

Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
Міністерство освіти і науки України  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова праця  
на правах рукопису

**ОЛІЙНИК ЖАННА ІГОРІВНА**

УДК 571.27; 612.017.11; 616.858-008.6; 616-092; 616-002

**ДИСЕРТАЦІЯ**  
**МЕТАБОЛІЧНИЙ ПРОФІЛЬ ФАГОЦИТІВ У ЩУРІВ З РІЗНИМИ**  
**МОДЕЛЯМИ ХВОРОБИ ПАРКІНСОНА**

Спеціальність – 091-Біологія

Галузь знань – 09-Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі біології

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_ Ж.І. Олійник

Науковий керівник: Сківка Лариса Михайлівна, доктор біологічних наук,  
професор.

Київ–2023

## АНОТАЦІЯ

**Олійник Ж.І. Метаболічний профіль фагоцитів у щурів з різними моделями хвороби Паркінсона.** – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 091- Біологія (09 – Біологія) – ННЦ «Інститут біології та медицини», Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, 2023.

Хвороба Паркінсона (ХП) – це друге за поширеністю нейродегенеративне захворювання з високим рівнем інвалідизації і смертності. Розрізняють спадкову та спорадичну (ідіопатичну) форми ХП. Спадкова форма захворювання складає біля 10% всіх його випадків, решту становить спорадична форма. Етіологія та патогенетичні механізми спорадичної форми ХП залишаються не до кінця вивченими. Згідно сучасної концепції, спорадична форма ХП розглядається як мультифакторне захворювання, основними (але не єдиними) патогенетичними механізмами якого є оксидативний стрес, пов'язаний з мітохондріальною дисфункцією, протеолітичний стрес, зумовлений дисфункцією убіквітин-протеасомної системи і місцеве запалення (нейрозапалення), які окремо або у поєднанні здатні викликати апоптоз дофамінергічних нейронів (ДН), що, у свою чергу, спричиняє розвиток моторних і немоторних симптомів хвороби.

Останнім часом особлива увага приділяється вивченню запалення у патогенезі ХП. У паренхімі головного мозку запальна реакція донедавна вважалася очевидним наслідком дегенерації нейронів, але останні спостереження вказують на прямий внесок запальних гліальних змін на ранній стадії захворювання. Крім того, системне запалення також впливає на розвиток дисфункції нейронів, створюючи

порочне коло з локальним нейрозапаленням, що надає перебігу хвороби хронічного характеру.

На сьогоднішній день ХП залишається невиліковним захворюванням, а існуюча терапія – симптоматичною. Розуміння механізмів патогенезу може дозволити ідентифікувати нові терапевтичні цілі та розробити патогенетичне лікування хвороби. Розшифрування механізмів патогенезу і розробка патогенетичних методів лікування передбачають використання тваринних моделей. Гетерогенність хвороби вимагає використання різних моделей, оскільки жодна з численних існуючих не відтворює всі її особливості. Для дослідження запалення у структурі патогенезу ХП розроблено тваринні моделі, засновані на інтрацеребральному та системному введенні інфламогенів. Серед них найчастіше застосовуються моделі на основі інтрацеребрального введення 6-гідроксидофаміну (6-OHDA) та бактеріального ліпополісахариду (ЛПС). Однак, порівняння релевантності цих моделей щодо відтворення всіх аспектів локального і системного запалення, притаманного клінічному перебігу ХП, у літературі відсутнє.

Ключовими ефекторними клітинами локальних і системних запальних процесів є фагоцити (макрофаги, моноцити і нейтрофіли), які виконують як роль ініціаторів запальних процесів, так і функцію гальмування (резолуції) запалення. Оцінка функціонального профілю фагоцитів дозволяє охарактеризувати виразність і стадію запального процесу, а також взаємозв'язок між локальним і системним запаленням.

З огляду на вище зазначене метою роботи було провести порівняльну оцінку метаболічного профілю тканинних резидентних та циркулюючих фагоцитів у щурів з моделями ХП, які найчастіше використовуються для дослідження запалення: індуковані інтрацеребральним введенням 6-OHDA та ЛПС.

Розвиток симптомів захворювання констатували за результатами оцінки загибелі ДН в апоморфіновому тесті та імуногістохімічного дослідження

тирозинової гідроксилази (яка є маркером цих нейронів), а також за результатами поведінкового тесту «Відкрите поле». Метаболічний профіль (про- та протизапальний) фагоцитів характеризували за результатами оцінки їх оксидативного метаболізму (генерації реактивних форм кисню), фагоцитарної активності та експресії фенотипових маркерів CD80/86 (костимуляторні молекули, залучені в антигенпрезентацію, маркер прозапальної поляризованої активації) та CD206 (член родини рецепторів ендоцитозу, маркер протизапальної поляризованої активації фагоцитів), які досліджували методом проточної цитометрії. Для підтвердження наявності локального і системного запальних процесів додатково досліджували загально визнані їх характеристики: маркери реактивного астрогліозу, концентрацію С-реактивного білка у плазмі крові, інтегральні індекси системного запалення, засновані на співвідношенні кількісних показників лейкоцитів різних популяцій за результатами гемограми, вагові показники та клітинність лімфодних органів. Дослідження метаболічного профілю фагоцитів різної локалізації (мікрогліальних клітин, моноцитів і нейтрофілів периферичної крові, перитонеальних макрофагів) та інші вище зазначені показники досліджували на 28 добу з моменту ініціювання захворювання, що дозволяло виявити хронічні запальні процеси.

Порівняльна оцінка критеріїв розвитку ХП у тварин з різними моделями виявила більший ступінь втрати ДН у щурів з 6-OHDA-ХП порівняно з тваринами з ЛПС-індукованою хворобою (~90% проти ~60%), що було засвідчено результатами апоморфінового тесту та імуногістохімічного аналізу експресії тирозинової гідроксилази у чорній субстанції. Моторні і немоторні симптоми хвороби, які оцінювали у поведінковому тесті «Відкрите поле», були порівняними у тварин з обома моделями: зменшення загальної пройденої дистанції, подовження латентного періоду до початку рухової активності, зменшення кількості вертикальних підйомів, актів грумінгу та дефекації. Отримані результати вказують

на те, що моторні порушення у моделі 6-OHDA-ХП викликані безпосередньо загибеллю ДН внаслідок активації апоптозу токсином. У той час, як моторні і немоторні симптоми у щурів з ЛПС-ХП зумовлені більшою мірою нейрозапаленням, спричиненим бактеріальним ендотоксином, що засвідчили результати порівняльної оцінки метаболічного профілю мікрогліальних клітин у тварин з різними моделями.

Порівняльна оцінка фенотипових і функціональних характеристик клітин мікроглії виявила їх відмінності у щурів з 6-OHDA- та ЛПС-індукованою ХП. Відсутність функціонального резерву оксидативного метаболізму (що вказує на його персистентну активацію та/або метаболічне виснаження клітини в результаті тривалої запальної активації) та значно підвищена частка клітин, що експресують костимуляторні молекули CD80/86 у складі мікроглії у тварин з ЛПС-ХП вказують на їх прозапальний метаболічний зсув, на відміну від протизапального фенотипу мікроглії щурів з 6-OHDA-ХП, засвідченого підвищенням відсотка клітин з експресією маркера протизапального метаболічного зсуву CD206 одночасно зі зниженням частки CD80/86-позитивних клітин. Такі результати вказують на те, що тривале нейрозапалення на 28 добу після ініціювання хвороби зберігається лише у моделі, індукованій інтрацеребральним уведенням ЛПС.

Метаболічний профіль циркулюючих фагоцитів у тварин з ЛПС-ХП також характеризувався прозапальною спрямованістю: збільшенням показника оксидативного мтеаболізму у 5 разів порівняно з контролем, істотним зниженням фагоцитарної активності, збільшенням вдвічі частки CD80/86-позитивних клітин. Прозапальний метаболічний зсув фагоцитів периферичної крові у тварин з цією моделлю був асоційований з нейтрофіліозом і підвищеними, порівняно з контролем, значеннями інтегральних індексів системного запалення (нейтрофільно-лімфоцитарного коефіцієнта, тромбоцитарно-лімфоцитарного коефіцієнта та індекса системного імунного запалення). Циркулюючі фагоцити

щурів з 6-OHDA-ХП вирізнялися протизапальною поляризованою активацією зі зниженням генерації реактивних форм кисню, посиленням фагоцитарної активності, зниженням експресії фенотипового маркера CD80/86 і підвищенням частки клітин з експресією CD206. Протизапальний метаболічний зсув циркулюючих фагоцитів у тварин з цією моделлю супроводжувався зниженням відносної кількості нейтрофілів та значень інтегральних індексів системного запалення порівняно з аналогічними показниками тварин контрольних груп. У сукупності отримані нами дані вперше демонструють наявність системного запального процесу у віддалені терміни після ініціювання ХП введенням токсину лише в ЛПС-індукованій моделі. У той час, як показники метаболічного профілю циркулюючих фагоцитів та інші біомаркери системного запалення у щурів з 6-OHDA-ХП вказують на гальмування (резолуцію) системного запалення у цьому ж часовому проміжку.

Кореляційний аналіз залежності між метаболічними характеристиками мікрогліальних клітин та значеннями інтегральних індексів системного запалення виявив сильний позитивний зв'язок між часткою CD80/86-позитивних мікрогліальних клітин та нейтрофільно-лімфоцитарним коефіцієнтом, тромбоцитарно-лімфоцитарним коефіцієнтом, а також індексом системного імунного запалення у щурів з ЛПС-ХП, що вперше доводить причинно-наслідковий зв'язок між поляризованою активацією фагоцитів головного мозку і розвитком системного запалення, а також демонструє відтворення на моделі ЛПС-ХП порочного кола запалення, притаманного клінічному перебігу хвороби. У щурів з OHDA-індукованою моделлю ХП зареєстровано помірний негативний кореляційний зв'язок між часткою CD80/86-позитивних мікрогліальних клітин і нейтрофільно-лімфоцитарним коефіцієнтом та також індексом системного імунного запалення, що може пояснюватися подвійною роллю молекул-членів родини B7, до складу якої входять CD80 (B7.1) і CD86 (B7.2), у регуляції імунної

відповіді. Надекспресія B7.1 властива одночасно імуностимуляторним мієлоїдним клітинам з антигенпрезентувальною здатністю та мієлоїдним супресорним клітинам (Myeloid-Derived Suppressor Cells, MDSC). Як зазначено вище, мікроглія тварин з OHDA-ХП вирізнялася підвищеною часткою клітин, що експресують CD206 – маркер, що притаманний фагоцитам протизапального метаболічного профілю, а також CD80-позитивним MDSC. Зважаючи на це негативний кореляційний зв'язок між часткою CD80/86-позитивних клітин мікроглії та значеннями інтегральних індексів системного запалення у тварин з OHDA-ХП може вказувати на імуносупресорний фенотип фагоцитів мікроглії, функції яких пов'язані з гальмуванням (резолуцією) запалення.

Уперше зареєстровано відмінності у метаболічному профілі перитонеальних макрофагів (ПМ) у щурів з різними моделями ХП. ПМ структурно пов'язані з лімфоїдними кластерами, асоційованими з жировою тканиною (Fat-Associated Lymphoid Clusters, FALC), функцію яких у черевній порожнині виконують так звані «молочні плями» (Milky Spots) лімфоїдної тканини, асоційованої із сальником (Omentum-Associated Lymphoid Tissue). У стані спокою ПМ характеризуються зсувом метаболізму у бік протизапального M2-фенотипу і відіграють важливу роль у резолуції будь-якого запального процесу, що стосується органів черевної порожнини, у т.ч. кишечника, хронічне запалення якого розглядається як важливий компонент патофізіології ХП. За результатами наших досліджень у щурів з 6-OHDA-ХП ПМ характеризувалися збільшенням фагоцитарного індексу в 1,9 раза, посиленням експресії CD206 в 1,4 раза і зниженням експресії CD80/86 вдвічі порівняно з аналогічними показниками тварин контрольних груп, що свідчить про їх протизапальний метаболічний профіль. ПМ тварин з ЛПС-ХП мали підвищений у півтора рази порівняно з контролем рівень експресії CD80/86, що вказує на їх прозапальний метаболічний зсув.

Таким чином, за результатами порівняльної оцінки метаболічного профілю фагоцитів різної локалізації у тварин з різними моделями ХП показано, що прозапальні метаболічні і фенотипові характеристики мікроглії, моноцитів і нейтрофілів периферичної крові, ПМ, а також існування позитивного кореляційного зв'язку між метаболічними характеристиками фагоцитів мікроглії та індексами системного запалення у тварин з ЛПС-індукованою моделлю переконливо доводять її релевантність щодо відтворення локального нейрозапалення, системного запалення та їх взаємозв'язку, які властиві клінічному перебігу спорадичної форми захворювання. Результати роботи експериментально обґрунтовують адекватність ЛПС-індукованої моделі ХП для дослідження механізмів запалення у структурі патогенезу ХП, а також для доклінічної оцінки ефективності протизапальних препаратів у комплексній терапії захворювання. Показники метаболічного профілю фагоцитів різної локалізації можуть бути використані як інформативні маркери локального і системного запалення у таких дослідженнях.

**Ключові слова:** хвороба Паркінсона, 6-OHDA, ліпополісахарид, запалення, фагоцити, мікроглія, макрофаги, моноцити, нейтрофіли, реактивні форми кисню, фагоцитоз.

## ABSTRACT

**Oliynyk Z.I. " Metabolic profile of phagocytes in rats with different models of Parkinson's disease".** – Qualification scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in the field of 09-Biology in the speciality 091–Biology. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, 2023.

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease with a high level of disability and mortality. There are hereditary and sporadic (idiopathic) forms of PD. The hereditary form of the disease accounts for about 10% of all its cases, the rest is a sporadic form. The etiology and pathogenetic mechanisms of the sporadic form of PD remain incompletely understood. According to the current concept, the sporadic form of PD is considered a multifactorial disease, the main (but not the only) pathogenetic mechanisms of which are oxidative stress associated with mitochondrial dysfunction, proteolytic stress due to dysfunction of the ubiquitin-proteasome system, and local inflammation (neuroinflammation), which individually or in combination can cause apoptosis of dopaminergic neurons (DN), and, as a result, the development of motor and non-motor symptoms of the disease.

Recently, special attention has been paid to the study of inflammation in the pathogenesis of PD. In the brain parenchyma, the inflammatory response was until recently considered an obvious consequence of neuronal degeneration, but recent observations indicate a direct contribution of inflammatory glial changes in the early stage of the disease. In addition, systemic inflammation also affects the development of neuronal dysfunction, creating a vicious circle with local neuroinflammation, which gives the disease a chronic course.

To date, PD remains an incurable disease, and the existing therapy is symptomatic. Understanding the mechanisms of pathogenesis may allow the identification of new therapeutic targets and the development of disease modifying treatment modalities. Deciphering the mechanisms of pathogenesis and developing pathogenetic treatment methods involve the use of animal models. The heterogeneity of the disease requires the use of different models, since none of the numerous existing ones reproduces all its features. To study inflammation in the structure of the PD pathogenesis, animal models based on intracerebral and systemic administration of inflammagens have been developed. Among them, models based on intracerebral administration of 6-

hydroxydopamine (6-OHDA) and bacterial lipopolysaccharide (LPS) are most often used. However, a comparison of the relevance of these models in reproducing all aspects of local and systemic inflammation inherent in the clinical course of PD is absent in the literature.

The key effector cells of local and systemic inflammatory processes are phagocytes (macrophages, monocytes, and neutrophils), which perform both the role of initiators of inflammatory processes and the function of inhibition (resolution) of inflammation. Assessing functional profile of phagocytes allows to characterize the severity and stage of the inflammatory process, as well as the functional link between local and systemic inflammation.

In view of the above, the aim of the work was to conduct a comparative assessment of the metabolic profile of tissue resident and circulating phagocytes in rats with PD models, which are most often used to study inflammation: induced by intracerebral administration of 6-OHDA and LPS.

The development of symptoms of the disease was determined by the results of the assessment of the DN loss by the results of the apomorphine test and by the immunohistochemical assay of tyrosine hydroxylase (which is a marker of these neurons), as well as by the results of the "Open field" behavioral test. The metabolic profile (pro- and anti-inflammatory) of phagocytes was characterized based on the results of the assessment of their oxidative metabolism (generation of reactive oxygen species), phagocytic activity and expression of the phenotypic markers CD80/86 (co-stimulatory molecules involved in antigen presentation, phenotypic marker of pro-inflammatory phagocyte profile) and CD206 (the member of a family of endocytic receptors, phenotypic marker of anti-inflammatory phagocyte profile), which were determined by flow cytometry. In order to confirm the presence of local and systemic inflammatory processes, their generally recognized characteristics were additionally investigated: markers of reactive astrogliosis, concentration of C-reactive protein in blood plasma,

integral systemic inflammation indices, which were calculated as the ratio of absolute counts of leukocytes of different populations according to the results of a hemogram analysis, weight indexes and cellularity of lymphoid organs (thymus and spleen). The study of the metabolic profile of phagocytes of different localization (microglial cells, monocytes and neutrophils of peripheral blood, peritoneal macrophages) and other above-mentioned indicators were studied on the 28th day after the disease initiation, which made it possible to observe and reveal chronic inflammatory processes.

Comparative evaluation of the criteria for the PD development in animals with different models revealed a greater degree of DN loss in rats with 6-OHDA-PD compared to animals with LPS-induced disease (~90% vs. ~60%), which was evidenced by the results of the apomorphine test and by the tyrosine hydroxylase immunostaining in the substantia nigra. Motor and non-motor symptoms of the disease, which were evaluated in the behavioral test "Open field", were comparable in animals with both models. In 6-OHDA- and LPS-lesioned rats we have registered a decrease in the total distance traveled, increased latency to start the movement, a decrease in the number of rearing, grooming and defecation. It suggests that behavioral abnormalities in 6-OHDA-lesioned rats may be primarily stipulated by DN damage as a result of selective toxic effect of 6-OHDA, whereas motor and non-motor symptoms in LPS-lesioned animals may be foremost associated with more pronounced pro-inflammatory activation of the microglia cell population, which was indicated by the results of comparative assessment of metabolic profiles of these cells.

Comparative assessment of phenotypic and functional characteristics of microglial cells revealed their differences in rats with 6-OHDA- and LPS-induced PD. The lack of a functional reserve of oxidative metabolism (which indicates its persistent activation and/or metabolic cell exhaustion caused by prolonged pro-inflammatory activation) and increased proportion of cells expressing costimulatory molecules CD80/86 in the complex microglia population of animals with LPS-PD indicate their pro-inflammatory

metabolic profile, unlike from the anti-inflammatory phenotype of microglia of rats with 6-OHDA-PD, evidenced by an increase in the percentage of cells expressing the anti-inflammatory metabolic shift marker CD206, along with a decrease in the proportion of CD80/86-positive cells. Such results indicate that long-term neuroinflammation persists only in the model induced by intracerebral LPS administration.

The metabolic profile of circulating phagocytes in animals with LPS-PD was also characterized by a pro-inflammatory orientation as was evidenced by a 5-fold increase in the index of oxidative metabolism compared to the control, a significant decrease in phagocytic activity, and a doubling of the proportion of CD80/86-positive cells. The pro-inflammatory metabolic shift of peripheral blood phagocytes in animals with this model was associated with neutrophilia and increased values of integral indices of systemic inflammation (Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio, Platelet-to-Lymphocyte ratio and Index of Systemic Immune Inflammation) as compared to controls. Circulating phagocytes of rats with 6-OHDA-PD were distinguished by anti-inflammatory polarized activation with a decrease in reactive oxygen species generation, an increase in phagocytic activity, a decrease in the expression of the phenotypic marker CD80/86, and an increase in the proportion of cells expressing the CD206. The anti-inflammatory metabolic shift of circulating phagocytes in animals with this model was accompanied by a decrease in the relative number of neutrophils and values of integral indices of systemic inflammation compared to similar indicators of animals in the control groups. Collectively, our findings demonstrate for the first time the presence of a systemic inflammatory process in the distant term after the initiation of PD by the introduction of a toxin only in the LPS-induced model. While metabolic profile indicators of circulating phagocytes and other biomarkers of systemic inflammation in rats with 6-OHDA-PD mirror inhibition (resolution) of systemic inflammation in the same time period.

Correlation analysis of the dependence between the metabolic characteristics of microglial cells and the values of integral indices of systemic inflammation revealed a

strong positive relationship between the proportion of CD80/86-positive microglial cells and the Neutrophil-to-Lymphocyte ratio, the Platelet-to-Lymphocyte ratio, as well as the Systemic Immune Inflammation Index in rats with LPS-PD, which for the first time proves a cause-and-effect relationship between the polarized activation of brain phagocytes and the development of systemic inflammation, and also demonstrates the reproduction of the vicious cycle of inflammation inherent in the clinical course of the disease in the LPS-PD model. In rats with the OHDA-induced model of PD, a moderate negative correlation was registered between the proportion of CD80/86-positive microglial cells and the Neutrophil-to-Lymphocyte ratio, as well as the Systemic Immune Inflammation Index, which can be explained by the dual role of molecules members of the B7 family, which include CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2), in the regulation of the immune response. Overexpression of B7.1 is characteristic of both immunostimulatory myeloid cells with antigen-presenting ability and myeloid-derived suppressor cells (MDSC). It is necessary to point that CD80 overexpressing MDSC are CD206-positive. Considering the increase of CD206-positive cell fraction in microglia of rats with OHDA-PD, one can suppose, that the negative correlation between the proportion of CD80/86-positive microglial cells and the values of integral indices of systemic inflammation may indicate the immunosuppressive phenotype of these phagocytes, whose functions are related to the inhibition (resolution) of inflammation.

Differences in the metabolic profile of peritoneal macrophages (PM) in rats with different PD models were reported for the first time. PMs are structurally related to fat-associated lymphoid clusters (FALC), whose function in the peritoneal cavity is performed by the so-called "milky spots" of Omentum-Associated Lymphoid Tissue. In resting state, PM are characterized by a shift of metabolism towards the anti-inflammatory M2 phenotype and play an important role in the resolution of any inflammatory process affecting the organs of the peritoneal cavity, including intestine, chronic inflammation of which is considered an important component of the PD pathophysiology. According to

our findings, in rats with 6-OHDA-PD, PM were characterized by a 1.9-fold increase in the phagocytic index, a 1.4-fold increase in the expression of CD206, and a 2-fold decrease in the expression of CD80/86 compared to the similar indicators of the animals of the control groups, which indicates their anti-inflammatory metabolic profile. In the PM of animals with LPS-PD, one and a half times higher expression level of CD80/86 compared to control animals was observed, indicating their pro-inflammatory metabolic shift.

Thus, according to the results of a comparative assessment of the metabolic profile of phagocytes of different localization in animals with different PD models, it is shown that proinflammatory metabolic and phenotypic characteristics of microglia, monocytes and neutrophils of peripheral blood, PM, as well as the existence of a positive correlation between the metabolic characteristics of microglia phagocytes and indices of systemic inflammation in animals with the LPS-induced model convincingly prove its relevance for the reproduction of local neuroinflammation, systemic inflammation and their interrelation, which are characteristic of the clinical course of the sporadic disease form. The results of the work experimentally substantiate the adequacy of the LPS-induced PD model for the study of the mechanisms of inflammation in the complex PD pathogenesis, as well as for the preclinical assessment of the effectiveness of anti-inflammatory drugs in the complex therapy of the disease. Indicators of the metabolic profile of phagocytes of different localization can be used as informative markers of local and systemic inflammation in such studies.

**Key words:** Parkinson's disease, 6-OHDA, lipopolysaccharide, inflammation, phagocytes, microglia, macrophages, monocytes, neutrophils, reactive oxygen species, phagocytosis.

## Список публікацій здобувача

Праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Олійник, Ж., Сенчило, Н., Довбинчук, Т., Степаненко, С., Гузик, М. (2020). Реактивний астрогліоз у щурів із ЛПС-індукованою хворобою Паркінсона. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія, Біологія, 1(80):19-25. [https://doi.org/10.17721/1728\\_2748.2020.80.19-25](https://doi.org/10.17721/1728_2748.2020.80.19-25)  
*(Особистий внесок здобувача – експериментальні дослідження, пошук, аналіз та узагальнення тематичної літератури, підготовка статті до друку. 0,59 авторських аркушів).*
2. Oliynyk, Zh., Rudyk, M., Svyatetska, V., Dovbynychuk, T., Tolstanova, G., Skivka, L. (2022). Systemic inflammation biomarkers in 6-OHDA- and LPS-induced Parkinson's disease in rats. Ukr. Biochem. J, 94(1): 33-43. <https://doi.org/10.15407/ubj94.01.033>  
*(Особистий внесок здобувача – експериментальні дослідження, пошук, аналіз та узагальнення тематичної літератури, підготовка статті до друку. 1,2 авторських аркушів).*
3. Олійник, Ж., Сківка, Л. (2022) Функціональні характеристики перитонеальних фагоцитів щурів із 6-OHDA- та ЛПС-індукованою хворобою Паркінсона. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія, Біологія, 1(88): 41-46. <https://bio.visnyk.knu.ua/issue/view/vol88-n2/article5>  
*(Особистий внесок здобувача – експериментальні дослідження, пошук, аналіз та узагальнення тематичної літератури, підготовка статті до друку. 0,87 авторських аркушів).*

4. Oliynyk, Zh., Rudyk, M., Kalachniuk, L., Dovbynchuk, T., Tolstanova, G., Skivka, L. (2022). Long-term effects of sham surgery on phagocyte functions in rats. *Biotechnologia Acta* , 15(2): 37-46. <https://doi.org/10.15407/biotech15.02.037>  
*(Особистий внесок здобувача – експериментальні дослідження, пошук, аналіз та узагальнення тематичної літератури, підготовка статті до друку. 0,91 авторських аркушів).*
5. Oliynyk, Z., Rudyk, M., Dovbynchuk, T., Dzubenko, N., Tolstanova, G., Skivka, L. (2023) Inflammatory hallmarks in 6-OHDA- and LPS-induced Parkinson's disease in rats. *Brain Behav Immun Health*. 30:100616. <https://doi.org/10.1016/j.bbih.2023.100616>  
*(Особистий внесок здобувача – експериментальні дослідження, пошук, аналіз та узагальнення тематичної літератури, підготовка статті до друку. 1,49 авторських аркушів).*

#### **Опубліковані праці апробаційного характеру:**

1. Олійник Ж., Рудик М., Довгий Р., Святецька В., Толстанова Г., Довбинчук Т., Майборода Я., Степаненко С., Яценко І., Гладун Д., Сківка Л. Розвиток ЛПС-індукованої хвороби Паркінсона у щурів асоційований з прозапальною активацією циркулюючих фагоцитів. XV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», 9 – 11 квітня 2019 р., Львів, Україна: с.123.
2. Олійник Ж. І., Гузик М. М., Толстанова Г. М., Довбинчук Т. В., Рудик М. П., Довгий Р. С., Святецька В. М., Сківка Л.М. Патологічні зміни астроглії за умов розвитку ЛПС-індукованої хвороби Паркінсона у щурів.

- Всеукраїнська наукова конференція з міжнародною участю «Актуальні питання біології та медицини», 30-31 травня 2019 р., Черкаси, Україна: с.65.
3. Степаненко С., Рудик М., Гурмач Є., Святецька В., Присяжнюк А., Олійник Ж., Маринченко А., Довбинчук Т., Храновська Н., Скачкова О., Толстанова Г.М., Сківка Л.М. Функціональні та фенотипові властивості циркулюючих фагоцитів як індикаторні показники розвитку хвороби Паркінсона у щурів. Науково-практична конференція «Сучасні наукові досягнення в експериментальній та лабораторній медицині» Міжнародного конгресу з лабораторної медицини, 23-25 вересня 2020 р., Київ, Україна: с.11.
  4. Олійник Ж., Святецька В., Маринченко А., Степаненко С., Довбинчук Т., Толстанова Г. Гематологічні ознаки системного запального процесу у тварин з різними моделями хвороби Паркінсона. XIX Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / Bioscience advances», 12-13 травня 2021 р., Київ, Україна: с.42.
  5. Олійник Ж., Святецька В., Маринченко А., Довбинчук Т., Толстанова Г. Метаболічний профіль циркулюючих фагоцитів у тварин з різними моделями хвороби Паркінсона. XV Всеукраїнська конференція молодих вчених ІМБІГ з міжнародною участю, 26-27 травня 2021 р., Київ, Україна: с.202
  6. Oliyuyk ZH., Svyatetska V., Marynchenko A., RudyM., Dovbynychuk T., Dzubenko N., Tolstanova G. Functional Changes in Peripheral Phagocytes in Rats with LPS-induced Parkinson's Disease1-st International Conference on Experimental Sciences & Biotechnology, September 8-10, 2021, Mugla, Turkey: p.43-48.

7. Oliylyk Zh., Marynchenko A., Stepanenko S., Svyatetska V., Rudyk M. Functional alterations of peritoneal macrofages in rats with different models of Parkinson's disease. IV international scientific conference Microbiology and Immunology - The Development Outlook In The 21st Century, September 22-23, 2022, Kyiv, Ukraine: p.16.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	21
ВСТУП .....	23
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	31
1.1. Етіологія та імунопатогенез хвороби Паркінсона.....	32
1.1.1. Неімунні фактори патогенезу хвороби Паркінсона.....	32
1.1.2. Локальне і системне імунне запалення у патогенезі хвороби Паркінсона.....	38
1.2. Тваринні моделі хвороби Паркінсона.....	43
1.3. Метаболічна поляризація фагоцитів у структурі запального процесу..	47
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	55
2.1. Дослідні тварини.....	55
2.2. Схема дослідження.....	56
2.3. 6-OHDA-індукована модель хвороби Паркінсона.....	57
2.4. ЛПС-індукована модель хвороби Паркінсона.....	58
2.5. Апоморфіновий тест.....	59
2.6. Імуногістохімічний аналіз дофамінергічних нейронів.....	59
2.7. Поведінковий тест «відкрите поле».....	61
2.8. Імуногістохімічний аналіз гліального фібрилярного кислого протеїну.....	61
2.9. Дослідження протеїнів-маркерів астрогліозу методом вестерн-блот...	62
2.10. Виділення фагоцитів різної локалізації.....	64
2.11. Оцінка фагоцитарної активності.....	65
2.12. Оцінка оксидативного метаболізму фагоцитів.....	66
2.13. Оцінка оксидативного метаболізму фагоцитів в НСТ-тесті.....	67
2.14. Оцінка експресії фенотипових маркерів фагоцитами.....	68

2.15. Дослідження гематологічних показників.....	68
2.16. Визначення концентрації С-реактивного білка у плазмі крові .....	69
2.17. Оцінка вагових індексів та клітинності лімфоїдних органів .....	69
2.18. Статистичний аналіз.....	70
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ .....	71
3.1. Критерії розвитку захворювання у щурів з 6-ОНДА- та ЛПС-індукованою хворобою Паркінсона.....	71
3.2. Метаболічний профіль мікроглії у щурів з різними моделями хвороби Паркінсона.....	75
3.3. Реактивний астрогліоз у щурів ЛПС-індукованою моделлю хвороби Паркінсона.....	82
3.4. Метаболічний профіль циркулюючих фагоцитів у структурі системного запального процесу у щурів з 6-ОНДА- та ЛПС-індукованою хворобою Паркінсона.....	87
3.5. Фенотипові-функціональні характеристики перитонеальних фагоцитів у щурів з 6-ОНДА- та ЛПС-індукованою хворобою Паркінсона.	101
УЗАГАЛЬНЕННЯ .....	113
ВИСНОВКИ .....	129
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....	132
ДОДАТОК 1.....	160

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ВПМ – великі перитонеальні макрофаги  
ГЕБ- гематоенцефалічний бар'єр  
ДА- дофамін  
ДН -дофамінергічні нейрони  
ІЛ - інтерлейкін  
ІСІЗ – індекс системного імунного запалення  
ЛМК – лімфоцитарно-моноцитарний коефіцієнт  
ЛПС - ліпополісахарид  
Лф - лімфоцити  
Мо -моноцити  
МПМ – малі перитонеальні макрофаги  
МФ - макрофаги  
МФТП - 1-метил-4-феніл-1,2,3,6-тетрагідропіридин  
Нф – нейтрофіли  
НЛК – нейтрофільно-лімфоцитарний коефіцієнт  
НСТ – нітросиній тетразолій  
ПМ – перитонеальні макрофаги  
ПРР – патерн-розпізнавальні рецептори  
РФК - реактивні форми кисню  
РФН – реактивні форми нітрогену  
ТГ- тирозин гідроксилаза  
ТЛК – тромбоцитарно-лімфоцитарний коефіцієнт  
ФІ – фагоцитарний індекс  
ХО- хибнооперовані  
ХП - хвороба Паркінсона

ЦНС- центральна нервова система

$\alpha$ Syn – alpha synuclein – альфа синуклеїн

CD – Cluster of Differentiation – кластер диференціювання

DAMP – Danger (Damage)-Associated Molecular Patterns

FITC - fluorescein isothiocyanate – флуоресцеїн ізотіоціанат

GFAP - glial fibrillary acidic protein – гліальний фібрилярний кислий білок

MALT- Mucosa-Associated Lymphoid Tissue - лімфоїдна тканина асоційована

зі слизовими оболонками

MBP – main myelin protein – основний білок мієліну

MDSC – Myeloid-Derived Suppressor Cells – мієлоїдні супресорні клітини

MHC – Major Histocompatibility Complex – головний комплекс

гістосумісності

OALT – Omentum-Associated Lymphoid Tissues – лімфоїдна тканина,

асоційована із сальником

6-OHDA - 6-hydroxydopamine – 6-гідроксидофамін

PAMP – Pathogen-Associated Molecular Patterns – молекулярні патерни,

асоційовані з патогенами

PBS – Phosphate-buffered saline – фосфатно-сольовий розчин

ROS – reactive oxygen species – реактивні форми кисню

VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor – фактор росту ендотелію судин

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Хвороба Паркінсона (ХП) є провідним нейродегенеративним руховим розладом у всьому світі, яким уражено 0,2% населення планети [1]. З 1990 по 2016 рр. поширеність хвороби подвоїлася, біля 1% людей віком понад 60 років і 4% людей  $\geq 80$  років мають ХП, що відображає експоненційний ріст її поширеності з віком. За оцінками експертів Всесвітньої організації охорони здоров'я, кількість випадків ХП перевищить 12 мільйонів осіб у 2040 році. ХП – це хронічно прогресуюче захворювання з високим рівнем інвалідності та смертності. У період з 1994 по 2019 рік у всьому світі спостерігалось значне зростання рівня смертності від ХП як серед чоловіків, так і серед жінок: з 1,76 (на 100 000) у 1994 році до 5,67 у 2019 році [2,3]. Захворюваність на ХП в Україні, згідно статистики МОЗ, становить 61,4 на 100 000 населення.

ХП характеризується дегенерацією дофамінергічних нейронів (ДН) у чорній субстанції середнього мозку із супутньою втратою їх аксонів, які виступають у смугасте тіло вздовж нігростріарного шляху. Це призводить до втрати нейромедіатора дофаміну (ДА), що, у свою чергу, спричиняє розвиток первинних моторних симптомів ХП: брадикінезії, атаксії, тремору, ригідності і постуральної нестабільності, які проявляються клінічно після того, як рівень ДА у смугастому тілі знижується на 70% [4]. Іншою ключовою патологічною ознакою ХП є наявність білкових включень, відомих як тільця Леві. Білок  $\alpha$ -синуклеїн є основним компонентом тілець Леві, а його мутантні форми можуть спричинити сімейну форму ХП [5].

ХП – це складний нейродегенеративний стан, етіологія та патогенетичні механізми якого залишаються не до кінця вивченими. У той час як невелика частина пацієнтів із ХП має моногенну причину захворювання, більшість випадків (спорадична ХП) не пов'язані з певною генетичною аномалією [6]. ХП є

багатофакторним захворюванням. Згідно сучасної концепції етіопатогенезу спорадичної ХП, основними (але не єдиними) патогенетичними механізмами цієї форми захворювання є окисний стрес, пов'язаний з мітохондріальною дисфункцією, протеолітичний стрес через дисфункцію убіквітин-протеасомної системи і місцеве запалення (нейрозапалення). Кожен із трьох шляхів може призвести до активації внутрішньоклітинного механізму запрограмованої клітинної загибелі, який вважається загальним механізмом втрати нейронів при ХП. Крім того, всі зазначені механізми можуть взаємодоповнюватися [7, 8].

На сьогоднішній день ХП залишається невиліковним нейродегенеративним захворюванням, а існуюча терапія – симптоматичною [9, 10]. Розуміння механізмів патогенезу ХП може дозволити ідентифікувати нові терапевтичні цілі та розробити патогенетичне лікування.

Розшифрування механізмів патогенезу ХП і розробка патогенетичних методів захворювання передбачають поєднання клінічних спостережень і експериментальних досліджень з використанням тваринних моделей. Симптоматична, патофізіологічна та патогенетична гетерогенність ХП вимагає використання різноманітних тваринних моделей для вивчення різних особливостей захворювання. Оскільки, як зазначено вище, паркінсонізм є багатофакторним розладом, вибір моделі для дослідження є важливим, оскільки жодна модель не відтворює всі біохімічні особливості захворювання. На сьогоднішній день розроблено численні фармакологічні, нейротоксин-індуковані, генетичні та клітинні моделі ХП [11, 12]. Останнім часом особлива увага приділяється вивченню запалення у патогенезі ХП. У паренхімі головного мозку запальна реакція вважалася очевидним наслідком дегенерації нейронів, але останні спостереження вказують на прямий внесок запальних гліальних змін на ранній стадії захворювання. Крім того, системне запалення також впливає на розвиток дисфункції нейронів [13, 14]. Для дослідження запалення у структурі патогенезу ХП

розроблено тваринні моделі, засновані на інтрацеребральному та системному введенні інфламогенів, а також на використанні вірусних векторів [15, 16]. Серед них найбільш часто застосовуваними є моделі на основі інтрацеребрального введення 6-гідроксидофаміну (6-OHDA) [17] та бактеріального ліпополісахариду (ЛПС) [18]. Однак, порівняння релевантності цих моделей щодо відтворення всіх аспектів локального і системного запалення, притаманного клінічному перебігу ХП, у літературі відсутнє.

Ключовими ефекторними клітинами локальних і системних запальних процесів є фагоцити (макрофаги, моноцити і нейтрофіли). Фагоцити виконують як роль ініціаторів запальних процесів, так і функцію резолуції запалення [19, 20]. Оцінка функціонального профілю фагоцитів дозволяє охарактеризувати виразність і стадію запального процесу, а також взаємозв'язок між локальним і системним запаленням.

**Мета і завдання дослідження.** *Метою роботи було* провести порівняльну оцінку метаболічного профілю тканинних резидентних та циркулюючих фагоцитів у щурів з різними моделями ХП.

Для досягнення мети були поставлені наступні *завдання*:

1. Дослідити фагоцитарну активність, оксидативний метаболізм та експресію фенотипових маркерів поляризованої активації мікроглії у щурів з 6-OHDA- та ЛПС-індукованою хворобою Паркінсона.
2. Провести порівняльні дослідження функціональних та фенотипових характеристик фагоцитів циркулюючої крові у щурів з 6-OHDA- та ЛПС-індукованою хворобою Паркінсона.
3. Охарактеризувати інтегральні індекси системного запалення, засновані на кількісних показниках лейкоцитів крові, у тварин з 6-OHDA- та ЛПС-індукованою хворобою Паркінсона.

4. Дослідити кореляційний взаємозв'язок між метаболічним профілем мікроглії та інтегральними індексами системного запалення у тварин з різними моделями хвороби Паркінсона.

5. Провести порівняльне дослідження фагоцитарної активності, оксидативного метаболізму та експресії фенотипових маркерів поляризованої активації перитонеальних макрофагів у щурів з різними моделями хвороби Паркінсона.

**Об'єкт дослідження:** метаболічний профіль фагоцитів різної локалізації (мікроглії, моноцитів і гранулоцитів (нейтрофілів) периферичної крові та перитонеальних макрофагів) в умовах розвитку 6-OHDA- та ЛПС -індукованої хвороби Паркінсона.

**Предмет дослідження:** фагоцитарна активність, оксидативний метаболізм, експресія фенотипових маркерів поляризованої активації фагоцитів різної локалізації.

**Методи дослідження:** для виконання поставлених завдань у роботі використано імуногістохімічні, біохімічні, імуноцитохімічні (визначення поглинальної активності, оксидативного метаболізму та експресії фенотипових маркерів поляризованої активації фагоцитами методом проточної цитометрії), методи експериментальної фізіології та статистичні методи. Хірургічні операції проводили із застосуванням анестезуючих речовин нембуталу та кетаміну/ксилазину. Евтаназію тварин проводили шляхом цервікальної дислокації.

#### **Наукова новизна отриманих результатів.**

За результатами дисертаційного дослідження розширено існуючі уявлення щодо відмінностей метаболічного профілю мікроглії у тварин з 6-OHDA- та ЛПС-індукованою моделями ХП: встановлено, що у популяції мікроглії щурів з ЛПС-ХП переважають клітини з прозапальним метаболічним профілем, типовим для

клінічного перебігу захворювання, з посиленою антигенпрезентувальною здатністю, засвідченою надекспресією костимуляторних молекул CD80/86.

Уперше встановлено кореляційний зв'язок між часткою мікрогліальних CD80/86+ клітин та значеннями інтегральних індексів системного запалення у тварин з ЛПС-ХП, що вказує на відтворення у цій моделі порочного кола локального і системного запалення, властивого клінічному перебігу ХП.

Отримано нові дані стосовно особливостей метаболічного профілю циркулюючих фагоцитів (моноцитів і нейтрофілів) у тварин з моделями ХП, індукованими 6-ОНДА та ЛПС: прозапальний метаболічний профіль, притаманний циркулюючим фагоцитам, залученим у системне запалення у клінічному перебігу захворювання, виявлено лише у щурів з ЛПС-ХП.

Уперше встановлено факт прозапальної поляризованої активації перитонеальних макрофагів у поєднанні з гіпоспленією у моделі ХП, індукованій уведенням бактеріального ЛПС, що доводить їх участь у системному запаленні та ілюструє відтворення у цій моделі залучення осі кишечник-селезінка-мозок у патогенез ХП.

### **Практичне значення отриманих результатів.**

За результатами дослідження метаболічного профілю фагоцитів різної локалізації (резидентних тканинних макрофагів головного мозку – мікроглії, циркулюючих моноцитів і нейтрофілів, а також перитонеальних макрофагів) експериментально доведено релевантність моделі ХП, індукованої інтрацеребральним уведенням бактеріального ЛПС, щодо відтворення локального нейрозапалення та системного запального процесу у патогенезі ХП, властивого клінічному перебігу захворювання. Це обґрунтовує доцільність використання ЛПС-ХП для вивчення механізмів розвитку запалення у патогенезі захворювання та доклінічної оцінки засобів його контролю у комплексному лікуванні.

Результати дисертаційного дослідження застосовуються в навчальному процесі кафедри мікробіології та імунології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка при викладанні дисциплін «Імунологія», «Анатомія та морфологія імунної системи» та «Нейроімунологія».

### **Особистий внесок здобувача.**

Дисертаційна робота є самостійним дослідженням автора. Автором особисто проведено аналіз та узагальнення літературних даних за темою роботи, одержано основну частину експериментального матеріалу, викладеного в дисертації, а також проведено його статистичний аналіз. Формулювання концепції дослідження, аналіз та інтерпретацію результатів, формулювання основних положень і висновків, підготовку до друку наукових праць проведено у співпраці з науковим керівником д.б.н., проф. Л.М.Сківкою.

Автор висловлює також глибоку вдячність за консультаційну допомогу та методичний супровід у роботі з тваринами завідувачці навчальної лабораторії біофізики ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, н.с., к.б.н. Довбинчук Т.В.; за методичний супровід у проведенні імуногістохімічних досліджень гіпокампа ст.н.с. кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики Інституту високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка к.б.н., В.Н.Дзюбенко; за методичний супровід у проведенні імуногістохімічних досліджень та вестерн-блоту при вивченні астрогліозу ст.н.с. відділу вітамінів і коензимів Інституту біохімії ім. О.В Паладіна НАН України, к.б.н. М.М.Гузику; за консультативну допомогу в аналізі даних проточної цитометрії доценту кафедри мікробіології та імунології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, к.б.н. М.П.Рудик. Співучасть колег у виконанні роботи відображена у спільних публікаціях.

### **Апробація результатів дисертації.**

Основні результати дисертаційної роботи було представлено на XV Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (9 – 11 квітня 2019, м. Львів, Україна); Всеукраїнській науковій конференції з міжнародною участю «Актуальні питання біології та медицини» (30-31 травня 2019 року, м. Черкаси, Україна); Науково-практичній конференції «Сучасні наукові досягнення в експериментальній та лабораторній медицині» Міжнародного конгресу з лабораторної медицини (23-25 вересня 2020 року, м. Київ, Україна); XIX Міжнародна науковій конференції студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / Bioscience advances» (12-13 травня 2021 року, м. Київ, Україна); XV Всеукраїнській конференції молодих вчених ІМБІГ з міжнародною участю (26-27 травня 2021 року, м. Київ, Україна); 1-st International Conference on Experimental Sciences & Biotechnology (September 8-10, 2021, Mugla, Turkey); IV international scientific conference Microbiology and Immunology - The Development Outlook In The 21st Century (September 22-23, 2022, Kyiv, Ukraine).

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Дисертаційна робота виконана в рамках тематики наукових досліджень ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка: НДР № 21БФ036-01 «Тромбози як фактор ризику виникнення ускладнень у пацієнтів, що хворіли на covid-19», № 22БФ036-02 «Патології суглобів, спричиненні порушеннями метаболізму в пост-ковідний період», № 17ДП036-01 «Effects of  $^{64}\text{Zn}$ -asp and  $^{64}\text{Zn}$ -asp Containing 10% E2+85Rb on Indices of Systemic Immunologic Reactivity, Oxidant-Antioxidant Reactivity, Behavioral and Motor Functions in Experimental Parkinson's Disease», № 18ДП036-10 «The effect of  $^{64}\text{Zn}$ -asp and  $^{64}\text{Zn}$ -asp containing 50% E2+85Rb on local and systemic immune reactivity, behavioural and motor functions in rats with LPS-induced experimental parkinsonism» та

виконання завдань Перспективного плану розвитку наукового напрямку «Біологія та охорона здоров'я» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Тема дисертаційної роботи затверджена на засіданні Вченої ради ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, протокол №5 від 12 листопада 2018 року.

Уточнення теми дисертаційної роботи затверджено на засіданні Вченої ради ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, протокол №12 від 30 червня 2022 року.

### **Публікації.**

За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 12 наукових праць: 5 статей у фахових періодичних виданнях, з них 2 статті у виданнях, що індексуються Scopus/WoS, 3 статті у виданнях, затверджених переліком МОН України, та 7 тез наукових доповідей на закордонних та вітчизняних міжнародних наукових конференціях.

### **Структура та обсяг дисертації.**

Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів власних досліджень з їх обговоренням, узагальнення, висновків, списку використаних літературних джерел. Загальний обсяг дисертації складає 163 сторінок, основну частину роботи викладено на 131 сторінках. Робота ілюстрована 4 таблицями та 26 рисунками. Перелік використаних літературних джерел налічує 250 найменувань.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

ХП є другим за поширеністю нейродегенеративним розладом [21]. У всьому світі нараховується понад 10 мільйонів людей із ХП. Тільки у США приблизно один мільйон американців хворі на паркінсонізм і щорічно діагностується приблизно 60 000 нових випадків. В Європі показники поширеності і захворюваності на ХП оцінюються приблизно в 108–257/100 000 та 11–19/100 000 на рік відповідно [22]. Згідно зі статистичними даними Міністерства охорони здоров'я, в Україні ХП, що становить 61,4 на 100 000 населення. Кожного року реєструється близько 2 500 нових випадків захворювання [23]. У численних епідеміологічних дослідженнях встановлено безумовний факт залежності ХП від віку. Середній вік встановлення діагнозу становить 60 років. [24]. За даними міжнародної «Робочої групи з хвороби Паркінсона» та результатами низки інших досліджень, у даний час серед осіб, хворих на цю патологію 1 з 20 має вік до 40 років, 1 з 10 –до 50 років [25]. За прогнозами експертів ВООЗ до 2050 року очікується збільшення числа хворих на ХП, у середньому, у чотири рази [26]. Очікування зростання числа хворих пояснюється загальносвітовою тенденцією збільшення тривалості життя і старіння населення в розвинених країнах.

Неухильне прогресування хвороби і неминуча інвалідизація хворих обумовлюють високу соціальну значимість ХП. Через 10-20 років після встановлення діагнозу 40-75% хворих помирають, а 50% тих, що вижили, потребують постійного стороннього догляду [27]. У зв'язку з таким станом справ, звертається увага на необхідність своєчасної діагностики захворювання та лікування пацієнтів з ХП [28]. При цьому патогномонічних (властивих саме цій патології) симптомів ХП немає. Діагноз встановлюється за сукупністю клінічних

проявів. Проведення лікування є виключно симптоматичним. Через 200 років після опису Д. Паркінсоном симптомокомплексу дрижального паралічу, патогенетичні методи терапії ХП відсутні.

Таким чином, високий рівень захворюваності, смертності, інвалідизації населення, прогноз очікуваного зростання числа хворих на цю патологію визначають необхідність більш ретельного розгляду відомих результатів досліджень щодо ХП і обумовлюють необхідність виявлення усіх факторів розвитку цієї патології з метою розробки методів її ранньої діагностики та способів патогенетичного лікування.

## **1.1. Етіологія та імунопатогенез хвороби Паркінсона**

### **1.1.1. Неімунні фактори патогенезу хвороби Паркінсона**

Хвороба Паркінсона (ХП) є прогресуючим нейродегенеративним захворюванням, що вражає центральну нервову систему і периферичні органи [29]. Фактори ризику включають вік, чоловічу стать, деякі фактори навколишнього середовища. Етіологія захворювання більшості пацієнтів невідома.

Виділяють три патогенетичні форми паркінсонізму [30].

- первинний (ідіопатичний) паркінсонізм, який включає безпосередньо хворобу Паркінсона і ювенільний паркінсонізм;
- вторинний (симптоматичний) паркінсонізм, який в залежності від етіологічного фактора може бути постенцефалічним, лікарським, судинним, токсичним, травматичним;
- паркінсонічний синдром при різних формах мультисистемної дегенерації (хвороба Вільсона - Коновалова, Гентингтона, кортико-базальна дегенерація та ін.).

Крім того, розрізняють спадкову і спорадичну форми ХП. Було ідентифіковано різні генетичні причини хвороби, хоча на сімейні форми ХП припадає всього 5–15% випадків, інші 90% - 95% визначаються як спорадичні форми [31]. Такий поділ не пояснює всього різноманіття поглядів на патогенез хвороби. Тому прийнято вважати ХП мультифакторним захворюванням, що виникає внаслідок збігу патогенної дії як спадкових, так і ендо- та екзогенних факторів. Спадкова форма ХП асоційована з хромосомними абераціями. Спорадичні форми асоціюють з деякими екзогенними факторами. Огляд екзогенних факторів ризику розвитку ХП підтверджує важливу роль низки токсичних речовин (пестициди ротенон і паракват, токсин МФТП (1-метил-4-феніл-1,2,3,6-тетрагідропіридіном), синтетичний героїн і ряд інших ліків) як тригерів спорадичних випадків цього захворювання [32].

Точне співвідношення впливу сукупності зовнішніх і генетичних факторів розвитку ХП не виявлено, однак встановлені біологічні закономірності патогенезу дозволяють авторам виділити, як базові ланки їх впливу, мітохондріальну дисфункцію та окисний стрес, агрегацію  $\alpha$ -синуклеїну ( $\alpha$ Syn) і хронічне нейрозапалення [33-35].

Протеолітичний стрес і порушення функцій мітохондрій розглядаються як два основних неімунних механізми у патогенезі нейродегенерації при ХП. При протеолітичному стресі відбувається порушення синтезу нейронних білків з одночасною активацією їх протеолітичної деградації. У патологічний каскад залучаються порушення лізосомальної аутофагії, мітофагії (селективної деградації мітохондрій), зміни убіквітин-протоасомного шляху. Другий неімунний механізм патогенезу - порушення гомеостазу, і, як наслідок, функцій мітохондрій. У комплексі ці два основні механізми патогенезу при ХП призводять до окисного стресу і пригнічення метаболізму нейронів [36-38].

Біохімічною особливістю ХП є недостатність продукції дофаміну (ДА) у базальних гангліях. У результаті розвивається ДА-дефіцитний нейромедіаторний дисбаланс. При втраті 70% ДА у смугастому тілі (хвостатому ядрі) знижується гальмівний дофаміновий контроль у нігростріатній системі, виникає гіперактивація стріатних холінергічних нейронів [39].

Розвиток внаслідок дегенерації дофамінсинтезуючих нейронів недостатності ДА-трансмисії приводить до підвищення активності ферментів катаболізму ДА-моноаміноксидази Б (МАО-Б) та катехол-О-метилтрансферази (КОМТ). Змінюються функціональні взаємодії між ДА і збудливим медіатором глутаматом. Гіперактивація глутаматних рецепторів посилює накопичення кальцію в ДА-нейронах, що індукує пошкодження і загибель нігростріатних клітин [30].

При ХП посилюється вільнорадикальне окиснення, виникає окисний стрес, що активує некроз та апоптоз ДА-нейронів [40, 41]. Окисний стрес запускає ланцюг подій, що складається з інгібування сульфгідрильних ферментів, полімеризації протеїнів, активації перекисного окиснення ліпідів, токсичної дії на мітохондрії, білки, нуклеїнові кислоти і мембрани нейронів [30]. Окиснення ДА при дії МАО-Б пов'язане з утворенням гідроксипероксиду, що спричиняє посилення впливу гідроксильних радикалів на ДА-нейрони. МФТП-нейротоксин вибірково пошкоджує ДА-нейрони чорної субстанції. В експерименті показано, що інгібітори МАО-Б захищають тварин від ХП, викликаного МФТП [42]. Окисний стрес тісно пов'язаний з мітохондріальною дисфункцією. Припущення про значення дисфункції мітохондрій у патогенезі ХП з'явилися після встановлення факту розвитку паркінсонізму при прийомі компонента синтетичних опіатів МФТП, який пригнічує мітохондріальний комплекс I. Встановлено, що при ХП знижується активність мітохондріального комплексу I і зменшується кількість цього комплексу в ЦНС і в тромбоцитах [43]. Факторами таких системних порушень є: мутації в генах SCNA, LRRK2, DJ-1, PINK1, PARK2; вплив токсинів на НАД-

дегідрогеназний комплекс мітохондрій клітин; накопичення агрегованого  $\alpha$ -синуклеїну [44]. Надмірно утворюються вільно-радикальні форми кисню, ушкоджуючи мітохондріальні білки. Зниження вироблення АТФ в нейронах служить індуктором токсичних процесів. Відбувається деполяризація клітинних мембран, як наслідок надмірна активація NMDA-рецепторів. Зростає трансмембранний приток кальцію у клітину, вивільняється іонізований кальцій з внутрішньоклітинних депо, й ініціюється каскад Са-залежних нейротоксичних реакцій, вивільнення цитохрому С. Наприкінці запускається каскад реакцій апоптозу [45, 46].

Одним з механізмів у патогенезі ХП є порушення функції убіквітин-протеасомної системи. Однією з функцій цієї системи є протеоліз мутантних і пошкоджених білків. У процесі беруть участь три ферменти: убіквітин-активуючий ензим (E1), убіквітин-кон'югуючий ензим (E2) та убіквітин-лігаза (E3). Ці ферменти розпізнають змінені білки-мішені, утворюють з ними комплекси, які потім розпізнаються 26S протеасомою і піддаються незворотній деградації [47-49]. При ХП відбуваються мутації в генах SNCA, PARK2 і UCHL1, що веде до порушення роботи убіквітин-протеасомної системи. Надалі накопичення  $\alpha$ -синуклеїну, утворення тілець Леві призводить до загибелі нейронів. Інший шлях нейтралізації патогенних білків - лізосомальна аутофагія. При мутації в гені GBA, який кодує фермент глюкоцереброзидазу, що каталізує утворення цераміду і глюкози з гліколіпиду глікозилцераміду, порушується лізосомальна біодеградація аномальних білків. При цьому з'являються симптоми паркінсонізму. Порушення лізосомальної аутофагії також розвивається при мутації в гені ATR13A2, відповідальному за розвиток форми PARK9 ХП з аутосомно-рецесивним типом успадкування. [49, 50].

«Врівноважуючою» різні погляди на патогенез ХП точкою відліку у розвитку патології прийнято вважати комплекс патогенетичних змін внаслідок пошкодження білка  $\alpha$ -синуклеїну ( $\alpha$ Syn). Через призму змін конформації, властивостей цього

білка розглядаються багато біологічних процесів при ХП.  $\alpha$ Syn являє собою невеликий пресинаптичний білок, що знаходиться в клітинах у формі тетрамера. Цей білок становить близько 1% всієї маси головного мозку і експресується в різних відділах ЦНС. Його фізіологічна функція полягає в процесах везикулярного транспорту дофаміну [51, 52]. Ключовою подією переходу  $\alpha$ Syn з непатогенного у патогенний стан є зміна його просторової конформації. Формуються складні Р-структури, нейротоксичні олігомери. Відбувається їх фібриляція з формуванням цитоплазматичних агрегатів [53-55]. Тобто, при зміні просторової конфігурації  $\alpha$ Syn - геометричного дублювання, потроєння, збільшення кількості, відбувається його патологічна агрегація і подальше пошкодження дофамінергічних нейронів чорної субстанції головного мозку [36]. У подальшому  $\alpha$ Syn формує основу тілець Леві (аномальних скупчень білка у нейронах).  $\alpha$ Syn бере участь у патогенезі як спорадичних, так і спадкових форм ХП. Агресивна дія екзогенних і генетичних факторів, що призводить до конформаційних змін  $\alpha$ Syn, найбільш чітко проявляється у старшому віці, коли посилюються порушення в загальному ендогенному метаболізмі [56-58].

Показано, що токсини, які мають значення в розвитку спорадичних випадків ХП, викликають місцеве запалення, поширення якого призводить до окислювального стресу в кишковоки. Відбувається осадження в цих зонах  $\alpha$ Syn, а потім подальша його міграція у структури центральної нервової системи (ЦНС). Згодом надмірне накопичення патологічних форм  $\alpha$ Syn, які володіють токсичними властивостями, призводить до дисфункції і загибелі нейронів. Це, у свою чергу, призводить до підвищеної чутливості уражених нейронів до окисного стресу. Такі нейрони мають більш високі рівні накопичення ендогенного  $\alpha$ Syn. Морфологічно їх аксони довші, розгалужені, наростає їх демієлінізація, аж до повної втрати мієліну [59, 60].

ХП розглядається як багатоцентровий нейродегенеративний процес, який впливає на численні нейронні структури, окрім *substantia nigra pars compacta*, у т.ч. й на ентеральну нервову систему. У тваринних моделях вивчений механізм поширення  $\alpha$ Syn від шлунково-кишкового тракту в структури ЦНС. Білок  $\alpha$ Syn вводили у стінку шлунка і дванадцятипалої кишки, після чого він поширювався далі через блукаючий нерв. Цей результат показує, що блукаючий нерв бере участь в поширенні  $\alpha$ Syn від шлунково-кишкового тракту до центральної нервової системи [61].

Існують теорії, в яких висловлюється припущення, що дія  $\alpha$ Syn аналогічна дії пріонів. Патологічно структурований  $\alpha$ Syn розглядається як інфекційний агент, який формує «токсичний патерн». Такий «патерн» індукує патологічну конформацію сусіднього з  $\alpha$ Syn білка, що перетворює його в токсичний білок [62]. Теорія «токсичного патерну» пояснює деякі невідповідності появи тілець Леві і клінічних ознак ХП. При вивченні поширення тілець Леві, деякі дослідники ставлять під сумнів винятковий зв'язок між тільцями Леві та клінічними симптомами ХП. Серед хворих на ХП з явищами деменції і руховими розладами тільки в 45% випадків виявляються тільця Леві в головному мозку, і тільки у 10% хворих - у чорній субстанції або базальних відділах переднього мозку. Також нейродегенеративні розлади в чорній субстанції можуть реєструватися раніше, ніж утворення тілець Леві [63, 64].

Введення у смугасте тіло (*striatum*) фібрил  $\alpha$ -синуклеїну викликає у мишей дегенерацію клітин в чорній субстанції і появу фібрилярних синуклеїнових агрегатів з розвитком рухових порушень [65, 66]. Далі синуклеїнові агрегати реєструються в інших відділах головного мозку. Це підтверджує характер поширення патології від початкового місця введення патологічного білка по шляхах в ЦНС. Такий ефект не спостерігається у трансгенних мишей, у яких пригнічена експресія власного  $\alpha$ -синуклеїну. Тобто для утворення патологічного  $\alpha$ -

синуклеїну необхідно ендогенне вироблення нормальних молекул цього білка [65]. Патологія  $\alpha$ -синуклеїну, його схильність до агрегації і формування фібрилярних структур, має виключне значення в патогенезі сімейних і спорадичних випадків ХП.

### **1.1.2 Локальне і системне імунне запалення у патогенезі хвороби Паркінсона**

ХП належить до категорії системних хронічних запальних захворювань [67]. Важливим компонентом патофізіології ХП є дисфункція імунної системи, яка включає у себе порушення імунорегуляції і прозапальну активацію імуніцитів, послаблення патрульної функції клітин імунної системи, розвиток аутоімунних розладів тощо [68, 69]. Ключова роль у локальному і системному запаленні в умовах розвитку цієї хвороби відводиться фагоцитам різної локалізації. Встановлено, що клітини мікроглії, котрі представлені резидентними і рекрутованими фагоцитами головного мозку, є центральними ефекторними клітинами нейрозапалення, тоді як циркулюючі фагоцити вважаються важливими ефекторними клітинами що викликають системне запалення [70]. Резидентні клітини мікроглії походять із жовткового мішка та відрізняються від резидентних макрофагів у периферичних тканинах своїми унікальними фенотиповими та метаболічними особливостями. Клітини мікроглії мають здатність до самооновлення та репопуляції і, таким чином, підтримують постійну щільність клітин у здоровому мозку дорослої людини [71, 72]. За фізіологічних умов ці резидентні сторожові клітини злегка зміщені у бік протизапального (M2) фенотипу, що важливо для гомеостазу головного мозку [73, 74]. При патологічних станах, таких як нейродегенерація, поляризована активація мікроглії (прозапальна M1 vs протизапальна M2) може ініціювати або завершувати нейрозапалення, відповідно посилюючи або гальмуючи прогресування

захворювання [71, 75]. Слід також відзначити, що прозапальна активація мікроглії у цих умовах може бути як тригером загибелі нейронів, так і наслідком нейродегенерації. З одного боку, численні зовнішні подразники, включаючи периферичні медіатори запалення, пов'язані з системним запаленням, можуть запускати прозапальну активацію мікроглії, що передуює нейродегенерації [76]. З іншого боку, дегенерація нейронів, що супроводжується вивільненням молекулярних патернів, асоційованих з ушкодженням клітин (Damage-Associated Molecular Patterns, DAMP), може спричинити прозапальний зсув метаболізму мікроглії [77]. Нейрозапалення завжди пов'язане з порушенням гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ) з подальшим рекрутуванням циркулюючих моноцитів у ЦНС, де ці клітини диференціюють на макрофаги [78, 79]. Рекрутовані з циркулюючої крові фагоцити у комплексній популяції мікроглії/макрофагів є додатковим важливим клітинним компонентом в опосередкуванні нейрозапалення. Метаболічний профіль цієї комплексної популяції фагоцитів визначає перебіг хронічних запальних захворювань ЦНС, таких як нейродегенеративні розлади, і розглядається як приваблива терапевтична мішень для лікування цих захворювань [80-82].

Порівняно недавно у літературі з'явилися публікації про розвиток системного запального процесу при ХП. У всіх пацієнтів з ХП спостерігається підвищення рівня прозапальних цитокінів у сироватці крові та зниження співвідношення CD4+ до CD8+ лімфоцитів незалежно від наявності або відсутності супутньої органоспецифічної чи неспецифічної запальної патології. Це, на думку фахівців, може відбуватися за рахунок дифузії медіаторів запалення, що продукуються активованими клітинами мікро- та астроглії, на периферію з активацією циркулюючих імунних клітин та подальшою появою в крові маркерів системного запалення (СЗ) [83]. Нестача дофаміну (внаслідок нейродегенерації у чорній субстанції), який, як відомо, пригнічує TRAF6-опосередковану активацію NF- $\kappa$ B та

запалення через дофаміновий рецептор D5 у клітинах вродженого імунітету, є ще однією причиною розвитку СЗ при ХП [84]. Крім того, локальне нейрозапалення індукує синтез клітинами печінки білків гострої фази, які відповідальні за рекрутування лейкоцитів у кров та їх прозапальний метаболічний зсув [85]. Прозапальні медіатори, що продукуються активованими периферичними імуніцитами, можуть, у свою чергу, впливати на клітини імунної системи мозку за двома основними механізмами. Перший полягає у стимуляції цими медіаторами нейронів вегетативної нервової системи. Другий – гуморальний – полягає у транспортуванні прозапальних медіаторів з кров'ю через порушений ГЕБ [86]. У такий спосіб прозапальні медіатори, що продукуються периферичними імуніцитами, посилюють нейрозапалення та нейродегенерацію. Крім того, периферичні імуніцити, в основному моноцити та нейтрофіли, рекрутуються в осередок нейрозапалення та сприяють переходу праймованої мікроглії в активований стан [87]. Таким чином, місцеві та системні запальні процеси утворюють порочне коло (*circulus vitiosus*), яке надає ХП хронічного характеру [88]. Саме тому запальні компоненти, зокрема СЗ, розглядаються як приваблива мішень для терапевтичного впливу при лікуванні ХП.

Доведеною, але наразі найменш дослідженою є участь запальних процесів у лімфоїдній тканині, асоційованій зі слизовими оболонками (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue, MALT) у розвитку ХП [89], на якій ґрунтується гіпотетична модель ініціювання ХП через вісь кишечник-мозок. Крім рухових порушень, у пацієнтів з ХП також наявний метаболічний дисбаланс, у половини з яких спостерігаються закрепи до появи інших клінічних ознак. Це свідчить про потенційний зв'язок між ранніми проблемами шлунково-кишкового тракту (ШКТ) та пізнішими стадіями розвитку БП. Дисбіотичні зміни кількості і видового різноманіття кишкової мікробіоти розглядаються як основна причина ініціювання розвитку ХП через вісь кишечник-мозок. Токсини кишкової мікробіоти можуть

індукувати утворення агрегатів  $\alpha$ Syn в ентеральній нервовій системі. Стимуляція вродженої імунної системи через дисбіотичні зміни у кишковій мікробіоті та підвищена проникність кишечника можуть спричинити системне запалення. У свою чергу, активація кишкових гліальних клітин і кишкових нейронів може сприяти  $\alpha$ -синуклеїнопатії [90]. Таким чином, згідно цієї моделі, ентеральне запалення, значною мірою опосередковане резидентними і рекрутованими фагоцитами, спричиняє накопичення  $\alpha$ Syn в ентеральній нервовій системі і його транспорт до головного мозку. Прогресивне нейрозапалення, у свою чергу, супроводжується транспортом запальних медіаторів на периферію, у т.ч. й до MALT. Відомо, що ГЕБ не є абсолютною перешкодою для взаємозв'язку мозку та периферичної імунної системи. З головного мозку відбувається транспорт антигенів та біологічно активних медіаторів лімфатичними судинами ЦНС (глімфатична система [91] у периферичні лімфовузли: назальні та глибокі шийні, які є частиною MALT [92]. Унікальним структурним компонентом імунної системи є лімфоїдна тканина, асоційована із сальником (Omentum-Associated Lymphoid Tissue, OALT), яка має багато спільних рис з MALT і бере активну участь в ініціюванні і контролі локальних і системних запальних процесів. Основними клітинами вродженого імунітету у складі OALT є перитонеальні макрофаги (ПМ). OALT тісно пов'язана із системною судинною мережею і взаємодіє з центральною нервовою системою та гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковою віссю [93]. Біологічні характеристики даної тканини ще повністю не з'ясовані. Однак, існують численні докази інтегративної ролі ПМ та інших клітин OALT у патофізіології запальних хвороб [94]. Дані літератури свідчать про те, що ПМ, подібно до інших позамозкових фагоцитів, залучені до розвитку системного запалення в умовах розвитку синуклеїнопатій. Відомо, що функціональний стан периферичних фагоцитів (циркулюючих клітин та фагоцитів у складі MALT) динамічно змінюється у процесі прогресування ХП від прозапальної активації у період ініціювання системного запалення до

метаболічного виснаження у період прогресування хвороби, на пізніх її стадіях [95]. Дані стосовно функціонального стану ПМ у патофізіології та комплексному патогенезу ХП у літературі практично відсутні. При цьому ПМ є дуже зручними для дослідження клітинами, зважаючи на простоту їх виділення у незбудженому стані.

Таким чином, як локальне, так і системне запалення є важливими компонентами у патофізіології та патогенезі ХП, механізми та динаміка яких у ході розвитку захворювання досліджені лише фрагментарно. При цьому розробка засобів лікування ХП, спрямованих на гальмування запалення, розглядається, як важливий компонент комплексної терапії цього складного мультифокального хронічного захворювання. Наразі у літературі наявні публікації, які ілюструють обнадійливі результати комплексного лікування ХП із включенням до його складу застосування антибіотиків для боротьби з дисбіотичними розладами і, як наслідок, з персистентним системним запаленням [96]. Застосування природних і синтетичних протизапальних препаратів (як традиційних, таких як нестероїдні протизапальні засоби, так і препаратів нового покоління) також демонструє позитивні ефекти у лікування ХП [97, 98].

У підсумку особливо слід відзначити, що при розгляді механізмів патогенезу ХП їх неможливо стратифікувати за ступенем значимості і послідовністю залучення у патологічний процес. Ці механізми взаємно пов'язані, мають каскадний характер та активуються численними тригерами: як ендогенними, так і екзогенними. Дослідження кожного з них для створення цілісної картини патофізіології та патогенезу захворювання потребує наявності і використання адекватних тваринних моделей, які б максимально точно відтворили клінічну картину того чи іншого компонента патофізіології ХП.

## 1.2. Тваринні моделі хвороби Паркінсона

Як зазначено вище, рання діагностика і прогнозування перебігу ХП, розробка методів і засобів профілактики і лікування цієї хвороби потребують глибоко знання патофізіології хвороби, а останнє - наявності адекватних тваринних моделей, які б максимально точно відтворили картину патофізіологічного процесу.

Для моделювання ХП було розроблено численні тваринні моделі, які відтворюють багато аспектів ідіопатичного захворювання, включаючи нейрозапалення [99]. Серед тваринних моделей ХП розрізняють моделі генетичні (нокаутні та трансгенні), нейротоксичні (системне введення нейротоксинів) та стереотаксичні (стереотаксичне введення ротенону, параквату, 6-ОНДА, MPP+, MPTP, метамфетаміну, дегуеліну тощо). Для моделювання хвороби Паркінсона *in vitro* використовуються культури нейронів, астроцитів і клітин мікроглії, що становлять функціональну мережу в цитоархітектоніці головного мозку, контактують один з одним за допомогою нейронгліальних взаємодій і підтримують гомеостаз головного мозку. Кожна з моделей захворювання має свої переваги і недоліки.

Нещодавно було виявлено, що сільськогосподарські хімікати, такі як ротенон, при системному введенні можуть відтворювати специфічні особливості ХП у гризунів, за рахунок розвитку окисного стресу. Ротенон – це флавоноїд, що пригнічує перенесення електронів з Fe/S-центрів НАДН-дегідрогенази на убіхінон, чим перешкоджає виробленню АТФ внаслідок окисного фосфорилування. Під його впливом ДА-нейрони гинуть через виникнення дефіциту енергетичного метаболізму [100, 101]. Більшість ротенонових моделей *in vivo* передбачають тривале системне введення цього нейротоксину щурам [100]. Розвиток ХП у ротеноновій моделі досягається шляхом підшкірного введення щурам розчину ротенону у диметилсульфоксиді з додаванням мінеральних олій. Основні недоліки

такого підходу – недостатня селективність ураження структур головного мозку [102] та токсичність ротенону, щодо серцево-судинної системи [101]. За таких умов важко отримати групу дослідних тварин з однотипними ураженнями головного мозку.

Резерпінова модель була однією з перших моделей для дослідження патофізіології та демонстрації терапевтичної ефективності L-DOPA, яка залишається золотим стандартом лікування ХП [103]. Резерпін є специфічним інгібітором везикулярного переносника моноамінів (VMAT2), який викликає втрату здатності до накопичення та виснаження ДА та норадреналіну у головному мозку [104]. Введення резерпіну гризунам було запропоновано як фармакологічну модель ХП на підставі впливу цієї речовини, що виснажує запаси моноамінів, на рухову активність. Крім того, ці рухові ознаки супроводжувалися підвищеним рівнем перекисного окиснення ліпідів смугастого тіла [105]. Однак, у 80-х минулого століття роках цей токсин став менше використовуватися через те, що відсутність селективності щодо дофаміну, як і у випадку ротенонової моделі, також вважалася основним недоліком.

Пошкодження ДН середнього мозку, спричинене системними ін'єкціями МФТП, є найбільш часто використовуваною моделлю ХП у мишей. Модель МФТП дуже цінна, як модель індукованого нейротоксином окисного та мітохондріального пошкодження та особливо приваблива тим, що дозволяє уникнути використання більш спеціалізованої і складної у виконанні стереотаксичної хірургії. Однак, модель МФТП менш корисна для функціональних досліджень, оскільки поведінкові порушення у цій моделі досить малопомітні і вимагають інтенсивного режиму уведення препарату [106]. Двобічний дефіцит ДА та відхилення від загальної поведінки, пов'язані з хворобою, що спостерігаються у мишей, які отримували МФТП, також важко піддаються кількісній оцінці.

Досвід, отриманий у дослідженнях на щурах, показує, що глибокі та стабільні рухові порушення, подібні до таких, властивих клінічній картині ХП, легше отримати і кількісно оцінити у тварин з однобічними ураженнями, викликаними однобічними ін'єкціями 6-гідроксидофаміну (6-OHDA) у медіальний пучок переднього мозку (MF ) або у смугасте тіло. Ця модель зазвичай використовується для вивчення патофізіології захворювання та перевірки нейропротекторного потенціалу фармацевтичних сполук [107]. Модель однобічного ураження 6-OHDA з моменту появи 40 років тому (Ungerstedt, 1968) залишається найбільш широко використовуваною у щурів. Її застосування у мишей виявилось більш проблематичним, принаймні, частково через менший розмір мозку миші, що ускладнює досягнення відтворюваного стереотаксичного проведення ін'єкцій токсину. Однак, навіть незалежно від місця ін'єкції, ураження 6-OHDA у мишей дуже варіабельні, і на будь-якому етапі операції можна очікувати, що лише частина тварин, яким провели ін'єкцію, буде добре уражена. Наразі це було серйозним обмеженням для корисності цієї моделі ХП на мишах. У мозку 6-OHDA відповідає за виникнення дегенерації дофамінергічних та недофамінергічних нейронів [108]. Ці нейрони високо чутливі до 6-OHDA, оскільки їх мембранні транспортери - дофаміновий і норадренергічний - мають високу спорідненість до цієї молекули [109]. Потрапляючи в нейрон 6-OHDA накопичується в цитозолі, надалі окиснюючись, викликає утворення реактивних форм кисню. Відповідно, відбувається розвиток цитотоксичності, пов'язаної з оксидативним стресом [110]. При введенні нейротоксину в чорну субстанцію дегенерація ДН проявляється через 12 год [111]. При введенні токсину в медіальний пучок переднього мозку викликається дегенерація смугастого тіла перед загибеллю дофамінергічних клітин [112]. Унікальною рисою цієї моделі є можливість кількісного обліку рівня загибелі ДН шляхом аналізу ротаційної активності в апоморфіновому та амфетаміновому тестах [113]. Для цього проводиться унілатеральне введення 6-OHDA в одну

гемісферу без пошкодження другої для її використання в якості внутрішнього контролю. Для виклику асиметричних рухів тварини по колу виконується введення у цю неушкоджену гемісферу агоністів дофамінергічних рецепторів (прикладом є апоморфін), L-3,4-дигідроксифенілаланіну (L-допа, прекурсор дофаміну) або речовин, що викликають вивільнення дофаміну (таких, як амфетамін) [113]. Ступінь руйнування дофамінергічних нейронів корелює з кількістю ротаційних рухів тварини [114]. Нейрозапалення та елементи системного запалення також, згідно літературних даних, частково відтворюються у цій моделі. Однак, як і у випадку багатьох інших нейротоксичних моделей паркінсонізму, гострим нейродегенеративним властивостям моделі 6-OHDA бракує прогресивних, залежних від віку ефектів ХП. Також у цій моделі не виявляються тільки Леві [108].

Ендотоксин, ліпополісахарид (ЛПС), компонент клітинної стінки грамнегативних бактерій, є сильним індуктором запалення. ЛПС-індукована модель використовується для вивчення запальних процесів у патогенезі ХП та для розробки протизапальних засобів лікування захворювання [115]. Відсутність прямого впливу ЛПС на нейрони робить його чудовим інструментом для вивчення дофамінергічної нейродегенерації, опосередкованої запаленням. Ряд дослідників вважають, що ЛПС, як потужний стимулятор мікроглії, може бути використаний для того, щоб призвести до повільної, прогресивної та селективної дегенерації нігростріальних ДН у гризунів, що має схожі риси з нейродегенерацією при перебігу патології у людей [116]. ЛПС не має прямого впливу на нейрони через відсутність у них функціональної експресії Toll-подібного рецептора 4 (TLR4), який є необхідним для активації гліальних клітин, особливо мікроглії до вивільнення широкого спектра запальних та нейротоксичних факторів (оксид азоту (NO), активні форми кисню (ROS), ІЛ-1 $\beta$ , ІЛ-6 та ФНП- $\alpha$ , а також циклооксигенази-2 (COX-2)) [117]. Також підтверджено активацію мікроглії та вивільнення ФНП- $\alpha$  та ІЛ-1 $\beta$  у чорній субстанції у мишей після хронічного інтраназального впливу

ендотоксину [118]. Було доведено зниження моторної активності, рівня нейротрансмітерів та експресії тирозингідроксилази у мишей під впливом ЛПС [119].

Таким чином, згідно думки експертів, жодна з існуючих моделей ХП не відображує в повній мірі одночасно клінічну картину та патофізіологічні аспекти захворювання. То ж різні моделі доцільно використовувати для дослідження різних аспектів цього мультифакторного захворювання, одним з яких є запалення. Зважаючи на це, і враховуючи виключну роль запалення у патогенезі ХП, поглиблене вивчення ключових ефекторів запального процесу фагоцитів створює підґрунтя для розшифрування клітинних механізмів імунопатогенетичної компоненти патофізіології ХП, та завдяки цьому робить можливою розробку нових методів її лікування.

### **1.3. Метаболічна поляризація фагоцитів у структурі запального процесу**

Професійні фагоцити – комплексна популяція клітин вродженої імунної системи, яка включає клітини мієлоїдного походження: мононуклеарні (моноцити, макрофаги, дендритні клітини) та поліморфноядерні (нейтрофіли). За локалізацією розрізняють тканинні резидентні клітини і циркулюючі у периферичній крові. Основними резидентними фагоцитами тканин є макрофаги. МФ виявляються у всіх тканинах організму, де вони виступають вартовими, виконуючи функцію підтримки тканинного гомеостазу та першої лінії протиінфекційного захисту. Згідно сучасних уявлень, більшість резидентних тканинних макрофагів походять з попередників у жовтковому мішку і оселяються у тканинах під час онтогенезу. Ці клітини здатні до самооновлення і їх кількість у тканинах підтримується за рахунок

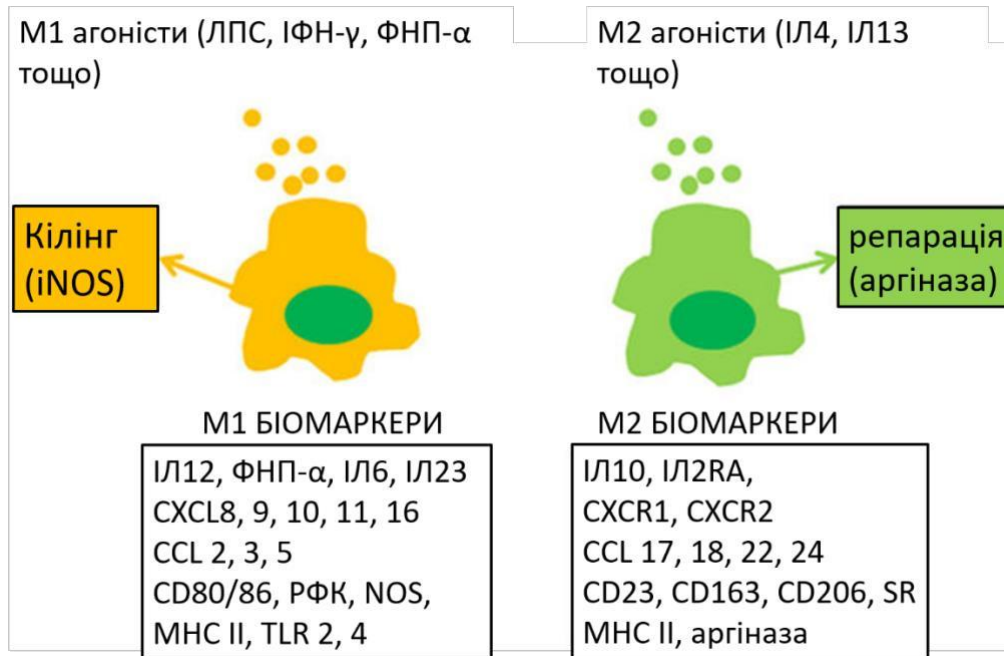
проліферації саме жовтквомішкових клітин. У нормі лише незначна частина резидентних тканинних макрофагів походять з моноцитів периферичної крові [120]. Макрофаги моноцитарного походження диференціюють з гемопоетичних стовбурових клітин вже після народження. Згодом премоноцитарні клітини диференціюють на моноцити, які потрапляють у різні тканини з кровотоку, де, у свою чергу, диференціюють на резидентні клітини під впливом тканинного мікрооточення (подібно до того, як це відбувається з макрофагами, що походять із жовткового мішка) для набуття здатності виконувати специфічну для кожної тканини функцію [121]. Наприклад, у печінці МФ, які називаються клітинами Купфера, відповідають за видалення токсинів та патогенів, які потрапили в організм гематогенним шляхом. У легенях альвеолярні МФ знищують мікроорганізми, алергени та мікрочастинки, що потрапляють в організм з повітря. Клітини Лангерганса та шкірні МФ відповідають за підтримку гомеостазу шкіри і видалення інвазивних патогенів, які потрапляють у цю локацію. Селезінкові МФ та МФ лімфовузлів відіграють важливу роль у функціонуванні цих вторинних лімфоїдних органів у процесі ініціювання адаптивної імунної відповіді. Крім того, селезінкові МФ утилізують відпрацьовані еритроцити. У головному мозку МФ представлені мікрогліальними клітинами, які забезпечують першу лінію захисту ЦНС від патогенів та модулюють проліферацію, морфологічну трансформацію, рухливість, міграцію, внутрішньоклітинну комунікацію нейронів, а також здійснюють фагоцитоз загиблих клітин [122].

У випадку розвитку патологічного процесу (злоякісної трансформації, травми з не програмованою загибеллю клітин, інфекції тощо) у тканині розвивається запалення, спрямоване на усунення причини, що його викликала, і відновлення тканинного гомеостазу. Резидентні тканинні макрофаги є одним з основних джерел синтезу хемокінів, які потрапляють у кров і залучують циркулюючі фагоцити у ділянку патологічного запального процесу. Рекрутинг циркулюючих клітин у

запалену тканину спричиняє збільшення у ній частки макрофагів моноцитарного походження. І, якщо макрофаги, що походять із жовткового мішка – це клітини, основною функцією яких є підтримка тканинного гомеостазу, то макрофаги моноцитарного походження, які з'являються у тканині у випадку її стресу, спеціалізуються на ініціюванні і підтримці запалення [123]. Все більше даних свідчить про те, що поляризовані МФ відіграють ключову роль у прогресуванні запальних захворювань, у т.ч. нейродегенеративних хвороб, а регуляція поляризації може забезпечити новий підхід до терапевтичного лікування цих захворювань [124].

МФ є дуже пластичними клітинами, здатними змінювати метаболізм залежно від впливу різних чинників їх мікрооточення. Подібно до Т-лімфоцитів, МФ здатні утворювати численні активаційні стани (підтипи), які відрізняються за експресією поверхневих маркерів і рецепторів, експресією хемокінів, цитокінів, ферментів, коstimуляторних молекул та, як наслідок, за функціями [125]. Згідно спрощеної моделі поляризованої активації МФ можуть поляризуватися до двох протилежних активаційних станів: M1 (прозапального класичного) і M2 (протизапального, альтернативного) (рис.1.1). M1-МФ утворюються за дії прозапальних стимулів, таких як мікробні молекулярні патерні або прозапальні цитокіни. M2-МФ утворюються за дії протизапальних цитокінів або у відповідь на розпізнавання апоптичних клітин тканини [126]. Поляризовані M1 клітини продукують прозапальні цитокіни і медіатори, що викликають запалення, у той час як M2-МФ чинять протизапальну дію. M1 функціональна поляризація характеризується посиленням синтезу прозапальних цитокінів, реактивних форм кисню та азоту, набуттям МФ властивостей антигенпрезентувальних клітин з посиленою експресією коstimуляторних молекул CD80/86. Надекспресія CD80/86 вважається одним з основних фенотипових маркерів M1-МФ. Одним з визнаних метаболічних маркерів M1-МФ є посилення експресії індукцйбельної синтази оксиду азоту

(iNOS). Серед M2 МФ розрізняють кілька підтипів - M2a, M2b, M2c та M2d, які характеризуються посиленням експресії іншого фермента метаболізму аргініну - аргінази.



**Рис.1.1.** M1/M2 поляризація макрофагів. ЛПС – ліпополісахарид, ІЛ – інтерлейкін, ФНП – фактор некрозу пухлин, ІФН – інтерферон, CXCR1 - α-рецептор інтерлейкіна 8, CXCR2 - β-рецептор інтерлейкіна 8, CCL 17, 18, 22, 24 – протизапальні хемокіни, CCL2, 3, 5 – прозапальні хемокіни, РФК – реактивні форми кисню, NOS – NO-синтаза, TLR – толл-подібний рецептор (адаптовано з [125]).

Для M2a-МФ характерною є посилена продукція ІЛ-4 та ІЛ-13, профібротичних факторів (ТФР-β, інсуліноподібний фактор росту), а також надекспресія рецептора манози CD206. МФ цього підтипу – активні учасники процесів завершення (резолуції) запалення, загоєння ран і формування фіброзів [127]. Особливістю M2b-МФ є синтез прозапальних цитокінів (ІЛ-1β, ІЛ-6 та ФНП-α) з одночасним посиленням синтезом протизапального цитокіну ІЛ-10. МФ цього

підтипу сприяють пухлинному росту і розвитку бактеріальних, грибних і паразитарних інфекцій, ініціюючи резолюцію запалення [128]. М2с-МФ також характеризуються посиленою продукцією ІЛ-10. Ці клітини також вирізняються посиленням експресії рецептора очищення (скавенджер-рецептора), який розпізнає гаптоглобін-гемоглобінові комплекси, CD163, і який вважається одним з фенотипових маркерів М2-МФ в цілому. М2с-клітинам властива посилена фагоцитарна функція, оскільки вона є активними учасниками процесів ефероцитозу (фагоцитозу апоптичних клітин) [129]. М2d-МФ беруть участь у процесах ангиогенезу, продукуючи ІЛ-10, ТФР- $\beta$  та фактор росту ендотелію судин (VEGF). Клітини цього типу складають основну частку популяції пухлино-асоційованих макрофагів і володіють яскраво вираженими протизапальними властивостями [130]. У ході процесу запалення МФ здатні змінювати активаційний профіль з про-на протизапальний і навпаки. У зв'язку з цим у літературі присутні дані щодо існування так званих проміжних або перехідних активаційних профілів МФ: М3, М4, М5 та М6. Однак, метаболічні і фенотипові маркери цих перехідних станів поляризованої активації МФ поки що не ідентифіковані [125].

Неконтрольована поляризована активація фагоцитів є важливим компонентом патофізіології великої кількості захворювань. Зокрема, надмірна М2 поляризація фагоцитів (як циркулюючих, так і тканинних) залучена у розвиток алергічних захворювань, низки автоімунних патологічних станів, а також супроводжує прогресування пухлинного процесу з розвитком метастазів. Надмірна М1 поляризація фагоцитів різної локалізації є важливим компонентом патофізіології запальних захворювань, до числа яких входять нейродегенеративні хвороби [131, 132]. Оцінка кількісних, метаболічних та фенотипових характеристик МФ та інших фагоцитів широко застосовується для діагностики та прогнозування перебігу запалення [133, 134]. Загально визнаним є той факт, що саме МФ сприяють відновленню балансу прозапальних реакцій до реакцій, що сприяють резолюції

запалення. Пошук терапевтичних засобів для регуляції пластичності фагоцитів є актуальним науковим напрямком у контексті розробки методів лікування запальних захворювань [135].

Як правило, для характеристики поляризованої активації фагоцитів досліджують кілька основних метаболічних показників та фенотипових маркерів: фагоцитарну активність і експресію рецепторів фагоцитозу (CD14, CD206, CD163), оксидативний метаболізм, експресію маркерів антигенпрезентувальної функції CD80/86 тощо.

МФ та інші фагоцити зв'язують патогени, апоптичні клітини та деякі інші корпускулярні антигени через фагоцитарні рецептори, що ініціює перебудову цитоскелету та утворення фагосоми [136, 137]. Інтерналізація (поглинання) патогену викликає дозрівання фагосоми, її злиття з лізосомою з утворенням фаголізосоми (у поліморфноядерних фагоцитів фагосома зливається з цитоплазматичними гранулами), де патоген знищується за допомогою кисне залежних та кисненезалежних механізмів. До них відносяться утворення реактивних сполук кисню та азоту, а також синтез антимікробних пептидів відповідно. Під дією гідролаз, мертві рештки мікробних клітин перетравлюються, а мікробні пептиди транспортуються до молекул головного комплексу гістосумісності (МНС) класу II у везикулах. Пептиди зв'язуються з молекулою МНС, і комплекси транспортуються на поверхню клітини, де комплекс пептид/МНСII зв'язується зі специфічним Т-клітинним рецептором. Цей процес – антигенпрезентація - призводить до специфічної активації Т-клітинної імунної відповіді і є зв'язуючою ланкою між вродженою та адаптивною імунними системами. Одночасно з презентацією антигену антигенпрезентувальні клітини секретують медіатори запалення, у тому числі цитокіни, які надалі індукують і стимулюють адаптивну імунну відповідь [138]. Велика увага приділяється також механізму опсонофагоцитозу, що опосередковується зв'язуванням Fc-рецепторів

фагоцитів з корпускулярними антигенами, опсонізованими антитілами, або зв'язуванням рецепторів комплементу з опсонінами каскаду комплементу (C3b, C3d, iC3b тощо).

Існуюча на сьогоднішній день концепція поляризованої активації фагоцитів коректно описує функціональну поляризацію практично всіх резидентних тканинних фагоцитів і циркулюючих моноцитів і нейтрофілів. Однак, є фагоцити, поляризована активація яких не зовсім вкладається у цю парадигму. Прикладом таких фагоцитів є мікроглія – резидентні макрофаги мозку. Мікроглія - найбільш поширені резидентні імуніцити в ЦНС, де вони тісно взаємодіють з астроцитами та нейронами як фізично, так і функціонально та беруть участь у тканинному гомеостазі та імунному захисті [138, 140]. Резидентні клітини мікроглії походять з жовткового мішка та відрізняються від резидентних макрофагів у периферичних тканинах своїми унікальними фенотиповими та метаболічними особливостями. Зокрема, посилення фагоцитарної активності, яке для поза мозкових резидентних тканинних фагоцитів розглядається як маркер протизапального метаболічного зсуву, у випадку мікроглії означає її перехід в активований стан як про-, так і протизапальної спрямованості. Клітини мікроглії мають здатність до самооновлення підтримуючи постійну щільність клітин у здоровому мозку дорослої людини [71, 72]. Передбачається, що за фізіологічних умов ці резидентні сторожові клітини злегка зміщені у бік протизапального (M2) фенотипу, що важливо для гомеостазу головного мозку [73, 74]. При патологічних станах, таких як нейродегенерація, поляризована активація мікроглії (прозапальна M1 vs протизапальна M2) може ініціювати розвиток або резолуцію нейрозапалення, посилюючи або полегшуючи перебіг захворювання [71, 75]. Слід відзначити, що прозапальна активація мікроглії в цих умовах може бути як тригером загибелі нейронів, так і наслідком нейродегенерації. З одного боку, численні зовнішні подразники, у т.ч. периферичні медіатори запалення, можуть запускати

прозапальну активацію мікроглії, що передує нейродегенерації [76]. З іншого боку, дегенерація нейронів, що супроводжується вивільненням молекулярних патернів, пов'язаних з ушкодженням, може спричинити прозапальний зсув мікроглії [77]. Нейрозапалення завжди пов'язане з порушенням ГЕБ з подальшим рекрутуванням циркулюючих моноцитів у ЦНС, де ці клітини диференціюють на МФ. МФ моноцитарного походження у складній популяції мікроглії/макрофагів є додатковим важливим клітинним компонентом в опосередкуванні нейрозапалення. Метаболічний профіль цієї складної популяції фагоцитів визначає перебіг хронічних запальних захворювань ЦНС, таких як нейродегенеративні розлади, і розглядається як терапевтична мішень для лікування цих хвороб [78-80].

Підсумовуючи аналіз літературних даних щодо поляризованої активації фагоцитів у процесі запалення і розвитку запальних захворювань слід зазначити наступне. По-перше, цей науковий напрямок лише розвивається і характеристика функціонального стану резидентних тканинних фагоцитів у процесах локального запалення все ще носить суперечливий характер через відсутність достатньої стандартизації таких досліджень. Особливо це стосується фагоцитів мозку. По-друге, дослідження поляризованої активації фагоцитів у процесі системного запалення практично не досліджена. Найчастіше у літературі зустрічається оцінка кількісних показників фагоцитів та їх співвідношень з іншими популяціями лейкоцитів та клітин крові в цілому. У той час як функціональний стан фагоцитів периферичної крові у ході системного запального процесу значно менше досліджений. Крім того, практично відсутня інформація щодо залучення фагоцитів різної локалізації, окрім циркулюючих клітин, у процес системного запалення. Бракує також інтегральної оцінки поляризованої активації фагоцитів різної локалізації в умовах розвитку системних запальних захворювань (у т.ч. нейродегенеративної патології), необхідної для глибокого розуміння імунопатогенезу цих хвороб.

# ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

## РОЗДІЛ 2.

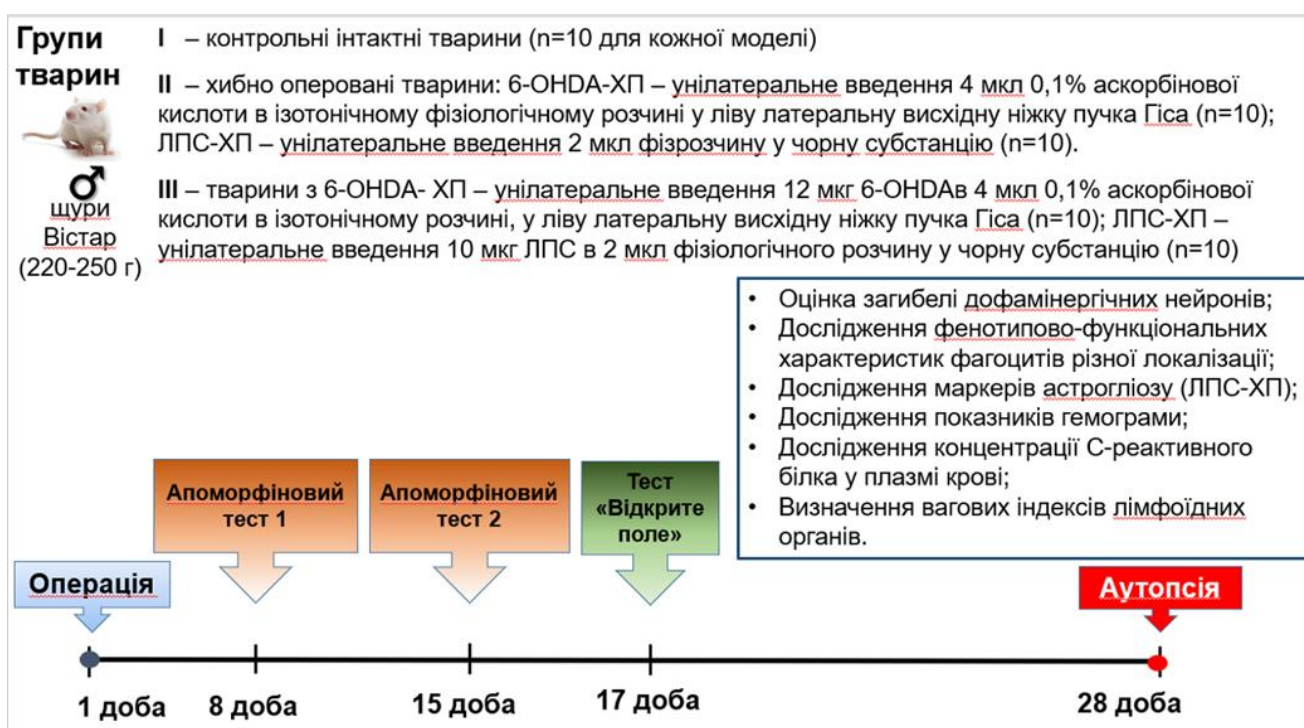
### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 2.1. Дослідні тварини

Експерименти проводилися на статевозрілих щурах-самцях лінії Вістар (220-250 г) розведення віварію ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка та розведення віварію ДУ «Інститут екогігієни і токсикології ім. Л. І. Медведя НАМНУ». Тварин утримували у стандартних умовах віварію із вільним доступом до води та корму (стандартний раціон). Протоколи досліджень з тваринами були схвалені Комітетом з біоетики ННЦ «Інститут біології та медицини» відповідно до керівних принципів Закону про захист тварин (Протокол № 4 від 03.07.2023р.). Усі процедури з тваринами проводилися відповідно до принципів гуманності, згідно із «Загальними принципами проведення експериментів на тваринах», затвердженими Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001–2007 рр.) та відповідно до положень «Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, Франція, 1986).

## 2.2. Схема дослідження

Оцінку метаболічного профілю фагоцитів різної локалізації (мікрогліальні клітини, моноцити і гранулоцити (нейтрофіли) периферичної крові, макрофаги перитонеальної порожнини) у тварин з 6-OHDA-індукованою ХП та ЛПС-індукованою ХП проводили на момент завершення експерименту (28 доба після індукування хвороби) (рис.2.1).



**Рис.2.1.** Схема дослідження метаболічного профілю фагоцитів у щурів з різними моделями хвороби Паркінсона.

Для характеристики метаболічного профілю фагоцитів досліджували їх фагоцитарну активність (п. 2.11), оксидативний метаболізм (пп. 2.12 і 2.13), а також експресію фенотипових маркерів поляризованої активації CD80/86 та CD206 (п. 2.14). Як додатковий критерій залучення фагоцитів мікроглії у нейрозапалення у тварин ЛПС-індукованою ХП аналізували маркери розвитку астрогліозу (п. 2.8 і

2.9). Для оцінки залучення фагоцитів у системний запальний процес аналізували показники гемограми та інтегральні індекси системного запалення, засновані на кількісних характеристиках лейкоцитів периферичної крові (п. 2.15). Як класичний маркер системного запалення використовували рівень С-реактивного білка у плазмі крові (п. 2.16). Як контроль використовували відповідні показники хибнооперованих та інтактних тварин.

### **2.3. 6-ОНДА-індукована модель хвороби Паркінсона**

У цьому експерименті було використано 30 щурів (рис.2.1). Перед початком експерименту тварин рандомізували за вагою і розділяли на три групи по 10 тварин у кожній: I – інтактні тварини, II – хибно оперовані (ХО) тварини, III – тварини з 6-ОНДА-індукованою ХП (6-ОНДА-ХП). У день операції (ініціювання захворювання) щурам груп II та III проводили анестезію сумішшю кетаміну (Sigma, США) - 75 мг/кг і 2% ксилазину (Alfasan International B.V., Нідерланди) – 400 мкл/кг у стерильному фізіологічному розчині внутрішньочеревно і поміщали у стереотаксичний апарат (СЄЖ-4, Україна). Після наркотизації тваринам робили трепанаційний отвір за наступними координатами (мм) від брегми: AP = -2,2; ML = 1,5; DV = 8,8 [141]. Потім тваринам вводили внутрішньочеревно паргілін у дозі 40 мг/кг (Sigma, США), котрий інгібує метаболічну конверсію 6-ОНДА під дією моноаміноксидази, та дезіпрамін у дозі 25 мг/кг (Sigma, США), що блокує захоплення нейротоксину норадренергічними нейронами [142]. 6-ОНДА-ХП моделювали шляхом унілатерального (однобічного) уведення 12 мкг 6-ОНДА (Sigma, США), розчиненого в 4 мкл 0,1% аскорбінової кислоти в ізотонічному фізіологічному розчині на відстані 8,8 мм вглиб від брегми. Нейротоксин вводили у тканину мозку зі швидкістю 1 мкл/хв (кожні 15 с). Інжектор залишали у місці

введення впродовж 5 хвилин, а потім повільно витягували, щоб забезпечити дифузію токсину у тканину та запобігти його рефлюксу. Хибно оперованим щурам вводили розчинник (0,1% аскорбату в 0,9% хлориді натрію) у тих самих координатах. Розвиток хвороби констатували на основі результатів імуногістохімічної оцінки рівня загибелі ДН, результатів апоморфінового тесту та поведінкового тесту «Відкрите поле».

#### **2.4. ЛПС-індукована модель хвороби Паркінсона**

У цьому експерименті було використано 30 щурів (рис.2.1). Перед початком експерименту тварин рандомізували за вагою і розділяли на три групи по 10 тварин у кожній: I – інтактні тварини, II – хибно оперовані (ХО) тварини, III – тварини з ЛПС-індукованою ХП (ЛПС -ХП). Хронічний унілатеральний (лівобічний) дефіцит дофаміну моделювали шляхом руйнування дофамінергічних нейронів компактною частини чорної субстанції, яке викликали шляхом стереотаксичних мікроін'єкцій 10 мкг ліпополісахариду (Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O111:B4, cat. L2630 Sigma), розчиненого у 2 мкл стерильного 0,9 % NaCl (ЗАТ «Інфузія», Україна). Розчин готували в день операції для всіх тварин. Ємність з отриманим розчином герметизували краплею силіконової олії (ТОВ «СТЕП-ЕЛЕКТРОНІКА», Україна) і утримували за температури 4°C до моменту введення. ЛПС вводили за наступними координатами: AP = -5,3; ML = ± 2,0; DV = -7,2 [143]. Процедури наркотизації, введення ендотоксину та оцінку розвитку хвороби були аналогічними до таких для 6-OHDA-ХП (див. розділ «Матеріали і методи», п.2.3)

## **2.5. Апоморфіновий тест**

Введення апоморфіну викликає аномальні контралатеральні обертання у щурів з моделлю геміпаркінсонізму [144]. Тест використовували для оцінки ступеня пошкодження ДН. Тест проводили на 8 та 18 добу з моменту індукування захворювання. Для індукції обертальної активності тварин їм вводили агоніст ДН апоморфін (Sigma, США) в/ч у дозі 0,5 мг/кг. Через п'ять хвилин після ін'єкції тварину поміщали у циліндр діаметром 40 см, обертання у бік, контралатеральний відносно півкулі, в яку вводили токсини, реєстрували впродовж 30 хв. Ступінь ураженні ДН оцінювали за швидкістю обертання згідно Talanov et al., 2006 [142]. Швидкість обертання  $>6$  об/хв характеризує втрату 90-100% ДН, швидкість обертання  $<6$  об/хв - втрату  $\leq 70\%$  ДН.

## **2.6. Імуногістохімічний аналіз дофамінергічних нейронів**

Для імуногістохімічного дослідження мозкової тканини проводили перфузійну фіксацію мозку (whole body perfusion) під тіопенталовим наркозом (50 мг/кг в/ч). Для цього спочатку проводили транскардіальну перфузію гепаринізованим фізіологічним розчином (8 од гепарину/мл 0,9% розчину NaCl), об'ємом близько 70-100 мл. Потім проводили перфузію 4% параформальдегідом на фізіологічному розчині (120-150 мл/щуро вагою 200-250 г). Після перфузії обережно видаляли мозок та фіксували його у 4% нейтральному формаліні (на фосфатному буфері, PBS). Фіксовані фронтальні тканини зневоднювали і заключали у парапласт (Leica Surgipath Paraplast Regular). Протокол дегідратації: етанол (з 70%

до 100%-розчину), діоксан, ксилол, ксилол/парапласт (1:1; 37°C), парапласт (56°C). Зрізи товщиною 5 мкм виготовляли на мікротомі Thermo Microm HM 360, далі депарафінували, регідратували за стандартною методикою [145] та використовували для імуногістохімічного виявлення ТГ із застосуванням пероксидазного методу [146]. Активність ендогенної пероксидази блокували блокуючим розчином (Dako, EnVision Flex, DM821) та інкубували зрізи з анти-ТГ антитілами у розведенні 1:200 (Millipore, AB152) впродовж ночі (+4°C). Неспецифічне зв'язування первинних антитіл блокували за допомогою 4% сухого молока у трис-буферному сольовому розчині (PBSt) з 0,2% Triton X-100. Потім зрізи промивали та інкубували з вторинними антитілами (1:200, біотинільовані мишачі анти-кролячі sc-2357, Santa Cruz Biotechnology) впродовж 30 хв. Після цього зрізи інкубували з розчином комплексу авідин-біотин, далі - з діамінобензидином (Dako, EnVision) і оцінювали з використанням мікроскопа Primo Star, Zeiss. Кожен зразок оцінювали напівкількісно за інтенсивністю імунного фарбування та часткою позитивних клітин (табл.2.1).

Дані представлені у вигляді кількості балів Q, розрахованих за формулою:  $Q = P \times I$ , де P - частка позитивних клітин (%), I - інтенсивність забарвлення [147].

Таблиця 2.1.

Напівкількісна шкала для оцінки ТГ-позитивних клітин

Кількість балів	0	1	2	3	4
Кількість ТГ-позитивних клітин, %	<10	10-25	25-50	50-75	>75
Кількість балів	1	2	3		

Інтенсивність забарвлення	неоднорідне слабке	помірне гомогенне	гомогенне виразне		
---------------------------	--------------------	-------------------	-------------------	--	--

## 2.7. Поведінковий тест «відкрите поле»

Тест використовували для оцінки моторної активності щурів та рівень їх дослідницької активності в умовах незнайомого середовища, а також оцінити наявність та рівень страху, порушення або збільшення орієнтовної реакції тварини [148]. Оцінка поведінки проводиться за такими основними параметрами: дистанція пройдена у зовнішньому та внутрішньому периметрі, час проведений у внутрішньому периметрі, кількість підйомів тварини на задні лапи, кількість актів грумінгу, кількість дефекацій. Експериментальна установка являє собою квадратне поле зі сторонами 100 см і висотою стінок 30 см. Установка освітлюється двома світлодіодними лампами, кожна по 60 Вт, які розташовані на висоті 2 м. Дослід записується на IP камеру, після чого проводиться оцінка параметрів за допомогою MATLAB. Статистичні підрахунки проводили за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism. Значення  $p < 0,05$  було прийнято як статистично достовірне. Оцінка проводилася методами One-way ANOVA (Tukey test або Dunnett test) та Unpaired t-test або Mann-Whitney.

## 2.8. Імуногістохімічний аналіз гліального фібрилярного кислого протеїну

Гістологічні зрізи для цих досліджень виготовляли, як описано у п.2.6. Для детекції маркера астрогліозу - гліального фібрилярного кислого протеїну (GFAP) - зрізи промивали 3-4 рази розчином PBSt та інкубували впродовж 60 хв за кімнатної

температури зі специфічними антитілами, кон'югованими з FITC, у розведенні 1:500 в PBSt. Промиті зрізи дофарбовували для візуалізації клітинного ядра флуоресцентним барвником Hoechst-33342. За допомогою мікроскопа Carl Zeiss LSM 510 Мета (Carl Zeiss, Німеччина) були оцінені результати імунофлюоресценції та надалі оброблені за допомогою програмного забезпечення ImageJ.

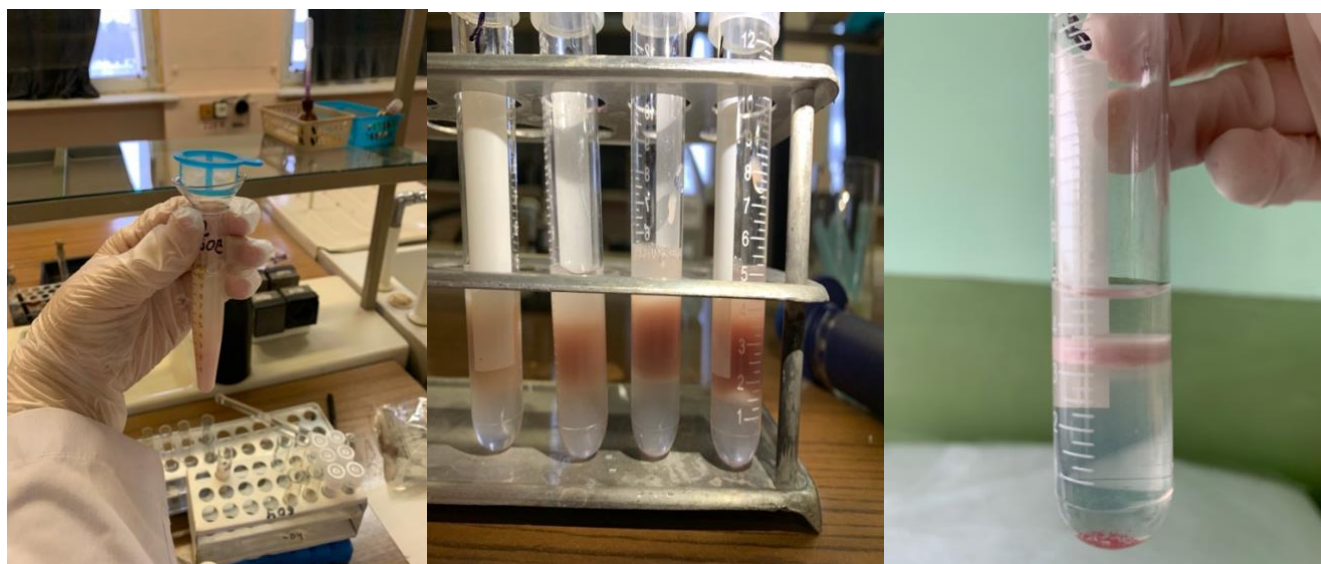
## **2.9. Дослідження протеїнів-маркерів астрогліозу методом вестерн-блот**

Вміст протеїнів-маркерів астрогліозу (GFAP) та основного мієлінового білку (MBP) як маркера демієлінізації нервових волокон визначали у зразках методом Вестерн-блоту. Для проведення дослідження мозок заморожували в рідкому азоті відразу після розтину. Зразки (0,5-1 г) швидко гомогенізували в 10% додецилсульфаті натрію (SDS) у концентрації 50 мг вологої тканини/мл SDS, заморожували в рідкому азоті та зберігали при  $-20^{\circ}\text{C}$  до проведення електрофорезу. Дослідження проводили шляхом електрофоретичного розділення протеїнів з наступним імуноблот аналізом зразків гомогенатів мозку щурів згідно стандартних методів молекулярної біології [149]. Для проведення електрофоретичного розділення протеїнів зразки вирівнювали за концентрацією протеїну та прогрівали при  $95^{\circ}\text{C}$  протягом 5 хв у буфері Леммлі для зразків. Електрофорез проводили в Трис-гліциновому буфері рН 8,3 використовуючи камеру для електрофорезу Mini-PROTEAN II (BIO-RAD, Швеція). Електрофорез протеїнів проводили у 12 % поліакриламідному гелі (ПААГ), за присутності додецилсульфату натрію (ДСН) у буферній системі Леммлі для подальшого імуноблот-аналізу. Для визначення молекулярної маси протеїнів на електрофореграмах використовували протеїнові стандарти виробництва Thermo Scientific (США) із діапазоном молекулярних мас 10-250 кДа. Блотинг протеїнів із поліакриламідного гелю (ПААГ) на

нітроцелюлозну мембрану (Amersham Bioscience) проводили в апараті Mini Trans-Blot Cell (BIO-RAD, Швеція) у буфері для переносу, що містить: 25 ммоль/л Трис-НСІ, рН 8,3, 20 % метанол, 192 ммоль/л гліцин, 0,1 % ДСН. По закінченню мембрани промивали дистильованою водою та фарбували 1 % розчином барвника Ponceau S, приготованого на 3 % трихлороцтвоїй кислоті 5-10 хв. Надалі вільні центри зв'язування на мембрані блокували протягом 1 год 5 % сухим знежиреним молоком (Genesee Scientific Inc., США) у tPBS. Мембрани інкубували почергово із цільовими первинними антитілами у буфері для блокування протягом ночі при 4°C з наступним промиванням PBS. Як вторинні антитіла використовували анти-видові антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому. Для візуалізації активності пероксидази проводили кольорову реакцію з використанням 3-діамінобензидинтетрахлориду (DAB) (Dako Cytomation, Данія) та/або імунореактивні зони виявляли за допомогою реакції хемілюмінесценції. Для цього використовували розчин, що містить 1,25 ммоль/л люмінолу (Sigma, США), 2,72 ммоль/л кумарової кислоти (Sigma, США) та 0,01 % розчин гідроген пероксиду в 0,1 М Трис-НСІ (рН 8,5). Час експозиції оброблених мембран на рентгенівській плівці залежав від інтенсивності хемілюмінесценції. Для проявлення плівки використовували реактиви Carestream Kodak, (Sigma-Aldrich, США). Денситометричний аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення TotalLab TL120 (Nonlinear Inc, США), вміст протеїнів представлено в умовних одиницях (ум. од.). Для визначення концентрації білка в зразках використовували комерційний набір Modified Lowry Protein Assay Kit (Thermo Scientific, США) згідно з інструкцією виробника [150].

## 2.10. Виділення фагоцитів різної локалізації

**Виділення клітин мікроглії/макрофагів.** Для дослідження мікроглії виділяли головний мозок та швидко переносили його у чашку Петрі з PBS на льоду. Виділену тканину дисоціювали в охолоджену PBS з додаванням 0,2% глюкози протягом 15 хвилин за кімнатної температури з використанням гомогенізатора Поттера. Гомогенат тканини фільтрували через клітинне сито з діаметром пор 40 нм (BD Biosciences Discovery, США) для додаткового подрібнення тканини і видалення конгломератів, потім переносили у пробірку на 15 мл та центрифугували при 350 g упродовж 10 хвилин за кімнатної температури. На наступному етапі клітинний осад суспендували в 1 мл 70% ізотонічного розчину перколу. 1 мл 50% розчину перколу обережно нашарували поверх 70% перколового шару, далі 1 мл клітинної суспензії у PBS нашарували поверх шару 50% перколу. Градієнт густини центрифугували 40 хв за 1200 g. Після центрифугування шар на межі між фазами 70% і 50% розчинами перколу, що містить збагачену фракцію мікроглії, відбирали пластиковою піпеткою, та клітини двічі промивали PBS шляхом центрифугування (рис.2.2). Чистоту виділеної фракції мікроглії/макрофагів досліджували за допомогою проточної цитометрії з використанням анти-CD11b антитіл, мічених FITC (BD Pharmingen™) та анти-CD45 натитіл, мічених фікоеритрином (PE) (BD Pharmingen™). Частка CD11b+CD45+ клітин складала  $88,9 \pm 3,7\%$ . Життєздатність клітин визначали за фарбуванням трипановим синім. Частка життєздатних клітин становила не менше 93% [151].



**Рис. 2.2.** Репрезентативна ілюстрація етапів виділення клітин мікроглії.

**Виділення перитонеальних макрофагів (ПМ).** Для дослідження використовували ПМ, виділені без попередньої сенсibilізації, які отримували шляхом перфузування перитонеальної порожнини охолодженим буферним розчином [152]. Для цього у черевну порожнину щурів вводили 20 мл холодного PBS (рН 7,3–7,4), масажували стінки черевної порожнини впродовж 2-3 хв. За допомогою шприца відбирали суспензію клітинного змиву черевної порожнини, після цього ще двічі промивали черевну порожнину додатковою кількістю PBS. Виділені клітини двічі відмивали PBS та ресуспендували у середовищі RPMI-1640 (Sigma, США) для оцінки функціональних властивостей та фенотипових маркерів.

### **2.11. Оцінка фагоцитарної активності**

Фагоцитарну активність фагоцитів різної локалізації досліджували методом проточної цитометрії, згідно протоколу описаного раніше [153]. Як об'єкт фагоцитозу використовували FITC-мічені термоінактивовані клітини

*Staphylococcus aureus* Cowan I (колекція кафедри мікробіології та імунології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка).  $2 \times 10^5$  клітин інкубували 30 хв у  $\text{CO}_2$ -інкубаторі при температурі  $37^\circ\text{C}$  з бактеріальними клітинами (5 мкл вихідної суспензії FITC -міченого *S. aureus* у концентрації  $1 \times 10^7$  клітин/мл). Фагоцитоз зупиняли додаванням стоп-розчину (PBS з 0,02% EDTA та 0,04% параформальдегіду). Зразки аналізували на проточному цитометрі FACS Calibur (BD Biosciences, Сан-Хосе, Каліфорнія, США). Дані аналізували за допомогою програмного забезпечення CELLQuest (BD; Franklin Lakes, NJ, США). Результати представлені у вигляді фагоцитарного індексу (ФІ), як середня флуоресценція на одну фагоцитуючу клітину, яка пропорційна кількості бактерій, поглинутих однією клітиною, і у вигляді фагоцитарного коефіцієнту (ФК) - відсотка флуоресціюючих (фагоцитуючих) клітин. Для дослідження фагоцитарної активності фагоцитів периферичної крові досліджували цільну кров, взяту з антикоагулянтом EDTA. Еритроцити видаляли шляхом осмотичного лізису з використанням лікуючого буферу (гіпотонічний розчин  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ). Аналіз фагоцитарної активності моноцитів і гранулоцитів проводили шляхом гейтування відповідно до прямого та бічного розсіювання.

## 2.12. Оцінка оксидативного метаболізму фагоцитів

Оксидативний метаболізм фагоцитів різної локалізації досліджували методом проточної цитометрії за генерацією внутрішньоклітинних реактивних форм кисню (РФК) з використанням карбокси-2'7'-дихлордигідрофлуоресцеїндиацетату (carboxy- $\text{H}_2\text{DCFDA}$ , Invitrogen) [153]. Клітини у кількості  $2 \times 10^5$  інкубували в об'ємі 2 мкл PBS, що містив 10 мкМ carboxy- $\text{H}_2\text{DCFDA}$ , протягом 30 хв в темряві за  $37^\circ\text{C}$ . Після інкубації зразки тричі відмивали PBS шляхом центрифугування і фіксували у

0,4 % формаліні. Зразки аналізували на проточному цитометрі FACS Calibur (BD Biosciences, Сан-Хосе, Каліфорнія, США). Дані аналізували за допомогою програмного забезпечення CELLQuest (BD; Franklin Lakes, NJ, США).

Резерв реактивності для оксидативного метаболізму характеризували за коефіцієнтом модуляції (КМ). КМ визначали після обробки клітин форбол 12-миристат 13-ацетатом (ФМА, Sigma, США) *in vitro* і розраховували за формулою:  $КМ = ((Ст - Сп) / Сп) \times 100$ , де Ст – рівень РФК у пробах після обробки ФМА *in vitro*; Сп – показник генерації РФК необроблених клітин. Зразки аналізували на проточному цитометрі FACS Calibur (BD Biosciences, Сан-Хосе, Каліфорнія, США). Дані аналізували за допомогою програмного забезпечення CELLQuest (BD; Franklin Lakes, NJ, США). Результати представлені у вигляді середньої флуоресценції на одну, яка пропорційна концентрації генерованих РФК. Для дослідження оксидативного метаболізму фагоцитів периферичної крові досліджували цільну кров, взяту з антикоагулянтном ЕДТА. Еритроцити видаляли шляхом осмотичного лізису з використанням лікуючого буферу (гіпотонічний розчин  $NH_4Cl$ ). Аналіз оксидативного метаболізму моноцитів і гранулоцитів проводили шляхом гейтування відповідно до прямого та бічного розсіювання.

### **2.13. Оцінка оксидативного метаболізму фагоцитів в НСТ-тесті**

НСТ-тест для оцінки оксидативного метаболізму перитонеальних макрофагів проводили згідно методики Muller F. et all [154]. 100 мкл супензії клітин перитонеального ексудату (виділених без попередньої сенситизації) з концентрацією  $2 \times 10^6$  /мл вносили у лунки 96-лункового планшету та інкубували в термостаті за  $37^\circ C$  впродовж 30 хв для забезпечення адгезії макрофагів. Після адгезії клітин до поверхні планшету додавали стимулятор генерації РФК ФМА (див.

п.2.12). Далі у контрольні і стимульовані ФМА проби додавали 0,1 мл 0.2 % НСТ (Sigma, США) та інкубували впродовж 60 хв за 37°C. Метаболічну реакцію відновлення НСТ зупиняли додаванням 0,1 мл 2М КОН + 0,1 мл 50% розчину диметилсульфоксиду. Оптичну густину диформазану визначали на мікроплейтфотометрі за довжини хвилі 630 нм.

#### **2.14. Оцінка експресії фенотипових маркерів фагоцитами**

Для фенотипування фагоцитів різної локалізації використовували антитіла проти CD80/86, мічені FITC, і антитіла проти CD206, мічені фікоеритрином (PE) (Becton Dickinson, Pharmingen, США). Клітини інкубували з антитілами впродовж 30 хвилин, у темряві при 4°C. Після інкубації зразки фіксували у PBS з додаванням параформальдегіду (0,04 %), надалі результати оцінювали за допомогою проточного цитометра FACSCalibur та програмного забезпечення CellQuest (Becton Dickinson, США). Гранулоцити та моноцити гейтували відповідно до прямого та бічного розсіювання. Результати представлені у вигляді частки позитивних клітин та рівня експресії маркерів, який пропорційний інтенсивності флуоресценції (GMean).

#### **2.15 . Дослідження гематологічних показників**

Гематологічні показники досліджували за допомогою аналізатора Particle counter model PCE 210 (ERMA, Японія), адаптованого для дослідження клітин крові щурів і мишей. Додатково до визначення абсолютної та відносної кількості лейкоцитів різних популяцій аналізували лейкоцитарні індекси: нейтрофільно-

лімфоцитарний коефіцієнт НЛК (відношення абсолютної кількості нейтрофілів (гранулоцитів) (Нф) до абсолютної кількості лімфоцитів (Лф), лімфоцитарно-моноцитарний коефіцієнт ЛМК (відношення абсолютної кількості Лф до абсолютної кількості моноцитів (Мо), диференційований НЛК (відношення абсолютної кількості Нф до абсолютної кількості лейкоцитів Лц), тромбоцитарно-лімфоцитарний коефіцієнт ТЛК (абсолютна кількість тромбоцитів (Тр)/абсолютна кількість Лф), індекс системної запальної відповіді ІСЗВ (Нф x Мо / Лц) та індекс системного імунного запалення ІСІЗ (Нф x абсолютна кількість тромбоцитів (Тр) / Лф) [155].

## **2.16. Визначення концентрації С-реактивного білка у плазмі крові**

Вміст С-реактивного білка (CRP) у плазмі крові, взятої з антикоагулянтом ЕДТА, вимірювали методом імуноферментного аналізу з використанням тест-системи ELISA-CRP (Labcare Diagnostics India Pvt Ltd) відповідно до рекомендацій виробника.

## **2.17. Оцінка вагових індексів та клітинності селезінки**

На момент завершення експерименту видаляли селезінку та тимус тварин. Органи зважували та гомогенізували механічно в гомогенізаторі Поттера. Для видалення еритроцитів використовували осмотичний лізис клітин у гіпотонічному розчині  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Для отримання однорідної клітинної суспензії гомогенат фільтрували через нейлоновий фільтр. Отриману фракцію клітин центрифугували 8 хв при 200 g. Зливали надосад та ресуспендували клітини в 5 мл середовища

РРМІ-1640. За допомогою камери Горяєва підраховували кількість клітин в 1 мл. Визначали вагові індекси і клітинність органів, які розраховували за формулами: ваговий індекс органу = вага органу / вага тварини; клітинність органу = загальна кількість каріоцитів / маса органу [156].

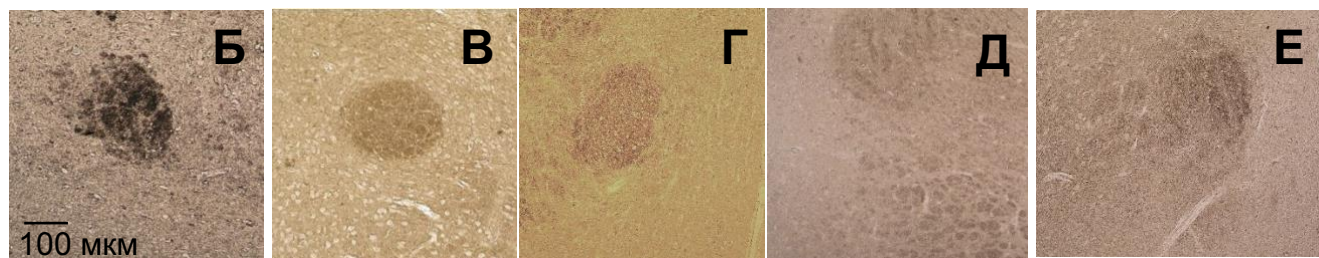
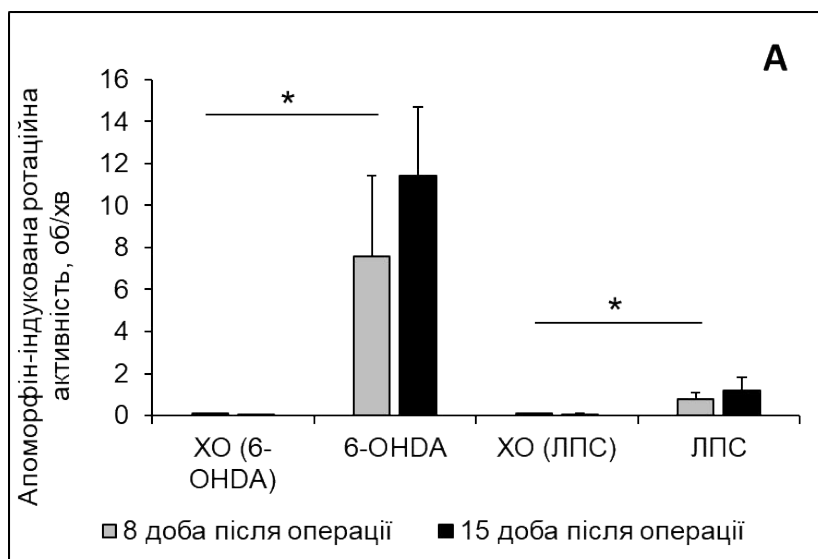
## **2.18. Статистичний аналіз**

Обробка статистичних даних зроблена Statistica v. 10. Усі дані представлені як середнє  $\pm$  стандартне відхилення. Статистичні відмінності були розраховані з використанням дисперсійного аналізу ANOVA з апостеріорним критерієм Тьюки для множинних порівнянь та двостороннім t-тестом та непараметричним критерієм Mann-Whitney U для парних порівнянь. Аналіз даних апоморфінового тесту проводили з використанням програмного забезпечення GraphPad Prism5 (GraphPad Software Inc., Сан-Дієго, Каліфорнія, США). Для визначення достовірності відмінностей результатів апоморфінового тесту між групами тварин використовували однофакторний тест Kraskel-Wallis та post-hoc Dunn. Відмінності вважали достовірними при  $p \leq 0,05$ . Кореляційний тест Спірмена використовувався для визначення статистичних зв'язків між значеннями метаболічних характеристик мікроглії/макрофагів і значеннями маркерів системного запалення. За  $p \leq 0,05$  кореляційний зв'язок вважався статистично значущим.

## РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

### 3.1. Критерії розвитку захворювання у щурів з 6-OHDA- та ЛПС-індукованою хворобою Паркінсона

Розвиток захворювання у щурів з 6-OHDA- та ЛПС-індукованою ХП констатували за рівнем загибелі ДН у *substantia nigra*, який оцінювали за результатами апоморфінового тесту та імуногістохімічного дослідження експресії тирозинової гідроксилази, яка є маркером цих нейронів. Додатково критеріями розвитку захворювання були поведінкові зміни тварин, які оцінювали у тесті «Відкрите поле». Як видно з рис 3.1А, у щурів з 6-OHDA-ХП швидкість контрлатерального обертання на 8 день після операції становила 7,6 об/хв, що вказувало на ~ 90-100 % пошкодження ДН і відображало гостру, важку, однобічну нейродегенерацію. Ще через тиждень швидкість обертання у цих тварин досягнула 11,4 об/хв, що вказало на подальшу прогресуючу втрату ДН. У тварин з ЛПС-ХП швидкість контрлатерального обертання становила 0,8 об/хв через 7 днів та 1,2 об/хв - через 14 днів після введення ендотоксину, що вказує на помірну, але прогресуючу втрату ДН. Наші результати узгоджуються з даними Eidson et al. (2017), які повідомили про помірне ( $\leq 50\%$ ), але прогресуюче зниження рівня дофаміну у щурів після інтрастріарної ін'єкції ЛПС [157]. Втрата ДН була додатково підтверджена результатами імуногістохімічного дослідження, яке виявило ~60% зменшення TH-позитивних нейронів у щурів з ЛПС-ХП та >80% зменшення у тварин з 6-OHDA-ХП (рис.3.1Б-Е).

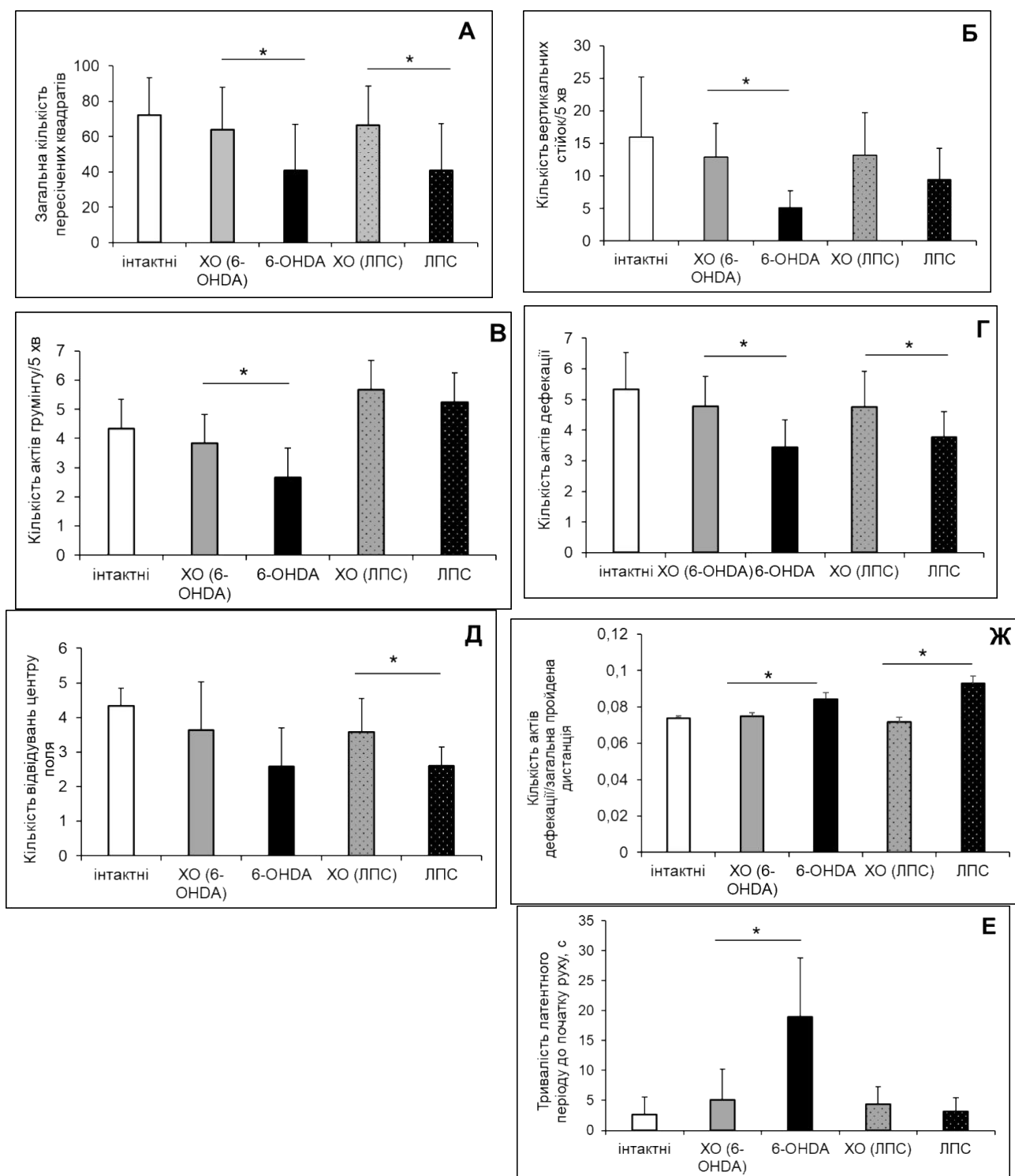


	Б	В	Г	Д	Е
Q	5,8±1,9	4,8±1,0	5,0±1,1	0,6±0,2	2,6±0,8

**Рис.3.1** Втрата дофамінергічних нейронів у тварин з різними моделями хвороби Паркінсона. А – результати апоморфінового тесту (n=10 у кожній групі тварин). Б-Е – репрезентативні мікрофотографії імуногістохімічної оцінки експресії тирозинової гідроксилази (збільшення x50): Б – інтактна тварина, В – хібнооперована тварина у моделі 6-OHDA-ХП, Г - хібнооперована тварина у моделі ЛПС-ХП, Д – тварина з 6-OHDA-ХП, Е – тварина з ЛПС-ХП. \* - p<0,05 порівняно з показником хібнооперованих тварин у відповідній моделі.

Рухова і дослідницька активність у тварин з 6-OHDA-ХП була досить подібною до такої у щурів з ЛПС-ХП. Однак поведінкові порушення були дещо

більш виразні у щурів з 6-OHDA-ХП. Достовірно зменшеною була загальна кількість пересічених квадратів відкритого поля: на 36% у щурів з 6-OHDA-ХП та на 38% – з ЛПС-ХП (рис. 3.2А). Кількість вертикальних стійок була меншою у тварин з 6-OHDA-ХП на 59% та на 31% у щурів з ЛПС-ХП (рис. 3.2Б) порівняно з показниками хибнооперованих тварин у відповідній моделі. Кількість актів грумінгу, порівняно з хибнооперованими тваринами, була більше знижена у щурів з 6-OHDA-ХП: на 27% проти 1% у тварин з ЛПС-ХП (рис. 3.2В). Кількість актів дефекації впродовж тестування також була зменшена у щурів з геміпаркінсонізмом: на 28,2% у тварин з 6-OHDA-ХП та на 19,2% у щурів з ЛПС-ХП порівняно з контрольними групами (рис. 3.2Г), що може вказувати на дисфункцію шлунково-кишкового тракту зі зниженням скорочення товстої кишки, яка притаманна хворим на ХП та гризунам з експериментальним геміпаркінсонізмом [158]. Що стосується тривожної поведінки, яку оцінювали за кількістю відвідувань центру арени, то кількість входів до центру поля була зменшена у всіх хворих тварин в середньому в 1,3 рази (рис. 3.2Д), латентний період від початку потрапляння тварини на арену і до початку рухової активності, був більшим у щурів з 6-OHDA-ХП у 4 рази, у щурів з ЛПС-ХП – лише незначно (рис. 3.2Е). У сукупності зі статистично достовірним збільшенням частоти дефекації (рис. 3.2Ж) це вказує на тривожну поведінку у щурів з обома моделями ХП.



**Рис.3.2** Результати поведінкового тесту «Відкрите поле» у тварин з різними моделями хвороби Паркінсона. n=10 у кожній групі тварин. (M±SD), ANOVA з апостеріорним критерієм Тьюки. **Примітка:** \* - відмінності статистично достовірні, p < 0,05.

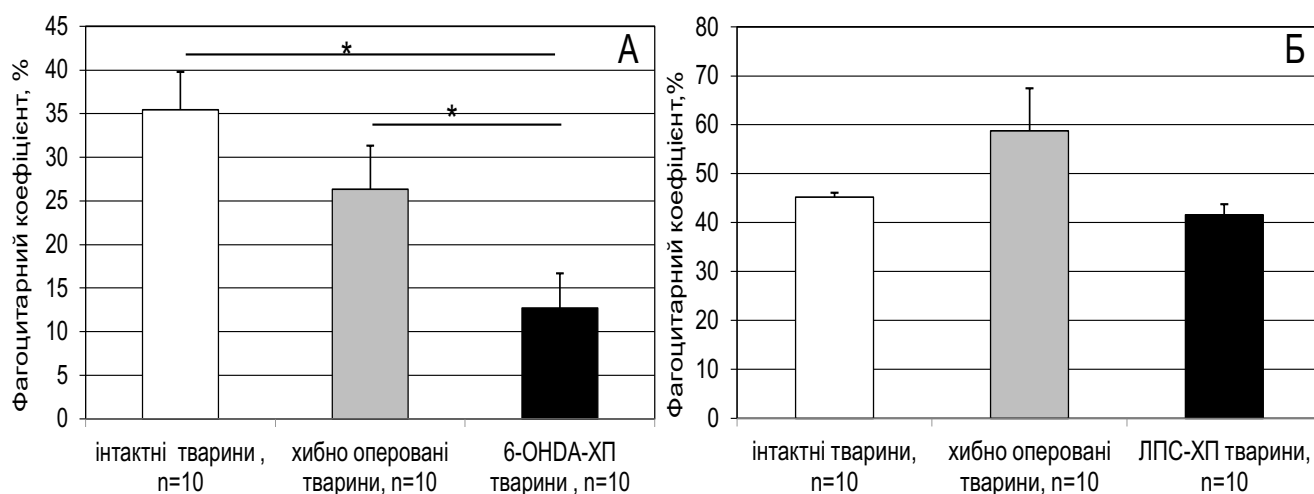
Таким чином, ми виявили порівняні порушення локомоторної активності, шлунково-кишкову дисфункцію та тривожну поведінку в обох моделях. У той же час втрата ДН була значно більш виразною у щурів з 6-OHDA-ХП, порівняно з тваринами з ЛПС-індукованою моделлю. Локомоторні порушення та тривожна поведінка подібного ступеню виразності у щурів з 6-OHDA-ХП та ЛПС-ХП були пов'язані з дещо відмінним метаболічним профілем популяції мікроглії/макрофагів тварин на момент припинення експерименту.

### **3.2. Метаболічний профіль мікроглії у щурів з різними моделями хвороби Паркінсона**

Мікрогліальні клітини – це резидентні фагоцити головного мозку. Як зазначено в огляді латерітури, у здорових тварин у відсутності патологічного стану популяція мікроглії складається з макрофагів, які походять із жовткового мішка і постійність кількості яких підтримується за рахунок їх самооновлення. В умовах нейрозапалення популяція клітин мікроглії поповнюється за рахунок моноцитів периферичної крові, які диференціюють на макрофаги *in situ*. Методичний підхід, застосований нами для виділення і оцінки фенотипово-функціональних характеристик мікроглії, не дозволяє диференціювати у її складі макрофаги різного походження. Як зазначено у методичному розділі, для характеристики спрямованості поляризованої активації фагоцитів ми використовували показники фагоцитарної активності, оксидативного метаболізму та рівня експресії фенотипових маркерів, властивих про- та протизапальному метаболічному зсуву фагоцитів.

**Фагоцитарна активність.** Посилення фагоцитарної активності традиційно вважається маркером протизапального метаболічного зсуву фагоцитів, таких, як

резидентні макрофаги тканин, оскільки ендоцитарна активність тісно пов'язана з функцією еферозитозу (кліренсу апоптичних клітин тканини у процесі тканинного гомеостазу) [159, 160] та стимуляцією протизапального метаболізму резидентних макрофагів. Крім того, посилена фагоцитарна активність асоційована зі зниженою антигенпрезентувальною активністю фагоцитів, яка, у свою чергу, є критерієм прозапального метаболічного зсуву фагоцитів: макрофагів, ендричних клітин і моноцитів [161]. Однак, клітини мікроглії мають унікальні фенотипово-функціональні характеристики, які дещо відрізняють їх від більшості резидентних тканинних макрофагів. В нормі клітини мікроглії характеризуються помірно посиленою фагоцитарною активністю, що пояснюється необхідністю ретельного кліренсу апоптичних клітин і дебрису з метою мінімізації збудження нейронів [162]. В умовах патологічних станів (черепно-мозкової травми, ішемічного інсульту, а також нейродегенеративних захворювань) фагоцитарна активність мікроглії посилюється, що вважають маркером як про- так і протизапальної поляризованої активації цих клітин [163]. Численні дослідження вказують на дисрегуляцію (підвищення чи зниження) фагоцитарної активності мікроглії як визначну подію в патофізіології хвороби Паркінсона [164]. У наших експериментах частка фагоцитуючих клітин (фагоцитарний коефіцієнт, ФК) мікроглії/макрофагів у щурів, уражених 6-ОНДА, була в 1,4 раза нижчою порівняно з ХО тваринами та майже в 3 рази нижчою, ніж у інтактних тварин (рис. 3.3А). Тоді як відсоток фагоцитуючих клітин мікроглії/макрофагів у тварин, уражених ЛПС, істотно не відрізнявся від такого у тварин контрольних груп (рис. 3.3Б).



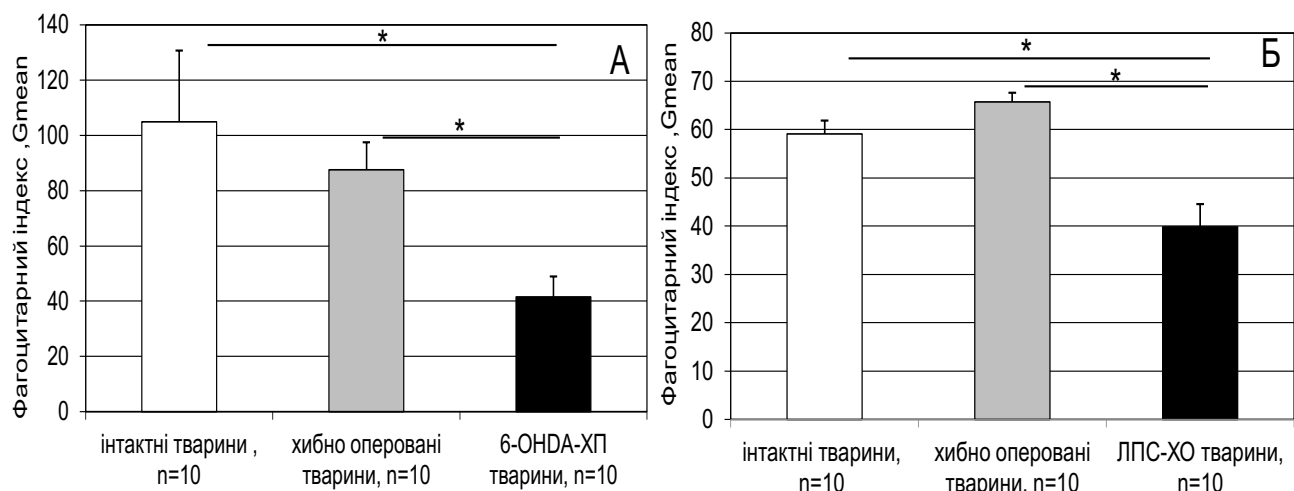
**Рис.3.3.** Частка фагоцитуючих мікрогліальних клітин у щурів з різними моделями хвороби Паркінсона. А – 6-ОНДА-індукована ХП, Б – ЛПС-індукована ХП.

**Примітка:** \* - відмінності статистично достовірні,  $p < 0,05$ .

Інтенсивність фагоцитозу *S. aureus* (ФІ) була знижена у тварин з 6-ОНДА-ХП: у 1,2 раза порівняно з ХО тваринами та в 2,5 раза порівняно з інтактними щурами (рис. 3.4А). У тварин з ЛПС-ХП також спостерігали зниження фагоцитарної активності, але меншою мірою: в 1,5 раза порівняно з інтактними та хибнооперованими щурами (рис. 3.4Б).

В цілому результати оцінки фагоцитарної активності комплексної популяції мікроглії у тварин з обома моделями ХП вказують на активований стан цих клітин.

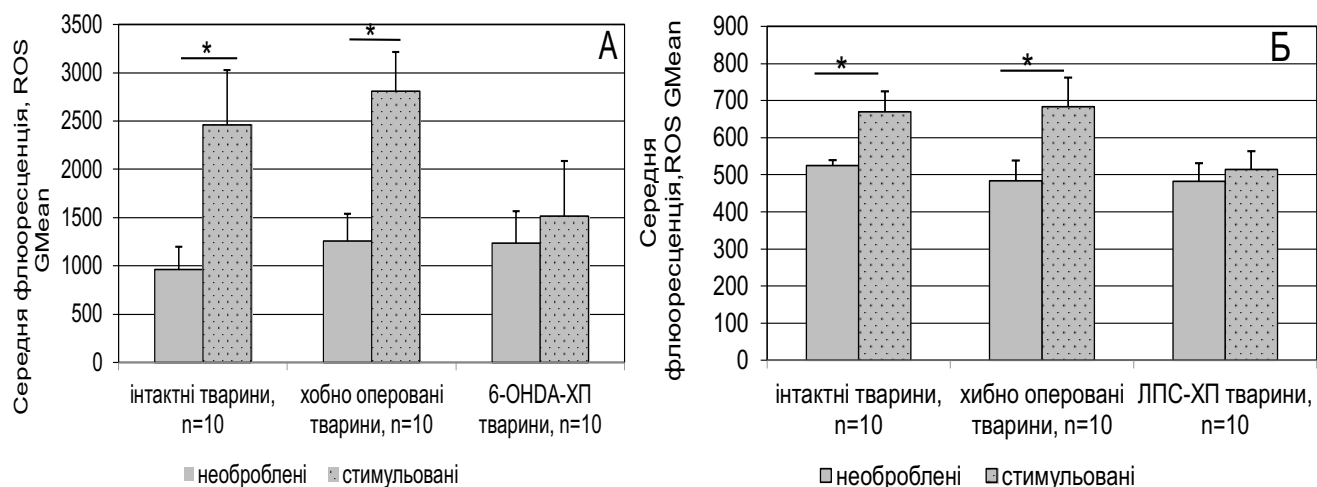
**Оксидативний метаболізм.** Конститутивна генерація РФК притаманна багатьом клітинам, у т.ч. фагоцитам, враховуючи їхню важливу роль у передачі сигналу, диференціації клітин і експресії генів [165]. При поляризованій активації фагоцитів, підвищена генерація РФК розглядається, як метаболічний маркер їх прозапального функціонального зсуву [74].



**Рис. 3.4.** Фагоцитарна активність клітин мікроглії у щурів з різними моделями хвороби Паркінсона. А – 6-OHDA-індукована ХП, Б – ЛПС-індукована ХП.

**Примітка:** \* - відмінності статистично достовірні,  $p < 0,05$ .

У наших експериментах базова генерація РФК клітинами мікроглії/макрофагів у щурів в обох моделях суттєво не відрізнялася від такої у контрольних тварин (рис. 3.5). На додачу до оцінки базової генерації РФК, ми також досліджували резерв реактивності цієї функції фагоцитів (залишкова здатність клітини виконувати задану метаболічну функцію під впливом стресора *in vitro*) після обробки ФМА *in vitro*. Резерв реактивності характеризували за значенням КМ. Позитивне значення КМ (див. Матеріали та методи) означає наявність резерву реактивності в аналізованій популяції клітин, тоді як нульове та негативне значення може свідчити про максимальний ступінь активації даної функції та відсутність резерву реактивності або функціональне виснаження клітини [166]. У тварин з контрольних груп обробка клітин мікроглії/макрофагів ФМА *in vitro* призводила до посилення генерації РФК (в середньому в 1,9 раза), тоді як у щурів з обома моделями ХП не спостерігали приросту показника оксидативного метаболізму мікроглії/макрофагів при їх обробці стимулятором *in vitro*.



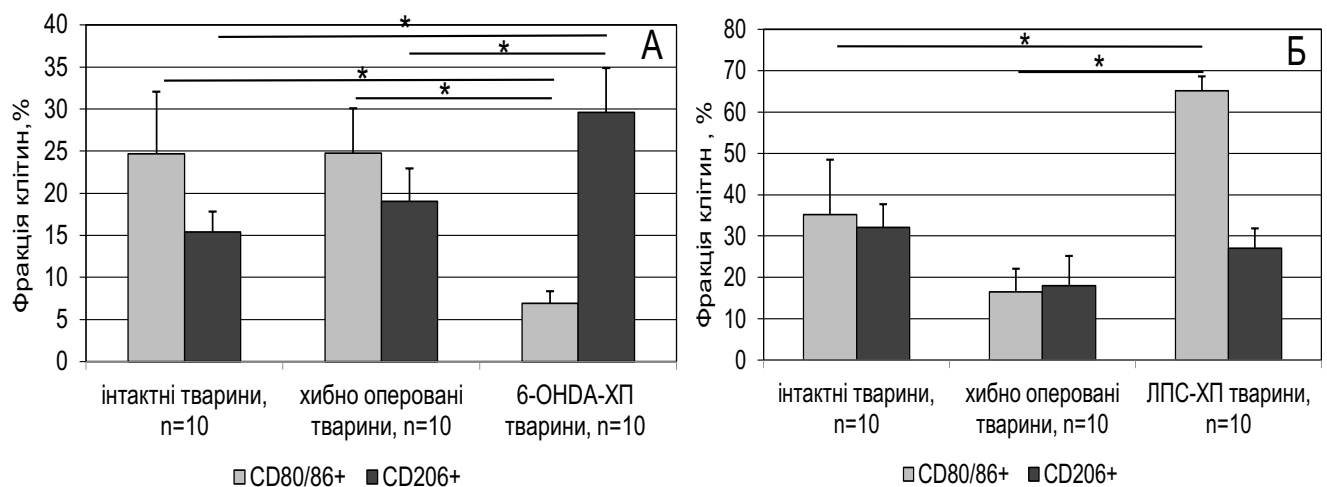
**Рис. 3.5** Оксидативний метаболізм клітин мікроглії у щурів з різними моделями хвороби Паркінсона. А – 6-OHDA-індукована ХП, Б – ЛПС-індукована ХП.

**Примітка:** \* - відмінності статистично достовірні,  $p < 0,05$ .

Отже, незважаючи на відсутність статистично достовірної різниці між показниками рівня продукції РФК у тварин з обома моделями ХП порівняно з тваринами контрольних груп, відсутність резерву реактивності вказує на тривалу активацію цієї функції клітин мікроглії, яка спричинила її часткове виснаження, що може бути маркером прозапальної поляризованої активації.

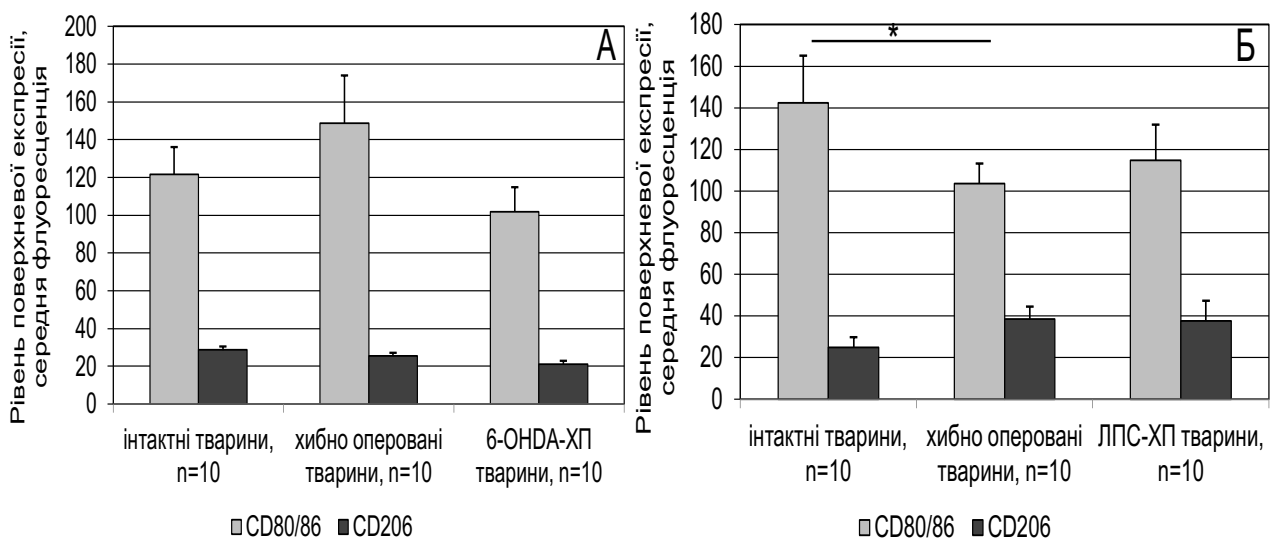
**Фенотипові маркери поляризованої активації.** Використані нами у дослідженні фенотипові маркери CD80/86 та CD206 є загально визнаними маркерами поляризованої активації фагоцитів, у т.ч. клітин мікроглії. CD80 і CD86 є коstimуляторними молекулами, які необхідні для презентації антигену та активації Т-клітин. CD80 експресується як мікроглією у стані спокою, так і активованими резидентними мікрогліальними клітинами, тоді як CD86 експресується лише активованими резидентними та рекрутованими мікрогліальними клітинами [167]. Посилена експресія CD80/86 вважається

маркером прозапального (M1) метаболічного зсуву мікроглії/макрофагів. У наших експериментах частка CD80/86 позитивних клітин у популяції мікроглії/макрофагів у щурів з 6-ОНДА-ХП була в 3,6 раза нижчою, ніж у тварин із контрольних груп (рис.3.6А). У щурів з ЛПС-ХП відсоток цих клітин значно, а саме в 1,85 раза перевищував показник інтактних тварин, і в 4 рази - показники хибнооперованих щурів (рис. 3.6Б). Рівні експресії CD80/86 клітинами мікроглії/макрофагів щурів з обома моделями були порівнянними з такими у контрольних тварин (рис. 3.7А і Б). Крім того, популяція мікроглії/макрофагів у щурів з 6-ОНДА-ХП характеризувалася збільшенням частки CD206-позитивних клітин: у 1,92 раза порівняно з інтактними тваринами та в 1,56 раза порівняно зі значеннями у хибнооперованих щурів. Поверхнева експресія CD206 не відрізнялася у хворих і контрольних тварин. У щурів з ЛПС-ХП групи ні відсоток CD206-позитивних клітин мікроглії/макрофагів, ні рівень поверхневої експресії CD206 не відрізнялися від груп контролю.



**Рис.3.6.** Частка позитивних за фенотиповими маркерами клітин мікроглії/макрофагів у щурів з різними моделями хвороби Паркінсона. А – 6-ОНДА-індукована ХП, Б – ЛПС-індукована ХП.

**Примітка:** \* - відмінності статистично достовірні,  $p < 0,05$ .



**Рис. 3.7.** Рівні експресії поверхневих маркерів клітинами мікроглії/макрофагів у щурів з різними моделями хвороби Паркінсона. А – 6-ОНДА-індукована ХП, Б – ЛПС-індукована ХП.

**Примітка:** \* - відмінності статистично достовірні,  $p < 0,05$ .

CD206 - рецептор манози С-типу 1 - конститутивно експресується всіма макрофагами, включаючи резидентні мікрогліальні клітини. Це рецептор очищення, що зв'язує як ендogenous глікани (пов'язані з пошкодженням тканин або апоптичною клітинною загибеллю), так і цукри мікроорганізмів [168]. Лігування CD206 здебільшого викликає протизапальні реакції і тому посилення експресії CD206 розглядається як маркер протизапальної поляризованої активації фагоцитів [74].

Варто відмітити, що у хібнооперованих тварин зареєстровано незначне зниження рівня експресії CD80/86 одночасно з посиленням експресії CD206, що може бути ознакою помірного протизапального метаболічного зсуву, імовірно, зумовленого триваючими репаративними процесами після проведеного плацебо-хірургічного втручання.

### **3.3. Реактивний астрогліоз у щурів ЛПС-індукованою моделлю хвороби Паркінсона**

Зважаючи на менший рівень втрати ДН у тварин з ЛПС-ХП порівняно зі щурами з 6-OHDA-ХП було вирішено додатково дослідити стан астрогліальних клітин у тварин із цією моделлю, зважаючи на численні літературні дані, які засвідчують участь реактивного астрогліозу у дегенерації ДН, а також у активації та підтримці прозапального метаболічного зсуву мікрогліальних клітин. Астроцити - найчисленніша (біля 60%) популяція нейроглії, яка є одними з ключових елементів у фізіології нервової системи. За умов розвитку нейродегенеративних захворювань реєструються реактивні зміни в астроглії, які є складовою гліозу [169]. Реактивний астрогліоз, за результатами як експериментальних досліджень з використанням тваринних моделей, так і за даними клінічних досліджень, розглядається як один з тригерних чинників ХП. Вважається, що активовані астроцити є джерелом медіаторів, які спричиняють загибель ДН, а також індукують і підтримують прозапальну метаболічну поляризацію клітин мікроглії [170, 171].

Для оцінки наявності реактивного астрогліозу ми проводили визначення загально визнаного його маркера - гліального фібрилярного кислого протеїну (GFAP) [172].

Імуногістохімічне дослідження зрізів головного мозку щурів з ЛПС-ХП виявило локалізацію реактивних астроцитів переважно у гіпокампі (рис.3.8А). При цьому в інших ділянках мозку істотних змін нами не було виявлено. Отримані результати вказують на залучення астроцитів саме гіпокампальної ділянки у розвиток реактивного астрогліозу в умовах розвитку патологічного процесу у щурів з ЛПС-індукованою ХП. Гіпокамп, як відомо, є важливим органом лімбічної системи, що бере участь у консолідації пам'яті [173]. Отримані нами дані дають

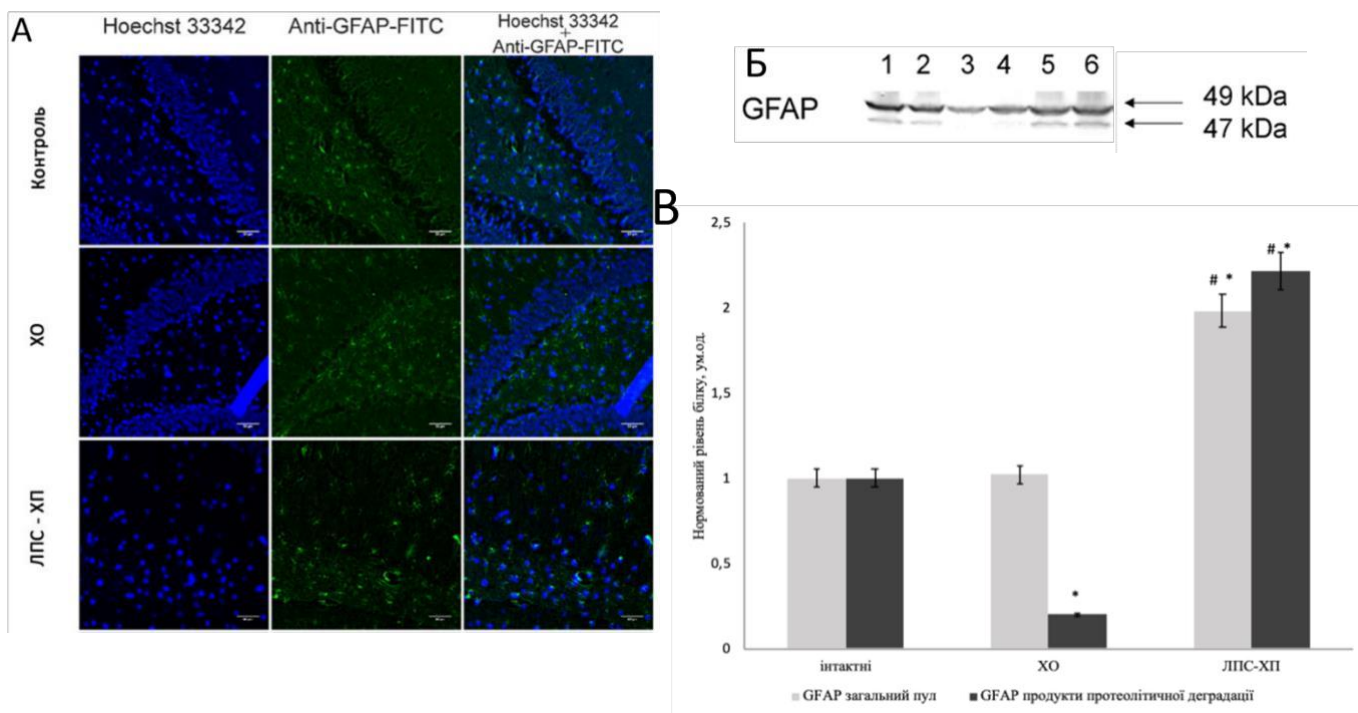
підстави зробити припущення про те, що реактивний астрогліоз у гіпокампі є важливим компонентом патофізіології когнітивних розладів у тварин з ЛПС-ХП моделлю. Денситометричний аналізу блотограм у зразках мозку дослідних тварин виявив збільшення вмісту GFAP у щурів з ЛПС-ХП у 2 рази у порівнянні з ХО та інтактними тваринами (табл.3.1, рис.3.8Б). Вміст низькомолекулярних деградованих поліпептидів GFAP у тварин з експериментальним паркінсонізмом, індукованим бактеріальним ендотоксином, був більшим в 11 разів, ніж у групі ХО щурів. Слід відмітити, що у хибнооперованих тварин нами було зареєстровано знижений, порівняно з інтактними щурами, рівень деградованих форм GFAP. Ми схильні вважати це наслідком активації репаративних процесів, викликаних хірургічним втручанням і не пов'язаних з нейродегенерацією.

**Таблиця 3.1.**

**Маркери реактивного астрогліозу у щурів з ЛПС-ХП за результатами денситометрії блотограм зразків головного мозку (M ± SD)**

Досліджуваний показник умовні одиниці, m±SD	Групи тварин		
	Інтактні, n=10	Хибнооперовані, n=10	ЛПС-ХП, n=10
GFAP загальний пул	1,00±0,31	1,02±0,38	1,98±0,15*#
GFAP продукти протеолітичної деградації	1,00±0,40	0,20±0,16*	2,21±0,35*#
nNOS	1,00±0,16	0,68±0,27*	0,77±0,19*#
MBP	1,00±0,29	1,19±0,68	1,83±0,26*#

Примітки: \* - p< порівняно з інтактними тваринами; # - p< порівняно з хибнооперованими тваринами.



**Рис. 3.8.** Вміст GFAP та продуктів його протеолітичної деградації в гомогенатах головного мозку щурів із ЛПС-ХП. А – результати імуногістохімічного аналізу зрізів головного мозку щурів (гіпокампальна ділянка), зрізи оброблені антитілами проти GFAP додатковим фарбуванням ядер Hoechst-33342, конфокальна мікроскопія (шкала масштабу – 50 мкм); Б – репрезентативна блотограма: 1, 2 – інтактні тварини, 3,4 – хибнооперовані тварини, 5,6 – тварини з ЛПС-ХП; В – результати денситометрії блотограм ( $M \pm SD$ ),  $n = 10$  у кожній групі тварин.

Примітки: \* –  $p < 0,05$  порівняно з інтактними тваринами; # –  $p < 0,05$  порівняно з хибнооперованими тваринами.

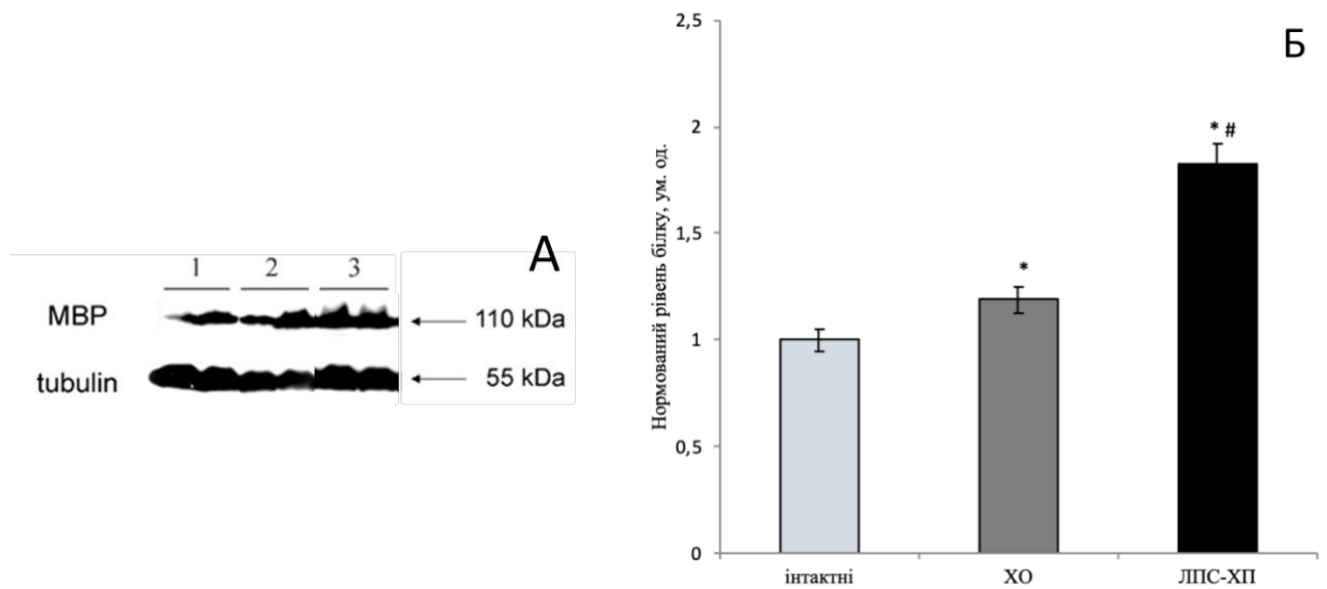
Для оцінки стану мієлінізації нервових волокон за експериментальних умов хвороби Паркінсона у щурів за допомогою Вестерн-блот аналізу проведено дослідження основного протеїну мієліну (MBP, myelin basic protein). Як відомо,

МВР – головний протеїновий компонент (30-50 %) мієлінової оболонки нейронів, до складу якої він входить у комплексі з ліпідами. МВР відіграє важливу роль в організації, зборці та підтримці структурної цілісності мієліну. Проявляє гетерогенність поліпептидного складу: мономерна субодиниця має молекулярну масу приблизно 17-19 кДа, але у мозку тварин різних видів виявляються поліпептиди з іншими молекулярними масами, у тому числі високомолекулярні мембрано-асоційовані полімеризовані форми.

МВР мозку щурів представлений двома функціонально важливими формами, які відрізняються за фізико-хімічними властивостями: високомолекулярними поліпептидами у діапазоні молекулярних мас 95-110 кДа, які є складовими мембран Шванівських клітин, та мономерною відносно низькомолекулярною формою 17 кДа, яка має переважно цитозольну локалізацію.

Експериментально показано, що сенсibilізація до МВР значно погіршує прогноз інсульту та збільшує розміри інфаркту мозку. Властивості МВР дозволяють зв'язати порушення його метаболізму з розвитком процесу демієлінізації. Визначення кількісного вмісту МВР та його поліпептидного складу у тканині головного мозку використовується для оцінки ступеня демієлінізації/ремієлінізації нейронів [174].

Результати імунохімічної детекції МВР головного мозку контрольних та експериментальних щурів, представлені на рис. 3.9, вказують на збільшення рівня високомолекулярних поліпептидів МВР (95-110 кДа) у мозку тварин з ЛПС-індукованою хворобою Паркінсона в 1,8 рази у порівнянні із показником контрольних тварин (значення  $1,83 \pm 0,26$  ум.од. та  $1,00 \pm 0,29$  ум.од., відповідно).



**Рис. 3.9.** Вміст МВР в гомогенатах головного мозку щурів із ЛПС-ХП. А – репрезентативна блотограма: 1 – інтактні тварини, 2 – хибнооперовані тварини, 3 – тварини з ЛПС-ХП; В – результати денситометрії блотограм ( $M \pm SD$ ),  $n = 10$  у кожній групі тварин.

Примітки: \* –  $p < 0,05$  порівняно з інтактними тваринами; # –  $p < 0,05$  порівняно з хибнооперованими тваринами.

Хоча відомо, що хвороба Паркінсона уражує переважно сіру речовину головного мозку, результати сучасних досліджень вказують на те, що значну роль у патогенезі цієї хвороби може відігравати й біла речовина. Припускається, що патологічні зміни за розвитку хвороби Паркінсона асоційовані зі зворотними змінами мієлінізації у мозку, причому тонкі мієлінізовані відростки кортикальних нейронів є виключно чутливими.

Результати, отримані у проведеному дослідженні з експериментального паркінсонізму, що вказують на зростання вмісту МВР, частково збігаються з даними, представленими у роботі Dean et al., 2016 та Xie et al., 2022 [175, 176]. Авторами встановлено, що у пацієнтів з хворобою Паркінсона спостерігається

зростання вмісту водорозчинної фракції мієліну у білій речовині фронтальної та темпоральної зони і білатерального таламусу, а також у корі поясної частини головного мозку у порівнянні з контролем відповідного віку.

Істотне зростання кількості астрогліального маркера запалення та низькомолекулярних поліпептидів GFAP свідчить про перебіг реактивного астроцитозу внаслідок розвитку запальних процесів, індукованих введенням ЛПС. Астрогліоз є характерною патологічною ознакою ХП, важливим підтвердженням розвитку нейрозапальних процесів та адекватності створеної експериментальної моделі [177].

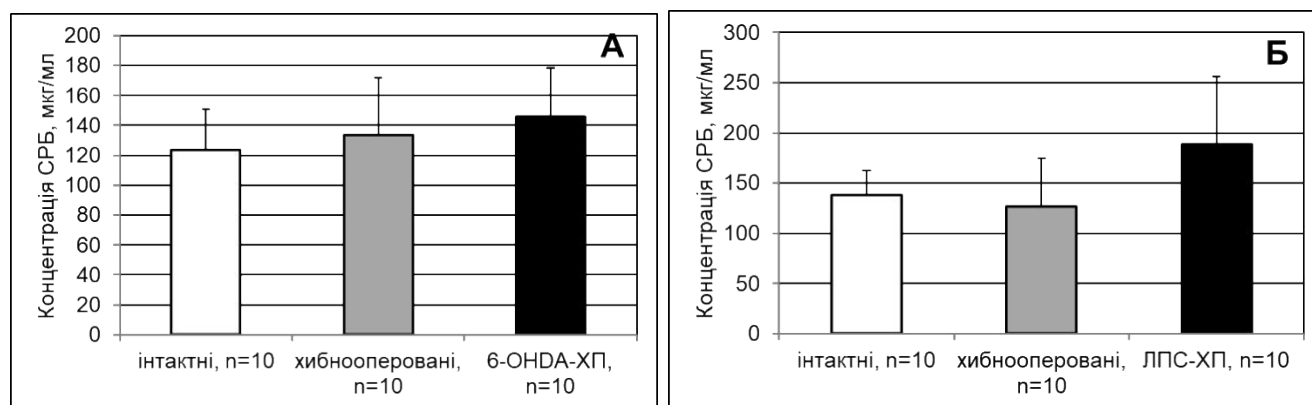
Таким чином розвиток ЛПС-ХП супроводжується реактивним астрогліозом з гіпертрофією астроцитів, надекспресією GFAP та продуктів його деградації у головному мозку. Це явище підтверджує характерну патологічну ознаку перебігу ХП. Виразний процес демієлінізації у тварин з ЛПС-ХП корелює з збільшенням рівня GFAP, і є фактом участі мієліну в астрогліозі.

### **3.4. Метаболічний профіль циркулюючих фагоцитів у структурі системного запального процесу у щурів з 6-OHDA- та ЛПС-індукованою хворобою Паркінсона**

Хронічне системне запалення є характерною ознакою клінічного перебігу ХП і нерозривно пов'язане з нейрозапаленням [178]. Отже відтворення системного запалення у тваринних моделях хвороби є важливим для розшифрування механізмів його розвитку та пошуку терапевтичних мішеней для розробки патогенетичних методів лікування ХП. З огляду на це наступним завданням роботи було порівняльне дослідження проявів системного запалення у тварин з різними моделями ХП. Для характеристики маніфестації системного запалення

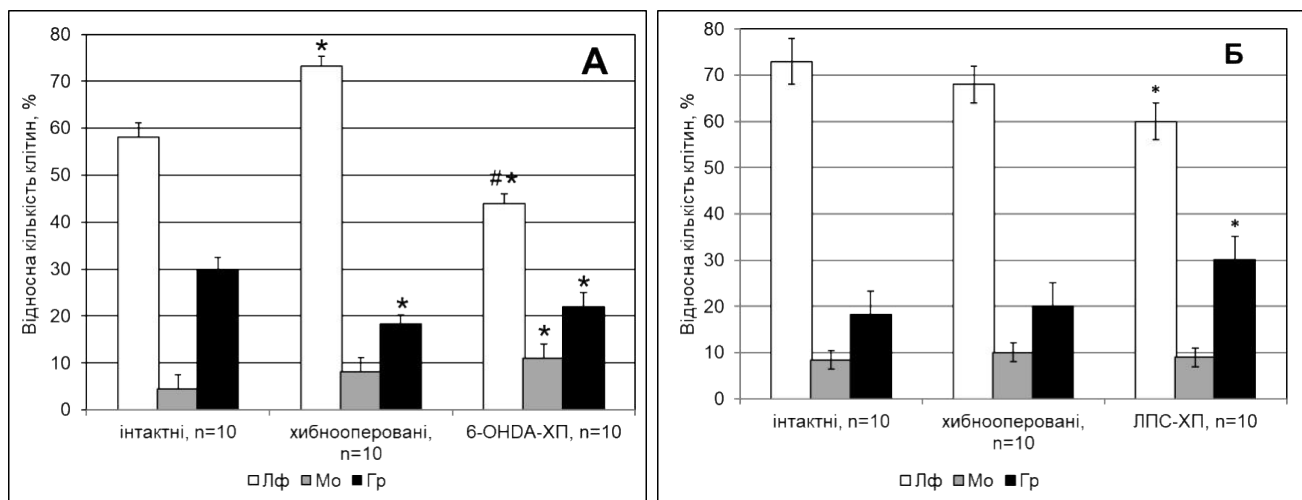
досліджували рівень С-реактивного білка (СРБ) у плазмі крові тварин, який є загально визнаним маркером системного запального процесу [179]. Важливими маркерами системного запального процесу є також показники гемограми: кількість лейкоцитів, абсолютна та відносна кількість лейкоцитів різних популяцій та коефіцієнти (індекси) системного запалення, які розраховуються на основі цих показників [180]. Ще одним важливим критерієм розвитку системного запального процесу є метаболічний профіль циркулюючих мієлоїдних клітин: моноцитів і гранулоцитів (головним чином, нейтрофілів) [181].

Відомо, що підвищені рівні СРБ у плазмі крові у пацієнтів з ХП корелюють із тяжкістю захворювання [182]. Таким чином цей показник є загально визнаним маркером системного запалення в умовах розвитку ХП у людини. Дані щодо рівня СРБ у плазмі крові гризунів з експериментальним паркінсонізмом в літературі нами не виявлені. У наших експериментах рівні СРБ у плазмі тварин з обома моделями ХП характеризувалися значною індивідуальною варіабельністю. У щурів з 6-ОНДА-індукованою ХП показники плазматичного рівня СРБ не відрізнялися від таких у контрольних тварин обох груп. У тварин з ЛПС-ХП спостерігалася тенденція до незначного підвищення рівня СРБ у плазмі порівняно з контролем (189,0 + 67,0 проти 126,5 + 48,5 мкг/мл у ХО щурів) (рис.3.10).



**Рис.3.10** Рівень С-реактивного білка у плазмі крові щурів з А – 6-ОНДА-індукованою ХП та Б – ЛПС-індукованою ХП.

Результат порівняльного аналізу показників гемограми у тварин з різними моделями ХП показав наступне. Встановлено зниження фракції Лф у тварин з обома моделями ХП. Однак, більш виразним воно було у щурів з 6-ОНДА-ХП (рис.3.11). Водночас у тварин із 6-ОНДА-ХП відносна кількість Мо була вдвічі вищою, ніж у інтактних тварин, тоді як частка гранулоцитів (Гр) майже не відрізнялася від такої у інтактних щурів. На відміну від тварин із 6-ОНДА-ХП, фракція Мо у групи ЛПС-ХП не відрізнялася від такої у тварин контрольних груп, тоді як частка Гр була майже вдвічі вищою.

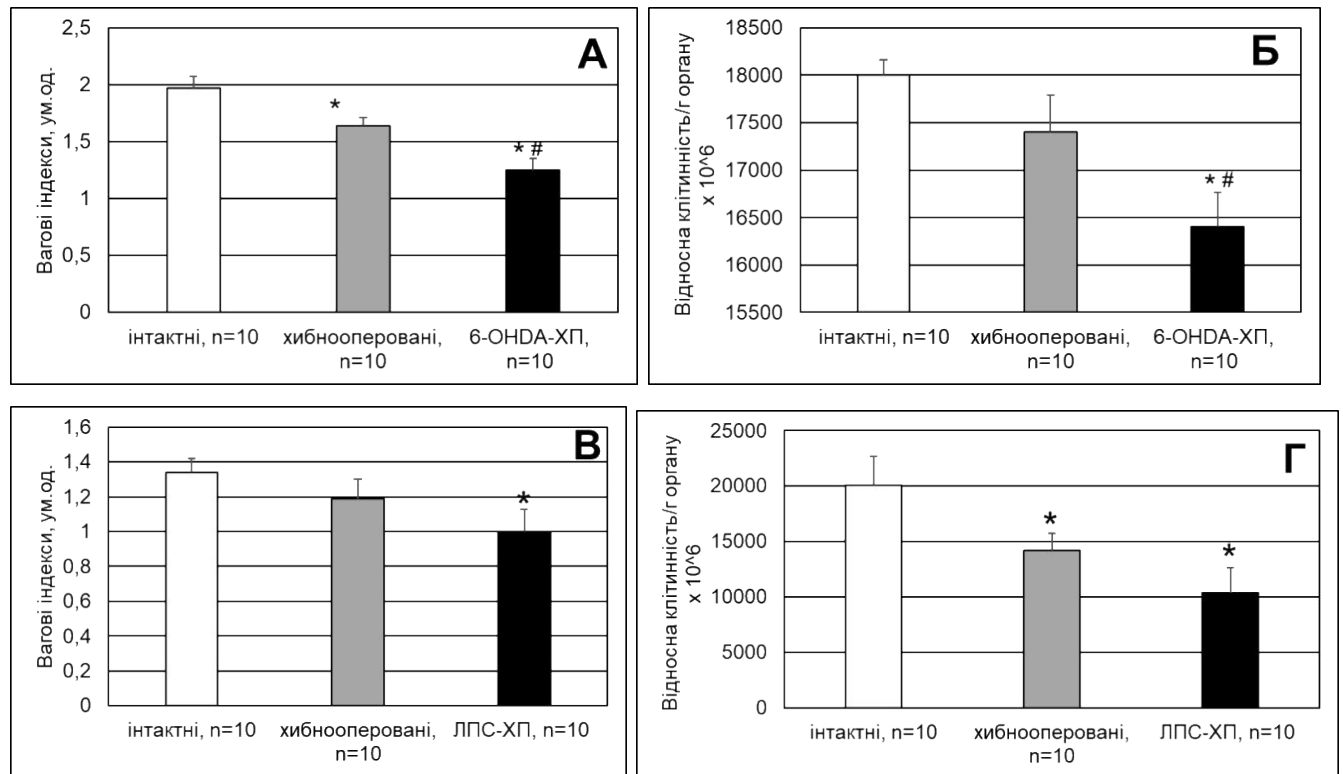


**Рис. 3.11.** Відносна кількість лейкоцитів різних популяцій у щурів з різними моделями хвороби Паркінсона. А – 6-ОНДА-індукована ХП; Б – ЛПС-індукована ХП.

**Примітка:** \* –  $p < 0,05$  порівняно з інтактними тваринами, # –  $p < 0,05$  порівняно з хибнооперованими тваринами.

Зважаючи на те, що джерелом лімфоцитів є первинні лімфоїдні органи: кістковий мозок (джерело зрілих наївних В-клітин) і тимус (джерело експорту на периферію зрілих наївних Т-клітин), ми дослідили вагові індекси і відносну клітинність тимусу у тварин з обома моделями. Як показали результати цих

досліджень, у тварин з обома моделями як вагові індекси, так і відносна клітинність були знижені порівняно з аналогічними показниками тварин контрольних груп (рис. 3.12).



**Рис. 3.12.** Вагові індекси (А, В) та відносна клітинність (Б, Г) тимусу у щурів з різними моделями хвороби Паркінсона.

**Примітка:** \* і # вказують на відмінності ( $p < 0,05$ ) у порівнянні зі значеннями інтактних та хибнооперованих тварин відповідно.

Такі дані можуть вказувати на те, що акцидентальна інволюція тимусу у тварин з обома моделями ХП може бути однією з причин зниження кількості циркулюючих лімфоцитів за рахунок зменшення кількості Т-клітин. Однак, згідно літературних даних стосовно функції тимусу в умовах ХП у людини і тварин з моделями цієї хвороби, механізми акцидентальної інволюції у щурів з різними моделями у наших дослідженнях відрізняються. Відомо, що у тварин з 6-ОНДА-індукованою ХП у тимусі знижується концентрація ДА, що негативно позначається

на проліферативній активності тимоцитів і може спричиняти акцидентальну інволюцію органу, оскільки знижена проліферативна активність негативно позначатиметься і на обсягах міграції клітин на периферію [183, 184]. Ми не визначали концентрацію ДА, оскільки це не входило у задачі дослідження. Однак, добре відомо, що ДА та його транспортери присутні у клітинах лімфоїдних органів, у т.ч. первинних: тимусу і кісткового мозку [185]. Тому припущення про те, що акцидентальна інволюція тимусу, спричинена порушенням ДА сигналізації в органі може бути однією з причин зниження кількості циркулюючих лимфоцитів, є правомірним. Ще однією причиною акцидентальної інволюції тимусу є запалення [186]. Добре відомо, що гостре запалення викликає зниження ваги і, меншою, мірою, зменшення клітинності тимусу. Однак, у випадку резолюції такого запалення морфологічні показники тимусу відновлюються. Натомість, хронічна персистенція запальних стимулів відмінняє програму відновлення і формується акцидентальна інволюція органу [187]. Зниження показників клітинності тимусу у щурів з 6-OHDA- та ЛПС- ХП відносно показників тварин контрольних груп були порівняними: на 7% на 10% відповідно. Зменшення вагових індексів тимусу порівняно з контролем було більш виразним у тварин з 6-OHDA-ХП: на 37% vs 26% у щурів з ЛПС-ХП. Як показано у підрозділі 3.1., рівень втрати ДН у мозку тварин з 6-OHDA-ХП був набагато більш виразним порівняно з таким в ендотоксиновій моделі, зниження вагових індексів у щурів з ЛПС-ХП не може бути пояснений лише втратою ДН і однією з причин можна припустити тривале системне запалення, порівняльній оцінці якого і присвячено цю частину роботи.

У літературі останніх 15-20 років все більше уваги приділяється оцінці лейкоцитарних коефіцієнтів системного запалення, як інформативних маркерів системного запалення. Навіть за відсутності загально визнаних показників системного запального процесу, таких як підвищення рівня СРБ у сироватці/плазмі крові, зміна лейкоцитарних коефіцієнтів є надійним маркером системного

запалення у перебігу багатьох запальних захворювань, у т.ч. ХП. Зокрема, згідно з літературними даними, НЛК застосовний не лише як валідований маркер системного запального процесу при ХП, а й є важливою складовою комплексу маркерів для диференційної діагностики підтипів захворювання [188]. Враховуючи вищезазначене, ми провели порівняльну оцінку НЛК, а також інших індексів системного запалення у тварин з 6-OHDA- та ЛПС- ХП (табл. 3.2.).

**Таблиця 3.2.**

**Лейкоцитарні індекси системного запалення у щурів з різними моделями хвороби Паркінсона.**

Індекс системного запалення	6-OHDA-ХП		
	інтактні, n=10	хибнооперовані, n=10	6-OHDA-ХП, n=10
НЛК	0,35 ± 0,07	0,27 ± 0,12	0,21 ± 0,06*
дНЛК	0,41 ± 0,05	0,34 ± 0,12	0,32 ± 0,18
ЛМК	7,61 ± 2,66	8,45 ± 2,28	4,39 ± 0,82*#
ТЛК	25,53 ± 6,57	28,64 ± 9,25	27,72 ± 15,25
ІСЗВ	0,20 ± 0,08	0,13 ± 0,05	0,19 ± 0,11
ІСІЗ	33,73 ± 9,09	32,85 ± 8,04	23,52 ± 2,04*
	ЛПС-ХП		
	інтактні, n=10	хибнооперовані, n=10	ЛПС-ХП, n=10
НЛК	0,25 ± 0,09	0,29 ± 0,09	0,54 ± 0,12*#
дНЛК	0,23 ± 0,07	0,25 ± 0,07	0,53 ± 0,14*#
ЛМК	8,39 ± 1,78	6,78 ± 2,28	8,27 ± 2,45
ТЛК	29,54 ± 6,91	34,58 ± 7,52	51,81 ± 7,84*#
ІСЗВ	0,11 ± 0,04	0,12 ± 0,09	0,21 ± 0,09
ІСІЗ	37,24 ± 8,97	41,91 ± 7,83	77,58 ± 4,53*#

**Примітки:** дані представлені як  $M \pm SD$ . \* –  $p < 0,05$  порівняно з інтактними тваринами; # –  $p < 0,05$  порівняно з хибнооперованими тваринами. (ANOVA з апостеріорним критерієм Тьюки).

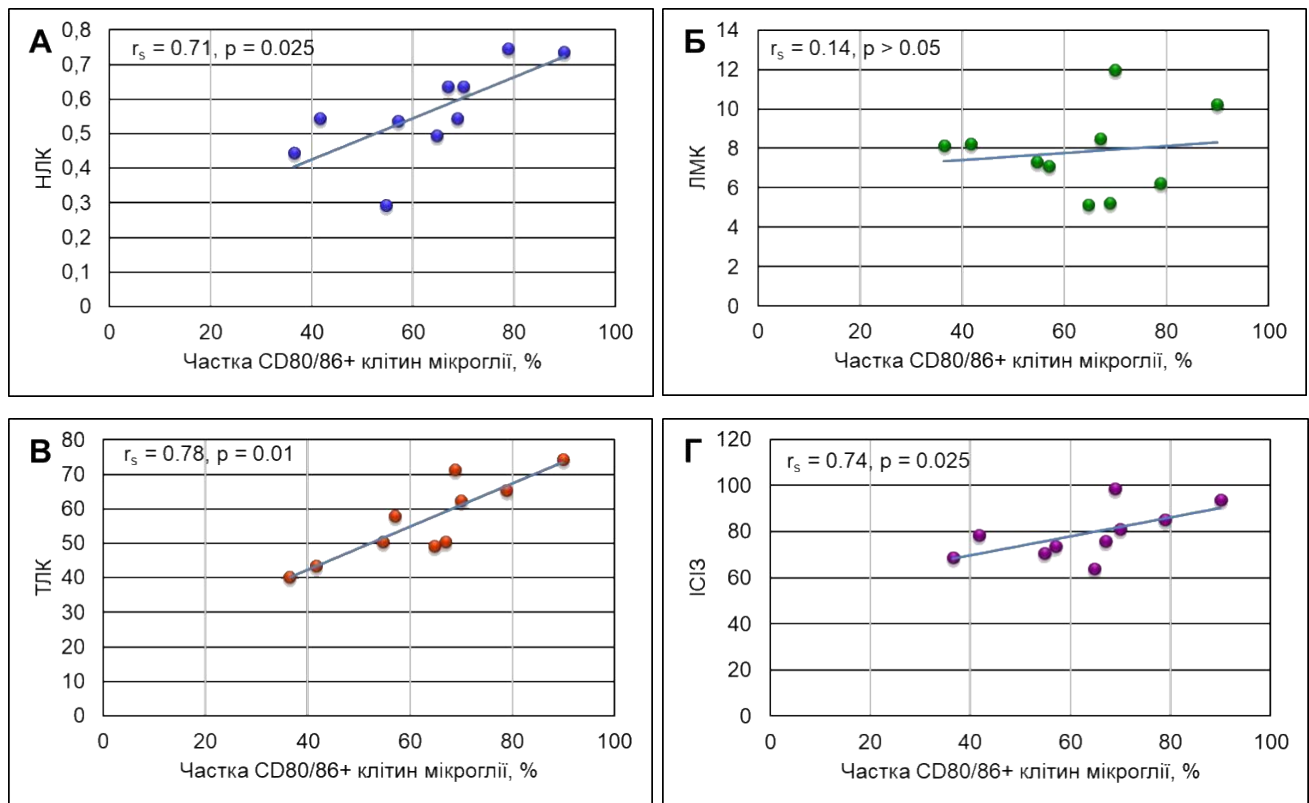
НЛК є дуже чутливим і найбільш часто використовуваним індикатором системного запалення, який відображає зв'язок і антагонізм між вродженим і адаптивним імунітетом під час різних патологічних станів, включаючи нейродегенеративні захворювання [189]. У щурів з 6-OHDA-ХП значення НЛК були в 1,7 раза нижчими, ніж у інтактних тварин, і помірно нижчими порівняно з ХО тваринами. У тварин з ЛПС-ХП навпаки - значення НЛК були майже вдвічі вищими, ніж у контрольних тварин. дНЛК вважається більш чутливим біомаркером для системного запалення порівняно з НЛК, оскільки він відображає рекрутинг недиференційованих нейтрофілів і моноцитів у прозапальне середовище [190]. Значення цього індекса також були підвищені у щурів із ЛПС-ХП порівняно з контрольними тваринами обох груп (в середньому в 2,2 раза), тоді як значення дНЛК у тварин з 6-OHDA-ХП не відрізнялися від таких у контрольних тварин.

ЛМК відображає участь мононуклеарних запальних клітин (моноцитів) у системному запаленні [191]. У наших експериментах значення ЛМК у щурів з 6-OHDA-ХП були майже вдвічі нижчими, ніж у контрольних тварин, тоді як у щурів з ЛПС-ХП – суттєво не відрізнялися від таких у контрольних тварин. ТЛК є маркером, що вказує на зміни кількості тромбоцитів і лімфоцитів, спричинені системним запаленням з протромботичним станом, яке притаманне перебігу Хп у людини [192]. Значення ТЛК у групі ЛПС-ХП були в 1,7 раза вищими, ніж у інтактних тварин, і в 1,5 рази вищими, ніж у ХО щурів. У моделі 6-OHDA-ХП значення ТЛК не відрізнялися в уражених і контрольних тварин. ІСЗВ поєднує кількість нейтрофілів, моноцитів і лімфоцитів, відображає імунний і запальний баланс організму, таким чином відображаючи стан імунодефіциту або виснаження імунітету. ІСІЗ поєднує кількість нейтрофілів, тромбоцитів і лімфоцитів і представляє більш інтегральний індекс системного запалення з протромботичним компонентом порівняно з ТЛК. Erdoğ an (2020) переконливо довів високу діагностичну та прогностичну значущість ІСІЗ на прикладі системного запалення у

хворих на бронхіальну астму [193]. Цей індекс свого часу був розроблений Hu et al. у 2014 році для оцінки перебігу системного запального процесу хворих з онкологічними захворюваннями [194] і наразі успішно застосовується для діагностики і прогнозування низки запальних захворювань [195, 196]. У наших експериментах не було суттєвих відмінностей між значеннями ІЗСВ у хворих і контрольних тварин в обох моделях. Значення ІСІЗ у щурів з 6-OHDA-ХП були помірно нижчими, ніж у контрольних тварин, тоді як у щурів з ЛПС-ХП ці показники були більш ніж у 2 рази вищими порівняно з контрольними тваринами. Це дає підстави вважати, що комплексний маркер системного запалення ІСІЗ, який базується на кількісному співвідношенні лімфоцитів до нейтрофілів і тромбоцитів і є маркером, що відображає імунне запалення при ХП, вказує на наявність системного запального процесу лише у щурів з ХП, індукованою ЛПС.

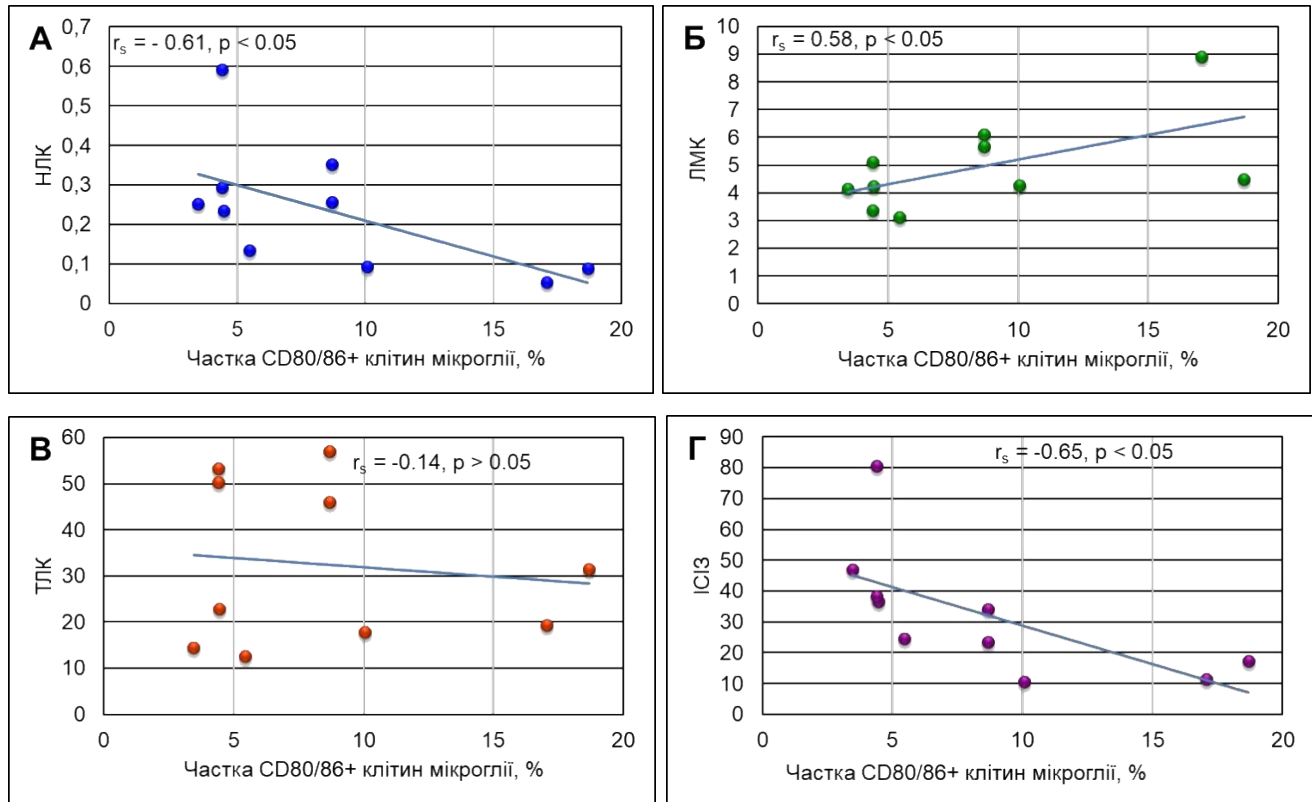
Як зазначено в огляді літератури, активована у процесі нейрозапалення мікроглія сприяє порушенню ГЕБ і поширенню запальних явищ на периферію [197]. Ми припустили, що різні особливості активації мікроглії у тварин з різними моделями ХП можуть корелювати з різними периферичними запальними змінами. Для перевірки цього припущення ми провели кореляційний аналіз між показниками метаболічного профілю мікроглії та лейкоцитарними індексами системного запалення у тварин з обома моделями. Кореляційний аналіз виявив зв'язки різної сили і спрямованості (прямі або зворотні) між часткою CD80/86-позитивних клітин у популяції мікроглії/макрофагів та декількома індексами системного запалення у тварин обома моделями. Однак, ці асоціації значно відрізнялися у щурів з ЛПС-ХП (рис.3.13) і 6-OHDA-ХП (рис. 3.14) за характером і силою взаємозв'язку. У щурів з ЛПС-ХП, мікроглія яких характеризувалася підвищеною часткою CD80/86+ клітин (рис.3.6Б) у сукупності з помірно зниженою, порівняно з контролем, фагоцитарною активністю (рис.3.4Б) встановлено сильну позитивну кореляцію між відсотком CD80/86+ клітин і НЛК, ТЛК і ІСІЗ (рис.3.13 А, В і Г відповідно). Достовірна

кореляція між часткою CD80/86+ клітин і ЛМК у тварин з цією моделлю ХП була відсутня (рис.3.13Б). З огляду на те, що посилення фагоцитарної активності властиве як про-, так і протизапальній поляризованій активації мікроглії, ми схильні вважати, що посилена фагоцитарна активність у сукупності зі збільшенням частки CD80/86+ клітин (що є маркером прозапального метаболічного зсуву) засвідчують прозапальний метаболічний профіль мікроглії тварин з ЛПС-ХП в цілому. Саме медіатори клітин такого метаболічного профілю здатні поширювати запалення на периферію гематогенним шляхом з урахуванням порушення ГЕБ.



**Рис. 3.13.** Кореляційні зв'язки між часткою CD80/86+ клітин мікроглії та лейкоцитарними індексами системного запалення у щурів з ЛПС-індукованою хворобою Паркінсона.

У тварин з 6-ОНДА-ХП ми встановили негативний кореляційний зв'язок середньої сили між часткою CD80/86+ мікрогліальних клітин і НЛК (рис.3.14А) та сильний негативний зв'язок між відсотком CD80/86+ клітин і ІСІЗ (рис.3.14Г). Достовірний зв'язок з ТЛК був відсутній (рис.3.14В).



**Рис. 3.13.** Кореляційні зв'язки між часткою CD80/86+ клітин мікроглії та лейкоцитарними індексами системного запалення у щурів з 6-ОНДА-індукованою хворобою Паркінсона.

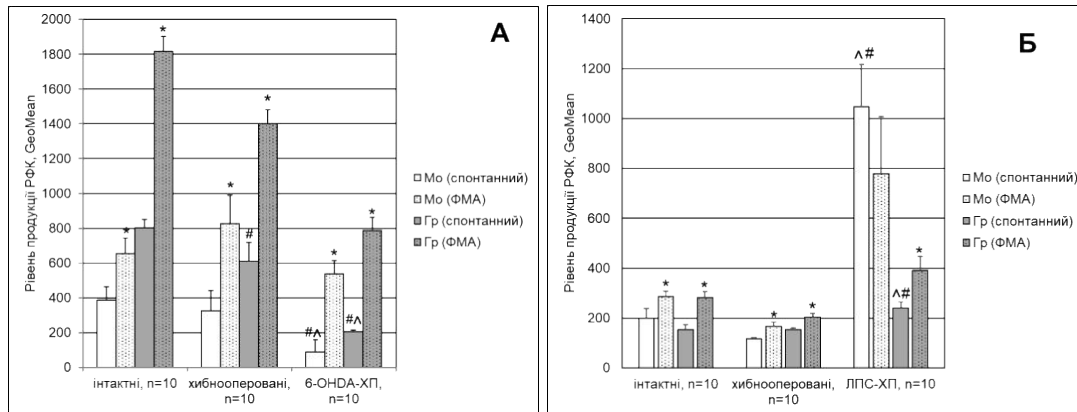
Натомість виявлено позитивний кореляційний зв'язок між часткою CD80/86+ мікрогліальних клітин і МЛК (рис.3.13Б) у тварин з 6-ОНДА-ХП.

На нашу думку виявлення кореляційних зв'язків між метаболічною характеристикою мікроглії і маркерами системного запалення ілюструє існування порочного кола між локальним нейрозапаленням і системними запальними

реакціями в умовах розвитку ХП. Добре відомо, що математичний (статистичний) аналіз результатів дослідження є якісно вищим етапом пізнання, який дає змогу отримати докази висловленого припущення щодо взаємозалежності двох феноменів (явищ) і в подальшому - формулювати гіпотези щодо їх взаємозумовленості [199].

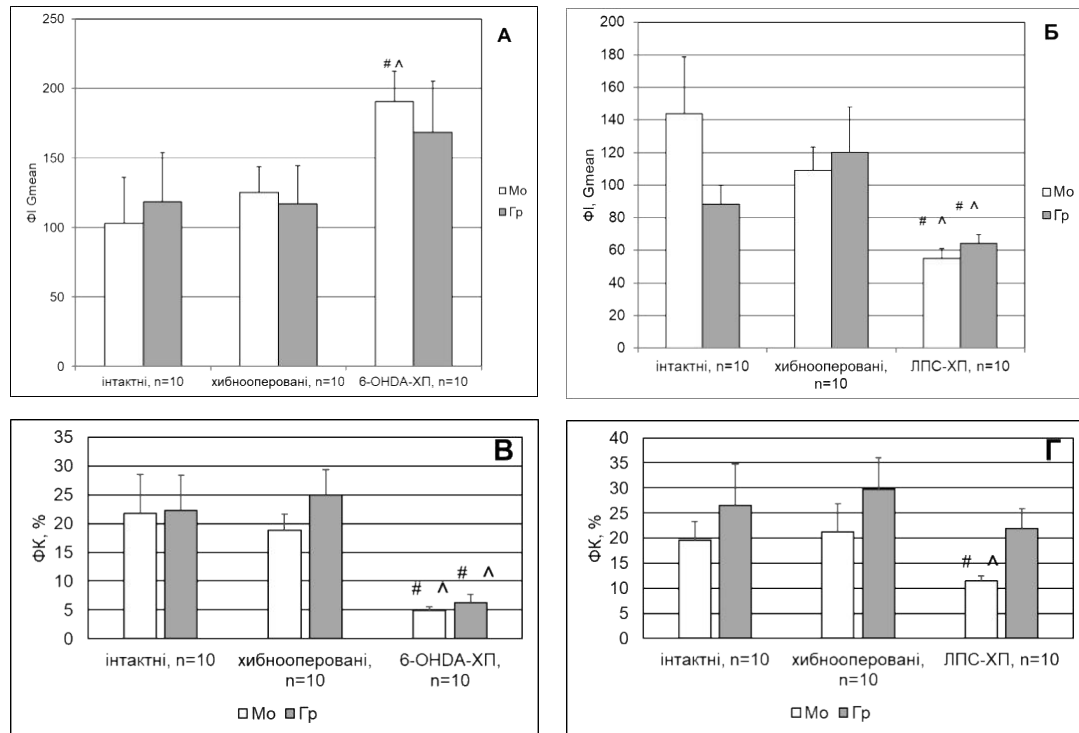
Окрім кількісних характеристик лейкоцитів різних популяцій та кореляційного зв'язку між індексами на їх основі та метаболічними характеристиками мікроглії, ми оцінювали метаболічний профіль циркулюючих фагоцитів: Мо і Гр (Нф). З цією метою було досліджено генерацію РФК, фагоцитарну активність та експресію фенотипових маркерів, залучених до метаболічної поляризації фагоцитів. Як зазначалося у попередньому розділі, підвищення генерації РФК у сукупності зі зниженою фагоцитарною активністю є метаболічним маркером прозапального функціонального зсуву фагоцитів. Прозапальна поляризація циркулюючих і резидентних тканинних фагоцитів пов'язана з безперервним виробленням ними РФК і набуттям антигенпрезентувальної здатності, обидві ці функції супроводжуються затримкою дозрівання фагосом і прогресуючим зниженням фагоцитарної активності [199]. Подібно до резидентних тканинних фагоцитів, класична поляризація циркулюючих фагоцитів також пов'язана з підвищеною поверхневою експресією коstimуляторних молекул CD80/CD86 разом із відсутністю/зменшенням експресії CD206 [200]. У наших експериментах рівень продукції РФК Мо та Гр (далі – нейтрофілами, Нф) у щурів із 6-OHDA-ХП був значно нижчим порівняно з таким у інтактних та ХО тварин (рис. 3.15А). У щурів з ЛПС-ХП рівні генерації РФК значно перевищували показники в контрольних групах (рис. 3.15Б). На додачу до базової генерації РФК ми також досліджували резерв реактивності цієї функції у циркулюючих мієлоїдних клітин за показником КМ (див. Матеріали і методи) після обробки клітин *in vitro* стимулятором оксидативного метаболізму ФМА. Наявність

резерву реактивності окисного метаболізму зареєстровано у Мо та Нф інтактних та ХО тварин, а також у щурів із 6-ОНДА-ХП, що вказує на присутність у складі аналізованої популяції клітин у стані спокою, здатних реагувати позитивно на додатковий стимул.



У тварин з ЛПС-ХП був відсутній резерв реактивності окисного метаболізму Мо, що свідчить про крайній ступінь його активації в цих клітинах або їх метаболічне виснаження, яке може бути викликане персистентним запальним процесом. Фагоцитарна активність Мо і Гр була дещо посиленою у щурів з 6-ОНДА-ХП (рис. 3.16А) і значно зниженою - у щурів з ЛПС-ХП (рис. 3.16Б) порівняно з інтактними та ХО тваринами. Як зазначено у попередньому розділі, посилення фагоцитарної активності є ознакою протизапального метаболічного зсуву фагоцитів, асоційованого з репаративними процесами і процесами загоєння ран, а також асоціюється зі зниженням антигенпрезентувальної здатності,

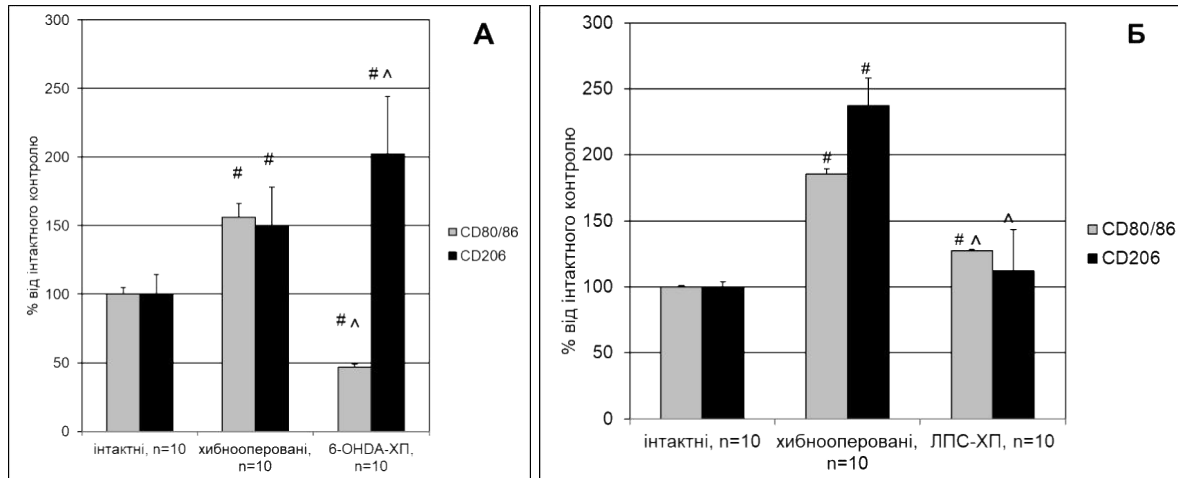
пов'язаної з прозапальною поляризованою активацією фагоцитів. Зниження фагоцитарної активності – ознака прозапального зсуву метаболізму фагоцитів.



**Рис.3.16.** Фагоцитарна активність моноцитів та нейтрофілів у щурів з різними моделями хвороби Паркінсона. А і Б – фагоцитарний індекс, В і Г – фагоцитарне число, А і В – 6-ОНДА-ХП, Б і Г – ЛПС-ХП. Мо – моноцити, НФ – нейтрофіли. **Примітка:** # і ^ вказують на відмінності ( $p < 0,05$ ) в порівнянні зі значеннями інтактних та хибнооперованих тварин відповідно.

Фенотиповий профіль циркулюючих фагоцитів також відрізнявся в у тварин з різними моделями ХП (рис. 3.17 А і Б). Частка позитивних за усіма досліджуваними маркерами клітин статистично достовірно не відрізнялася у тварин різних груп (дані не представлені). Рівень експресії CD206 циркулюючими фагоцитами у тварин з 6-ОНДА-ХП був удвічі більший порівняно з інтактними тваринами, тоді як експресія CD80/86 була значно знижена порівняно як з інтактними, так і з ХО тваринами. Посилення експресії CD206, який належить до

групи рецепторів очищення, залучений у процес ефероцитозу, що притаманний фагоцитам протизапальної спрямованості, у сукупності з посиленням фагоцитарної активності та зниженням рівня експресії костимуляторних молекул, залучених у презентацію антигену, вказують на протизапальну поляризовану активацію циркулюючих фагоцитів у щурів з 6-OHDA-ХП.



**Рис. 3.17.** Експресія фенотипових маркерів циркулюючих фагоцитів щурів з різними моделями хвороби Паркінсона. А– 6-OHDA-індукована ХП, Б – ЛПС-індукована ХП.

**Примітка:** # і ^ вказують на відмінності ( $p < 0,05$ ) в порівнянні зі значеннями інтактних та хибно оперованих тварин відповідно.

У щурів з ЛПС-ХП експресія CD80/86 була незначно підвищена порівняно з інтактними тваринами, а значення експресії CD206 не відрізнялися суттєво від таких у інтактних щурів. У сукупності зі зниженням фагоцитарної активності це може вказувати на помірний прозапальний метаболічний зсув циркулюючих фагоцитів у тварин з ЛПС-ХП.

У тварин ХО групи ми спостерігали підвищений рівень експресії обох досліджуваних фенотипових маркерів. Слід зазначити, що надекспресія CD80 відбувається не лише у разі посилення антигенпрезентувальної активності

фагоцитів, але й у разі диференціювання незрілих клітин на міелоїдні супресорні клітини MDSC (Myeloid-Derived Suppressor Cells), які беруть участь у гальмуванні запалення [201]. Ми схильні розглядати такий фенотиповий профіль циркулюючих фагоцитів у ХО тварин, як ознаку їх протизапальної поляризації, пов'язаної з післяопераційною репарацією тканин. У рамках проведених нами експериментів ми не змогли диференціювати MDSC, виокремлене дослідження яких потребує використання додаткових фенотипових маркерів, тому необхідні додаткові дослідження для підтвердження цієї гіпотези.

Таким чином, проведені нами дослідження засвідчують значно більш виразну маніфестацію системного запалення у щурів з ЛПС-ХП порівняно з 6-OHDA-ХП, що переконливо доводять загально визнані маркери системного запального процесу, такі як індекси системного запалення на основі кількісних характеристик лейкоцитів різних популяцій, а також прозапальні метаболічні характеристики циркулюючих фагоцитів

### **3.5. Фенотипово-функціональні характеристики перитонеальних фагоцитів у щурів з 6-OHDA- та ЛПС-індукованою хворобою Паркінсона.**

Хронічний системний запальний процес спричиняє функціональні зміни у MALT: зміну популяційного складу лімфоїдних і міелоїдних клітин і навіть появу ектопічних третинних (індукованих) організованих лімфоїдних утворів [202, 203]. Як зазначено в огляді літератури, на залученні представництва MALT у шлунково-кишковому тракті (GALT – Gut-Associated Lymphoid Tissue) ґрунтується гіпотетична модель ініціювання ХП через вісь кишечник-мозок [90]. Згідно цієї моделі, запалення у кишечнику, ключовими ефекторами якого є резидентні і рекрутовані фагоцити, викликає накопичення альфа-синуклеїну в ентеральній

нервовій системі і його транспорт до головного мозку. Хронічне прогресуюче локальне нейрозапалення, з іншого боку, пов'язане з експортом прозапальних медіаторів на периферію, у т.ч. й до MALT. В останні роки істотних змін зазнала концепція імунологічної привілейованості головного мозку. На сьогодні відомо, що ГЕБ не є абсолютно непроникним, існує і постійно підтримується взаємозв'язок між мозком та периферичною імунною системою. Встановлено також існування представництва лімфатичної системи у мозку – так званої глімфатичної системи, через яку відбувається транспорт біологічно активних медіаторів, а також антигенних субстанцій з мозку на периферію [91]. Презентація антигенних субстанцій, транспортованих з головного мозку, відбувається у периферичних лімфовузлах: назальних та глибоких шийних, які є частиною MALT [92]. Макрофаги перитонеальної порожнини є складовою частиною OALT, яка, як зазначено вище, має багато спільних рис з MALT і бере активну участь в ініціюванні і контролі локальних і системних запальних процесів. До недавнього часу сальник вважався інертною жировою тканиною, присутньою лише для ізоляції черевної порожнини, а тепер він визнаний активним імунологічним органом зі складною структурою, яка унікально підходить для захисту від патогенів і травм. Сальник є джерелом резидентних запальних і стовбурових клітин, доступних для участі в локальному контролі інфекції, загоєнні ран і регенерації тканин. Він тісно пов'язаний із системною судинною мережею та сполучається з центральною нервовою системою і гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковою віссю. Крім того, сальник має здатність проходити через черевну порожнину та секвеструвати ділянки запалення та травми. Він містить функціональні імунологічно активні структурні одиниці, які зазвичай називають «молочними плямами» (Milky Spots). Ці молочні плями являють собою складні вузлики, що складаються з макрофагів і вкраплених лімфоцитів, які є воротами для проникнення запальних клітин у черевну порожнину у відповідь на інфекцію та пошкодження. [204]. Біологічні

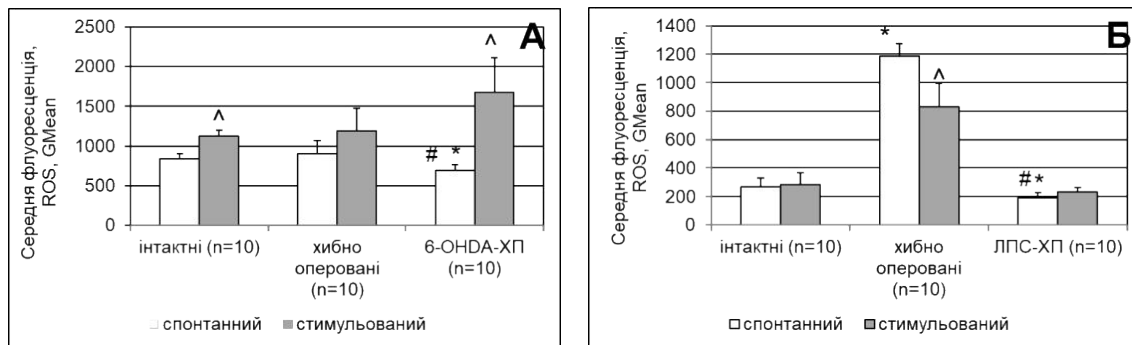
характеристики OALT ще повністю не з'ясовані. Однак, існують численні докази інтегративної ролі перитонеальних макрофагів (ПМ) та інших клітин OALT у патофізіології запальних хвороб [94]. Згідно літературних даних ПМ, подібно до інших периферичних (позамозкових) циркулюючих і резидентних тканинних фагоцитів, залучені до розвитку системного запалення за умов розвитку синуклеїнопатій. Згідно нечисленних літературних повідомлень, функціональний стан периферичних міелоїдних клітин змінюється у ході розвитку ХП від прозапальної активації на початкових на її пізніх етапах [95]. Однак, детальний аналіз тематичної літератури показав практично повну відсутність інформації щодо функціонального стану ПМ як у хворих з ХП, так і у тварин з моделями цього захворювання. З огляду на вище зазначене завданням цієї частини роботи було дослідження метаболічного профілю ПМ у тварин з різними моделями ХП.

Аналіз фенотипових та функціональних характеристик ПМ у наших дослідженнях виявив їх відхилення від контролю у тварин з обома моделями ХП, що вказує на залучення OALT у розвиток системного запалення, асоційованого з експериментальним геміпаркінсонізмом.

ПМ тварин з 6-OHDA-ХП характеризувалися незначним зниженням генерації РФК при збереженні значного метаболічного резерву цієї функції (рис.3.18А). Синтез РФК у щурів з ЛПС-ХП був достовірно нижчим порівняно з інтактними і ХО тваринами (рис.3.18Б). резерв реактивності оксидативного метаболізму клітин у цих тварин був відсутній.

Додатково до дослідження оксидативного метаболізму ПМ методом проточної цитометрії, у щурів з 6-OHDA-ХП вивчали цю метаболічну реакцію з використанням НСТ-тесту. Проведення цих досліджень було викликане необхідністю порівняння відтворюваності результатів з використанням різних методів і оцінки доцільності використання НСТ-тесту у дослідженнях з ЛПС-індукованою моделлю хвороби. Як показали результати дослідження, характер

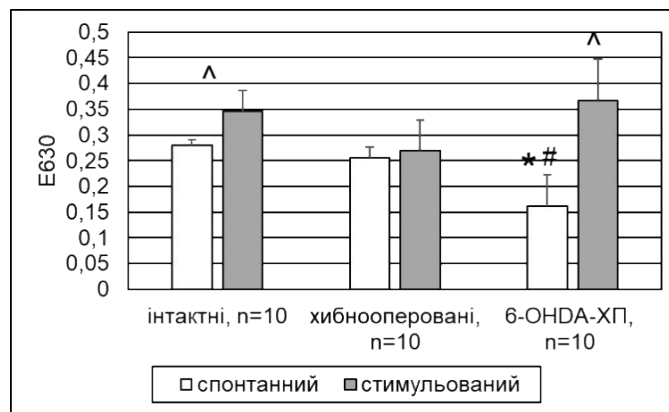
відмінностей між дослідними групами стосовно оксидативного метаболізму, виявлений з використанням проточної цитометрії, цілком ідентичний такому за результатам НСТ-тесту (рис.3.19).



**Рис. 3.18.** Оксидативний метаболізм перитонеальних макрофагів (метод проточної цитометрії) у щурів з різними моделями хвороби Паркінсона. А – 6-OHDA-індукована ХП, Б – ЛПС-індукована ХП.

**Примітка:** \* і # вказують на відмінності ( $p < 0,05$ ) в порівнянні зі значеннями інтактних та хибнооперованих тварин відповідно. <sup>^</sup> -  $p < 0,05$  порівняно з показником спонтанної продукції РФК у відповідній пробі.

Подібно до результатів оцінки оксидативного метаболізму методом проточної цитометрії, у щурів з 6-OHDA- показники спонтанної генерації реактивних форм кисню були статистично достовірно нижчими порівняно з аналогічними показниками у інтактних і хибнооперованих тварин. Резерв реактивності був присутній лише у ПМ інтактних тварин і тварин з ХП. Значення КМ були подібними при їх визначення із використанням різних методів. Зокрема, КМ фагоцитів інтактних тварин, визначений методом проточної цитометрії становив  $34,1 \pm 6,7$ , визначений за результатами НСТ-тесту –  $28,8 \pm 9,9$ . КМ ПМ хибнооперованих тварин, визначений методом проточної цитометрії був  $31,3 \pm 7,1$ , розрахований за результатами НСТ-тесту –  $21,2 \pm 11,8$ . КМ щурів з 6-OHDA-ХП, визначений методом проточної цитометрії становив  $141,5 \pm 12,9$ , а розрахований за результатами НСТ-тесту  $127,1 \pm 26,4$ .



**Рис. 3.19.** Оксидативний метаболізм перитонеальних макрофагів (НСТ-тест) у щурів з 6-OHDA-індукованою ХП.

**Примітка:** \* і # вказують на відмінності ( $p < 0,05$ ) в порівнянні зі значеннями інтактних та хибнооперованих тварин відповідно. ^ -  $p < 0,05$  порівняно з показником спонтанної продукції РФК у відповідній пробі.

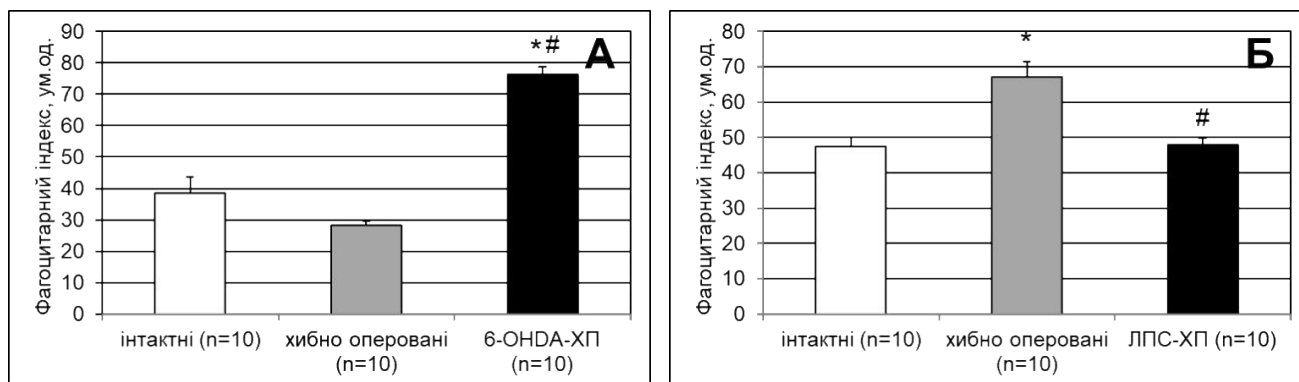
НСТ-тест впродовж багатьох років використовується для оцінки киснезалежного метаболізму фагоцитів. Це простий у виконанні і низьковартісний метод. Однак, він має низку недоліків, не притаманних методу проточної цитометрії. Зокрема, цей метод не дозволяє виокремити з аналізу мертві клітини, що легко виконується методом проточної цитометрії. Крім того, інтерпретація результатів і достовірність висновків, отриманих з використанням НСТ-тесту ускладнені комплексною хімією реакції відновлення нітросинього тетразолію, яка лежить в основі цього аналізу. НСТ піддається відновленню з утворенням нерозчинного формагану за дії супероксидного аніону. Однак, при цьому значна кількість ферментів здатна до відновлення НСТ. Наприклад, НАДН або НАДФН, як донор електронів, генеруватимуть відповідь, яка маскується під реактивний кисень. Таким чином, хоча супероксид аніон теоретично здатний відновлювати НСТ, така сама відповідь може бути згенерована низкою оксидоредуктаз з використанням альтернативних донорів електронів (цитохром Р450- і цитохром b5-редуктази). Carboxy- $H_2DCFDA$  — це флуорогенний зонд для виявлення реактивних

проміжних продуктів кисню у фагоцитах. Гідролізований барвник флуоресціює при взаємодії з активними формами кисню, в т.ч перекисом водню та гідроксильним радикалом, але не супероксидним аніоном. Його додаткові негативні заряди покращують його утримання порівняно з некарбоксільованими формами. Оцінка киснезалежного метаболізму методом проточної цитометрії з використанням цього барвника добре стандартизується і відтворюється від партії до партії реактиву [205]. Окрім технологічних недоліків методу НСТ-тесту ми також відмітили більшу (порівняно з методом проточної цитометрії) варіабельність показників в межах паралельних повторів і між усередненими показниками окремих тварин в групі, що є додатковим недоліком. Зважаючи на те, що дані, отримані з використанням двох різних методів виявилися цілком співтавними, ми вирішили у подальших дослідженнях віддати перевагу методу проточної цитометрії і вважали недоцільним подальше використання НСТ-тесту для оцінки оксидативного метаболізму фагоцитів тварин з ЛПС-індукованою ХП.

Фагоцитарна активність ПМ, оцінена за фагоцитарним індексом, у тварин з 6-OHDA-ХП була майже вдвічі вищою порівняно з інтактними і ХО тваринами і (рис.3.20А). Ендоцитарна активність ПМ у тварин з ЛПС-ХП була на рівні інтактних тварин і достовірно нижчою порівняно з показником хибнооперованих щурів (рис.3.20Б). Слід зазначити, що частка фагоцитуючих клітин перитонеальної порожнини у тварин всіх груп з обома моделями ХП статистично достовірно не відрізнялася і становила, в середньому біля 15% (дані не представлені).

Фенотиповою особливістю ПМ щурів з 6-OHDA-ХП було статистично достовірно, порівняно як з інтактними, так і з ХО тваринами, зниження рівня експресії CD80/86 – фенотипового маркера прозапальної активованої поляризації фагоцитів – порівняно з інтактними та ХО щурами (рис.3.21А). При цьому рівень експресії манозного рецептора, що належить до рецепторів очищення, CD206 був

помірно підвищений: статистично достовірно порівняно з показником хибнооперованих щурів.



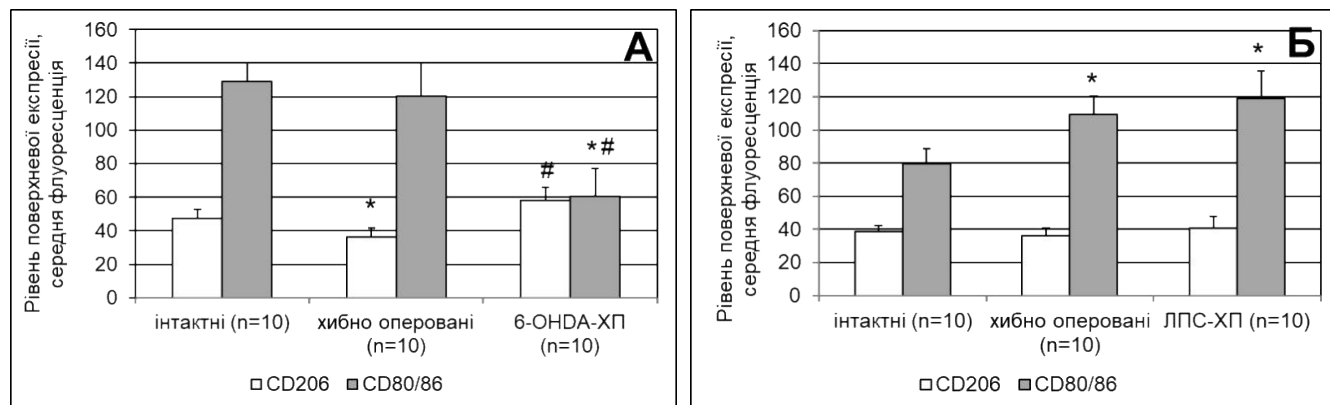
**Рис.3.20.** Фагоцитарна активність перитонеальних макрофагів у щурів з різними моделями хвороби Паркінсона. А – 6-OHDA-індукована ХП, Б – ЛПС-індукована ХП.

**Примітка:** \* і # вказують на відмінності ( $p < 0,05$ ) в порівнянні зі значеннями інтактних та хибнооперованих тварин відповідно.

У сукупності такі фенотипово-функціональні характеристики вказують на помірний M2 функціональний зсув, характерний для залучення фагоцитів у репаративні та регенеративні процеси. В даному випадку це може свідчити про спонтанну регенерацію у тварин з 6-OHDA-ХП, у т.ч. спонтанне завершення системного запалення, які описані в літературі [206].

Фенотипові характеристики ПМ щурів з ЛПС-ХП відрізнялися від таких у тварин з 6-OHDA-ХП і включали підвищений рівень експресії CD80/86 (рис.3.21Б). Рівень експресії CD206 перитонеальними фагоцитами тварин з цією моделлю не відрізнявся від аналогічних показників тварин контрольних груп. Слід відмітити, що частка клітин перитонеальної порожнини, позитивних за досліджуваними

маркерами не відрізнялася статистично вірогідно у тварин контрольних і дослідних груп в обох моделях ХП (дані не представлені).



**Рис. 3.21.** Експресія фенотипових маркерів перитонеальними макрофагами щурів з різними моделями хвороби Паркінсона. А– 6-OHDA-індукована ХП, Б – ЛПС-індукована ХП.

**Примітка:** \* і # вказують на відмінності ( $p < 0,05$ ) в порівнянні зі значеннями інтактних та хибно оперованих тварин відповідно.

У сукупності такі метаболічні і фенотипові характеристики ПМ (пригнічений оксидативний метаболізм у сукупності з надекспресією CD80/86 на 28 добу після ініціювання хвороби) у тварин з ЛПС-ХП можуть вказувати на їх метаболічне виснаження в результаті тривалої запальної активації.

Слід відмітити, що у ПМ ХО тварин ми спостерігали значне посилення фагоцитарної активності, оксидативного метаболізму (у відсутності метаболічного резерву цієї функції) і експресії CD80/86 порівняно з інтактними тваринами. Це може бути наслідком потужної пролонгованої прозапальної дії засобів для анестезії, які вводилися внутрішньочеревно. Однак, висловлене припущення потребує додаткових досліджень, зокрема спрямованих на більш детальне вивчення фенотипу клітин, оскільки у складі фагоцитів перитонеального ексудату можуть

бути як резидентні (так звані великі ПМ, які походять з жовткового мішка), так і рекрутовані (так звані малі ПМ, які диференціювали *in situ* з моноцитів периферичної крові) макрофаги.

У сукупності отримані нами дані підтверджують недавні клінічні спостереження щодо порушення функцій ПМ, у т.ч. їх цитокінового профілю та фагоцитарної активності, у пацієнтів із синуклеїнопатіями, такими як ХП. Фенотипові і функціональні відхилення від контролю ПМ тварин з експериментальним геміпаркінсонізмом засвідчують відтворення в експериментальних моделях залучення OALT у патофізіологію ХП. Фенотипово-функціональний профіль ПМ у щурів із ЛПС-ХП подібний до такого для клінічного перебігу хвороби.

Важливим органом черевної порожнини з точки зору імунології, у т.ч. і функціонування системи фагоцитів є селезінка, яка є найбільшим вторинним лімфоїдним органом, становить біля 25% всієї лімфоїдної тканини в організмі людини і тварин і є найбільшим резервуаром клітин імунної системи і еритроцитів [207].

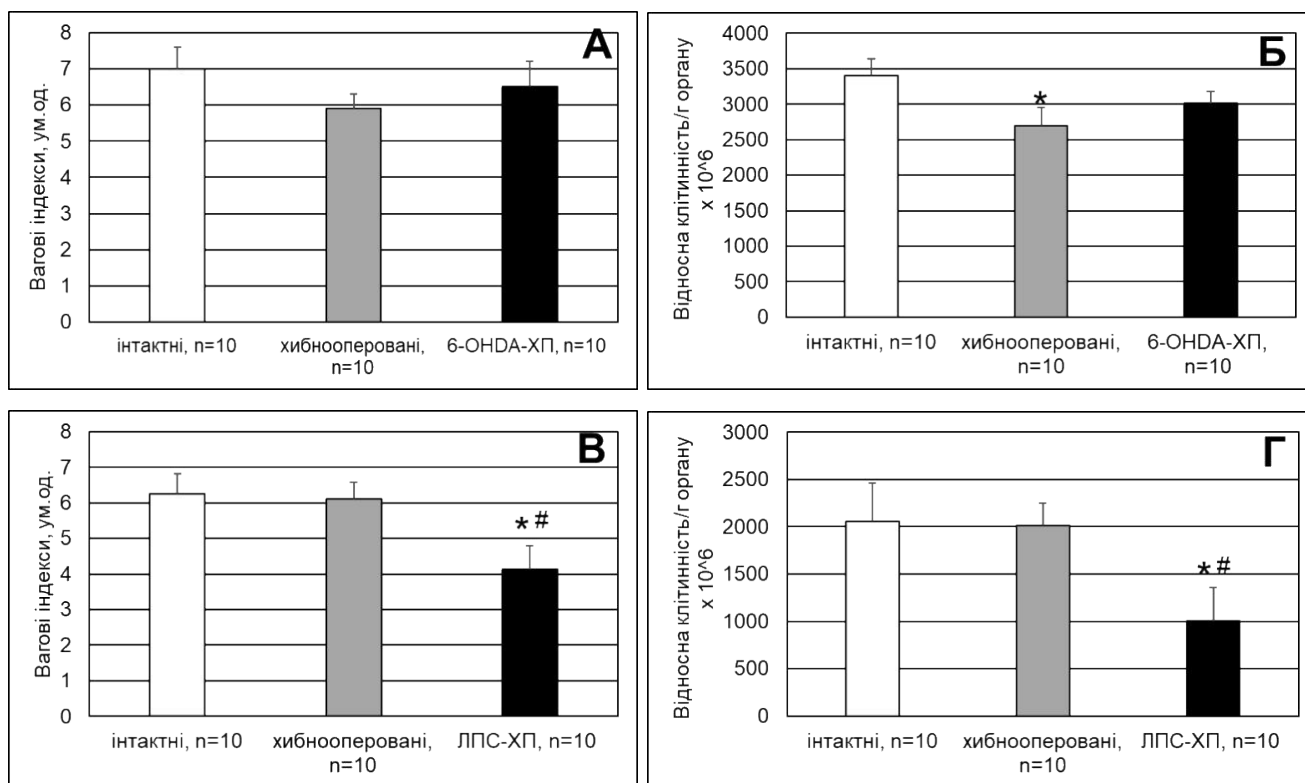
На додачу до гіпотези щодо ролі осі кишечник-мозок у патогенезі і патофізіології ХП, останнім часом активно дискутується участь осі селезінка-мозок у розвитку та посиленні нейродегенерації, у т.ч. в умовах розвитку ХП. Накопичені за останню декаду експериментальні докази і результати клінічних спостережень вказують на те, що вісь мозок-селезінка є важливим шляхом нейроімунної взаємодії як в нормі, так і в умовах розвитку патологічних станів. Реакція селезінки на стрес та/або патологічні зміни у нервовій системі відображається трьома способами: зміною морфології селезінки (зменшенням або збільшенням її розміру, довжини, загальної відносної клітинності), зміною популяційного складу імунних клітин (з переважанням клітин вродженого імунітету з прозапальним метаболічним профілем і ефекторів адаптивного імунітету Th1-профілю або міелоїдних клітин

протизапального фенотипу у поєднанні із MDSC і ефекторів адаптивного імунітету Th2-профілю і регуляторних клітин) і зміною рівня синтезу та профілю розчинних медіаторів запалення (цитокінів Th1 або Th2, ейкозаноїдів тощо) [208, 209]. Системне запалення або хронічний соціальний стрес можуть викликати транзиторну спленомегалію або гіпоспленію у гризунів [210]. Крім того, нещодавне дослідження показує, що селезінка може регулювати системний гуморальний імунний захист шляхом впливу на дві ділянки мозку: пов'язані з кортикотропіном нейрони в паравентрикулярному ядрі і центральне ядро мигдалеподібного тіла [211]. Аферентна та еферентна передача сигналів блукаючого нерва також може сприяти зв'язку мозку та селезінки [212].

Участь селезінки у патофізіології нейродегенерації засвідчена низкою експериментальних досліджень. Зокрема, Chu et al., 2013 показали, що видалення селезінки зменшує нейродегенерацію в різних моделях травм головного мозку [213]. Спленектомія також зменшує кількість імунних клітин у мозку і володіє нейропротекторним ефектом в цілому. Seifert et al., 2012 показали, що формування автоантитіл до молекул мозкового походження у випадку розвитку автоімунного компоненту нейроптаологічних станів також зменшується з видаленням селезінки. Крім того, знижується сироватковий рівень прозапальних цитокінів [214]. Ця ж сама наукова група встановила, що розмір і загальна клітинність селезінки у тварин з ішемічним інсультом динамічно змінюються в динаміці прогресування патологічного стану. У гостру фазу (одразу після ініціювання ішемічного або геморагічного інсульту) спостерігається різка спленомегалія зі збільшенням загальної клітинності селезінки. З часом розмір селезінки нормалізується і далі прогресивно зменшується до стану гіпоспленії. Автори цієї роботи довели, що такі зміни морфології селезінки пов'язані з міграцією спленоцитів, у т.ч. фагоцитів селезінки. У гостру фазу запального процесу вони зареєстрували зростання рекрутингу попередників з кісткового мозку до селезінки і посилення

проліферативної активності резидентних спленоцитів, що й викликало спленомегалію і збільшення показника клітинності. Після цього було зареєстровано посилення міграції спленоцитів у кров, наслідком чого було зменшення ваги і клітинності селезінки. Більше того, мічені спленоцити (методологія була використана для спостереження їх міграції) виявлялися у великій кількості у запаленій ділянці мозку. Серед виявлених у мозку спленоцитів велику частку складали мононуклеарні фагоцити [214]. У мишей з МРTP-індукованою ХП зареєстровано зменшення розмірів селезінки. Однак, у групі тварин з цією моделлю, які отримували імуномодулятор, спостерігалось збільшення кількості спленоцитів і розміру селезінки, що асоціювалося з пригніченням нейрозапальної реакції, моторної дисфункції та втрати ДА, що вказує на посередницьку роль селезінки в імунологічному зв'язку між центральною нервовою системою і периферичною імунною системою при ХП []. У сукупності ці дослідження показують, що селезінка є периферичним центром імунної відповіді на пошкодження тканин мозку і може бути одним з важливих осередків розвитку системного запалення, як наслідку локального нейрозапалення.

За результатами наших досліджень вагові індекси селезінки у тварин з 6-ОНДА-ХП (рис.3.18) не відрізнялися статистично вірогідно від аналогічних показників контрольних тварин (інтактних і хибнооперованих) (рис.3.22А). Не виявлено відмінностей між дослідними групами у цій моделі і в показниках відносної клітинності селезінки (рис.3.22Б). Натомість у тварин з ЛПС-ХП вагові індекси селезінки на момент завершення експерименту (29 добі після операції) були статистично достовірно нижчими за аналогічні показники у інтактних і хибнооперованих тварин (рис.3.22В). Зниженими порівняно з контрольними групами були і показники відносної клітинності селезінки у щурів з цією моделлю хвороби (рис.3.22Г).



**Рис. 3.22.** Вагові індекси (А, В) та відносна клітинність (Б, Г) селезінки у щурів з різними моделями хвороби Паркінсона.

**Примітка:** \* і # вказують на відмінності ( $p < 0,05$ ) у порівнянні зі значеннями інтактних та хибнооперованих тварин відповідно.

Згідно з літературними даними [214], зменшення вагових індексів і клітинності селезінки може бути наслідком міграції спленоцитів. Більше того, в число таких мігруючих спленоцитів можуть входити спленічні макрофаги прозапального метаболічного профілю, які можуть вносити вклад у формування прозапального фенотипу ПМ і у розвиток та персистенцію системного запалення в цілому [215].

Таким чином, отримані нами дані ілюструють залучення органів черевної порожнини у розвиток системного запалення у тварин з ЛПС-ХП. Це може служити додатковим доказом більш адекватного і повного відтворення запальних процесів, притаманних клінічному перебігу ХП у цій моделі, порівняно з 6-ОНДА-ХП.

## УЗАГАЛЬНЕННЯ

Макрофаги, моноцити і нейтрофіли, які вивчалися у роботі, є професійними мієлоїдними фагоцитами, які широко розповсюджені у тканинах організму людини і тварин. Макрофаги – це мононуклеарні фагоцити і резидентні фагоцити всіх без виключення тканин, у т.ч. так званих імунологічно привілейованих, у число яких входять головний мозок, внутрішня камера ока, яєчка і матка у стані вагітності [216]. Резидентні макрофаги тканин, головним чином, походять із попередників жовткового мішка, заселяють тканину у період її ембріонального розвитку і характеризуються здатністю до самооновлення впродовж всього життя організму. Їх основна функція – підтримка гомеостазу тканини, тому резидентні макрофаги різних тканин адаптовані брати участь у метаболічних процесах, притаманних різним тканинним елементам. З цієї причини резидентні тканинні макрофаги різної локалізації мають унікальні фенотипово-функціональні характеристики, які можуть дуже істотно відрізнити їх.

Підтримка гомеостазу, окрім безпосередньої участі у метаболічних процесах, притаманних тій чи іншій тканині, включає також скавенджинг (прибирання) програмовано загиблих клітин тканини і стимуляцію міграції та диференціювання тканинних стовбурових елементів з метою відновлення тканинної цілісності [217]. Резидентні макрофаги тканин є також клітинами-вартівими імунної системи, які першими розпізнають сигнали небезпеки (Danger-Associated Molecular Patterns, DAMPs), пов'язані з інфекцією (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMPs) або ушкодженням (Damage-Associated Molecular Patterns, DAMPs), та ініціюють імунну відповідь у формі запалення, яке може бути деструктивним (захисним, спрямованим на видалення джерела сигналів небезпеки) або репаративним, спрямованим на відновлення тканинного гомеостазу. Запалення деструктивного характеру у ході протиінфекційної або посттравматичної відповіді

з часом змінюється на репаративне запалення [218]. Інша популяція мононуклеарних мієлоїдних фагоцитів – моноцити – переважно циркулюючі у крові клітини. Однак, нещодавно було встановлено гетерогенність популяції моноцитів з їх поділом на класичні, проміжні і некласичні. Класичні моноцити – це субпопуляція, що циркулює у периферичній крові і рекрутується у тканини у разі виникнення запалення, ініційованого клітинами-вартовими. Некласичні моноцити – це резидентні фагоцити васкулярної стінки, які відповідальні за підтримку її цілісності. Встановлено їх здатність залишати судинну стінку і мігрувати у периваскулярний простір тканин у разі розвитку запалення [219]. Нейтрофіли – поліморфноядерні мієлоїдні фагоцити – донедавна вважалися виключно циркулюючими клітинами, які є найпоширенішою популяцією лейкоцитів периферичної крові. Однак, нещодавно встановлено, що нейтрофіли можуть бути резидентними клітинами тканин і, подібно до макрофагів, брати участь у підтримці тканинного гомеостазу. Такі нейтрофіли називають внутрішньосудинними (*marginated within the vascular bed*), оскільки їх перебування у тканині є результатом маргінації в обмеженій ділянці тканинного судинного ложа. Подібно до моноцитів, нейтрофіли виявлені і у позаваскулярному просторі у складі паренхіми багатьох органів [220]. Постійна присутність нейтрофілів, як резидентних тканинних клітин, доведена і для головного мозку. Єдиною структурою головного мозку гризунів, де виявлена постійна присутність нейтрофілів, є ольфакторна ділянка [221]. Функції тканинних резидентних моноцитів і нейтрофілів з'ясовані лише частково і наразі активно досліджуються.

Участь у підтримці тканинного гомеостазу, а також захист тканин від інфекцій та ушкодження зумовили необхідність обладнання фагоцитів, особливо резидентних тканинних макрофагів, широким спектром рецепторів, які забезпечують чутливу і диверсифіковану реакцію цих клітин на будь-які зміни в оточуючому середовищі і надзвичайну пластичність їхнього метаболізму. У процесі

реакції на зміну в оточуючому середовищі фагоцити можуть набувати численні метаболічні стани або стани поляризованої активації, спрощений опис яких зводиться до констатації існування двох опозитних профілів поляризованої активації (метаболічних профілів) цих клітин: прозапального (M1 для моноцитів і макрофагів та N1 – для нейтрофілів) і протизапального (M2 для моноцитів і макрофагів і N2 – для нейтрофілів) [126, 222]. Найбільш унікальною популяцією тканинних резидентних макрофагів справедливо вважається мікроглія – найбільша за кількістю і найбільш вивчена субпопуляція резидентних макрофагів головного мозку (порівняно з так званими «прикордонними» макрофагами, локалізованими у васкулярному та периваскулярному просторі менінгеального судинного сплетення). Патерни метаболічної поляризації або поляризованої активації мікроглії часто не вкладаються у парадигму M1/M2 поляризації фагоцитів. З огляду на це в літературі все частіше зустрічається поняття «мікроглії, асоційованої з хворобою» (disease-associated microglia), яке дозволяє виокремити унікальні риси поляризованої активації цих клітин в умовах розвитку патологічних станів головного мозку інфекційної і неінфекційної природи [223].

Гостра і особливо хронічна прозапальна поляризована активація фагоцитів усіх популяцій робить їх компонентами патофізіології і патогенезу запальних захворювань – найбільшої групи патологічних станів людини і тварин [224]. У перелік хронічних запальних захворювань входять і нейродегенеративні хвороби, у т.ч. ХП. Як зазначено в огляді літератури, ХП розглядається на сьогодні як мультифакторне захворювання, важливим компонентом патогенезу якого є хронічне запалення. Причому однаково важливу роль в ініціюванні і прогресуванні ХП відіграють локальне нейрозапалення і системне запалення, які здатні створювати порочне коло, надаючи захворюванню хронічного перебігу. Алгоритм лікування ХП, як і її патофізіологія, є комплексним і включає використання засобів і заходів, спрямованих на запобігання розвитку синуклеїнопатії, симптоматичне

лікування, призначене для відновлення та/або стримування моторних і немоторних порушень, застосування препаратів для відновлення функції кишечника тощо [225]. Одним з компонентів такого комплексного лікування є застосування протизапальних традиційних і новостворених засобів [226, 227]. Механізми і динаміка локального і системного запалення та їх взаємозв'язок у патофізіології та патогенезі ХП залишаються нез'ясованими. З'ясування цих питань потребує використання тваринних моделей, які адекватно відтворюють запальні процеси, притаманні перебігу ХП. Пошук нових терапевтичних мішеней і розробка препаратів, спрямованих на гальмування запалення у комплексному лікуванні ХП, також потребують тваринних моделей такого типу. Як зазначено в огляді літератури, існує достатньо велика кількість тваринних моделей ХП, які умовно можна поділити на генетичні та інтервенційні. Генетичні моделі більшою мірою застосовуються для вивчення спадкових форм ХП, інтервенційні – для дослідження патофізіології і патогенезу, а також розробки способів лікування спорадичних форм ХП, які є значно більш поширеними, порівняно зі спадковими. Комплексний характер патогенезу ХП зумовлює використання для вивчення різних його компонентів різних моделей хвороби. Згідно літературних даних, найчастіше для дослідження запального компонента у патогенезі і патофізіології ХП застосовується канонічна 6-OHDA-індукована модель захворювання і дещо пізніше розроблена ЛПС-індукована модель. Публікації стосовно цих моделей зосереджені переважно на їх використанні для дослідження нейрозапалення. При цьому порівняльна оцінка метаболічного профілю фагоцитів, у т. ч. мікрогліальних клітин, які є основними ефекторами нейрозапалення, для цих моделей у літературі відсутня. Саме тому ці моделі були обрані для порівняльного аналізу метаболічного профілю фагоцитів різної локалізації, що дає змогу оцінити релевантність кожної з моделей для дослідження запального компонента в патофізіології та патогенезі ХП: відтворення локального і системного запалення. Терміном для проведення такого

аналізу був обраний 28 день з моменту ініціювання захворювання (інтрацеребрального уведення 6-OHDA та ЛПС), оскільки це дало змогу виявити тривалі (хронічні) запальні процеси. Для проведення такого аналізу першопочатково необхідно було порівняти відтворення основних симптоматичних проявів ХП у тварин з обома моделями: рівня загибелі ДН та моторних і немоторних розладів. Згідно результатів досліджень *in vitro*, у культурі ДН 6-OHDA викликає їх загибель на рівні 89%, ЛПС не чинить прямого токсичного впливу. Однак, у змішаній культурі ДН і мікрогліальних клітин 6-OHDA спричиняє лише помірну загибель ДН, у той час як обробка ЛПС викликає загибель 70% ДН [228]. Ми виявили порівняні порушення локомоторної активності, ознаки шлунково-кишкової дисфункції та тривожної поведінки в обох моделях. У той же час втрата ДН була значно більш виразною у щурів з 6-OHDA-ХП, порівняно з тваринами з ЛПС-ХП, що узгоджується з літературними даними і засвідчує придатність обох моделей з точки зору відтворення симптомів хвороби. При цьому ми спостерігали більш явний прозапальний метаболічний зсув у клітинах мікроглії/макрофагів у щурів із ЛПС-ХП (про що свідчить значне збільшення фракції позитивних клітин CD80/86). Це свідчить про те, що поведінкові порушення у щурів з 6-OHDA-ХП можуть бути насамперед зумовлені пошкодженням ДН в результаті селективної токсичної дії 6-OHDA [15]. Рухові та немоторні симптоми у тварин з ЛПС-ХП можуть бути пов'язані, перш за все, з більш виразною прозапальною активацією популяції клітин мікроглії/макрофагів. Додатковою причиною розвитку моторних порушень і немоторних симптомів у тварин з цією моделлю може бути виявлений нами реактивний астрогліоз, який одночасно є тригером персистентного мікрогліозу. Наші дані узгоджуються з висновками Parra et al. (2020), які показали, що 6-OHDA спричиняє високу ступінь втрати ДН і нижчий ступінь активації мікроглії порівняно з ЛПС, як було доведено за допомогою аналізу морфології цих клітин у дослідженнях *in vivo* [229]. Метаболічні характеристики популяції

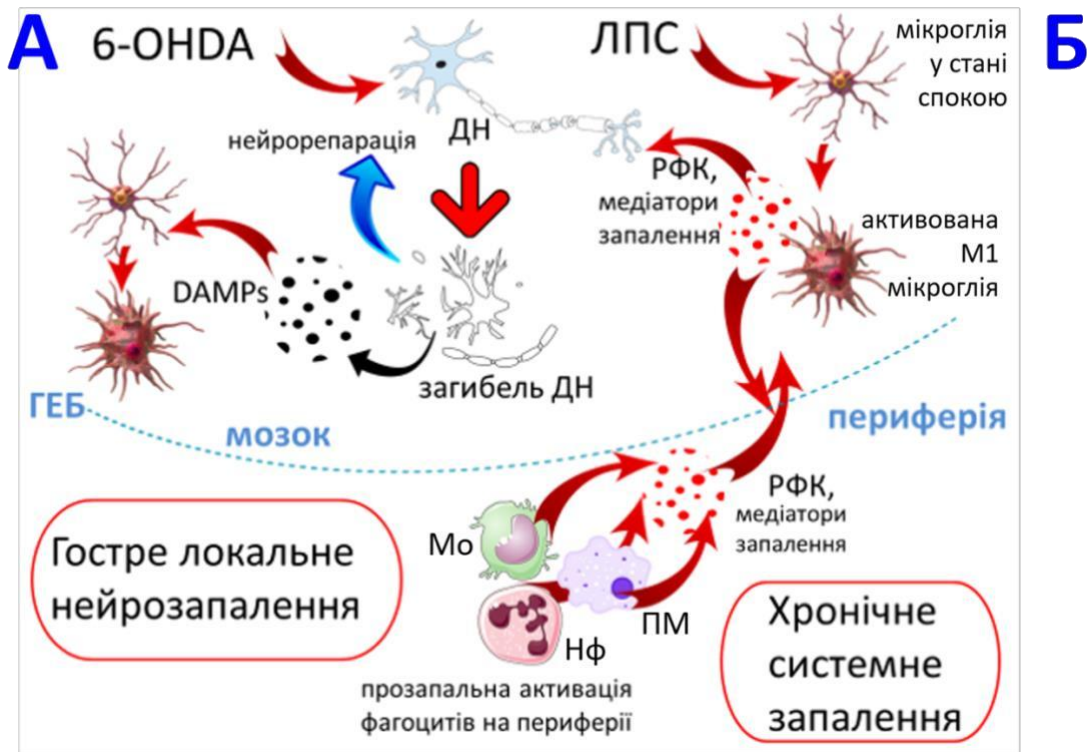
мікроглії/макрофагів у тварин з обома дослідженими моделями ХП на момент припинення експерименту (29-й день після операції) були багато в чому ідентичними: знижена фагоцитарна активність разом із персистентною активацією окисного метаболізму, яку констатували за відсутністю резерву реактивності цієї функції у тварин з ЛПС-індукованою хворобою, вказують на прозапальний функціональний зсув клітин [74]. Добре відомо, що М1 поляризована активація фагоцитів супроводжується безперервною генерацією РФК і набуттям антигенпрезентувальної здатності, обидві ці функції супроводжуються затримкою дозрівання фагосом і прогресуючим зниженням фагоцитарної активності [230, 231]. Однак, як зазначалося вище, для клітин мікроглії, активованих за про- або протизапальним профілем, характерним є посилення фагоцитарної активності у будь-якому випадку. Тим не менш, ми зареєстрували деякі важливі відмінності в патернах активації популяції мікроглії/макрофагів у 6-ОНДА- та ЛПС-індукованих моделях ХП. На момент припинення експерименту частка фагоцитуючих клітин, а також частка CD80/86-позитивних клітин у популяції мікроглії/макрофагів залишалися досить високими у тварин із ЛПС-ХП. Це може вказувати на триваюче нейрозапалення у тварин з цією моделлю навіть через 28 днів після початку захворювання. Це припущення узгоджується з даними, представленими Janda et al. (2018) [164], згідно з якими прозапальна та фагоцитуюча TREM2-позитивна мікроглія з підвищеною експресією молекул головного комплексу гістосумісності (МНС) II і коstimуляторних молекул є преважаючою у пацієнтів з ХП, особливо на пізніх стадіях захворювання. У наших експериментах для дослідження фагоцитозу мікроглії ми використовували як об'єкт ендоцитозу бактеріальні клітини. TREM2 (тригерний рецептор, експресований на мієлоїдних клітинах) бере участь як у фагоцитозі апоптичних нейронів, так і в поглинанні широкого спектру бактерій мікроглією [232]. Це дає підстави вважати, що у щурів з ЛПС-ХП переважає мікроглія (з високою часткою клітин, позитивних за коstimуляторними

молекулами) з метаболічним профілем типовим для перебігу ХП у людини. Частка фагоцитуючих клітин у популяції мікроглії/макрофагів у щурів з 6-OHDA-ХП була значно знижена порівняно з тваринами з ЛПС-ХП. Суттєве зниження відсотка CD80/86-позитивних клітин у сукупності з підвищеною часткою CD206-позитивних клітин також зареєстровано у тварин із 6-OHDA-ХП. Загалом ці дані можуть свідчити про спонтанну резолюцію нейрозапалення у щурів з цією моделлю на момент завершення експерименту. Наше припущення узгоджується з численними літературними даними, у яких гострий характер 6-OHDA-індукованої ХП з потенціалом спонтанної нейрорепарації та резолюції нейрозапалення розглядається як один із недоліків цієї моделі [233-235]. Таким чином, за результатами оцінки метаболічного профілю популяції мікроглії/макрофагів, нами отримано нові докази більш адекватного, наближеного до клінічної картини ХП відтворення нейрозапалення на моделі ЛПС-ХП порівняно з 6-OHDA-ХП. При цьому відтворення моторних і немоторних порушень також є задовільним у цій моделі, хоча і дещо менш виразним, ніж у моделі, індукованій введенням 6-OHDA.

Нейрозапалення із залученням мікроглії, як відомо, створює порочне коло із системним запаленням, що надає ХП хронічного характеру. Медіатори запалення, що виробляються активованою мікроглією рпозапального фенотипу, потрапляють на периферію та активують периферичні імуніцити, у т.ч. і у першу чергу, фагоцити, з наступною появою маркерів системного запалення в крові [236]. Медіатори запалення, синтезовані і секретовані периферичними клітинами імунної системи, у т.ч. фагоцитами, у свою чергу, можуть потрапляти в мозок через нервові або гуморальні шляхи. Гуморальний шлях передбачає транспортування цих медіаторів з кров'ю через порушений ГЕБ. Нервовий шлях пов'язаний із передачею периферичних прозапальних сигналів через вегетативну нервову систему [237] Ці медіатори запалення, транспортуючись до мозку, підтримують і загострюють нейрозапалення, опосередковане мікрогліальними клітинами, та нейродегенерацію.

Крім того, ступінь виразності системного запалення корелює із тяжкістю захворювання [238]. Комплексна оцінка маркерів системного запалення, яка включала аналіз індексів системного запалення на основі кількісних показників лейкоцитів крові та метаболічний профіль циркулюючих фагоцитів засвідчила, що 6-OHDA- та ЛПС-індуковані моделі ХП відрізнялися також у маніфестації системних запальних реакцій. У наших експериментах значення індексів системного запалення, які найбільш точно відображають стійке персистентне системне запалення (НЛК, дНЛК, ТЛК та ІСІЗ) [190], були підвищені порівняно з контролем лише у щурів з ЛПС-ХП, що вказує на те, що системне поширення нейрозапалення, як ознака взаємозв'язку між центральною та периферичною імунною системою, є характерним для цієї моделі, на відміну від 6-OHDA-ХП. Індекси системного запалення корелювали з часткою CD80/86+ клітин у популяціях мікроглії/макрофагів в обох моделях, але по-різному. CD80/86 позитивні мікрогліальні клітини вважаються основним джерелом прозапальних медіаторів, включаючи цитокіни Th1-профілю, які відповідають за поширення нейрозапалення на периферію [74]. Було виявлено, що частка мікрогліальних клітин CD80/86+ позитивно корелює зі значеннями НЛК, ТЛК та ІСІЗ у щурів із ЛПС-ХП. Можна припустити, що ці M1-поляризовані фагоцити з властивостями антигенпрезентувальних клітин пов'язані з поширенням запалення на периферію у цій моделі (рис. 4.1). У щурів із 6-OHDA-ХП частка CD80/86+ мікрогліальних клітин негативно корелювала зі значеннями індексів системного запалення. Це явище можна пояснити подвійною роллю молекул-членів родини B7, до складу якої входять CD80 і CD86, у регуляції імунної відповіді. Нещодавно продемонстровано надекспресію CD80 (B7.1) MDSC, які здатні стимулювати диференціювання наївних Т-клітин на регуляторні Т-клітини. MDSC, одночасно з надекспресією CD80 характеризуються експресією CD206. З огляду на це CD80/86+ клітини

можуть належати як до M1-поляризованих імуностимуляторних мієлоїдних клітин, так і до MDSC, які беруть участь у резолуції запалення [239, 240].



**Рис.4.1.** Схематична репрезентація узагальнення результатів дослідження. А – загибель ДН, викликана 6-OHDA, супроводжується вивільненням DAMPs, які активують мієроглію через ПРР з розвитком нейрозапалення і, ймовірно, короткочасного системного запалення. Після кліренсу 6-OHDA і нейрорепарації відбувається резолуція запалення. Б – ЛПС активує мієроглію через ПРР з виділенням цитотоксичних РФК та РФН (та інших медіаторів запалення), які спричиняють загибель ДН і розвиток нейрозапалення з експортом на периферію медіаторів запалення і розвитком системного запального процесу, котрий, у свою чергу, підтримує персистенцію нейрозапалення, формуючи порочне коло запалення, властиве клінічному перебігу ХП.

З огляду на те, що у тварин з 6-OHDA-ХП зареєстровано збільшення частки CD206-позитивних клітин, можна припустити, що CD80/86+ мікрогліальні клітини, кількість яких негативно корелює з проявом системного запалення, одночасно експресують CD206 і належать до MDSC. Для більш глибокого розуміння виявленого нами явища відмінності кореляційного взаємозв'язку між функціональною характеристикою мікрогліальних клітин та індексами системного запалення у різних моделях ХП, а також для перевірки висловленого припущення щодо механізмів цих відмінностей необхідно у майбутніх експериментах досліджувати патерни активації мікроглії/макрофагів у моделях 6-OHDA- та ЛПС-ХП з використанням диференційованої оцінки CD80, 86 та 206, а також в динаміці після введення токсинів, оскільки таким чином можна порівняти початкові прояви як локальних, так і системних запальних реакцій. Крім того, у майбутніх дослідженнях варто розширити спектр досліджуваних метаболічних характеристик фагоцитів, включаючи метаболізм аргініну та профіль цитокінів. Однак, слід зазначити, що такі дослідження варто проводити у ті самі часові періоди, у які були проведені поточні експерименти, зважаючи на наявність циркануальних (сезонних) ритмів усіх показників метаболізму фагоцитів [241]. Глибоке розуміння причин відмінностей у патернах активації комплексної популяції мікроглії/макрофагів вимагає також окремої оцінки резидентних клітин мікроглії та рекрутованих макрофагів моноцитарного походження. Наприклад, макрофаги з периферії можна диференціювати від резидентних мікрогліальних клітин за їхньою експресією Tmem119, CD44 і CD169 [74, 242].

Окрім різниці у значеннях індексів системного запалення на основі кількісних показників лейкоцитів периферичної крові, та відмінностей у характері кореляційних зв'язків цих індексів з метаболічними характеристиками мікроглії на користь більш виразних проявів системного запалення у моделі ЛПС-ХП свідчили фенотипові та функціональні характеристики циркулюючих фагоцитів. Зниження

рівня оксидативного метаболізму та рівня експресії CD80/86 у сукупності з підвищеною фагоцитарною активністю та посиленою експресією CD206 у циркулюючих фагоцитарних клітинах щурів з 6-OHDA-ХП вказують на їх протизапальний функціональний зсув, який може бути зумовлений спонтанною резолюцією гострого запалення, ініційованого токсином, введеним на початку експерименту. Посилений оксидативний метаболізм і підвищена експресія CD80/86 разом зі зниженою ендоцитарною активністю у фагоцитуючих клітинах периферичної крові щурів з ЛПС-ХП вказують на їх прозапальний функціональний зсув, як ознаку триваючого системного запалення.

Таким чином ми вперше показали, що модель ХП, заснована на стереотаксичному введенні ЛПС, адекватно відтворює не лише локальне нейрозапалення, а й системне запалення, властиве клінічному перебігу захворювання. Гематологічні та імунологічні показники в моделі ХП, індукованій 6-OHDA, вказують на спонтанну резолюцію системного запалення, що є типовим для «гострого» характеру цієї моделі. Оцінка метаболічного профілю циркулюючих фагоцитів може бути використана у комплексі маркерів системного запалення при застосуванні інтервенційних моделей ХП як для дослідження його механізмів, так і для оцінки ефективності протизапальних засобів у комплексному лікуванні захворювання.

Ще одним важливим імунологічним аспектом, який, за результатами наших досліджень, відрізняє моделі ХП, індуковані 6-OHDA та ЛПС, є відмінності у метаболічному профілі ПМ. ПМ є ключовим компонентом імунітету черевної порожнини і структурним елементом найменш вивченого компартменту імунної системи – OALT. Сальник добре відомий як депо вісцерального жиру, роль сальника у перитонеальному імунітеті не була визнана до початку 1900-х років, доти, доки британський хірург R.Morrison не назвав його «поліцейським черевної порожнини» через його здатність послаблювати перитоніт. Насправді було

помічено, що сальник рухається по черевній порожнині та закриває місця запалення, такі як розрив яєчників, запалений апендикс, виразки кишечника або рани внаслідок травми чи операції. Згідно з цим спостереженням, сальник має чудову ангіогенну, фіброзну та імунну активності, є потужним джерелом стовбурових клітин. У сукупності ці властивості сприяють васкуляризації, прискорюють загоєння ран і обмежують інфекцію [243]. В очеревині, що покриває сальник, локалізовані продихи (отвори між мезотеліальними клітинами), які відкриваються безпосередньо до скупчень лейкоцитів, відомих як молочні плями або пов'язані з жиром лімфоїдні кластери (fat-associated lymphoid clusters, FALC), які вбудовані між адипоцитами безпосередньо під шаром мезотеліальних клітин. Молочні плями структурно нагадують вторинні організовані лімфоїдні утвори MALT із центральною ділянкою В-клітин, оточених Т-клітинами та мієлоїдними клітинами, які підтримуються мережею стромальних фібробластів. Відповідно до свого розташування під продихами молочні плями фільтрують перитонеальну рідину, що робить їх ідеальними місцями для генерації імунної відповіді на антигени або патогени в черевній порожнині. Фактично молочні плями підтримують місцеву імунну відповідь на перитонеальні антигени та запальні стимули [244]. Макрофаги перитонеальної порожнини являють собою комплексну популяцію, що складається з двох субпопуляцій: великих перитонеальних макрофагів (ВПМ) і малих перитонеальних макрофагів (МПМ). ВПМ – переважаюча субпопуляція макрофагів черевної порожнини - походять із попередників жовткового мішка і є класичними резидентними макрофагами з основною функцією, яка полягає у контролі гомеостазу черевної порожнини. Мезотеліальні клітини і стромальні фібробласти конвертують ретинол на ретиноеву кислоту, яка сприяє диференціюванню ВПМ, а також інтерлейкін 33, який підтримує протизапальний метаболічний профіль цих клітин в нормі. ВПМ здатні рециркулювати між перитонеальною порожниною і молочними плямами, а також

мігрувати зі складу молочних плям до місця розвитку локального запального процесу у черевній порожнині. У процесі такої міграції їх функції зводяться до активації резолюції запалення з надекспресією CD206, який опосередковує ефероцитоз ушкоджених запаленням клітин. З огляду на це переважання у популяції ПМ клітин з надекспресією CD206 розглядається як ознака резолюції запалення [245]. МПМ – це клітини моноцитарного походження, основна функція яких – патрульна. Ці клітини є основними ефекторами протиінфекційного імунітету і в нормі CD206-негативні. Окрім протиінфекційного імунітету ці клітини є важливими учасниками патологічного запального процесу в органах черевної порожнини у випадку розвитку запальних захворювань, таких як апендицит, хвороба Крона, метастазування злоякісного новоутворення тощо. Відповідно, переважання у комплексній популяції ПМ CD206-негативних клітин є ознакою триваючого запального процесу.

Традиційно ХП характеризується, головним чином, моторними розладами (тремор, ригідність м'язів, порушення ходи тощо), які з'являються переважно на середніх і пізніх стадіях захворювання. На продромальній стадії спостерігаються немоторні симптоми, такі як розлад моторики шлунково-кишкового тракту, зниження нюху тощо. Основним немоторним симптомом у хворих на ХП є шлунково-кишкова дисфункція: дисфагія, затримка спорожнення шлунку та закрепи - найпоширеніший немоторний симптом. Біля 70–80% пацієнтів із ХП страждають від закрепів, при цьому у близько 30% хворих закрепи розвиваються за 20 років до появи моторних симптомів. Однією з причин появи закрепів розглядається втрата ентеральних ДН внаслідок аномального відкладення депозитів альфа-синуклеїну, яке, у свою чергу, може бути спричиненим дисбіотичними порушеннями у кишечнику [246]. Значне накопичення аномально згорнутого альфа-синуклеїну реєструється в організованих лімфоїдних утворах MALT: апендиксі та мигдаликах, видалення яких у разі їхнього запалення знижує

ризик розвитку ХП згідно деяких клінічних даних. Не виключене депонування альфа-синуклеїну і в інших організованих лімфоїдних утворах MALT, а також OALT [247]. ПМ, як зазначено вище, чутливо реагують на запальні процеси у перитонеальній порожнині будь-якого генезу, у т.ч. аномальне депонування альфа-синуклеїну, дисбіоз і пов'язані з ним запальні хвороби кишечника. Крім того, наявність у циркулюючій крові фагоцитів прозапального метаболічного профілю також може позначатися на поляризованій активації ПМ, що не виключає їх роль в ініціюванні і прогресуванні ХП. Тим не менше, літературні дані стосовно функціонального стану цих клітин у патофізіології ХП відсутні. За результатами наших досліджень встановлено, що у тварин з різними моделями ХП метаболічний профіль ПМ відрізняється. У щурів з 6-OHDA-ХП знижений оксидативний метаболізм (з наявним значним резервом реактивності цієї функції) у сукупності з істотно посиленою фагоцитарною активністю і помірно посиленою експресією CD206 та зниженою експресією CD80/86 вказують на протизапальний метаболічний профіль ПМ, імовірно, внаслідок залучення цих клітин у спонтанну резолюцію системного запалення. Виявлений нами метаболічний профіль ПМ щурів у цій моделі добре узгоджується з метаболічним профілем мікроглії і фагоцитів периферичної крові, які також вказують на відсутність виразного нейрозапалення і системного запалення на момент завершення експерименту.

У тварин з ЛПС-ХП знижений оксидативний метаболізм, але без резерву цієї функції, вказує на метаболічне виснаження клітин, імовірно, внаслідок їх тривалого залучення у системний запальний процес. На користь прозапального метаболічного профілю ПМ у щурів з цією моделлю свідчить також достовірно посилена експресія коstimуляторних молекул CD80/86.

Додатковим аргументом на користь залучення ПМ у системний запальний процес у тварин з ЛПС-ХП стали результати порівняльної оцінки вагових індексів і відносної клітинності селезінки у тварин з обома моделями. У щурів з ЛПС-ХП,

на відміну від тварин з 6-OHDA-ХП, ми спостерігали зниження ваги і клітинності селезінки, що може бути наслідком міграції спленоцитів у кров, а також гематогенного поширення їх у перитонеальну порожнину [214] з підтримкою прозапального фенотипу ПМ.

Органи черевної порожнини селезінка та кишківник - два найбільших периферичних імунологічних органи - мають потужний вплив на фізіологічні і патологічні процеси у нервовій системі [248, 249]. Наприклад, збільшення кількості макрофагів селезінки з активованим підтипом M1 може індукувати системну прозапальну відповідь, що призводить до неврологічного пошкодження та моторних розладів у мишачій моделі паркінсонізму [250]. Взяті разом, селезінка та кишечник є життєво важливими периферичними органами, які мають виключне значення для системного імунітету, суттєво залучені у патофізіологію та розвиток ХП і можуть бути потенційними мішенями для боротьби з нейродегенерацією та/або профілактики цього патологічного процесу. ПМ добре відображають імунне середовище перитонеальної порожнини і є дуже зручними об'єктами дослідження завдяки простоті їх виділення. Це підкреслює перспективність включення дослідження метаболічного профілю ПМ, а також фагоцитів селезінки у перелік показників для оцінки ролі периферичного системного запалення у патогенезі і патофізіології ХП, а також для розробки і оцінки ефективності імуномодуляторних препаратів для контролю запалення у комплексному лікуванні цієї хвороби. Проведене нами порівняльне дослідження метаболічного профілю ПМ у щурів з найчастіше застосовуваними для вивчення запального компоненту ХП є важливим з декількох причин. По-перше, нам вперше вдалося показати залучення ПМ у системний запальний процес у тварин з ЛПС-ХП, що додатково засвідчує релевантність даної моделі для вивчення запального компоненту у патофізіології і патогенезі цієї хвороби, а також для розробки і доклінічної оцінки протизапальних засобів у комплексному лікуванні цього патологічного стану. По-друге, факт зміни

метаболичного профілю ПМ у тварин з експериментальним ендотоксин-індукованим геміпаркінсонізмом - це нова характеристика цієї моделі, яка до цього часу не досліджувалася, у літературі не описана і, на нашу думку, заслуговує на більш глибоке вивчення у контексті важливості осі кишечник-селезінка-мозок у патофізіології і патогенезі ХП. І, по-третє, літературні дані вказують на запальну активацію осі кишечник-мозок (і селезінка-мозок), у першу чергу, як на причину розвитку ХП і явище первинне по відношенню до нейродегенерації і нейрозапалення. На прикладі використаної нами інтервенційної ЛПС-індукованої моделі ХП показано, що розвиток запалення у черевній порожнині (а також системного запалення в цілому) можуть бути не лише причиною, а й наслідком нейрозапалення і нейродегенерації, що дозволяє використовувати цю модель для дослідження динаміки формування порочного кола локального і системного запалення, у т.ч. механізмів прозапального метаболічного зсуву фагоцитів та можливих підходів до їх протизапальної реполяризації як терапевтичного підходу. Поглибленого дослідження вимагають якісні та кількісні характеристики пристінкової та просвітної мікробіоти і вірбіоти у тварин з ЛПС-ХП для оцінки розвитку вторинного (по відношенню до нейродегенерації) дисбіозу у такій моделі та можливих механізмів його формування, оскільки молекулярні патерни мікроорганізмів можуть бути потужними тригерами як прозапальної, так і протизапальної поляризованої активації фагоцитів – ключових клітин у розвитку запалення. Безперечно, перспективним напрямком для подальших досліджень є диференційована оцінка спленічних макрофагів у тварин з різними моделями ХП з диверсифікованим дослідженням фагоцитів червоної і білої пульпи, маргінальних клітин різних субпопуляцій.

## ВИСНОВКИ

У дисертації наведено теоретичне узагальнення та представлено вирішення одного з важливих питань нейроімунології: порівняльної оцінки метаболічного профілю тканинних резидентних та циркулюючих фагоцитів у щурів з моделями хвороби Паркінсона (ХП), які найчастіше використовуються для дослідження запалення у патофізіології та патогенезі захворювання: засновані на інтрацеребральному введенні 6-гідроксидофаміну (6-OHDA) та бактеріального ліпополісахариду (ЛПС). Прозапальні метаболічні та фенотипові характеристики мікроглії, моноцитів і нейтрофілів периферичної крові, а також перитонеальних макрофагів у тварин з ЛПС-індукованою моделлю переконливо доводять її релевантність щодо відтворення локального нейрозапалення, системного запалення та їх взаємозв'язку, які притаманні клінічному перебігу захворювання. Результати дисертаційного дослідження експериментально обґрунтовують доцільність застосування ЛПС-індукованої ХП для дослідження механізмів запалення у структурі патогенезу ХП та доклінічної оцінки протизапальних засобів у комплексній терапії захворювання.

1. На момент завершення експерименту (29 доба після операції) у щурів з 6-OHDA-ХП мікроглія характеризується зниженою (в середньому, вдвічі порівняно з контрольними тваринами) часткою фагоцитуючих клітин зі зниженим (в середньому у 2,3 раза порівняно з контролем) фагоцитарним індексом, зниженою (втричі порівняно з контролем) часткою CD80/86+ клітин і підвищеною (в 1,8 раза порівняно з контролем) часткою CD206+ клітин, що вказує на протизапальний метаболічний профіль. У щурів з ЛПС-ХП мікроглія характеризується підвищеною (втричі порівняно з контролем) часткою CD80/86+ клітин і помірно зниженою часткою CD206+ клітин, що вказує на прозапальний метаболічний профіль.

2. Генерація РФК циркулюючими моноцитами і нейтрофілами щурів з 6-ОНДА-ХП знижена (в середньому у 5 разів), фагоцитарна активність помірно посилена, CD80/86+ клітин вдвічі менша, а частка CD206+ клітин вдвічі більша порівняно з аналогічними показниками інтактних і хибнооперованих тварин, що вказує на протизапальний метаболічний зсув. У тварин з ЛПС-ХП показники оксидативного метаболізму моноцитів перевищують контрольні значення в середньому у 5 разів, фагоцитарний індекс моноцитів нижчий за контроль в середньому у 2,25 раза, нейтрофілів – в 1,75 раза, частка CD80/86+ клітин вища за контрольний показник на 25%, що у сукупності свідчить про прозапальний метаболічний зсув.
3. У гемограмі щурів з ОНДА-ХП встановлено зниження частки лімфоцитів, в середньому втричі порівняно з контролем, що супроводжувалося зниженням вагових індексів та відносної клітинності тимусу в середньому у півтора раза. Частка нейтрофілів у цих тварин помірно знижена порівняно з контролем. Гемограма тварин з ЛПС-ХП виявила зниження частки лімфоцитів в середньому вдвічі порівняно з контролем у поєднанні зі зниженням вагових індексів і клітинності тимусу.
4. 6-ОНДА-ХП супроводжується зниженням значень інтегральних індексів системного запалення: нейтрофільно-лімфоцитарного коефіцієнта (НЛК) – в середньому у півтора рази, індекса системного імунного запалення (ІСІЗ) – в 1,4 раза порівняно з аналогічними показниками інтактних та хибнооперованих тварин. ЛПС-ХП асоціюється із вдвічі підвищеними, порівняно з контролем, значеннями НЛК, дНЛК та ІСІЗ, а також із підвищеними значеннями тромбоцитарно-лімфоцитарного коефіцієнту в середньому у півтора раза порівняно з аналогічними показниками інтактних та хибнооперованих щурів.

5. В умовах розвитку 6-ОНДА-ХП частка CD80/86+ клітин мікроглії негативно корелює зі значеннями інтегральних індексів системного запалення ( $r = -0,65$  для НЛК та  $-0,61$  – для ІСІЗ). У тварин з ЛПС-ХП частка CD80/86+ клітин мікроглії позитивно корелює зі значеннями інтегральних індексів системного запалення ( $r = 0,71$  для НЛК,  $0,78$  – для ТЛК та  $0,74$  – для ІСІЗ).
6. Перитонеальні макрофаги у тварин з 6-ОНДА-ХП характеризуються протизапальним метаболічним профілем: збільшенням фагоцитарного індексу в 1,9 раза, посиленням експресії CD206 в 1,4 раза і зниженням експресії CD80/86 вдвічі порівняно з аналогічними показниками контрольних тварин. У щурів з ЛПС-ХП виявлено перитонеальні макрофаги з підвищеним у півтора рази порівняно з контролем рівнем експресії CD80/86, що вказує на прозапальний метаболічний зсув.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Hayes M. Parkinson's disease and parkinsonism. *Am. J. Med.* 2019; 132: 802-807.
2. Nilashi M, Abumalloh RA, Alyami S, Alghamdi A, Alrizq M. Parkinson's Disease Diagnosis Using Laplacian Score, Gaussian Process Regression and Self-Organizing Maps. *Brain Sci.* 2023 Mar 24;13(4):543.
3. Lampropoulos IC, Malli F, Sinani O, Gourgoulianis KI, Xiromerisiou G. Worldwide trends in mortality related to Parkinson's disease in the period of 1994-2019: Analysis of vital registration data from the WHO Mortality Database. *Front Neurol.* 2022 Oct 4;13:956440.
4. Fearnley JM, Lees AJ. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain.* 1991; 114 :2283–301.
5. MacMahon Copas AN, McComish SF, Fletcher JM, Caldwell MA. The Pathogenesis of Parkinson's Disease: A Complex Interplay Between Astrocytes, Microglia, and T Lymphocytes? *Front Neurol.* 2021 May 26;12:666737.
6. Kouli A, Torsney KM, Kuan WL. Parkinson's Disease: Etiology, Neuropathology, and Pathogenesis. In: Stoker TB, Greenland JC, editors. *Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects* [Internet]. Brisbane (AU): Codon Publications; 2018 Dec 21. Chapter 1. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK536722/>
7. Alexander GE. Biology of Parkinson's disease: pathogenesis and pathophysiology of a multisystem neurodegenerative disorder. *Dialogues Clin Neurosci.* 2004 Sep;6(3):259-80.
8. Flores-Leon M, Outeiro TF. More than meets the eye in Parkinson's disease and other synucleinopathies: from proteinopathy to lipidopathy. *Acta Neuropathol.* 2023 Sep;146(3):369-385.
9. Sivanandy P, Leey TC, Xiang TC, Ling TC, Wey Han SA, Semilan SLA, Hong PK. Systematic Review on Parkinson's Disease Medications, Emphasizing on

- Three Recently Approved Drugs to Control Parkinson's Symptoms. *Int J Environ Res Public Health*. 2021 Dec 30;19(1):364.
10. He A, Wang M, Li X, Chen H, Lim K, Lu L, Zhang C. Role of Exosomes in the Pathogenesis and Theranostic of Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci*. 2023 Jul 4;24(13):11054.
  11. Pingale T, Gupta GL. Classic and evolving animal models in Parkinson's disease. *Pharmacol Biochem Behav*. 2020 Dec;199:173060.
  12. Khan E, Hasan I, Haque ME. Parkinson's Disease: Exploring Different Animal Model Systems. *Int J Mol Sci*. 2023 May 22;24(10):9088.
  13. Forloni G, La Vitola P, Cerovic M, Balducci C. Inflammation and Parkinson's disease pathogenesis: Mechanisms and therapeutic insight. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2021;177:175-202.
  14. Forloni G. Alpha Synuclein: Neurodegeneration and Inflammation. *Int J Mol Sci*. 2023 Mar 21;24(6):5914.
  15. García-Revilla J, Herrera AJ, de Pablos RM, Venero JL. Inflammatory Animal Models of Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis*. 2022;12(s1):S165-S182.
  16. Kuter KZ, Śmiałowska M, Ossowska K. The influence of preconditioning with low dose of LPS on paraquat-induced neurotoxicity, microglia activation and expression of  $\alpha$ -synuclein and synphilin-1 in the dopaminergic system. *Pharmacol Rep*. 2022 Feb;74(1):67-83.
  17. Hernandez-Baltazar D, Zavala-Flores LM, Villanueva-Olivo A. The 6-hydroxydopamine model and parkinsonian pathophysiology: Novel findings in an older model. *Neurologia*. 2017 Oct;32(8):533-539.
  18. Skrzypczak-Wiercioch A, Sałat K. Lipopolysaccharide-Induced Model of Neuroinflammation: Mechanisms of Action, Research Application and Future Directions for Its Use. *Molecules*. 2022 Aug 26;27(17):5481.

19. Austermann J, Roth J, Barczyk-Kahlert K. The Good and the Bad: Monocytes' and Macrophages' Diverse Functions in Inflammation. *Cells*. 2022 Jun 20;11(12):1979.
20. Visan I. Inflammatory macrophages. *Nat Immunol*. 2022 Jul;23(7):988.
21. Brakedal B, Toker L, Haugarvoll K, Tzoulis C. A nationwide study of the incidence, prevalence and mortality of Parkinson's disease in the Norwegian population. *NPJ Parkinsons Dis*. 2022 Mar 2;8(1):19.
22. Balestrino R, Schapira AHV. Parkinson disease. *Eur J Neurol*. 2020;27(1):27-42.
23. Карабань ІМ. Лікування хвороби Паркінсона: потенційні можливості праміпексолу пролонгованого вивільнення. *Укр. Мед. Часопис*, ; 1 (141): 51-54.
24. Epidemiology of Parkinson's disease. Tysnes OB, Storstein A. *J Neural Transm (Vienna)*. 2017 Aug;124(8):901-905.
25. Alarcón TA, Presti-Silva SM, Simões APT, Ribeiro FM, Pires RGW. Molecular mechanisms underlying the neuroprotection of environmental enrichment in Parkinson's disease. *Neural Regen Res*. 2023 Jul;18(7):1450-1456.
26. Halli-Tierney AD, Luker J, Carroll DG. Parkinson Disease. *Am Fam Physician*. 2020 Dec 1;102(11):679-691.
27. Aamodt WW, Kluger BM, Mirham M, Job A, Lettenberger SE, Mosley PE, Seshadri S. Caregiver Burden in Parkinson Disease: A Scoping Review of the Literature from 2017-2022. *J Geriatr Psychiatry Neurol*. 2023 Aug 8:8919887231195219.
28. Swallow DMA, Counsell CE. The evolution of diagnosis from symptom onset to death in progressive supranuclear palsy (PSP) and corticobasal degeneration (CBD) compared to Parkinson's disease (PD). *J Neurol*. 2023 Jul;270(7):3464-3474.
29. Harms AS, Ferreira SA, Romero-Ramos M. Periphery and brain, innate and adaptive immunity in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol*. 2021 Apr;141(4):527-545.

30. Маньковский НБ, Карабань ИН, Карасевич НВ. Болезнь Паркинсона: патогенетические аспекты лекарственной терапии и клинического течения. Журнал неврології ім. Б.М. Маньковського. 2013; 1: 9 -17.
31. Balestrino R, Scharira AHV. Parkinson disease. Eur J Neurol. 2020 Jan;27(1):27-42.
32. Ravenhill SM, Evans AH, Crewther SG. Escalating Bi-Directional Feedback Loops between Proinflammatory Microglia and Mitochondria in Ageing and Post-Diagnosis of Parkinson's Disease. Antioxidants (Basel). 2023 May 18;12(5):1117.
33. Clairembault T, Leclair-Visonneau L, Neunlist M, Derkinderen P. Enteric glial cells: new players in Parkinson's disease? Mov Disord. 2015 Apr;30(4):494-8.
34. Drouin-Ouellet J, Cicchetti F. Inflammation and neurodegeneration: the story 'retolled'. Trends Pharmacol Sci. 2012 Oct;33(10):542-51.
35. Lema Tomé CM, Tyson T, Rey NL, Grathwohl S, Britschgi M, Brundin P. Inflammation and  $\alpha$ -synuclein's prion-like behavior in Parkinson's disease--is there a link? Mol Neurobiol. 2013 Apr;47(2):561-74.
36. Lin MK, Farrer MJ. Genetics and genomics of Parkinson's disease. Genome Med. 2014; 6(6): 48.
37. Hirsch EC, Jenner P, Przedborski S. Pathogenesis of Parkinson's disease. Mov. Disord. 2013; 28: 24-30.
38. Rubinsztein DC. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. Nature. 2006; 443: 780-6.
39. Jiang Y, An H, Xi Q, Yang W, Xie H, Li Y, Huang D. Diffusion Tensor Imaging Reveals Deep Brain Structure Changes in Early Parkinson's Disease Patients with Various Sleep Disorders. Brain Sci. 2022 Mar 30;12(4):463.
40. Behl T, Madaan P, Sehgal A, Singh S, Anwer MK, Makeen HA, Albratty M, Mohan S, Bungau S. Mechanistic Insights Expatriating the Redox-Active-Metal-Mediated Neuronal Degeneration in Parkinson's Disease. Int J Mol Sci. 2022 Jan 8;23(2):678.

41. Ortiz GG, Pacheco-Moisés FP, Mireles-Ramírez MA, Flores-Alvarado LJ, González-Usigli H, Sánchez-López AL, Torres-Sánchez ED. Oxidative Stress and Parkinson's Disease: Effects on Environmental Toxicology. InTech. 2016. doi: 10.5772/63794.
42. Guo JD, Zhao X, Li Y, Li GR, Liu XL. Damage to dopaminergic neurons by oxidative stress in Parkinson's disease (Review). *Int J Mol Med*. 2018 Apr;41(4):1817-1825.
43. See WZC, Naidu R, Tang KS. Cellular and Molecular Events Leading to Paraquat-Induced Apoptosis: Mechanistic Insights into Parkinson's Disease Pathophysiology. *Mol Neurobiol*. 2022 Jun;59(6):3353-3369.
44. Hauser DN, Hastings TG. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease and monogenic parkinsonism. *Neurobiol Dis*. 2013 Mar;51:35-42.
45. Zampese E, Surmeier DJ. Calcium, Bioenergetics, and Parkinson's Disease. *Cells*. 2020 Sep 8;9(9):2045.
46. Rizzuto R, De Stefani D, Raffaello A, Mammucari C. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012 Sep;13(9):566-78.
47. Lewis FW, Fairouz S, Elson JL, Hubscher-Bruder V, Brandel J, Soundararajan M, Smith D, Dexter DT, Tétard D, Pienaar IS. Novel 1-hydroxypyridin-2-one metal chelators prevent and rescue ubiquitin proteasomal-related neuronal injury in an in vitro model of Parkinson's disease. *Arch Toxicol*. 2020 Mar;94(3):813-831.
48. Ciechanover A, Brundin P. The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron*. 2003 Oct 9;40(2):427-46.
49. Rubinsztein DC. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature*. 2006 Oct 19;443(7113):780-6.

50. Corti O, Lesage S, Brice A. What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease. *Physiol Rev.* 2011 Oct;91(4):1161-218.
51. Lee F.J.S., Liu F., Pristupa Z.B., Niznik H.B. Direct binding and functional coupling of alpha-synuclein to the dopamine transporters accelerate dopamine-induced apoptosis. *FASEB J.* 2001; 15: 916-26.
52. Murphy D.D., Rueter S.M., Trojanowski J.Q., Lee V.M.Y. Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippo-campal neurons. *J. Neurosci.* 2000; 20: 3214-20.
53. Breydo L., Wu J.W., Uversky V.N. a-synuclein misfolding and Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012; 1822: 26185.
54. Jenner P., Morris H.R., Robbins T. W., Goedert M., Hardy J., Ben-Shlomo Y. et al. Parkinson's disease - the debate on the clinical phenomenology, aetiology, pathology and pathogenesis. *J. Parkinson. Dis.* 2013; 3: 1-11.
55. Saiki S., Sato S., Hattori N. Molecular pathogenesis of Parkinson's disease: update. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2012; 83: 430-6.
56. Takaramoto S, Nakasone Y, Sadakane K, Maruta S, Terazima M. Time-resolved detection of SDS-induced conformational changes in  $\alpha$ -synuclein by a micro-stopped-flow system. *RSC Adv.* 2021 Jan 4;11(2):1086-1097.
57. Gatto NM, Rhodes SL, Manthripragada AD, Bronstein J, Cockburn M, Farrer M, Ritz B.  $\alpha$ -Synuclein gene may interact with environmental factors in increasing risk of Parkinson's disease. *Neuroepidemiology.* 2010;35(3):191-5.
58. Vargas KJ, Makani S, Davis T, Westphal CH, Castillo PE, Chandra SS. Synucleins regulate the kinetics of synaptic vesicle endocytosis. *J Neurosci.* 2014 Jul 9;34(28):9364-76.
59. Holmqvist S, Chutna O, Bousset L, Aldrin-Kirk P, Li W, Björklund T, Wang ZY, Roybon L, Melki R, Li JY. Direct evidence of Parkinson pathology spread from the

- gastrointestinal tract to the brain in rats. *Acta Neuropathol.* 2014 Dec;128(6):805-20.
60. Surmeier DJ, Sulzer D. The pathology roadmap in Parkinson disease. *Prion.* 2013 Jan-Feb;7(1):85-91.
61. Klann EM, Dissanayake U, Gurralla A, Farrer M, Shukla AW, Ramirez-Zamora A, Mai V, Vedam-Mai V. The Gut-Brain Axis and Its Relation to Parkinson's Disease: A Review. *Front Aging Neurosci.* 2022;13:782082.
62. Visanji NP, Brooks PL, Hazrati LN, Lang AE. The prion hypothesis in Parkinson's disease: Braak to the future. *Acta Neuropathol Commun.* 2013 May 8;1:2.
63. Weil RS, Lashley TL, Bras J, Schrag AE, Schott JM. Current concepts and controversies in the pathogenesis of Parkinson's disease dementia and Dementia with Lewy Bodies. *F1000Res.* 2017 Aug 30;6:1604.
64. Menšíková K, Matěj R, Colosimo C, Rosales R, Tučková L, Ehrmann J, Hraboš D, Kolaříková K, Vodička R, Vrtěl R, Procházka M, Nevrlý M, Kaiserová M, Kurčová S, Otruba P, Kaňovský P. Lewy body disease or diseases with Lewy bodies? *NPJ Parkinsons Dis.* 2022 Jan 10;8(1):3.
65. Luk K., Kehm V., Carroll J., Zhang B., O'Brien P., Trojanowski J. et al. Pathological  $\alpha$ -synuclein transmission initiates Parkinsonlike neurodegeneration in non-transgenic mice. *Science.* 2012; 338(6109): 949-53.
66. Masuda-Suzukake M., Nonaka T., Hosokawa M., Oikawa T., Arai T., Akiyama H. et al. Prion-like spreading of pathological  $\alpha$ -synuclein in brain. *Brain.* 2013; 136: 1128-38.
67. Bido, S., Muggeo, S., Massimino, L. et al. Microglia-specific overexpression of  $\alpha$ -synuclein leads to severe dopaminergic neurodegeneration by phagocytic exhaustion and oxidative toxicity. *Nat Commun.* 2021; 12, 6237.

68. Tan EK, Chao YX, West A, Chan LL, Poewe W, Jankovic J. Parkinson disease and the immune system - associations, mechanisms and therapeutics. *Nat Rev Neurol*. 2020 Jun;16(6):303-318.
69. Harms AS, Ferreira SA, Romero-Ramos M. Periphery and brain, innate and adaptive immunity in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol*. 2021;141(4):527-545.
70. Öberg M, Fabrik I, Fabrikova D, Zehetner N, Härtlova A. The role of innate immunity and inflammation in Parkinson's disease. *Scand J Immunol*. 2021; 93(5):e13022.
71. Lee JW, Chun W, Lee HJ, Kim SM, Min JH, Kim DY, Kim MO, Ryu HW, Lee SU. The Role of Microglia in the Development of Neurodegenerative Diseases. *Biomedicines*. 2021 Oct 12;9(10):1449.
72. Zhang X, Kracht L, Lerario AM, Dubbelaar ML, Brouwer N, Wesseling EM, Boddeke EWGM, Eggen BJL, Kooistra SM. Epigenetic regulation of innate immune memory in microglia. *J Neuroinflammation*. 2022 May 14;19(1):111.
73. Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflammation*. 2014 Jun 3;11:98.
74. Jurga AM, Paleczna M, Kuter KZ. Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. *Front Cell Neurosci*. 2020 Aug 6;14:198.
75. Lashgari NA, Roudsari NM, Momtaz S, Sathyapalan T, Abdolghaffari AH, Sahebkar A. The involvement of JAK/STAT signaling pathway in the treatment of Parkinson's disease. *J Neuroimmunol*. 2021 Dec 15;361:577758.
76. Agirman G, Yu KB, Hsiao EY. Signaling inflammation across the gut-brain axis. *Science*. 2021 Nov 26;374(6571):1087-1092.
77. Gelders G, Baekelandt V, Van der Perren A. Linking Neuroinflammation and Neurodegeneration in Parkinson's Disease. *J Immunol Res*. 2018 Apr 16;2018:4784268.

78. Takata F, Nakagawa S, Matsumoto J, Dohgu S. Blood-Brain Barrier Dysfunction Amplifies the Development of Neuroinflammation: Understanding of Cellular Events in Brain Microvascular Endothelial Cells for Prevention and Treatment of BBB Dysfunction. *Front Cell Neurosci.* 2021 Sep 13;15:661838.
79. Gaviglio EA, Peralta Ramos JM, Arroyo DS, Bussi C, Iribarren P, Rodriguez-Galan MC. Systemic sterile induced-co-expression of IL-12 and IL-18 drive IFN- $\gamma$ -dependent activation of microglia and recruitment of MHC-II-expressing inflammatory monocytes into the brain. *Int Immunopharmacol.* 2022 Apr;105:108546.
80. Sevenich L. Brain-Resident Microglia and Blood-Borne Macrophages Orchestrate Central Nervous System Inflammation in Neurodegenerative Disorders and Brain Cancer. *Front Immunol.* 2018 Apr 6;9:697.
81. Grassivaro F, Martino G, Farina C. The phenotypic convergence between microglia and peripheral macrophages during development and neuroinflammation paves the way for new therapeutic perspectives. *Neural Regen Res.* 2021 Apr;16(4):635-637.
82. Miao Q, Chai Z, Song LJ, Wang Q, Song GB, Wang J, Yu JZ, Xiao BG, Ma CG. The neuroprotective effects and transdifferentiation of astrocytes into dopaminergic neurons of Ginkgolide K on Parkinson' disease mice. *J Neuroimmunol.* 2022 Mar 15;364:577806.
83. Sadek HL, Almohari SF, Renno WM. The Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *J Alzheimers Dis Parkinsonism.* 2014; 4:148.
84. Wu Y, Hu Y, Wang B, Li S, Ma C, Liu X, Moynagh PN, Zhou J, Yang S. Dopamine Uses the DRD5-ARRB2-PP2A Signaling Axis to Block the TRAF6-Mediated NF- $\kappa$ B Pathway and Suppress Systemic Inflammation. *Mol Cell.* 2020;78(1):42-56.e6.
85. Beers DR, Zhao W, Neal DW, Jason RT, Aaron DT, Alireza F, Shixiang W, Jinghong W, Stanley HA. Elevated acute phase proteins reflect peripheral

- inflammation and disease severity in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Sci Rep* 10. 2020: 15295.
86. Ferrari CC, Tarelli R. Parkinson's disease and systemic inflammation. *Parkinsons Disease*. 2011; 2011:436813.
87. Pajares M, I Rojo A, Manda G, Boscá L, Cuadrado A. Inflammation in Parkinson's Disease: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Cells*. 2020; 9(7):1687.
88. Ortiz GG, González-Usigli H, Pacheco-Moisés FP, Mireles-Ramírez MA. Physiology and Pathology of Neuroimmunology: Role of Inflammation in Parkinson's Disease. In book: *Physiology and Pathology of Immunology*. Edition 1. In Tech Open. 2017; 173-197.
89. Isung J, Isomura K, Almqvist C, Lichtenstein P, Larsson H, Wester T, Rück C, Fernández de la Cruz L, Sidorchuk A, & Mataix-Cols D. Association of chronic and acute inflammation of the mucosa-associated lymphoid tissue with psychiatric disorders and suicidal behavior. *Translational psychiatry*. 2019; 9(1), 227.
90. Dogra N, Mani RJ, Katare DP. The Gut-Brain Axis: Two Ways Signaling in Parkinson's Disease. *Cell Mol Neurobiol*. 2021; 42(2): 315-332.
91. Natale G, Limanaqi F, Busceti CL, Mastroiacovo F, Nicoletti F, Puglisi-Allegra S and Fornai F. Glymphatic System as a Gateway to Connect Neurodegeneration From Periphery to CNS. *Front. Neurosci*. 2021;15:639140.
92. Louveau A, Smirnov I, Keyes T. et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*. 2015; 523, 337–341.
93. Harms AS, Ferreira SA, Romero-Ramos M. Periphery and brain, innate and adaptive immunity in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol*. 2021;141(4):527-545.
94. Liu T, Liu F, Peng LW, Chang L, Jiang YM. The Peritoneal Macrophages in Inflammatory Diseases and Abdominal Cancers. *Oncol Res*. 2018 Jun 11;26(5):817-826.

95. Gardai SJ, Mao W, Schüle B, Babcock MC, Schoebel S, Lorenzana C, Alexander J, Kim S, Glick H, Hilton KJ, Fitzgerald JK, Buttini M, Chiou S, McConlogue L, Anderson J, Schenk D, Bard F, Langston JW, Yednock T, & Johnston J. Elevated Alpha-Synuclein Impairs Innate Immune Cell Function and Provides a Potential Peripheral Biomarker for Parkinson's Disease. 2013; PLoS ONE, 8.
96. Markulin I, Matasin M, Turk VE, Salković-Petrisic M. Challenges of repurposing tetracyclines for the treatment of Alzheimer's and Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)*. 2022 Jun;129(5-6):773-804.
97. Fyfe I. Aspirin and ibuprofen could lower risk of LRRK2 Parkinson disease. *Nat Rev Neurol*. 2020 Sep;16(9):460.
98. Jin T, Zhang Y, Botchway BOA, Zhang J, Fan R, Zhang Y, Liu X. Curcumin can improve Parkinson's disease via activating BDNF/PI3k/Akt signaling pathways. *Food Chem Toxicol*. 2022 Jun;164:113091.
99. Potashkin JA, Blume SR, Runkle NK. Limitations of animal models of Parkinson's disease. *Parkinson's disease*. 2011 : 658083.
100. Alam M, Schmidt WJ. L-DOPA reverses the hypokinetic behaviour and rigidity in rotenone-treated rats. *Behav Brain Res*. 2004; 153(2): 439-46.
101. Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci*. 2000; 3(12): 1301-06.
102. Ferrante RJ, Schulz JB, Kowall NW, Beal MF. Systemic administration of rotenone produces selective damage in the striatum and globus pallidus, but not in the substantia nigra. *Brain Res*. 1997; 753(1): 157-62.
103. Yeragani VK, Tancer M, Chokka P, Baker GB. Arvid Carlsson, and the story of dopamine. *Indian J Psychiatry*. 2010 Jan;52(1):87-8.

104. Jampolska M, Andrzejewski K, Zaremba M, Joniec-Maciejak I, Kaczyńska K. Deficiency of Biogenic Amines Modulates the Activity of Hypoglossal Nerve in the Reserpine Model of Parkinson's Disease. *Cells*. 2021 Mar 2;10(3):531.
105. Fernandes VS, Santos JR, Leão AH, Medeiros AM, Melo TG, Izídio GS, Cabral A, Ribeiro RA, Abílio VC, Ribeiro AM, Silva RH. Repeated treatment with a low dose of reserpine as a progressive model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res*. 2012 May 16;231(1):154-63.
106. Mustapha M, Mat Taib CN. MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease: A promising direction of therapeutic strategies. *Bosn J Basic Med Sci*. 2021 Aug 1;21(4):422-433.
107. Stefani A, Cerroni R, Pierantozzi M, D'Angelo V, Grandi L, Spanetta M, Galati S. Deep brain stimulation in Parkinson's disease patients and routine 6-OHDA rodent models: Synergies and pitfalls. *Eur J Neurosci*. 2021; 53(7):2322-2343.
108. Ungerstedt U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol*. 1968 Dec;5(1):107-10.
109. Jonsson G. Chemical neurotoxins as denervation tools in neurobiology. *Annu Rev Neurosci*. 1980;3:169-87.
110. Tranzer JP, Thoenen H. Selective destruction of adrenergic nerve terminals by chemical analogues of 6-hydroxydopamine. *Experientia*. 1973 Mar 15;29(3):314-5.
111. Bezard E, Przedborski S. A tale on animal models of Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2011 May;26(6):993-1002.
112. Faull RL, Lavery R. Changes in dopamine levels in the corpus striatum following lesions in the substantia nigra. *Exp Neurol*. 1969 Mar;23(3):332-40.
113. Sarre S, Yuan H, Jonkers N, Van Hemelrijck A, Ebinger G, Michotte Y. In vivo characterization of somatodendritic dopamine release in the substantia nigra of 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *J Neurochem*. 2004 Jul;90(1):29-39.

- 114.Luthman J, Fredriksson A, Sundström E, Jonsson G, Archer T. Selective lesion of central dopamine or noradrenaline neuron systems in the neonatal rat: motor behavior and monoamine alterations at adult stage. *Behav Brain Res.* 1989 Jul 1;33(3):267-77.
- 115.Deng I, Corrigan F, Zhai G, Zhou XF, Bobrovskaya L. Lipopolysaccharide animal models of Parkinson's disease: Recent progress and relevance to clinical disease. *Brain, Behavior, & Immunity–Health.* 2020; 4: 100060
- 116.Dutta G, Zhang P, Liu B. The lipopolysaccharide Parkinson's disease animal model: mechanistic studies and drug discovery. *Fundam Clin Pharmacol.* 2008 Oct;22(5):453-64.
- 117.Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms underlying inflammation in neurode- generation. *Cell.* 2010;140(6):918-934.
- 118.He Q, Yu W, Wu J, Chen C, Lou Z, Zhang Q, Zhao J, Wang J, Xiao B. Intranasal LPS-mediated Parkinson's model challenges the pathogenesis of nasal cavity and environmental toxins. *PLoS One.* 2013 Nov 8;8(11):e78418.
- 119.Song GB, Xi GP, Li YH, Li KJ, Liu JC, Chai Z, Huang JJ, Xiao BG, Zhang GX, Ma CG. The establishment of a mouse model of Parkinson's disease induced by intranasal admin- istration of LPS. *J. Neurol. Sci.* 2017;381(Suppl):198-199.
- 120.Cox N, Pokrovskii M, Vicario R, Geissmann F. Origins, Biology, and Diseases of Tissue Macrophages. *Annu Rev Immunol.* 2021 Apr 26;39:313-344.
- 121.Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol.* 2011;11:723–737.
- 122.Ilinykh A, Pinto AR. The Role of Cardiac Tissue Macrophages in Homeostasis and Disease. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1003:105-118.
- 123.Fujiwara N, Kobayashi K. Macrophages in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2005 Jun;4(3):281-6.

- 124.Koh YC, Yang G, Lai CS, Weerawatanakorn M, Pan MH. Chemopreventive Effects of Phytochemicals and Medicines on M1/M2 Polarized Macrophage Role in Inflammation-Related Diseases. *Int J Mol Sci.* 2018 Jul 28;19(8):2208.
- 125.de Sousa JR, Da Costa Vasconcelos PF, Quaresma JAS. Functional aspects, phenotypic heterogeneity, and tissue immune response of macrophages in infectious diseases. *Infect Drug Resist.* 2019 Aug 22;12:2589-2611.
- 126.Locati M, Curtale G, Mantovani A. Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity. *Annu Rev Pathol.* 2020 Jan 24;15:123-147.
- 127.White MJV, Gomer RH, 2015. Trypsin, tryptase, and thrombin polarize macrophages towards a pro-fibrotic M2a phenotype. *PLoS ONE*, 10(9): e0138748.
- 128.Wang LX, Zhang SX, Wu HJ, Rong XL, Guo J. M2b macrophage polarization and its roles in diseases. *J Leukoc Biol.* 2019;106(2):345-358.
- 129.Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, et al., 2018. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol*, 233(9): 6425-6440.
- 130.Li P, Ma C, Li J, You S, Dang L, Wu J, Hao Z, Li J, Zhi Y, Chen L, Sun S. Proteomic characterization of four subtypes of M2 macrophages derived from human THP-1 cells. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2022 May 15;23(5):407-422.
- 131.Sheu KM, Hoffmann A. Functional Hallmarks of Healthy Macrophage Responses: Their Regulatory Basis and Disease Relevance. *Annu Rev Immunol.* 2022 Apr 26;40:295-321.
- 132.Parisi L, Gini E, Baci D, et al. Macrophage Polarization in Chronic Inflammatory Diseases: Killers or Builders?. *J Immunol Res.* 2018;2018:8917804. Published 2018 Jan 14.
- 133.Margraf A, Perretti M. Immune Cell Plasticity in Inflammation: Insights into Description and Regulation of Immune Cell Phenotypes. *Cells.* 2022 Jun 2;11(11):1824.

134. Buonacera A, Stancanelli B, Colaci M, Malatino L. Neutrophil to Lymphocyte Ratio: An Emerging Marker of the Relationships between the Immune System and Diseases. *Int J Mol Sci.* 2022 Mar 26;23(7):3636.
135. Ross EA, Devitt A, Johnson JR. Macrophages: The Good, the Bad, and the Gluttony. *Front Immunol.* 2021 Aug 12;12:708186.
136. Lukácsi S, Farkas Z, Saskóí É, Bajtay Z, Takács-Vellai K. Conserved and Distinct Elements of Phagocytosis in Human and *C. elegans*. *Int J Mol Sci.* 2021 Aug 19;22(16):8934.
137. Greenberg S, Grinstein S. Phagocytosis and innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 2002 Feb;14(1):136-45.
138. Fu YL, Harrison RE. Microbial Phagocytic Receptors and Their Potential Involvement in Cytokine Induction in Macrophages. *Front Immunol.* 2021 Apr 29;12:662063.
139. Ho MS. Microglia in Parkinson's Disease. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1175:335-353.
140. Zhao J, Zhang W, Wu T, Wang H, Mao J, Liu J, Zhou Z, Lin X, Yan H, Wang Q. Efferocytosis in the Central Nervous System. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Dec 3;9:773344.
141. Paxinos, G. and Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 6th Edition, San Diego: Academic Press, 2007; 456 p.
142. Talanov SA, Oleshko NN, Tkachenko MN, Sagach VF. Pharmacoprotective influences on different links of the mechanism underlying 6-hydroxydopamine-induced degeneration of nigro-striatal dopaminergic neurons. *Neurophysiology.* 2006; 38 (2): 128-133.
143. Hoban DB, Connaughton E, Connaughton C, Hogan G, Thornton C, Mulcahy P, Moloney TC, Dowd E. Further characterisation of the LPS model of Parkinson's disease: a comparison of intra-nigral and intra-striatal lipopolysaccharide

- administration on motor function, microgliosis and nigrostriatal neurodegeneration in the rat. *Brain Behav Immun.* 2013; 27(1):91-100.
- 144.Iancu R, Mohapel P, Brundin P, Paul G. Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. *Behav Brain Res.* 2005;162(1):1-10.
- 145.Falkeholm L, Grant CA, Magnusson A, Mollur E. Xylene-free method for histological preparation: A Multicentre Evaluation. *Lab Invest* 2001;81:1213-21.
- Buesa RJ, Peshkov MV. Complete elimination of xylene in practice of a histology laboratory. *Arkh Patol.* 2011;73:54–60.
- 146.Walsh S, Finn DP, Dowd E. Time-course of nigrostriatal neurodegeneration and neuroinflammation in the 6-hydroxydopamine-induced axonal and terminal lesion models of Parkinson's disease in the rat. *Neuroscience.* 2011; 175:251-61.
- 147.Charafe-Jauffret E, Tarpin C, Bardou VJ, Bertucci F, Ginestier C, Braud AC, Puig B, Geneix J, Hassoun J, Birnbaum D, Jacquemier J, Viens P. Immunophenotypic analysis of inflammatory breast cancers: identification of an 'inflammatory signature'. *J Pathol.* 2004; 202(3): 265-73.
- 148.Denenberg VH. Open-field behavior in the rat: what does it mean? *Ann N Y Acad Sci.* 1969 Jul 30;159(3):852-9.
- 149.Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature.* 1970; 227(5259): 680-685.
- 150.LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951 Nov;193(1):265-75.
- 151.Frank, M.G., Wieseler-Frank, J.L., Watkins, L.R., Maier, S.F., 2006. Rapid isolation of highly enriched and quiescent microglia from adult rat hippocampus: immunophenotypic and functional characteristics. *J. Neurosci. Methods.* 151(2), 121-130.

- 152.Zhang X, Goncalves R, Mosser DM. The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol*. 2008 Nov; Chapter 14:Unit 14.1.
- 153.Macrophages and dendritic cells. *Methods and Protocols*. Edited by Neil E.Reiner. - NY, Humana Press, 2009: 368 P.
- 154.Müller, F., Rollag, H., Frøland, S.S. Nitroblue tetrazolium reduction in monocytes and monocyte-derived macrophages. Effect of oxidative burst stimulants and interferons. *APMIS*. 1989;97(6):490-6.
- 155.Hu, B., Yang, X.R., Xu, Y., Sun, Y.F., Sun, C., Guo, W., Zhang, X., Wang, W.M., Qiu, S.J., Zhou, J., Fan, J., 2014. Systemic immune-inflammation index predicts prognosis of patients after curative resection for hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res*. 20(23), 6212-6222.
- 156.Kozłowska E., J. Kopec-Szlezak, N. Drela. Sensitivity of mouse lymphoid and nonlymphoid organs to Silesian air pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf*. 1997;37:10-16.
- 157.Eidson LN, Kannarkat GT, Barnum CJ, Chang J, Chung J, Caspell-Garcia C, Taylor P, Mollenhauer B, Schlossmacher MG, Ereshefsky L, Yen M, Kopil C, Frasier M, Marek K, Hertzberg VS, Tansey MG. Candidate inflammatory biomarkers display unique relationships with alpha-synuclein and correlate with measures of disease severity in subjects with Parkinson's disease. *J Neuroinflammation*. 2017 Aug 18;14(1):164.
- 158.Minalyan A, Gabrielyan L, Pietra C, Taché Y and Wang L Multiple Beneficial Effects of Ghrelin Agonist, HM01 on Homeostasis Alterations in 6-Hydroxydopamine Model of Parkinson's Disease in Male Rats. *Front in Integr. Neurosci*. 2019; 13:13.
- 159.Jaggi U, Yang M, Matundan HH, Hirose S, Shah PK, Sharifi BG, Ghiasi H. Increased phagocytosis in the presence of enhanced M2-like macrophage responses

- correlates with increased primary and latent HSV-1 infection. *PLoS Pathog.* 2020 Oct 8;16(10):e1008971.
160. Yin C, Heit B. Cellular Responses to the Efferocytosis of Apoptotic Cells. *Front Immunol.* 2021 Apr 20;12:631714.
161. Kim MK, Kim J. Properties of immature and mature dendritic cells: phenotype, morphology, phagocytosis, and migration. *RSC Adv.* 2019 Apr 10;9(20):11230-11238.
162. Poppell M, Hammel G, Ren Y. Immune Regulatory Functions of Macrophages and Microglia in Central Nervous System Diseases. *Int J Mol Sci.* 2023 Mar 21;24(6):5925.
163. Wang K, Li J, Zhang Y, Huang Y, Chen D, Shi Z, Smith AD, Li W, Gao Y. Central nervous system diseases related to pathological microglial phagocytosis. *CNS Neurosci Ther.* 2021 May;27(5):528-539.
164. Janda, E., Boi, L., Carta, A.R., 2018. Microglial phagocytosis and its regulation: a therapeutic target in Parkinson's disease? *Front. Mol. Neurosci.* 11, 144.
165. Canton M, Sánchez-Rodríguez R, Spera I, Venegas FC, Favia M, Viola A, Castegna A. Reactive Oxygen Species in Macrophages: Sources and Targets. *Front Immunol.* 2021 Sep 30;12:734229.
166. Kanyilmaz S, Hepguler S, Atamaz FC, Gokmen NM, Ardeniz O, Sin A. Phagocytic and oxidative burst activity of neutrophils in patients with spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil.* 2013 Feb;94(2):369-74.
167. Böttcher, C., Schlickeiser, S., Sneeboer, M. M. A., Kunkel, D., Knop, A., Paza, E., et al. 2019. Human microglia regional heterogeneity and phenotypes determined by multiplexed single-cell mass cytometry. *Nat. Neurosci.* 22, 78–90.
168. Feinberg, H., Jégouzo, S.A.F., Lasanajak, Y., Smith, D.F., Drickamer, K., Weis, W.I., Taylor, M.E., 2021. Structural analysis of carbohydrate binding by the macrophage mannose receptor CD206. *J. Biol. Chem.* 296, 100368.

- 169.Booth HDE, Hirst WD, Wade-Martins R. The Role of Astrocyte Dysfunction in Parkinson's Disease Pathogenesis. *Trends Neuroscience*. 2017; 40(6):358-370.
- 170.Booth HDE, Hirst WD, Wade-Martins R. The Role of Astrocyte Dysfunction in Parkinson's Disease Pathogenesis. *Trends Neuroscience*. 2017; 40(6):358-370.
- 171.Morales I, Sanchez A, Rodriguez-Sabate C, Rodriguez M. Striatal astrocytes engulf dopaminergic debris in Parkinson's disease: A study in an animal model. *PLoS One*. 2017;12(10): e0185989.
- 172.Hol EM, Pekny M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Curr Opin Cell Biol*. 2015 Feb;32:121-30.
- 173.Vann SD, Albasser MM. Hippocampus and neocortex: recognition and spatial memory. *Curr Opin Neurobiol*. 2011 Jun;21(3):440-5.
- 174.Weil MT, Möbius W, Winkler A, Ruhwedel T, Wrzos C, Romanelli E, Bennett JL, Enz L, Goebels N, Nave KA, Kerschensteiner M, Schaeren-Wiemers N, Stadelmann C, Simons M. Loss of Myelin Basic Protein Function Triggers Myelin Breakdown in Models of Demyelinating Diseases. *Cell Rep*. 2016 Jul 12;16(2):314-322.
- 175.Dean DC 3rd, Sojkova J, Hurley S, Kecskemeti S, Okonkwo O, Bendlin BB, Theisen F, Johnson SC, Alexander AL, Gallagher CL. Alterations of Myelin Content in Parkinson's Disease: A Cross-Sectional Neuroimaging Study. *PLoS One*. 2016 Oct 5;11(10):e0163774.
- 176.Xie S, Yang J, Huang S, Fan Y, Xu T, He J, Guo J, Ji X, Wang Z, Li P, Chen J, Zhang Y. Disrupted myelination network in the cingulate cortex of Parkinson's disease. *IET Syst Biol*. 2022 May;16(3-4):98-119.
- 177.Rappold PM, Tieu K. Astrocytes and therapeutics for Parkinson's disease *Neurotherapeutics*. 2010; 7(4): 413-423.

178. Tansey MG, Wallings RL, Houser MC, Herrick MK, Keating CE, Joers V. Inflammation and immune dysfunction in Parkinson disease. *Nat Rev Immunol*. 2022 Nov;22(11):657-673.
179. Pritzker KPH. Blood-based biomarkers of chronic inflammation. *Expert Rev Mol Diagn*. 2023 Jun;23(6):495-504.
180. Chmielewski PP, Strzelec B. Elevated leukocyte count as a harbinger of systemic inflammation, disease progression, and poor prognosis: a review. *Folia Morphol (Warsz)*. 2018;77(2):171-178.
181. Herrero-Cervera A, Soehnlein O, Kenne E. Neutrophils in chronic inflammatory diseases. *Cell Mol Immunol*. 2022 Feb;19(2):177-191. doi: 10.1038/s41423-021-00832-3; Cornwell WD, Kim V, Fan X, Vega ME, Ramsey FV, Criner GJ, Rogers TJ. Activation and polarization of circulating monocytes in severe chronic obstructive pulmonary disease. *BMC Pulm Med*. 2018 Jun 15;18(1):101.
182. Mehta N, Luthra NS, Corcos DM, Fantuzzi G. C-reactive protein as the biomarker of choice to monitor the effects of exercise on inflammation in Parkinson's disease. *Front Immunol*. 2023; 14: 1178448.
183. Kawamura M, Schwartz JP, Nomura T, Kopin IJ, Goldstein DS, Huynh TT, Hooper DR, Harvey-White J, Eisenhofer G. Differential effects of chemical sympathectomy on expression and activity of tyrosine hydroxylase and levels of catecholamines and DOPA in peripheral tissues of rats. *Neurochem Res*. 1999 Jan;24(1):25-32.
184. Matt SM, Gaskill PJ. Where Is Dopamine and how do Immune Cells See it?: Dopamine-Mediated Immune Cell Function in Health and Disease. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2020 Mar;15(1):114-164.
185. Mignini, F., Tomassoni, D., Traini, E., Amenta, F. Dopamine, vesicular transporters and dopamine receptor expression and localization in rat thymus and spleen. *J Neuroimmunol*. 2009; 206(1-2): 5-13.

186. Duah, M., Li, L., Shen, J., Lan, Q., Pan, B., Xu, K. Thymus Degeneration and Regeneration. *Front Immunol.* 2021; 12: 706244.
187. Belhacène N, Gamas P, Gonçalves D, Jacquin M, Beneteau M, Jacquel A, Colosetti P, Ricci JE, Wakkach A, Auburger P, Marchetti S. Severe thymic atrophy in a mouse model of skin inflammation accounts for impaired TNFR1 signaling. *PLoS One.* 2012;7(10):e47321.
188. Kara SP, Altunan B, Unal A. Investigation of the peripheral inflammation (neutrophil-lymphocyte ratio) in two neurodegenerative diseases of the central nervous system. *Neurol Sci.* 2021; 31:1–9.
189. Zahorec R. Neutrophil-to-lymphocyte ratio, past, present and future perspectives. *Bratisl Lek Listy.* 2021; 122(7): 474-488.
190. Citu C, Gorun F, Motoc A, Sas I, Gorun OM, Burlea B, Tuta-Sas I, Tomescu L, Neamtu R, Malita D, Citu IM. The Predictive Role of NLR, d-NLR, MLR, and SIRI in COVID-19 Mortality. *Diagnostics (Basel).* 2022; 12(1): 122.
191. Nissen SK, Shrivastava K, Schulte C, Otzen DE, Goldeck D, Berg D, Møller HJ, Maetzler W, Romero-Ramos M. Alterations in Blood Monocyte Functions in Parkinson's Disease. *Mov Disord.* 2019; 34(11): 1711-1721.
192. Madetko N, Migda B, Alster P, Turski P, Kozirowski D, Friedman A. Platelet-to-lymphocyte ratio and neutrophil-to-lymphocyte ratio may reflect differences in PD and MSA-P neuroinflammation patterns. *Neurol Neurochir Pol.* 2022;56(2):148-155.
193. Erdoğan T. Role of systemic immune-inflammation index in asthma and NSAID-exacerbated respiratory disease. *Clin Respir J.* 2020; 15: 400–405.
194. Hu B, Yang XR, Xu Y, et al. Systemic immune-inflammation index predicts prognosis of patients after curative resection for hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2014;20(23):6212-6222.

- 195.Liu, B., Wang, J., Li, Yy. et al. The association between systemic immune-inflammation index and rheumatoid arthritis: evidence from NHANES 1999–2018. *Arthritis Res Ther* 25, 34 (2023).
- 196.Xia Y, Xia C, Wu L, Li Z, Li H, Zhang J. Systemic Immune Inflammation Index (SII), System Inflammation Response Index (SIRI) and Risk of All-Cause Mortality and Cardiovascular Mortality: A 20-Year Follow-Up Cohort Study of 42,875 US Adults. *Journal of Clinical Medicine*. 2023; 12(3):1128.
- 197.Huang X, Hussain B, Chang J. Peripheral inflammation and blood-brain barrier disruption: effects and mechanisms. *CNS Neurosci Ther*. 2021; 27(1): 36-47.
- 198.Ryabukha, O. I., Dronyuk, I. M. Application of correlation analysis in cytology: Opportunities to study specific activity of follicular thyrocytes. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2019; 10(3): 345-351.
- 199.Tan HY, Wang N, Li S, Hong M, Wang X, Feng Y. The Reactive Oxygen Species in Macrophage Polarization: Reflecting Its Dual Role in Progression and Treatment of Human Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016:2795090.
- 200.Orecchioni M, Ghosheh Y, Pramod AB, Ley K. Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Front Immunol*. 2019; 10:108.
- 201.Dilek N, Vuillefroy de Silly R, Blancho G, Vanhove B. Myeloid-derived suppressor cells: mechanisms of action and recent advances in their role in transplant tolerance. *Front Immunol*. 2012; 3:208.
- 202.Hjelmström, P. Lymphoid neogenesis: de novo formation of lymphoid tissue in chronic inflammation through expression of homing chemokines. *J Leukoc Biol*. 2001; 69(3): 331-9.
- 203.Kee, R., Naughton, M., McDonnell, G.V., Howell, O.W., Fitzgerald, D.C. A Review of Compartmentalised Inflammation and Tertiary Lymphoid Structures in the Pathophysiology of Multiple Sclerosis. *Biomedicines*. 2022;10(10):2604.

204. Wang A W, Prieto J M, Cauvi D M, Bickler SW, De Maio A. The Greater Omentum-A Vibrant and Enigmatic Immunologic Organ Involved in Injury and Infection Resolution. *Shock (Augusta, Ga.)*. 2020; 53(4): 384–390.
205. Wu, D., Yotnda, P. Production and detection of reactive oxygen species (ROS) in cancers. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2011; 57: 3357.
206. Bezdard E, Yue Z, Kirik D, Spillantini MG. Animal models of Parkinson's disease: limits and relevance to neuroprotection studies. *Mov Disord*. 2013; 28(1):61-70.
207. Bronte, V., Pittet, M.J. The Spleen in Local and Systemic Regulation of Immunity. *Immunity*. 2023;56(5):1152.
208. Buchmann Godinho, D., da Silva Fiorin, F., Schneider Oliveira, M., Furian, A.F., Rechia Figuera, M., Freire Royes, L.F. The immunological influence of physical exercise on TBI-induced pathophysiology: Crosstalk between the spleen, gut, and brain. *Neurosci Biobehav Rev*. 2021; 130: 15-30.
209. Wei Y, Wang T, Liao L, Fan X, Chang L, Hashimoto K. Brain-spleen axis in health and diseases: A review and future perspective. *Brain Res Bull*. 2022; 182:130-140.
210. Zhang K, Sakamoto A, Chang L, Qu Y, Wang S, Pu Y, Tan Y, Wang X, Fujita Y, Ishima T, Hatano M, Hashimoto K. Splenic NKG2D confers resilience versus susceptibility in mice after chronic social defeat stress: beneficial effects of (R)-ketamine. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2021 Apr;271(3):447-456.
211. Zhang X, Lei B, Yuan Y, Zhang L, Hu L, Jin S, Kang B, Liao X, Sun W, Xu F, Zhong Y, Hu J, Qi H. Brain control of humoral immune responses amenable to behavioural modulation. *Nature*. 2020 May;581(7807):204-208.
212. Rosas-Ballina M, Ochani M, Parrish WR, Ochani K, Harris YT, Huston JM, Chavan S, Tracey KJ. Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Aug 5;105(31):11008-13.

213. Chu W, Li M, Li F, Hu R, Chen Z, Lin J, Feng H. Immediate splenectomy down-regulates the MAPK-NF- $\kappa$ B signaling pathway in rat brain after severe traumatic brain injury. *J Trauma Acute Care Surg.* 2013 Jun;74(6):1446-53.
214. Seifert HA, Leonardo CC, Hall AA, Rowe DD, Collier LA, Benkovic SA, Willing AE, Pennypacker KR. The spleen contributes to stroke induced neurodegeneration through interferon gamma signaling. *Metab Brain Dis.* 2012 Jun;27(2):131-41.
215. Wang N, Li R, Feng B, Cheng Y, Guo Y, Qian H. Chicoric Acid Prevents Neuroinflammation and Neurodegeneration in a Mouse Parkinson's Disease Model: Immune Response and Transcriptome Profile of the Spleen and Colon. *Int J Mol Sci.* 2022 Feb 12;23(4):2031.
216. Forrester JV, Xu H, Lambe T, Cornall R. Immune privilege or privileged immunity? *Mucosal Immunol.* 2008; 1(5): 372-81.
217. Wu Y, Hirschi KK. Tissue-Resident Macrophage Development and Function. *Front Cell Dev Biol.* 2021; 8: 617879.
218. Guha Ray A, Odum OP, Wiseman D, Weinstock A. The diverse roles of macrophages in metabolic inflammation and its resolution. *Front Cell Dev Biol.* 2023; 11: 1147434.
219. Montgomery AB, Chen SY, Wang Y, Gadhvi G, Mayr MG, Cuda CM, Dominguez S, Moradeke Makinde HK, Gurra MG, Misharin AV, Mandelin AM, Ruderman EM, Thakrar A, Brar S, Carns M, Aren K, Akbarpour M, Filer A, Nayar S, Teososo A, Major T, Bharat A, Budinger GRS, Winter DR, Perlman H. Tissue-resident, extravascular Ly6c<sup>+</sup> monocytes are critical for inflammation in the synovium. *Cell Rep.* 2023; 42(5): 112513.
220. De Filippo K, Rankin SM. The Secretive Life of Neutrophils Revealed by Intravital Microscopy. *Front Cell Dev Biol.* 2020; 8: 60323.

221. Palominos MF, Calfún C, Nardocci G, Candia D, Torres-Paz J, Whitlock KE. The Olfactory Organ Is a Unique Site for Neutrophils in the Brain. *Front Immunol.* 2022; 13: 881702.
222. Antuamwine BB, Bosnjakovic R, Hofmann-Vega F, Wang X, Theodosiou T, Iliopoulos I, Brandau S. N1 versus N2 and PMN-MDSC: A critical appraisal of current concepts on tumor-associated neutrophils and new directions for human oncology. *Immunol Rev.* 2023; 314(1): 250-279.
223. Silvin, A., Qian, J., Ginhoux, F. Brain macrophage development, diversity and dysregulation in health and disease. *Cell Mol Immunol.* 2023 Jun 26.
224. Furman D, Campisi J, Verdin E, Carrera-Bastos P, Targ S, Franceschi C, Ferrucci L, Gilroy DW, Fasano A, Miller GW, Miller AH, Mantovani A, Weyand CM, Barzilai N, Goronzy JJ, Rando TA, Effros RB, Lucia A, Kleinstreuer N, Slavich GM. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat Med.* 2019; 25(12): 1822-1832.
225. Scherbaum R, Moewius A, Oppermann J, Geritz J, Hansen C, Gold R, Maetzler W, Tönges L. Parkinson's disease multimodal complex treatment improves gait performance: an exploratory wearable digital device-supported study. *J Neurol.* 2022; 269(11): 6067-6085.
226. Alrouji M, Al-Kuraishy HM, Al-Gareeb AI, Saad HM, Batiha GE. A story of the potential effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in Parkinson's disease: beneficial or detrimental effects. *Inflammopharmacology.* 2023 Apr;31(2):673-688.
227. Al-Kuraishy HM, Alexiou A, Papadakis M, Elhussieny O, Saad HM, Batiha GE. New insights on the potential effect of vinpocetine in Parkinson's disease: one of the neglected warden and baffling topics. *Metab Brain Dis.* 2023; 38(6): 1831-1840.

228. Bronstein DM, Perez-Otano I, Sun V, Mullis Sawin SB, Chan J, Wu GC, Hudson PM, Kong LY, Hong JS, McMillian MK. Glia-dependent neurotoxicity and neuroprotection in mesencephalic cultures. *Brain Res.* 1995; 704(1): 112-6.
229. Parra I, Martínez I, Ramírez-García G, Tizabi Y, Mendieta L. Differential Effects of LPS and 6-OHDA on Microglia's Morphology in Rats: Implications for Inflammatory Model of Parkinson's Disease. *Neurotox Res.* 2020; 37(1): 1-11.
230. Tan HY, Wang N, Li S, Hong M, Wang X, Feng Y. The Reactive Oxygen Species in Macrophage Polarization: Reflecting Its Dual Role in Progression and Treatment of Human Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:2795090.
231. Yanuck SF. Microglial Phagocytosis of Neurons: Diminishing Neuronal Loss in Traumatic, Infectious, Inflammatory, and Autoimmune CNS Disorders. *Front Psychiatry.* 2019 Oct 3;10:712.
232. Tremblay, M.E., Cookson, M.R., Civiero, L., 2019. Glial phagocytic clearance in Parkinson's disease. *Mol. Neurodegener.* 14 (1), 16.
233. Bezard E, Yue Z, Kirik D, Spillantini MG. Animal models of Parkinson's disease: limits and relevance to neuroprotection studies. *Mov Disord.* 2013 Jan;28(1):61-70.
234. Jagmag, S.A., Tripathi, N., Shukla, S.D., Maiti, S., Khurana, S., 2016. Evaluation of models of Parkinson's disease. *Front. Neurosci.* 9, 503.
235. Okyere, K.S., Zeng, C., Yue, D., Hu, Y., 2021. Neurotoxic mechanism and shortcomings of MPTP, 6-OHDA, rotenone and paraquat-induced Parkinson's disease animal models. *Venoms Toxins* 1 (1), 27–40.
236. Lerche S, Zimmermann M, Wurster I, Roeben B, Fries FL, Deuschle C, Waniek K, Lachmann I, Gasser T, Jakobi M, Joos TO, Schneiderhan-Marra N, Brockmann K. CSF and Serum Levels of Inflammatory Markers in PD: Sparse Correlation, Sex Differences and Association With Neurodegenerative Biomarkers. *Front Neurol.* 2022 Feb 25;13:834580.

237. Ferrari, C.C., Tarelli, R., 2011. Parkinson's disease and systemic inflammation. *Parkinsons Dis* 2011, 436813.
238. Roy A, Mondal B, Banerjee R, Choudhury S, Chatterjee K, Dey S, Kumar H. Do peripheral immune and neurotrophic markers correlate with motor severity of Parkinson's disease? *J Neuroimmunol*. 2021 May 15;354:577545.
239. Collins M, Ling V, Carreno BM. The B7 family of immune-regulatory ligands. *Genome Biol*. 2005;6(6):223.
240. Poschke I, Mougiakakos D, Hansson J, Masucci GV, Kiessling R. Immature immunosuppressive CD14+HLA-DR-/low cells in melanoma patients are Stat3hi and overexpress CD80, CD83, and DC-sign. *Cancer Res*. 2010 Jun 1;70(11):4335-45.
241. Onishi KG, Maneval AC, Cable EC, Tuohy MC, Scasny AJ, Sterina E, Love JA, Riggle JP, Malamut LK, Mukerji A, Novo JS, Appah-Sampong A, Gary JB, Prendergast BJ. Circadian and circannual timescales interact to generate seasonal changes in immune function. *Brain Behav Immun*. 2020 Jan;83:33-43.
242. Segal BM, Giger RJ. Stable biomarker for plastic microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Mar 22;113(12):3130-2.
243. Meza-Perez, S., Randall, T.D. Immunological Functions of the Omentum. *Trends Immunol*. 2017; 38(7): 526-536.
244. Liu M, Silva-Sanchez A, Randall TD, Meza-Perez S. Specialized immune responses in the peritoneal cavity and omentum. *J Leukoc Biol*. 2021 Apr;109(4):717-729.
245. Ardavín C, Alvarez-Ladrón N, Ferriz M, Gutiérrez-González A, Vega-Pérez A. Mouse Tissue-Resident Peritoneal Macrophages in Homeostasis, Repair, Infection, and Tumor Metastasis. *Adv Sci (Weinh)*. 2023 Apr;10(11):e2206617.
246. Ahn EH, Kang SS, Liu X, Cao X, Choi SY, Musazzi L, Mehlen P, Ye K. BDNF and Netrin-1 repression by C/EBP $\beta$  in the gut triggers Parkinson's disease

- pathologies, associated with constipation and motor dysfunctions. *Prog Neurobiol.* 2021 Mar;198:101905.
- 247.Liu B, Fang F, Ye W, Wirdefeldt K. Appendectomy, Tonsillectomy and Parkinson's Disease Risk: A Swedish Register-Based Study. *Front Neurol.* 2020 Jun 5;11:510.
- 248.Mok SW, Wong VK, Lo HH, de Seabra Rodrigues Dias IR, Leung EL, Law BY, Liu L. Natural products-based polypharmacological modulation of the peripheral immune system for the treatment of neuropsychiatric disorders. *Pharmacol Ther.* 2020 Apr;208:107480.
- 249.Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci.* 2008 Jan;9(1):46-56.
- 250.Yan A, Zhang Y, Lin J, Song L, Wang X, Liu Z. Partial Depletion of Peripheral M1 Macrophages Reverses Motor Deficits in MPTP-Treated Mouse by Suppressing Neuroinflammation and Dopaminergic Neurodegeneration. *Front Aging Neurosci.* 2018 Jun 5;10:160.

**Перелік опублікованих праць та відомості про апробацію досліджень****Праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:**

1. Олійник, Ж., Сенчило, Н., Довбинчук, Т., Степаненко, С., Гузик, М. (2020). Реактивний астрогліоз у щурів із ЛПС-індукованою хворобою Паркінсона. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія, Біологія, 1(80):19-25. [https://doi.org/10.17721/1728\\_2748.2020.80.19-25](https://doi.org/10.17721/1728_2748.2020.80.19-25)  
*(Особистий внесок здобувача – експериментальні дослідження, пошук, аналіз та узагальнення тематичної літератури, підготовка статті до друку. 0,59 авторських аркушів).*
2. Oliynyk, Zh., Rudyk, M., Svyatetska, V., Dovbynychuk, T., Tolstanova, G., Skivka, L. (2022). Systemic inflammation biomarkers in 6-OHDA- and LPS-induced Parkinson's disease in rats. Ukr. Biochem. J, 94(1): 33-43. <https://doi.org/10.15407/ubj94.01.033>  
*(Особистий внесок здобувача – експериментальні дослідження, пошук, аналіз та узагальнення тематичної літератури, підготовка статті до друку. 1,2 авторських аркушів).*
3. Олійник, Ж., Сківка, Л. (2022) Функціональні характеристики перитонеальних фагоцитів щурів із 6-OHDA- та ЛПС-індукованою хворобою Паркінсона. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія, Біологія, 1(88): 41-46. <https://bio.visnyk.knu.ua/issue/view/vol88-n2/article5>  
*(Особистий внесок здобувача – експериментальні дослідження, пошук, аналіз та узагальнення тематичної літератури, підготовка статті до друку. 0,87 авторських аркушів).*

4. Oliynyk, Zh., Rudyk, M., Kalachniuk, L., Dovbynchuk, T., Tolstanova, G., Skivka, L. (2022). Long-term effects of sham surgery on phagocyte functions in rats. *Biotechnologia Acta* , 15(2): 37-46. <https://doi.org/10.15407/biotech15.02.037>  
*(Особистий внесок здобувача – експериментальні дослідження, пошук, аналіз та узагальнення тематичної літератури, підготовка статті до друку. 0,91 авторських аркушів).*
5. Oliynyk, Z., Rudyk, M., Dovbynchuk, T., Dzubenko, N., Tolstanova, G., Skivka, L. (2023) Inflammatory hallmarks in 6-OHDA- and LPS-induced Parkinson's disease in rats. *Brain Behav Immun Health*. 30:100616. <https://doi.org/10.1016/j.bbih.2023.100616>  
*(Особистий внесок здобувача – експериментальні дослідження, пошук, аналіз та узагальнення тематичної літератури, підготовка статті до друку. 1,49 авторських аркушів).*

#### **Опубліковані праці апробаційного характеру:**

1. Олійник Ж., Рудик М., Довгий Р., Святецька В., Толстанова Г., Довбинчук Т., Майборода Я., Степаненко С., Яценко І., Гладун Д., Сківка Л. Розвиток ЛПС-індукованої хвороби Паркінсона у щурів асоційований з прозапальною активацією циркулюючих фагоцитів. XV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», 9 – 11 квітня 2019 р., Львів, Україна: с.123.
2. Олійник Ж. І., Гузик М. М., Толстанова Г. М., Довбинчук Т. В., Рудик М. П., Довгий Р. С., Святецька В. М., Сківка Л.М. Патологічні зміни астроглії за умов розвитку ЛПС-індукованої хвороби Паркінсона у щурів. Всеукраїнська наукова конференція з міжнародною участю «Актуальні питання біології та медицини», 30-31 травня 2019 р., Черкаси, Україна: с.65.

3. Степаненко С., Рудик М., Гурмач Є., Святецька В., Присяжнюк А., Олійник Ж., Маринченко А., Довбинчук Т., Храновська Н., Скачкова О., Толстанова Г.М., Сківка Л.М. Функціональні та фенотипові властивості циркулюючих фагоцитів як індикаторні показники розвитку хвороби Паркінсона у щурів. Науково-практична конференція «Сучасні наукові досягнення в експериментальній та лабораторній медицині» Міжнародного конгресу з лабораторної медицини, 23-25 вересня 2020 р., Київ, Україна: с.11.
4. Олійник Ж., Святецька В., Маринченко А., Степаненко С., Довбинчук Т., Толстанова Г. Гематологічні ознаки системного запального процесу у тварин з різними моделями хвороби Паркінсона. XIX Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / Bioscience advances», 12-13 травня 2021 р., Київ, Україна: с.42.
5. Олійник Ж., Святецька В., Маринченко А., Довбинчук Т., Толстанова Г. Метаболічний профіль циркулюючих фагоцитів у тварин з різними моделями хвороби Паркінсона. XV Всеукраїнська конференція молодих вчених ІМБІГ з міжнародною участю, 26-27 травня 2021 р., Київ, Україна: с.202.
6. Oliyuyk Zh., Svyatetska V., Marynchenko A., RudyM., Dovbynychuk T., Dzubenko N., Tolstanova G. Functional Changes in Peripheral Phagocytes in Rats with LPS-induced Parkinson's Disease 1-st International Conference on Experimental Sciences & Biotechnology, September 8-10, 2021, Mugla, Turkey: p.43-48.
7. Oliyuyk Zh., Marynchenko A., Stepanenko S., Svyatetska V., Rudyk M. Functional alterations of peritoneal macrophages in rats with different models of Parkinson's disease. IV international scientific conference Microbiology and

Immunology - The Development Outlook In The 21st Century, September 22-23, 2022, Kyiv, Ukraine: p.16.