфоциты) – FITC, CD25 (reg клетки) – Brilliant Violet 421™, CD282 (TLR2) – PE, CD284 (TLR4) – APC.

Популяции клеток исследовали на проточном цитофлюориметре FACSCanto II (BD), в каждом образце анализировали не менее 50 000 клеток. Данные анализировали с помощью программного обеспечения FACSDiva (BD).

Спонтанную и индуцированную митогенами продукцию про- (IFN $\gamma$ , IL-6, IL-17A) и противовоспалительных (IL-4 и IL-10) цитокинов в культуральном су-

пернатанте мононуклеарных клеток (МНК) периферической крови измеряли в пг/г ткани согласно протоколу фирмы-производителя методом мультиплексного иммунного анализа на мультиплексном анализаторе белков и нуклеиновых кислот (Milliplex Luminex 200, Merck Millipore) с помощью набора (Milliplex MAP Mouse Cytokine/Chemokine, Millipore) и программного обеспечения «xPONENT» и «Analyst». Определение субпопуляций клеток и экспрессию TLR проводили сразу же после взятия крови у животных, а для цитокинов супернатант замораживали при  $-70^\circ\text{C}$ .

Полученные данные анализировали с использованием программы Statistica 10.0 (StatSoft, Inc.). Соответствие полученных значений нормальному распределению оценивали с помощью критериев Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. При нормальном распределении показателей достоверность различий в группах определяли с помощью дисперсионного анализа ANNOVA. Если распределение не соответствовало нормальному, то данные обрабатывали с помощью непараметрической статистики с использованием критериев Манна-Уитни и Крускала-Уоллиса. Данные при параметрическом распределении представлены как среднее и ошибка среднего ( $M \pm m$ ), в случае непараметрического распределения в виде медианны (Me) и 25-го и 75-го перцентилей. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты исследования обсуждение

Анализ данных показал, что поведение молодых мышей *A53T* с  $\alpha$ -синуклеинопатией в тесте «открытое поле» не изменялось, общая двигательная активность, исследовательское поведение и тревожность у них не отличались от контрольных WT мышей. Что касается эмоциональности, тестируемой по числу дефекаций, то у мышей с гиперэкспрессией  $\alpha$ -синуклеина, оно была более, чем в 6 раз ниже, чем в контроле ( $p < 0,001$ ).

Состояние координации движения, тестируемое на установке «Ротарод» по латентному времени падения, у мышей *A53T* также существенно не отличалось от WT мышей. Таким образом, у молодых 2-месячных животных этой линии меняется только эмоциональное состояние, что соответствовало ранее полученным данным [7]. Вместе с тем нельзя исключить возможность, что меньшее число актов дефекаций у *A53T* мышей может быть связано не с эмоциональностью, а с низкой моторикой кишечника. Известно, что при развитии паркинсонизма первым обнаруживается агрегированный  $\alpha$ -синуклеин именно в гастроинтестинальном тракте и его отложение может за десятки лет предшествовать появлению клинических моторных нарушений [8].

Известно, что уровень субпопуляций периферических клеток изменяется при БП и может играть важную роль в патогенезе заболевания [7, 9–13]. Имею-

щиеся данные довольно противоречивы, что объясняется клиническим статусом, половыми и возрастными различиями, а также особенностями течения заболевания, его продолжительностью. При этом есть лишь единичные исследования, проведенные на ранних стадиях заболевания у пациентов с БП [11, 13, 14] и в экспериментальных моделях БП [5]. Нами ранее было показано, что у молодых мышей A53T изменяется количество почти всех субпопуляций Т- и В-клеток [7]. В настоящем исследовании было выявлено, что у 2-месячных животных, которые ещё не проявляли двигательных нарушений, изменялось содержание не только Т- и В-клеток и их субпопуляций, но и моноцитов, которые, как известно, при БП могут меняться, как количественно, так и функционально [11–13].

Так, у A53T мышей увеличивалось процентное содержание CD115<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> моноцитов от числа мононуклеарных клеток (МНК) ( $7,10 \pm 1,16$  против  $3,10 \pm 0,38$  у WT мышей,  $p < 0,01$ ), так же как CD3<sup>+</sup>Т-клеток ( $43,7 \pm 2,2$  против  $35,7 \pm 1,2$ ,  $p < 0,05$ ), и CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Th ( $15,8 \pm 1,0$  против  $12,70 \pm 0,46$ ,  $p < 0,05$ ). Уровень же CD19<sup>+</sup>В-клеток снижался ( $45,3 \pm 2,2$  против  $51,00 \pm 1,08$ ,  $p < 0,05$ ). При этом содержание CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg и CD19<sup>+</sup>25<sup>+</sup>Breg от общего количества МНК не менялось, хотя процентное содержание Treg клеток от CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Th популяции уменьшалось ( $p < 0,05$ ).

Обращает на себя внимание, что у трансгенных мышей повышено содержание CD4<sup>+</sup>Th в периферической крови, т.е. клеток, которые участвуют в воспалительных реакциях, инфильтрируют чёрную субстанцию и вызывают нейродегенерацию ДА нейронов [15, 16]. Важная роль этого типа Т-клеток для развития БП выявлена в исследованиях, демонстрирующих, что мыши с дефицитом CD4<sup>+</sup>Т клеток устойчивы к гибели ДА нейронов в модели БП, индуцированной 1-метил-4-фенил-1,2,3,6 тетрагидропиридином (МРТП) [15].

Большое значение имеет и факт, что у молодых мышей в популяции CD4<sup>+</sup>Th снижается содержание CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg, играющих важную роль в регуляции и ограничении воспалительных реакций и в патогенезе нейродегенеративных заболеваний. Более того, показано, что изменение содержания CD4<sup>+</sup>Th и дисрегуляция Treg, связаны с тяжестью клинических проявлений БП [16, 17]. Хорошо известно, что иммунная активация, как на периферии, так и в головном мозге является характерной чертой БП, а также других  $\alpha$ -синуклеинопатий. Более того,  $\alpha$ -синуклеин, является ключевым патологическим компонентом БП, который участвует в активации врожденной и адаптивной иммунной системы.  $\alpha$ -синуклеиновые пептиды действуют как антигенные эпитопы и стимулируют Т-клеточные реакции при БП и активируют циркулирующие Т-клетки, обеспечивающие хронический ответ ( $\alpha$ -синуклеин специфичные Т-клетки памяти). Показано, что они появляются за много лет до моторных проявлений и постановки диагноза,

причем наибольшее их число обнаруживается именно в ранний период заболевания [18]. Все больше доказательств указывает на то, что эти иммунные клетки распознают  $\alpha$ -синуклеин как чужеродный антиген, координируют локальные врожденные иммунные реакции и вызывают гибель ДА нейронов посредством активации иммунных процессов. Агрегированные формы  $\alpha$ -синуклеина могут действовать как лиганды для TLR (в частности TLR2 и TLR4), и, как следствие, эти рецепторы могут играть решающую роль в опосредовании иммунного ответа на этот белок, а также других воспалительных сигналов при БП. Хотя известно, что наличие воспаления в острой фазе БП может оказывать защитное действие в отношении клиренса  $\alpha$ -синуклеина и замедление развития заболевания, хроническая активация TLR и нейровоспаление могут привести к нейродегенерации и к прогрессированию заболевания [4, 14].

TLR представляют собой врожденные иммунные рецепторы, расположенные в основном в микроглии, а также на других иммунных и неиммунных клетках, которые участвуют в распознавании экзогенных и эндогенных стимулов и запускают воспалительные реакции. Имеются лишь единичные и противоречивые данные об изменении TLR2 и TLR4 на клетках периферической крови при БП [4, 5]. Некоторые исследователи показали повышенную экспрессию TLR в клетках головного мозга и периферической крови пациентов с БП. Это увеличение связано с чрезмерным развитием нейровоспаления с последующей нейродегенерацией в пораженных областях мозга и гибелью ДА нейронов. В этом отношении TLR2 и TLR4 играют наиболее заметную роль и могут дифференцированно меняться при развитии БП [4, 14]. Установлено, что отсутствие TLR4 в модели МРТП-индуцированной БП предотвращает истощение ДА, увеличивает активность тирозингидроксилазы и ДА транспортера, снижает число  $\alpha$ -синуклеин-позитивных нейронов, и, таким образом, уменьшает нейровоспаление и нейродегенерацию [19].

Результаты наших исследований по анализу экспрессии TLR2 и TLR4 на иммунных клетках у молодых A53T мышей с гиперэкспрессией  $\alpha$ -синуклеина представлены в **табл. 1**. Мы определяли TLR на моноцитах, а также на регуляторных клетках, число которых снижалось у молодых животных, но, как показано ранее [7], существенно повышалось у взрослых 10-месячных A53T мышей с нарушенной двигательной активностью.

Нами установлено, что повышенная экспрессия обоих типов TLR обнаруживается только на Т-регуляторных клетках. На моноцитах наблюдается тенденция к повышению только TLR4 ( $p = 0,08$  по сравнению с контрольной группой WT). TLR2 обнаруживались на высоком уровне у обеих групп мышей, примерно одинаковым у A53T и WT мышей.

Из литературы известно, что на разных стадиях развития БП происходят изменения экспрессии про-

и противовоспалительных цитокинов в разных областях мозга, их содержания и продукция в спинно-мозговой жидкости и в периферической крови [20]. Проведенный нами анализ спонтанной и стимулированной продукции провоспалительных цитокинов МНК на ранней стадии паркинсонизма показал, что молодые А53Т и WT мыши не различались по количеству  $IFN\gamma$  и IL-17 ( $p > 0,05$ ). В то же время спонтанная продукция IL-6 у трансгенных животных была выше, чем у контрольных WT мышей (0,83 (0,09; 1,77) против 0,77 (0,02; 9,67),  $p < 0,01$ ). Индуцированная митогенами продукция IL-6, была выше спонтанной, но отмечалась лишь тенденция к ее повышению у А53Т мышей по сравнению с контролем ( $p < 0,08$ ). Что касается противовоспалительных цитокинов, то как спонтанная, так и стимулированная продукция IL-4 у А53Т мышей мало отличалась от контроля ( $p > 0,05$ ). Продукция же другого противовоспалительного цитокина IL-10 у трансгенных мышей практически не выявлялась, в отличие от контрольных мышей, и вследствие этого была значительно ниже, чем у WT мышей. Так, спонтанная составляла (0,0 (0,0; 4,9) против 21,9 (11,8; 35,6), ( $p < 0,01$ ), а стимулированная продукция (0,0 (0,0; 21,0) против 58,9 (33,7; 81,2) у WT мышей,  $p < 0,001$ ). Таким образом, у молодых трансгенных А53Т мышей на-

блюдается дисбаланс цитокинов с преобладанием провоспалительного цитокина ИЛ-6 на фоне снижения продукции противовоспалительного цитокина ИЛ-10 (табл. 2).

Таким образом, у молодых А53Т мышей с  $\alpha$ -синуклеинопатией без признаков нарушения моторной функции выявляются значительные изменения различных иммунных параметров. У них увеличивается содержание циркулирующих моноцитов, Т-клеток и Th, снижается содержание уровня Treg, повышается экспрессия TLR2 и TLR4 на Treg, а также продукция провоспалительного цитокина IL-6 на фоне снижения противовоспалительного цитокина IL-10. Вышеперечисленные иммунные нарушения могут свидетельствовать о начале развития периферического воспалительного процесса на ранних стадиях паркинсонизма в трансгенной модели БП у А53Т мышей, что приводит к его генерализации, нейровоспалению и нейродегенерации в мозге в более позднем возрасте мышей при гиперсекреции  $\alpha$ -синуклеина и двигательных нарушениях. Изменения уровня цитокинов, субпопуляционный состав вырабатывающих их иммунных клеток, а также экспрессия TLR на иммунокомпетентных клетках могут быть индикаторами возникновения заболевания и терапевтическими мишенями БП в будущем.

Таблица 1

Содержание Т-, В- регуляторных клеток (reg) и моноцитов, экспрессирующих TLR2 и TLR4 в периферической крови, у WT и А53Т мышей в возрасте 2 месяцев (M  $\pm$  m)

Клетки с TLR, %	WT (n = 10)	А53Т (n = 10)
Т-reg / TLR2	75,2 $\pm$ 2,4	83,5 $\pm$ 1,9 *
Т-reg / TLR4	65,5 $\pm$ 2,3	71,3 $\pm$ 1,2 *
В-reg / TLR2	87,3 $\pm$ 0,5	83,2 $\pm$ 1,9
В-reg / TLR4	75,6 $\pm$ 1,3	73,7 $\pm$ 3,6
Моноциты / TLR2	95,5 $\pm$ 4,1	95,7 $\pm$ 6,4
Моноциты / TLR4	51,8 $\pm$ 9,1	61,4 $\pm$ 13,1 #

Примечания: в описании групп указано n – число животных. Статистическая значимость отличий: \* –  $p < 0,05$ ; # –  $p = 0,08$  по сравнению с контрольной группой WT (ANOVA).

Таблица 2

Изменение продукции цитокинов клетками крови у трансгенных А53Т мышей по сравнению с WT мышами в возрасте 2-х месяцев

Цитокины	Продукция цитокинов	
	Спонтанная	Стимулированная
Провоспалительные		
IL-6	↑	=
IL-17	=	=
$IFN\gamma$	=	=
Противовоспалительные		
IL-4	=	=
IL-10	↓	↓

Примечания: ↑ – увеличение по сравнению с WT мышами; ↓ – снижение по сравнению с WT мышами; = равное количество.

## Заключение

У мышей A53T с гиперэкспрессией  $\alpha$ -синуклеина на ранней стадии паркинсонизма до проявления моторных нарушений наблюдаются изменения иммунных показателей, указывающие на развитие воспаления.

## Список литературы / References

1. Gao H.M., Zhang F., Zhou H., Kam W., Wilson B., Hong J.S. Neuroinflammation and  $\alpha$ -synuclein dysfunction potentiate each other, driving chronic progression of neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Environ. Health Perspect.* 2011; 119(6): 807–814. DOI: 10.1289/ehp.1003013
2. Boyko A.A., Troyanova N.I., Kovalenko E.I., Sapozhnikov A.M. Similarity and Differences in Inflammation-Related Characteristics of the Peripheral Immune System of Patients with Parkinson's and Alzheimer's Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18(12): 2633. DOI: 10.3390/ijms18122633
3. Lai T.T., Kim Y.J., Ma H.I., Kim Y.E. Evidence of Inflammation in Parkinson's Disease and Its Contribution to Synucleinopathy. *J. Mov. Disord.* 2022; 15(1): 1–14. DOI: 10.14802/jmd.21078
4. Heidari A., Yazdanpanah N., Rezaei N. The role of Toll-like receptors and neuroinflammation in Parkinson's disease. *J. Neuroinflammation.* 2022; 19(1): 135. DOI: 10.1186/s12974-022-02496-w
5. Drouin-Ouellet J., St-Amour I., Saint-Pierre M., Lamontagne-Proulx J., Kriz J., Barker R.A., Cicchetti F. Toll-like receptor expression in the blood and brain of patients and a mouse model of Parkinson's disease. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2014; 18(6): pyu103. DOI: 10.1093/ijnp/pyu103
6. Oaks A.W., Frankfurt M., Finkelstein D.I., Sidhu A. Age-dependent effects of A53T alpha-synuclein on behavior and dopaminergic function. *PLoS One.* 2013; 8(4): e60378. DOI: 10.1371/journal.pone.0060378
7. Idova G.V., Al'perina E.L., Gevorgyan M.M., Tikhonova M.A., Zhanaeva S.Y. Content of Peripheral Blood T- and B-Cell Subpopulations in Transgenic A53T Mice of Different Age (A Model of Parkinson's Disease). *Bull. Exp. Biol. Med.* 2021; 170(4): 401–404. DOI: 10.1007/s10517-021-05075-w
8. Campos-Acuña J., Elgueta D., Pacheco R. T-Cell-Driven Inflammation as a Mediator of the Gut-Brain Axis Involved in Parkinson's Disease. *Front. Immunol.* 2019; 10: 239. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00239
9. Gruden M.A., Sewell R.D., Yanamandra K., Davidova T.V., Kucheryanu V.G., Bocharov E.V., Bocharova O.A., Polyschuk V.V., Sherstnev V.V., Morozova-Roche L.A. Immunoprotection against toxic biomarkers is retained during Parkinson's disease progression. *J. Neuroimmunol.* 2011; 233(1–2): 221–227. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2010.12.001
10. Sun C., Zhao Z., Yu W., Mo M., Song C., Si Y., Liu Y. Abnormal subpopulations of peripheral blood lymphocytes are involved in Parkinson's disease. *Ann. Transl. Med.* 2019; 7(22): 637. DOI: 10.21037/atm.2019.10.105
11. Yan Z., Yang W., Wei H., Dean M.N., Standaert D.G., Cutter G.R., Benveniste E.N., Qin H. Dysregulation of the Adaptive Immune System in Patients with Early-Stage Parkinson Disease. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* 2021; 8(5): e1036. DOI: 10.1212/NXI.0000000000001036
12. Su Y., Shi C., Wang T., Liu C., Yang J., Zhang S., Fan L., Zheng H., Li X., Luo H., Zhang S., Hu Z., Fan Y., Hao X., Zhang C., Song B., Mao C., Xu Y. Dysregulation of peripheral monocytes and pro-inflammation of alpha-synuclein in Parkinson's disease. *J. Neurol.* 2022. DOI: 10.1007/s00415-022-11258-w Epub ahead of print.
13. Tian J., Dai S.B., Jiang S.S., Yang W.Y., Yan Y.Q., Lin Z.H., Dong J.X., Liu Y., Zheng R., Chen Y., Zhang B.R., Pu J.L. Specific immune status in Parkinson's disease at different ages of onset. *NPJ Parkinsons Dis.* 2022; 8(1): 5. DOI: 10.1038/s41531-021-00271-x
14. Rocha Sobrinho H.M.D., Silva D.J.D., Gomides L.F., Dorta M.L., Oliveira M.A.P., Ribeiro-Dias F. TLR4 and TLR2 activation is differentially associated with age during Parkinson's disease. *Immunol. Invest* 2018; 47(1): 71–88. DOI: 10.1080/08820139.2017.1379024
15. Brochard V., Combadière B., Prigent A., Laouar Y., Perrin A., Beray-Berthet V., Bonduelle O., Alvarez-Fischer D., Callebert J., Launay J.M., Duyckaerts C., Flavell R.A., Hirsch E.C., Hunot S. Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. *J. Clin. Invest.* 2009; 119(1): 182–192. DOI: 10.1172/JCI36470
16. Kustrimovic N., Comi C., Magistrelli L., Rasini E., Legnaro M., Bombelli R., Aleksic I., Blandini F., Minafra B., Riboldazzi G., Sturchio A., Mauri M., Bono G., Marino F., Cosentino M. Parkinson's disease patients have a complex phenotypic and functional Th1 bias: cross-sectional studies of CD4+ Th1/Th2/T17 and Treg in drug-naïve and drug-treated patients. *J. Neuroinflammation.* 2018. 15(1): 205. DOI: 10.1186/s12974-018-1248-8
17. Chen X., Feng W., Ou R., Liu J., Yang J., Fu J., Cao B., Chen Y., Wei Q., Shang H. Evidence for Peripheral Immune Activation in Parkinson's Disease. *Front. Aging Neurosci.* 2021; 13: 617370. DOI: 10.3389/fnagi.2021.617370.19
18. Lindestam Arlehamn C.S., Dhanwani R., Pham J., Kuan R., Frazier A., Rezende Dutra J., Phillips E., Mallal S., Roederer M., Marder K.S., Amara A.W., Standaert D.G., Goldman J.G., Litvan I., Peters B., Sulzer D., Sette A.  $\alpha$ -Synuclein-specific T cell reactivity is associated with preclinical and early Parkinson's disease. *Nat. Commun.* 2020; 11(1): 1875. DOI: 10.1038/s41467-020-15626-w
19. Campolo M, Paterniti I, Siracusa R, Filippone A, Esposito E, Cuzocrea S. TLR4 absence reduces neuroinflammation and inflammatory activation in Parkinson's diseases in vivo model. *Brain Behav. Immun.* 2019; 76: 236–247. DOI: 10.1016/j.bbi.2018.12.003
20. Fuzzati-Armentero M.T., Cerri S., Blandini F. Peripheral-Central Neuroimmune Crosstalk in Parkinson's Disease: What Do Patients and Animal Models Tell Us? *Front. Neurol.* 2019; 10: 232. DOI: 10.3389/fneur.2019.00232

## Сведения об авторах:

**Идова Галина Вениаминовна** — доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник сектора «Психонейроиммунология» Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины»; <https://orcid.org/0000-0002-9090-514X>

**Альперина Елизавета Лазаревна** — доктор медицинских наук, главный научный сотрудник сектора «Психонейроиммунология» Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины»

**Жанаева Светлана Яковлевна** — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник сектора «Психонейроиммунология» Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины»; <https://orcid.org/0000-0002-4798-054X>

**Тихонова Мария Александровна** — доктор биологических наук, главный научный сотрудник с и.о. заведующей лаборатории экспериментальных моделей нейродегенеративных процессов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины»; <https://orcid.org/0000-0002-4265-8981>

**Геворгян Маргарита Маилловна** — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник сектора «Психонейроиммунология» Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины»