

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ Т-ЛИМФОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА И РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ

Левковская А. Н.¹, Адамович А. Ю.², Бойко А. В.², Борисов
А. В.³, Бадыгина Н. А.², Нижегородова Д. Б.^{1,2}

¹Кафедра иммунологии и экологической эпидемиологии
УО «Международный государственный экологический институт
им. А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета

²Научно-исследовательская лаборатория
ГУО «Белорусская медицинская академия
последипломного образования»,

³Кафедра нервных и нейрохирургических болезней
УО «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь

Актуальность. Нейродегенеративные заболевания (НДЗ) представляют собой группу в основном медленно прогрессирующих дегенеративных заболеваний, характеризующуюся мультифакториальной этиологией (генетическая предрасположенность, факторы окружающей среды и др.) и сопровождающуюся постепенным разрушением и гибелью отдельных групп клеток и структур центральной нервной системы (ЦНС), что приводит к развитию различной неврологической симптоматики, прежде всего деменции и нарушению двигательной активности [1, 2]. Несмотря на различные причины развития нейродегенерации, их общей чертой является хроническая активация микроглии, резидентных макрофагов нервной системы, что приводит к воспалению нервной ткани, повышению проницаемости гематоэнцефалического барьера, инфильтрации клеток адаптивной иммунной системы и повреждению нейронов [1, 2, 3].

Ряд проведенных исследований подтверждает, что ведущая роль в повреждении нейронов и их структур принадлежит Т-лимфоцитам, которые посредством секреции провоспалительных медиаторов поддерживают иммунное воспаление в ткани, регулируют синтез и высвобождение из клеток микроглии свободных радикалов, включая оксид азота, супероксид и

пероксид водорода, а также провоспалительных цитокинов и ингибируют продукцию нейротрофических факторов [1, 2]. Кроме того, в процессах нейродегенерации важную роль играют клетки памяти, которые, в условиях сформированного нейровоспаления могут вызывать высокоэффективный патогенный ответ, направленный против собственных тканей организма, и играть решающую роль в создании стойкой реакции иммунного воспаления, которая будет поддерживаться и усугубляться со временем [3].

В последнее время особый интерес представляет изучение эффекторных Т-клеток памяти, которые могут являться потенциальным диагностическим маркером развития и поддержания нейродегенеративных процессов при таких наиболее распространенных и социально-значимых НДЗ, как болезнь Паркинсона (БП), характеризующаяся гибелью дофаминергических нейронов в черной субстанции ЦНС, и рассеянный склероз (РС), представляющий собой хроническое заболевание с аутоиммунным воспалением, на фоне которого впоследствии формируются нейродегенерация [4].

Цель. Охарактеризовать субпопуляционный состав, пролиферативную способность и цитотоксическую активность Т-лимфоцитов у пациентов с БП и РС.

Материалы и методы исследования. Материалом для исследования явилась цельная периферическая венозная кровь, полученная от пациентов с РС (n=21, из них 10 мужчин и 11 женщины, средний возраст – 29,5 [23÷33] лет), пациентов с БП (n=6, из них 3 мужчин и 3 женщины, средний возраст – 61,2 [57÷65] года) и здоровых доноров (n=14, из них 8 мужчин и 6 женщины, средний возраст – 29 [24÷45] лет). Средняя продолжительность заболевания на момент забора биологического материала составила: 6 [4÷11] лет – у пациентов с БП и 4 [1÷6] года – у пациентов с РС. Средняя тяжесть заболевания соответствовала 2,5 [2,0÷3,0] баллам по шкале Хён и Яра – у пациентов с БП и 3,0 [2,0÷3,5] баллам по шкале EDSS (Expanded Disability Status Scale) – у пациентов с РС.

Метод проточной цитофлуориметрии. Периферическую кровь отбирали в стерильные пробирки с гепарином. Для определения экспрессии основных поверхностных маркеров лимфоцитов периферическую венозную кровь исследуемых групп окрашивали двумя панелями моноклональных антител:

CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 и CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 (BeckmanCoulter, США) согласно инструкции производителя. Для определения субпопуляции Т-клеток памяти использовали моноклональные антитела CD8-FITC, CCR7-PE, CD45RO-ECD, CD4-PC5, CD3-PC7 (BeckmanCoulter, R&DSYSTEMS, США). Основные популяции Т-клеток памяти определяли как: CD3⁺CCR7⁺CD45RO⁺ – Т-клетки центральной памяти (TCM), CD3⁺CCR7⁻CD45RO⁺ – Т-клетки эффекторной памяти (TEM), CD3⁺CCR7⁻CD45RO⁻ – терминально-дифференцированные эффекторные Т-клетки памяти (TEMRA). Окрашенные пробы инкубировали в течение 15 минут в темноте при комнатной температуре. Для последующего лизирования эритроцитов использовали раствор VersaLyse (BeckmanCoulter, США). Регистрацию результатов выполняли на проточном цитометре Cytotflex (BeckmanCoulter, США) на 20 000 CD3⁺Т-лимфоцитов.

Культуральный метод. Мононуклеары периферической крови (МПК) выделяли центрифугированием в течение 30 мин при 1500 об/мин при 4°C на градиенте плотности Histopaque-1077 с последующим 2-кратным центрифугированием в физиологическом растворе в течение 10 минут при 1500 об/мин при 4°C. Для оценки пролиферативной способности Т-лимфоцитов МПК предварительно окрашивали флуоресцентным красителем карбоксифлуоресцеином (CFSE, Fluka, Германия) и культивировали в полной питательной среде на основе RPMI-1640 (Invitrogen, Великобритания), содержащей 10% ЭТС (Gibco, Великобритания), 2 мМ L-глутамин (Invitrogen, Великобритания), 1% антибиотика-антимикотика (Invitrogen, Великобритания) в присутствии или отсутствии митогена – 2.5 мкг/мл фитогемагглютинаина (PHA, Sigma, Германия). Спонтанную и митоген-индуцированную пролиферацию лимфоцитов оценивали через 6 дней при помощи проточной цитофлуориметрии. Результат теста оценивали на проточном цитометре Cytotflex.

Спонтанную и интерлейкин-2-индуцированную (ИЛ-2, 100 U/мл, Fluka, Германия) цитотоксическую активность 3-дневной культуры МПК оценивали при совместном культивировании с предварительно окрашенными CFSE клетками-мишенями линии K-562, культивируемых в соотношении эффектор:мишень – 5:1 в течение 4 часов. По окончании культивирования

определяли количество погибших клеток-мишеней путем добавления в клеточную взвесь пропидиума иодида (PI, Sigma, Германия). Результаты оценивали на проточном цитометре Cytoflex на 20000 событий.

Статистическую обработку данных проводили с использованием стандартного пакета программы Statistica 8.0 («StatSoftInc.», США). Результаты представляли в виде медианы, 25 и 75-го перцентилей. Определение статистически значимых различий между сравниваемыми группами осуществляли непараметрическим методом *U*-критерий Манна-Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Количество Т-клеток памяти в периферической крови у пациентов с РС и БП

Количественный анализ субпопуляций Т-клеток памяти у пациентов с БП и РС показал, что общее количество CD3⁺Т-лимфоцитов и их основных субпопуляций (CD3⁺CD4⁺Т-хелперов и цитотоксических CD3⁺CD8⁺Т-клеток) статистически значимо не изменялось, однако выявлена тенденция к повышению удельного содержания CD3⁺Т-клеток памяти в периферической крови по сравнению с контрольной группой ($p = 0,06$).

Установлено, что у пациентов с НДЗ статистически значимо повышается относительное количество ТЕМ-клеток в обеих исследуемых группах: 17,4 [13,1÷22,2] и 18,9 [13,3÷22,8] соответственно, в группе пациентов с БП и РС по сравнению с аналогичным показателем у здоровых доноров (12,6 [7,2÷20,3], $p < 0,05$). При этом удельное содержание ТЕМ-клеток превышало количество ТСМ-клеток как у пациентов с БП (17,4 [13,1÷22,2] vs 10,9 [7,1÷16,8]), так и у пациентов с РС (18,9 [13,3÷22,8] vs 14,7 [11,8÷25,1]), в то время как в группе здоровых доноров преобладала субпопуляция ТСМ-клеток (19,2 [13,4÷26,0] vs 12,6 [7,2÷20,3]).

Детальный анализ субпопуляционного состава CD3⁺Т-клеток памяти у пациентов с НДЗ установил, что общее количество ТЕМ-клеток увеличивается, главным образом, за счет повышения процентного содержания цитотоксических CD8⁺CCR7⁻CD45RO⁺ТЕМ-клеток ($p < 0,05$), причем как с низкой так и с высокой экспрессией корецепторной молекулы CD8 при отсутствии

статистически значимых изменений в субпопуляции CD4⁺CCR7⁻CD45RO⁺TEM-клеток. Кроме того, показано, что количество TEMRA-клеток у пациентов с РС и БП статистически значимо повышены относительно показателей здоровых доноров и при этом в группе пациентов с БП удельное содержание TEMRA-клеток статистически значимо превышает как показатели здоровых доноров, так и пациентов с РС. Установлено, что общее количество TEMRA-клеток у пациентов с БП повышалось как за счет субпопуляции CD4⁺CCR7⁻CD45RO⁻TEMRA-клеток, так и CD8⁺CCR7⁻CD45RO⁻TEMRA-клеток, в то время как у пациентов с РС – только за счет увеличения цитотоксических CD8⁺CCR7⁻CD45RO⁻TEMRA-клеток.

Согласно литературным данным, TCM-клетки считаются покоеющимися долгоживущими клетками с высоким пролиферативным потенциалом и низкими эффекторными функциями, в то время как TEM-клетки являются относительно короткоживущими с меньшим потенциалом пролиферации, однако обладают высокой эффекторной активностью и преобладают в тканях-мишенях, где находятся в состоянии готовности реагировать на повторное действие антигена намного быстрее, чем популяция TCM-клеток. TEMRA-клетки являются терминально-дифференцированными эффекторными клетками, обладающие высокой цитотоксичностью, низкой пролиферативной активностью и высокой чувствительностью к апоптозу [5]. Таким образом, повышенное количество эффекторных популяций клеток памяти (TEM и TEMRA) у пациентов с НДЗ по сравнению с группой здоровых доноров, у которых преобладает популяция покоеющихся TCM-клеток, может указывать на активацию иммунного ответа у пациентов с РС и БП, однако о вовлеченности рассматриваемых клеток в нейродегенерацию и нейровоспаление можно судить только после углубленного анализа их функционального потенциала – пролиферативного ответа и цитотоксической активности.

Митоген-индуцированная пролиферация T-клеток памяти у пациентов с РС и БП

После 6 дней культивирования у пациентов с БП наблюдалось повышение спонтанной и РНА-стимулированной пролиферации TEM-клеток (8,0 [6,1÷13,2] vs 59,2 [55,2÷63,4] и TEMRA-

клеток (5,9 [4,9÷7,2] vs 65,9 [46,8÷84,6]) – в основном за счет CD4⁺Т-лимфоцитов и в меньшей степени за счет CD8⁺Т-клеток (p<0,05), в то время как у пациентов с РС (25,6 [15,6÷35,7] vs 89,3 [88,0÷90,5] ТЕМ-клеток и 32,3 [23,5÷41,2] vs 90,0 [89,3÷90,8] ТЕМРА-клеток) – наоборот, за счет CD8⁺ Т-лимфоцитов и в меньшей степени за счет CD4⁺ Т-клеток (p<0,05), по сравнению с пролиферацией у здоровых доноров, у которых превалировала субпопуляция ТСМ-клеток. При этом у пациентов с НДЗ отмечалась тенденция к дифференцировке Т-клеток памяти в ТЕМРА-клетки.

Цитотоксическая активность мононуклеаров периферической крови у пациентов с РС и БП

Анализ цитотоксической активности МПК у пациентов с БП выявил тенденцию к снижению спонтанной цитотоксичности в 1,9 раз (19,5 [8,2÷22,9]%, p<0,05), в то время как в группе пациентов с РС аналогичный показатель увеличивался в 1,4 раза (7,4 [5,2÷10,4]%), по сравнению со спонтанной цитотоксической активностью МПК здоровых доноров (10,3 [8,8÷11,8]%). В условиях стимуляции ИЛ-2 во всех исследуемых группах регистрировалось статистически значимое увеличение количества погибших клеток-мишеней К-562: 28,8 [28,5÷44,2]% – у пациентов с БП, 18,2 [12,9÷28,1] % – у пациентов с РС, и 51,3 [39,7÷62,9]% – в контрольной группе. Однако индексы стимуляции цитотоксичности (отношение ИЛ-2-индуцируемой к спонтанной цитотоксичности) МПК в группах пациентов с БП и РС статистически значимо снижались до 1,5 и 2,5, соответственно, в то время как в группе здоровых доноров индекс стимуляции составил 5,0.

Таким образом, превалирование активированных эффекторных субпопуляций ТЕМ- и ТЕМРА-клеток в двух исследуемых группах пациентов с БП и РС, а также увеличение их спонтанной и РНА-стимулированной пролиферации на фоне превалирования покоящихся ТСМ-клеток у здоровых доноров указывают на патогенетическую роль ТЕМ и ТЕМРА-клеток в развитии нейродегенерации. Кроме того, у пациентов с НДЗ показано снижение индуцированной цитотоксической активности МПК на фоне изменений в спонтанном цитотоксическом эффекте в зависимости от превалирующего патогенетического механизма (при БП

воспаление в нервной ткани инициируется повреждением нейронов, в то время как при РС аутоиммунное воспаление в ЦНС наблюдается в начальных этапах). В то же время снижение эффекторных функций лимфоидных клеток может быть результатом хронической стимуляции адаптивной иммунной системы.

Выводы. У пациентов с БП и РС регистрируется количественное преобладание и пролиферативная активность более дифференцированных популяций Т-клеток памяти (ТЕМ и ТЕМРА) по сравнению с контрольной группой, где основной популяцией выступают покоящиеся ТСМ-клетки, на фоне снижения способности МПК к ИЛ-2-стимулированной цитотоксической активности у пациентов с БП и РС. Полученные данные подтверждают участие Т-клеток памяти в развитии нейродегенерации и могут быть использованы в качестве биомаркеров при ранней диагностике данной патологии и оценке прогрессирования заболевания.

Литература

1. Sommer, A. The Trojan horse-neuroinflammatory impact of T cells in neurodegenerative diseases / A. Sommer, B. Winner // *Mol. Neurodegeneration*. – 2017. – Vol. 12. – P. 78–81.
2. Amor, S. Inflammation in neurodegenerative diseases / S. Amor, F. Puentes, D. Baker // *Immunology*. – 2010. – Vol. 129, No. 2. – P. 154–169.
3. González, H. T-cell-mediated regulation of neuroinflammation involved in neurodegenerative diseases / H. González, R. Pacheco // *J. of Neuroinflammation*. – 2014. – Vol. 11. – P. 201–208.
4. Кудрявцев, И. В. Т-клетки памяти: основные популяции и стадии дифференцировки / И. В. Кудрявцев // *Рос. иммунол. журн.* – 2014. – Т. 4, № 8. – С. 947–964.
5. Devarajan, P. Autoimmune effector memory T cells: the bad and the good / P. Devarajan, Z. Chen // *Immunol. Res.* – 2013. – Vol. 57. – № 1. – P. 12–22.