

И.П. Иванова, И.В. Савкин, Г.В. Селедцова, А.А. Шишков, В.И. Селедцов

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ ЦИТОКИНЫ Т-КЛЕТОК ПАМЯТИ У БОЛЬНЫХ РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ ПОСЛЕ Т-КЛЕТОЧНОЙ ВАКЦИНАЦИИ

ИИИ клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск)
Инновационный парк БФУ им. И. Канта (Калининград)

Пациенты с рассеянным склерозом (РС) были пролечены с использованием вакцины, состоящей из аутологичных, миелин-реактивных Т-клеток. Установлено, что у больных РС по сравнению со здоровыми людьми содержание CD8+CD45RO+CD62L- эффекторных Т-клеток памяти, а также количество центральных CD4+CD45RO+CD62L+ и CD8+CD45RO+CD62L+ Т-клеток памяти было достоверно увеличено. Проведение Т-клеточной вакцинации не оказывало существенного влияния на субпопуляционный состав Т-клеток памяти. Однако, после лечения у вакцинированных пациентов наблюдалось достоверное (в 2 раза) снижение относительного количества CD4+IFN γ +IL-4- и CD8+IFN γ +IL-4-клеток памяти, а также значительное (в 6 раз) уменьшение числа CD4+ клеток памяти, продуцирующих оба цитокина.

Ключевые слова: Т-клетки памяти, рассеянный склероз

PHENOTYPIC CHARACTERIZATION AND INTRACELLULAR CYTOKINES OF MEMORY T-CELLS IN MULTIPLE SCLEROSIS PATIENTS AFTER T-CELL VACCINATION

I.P. Ivanova, I.V. Savkin, G.V. Seledtsova, A.A. Shishkov, V.I. Seledtsov

Institute of Clinical Immunology SB RAMS, Novosibirsk
Innovation Center of Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad

Multiple sclerosis (RS) patients were treated with a vaccine consisted of autological myelin-reactive T-cells. Effector memory CD8+ CD45RO+CD62L- T-cells as well as central memory CD4+ CD45RO+CD62L+ and CD8+ CD45RO+CD62L+ T-cells were significantly increased in MS patients as compared with levels in healthy individuals. T-cells vaccination had no effect on the T-cells memory subpopulation composition. However, vaccine-treated RS patients had significant (by 2 fold) reduction of relative quantity of CD4+IFN γ +IL-4- and CD8+IFN γ +IL-4- memory T-cells, as well as suppression by 6 fold of CD4+ memory cells number, which produce both kinds of cytokines.

Key words: memory T-cells, multiple sclerosis

Аутоиммунный процесс, опосредуемый Т-хелперами I типа, лежит в основе патогенеза таких заболеваний как рассеянный склероз (РС), ревматоидный артрит, аутоиммунный тиреоидит. В литературе накапливаются данные о важной роли в развитии аутоиммунного заболевания Т-клеток памяти с фенотипом CD4⁺ CD45RO⁺ и CD8⁺ CD45RO⁺. Показано, что на стадии обострения количество этих клеток на периферии может возрасти в несколько раз и есть вероятность, что именно они являются локомотивами иммунопатологического процесса [2, 5, 8, 9].

Фенотипическим признаком дифференцировки наивных Т-клеток в Т-клетки памяти принято считать появление на клеточной поверхности изоформы CD45RO⁺ взамен изоформы CD45RA⁺. На сегодняшний день Т-клетки памяти подразделяются на центральные и эффекторные. Первые являются долгоживущими, тогда как вторые — относительно короткоживущими. Подобно наивным Т-лимфоцитам, долгоживущие центральные клетки памяти (ЦКП) экспрессируют на своей поверхности молекулу CD62L (лектин типа С) и хемокиновые рецепторы CCR7, которые способствуют их миграции в лимфоидные ткани. Эффекторные Т-клетки памяти (ЭКП) экспрессируют на своей

поверхности хемокиновые рецепторы CCR3, способствующие их проникновению в нелимфоидные органы и ткани. Активированные ЭКП обладают цитотоксичностью и продуцируют интерферон-гамма. Если ЭКП служат для немедленной защиты от воздействия антигена на периферии, то ЦКП обеспечивают защиту от системных воздействий. При повторной встрече с антигеном именно ЦКП, обладая повышенной пролиферативной активностью, могут генерировать большое количество терминально дифференцированных эффекторных Т-клеток, которые инфильтрируют периферические ткани и очищают их от антигена [2].

Является очевидным то, что элиминация аутоиммунных Т-лимфоцитов из организма должна лежать в основе патогенетического лечения аутоиммунных заболеваний. Один из наиболее реальных путей к достижению этой цели связан с возможностью стимуляции у больного антиидиотипического иммунного ответа, направленного на вариабельные фрагменты (идиотипы) антигенных рецепторов патогенных лимфоцитов. В экспериментальных моделях, а также в ряде клинических исследований показано, что вакцинация аутоантиген-реактивными клонированными Т-лимфоцитами или Т-клеточными линиями может быть эффективна

в лечении аутоиммунного энцефаломиелита, аутоиммунного увеита, аутоиммунного тиреоидита рассеянного склероза и ревматоидного артрита [3, 4, 6].

Механизм влияния Т-клеточной вакцинации на аутоиммунный процесс включает в себя несколько основных компонентов: 1) генерацию антиидиотипических цитотоксических CD8 + Т-лимфоцитов; 2) генерацию антиидиотипических CD4 + Th2 и Th3; 3) индукцию и стимуляцию функциональной активности Т-reg; и 3) индукцию синтеза антиидиотипических антител. Возможно, что Т-клеточная вакцинация также способна влиять на механизм формирования иммунной памяти [6, 7, 10].

Целью нашего исследования стало изучение фенотипических характеристик различных популяций Т-клеток памяти и количественная оценка содержания CD4 + и CD8 + Т-клеток памяти, продуцирующих внутриклеточные цитокины IFN γ и IL4, у больных рассеянным склерозом до и после проведения Т-клеточной вакцинации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клинические и экспериментальные исследования проводились в соответствии с протоколом, утвержденным Ученым советом и Этическим комитетом Института клинической иммунологии СО РАМН. От каждого больного, участвующего в исследовании, было получено информированное согласие. В исследование было включено 11 больных РС (7 женщин, 4 мужчин) в возрасте с 28 до 43 лет. Способ приготовления индивидуальной Т-клеточной вакцины описан нами ранее [1]. Контрольную группу составили 6 здоровых доноров, сопоставимых по возрасту. Схема иммунотерапевтического лечения Т-клеточной вакциной включала в себя 4 еженедельных подкожных вакцинации и последующие вакцинации с интервалом в 1 месяц. Вакцинальная доза варьировала в пределах $2,0 - 4,0 \times 10^7$ клеток.

Для иммунологического исследования у больных забирали 20 мл периферической крови перед вакцинацией, а также через 1 – 1,5 года после её на-

чала. Поверхностные маркеры выделенных мононуклеарных клеток определяли с помощью меченных фикоэритрином (PE) моноклональных антител (МА) LT4 (CD4) и LT8 (CD8), («Сорбент», Москва), конъюгированных с флюоресцеинизотиоцианатом (FITC) МА к CD45RO («eBioscience», США), APC-меченных анти-CD62L МА («eBioscience», США). В соответствии с наличием или отсутствием на клеточной поверхности соответствующих молекул определяли следующие клеточные популяции: «наивные» клетки – (CD45RO-CD62L +), центральные клетки памяти – (CD45RO + CD62L +), эф- фекторные клетки памяти – (CD45RO + CD62L –). В таблице указан процент каждой популяции от общего числа лимфоцитов.

Для оценки относительного количества цито- кин-продуцирующих клеток памяти использовали меченные Per CP МА к CD4 и CD8 («eBioscience», США) и конъюгированных с APC МА к CD45RO («eBioscience», США). IFN γ - и IL-4-продуцирующие Т-клетки оценивали с помощью меченных FITC МА к IFN γ и меченных PE МА к IL-4 («eBioscience», США). Процент позитивных клеток определяли на иммуноцитометре «FACS Calibur» («Becton Dickinson») с использованием программы «CELLQuest» («Becton Dickinson»).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате исследования нами обнаружено, что у как у здоровых лиц, так и у больных РС количество «наивных» CD4 + CD45RO-CD62L + и CD8 + CD45RO-CD62L + достоверно не различа- лось (табл. 1).

В то же время, у больных РС содержание CD8 + CD45RO + CD62L- эф- фекторных клеток памяти было увеличено в 4 раза, а количество центральных CD45RO + CD62L + клеток памяти было значитель- но увеличено как среди CD4 +, так и среди CD8 + Т-клеток (табл. 1).

Наши исследования указывают, что при РА может иметь место ускоренная дифференцировка

Таблица 1

Содержание Т-клеток памяти у больных рассеянным склерозом до и после лечения Т-клеточной вакциной

	Доноры n = 10	Больные РС до лечения n = 11	Больные РС после лечения n = 11
CD4+	45,46 ± 3,27	40,67 ± 1,39	35,66 ± 3,13
CD4+CD45RO+CD62L+	1,11 ± 0,48	4,89 ± 0,56**	3,35 ± 0,94
CD4+CD45RO+CD62L-	9,28 ± 4,16	7,64 ± 1,38	8,65 ± 2,58
CD4+CD45RO-CD62L+	10,18 ± 3,86	6,55 ± 0,54	9,09 ± 2,61
CD4+CD45RO-CD62L-	24,1 ± 5,7	19,06 ± 3,79	14,78 ± 4,11
CD8+	18,1 ± 1,12	21,98 ± 3,25**	15,41 ± 2,80
CD8+CD45RO+CD62L+	0,1 ± 0,03	0,37 ± 0,10**	0,52 ± 0,18
CD8+CD45RO+CD62L-	0,31 ± 0,07	1,28 ± 0,3**	1,45 ± 0,34
CD8+CD45RO-CD62L+	3,93 ± 1,29	4,67 ± 1,37	2,78 ± 0,86
CD8+CD45RO-CD62L-	11,47 ± 1,77	14,61 ± 2,32	9,91 ± 2,02

Примечание: ** – $p < 0,01$ – статистическая значимость различий показателей при сравнении группы доноров и больных до начала лечения, (непарный t-тест).

Таблица 2

Содержание CD4+ и CD8+ Т-клеток памяти, продуцирующих внутриклеточные IFN γ и IL-4, у больных рассеянным склерозом до и после лечения Т-клеточной вакциной

	Группа больных РС до лечения n = 10	Группа больных РС после лечения n = 10
CD4+	45,59 $\pm$ 5,77	35,11 $\pm$ 8,05
CD4+/CD45RO+/IFN γ /IL4-	8,60 $\pm$ 3,64	3,72 $\pm$ 1,23*
CD4+/CD45RO+/IFN γ /IL4+	2,68 $\pm$ 1,09	1,53 $\pm$ 0,49
CD4+/CD45RO-/IFN γ /IL4+	8,69 $\pm$ 4,91	1,41 $\pm$ 1,01***
CD4+/CD45RO-/IFN γ /IL4-	1,93 $\pm$ 0,9	0,95 $\pm$ 0,84**
CD4+/CD45RO-/IFN γ /IL4+	0,96 $\pm$ 0,29	0,39 $\pm$ 0,13
CD4+/CD45RO-/IFN γ /IL4+	0,48 $\pm$ 0,22	0,31 $\pm$ 0,13
CD8+	29,49 $\pm$ 3,52	20,23 $\pm$ 4,27
CD8+/CD45RO+/IFN γ /IL4-	11,1 $\pm$ 4,23	5,87 $\pm$ 1,84*
CD8+/CD45RO+/IFN γ /IL4+	4,39 $\pm$ 2,48	2,01 $\pm$ 1,16
CD8+/CD45RO+/IFN γ /IL4+	1,47 $\pm$ 0,84	0,79 $\pm$ 0,40
CD8+/CD45RO-/IFN γ /IL4-	7,48 $\pm$ 2,09	3,42 $\pm$ 1,2
CD8+/CD45RO-/IFN γ /IL4+	1,43 $\pm$ 0,56	0,69 $\pm$ 0,27
CD8+/CD45RO-/IFN γ /IL4+	0,74 $\pm$ 0,25	0,45 $\pm$ 0,19

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,005$ – статистическая значимость различий по сравнению с исходным уровнем (непарный t-тест).

«наивных» клеток в центральные CD4+ и CD8+ Т-клетки памяти и цитотоксические эффекторные CD8+ Т-клетки, которая отражает антигенспецифическую экспансию Т-клеток в ответ на повторные, системные воздействия антигена [8, 9].

После проведения Т-клеточной вакцинации в течение 1 года или 1,5 лет существенных изменений субпопуляционного состава клеток памяти отмечено не было, так как их количественные характеристики были близки к исходным величинам.

Вместе с тем, у вакцинированных пациентов с РС наблюдалось достоверное снижение (в 2 раза) числа IFN γ -продуцирующих CD4+ и CD8+ Т-клеток памяти, а также значительное снижение (в 6 раз) числа CD4+ Т-клеток памяти, продуцирующих оба цитокина (табл. 2). Этот эффект, по-видимому, был стойким, так как регистрировался у больных, находящихся на лечении длительное время.

Таким образом, иммунотерапия аутологичными антиген-реактивными клетками у больных РС приводит к снижению количества IFN γ -продуцирующих клеток памяти, что может свидетельствовать о функциональной перестройке миелин-реактивных Т-клеток и включении неспецифических иммунных механизмов в торможение иммунопатологического процесса. Наши данные указывают на значительный иммунорегуляторный потенциал Т-клеточной вакцинации, которая в перспективе может найти широкое применение в лечении аутоиммунных заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иванова И.П., Селедцов В.И., Банул Н.В., Самарин Д.М. и др. Получение Т-клеточной вак-

цины и ее применение для лечения рассеянного склероза // Мед. иммунология. – 2005. – Т. 7, № 1. – С. 27 – 32.

2. Селедцов В.И., Литвинова Л.С., Гончаров А.Г., Шуплецова В.В. и др. Клеточные механизмы генерации иммунологической памяти // Цитокины и воспаление. – 2010. – Т. 9, № 4. – С. 9 – 15.

3. Селедцов Д.В., Селедцов В.И., Иванова И.П., Литвинова Л.С. Антиген-специфическая иммунотерапия рассеянного склероза // Цитокины и воспаление. – 2010. – Т. 9, № 1. – С. 3 – 12.

4. Bourdette D.N., Edmonds E., Smith C., Bowen J.D. et al. A highly immunogenic trivalent T cell receptor peptide vaccine for multiple sclerosis // Multiple Sclerosis. – 2005. – Vol. 11, N 5. – P. 552 – 561.

5. Burns J., Bartholomew B., Lobo S. Isolation of myelin basic protein-specific T cells predominantly from the memory T-cell compartment in multiple sclerosis // Ann Neurol. – 1999. – Vol. 45. – P. 33 – 39.

6. Correale J., Farez M., Gilmore W. Vaccines for Multiple sclerosis. CNS Drugs. – 2008. – Vol. 22, N 3. – P. 175 – 198.

7. Hellings N., Raus J., Stinissen P. T-cell vaccination in multiple sclerosis: update on clinical application and mode of action // Autoimm. Rev. – 2004. – Vol. 3. – P. 267 – 275.

8. Liu G.Z., Fang L.B., Hjelmström P., Gao X.G. Increased CD8+ central memory T-cells in patients with multiple sclerosis // Mult. Scler. – 2007. – Vol. 13, N 2. – P. 149 – 155.

9. Okuda Y., Okuda M., Apatoff B.R., Posnett D.N. The activation memory CD4+ T cells and CD8+ T cells in patients with multiple sclerosis // J. Neurol. Sci. – 2005. – Vol. 235, N 1 – 2. – P. 11 – 17.

10. Vandenbark A.A., Morgan E., Bartholomew R., Bourdette D. et al. TCR peptide therapy in human autoimmune diseases // Neurochem Res. — 2001. — Vol. 26. — P. 713—730.

Сведения об авторах

Иванова Ирина Петровна – старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунофармакологии ФГБУ «НИИКИ СО РАМН», кандидат медицинских наук (630099, г. Новосибирск-99, ул. Ядринцевская, 14; тел.: (383) 228-25-47, 228-26-73, факс: (383) 228-26-73; e-mail: irinaiki@rambler.ru)

Савкин Иван Владимирович – научный сотрудник лаборатории клеточных биотехнологий ФГБУ «НИИКИ СО РАМН»

Селедцова Галина Викторовна – заведующая лабораторией клеточных биотехнологий ФГБУ «НИИ клинической иммунологии СО РАМН», доктор медицинских наук

Шишков Алексей Анатольевич – научный сотрудник лаборатории клеточных биотехнологий ФГБУ «НИИКИ СО РАМН»

Селедцов Виктор Иванович – доктор медицинских наук, профессор, директор Центра биотехнологий инновационного парка (236041, г. Калининград, ул. А. Невского, 14; тел.: 8 (4012) 595549; факс: 8 (4012) 466313; e-mail: info@innopark.kantiana.ru)