

УДК: 616.832-004.2:612.017

Влияние $\gamma\delta$ T-лимфоцитов на экспрессию CD62L и CD25 $\alpha\beta$ T-клетками при миелин-индуцированной активации *in vitro*

Д.Б. Нижегородова¹, Я.М. Мотузова², А.Г. Байда³, М.М. Зафранская¹¹Белорусская медицинская академия последипломного образования, ул. П.Бровки, 3, Минск, Беларусь²Белорусский государственный медицинский университет, пр. Дзержинского, 83, Минск, Беларусь³УЗ 9-я ГКБ, ул. Семашко, 8, Минск, Беларусь

$\gamma\delta$ T-lymphocytes' influence upon CD62L and CD25 expression on $\alpha\beta$ T-cells under myelin-induced activation *in vitro*

D.B. Nizheharodava¹, J.M. Motuzova², A.G. Bayda³, M.M. Zafranskaya¹¹Belarussian Medical Academy of Post-Graduated Education, Minsk, Belarus,²Belarussian State Medical University, Minsk, Belarus,³9th Municipal Hospital, Minsk, Belarus

Аннотация

Минорная полифункциональная популяция клеток периферической крови - $\gamma\delta$ T-лимфоциты - наряду с другими регуляторными клетками может участвовать в формировании толерантности к собственным антигенам организма. Целью исследований явилось оценка влияния $\gamma\delta$ T-лимфоцитов на экспрессию L-селективной молекулы CD62L и активационного маркера CD25 на $\alpha\beta$ T-лимфоцитах и их субпопуляциях при миелин-индуцированной активации клеток *in vitro* у больных рассеянным склерозом и здоровых доноров. Результаты были получены при использовании методов иммуномагнитной сепарации, проточной цитофлуориметрии и культуральных исследований. Показано, что удаление $\gamma\delta$ T-лимфоцитов из популяции мононуклеаров периферической крови приводит к достоверному снижению экспрессии хоумингового рецептора CD62L и повышению экспрессии CD25 на $\alpha\beta$ T-лимфоцитах при активации клеток миелин-олигодендропитарным гликопротеином *in vitro* в равной степени как у больных рассеянным склерозом, так и у здоровых доноров. Полученные результаты свидетельствуют о том, что $\gamma\delta$ T-лимфоциты сдерживают процессы шеддинга CD62L с клеточной мембраны $\alpha\beta$ T-лимфоцитов при миелин-индуцированной стимуляции и, таким образом, регулируют механизмы активации антиген-специфических T-клеток.

Ключевые слова

$\gamma\delta$ T-лимфоциты, CD62L, CD25, миелин-индуцированная активация $\alpha\beta$ T-клеток, рассеянный склероз

Summary

The minor polyfunctional cell population of peripheral blood - $\gamma\delta$ T-lymphocytes - is capable along with other regulatory cells to take part in generation of tolerance to self-antigens. The aim of research was to estimate $\gamma\delta$ T-cells influence upon L-selectin CD62L and activation marker CD25 expression by $\alpha\beta$ T-lymphocytes and their subsets under myelin-induced cell activation *in vitro* in patients with multiple sclerosis and healthy donors. Results were obtained using methods of immunomagnetic separation, flow cytometry and cell cultural investigation. It was shown that $\gamma\delta$ T-lymphocytes depletion from peripheral blood mononuclear cells population leads to significant decrease of homing receptor CD62L expression and increase of CD25 expression on $\alpha\beta$ T-lymphocytes activated with myelin-oligodendrocyte glycoprotein *in vitro* in both multiple sclerosis patients and healthy donors. These results indicate that $\gamma\delta$ T-cells hold in check CD62L shedding from $\alpha\beta$ T-lymphocytes surface and thereby regulate the activation of myelin-specific T-cells.

Key words

$\gamma\delta$ T-lymphocytes, CD62L, CD25, myelin-induced activation of $\alpha\beta$ T-cells, multiple sclerosis

Т-лимфоциты, экспрессирующие $\gamma\delta$ -клеточный рецептор, представляют собой минорную популяцию Т-клеток периферической крови (2-10% от Т-лимфоцитов) и являются доминирующим пулом среди Т-клеток слизистых оболочек организма. В связи с высокой гетерогенностью популяции и функциональным многообразием биологическая роль $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов до конца не изучена. Экспериментально доказано участие данной популяции клеток в иммунном ответе при инфекционных, опухолевых и аутоиммунных заболеваниях, в патогенезе которых $\gamma\delta$ Т-лимфоциты могут выступать как в качестве эффекторных цитотоксических или антиген-презентирующих клеток, так и выполнять иммунорегуляторную роль [1-4]. Ранее нами были продемонстрированы количественные и функциональные отличия популяции $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов, экспрессирующих $V\gamma 9^+V\delta 2^+$ Т-клеточный рецептор, а также механизмы вовлечения данной популяции Т-клеток в миелин-специфический пролиферативный ответ $\alpha\beta$ Т-лимфоцитов у больных рассеянным склерозом (РС) и здоровых доноров [5].

РС характеризуется как хроническое воспалительное аутоиммунное заболевание центральной нервной системы (ЦНС), при котором аутоиммунные реакции развиваются в результате нарушения механизмов толерантности Т-лимфоцитов по отношению к собственным миелиновым антигенам. Основными мишенями для эффекторных Т-клеток являются основной белок миелина (ОБМ), миелин-олигодендрогликопротеин (МОГ), протеолипидный протеин (ПЛП) и др. [6-8]. Многими авторами было показано, что аутореактивные клоны Т-лимфоцитов обнаруживаются не только в организме больных аутоиммунной патологией, но и циркулируют у здоровых людей [9-11]. Делеция аутореактивных Т-лимфоцитов во время их селекции в тимусе является главным, но не единственным механизмом контроля аутоиммунитета. Часть потенциально аутореактивных Т-лимфоцитов избегают элиминации и мигрируют на периферию, где в норме находятся под контролем механизмов периферической толерантности [12]. По данным Hafler D. et al. [6] частота встречаемости антиген-специфических клеток в организме составляет 10^{-5} – 10^{-6} . Несмотря на то, что динамика иммунологического репертуара потенциально аутореактивных клонов Т-лимфоцитов у здоровых людей мало изучена, показана высокая гетерогенность как в количественном, так и качественном составе Т-клеток, спо-

собных отвечать на собственные антигены организма [11]. Детекция потенциально аутореактивных Т-лимфоцитов, как при аутоиммунной патологии, так и в здоровом организме, может осуществляться путем культивирования клеток с аутоантигеном в концентрациях, превышающих физиологические, с последующей регистрацией активации и пролиферации клеток в ответ на специфический антиген.

Развитие аутоиммунных процессов при РС сопровождается нарушением интегративности гемато-энцефалического барьера, в результате которого аутореактивные Т-лимфоциты проникают в ЦНС и образуют бляшки, представляющие собой воспалительные инфильтраты активированных моноклеточных клеток и очаги демиелинизации. Миграция потенциально аутореактивных клонов Т-лимфоцитов в ЦНС при РС в первую очередь определяется ранними событиями адгезивного каскада, при которых важную роль играет молекулы селектина CD62L [6-8].

CD62L, или L-селектин, экспрессируется на 50% неактивированных циркулирующих лимфоцитов, участвует в их прикреплении и роллинге вдоль клеточной стенки эндотелия, обеспечивает их циркуляцию в лимфоидной ткани, а также вовлечение в воспалительный процесс. Основные лиганды L-селектина (CD34, GlyCAM-1, MAdCAM-1) присутствуют на высоком эндотелии посткапиллярных венул HEV (high endothelial venules) в паракортикальной области лимфатических узлов, способствуя рециркуляции лимфоцитов во вторичные лимфоидные органы, на лейкоцитах, опосредуя феномен вторичного роллинга лимфоцитов по другим лейкоцитам, и на эндотелиальных клетках в области воспаления, усиливая участие лимфоцитов в локальном контроле развития воспалительного процесса либо в репарации ткани (рис. 1) [13, 14].

Миграция лимфоцитов, находящихся в роллинге в сосудистом русле, начинается после запуска внутриклеточных активационных событий. Активационный маркер CD25 (β -цепь рецептора интерлейкина-2, IL-2R, или TAC-протеин, T-activated cell marker) представляет собой фосфорилированный мембранный гликопротеин, который способен связывать IL-2, но не обеспечивает поглощение образуемого комплекса клеткой и включение ростового сигнала из-за короткого цитоплазматического участка. Однако, CD25 в кооперации с CD122 (β -цепь IL-2R) и CD132 (γ -цепь IL-2R), формирует высокоаффинный IL-2R, который ответственен за интернализацию своего лиганда и осуществляет тон-

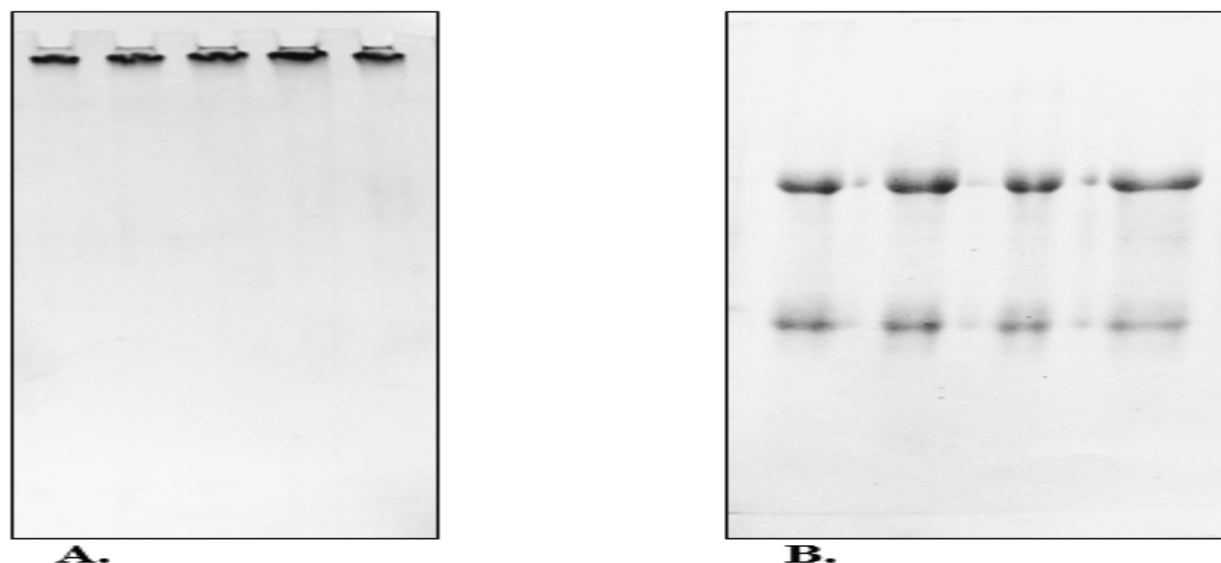


Рис. 1. (А) Электронная микрофотография высокого эндотелия венул и прикрепленных к нему лимфоцитов; (В) Схема адгезивного каскада лимфоцитов в лимфоидные ткани и области воспаления (адаптирован с Khan et al., 2003 [13]).

Примечание: GlyCAM - glycosylation cell adhesion molecule, PCLP - podocalyxin-like protein, MAdCAM - mucosal addressin cell adhesion molecule, VLA - very late antigen, CLA - cutaneous lymphocyte antigen, VAP - vascular adhesion protein, VCAM - vascular cell adhesion molecule, PSGL - P-selectin glycoprotein ligand, LFA - leukocyte function antigen, Mac - macrophage differentiation antigen, ICAM - intercellular adhesion molecule.

кую регуляцию роста и активации Т-лимфоцитов в ходе иммунного ответа. Покоящиеся Т-лимфоциты практически не экспрессируют CD25, но после активации они могут экспрессировать до 50 000 α -цепей на клетку. Формирование высокоаффинного IL-2R на поверхности клеток происходит через сутки после действия стимулирующего агента. Активированные Т-лимфоциты продуцируют IL-2, который, связываясь со своим высокоаффинным рецептором, стимулирует другие клетки иммунной системы, а также повышает экспрессию собственного рецептора на Т-клетках. Внутриклеточные активационные процессы запускают пролиферацию клетки и последующую ее дифференцировку. После выполнения своих функций клетка возвращается в состояние покоя. Еще одним вариантом исхода активации лимфоцитов является их запрограммированная гибель – апоптоз [15, 16].

В норме в организме 0,5-5% CD4⁺CD3⁺ и менее 1% CD8⁺CD3⁺Т-лимфоцитов периферической крови экспрессируют активационный маркер CD25, который может являться как маркером регуляторных, так и эффекторных CD25⁺Т-клеток. Показано, что при РС процент активированных Т-лимфоцитов превышает

аналогичный показатель у здоровых людей. Причем большинство активированных Т-лимфоцитов характеризуются как эффекторные клетки и активно вовлекаются в демиелинизирующие процессы [17].

Принимая во внимание, что миграция Т-лимфоцитов в воспалительно-дегенеративный очаг и клеточная активация являются одним из ключевых звеньев иммунопатогенеза РС, при котором иммунологические нарушения обнаруживаются не только в ЦНС, но и среди клеток периферической крови, целью наших исследований явилось оценка влияния $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов на экспрессию L-селектиновой молекулы CD62L и активационного маркера CD25 на $\alpha\beta$ Т-лимфоцитах и их субпопуляциях при миелин-индуцированной активации клеток *in vitro* у больных РС и здоровых доноров.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужила периферическая венозная кровь 10 больных с диагнозом РС, ремиттирующая форма течения, которые в течение последних 6 месяцев не подвергались курсу кортикостероидной терапии и у которых отсутствовали рецидивы. Средний

возраст больных РС составил $43,2 \pm 8,8$ лет. В контрольную группу были включены 10 здоровых доноров аналогичного возраста.

Мононуклеары периферической крови (МПК) выделяли из цельной венозной крови на градиенте плотности Histopaque («Sigma», Германия). Количество основных субпопуляций Т-лимфоцитов и экспрессия на них L-селектина CD62L и активационного маркера CD25 определяли на 0-й день и после 6 дней культивирования в среде, содержащей антигена, в присутствии и отсутствии популяции $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов. Популяцию гдТ-клеток удаляли из МПК методом иммуномагнитной сепарации с использованием набора моноклональных антител к $\gamma\delta$ Т-клеточному рецептору («Stem Cell Technology», Канада). Чистота выделения $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов составила $99,7\% \pm 0,2\%$; оригинальные данные результатов до и после магнитной сепарации клеток представлены на рисунке 2. МПК культивировали в концентрации 2×10^5 клеток/лунку 96-луночного планшета в полной культуральной среде, содержащей RPMI-1640 с 25 мМ HEPES, 2мМ L-глутамина, 1% антибиотика («Sigma», Германия) и 10% инактивированной человеческой сывороткой группы АВ (РНПЦ «Гематологии и трансфузиологии», Беларусь) в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ при 37°C. В качестве миелин-специфического аутоантигена использовали рекомбинантный человеческий МОГ₁₋₁₂₅ [18], который добавляли в культуральную среду

в конечной концентрации 10 мкг/мл. В качестве положительного контроля использовали экзоантиген *Tetanus Toxoid* (ТТ, «Chiron», Франция), который добавляли в культуральную среду в конечной концентрации 40 Лф/мл. Регистрацию данных осуществляли методом проточной цитометрии (FC500, «Beckman Coulter», США) с использованием моноклональных антител CD3-ECD, CD4-FITC, CD4-PE, CD8-PC5, V γ 9-PC5, CD62L-FITC, CD25-PE («Beckman Coulter», США).

Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета Statistica 6.0. Проверка на нормальность распределения выполняли с использованием критерия Холмогорова-Смирнова. Сравнение двух групп и определение достоверности различий осуществляли непараметрическим критерием Вилкоксона (в случае зависимых переменных) и непараметрическим критерием Манна-Уитни (в случае независимых переменных). Результаты представляли в виде медианы (25-й и 75-й процентиля). Корреляционный анализ выполняли при помощи определения коэффициентов корреляции по Спирмену. Во всех случаях результаты принимали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$, ***, $p < 0,001$.

Результаты и обсуждение

Субпопуляционный состав Т-лимфоцитов и влияние гдТ-клеток на экспрессию основных

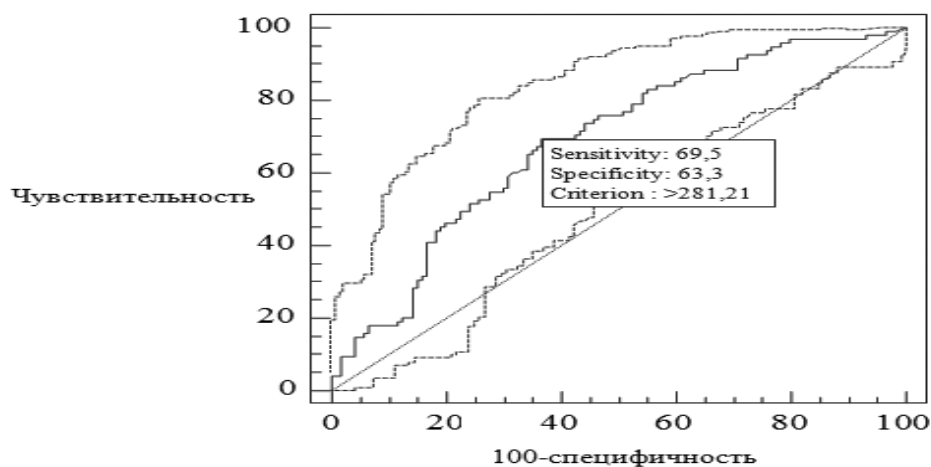


Рис. 2. Количество $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов в популяции CD3⁺Т-клеток до (точечная диаграмма слева) и после (точечная диаграмма справа) магнитной сепарации. Примечание: в диаграммах ось X отображает распределение CD3⁺Т-лимфоцитов, ось Y – $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов с V γ 9⁺Т-клеточным рецептором. Популяция CD3⁺ $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов выделена квадратным гейтом.

фенотипических маркеров Т-лимфоцитами у больных РС и здоровых доноров.

Количество CD3⁺Т-лимфоцитов в периферической крови у больных РС и здоровых доноров составило 67,5% (63,3 ÷ 71,7%) и 71,8% (69,8 ÷ 75,6%), соответственно. После культивирования МПК достоверных различий в количественном содержании CD3⁺Т-лимфоцитов между группой больных РС и здоровыми людьми не было обнаружено как в случае культивирования клеток в среде без антигенов, так и в присутствии МОГ и ТТ. Однако, иммунорегуляторный индекс ИРИ (отношение процента CD4⁺/CD8⁺Т-клеток) у больных РС, клетки которых культивировались с аутоантигеном или в его отсутствие, был достоверно выше по сравнению со здоровыми донорами за счет увеличения количества CD4⁺Т-лимфоцитов (табл. 1).

Распределение субпопуляционного состава Т-лимфоцитов при РС согласуется с литературными данными, указывающие на приоритетную роль CD4⁺Т-клеток в иммунопатогенезе заболевания, которые выступают в качестве аутореактивных клонов, активированных в результате нарушения механизмов толерантности к собственным антигенам организма, и играют основную роль в развитии аутоиммунных реакций, направленных на повреждение миелиновым структур ЦНС [6-8].

Удаление популяции $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов из культуры МПК не приводило к достоверным изменениям в экспрессии CD3⁺, CD4⁺ и CD8⁺ маркеров Т-лимфоцитов, в условиях миелин-индуцированной активации *in vitro*, как в группе больных РС, так и здоровых доноров.

Характеристика экспрессии CD62L на $\alpha\beta$ Т-лимфоцитах при миелин-индуцированной активации клеток.

Процент CD3⁺Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD62L, в периферической крови составил в среднем 40,3% (30,0% ÷ 55,2%) у больных РС и 48,5% (36,2% ÷ 58,1%) у здоровых доноров. После 6-дневного культивирования спонтанная экспрессия L-селектина на Т-лимфоцитах у больных РС не отличалась от таковой в контрольной группе (рис. 3). Наряду с этим, при добавлении в культуру МПК аутоантигена МОГ количество CD3⁺CD62L⁺Т-клеток достоверно уменьшалось как у больных РС ($p < 0,01$), так и у здоровых доноров ($p < 0,01$). Аналогичные результаты были получены при культивировании МПК с ТТ, где у больных РС и здоровых доноров количество CD62L⁺Т-лимфоцитов снижалось как по отношению к спонтанной ($p < 0,01$ и $p < 0,01$, соответственно), так и МОГ-индуцированной ($p < 0,01$ и $p < 0,01$, соответственно) экспрессии L-селектина на $\beta\gamma$ Т-лимфоцитах.

Снижение экспрессии хоумингового рецептора CD62L на Т-лимфоцитах при миелин-индуцированной активации у больных РС и здоровых доноров может объясняться его функциональным предназначением и обеспечением эффективной рециркуляции между периферической кровью и лимфатическими узлами [14]. Большинство CD62L⁺Т-клеток представляют собой наивные лимфоциты, однако, часть Т-клеток памяти, находящихся в покое и являющихся центральными Т-клетками-памяти, также экспрессируют L-селектин, что способствует их циркуляции в организме и участию в иммуноло-

Таблица 1

Фенотипическая характеристика Т-лимфоцитов после культивирования со специфическими антигенами у больных РС и здоровых доноров

	Больные РС, n=10				Здоровые, n=10			
	CD3 ⁺ , %	CD4 ⁺ , %	CD8 ⁺ , %	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD3 ⁺ , %	CD4 ⁺ , %	CD8 ⁺ , %	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
Культ. среда (67,3÷80,6)	75,9	80,3***	15,4**	5,54**	74,2	60,5	28,1	2,10
МОГ (70,4÷85,7)	75,7	83,4***	14,5***	5,79***	80,4	64,3	27,1	2,38
Т (70,3÷88,9)	86,1	85,1	12,6	6,80	85,3	76,9	14,2	5,30

Примечание: результаты представлены в виде медианы (25-й и 75-й процентиля). Достоверность указана по отношению к контрольной группе: ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$. Культ. среда – культуральная среда, МОГ – миелин-олигодендроцитарный гликопротеин, ТТ – *Tetanus Toxoid*.

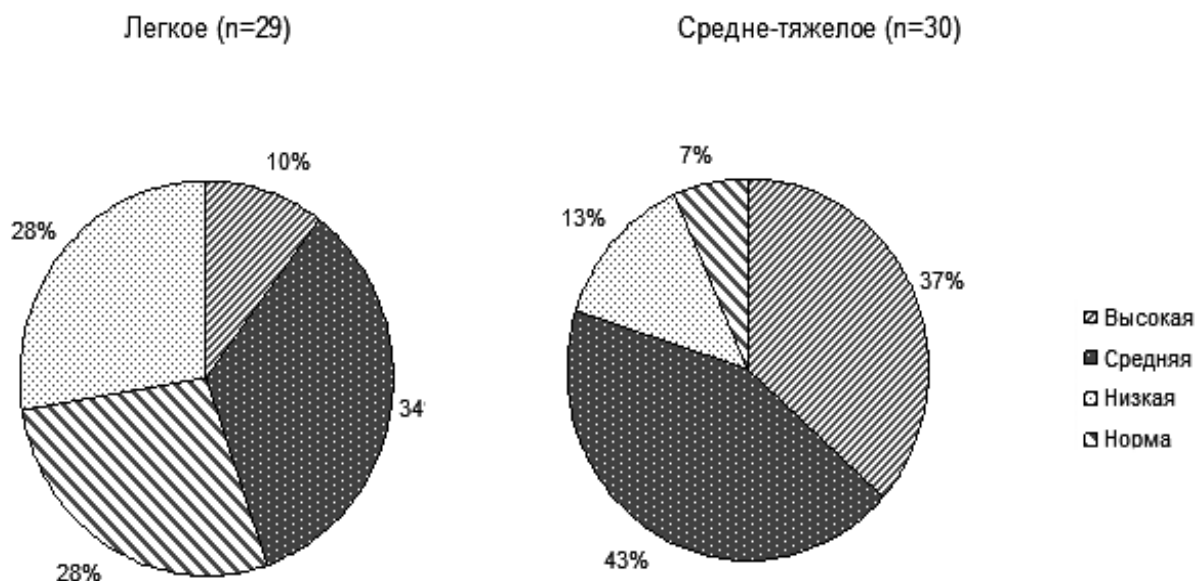


Рис. 3. Количество CD62L⁺CD3⁺Т-клеток в культурах МПК и МПК с удаленной популяцией $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов (МПК- $\gamma\delta$ Т), культивируемых в присутствии аутоантигена МОГ (миелин-олигодендроцитарный гликопротеин) и экзоантигена ТТ (*Tetanus Toxoid*).

Примечание: результаты представлены в виде медианы (25-й ч 75-й процентиля); * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$.

гическом контроле. Помимо рециркуляции и компартиментализации лимфоцитов на периферии, CD62L также обеспечивает регуляцию вовлечения клеток в воспалительный процесс [13]. Снижение экспрессии L-селектина и, как следствие, повышение уровня растворимых форм молекул клеточной адгезии описано в патогенезе многих воспалительных заболеваний, и является маркером клеточной активации [19, 20].

Удаление $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов из культуры МПК приводило к достоверному снижению МОГ-индуцированной экспрессии CD62L на CD3⁺Т-клетках у больных РС ($p < 0,05$) и здоровых доноров ($p < 0,01$), однако, в обеих группах не наблюдалось достоверных изменений в спонтанной экспрессии L-селектина на Т-лимфоцитах и их субпопуляциях (рис.3). При этом, в отсутствии $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов при миелин-индуцированной активации достоверно уменьшался процент как CD4⁺CD62L⁺ Т-клеток (у больных РС – с 55,5% (20,4 ÷ 67,6%) до 38,9% (16,6 ÷ 50,3%), $p < 0,01$; у здоровых доноров – с 40,4% (39,7 ÷ 55,5%) до 37,2% (32,1 ÷ 46,4%), $p < 0,05$), так и CD8⁺CD62L⁺Т-клеток (у больных РС – 20,8% (10,3 ÷ 36,3%) до 14,4% (9,82 ÷ 31,9%), $p < 0,05$; у здоровых доноров – с 30,9% (13,7 ÷ 44,3%) до

23,2% (11,8 ÷ 27,6%), $p < 0,05$). На рисунке 4 представлены оригинальные данные точечных диаграмм результатов проточной цитофлуориметрии типичной спонтанной и антиген-индуцированной экспрессии CD62L на CD3⁺Т-лимфоцитах в культурах МПК и МПК с удаленной популяцией $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов.

Снижение процента Т-лимфоцитов, экспрессирующих L-селектин, в отсутствие $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов в условиях миелин-индуцированной активации свидетельствует о роли этой минорной популяции Т-клеток в регуляции процесса клеточной активации, которая происходит после остановки роллинга клетки. В норме после активации лимфоцитов антигенами, в клетках, экспрессирующих L-селектин, наблюдаются конформационные изменения, приводящие либо к интернализации CD62L обратно в клеточную мембрану или цитоплазму либо к повышению чувствительности CD62L к эндопротеолитическому расщеплению. В результате вышеперечисленных процессов происходит шеддинг (слущивание с мембраны) L-селектина, осуществляется смена функционального фенотипа Т-лимфоцитов и циркулирующие клетки приобретают способность к перемещению в тканях. В орга-

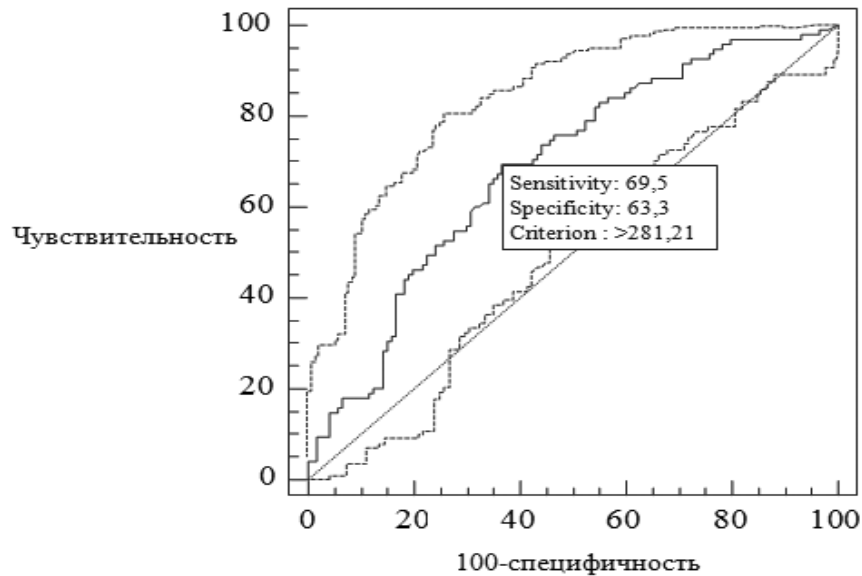


Рис. 4. Экспрессия CD62L на CD3⁺Т-клетках, культивируемых в культуральной среде RPMI-1640 или в среде, содержащей аутоантиген МОГ (миелин-олигодендрогликопротеин) или экзоантигена ТТ (*Tetanus Toxoid*). Примечание: верхняя панель диаграмм представляет результаты исследования культуры МПК, нижняя панель – культуры МПК с удаленной популяцией $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов (МПК- $\gamma\delta$ Т). В диаграммах ось X отображает распределение CD62L⁺ лимфоцитов, ось Y - CD3⁺Т-лимфоцитов. Популяция CD62L⁺CD3⁺Т-лимфоцитов выделена квадратным гейтом.

низме активированные лимфоциты, подвергшиеся шеддингу CD62L, начинают экспрессировать хемокиновые рецепторы и мигрируют по их градиенту из циркуляции на периферию, где, экспрессируя вновь CD62L, способны перемещаться во вторичных лимфоидных органах [13, 14]. Присутствие $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов сдерживает процесс шеддинга и тем самым предотвращает Т-клетки от дополнительной активации и неконтролируемой миграции на периферию. Причем и у больных РС и у здоровых доноров $\gamma\delta$ Т-лимфоциты регулируют активированные CD4⁺ и CD8⁺Т-клетки, которые могут равнозначно вовлекаться в патогенез заболевания и клеточно-опосредованное повреждение миелиновых оболочек в ЦНС [6, 8].

Аналогичное влияние $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов было показано в отношении экспрессии CD62L на Т-клетках и их субпопуляциях в культуре МПК, содержащей ТТ. Учитывая, что количество антиген-специфических клонов Т-лимфоцитов в иммунном организме значительно превышает количество потенциально аутореактивных клонов [11], полученные результаты подтверждают, что снижение экспрессии CD62L на Т-лимфоцитах в присутствии антигенов является маркером

Т-клеточной активации. При удалении $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов из популяции МПК, культивируемой с экзоантигеном, в обеих группах также сохранялась достоверная тенденция к снижению процента клеток, экспрессирующих L-селектин, что подтверждает влияние популяции $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов на экспрессию CD62L вне зависимости от вида антиген-специфического стимула (ауто или экзоантигена).

Влияние $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов на активацию $\alpha\beta$ Т-клеток

Общеизвестным маркером Т-клеточной активации является CD25 антиген, представляющий собой β -цепь IL-2R, который экспрессируется как на эффекторных, так и регуляторных Т-лимфоцитах. Средний процент CD3⁺Т-лимфоцитов, спонтанно экспрессирующих активационный маркер CD25 в периферической крови, не отличался у больных РС (0,98% (0,60 ч 1,50%)) от такового у здоровых доноров (1,53% (0,80 ч 1,77%)). Однако, после 6-дневного культивирования были выявлены достоверные различия в спонтанной экспрессии CD25 на Т-лимфоцитах в сторону увеличения процента у больных РС по сравнению с контрольной группой

(5,30% (2,84 ÷ 6,42%) и 2,37% (1,74 ÷ 3,40%), $p < 0,01$, соответственно), что согласуется с литературными данными, описывающими аутоактивацию Т-клеток при органоспецифической аутоиммунной патологии ЦНС [7].

При антиген-индуцированной активации как ауто-, так и экзоантигеном отмечалось ожидаемое достоверное увеличение количества $CD3^+CD25^+$ Т-клеток при культивировании *in vitro* как клеток больных РС ($p < 0,01$), так и здоровых доноров ($p < 0,01$) (рис.5), адекватно отражающих процесс активации и последующей пролиферации антиген-специфических клонов Т-лимфоцитов. При этом у пациентов с диагнозом РС была установлена достоверная корреляция количества $CD3^+CD25^+$ Т-клеток, культивируемых в присутствии МОГ, с продолжительностью заболевания ($R = 0,6$, $p < 0,05$), что предполагает эффекторный профиль миелин-активированных Т-лимфоцитов. Помимо этого, с увеличением процентного содержания $CD3^+CD25^+$ Т-лимфоцитов у больных РС количество гдТ-лимфоцитов в периферической крови достоверно снижалось ($R = -0,71$, $p < 0,05$), чего не было обнаружено в контрольной группе. Это позволяет предположить вовлечение популяции гдТ-клеток в регуляцию процесса активации Т-лимфоцитов у больных РС.

Удаление $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов из культуры МПК не сопровождалось достоверными изменениями в спонтанной экспрессии CD25 на Т-лимфоцитах и их субпопуляциях в обеих группах. При культивировании данной культуры МПК без $\gamma\delta$ Т-клеток с аутоантигеном МОГ у больных РС и здоровых доноров наблюдалось достоверное повышение процента $CD3^+$ Т-клеток, экспрессирующих CD25 ($p < 0,05$ и $p < 0,05$, соответственно) (рис.5). При этом у больных РС увеличивался процент популяций как $CD4^+CD25^+$, так и $CD8^+CD25^+$ Т-клеток, который коррелировал с продолжительностью заболевания ($R = 0,54$ и $R = 0,6$, соответственно, $p < 0,05$). Наряду с этим, у больных РС после удаления популяции $\gamma\delta$ Т-клеток повышение количества активированных $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитов обратно коррелировало со снижением процента $CD4^+CD62L^+$ и $CD8^+CD62L^+$ Т-лимфоцитов в культуре МПК без $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов ($R = -0,77$ и $R = -0,6$, соответственно, $p < 0,05$), что подтверждает изменение функционального фенотипа миелин-специфических Т-лимфоцитов в отсутствие $\gamma\delta$ Т-клеток у пациентов с диагнозом РС.

В отличие от больных РС в контрольной группе не было выявлено корреляционных зависимостей изучаемой популяции с экспрессией L-селектина в условиях антиген-специфичес-

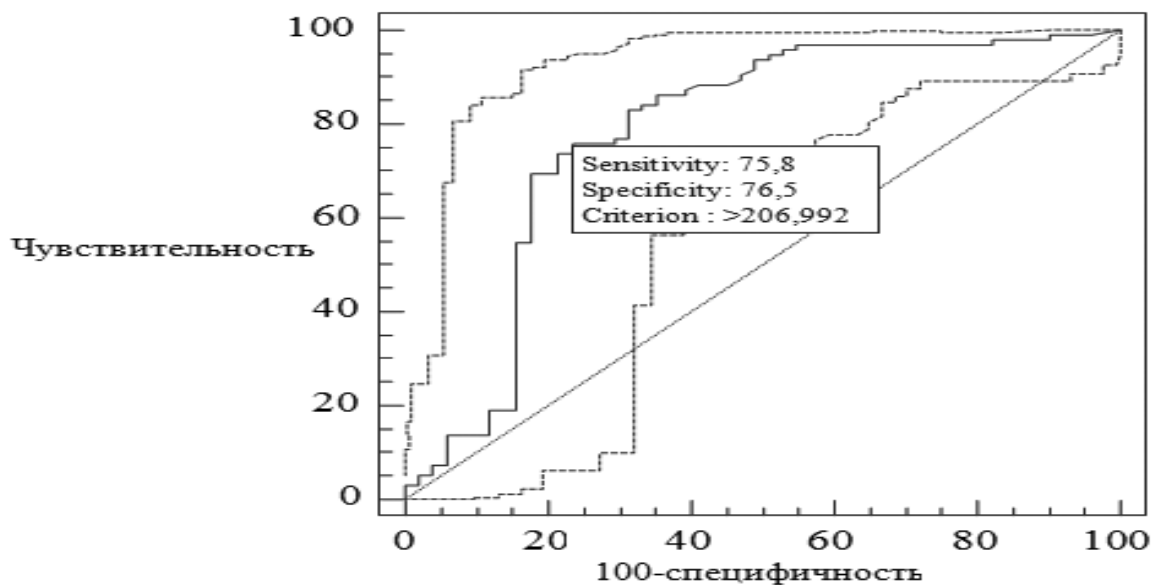


Рис. 5. Количество $CD25^+CD3^+$ Т-клеток в культурах МПК и МПК с удаленной популяцией $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов (МПК- $\gamma\delta$ Т), культивируемых в присутствии аутоантигена МОГ (миелин-олигодендроцитарный гликопротеин) и экзоантигена ТТ (*Tetanus Toxoid*).

Примечание: результаты представлены в виде медианы (25-й ч 75-й процентиля); * - $p < 0,05$.

кой стимуляции. Однако показано, что у здоровых доноров при удалении $\gamma\delta$ Т-клеток миелин-индуцированная экспрессия CD25 на Т-лимфоцитах и их субпопуляциях коррелирует с МОГ-специфической пролиферацией CD3⁺, CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺Т-лимфоцитов, культивируемых в культуре МПК с удаленной популяцией гдТ-клеток ($R = 0,71$, $p < 0,05$; $R = 0,81$, $p < 0,01$ и $R = 0,46$, $p < 0,05$, соответственно). Это согласуется с общеизвестными механизмами активационных процессов и процессов клеточного деления, а также подтверждает нашу гипотезу об иммунорегуляторной роли $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов, которые сдерживают миелин-индуцированную активацию и пролиферативный ответ на аутоантиген в здоровом организме [5].

После сепарации $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов из культуры МПК достоверные изменения в экспрессии активационного маркера CD25 на Т-клетках и их субпопуляциях, культивируемых с ТТ, отсутствовали как в группе больных РС, так и здоровых доноров. Вероятно, это объясняется природой антигена, который в отличие от миелинового аутоантигена МОГ, является иммуногенным белковым экзоантигеном, вызывающим в норме выраженную Т-клеточную активацию (50-70% Т-лимфоцитов) и последующую клональную экспансию антиген-специфических Т-клеток в иммунном организме, на которую минорная популяция $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов не оказывает достоверного влияния.

Как нами ранее было показано, в здоровом организме $\gamma\delta$ Т-лимфоциты контролируют как спонтанную, так и миелин-индуцированную пролиферацию, что характерно для иммунорегуляторных клеток [5]. Пролiferация миелин-реактивных Т-лимфоцитов существенно зависит от IL-2, что подтверждается идентификацией клеток, экспрессирующих IL-2 и его рецептор IL-2R, в периферической крови и бляшках при РС [17]. Однако, наряду с функционированием IL-2 в качестве ростового фактора Т-лимфоцитов на начальных этапах иммунного ответа, он

может выступать в качестве летального фактора на более поздних стадиях. Abbas et al. [21] показали, что хроническая презентация антигена ведет к элиминации активированных Т-клеток за счет Fas-опосредованного активационно-индуцированного апоптоза. В случае РС постоянная стимуляция индуцирует экспрессию Fas на Т-клетках за счет того, что IL-2 предотвращает активацию ингибиторного протеина FLICE, который в норме подавляет Fas-сигнал [21]. Несмотря на то, что у больных РС в развитии миелин-специфической пролиферации гдТ-лимфоциты играют иную роль, по сравнению с контрольной группой [5], тем не менее, в отношении активационных процессов их поведение, аналогично таковому у здоровых доноров. Отличие может быть лишь в том, что наряду с подавлением антиген-специфической активации Т-клеток, $\gamma\delta$ Т-лимфоциты могут также препятствовать апоптотической гибели аутореактивных клонов, что объясняет высокий уровень МОГ-специфического пролиферативного ответа в присутствии этой популяции клеток у больных РС.

Заключение

Таким образом, популяция $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов влияет на экспрессию CD62L на Т-лимфоцитах при миелин-индуцированной стимуляции *in vitro*, сдерживая процессы шеддинга L-селектина в присутствии аутоантигена, и тем самым регулирует механизмы активации антиген-специфических Т-лимфоцитов как в здоровом организме, так и при аутоиммунной патологии ЦНС. Корреляционная зависимость миелин-специфического пролиферативного ответа с клеточной активацией у больных РС и лимитирование $\gamma\delta$ Т-лимфоцитами антиген-индуцированной экспрессии CD25 на Т-клетках указывает на функциональную значимость $\gamma\delta$ Т-клеток в формировании толерантности к собственным антигенам в здоровом организме.

Литература

1. Girardi M. Immunosurveillance and immunoregulation by $\gamma\delta$ Т cells. J. Invest. Dermatol., 2006; 126: 25-31.
2. Cassetti R., Martino A. The plasticity of gamma delta T cells: innate immunity, antigen and new immunotherapy. Cell. Mol. Immunol., 2008; 5: 161-170.
3. Moser B. and Brandes M. гд Т cells: an alternative type of professional APC. Trends in Immunology, 2006; 27: 112-118.
4. Kapp J., Kapp L., McKenna K. Gammadelta T cells play an essential role in several forms of tolerance. Immunol. Res., 2004; 29: 93-102.
5. Нижегородова Д.Б., Эберль М., Йомаа Х., Зафранская М.М. Влияние $\gamma\delta$ Т-клеток на антиген-специфическую пролиферацию CD3⁺Т-лимфоцитов и их субпопуляций у пациентов с рассеянным склерозом. Вести национальной Академии наук Беларуси, 2007; 391-395.

6. Hafler D. Multiple sclerosis. J. Clin. Invest., 2004; 113: 788-794.
7. Sospedra M., Martin R. Immunology of multiple sclerosis. Annu. Rev. Immunol., 2005; 23: 683-747.
8. Zafranskaya M., Oschmann P., Engel R. et al. Interferon- β therapy reduces CD4⁺ and CD8⁺T-cell reactivity in multiple sclerosis. Immunology, 2007; 121: 29-39.
9. Burns J., Bartholomew B., Lobo S. In vivo activation of myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cells in healthy control subjects. Clin. Immunol., 2002; 105:185-191.
10. Berthelot L., Laplaud D., Pettre S. et al. Blood CD8⁺T cell responses against myelin determinants in multiple sclerosis and healthy individuals. Eur. J. Immunol., 2008; 38: 1889-1899.
11. Danke N., Koelle D., Yee C. et al. Autoreactive T cells in healthy individuals. J. Immunol., 2004; 172: 5967-5972.
12. Baecher-Allan C., Hafler D. Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. Immunol. Rev., 2006; 212: 203-216.
13. Khan A., Landis R., Malhotra R. L-selectin ligands in lymphoid tissues and models of inflammation. Inflammation, 2003; 27: 265-280.
14. Smalley D., Ley K. L-selectin: mechanism and physiological significance of ectodomain cleavage. J. Cell. Mol. Med., 2005; 9: 255-266.
15. Buchill M., Yang J., Vang K., Farrar M. Interleukin-2 receptor signaling regulatory T cell development and homeostasis. Immunol. Lett., 2007; 114:1-8.
16. Buckner J., Ziegler S. Regulating the immune system: the induction of regulatory T cells in the periphery. Arth. Res. Ther., 2004; 6: 215-222.
17. Viglietta V., Baecher-Allan C., Weiner H., Hafler D. Loss of functional suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. J. Exp. Med., 2004; 199: 971-979.
18. Smith P., Heijmans N., Ouwerling B. Native myelin oligodendrocyte glycoprotein promotes severe chronic neurological disease and demyelination in Biozzi ABH mice. Eur. J. Immunol., 2005; 35: 1311-1319.
19. Baraczka K., Nekam K., Pozsonyi T. et al. Concentration of soluble adhesion molecules (sVCAM-1, sICAM-1 and sL-selectin) in the cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus with central nervous involvement. Neuroimmunomodulation, 2001; 9: 49-54.
20. Rainer T. L-selectin in health and disease. Resuscitation, 2002; 52: 127-141.
21. Abbas A., Lichtman A., Pillai S. Cellular and molecular immunology. 6th edition, 2007; 566pp.

*Адрес для корреспонденции:
220073, г. Минск, ул. Притыцкого 18-3-51,
Нижегородовой Дарье Борисовне
e-mail: nzh@tut.by*

Поступила 29.06.09 г