Апоптоз лимфоцитов и факторы его регуляции у больных рассеянным склерозом

Вострякова С.А.¹, Алифирова В.М.², Иванова С.А.³

Apoptosis cells and regulation factors in patients with multiple sclerosis

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

¹ Томская областная клиническая больница, г. Томск

² Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

³ НИИ психического здоровья СО РАМН, г. Томск

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

Изучение апоптоза лимфоцитов крови и факторов его регуляции у больных рассеянным склерозом в стадиях обострения и ремиссии представляет актуальную проблему неврологии. Обследован 91 пациент с рассеянным склерозом. Определяли показатели апоптоза лимфоцитов крови. Абсолютное количество лимфоцитов с признаками апоптоза в обострении ниже, чем в ремиссию. Повышение фактора некроза опухоли- α наблюдается при обострении.

Ключевые слова: апоптоз, рассеянный склероз, фактор некроза опухоли- α .

Study process apoptosis cells in relapion and remission in 91 patients with multiple sclerosis. Study apoptosis cells in patients with multiple sclerosis. Absolut apoptosis cells in remission high.

Key words: apoptosis, multiple sclerosis, tumor necrosis factor α .

УДК 616.832-004.2:616.155.32-091.818:57.053

Введение

Апоптоз, или запрограммированная клеточная смерть, является важным механизмом поддержания корректного числа клеток в многоклеточном организме.

Предполагается, что развитие аутоиммунных заболеваний выступает результатом дисбаланса между пролиферацией клеток и запрограммированной клеточной смертью.

Апоптоз осуществляется и контролируется иммунными механизмами [1, 4].

В патогенезе рассеянного склероза лежат дегенеративные и аутоиммунные процессы, которые отражают взаимодействие иммунной и нервной систем.

С одной стороны, у больных рассеянным склерозом (РС) наблюдается индукция апоптоза, в частности, апоптоз в олигодендроцитах, запущенный на определенном этапе развития, резко тормозит процессы ремиелинизации, подготавливая почву гибели миелина. Одним из механизмов усиления гибели нервных клеток вы-

ступает нарушение синтеза регуляторных факторов, например фактора некроза опухоли- α (ФНО- α), который является основным проапоптогенным цитокином и на системном уровне приводит к индукции апоптоза клеток периферической крови. С другой стороны, аутоиммунные процессы задействуют чрезвычайно сложные и многообразные эффекторные механизмы, лежащие в основе нарушения нейроиммунного взаимодействия и развития характерного 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 запрограммированной клеточной гибели.

Около 10 лет назад был открыт на цитоплазматической мембране клеток первый специализированный рецептор из семейства TNF-

рецепторов для индукции апоптоза – CD95 (Fas/Apo-1). Описан соответствующий индукторный фактор Fas-лиганд. Fas-лиганд экспрессируется на поверхности глиальных клеток (микроглии, астроцитах) и лимфоцитах больных РС. Экспрессия Fas-рецептора на клеточной мембране означает готовность клетки уйти в апоптоз, 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). Этот показатель был предложен в качестве субклинического предвестника активации иммунопатологического процесса. Концентрация ФНО- α связана с клинически выраженной активностью болезненного процесса при РС [15].

Рассеянный склероз, в патогенезе которого лежат иммунологические нарушения, представляет собой адекватную модель для изучения процесса апоптоза.

Актуальность данного исследования объясняется все большим распространением в последнее время РС и возникающей в связи с этим необходимостью изучения патогенетических механизмов заболевания.

Цель исследования – изучить процесс апоптоза лимфоцитов крови и факторы его регуляции у больных рассеянным склерозом в стадиях обострения и ремиссии.

Материал и методы

Проведено обследование 91 пациента с РС, 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). Проведен анализ показателей лейкоцитов и спонтанного апоптоза клеток крови у больных рассеянным склерозом в зависимости от стадии заболевания и у здоровых лиц.

Пациенты в стадии обострения составили группу из 43 (47,25%) человек, в ремиссии находилось 48 (52,75%) человек. Иммуномодулирующая терапия была назначена 46 (50,54%) больным: ребиф получали 14 (15,38%) человек, авонекс – 10 (10,98%), копаксон – 22 (24,17%). При развитии обострения больные по показаниям проходили курс гормонотерапии. Курсы симптоматической терапии назначались 45 (49,45%) пациентам. Ремиттирующий тип течения наблюдался у 69,23% больных, вторично прогрессирующий тип течения у 26,37%, первично прогрессирующий у 4,39%.

Средний возраст пациентов составил ($39,95 \pm 2,56$) года, женщин было 68,19%, мужчин – 31,81%. средний возраст начала заболевания ($28,47 \pm 2,1$) года, медиана $Me = 30$ (от 15 до 44 лет). У пациентов с ремиттирующим и вторично прогрессирующим течением длительность первой ремиссии составляла ($3,12 \pm 0,79$) года ($Me = 2$; от 1 до 6 лет). Среднегодовая частота обострений в течение всего периода болезни составила $0,62 \pm 0,11$ ($Me = 0,5$; от 0,1 до 2,0). Средний балл по шкале EDSS у пациентов до начала наблюдения составил $3,42 \pm 0,91$ ($Me = 3,5$; 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 $0,49 \pm 0,19$ ($Me = 0,5$; 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). В группу сравнения вошли 20 здоровых лиц, соответствующих по полу и возрасту группе больных. Средний возраст составил ($31,9 \pm 1,7$) 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). 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 мети-

леновом синем по Май-Грюнвальду и окрашивали 40 мин по Романовскому-Гимзе. 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) («Сорбент», Россия). Концентрацию ФНО- α в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом с использованием соответствующих наборов («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 и обсуждение

У больных рассеянным склерозом относительное содержание лимфоцитов в кровотоке составило $(22,30 \pm 0,20)\%$, что ниже по сравнению с контрольной группой – $(30,06 \pm 1,73)\%$, $p < 0,05$. Абсолютное содержание лимфоцитов у пациентов с РС оказалось равным $(1,22 \pm 0,01) \cdot 10^6$ клеток на 1 л (кл/л) (у здоровых лиц $(1,96 \pm 0,04) \cdot 10^6$, $p < 0,05$). Относительное содержание нейтрофилов у пациентов с РС составило $(68,76 \pm 0,18)\%$ против $(66,28 \pm 0,25)\%$ у здоровых лиц, $p < 0,05$. Абсолютное содержание нейтрофилов у пациентов с РС имело значение $(3,84 \pm 0,04) \cdot 10^6$, а у здоровых лиц $(4,32 \pm 0,04) \cdot 10^6$ кл/л, $p < 0,05$. Показано, что в периферической крови у больных РС содержание лимфоцитов, экспрессирующих Fas-рецептор, находилось в пределах $(20,26 \pm 0,08)\%$, а у здоровых лиц в пределах $(13,52 \pm 0,27)\%$, $p < 0,05$. Абсолютное содержание CD95-лимфоцитов у больных РС составило $(145,37 \pm 3,22) \times 10^6$ кл/л, что ниже по сравнению с таковыми в

контрольной группе – $(268,25 \pm 12,45) \cdot 10^6$, $p < 0,05$. Относительное содержание нейтрофилов с морфологическими признаками апоптоза у пациентов с РС $(2,13 \pm 0,04)\%$, у здоровых лиц – $(0,18 \pm 0,07)\%$, $p < 0,05$. Абсолютное содержание апоптотических нейтрофилов у пациентов с РС оказалось равным $(201,15 \pm 4,83) \cdot 10^6$ ($(290,35 \pm 11,95) \cdot 10^6$ кл/л у здоровых лиц), $p < 0,05$. Относительное содержание лимфоцитов с признаками спонтанного апоптоза у пациентов с РС имело значение $(4,38 \pm 0,04)\%$ ($(1,08 \pm 0,27)\%$ в группе контроля), $p < 0,05$. Абсолютное содержание апоптотических лимфоцитов у пациентов с РС оказалось равным $(29,09 \pm 0,63) \cdot 10^6$ кл/л ($(38,35 \pm 0,84) \cdot 10^6$ у здоровых лиц), $p < 0,05$.

Рассчитан индекс реализации апоптоза, т.е. доля клеток с морфологическими признаками апоптоза в процентах от общего числа клеток, экспрессирующих рецепторы готовности к апоптозу. Установлено, что индекс реализации апоптоза у больных РС $(21,69 \pm 0,2)\%$ ($(8,48 \pm 2,16)\%$ в группе контроля), $p < 0,05$.

У больных рассеянным склерозом в стадии обострения относительное содержание в кровотоке лимфоцитов составило $(21,51 \pm 0,28)\%$, в стадии ремиссии данный показатель выше – $(23,31 \pm 0,27)\%$, $p < 0,05$. Абсолютное содержание лимфоцитов у пациентов с РС в стадии обострения ниже $(1,15 \pm 0,02) \cdot 10^6$ кл/л, чем в ремиссию $(1,31 \pm 0,02) \cdot 10^6$, $p < 0,05$. Относительное содержание лимфоцитов с признаками спонтанного апоптоза у пациентов с РС в стадии обострения выше $(4,55 \pm 0,06)\%$, чем в стадии ремиссии $(4,17 \pm 0,04)\%$, $p < 0,05$. Абсолютное содержание апоптотических нейтрофилов у пациентов с РС в стадии обострения оказалось равным $(197,38 \pm 6,67) \cdot 10^6$, при ремиссии – $(206,14 \pm 6,92) \cdot 10^6$ кл/л, $p < 0,05$. Абсолютное содержание апоптотических лимфоцитов у пациентов с РС в стадии обострения составило $(926,54 \pm 0,82) \cdot 10^6$, а в стадии ремиссии $(32,19 \pm 0,86) \cdot 10^6$ кл/л, $p < 0,05$. Доля нейтрофилов с признаками апоптоза у пациентов с РС равна $(2,16 \pm 0,05)\%$ в стадии обострения и снижена в стадии ремиссии – $(2,09 \pm 0,06)\%$, $p < 0,05$.

У больных рассеянным склерозом относительное содержание в кровотоке лимфоцитов, экспрессирующих рецепторы готовности к Fas-зависимому апоптозу (CD95), в стадии обострения оказалось равным ($20,61 \pm 0,11\%$), в стадии ремиссии данный показатель ниже – ($19,83 \pm 0,11\%$), $p < 0,05$.

Обнаружено, что индекс реализации апоптоза у больных РС в стадии обострения имел

значение ($22,12 \pm 0,29\%$), в стадии ремиссии – ($21,10 \pm 0,26\%$), $p < 0,05$. Показатели лейкоцитов и спонтанного апоптоза клеток крови у пациентов с рассеянным склерозом в зависимости от стадии заболевания и у здоровых лиц представлены в таблице.

Показатели содержания лейкоцитов и спонтанного апоптоза клеток крови у здоровых лиц и больных рассеянным склерозом в зависимости от стадии заболевания

Показатель	Здоровые лица	Стадия рассеянного склероза	
		Обострение	Ремиссия
Лейкоциты, $\cdot 10^9$ кл/л	$6,42 \pm 0,06$	$6,41 \pm 0,18^*$	$5,69 \pm 0,19$
Лимфоциты, %	$30,06 \pm 1,73$	$21,51 \pm 0,28^*$	$23,31 \pm 0,27$
Лимфоциты, абс.	$1,96 \pm 0,04$	$1,15 \pm 0,02^*$	$1,31 \pm 0,02$
Нейтрофилы, %	$66,28 \pm 0,25$	$69,33 \pm 0,25$	$67,98 \pm 0,27$
Нейтрофилы, абс.	$4,32 \pm 0,04$	$3,79 \pm 0,06$	$3,89 \pm 0,05$
Доля нейтрофилов с признаками апоптоза, %	$0,18 \pm 0,07$	$2,16 \pm 0,05^*$	$2,09 \pm 0,06$
Абсолютное количество нейтрофилов с признаками апоптоза, кл/л	$290,35 \pm 11,95$	$197,38 \pm 6,67$	$206,14 \pm 6,92$
Доля лимфоцитов с фрагментированным ядром, %	$1,08 \pm 0,27$	$4,55 \pm 0,06^*$	$4,17 \pm 0,04$
Абсолютное количество лимфоцитов с фрагментированным ядром, кл/л	$38,35 \pm 0,84$	$26,54 \pm 0,82^*$	$32,19 \pm 0,86$
Лимфоциты, экспрессирующие Fas-рецептор, %	$13,52 \pm 0,27$	$20,61 \pm 0,11^*$	$19,83 \pm 0,11$
Абсолютное количество CD95, кл/л	$268,25 \pm 12,45$	$130,59 \pm 4,23^*$	$163,04 \pm 4,24$
Индекс реализации апоптоза, %	$8,48 \pm 2,16$	$22,12 \pm 0,29^*$	$21,10 \pm 0,26$

* Достоверные различия с ремиссией.

У 38 больных РС и у здоровых лиц проведена оценка ФНО- α . Учитывая большую индивидуальную вариабельность значений продукции цитокинов, были выделены две группы лиц в зависимости от концентрации ФНО- α .

В первую группу вошли 4 (10,52%) человека, у которых наблюдалось повышение концентрации ФНО- α . Среднее значение концентрации ФНО- α у больных РС составило ($768,50 \pm 313$) пг/мл. Для представителей первой группы характерен более выраженный неврологический дефицит. Средний балл по шкале EDSS равнялся $3,80 \pm 2,11$. Пациенты этой группы находились в стадии обострения.

Во второй группе было 32 (89,47%) человека с показателями концентрации ФНО- α в пределах нормы – от 0 до 50 пг/мл. Пациенты находились в стадии ремиссии. Средний балл по шкале EDSS составил $2,65 \pm 1,43$.

В группе контроля концентрация ФНО- α была в пределах нормы.

Заключение

Проведенные исследования показали снижение абсолютного количества нейтрофилов и лимфоцитов с признаками апоптоза у пациентов с РС в сравнении с группой здоровых лиц. При РС снижена элиминация клеток, которые в норме уничтожаются процессом апоптоза. Показатели запрограммированной клеточной смерти изменяются в стадиях обострения и ремиссии. Абсолютное количество нейтрофилов и лимфоцитов с признаками апоптоза при обострении ниже, чем при ремиссии. В стадии обострения уменьшается уничтожение клеток посредством апоптоза. И, наоборот, в ремиссию повышается механизм уничтожения клеток с помощью апоптоза. Изменение показателей апоптоза при РС говорит о том, что запрограммированная клеточная смерть играет роль в патогенезе РС. Концентрация ФНО- α в сыворотке крови у больных рассеянным склерозом зависит от тяжести заболевания и стадии клинического течения. Повы-

шение ФНО- α наблюдается при обострении патологического процесса.

Литература

1. Барышникова А.Ю., Шишкин Ю.В. Иммунологические проблемы апоптоза. 2002. С. 32–40.
2. Завалишин И.А., Захарова М.Н. Гибель нейрона – кардиальная проблема неврологии и психиатрии // Журн. неврологии и психиатрии. 1999. С. 28–33.
3. Пальцев М.А., Иванов А.А., Северин С.Е. Межклеточные взаимодействия. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 2003. 188 с.
4. Потапов 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 ред. И.А. Завалишина, В.И. Голловкина. М., 2000. С. 9–15.
6. Ярилин А.А. Апоптоз и его место в иммунных процессах // Иммунология. 1996. № 6. С. 10–23.
7. 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.
8. Fox E.J. Immunopathology of multiple sclerosis // Neurology. 2004. V. 63. № 12. P. 3–7.
9. 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.
10. 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.
12. 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. Neurosurg. 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.
14. Prieto A., Diaz D., Barcenilla H. et al. Alvarez-Mon 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.
15. 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- α -induced oligodendrocyte apoptosis // J. Neurosci Res. 2006. V. 83. P. 763–774.

Поступила в редакцию 16.04.2009 г.

Сведения об авторах

С.А. Вострякова — врач-невролог отделения неврологии инсультного центра Томской ОКБ (г. Томск).

В.М. Алифирова — д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой неврологии и нейрохирургии СибГМУ (г. Томск).

С.А. Иванова — д-р мед. наук, профессор, зав. лабораторией клеточного и молекулярных исследований НИИ психического здоровья СО РАМН (г. Томск).

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

Апоптоз лимфоцитов и факторы его регуляции при РС

Для корреспонденции

Вострякова Светлана Анатольевна, тел. 8-913-100-76-50, e-mail: vostryakova@inbox.ru.