Апоптоз лимфоцитов у больных рассеянным склерозом

Вострякова С.А.¹, Алифирова В.М.¹, Иванова С.А.², Орлова Ю.Ю.¹

Apoptosis cells in patients with multiple sclerosis

Vostryakova S.A., Alifirova V.M., Ivanova S.A., Orlova Yu.Yu.

© Вострякова С.А., Алифирова В.М., Иванова С.А., Орлова Ю.Ю.

Введение

Рассеянный склероз (PC), в патогенезе которого лежат иммунологические нарушения, представляет собой адекватную модель изучения процесса апоптоза. Актуальность данного исследования объясняется все большей распространенностью в последнее время PC и возникающей в связи с этим необходимостью изучения патогенетических механизмов заболевания.

Апоптоз, или программированная клеточная смерть, считается важным механизмом поддержания корректного числа клеток в многоклеточном организме. Предполагается, что развитие аутоиммунных заболеваний является результатом дисбаланса между пролиферацией клеток и программированной клеточной смертью. Апоптоз осуществляется и контролируется иммунными механизмами [1, 4].

В патогенезе рассеянного склероза лежат дегенеративные и аутоиммунные процессы, которые отражают взаимодействие иммунной нервной систем. С одной стороны, у больных РС наблюдается индукция апоптоза, в частности апоптоз в олигодендроцитах, возникающий на определенном этапе развития, который резко тормозит процессы ремиелинизации, подготавливая почву разрушения миелина. Одним из механизмов усиления гибели нервных клеток является нарушение синтеза регуляторных факторов, например фактора некроза опухолей- α (ФНО- α), который является основным проапоптогенным цитокином и на системном уровне приводит к индукции апоптоза клеток крови. С другой стороны, аутоиммунные процессы задействуют чрезвычайно сложные и многообразные эффекторные механизмы, лежащие в основе нарушения нейроиммунного взаимодействия и развития присущего для РС неврологического дефицита. При этом аутоиммунные процессы характеризуются угнетением процессов апоптоза тех клеток, которые должны в норме погибать. Возможно, снижение апоптоза наблюдается именно для аутоиммунных Т-клеток, в то время как для других субпопуляций лимфоцитов или для всех иммунокомпетентных клеток в целом характерна индукция программированной клеточной гибели.

Около 10 лет назад был открыт на цитоплазматической мембране клеток первый специализированный рецептор из семейства ФНО-рецепторов для индукции апоптоза — CD95 (Fas/APO-I). Описан соответствующий индукторный фактор Fas-лиганд (FasL). Fas-лиганд экспрессируется на поверхности глиальных клеток и лимфоцитах больных PC. Экспрессия Fas-рецептора на клеточной мембране означает готовность клетки к апоптозу, однако для запуска процесса необходимо действие индукторов. Известна группа физиологических активаторов и ингибиторов апоптоза [3, 7, 9].

В качестве индуцирующих апоптоз факторов выступают провоспалительные цитокины (ФНО- α , γ -интерферон). Эти показатели были предложены в качестве субклинического признака (предвестника) активизации иммунопатологического процесса. Концентрация ФНО- α связана с клинически выраженной активностью болезненного процесса при РС [15].

Цель исследования — изучение процесса апоптоза лейкоцитов крови и факторов его регуляции у больных рассеянным склерозом и здоровых лиц.

Материал и методы

¹ Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

² НИИ психического здоровья ТНЦ СО РАМН, г. Томск

Проведено обследование 36 пациентов с PC, которые находились на стационарном лечении в неврологической клинике Сибирского государственного медицинского университета (СибГМУ) (г. Томск), а также наблюдались амбулаторно на кафедре неврологии и нейрохирургии СибГМУ. Диагноз устанавливался в соответствии с критериями Мак-Дональда (2005). Получали терапию копаксоном в дозе 20 мг подкожно ежедневно 22 пациента, 14 человек получали сосудисто-метаболическую терапию. В исследование вошли 68,19% женщин и 31,81% мужчин. Средний возраст пациентов составил (39,95 \pm 2,56) года. Средний возраст начала заболевания (28,47 \pm 2,1) года (медиана Ме равна 30; от 15 до 44 лет).

Ремиттирующий тип течения наблюдался у 63,63% больных, вторично-прогрессирующий — у 36,37% пациентов. У пациентов с ремиттирующим и вторично-прогрессирующим течением длительность первой ремиссии составляла $(3,12\pm0.79)$ года (Ме = 2; от 1 до 6 лет). Среднегодовая частота обострений в течение всего периода болезни составила 0.62 ± 0.11 (Me = 0,5; от 0,1 до 2,0). Средний балл по шкале EDSS у пациентов до начала наблюдения составил $3,42\pm0,91$ (Ме = 3,5; от 2,0 до 5,0 балла). Сумма неврологического дефицита составила $8,71 \pm 0,78$ (Me = 8; от 3 до 19). Скорость прогрессирования заболевания (отношение балла EDSS к длительности болезни) составила \pm 0,19 (Me = 0,5; от 0,1 до 1,0). Среднее количество курсов терапии кортикостероидами было $1,78 \pm 1,77$ (Me = 1,5; от 1,0 до 5,0).

Обследование пациентов проводилось в динамике, т.е. при поступлении (первая точка), через 3 мес наблюдения (вторая точка) и через 6 мес (третья точка). Группу сравнения составили 20 здоровых лиц, соответствующих по полу и возрасту группе больных. Средний возраст составил $(31,9\pm1,7)$ года.

Проводилась комплексная оценка апоптоза: рецепторный уровень (выявление рецептора апоптоза на лимфоцитах методом люминесцентной микроскопии), клеточный уровень (оценка морфологических изменений в лейкоцитах методом световой микроскопии). Учитывая, что наиболее информативным методом изучения апоптоза остается оценка структурных изменений клеток с помощью светового микроскопа, осуществлялось определение морфологических изменений нейтрофилов и лимфоцитов. Готовили мазки, фиксировали 5 мин в азур-эозине метиленовом синем по Май-Грюнвальду и окрашивали 40 мин по Романовскому—Гим-

зе. Подсчитывали количество клеток с морфологическими признаками апоптоза в процентах от доли нейтрофилов и лимфоцитов в общей лейкоцитарной формуле. Для оценки содержания клеток с маркером апоптоза (экспрессия CD95-рецептора на лимфоцитах) использовали непрямой иммунофлюоресцентный метод и моноклональные антитела к антигену CD95 (Fas-рецептор) (TOO «Сорбент», Россия).

Концентрацию ФНО-α в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом с использованием наборов реактивов («Протеиновый контур», г. Санкт-Петербург).

Все количественные показатели обрабатывались статистически с вычислением степени достоверности по t-критерию Стьюдента для независимых выборок. Различия оценивали как достоверные при p < 0,05. Предварительно оценивали нормальность генеральной совокупности с помощью критерия Колмогорова—Смирнова и равенство генеральных дисперсий с помощью F-критерия Фишера.

Результаты

У больных рассеянным склерозом относительное содержание в кровотоке лимфоцитов, экспрессирующих рецепторы готовности к Fas-зависимому апоптозу (CD95), в первой, во второй и третьей точках составило (19,19 \pm 0,42), (20,01 \pm 0,15), (20,79 \pm 0,14)% соответственно, у здоровых лиц (13,52 \pm 0,27)%, ρ < 0,05.

Абсолютное содержание CD95-лимфоцитов у больных PC в начале наблюдения, через 3 и 6 мес (171,88 \pm \pm 16,56) \cdot 106, (157,91 \pm 6,84) \cdot 106, (127,26 \pm 5,3) \cdot 106 кл./л что значительно выше по сравнению с таковыми в контрольной группе ((123,48 \pm 20,43) \cdot 106 кл./л, ρ < 0,05).

У пациентов с рассеянным склерозом в мазках крови обнаружены лимфоциты с морфологическими признаками, характерными для клеток, подвергшихся апоптозу (в лимфоцитах происходит деградация ядерного материала, наблюдается фрагментация хроматина на несколько частей).

Относительное содержание лимфоцитов с признаками спонтанного апоптоза у пациентов с PC составило $(4,19\pm0,17)\%$ при первичном осмотре, $(4,36\pm0,09)\%$ — после 3 мес наблюдения и $(4,68\pm0,07)\%$ — после 6 мес (против $(1,08\pm0,27)\%$ — в группе контроля, p<0,05). Абсолютное содержание апоптотических лимфоцитов у пациентов с PC составило $(32,92\pm3,08)\cdot10^6$ кл./л в начале наблюдения, $(31,42\pm1,29)\cdot10^6$ кл./л после 3 мес и $(26,36\pm1,05)\cdot10^6$ кл./л — че-

рез полгода (против $(9.98 \pm 0.65) \cdot 10^6$ кл./л у здоровых лиц, $\rho < 0.05$).

В мазках крови больных РС обнаружены сегментоядерные нейтрофилы с морфологическими признаками апоптоза. Нейтрофилы, подвергшиеся апоптозу, имеют меньший размер, округлую форму, в некоторых случаях в цитоплазме выделяется несколько крупных вакуолей на одном полюсе. Морфологическая картина изменений ядерного вещества выражается в уменьшении ядра с конденсацией и грануляцией хроматина по периметру его границы.

Процентное содержание нейтрофилов с морфологическими признаками апоптоза у пациентов с PC составило $(2,34\pm0,07)\%$ в первой точке, $(2,02\pm0,08)\%$ после 3 мес наблюдения и $(2,02\pm0,25)\%$ после 6 мес $((0,25\pm0,12)\%$ в группе контроля, p<0,05).

Абсолютное содержание апоптотических нейтрофилов у пациентов с PC в первой, во второй и третьей точках составило $(235,15\pm31,68)\cdot10^6,\qquad 231,63\pm10,87)\cdot10^6 \quad \text{и}\\ (184,09\pm0,68)\cdot10^6\ \text{кп/л},\ ((168,0\pm10,67)\cdot10^6\ \text{кп/л}\ \text{у}\ \text{ здоровых лиц, }\rho<0,05).$

Рассчитан индекс реализации апоптоза, т.е. доля клеток с морфологическими признаками апоптоза в процентах от общего числа клеток, экспрессирующих рецепторы готовности к апоптозу.

Индекс реализации апоптоза у больных РС в первой, во второй и третьей точках составляет (21,56 \pm \pm 0,5), (21,96 \pm 1,19), (22,48 \pm 0,46)%, что значительно превышает аналогичный показатель у здоровых лиц ((8,48 \pm 2,15)%, ρ < 0,05).

В ходе исследования пациенты были разделены на две группы в зависимости от концентрации ФНО- α . Определение концентрации ФНО- α проводилось в первой и во второй точках. Первую группу составили 4 человека (11,11%), у которых наблюдалось повышение концентрации ФНО- α . Среднее значение концентрации ФНО- α у больных РС в первой точке составило (768,50 \pm 313) пг/мл, во второй точке (810 \pm 265) пг/мл. Для пациентов первой группы характерен более выраженный неврологический дефицит. Пациенты этой группы находились в стадии обострения.

Во второй группе было 32 пациента (88,89%) с показателями концентрации ФНО- α в пределах нормы, и значения концентрации ФНО- α составили от 0 до 50 пг/мл во всех точках обследования. Пациенты находились в стадии ремиссии.

Заключение

Проведенные исследования показали увеличение спонтанного апоптоза иммунокомпетентных клеток периферической крови у пациентов с РС в сравнении с группой здоровых лиц. У больных РС наблюдалась тенденция к снижению абсолютного содержания апоптотических лимфоцитов, нейтрофилов в динамике наблюдения в течение 6 мес. Имеется динамика в увеличении процентного содержания лимфоцитов и нейтрофилов с морфологическими признаками апоптоза у больных РС. У больных рассеянным склерозом относительное содержание в кровотоке лимфоцитов, экспрессирующих рецепторы готовности к Fas-зависимому апоптозу (CD95), через 6 мес увеличивалось. Абсолютное содержание CD95-лимфоцитов у больных PC снижалось через 6 мес наблюдения. Имеется тенденция к нарастанию индекса реализации апоптоза лимфоцитов у больных РС в ходе исследования.

Полученные результаты показали, что концентрация ΦHO - α в сыворотке крови у больных рассеянным склерозом зависит от тяжести заболевания и стадии клинического течения. Повышение ΦHO - α наблюдается при обострении патологического процесса.

Литература

- 1. Барышникова А.Ю., Шишкин Ю.В. Иммунологические проблемы апоптоза. М.: Эдиториал УРСС, 2002. 320 с.
- Завалишин И.А., Захарова М.Н. Гибель нейрона кардиальная проблема неврологии и психиатрии // Журн. неврологии и психиатрии. 1999. С. 28—33.
- Пальцев М.А., Иванов А.А., Северин С.Е. Межклеточные взаимодействия. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 2003. 288 с.
- 4. *Потапнев М.П.* Апоптоз клеток иммунной системы и его регуляция цитокинами // Иммунология. 2002. № 4. с. 237—243.
- 5. *Рассеянный* склероз. Избранные вопросы теории и практики / Под редакцией И.А. Завалишина, В.И. Головкина. М., 2000.
- Ярилин А.А. Апоптоз и его место в иммунных процессах // Иммунология. 1996. №6. С. 10—23.
- Fas S.C., Fritzsching B., Suri-Payer E., Krammer P.H. Death receptor signaling and its function in the immune system // Curr. Dir. Autoimmun. 2006. V.9. P. 1.
- Fox E.J. Immunopathology of multiple sclerosis // Neurology. 2004.
 V. 63. № 12. P. 3—7.
- Hovelmeyer N., Hao Z., Kranidioti K. et al. Apoptosis of oligodendrocytes via Fas and TNF-R1 is a key event in the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis // J. Immunol. 2005.
 V. 175. № 9. P. 5875—5884.
- Okuda Y., Apatoff B.R., Posnett D.N. Apoptosis of T cells in peripheral blood and cerebrospinal fluid is associated with disease activity of multiple sclerosis // Neuroimmunol. 2006. V. 171. P. 163—170.
- 11. Pender M.P. Oligodendrocyte apoptosis before immune attack in multiple sclerosis? // Ann. Neurol. 2005. V. 57. № 1. P. 158.
- Petelin Z., Brinar V., Petravic D. et al. CD95/Fas expression on peripheral blood T lymphocytes in patients with multiple sclerosis: effect of high-dose methylprednisolone therapy // Clin. Neurol. Neuro-

Вострякова С.А., Алифирова В.М., Иванова С.А., Орлова Ю.Ю.

Апоптоз лимфоцитов у больных рассеянным склерозом

- surg. 2004. V. 106. № 3. P. 259-262.
- 13. Ponomarev E.D., Dittel B.N. Gamma delta T cells regulate the extent and duration of inflammation in the central nervous system by a Fas ligand-dependent mechanism // J. Immunol. 2005. V. 174. № 8. P. 4678—4687.
- Prieto A., Diaz D., Barcenilla H. et al. Increased spontaneous ex vivo apoptosis and subset alterations in peripheral blood T cells from patients with multiple sclerosis // J. Clin. Immunol. 2006. V. 26. P. 101—112.
- Ruffini F., Chojnacki A., Weiss S., Antel J.P. Immunobiology of oligodendrocytes in multiple sclerosis // Adv. Neurol. 2006. V. 98. P.47—63.
- 16. Vanderlocht J., Hellings N., Hendriks J.J. et al. Leukemia inhibitory factor is produced by myelin-reactive T cells from multiple sclerosis patients and protects against tumor necrosis factor-alpha-induced oligodendrocyte apoptosis // J. Neurosci. Res. 2006. V. 83. P. 763 —767