РОЛЬ ИММУННОЙ ДИСФУНКЦИИ В ПАТОГЕНЕЗЕ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА У ЛЮДЕЙ РАЗНОГО ВОЗРАСТА

Зуев В.А.

АНО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии», Санкт-Петербург, e-mail: miayy@yandex.ru

Одной из инновационных гипотез патогенеза нейродегенеративных заболеваний, в том числе болезни Паркинсона, является иммунологическая теория. Смысл этой теории состоит в том, что возрастное снижение функций иммунной системы приводит к развитию умеренно выраженных воспалительных реакций, которые могут индуцировать нейропатологию. В работе методами иммуногисто- и иммуноцитохимии с применением конфокальной микроскопии изучена экспрессия τ -протеина, α -синуклеина, цитокина TGF α , транскрипционного фактора NF-kB в черной субстанции головного мозга и лимфоцитах периферической крови пациентов пожилого и старческого возраста с болезнью Паркинсона и без патологии центральной нервной системы. Установлено, что экспрессия исследуемых маркеров значительно возрастает в черной субстанции и лимфоцитах крови у лиц пожилого и старческого возраста с болезнью Паркинсона по сравнению с лицами без нейропатологии. Полученные данные подтверждают предположение о роли нарушении функций иммунной системы в патогенезе болезни Паркинсона. На основании проведенного исследования можно рекомендовать использование лимфоцитов крови для прижизненной оценки уровня τ -протеина, α -синуклеина, TGF α и NF-kB у людей пожилого и старческого возраста с целью ранней диагностики болезни Паркинсона.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, τ -протеин, TGF α , NF-kB, лимфоциты крови.

THE ROLE OF IMMUNE DYSFUNCTION IN PARKINSON DISEASE PATHOGENESIS IN VARIOUS AGE PEOPLE

Zuev V.A.

St. Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, St. Petersburg, e-mail: miayy@yandex.ru

One of the innovate hypothesis of neurodegenerative diseases pathogenesis, which includes Parkinson disease, is immunology theory. The maim idea of this theory is that immune system aging dysfunction activates moderate inflammation, which is one of the reason of neuropathology. In our investigation the expression of τ -protein, α -synuclein, cytokine TGF α and transcription factor NF-kB in substantia nigra of brain and blood lymphocytes was investigated by immunocyto- and immunohistochemistry methods with using confocal microscopy in elderly and old people with Parkinson disease and without neurodegenerative pathology. It was shown that signal molecules expression significant increases in tissues, obtained from elderly ad old patients with Parkinson disease in comparison with people without neurodegenerative pathology. These data confirm the hypothesis about the immune system disorders in Parkinson disease pathogenesis and open new ways for diagnostic this disease. On the base of this investigation it can be recommended to use blood lymphocytes for vital diagnostic of τ -protein, α -synuclein, cytokine TGF α and transcription factor NF-kB in elderly and old patients for early Parkinson disease diagnostic.

Keywords: Parkinson disease, τ -protein, TGF α , NF-kB, blood lymphocytes.

Болезнь Паркинсона (БП) – вторая в мире по распространенности нейродегенеративная патология. Это хроническое прогрессирующее заболевание, преимущественно связанное с гибелью нейронов черной субстанции и приводящее к нарушению функции базальных ганглиев в условиях дофаминергического дефицита [1]. БП проявляется сочетанием гипокинезии и ригидности, тремора покоя, постуральной неустойчивостью, психическими и вегетативными расстройствами. В основе БП лежит расстройство двигательной активности. В качестве возможных факторов, способствующих развитию БП, рассматривали: возраст, генетическую предрасположенность, воздействие

окружающей среды, оксидативный стресс. Предполагают, что на молекулярном уровне развитие БП происходит вследствие нарушения метаболизма α -синуклеина (образование телец Леви) в головном мозге. Считается, что окислительный стресс, митохондриальная дисфункция и генетическая предрасположенность приводят к гиперагрегации α -синуклеина, а накопление агрегированной формы α -синуклеина является причиной повреждения синапсов и дегенерации дофаминергических и других типов нейронов [2].

Помимо теории развития БП, связанной с формированием телец Леви из агрегированной формы α -синуклеина, существуют также свободнорадикальная и митохондриальная теории развития заболевания. Среди новых гипотез развития БП – immune-aging (умеренная воспалительная реакция, связанная с возрастным снижением функции иммунной системы), окислительный и нитрозативный стресс, возникающие при депрессии и периферическом воспалении [3]. Известно, что в физиологических условиях в центральной нервной системе (ЦНС) млекопитающих количество иммунных клеток остается сравнительно небольшим, однако при возникновении патологии (инфекция, травма мозга и т.д.) их количество резко возрастает. Нейровоспаление со временем приводит к нейродегенерации, свойственной таким заболеваниям, как болезни Альцгеймера, Паркинсона и др. [4]. Имеются данные, согласно которым Т-хелперы 17-го типа вовлекаются в патогенез БП [5]. Однако исследования, посвященные изучению роли Т-клеток в патогенезе БП, достаточно противоречивы.

Как известно, τ -протеин является маркером, специфическим для болезни Альцгеймера, однако в последнее время появляются данные о его вовлеченности в патогенез БП [6]. TGF α – член семейства эпидермальных факторов роста (EGF), митогенный полипептид [7], который обладает ангиогенным эффектом и способствует развитию опухолей [8]. NF-kB – транскрипционный фактор с широким спектром функций, включающих контроль экспрессии генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла. Нарушение регуляции NF-kB приводит к развитию воспаления, аутоиммунных заболеваний, вирусных инфекций и различных опухолей [9]. Сравнительное изучение экспрессии перечисленных молекул в черной субстанции головного мозга и периферической крови пациентов с БП и без нейропатологии позволит оценить роль иммунной системы в развитии этого заболевания. В связи с вышеизложенным была поставлена цель исследования: сравнить экспрессию τ -протеина, цитокина TGF α и транскрипционного фактора NF-kB в черной субстанции и лимфоцитах периферической крови пациентов пожилого и старческого возраста с БП и лиц без нейродегенеративных заболеваний.

Материалы и методы исследования. Аутопсийный материал черной субстанции головного мозга был получен от 60 пациентов с БП и 60 лиц без патологии центральной

нервной системы, умерших от сердечно-сосудистых заболеваний (группа «норма»). Каждая группа состояла из двух равных по численности пациентов подгрупп – лиц пожилого и старческого возраста. Аналогичное разделение на группы было проведено для 126 образцов периферической крови индивидов с БП и без нейродегенеративных заболеваний. Из образцов периферической крови готовили мазки на предметных стеклах, покрытых полилизинном. Клетки фиксировали спиртом для дальнейшего изучения. Иммуногисто- и иммуноцитохимическими методами оценивали экспрессию τ -протеина, TGF α , NF-kB в аутопсийном материале черной субстанции и образцах периферической крови пациентов без нейропатологии и с БП. Препараты обрабатывали первичными антителами к τ -протеину (1:75, Dako), α -синуклеину (1:100, Abcam), TGF α (1:100, Abcam) и NF-kB (1:150, Dako). Анализ полученных образцов проводили на инвертированном конфокальном микроскопе «Olympus» Fluoview CM FV300-IX70.

Результаты окрашивания оценивали морфометрическим методом с использованием системы компьютерного анализа микроскопических изображений, состоящей из микроскопа «Olympus» Fluoview CM FV300-IX70, цифровой камеры Olympus, персонального компьютера и программы «VideotestMorphology 5.2». Площадь экспрессии рассчитывали как отношение площади, занимаемой иммунопозитивными клетками, к общей площади клеток в поле зрения и выражали в процентах. Статистическая обработка экспериментальных данных включала в себя подсчет среднего арифметического, стандартного отклонения и доверительного интервала для каждой выборки и проводилась в программе «Statistica 6.0». Для анализа вида распределения использовали критерий Шапиро–Уилка. Для проверки статистической однородности нескольких выборок были использованы непараметрические процедуры однофакторного дисперсионного анализа (критерий Крускала–Уоллиса). В случаях, когда дисперсионный анализ выявлял статистически значимую неоднородность нескольких выборок, для последующего выявления неоднородных групп (путем их попарных сравнений) применяли процедуры множественных сравнений с помощью *U*-критерия Манна–Уитни. Критический уровень достоверности нулевой гипотезы (об отсутствии различий) принимали равным 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты

Площадь экспрессии τ -протеина в черной субстанции головного мозга возрастала на два порядка у пациентов с БП по сравнению с нормой, как в пожилом, так и в старческом возрасте (рис. 1). У пациентов с БП площадь экспрессии α -синуклеина в черной субстанции значительно возрастала по сравнению с нормой: у пожилых людей – в 23 раза и у лиц старческого возраста – в 25 раз. Площадь экспрессии TGF α также значительно возрастала

при БП по сравнению с нормой: в 19 раз у пациентов пожилого возраста с БП и в 18 раз у пациентов старческого возраста с БП. Площадь экспрессии NF-kB при БП повышалась в 3,7 раза в группе лиц пожилого возраста и в 3,5 раза – у людей старческого возраста (табл. 1). Аналогичную тенденцию наблюдали при изучении площади экспрессии τ -протеина, TGF α и NF-kB в лимфоцитах крови пациентов пожилого и старческого возраста в норме и при БП (табл. 2). Площадь экспрессии τ -протеина в лимфоцитах крови пациентов пожилого и старческого возраста с БП повышалась более чем на два порядка по сравнению с индивидами тех же возрастных групп без нейропатологии. Площадь экспрессии α -синуклеина в лимфоцитах крови людей пожилого и старческого возраста с БП была соответственно в 4,3 и 8 раз больше по сравнению с этим показателем у обследованных без патологии ЦНС. Площадь экспрессии цитокина TGF α в лимфоцитах крови пациентов пожилого и старческого возраста с БП возрастала соответственно в 19 и 18 раз по сравнению с нормой. Площадь экспрессии транскрипционного фактора NF-kB в лимфоцитах крови пациентов пожилого и старческого возраста с БП возрастала соответственно в 3,7 и 3,5 раза по сравнению с лицами без нейропатологии (рис. 2).

Таблица 1

Площадь экспрессии сигнальных молекул в черной субстанции головного мозга
в норме и при болезни Паркинсона

Маркер	Площадь экспрессии ($N \pm n$), %			
	Пожилой возраст		Старческий возраст	
	Норма	БП	Норма	БП
τ-протеин	0,10 $\pm$ 0,02	13,05 $\pm$ 0,22*	0,19 $\pm$ 0,03*	19,97 $\pm$ 0,26** [#]
α-синуклеин	0,07 $\pm$ 0,02	0,30 $\pm$ 0,04*	0,08 $\pm$ 0,02	0,54 $\pm$ 0,09** [#]
TGFα	0,04 $\pm$ 0,01	0,76 $\pm$ 0,15*	0,04 $\pm$ 0,01	0,72 $\pm$ 0,12**
NF-kB	0,07 $\pm$ 0,015	0,26 $\pm$ 0,05*	0,10 $\pm$ 0,03	0,35 $\pm$ 0,06** [#]

* – $p < 0,05$ – по сравнению с нормой у пожилых людей

** – $p < 0,05$ – по сравнению с нормой у людей старческого возраста

[#] – $p < 0,05$ по сравнению с людьми пожилого возраста с БП

N – среднее значение, n – доверительный интервал.

Рис. 1. Иммунофлуоресцентное окрашивание черной субстанции головного мозга антителами к τ -протеину, пациент 85 лет, БП. Конфокальная микроскопия, $\times 100$. τ -протеин – Alexa 567 – красная флуоресценция. Ядра докрашены Hoechst 33258 – голубая флуоресценция. Ярко выражена экспрессия τ -протеина (красная флуоресценция) в черной субстанции головного мозга, тогда как у пациентов старческого возраста такой иммунопозитивной реакции не наблюдалось

Таблица 2

Площадь экспрессии сигнальных молекул в лимфоцитах крови
в норме и при болезни Паркинсона

Маркер	Площадь экспрессии ($N \pm n$), %			
	Пожилой возраст		Старческий возраст	
	Норма	БП	Норма	БП
τ-протеин	$0,02 \pm 0,005$	$0,87 \pm 0,09^*$	$0,02 \pm 0,005$	$1,03 \pm 0,12^{**}$
α-синуклеин	$0,02 \pm 0,005$	$0,15 \pm 0,03^*$	$0,025 \pm 0,005$	$0,20 \pm 0,05^{**}$
TGFα	$0,34 \pm 0,11$	$0,76 \pm 0,15^*$	$0,46 \pm 0,10^*$	$0,79 \pm 0,13^{**}$
NF-kB	$0,21 \pm 0,08$	$1,19 \pm 0,14^*$	$0,30 \pm 0,08$	$1,67 \pm 0,12^{**\#}$

* – $p < 0,05$ – по сравнению с нормой у пожилых людей

** – $p < 0,05$ – по сравнению с нормой у людей старческого возраста

– $p < 0,05$ по сравнению с людьми пожилого возраста с БП

N – среднее значение, n – доверительный интервал.

Рис. 2. Иммунофлуоресцентное окрашивание лимфоцитов крови с антителами к NF-kB, конфокальная микроскопия, x100. NF-kB – Alexa 567 – розовая флуоресценция, ядра докрашены Hoest 33258 – голубая флуоресценция. А – пациент 67 лет без патологии центральной нервной системы, Б – пациент 69 лет с БП. У пациента с БП в лимфоцитах крови ярко выраженная экспрессия NF-kB, тогда как у обследуемого без нейропатологии этого не наблюдалось

Обсуждение. Предполагается, что активация иммунного ответа, оцениваемая по экспрессии TGF α , NF-kB и наблюдаемая у пациентов с БП, может быть причиной, а не следствием гибели нейронов. F. Garretti и соавт. (2019) выдвигают гипотезу о том, что длительное хроническое системное воспаление может приводить к повышению проницаемости гематоэнцефалического барьера, в результате чего происходит проникновение Т-клеток в ЦНС. Накопление α -синуклеина, основного молекулярного маркера БП, может способствовать миграции Т-клеток, специфичных к α -синуклеину, развитию аутоиммунной реакции и последующего воспаления (рис. 3). При этом CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоциты распознают пептидные участки главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) 2-го типа на микроглии и ГКГС 1-го типа на дофаминергических нейронах, что приводит к их гибели и усугублению симптомов БП. Гипотеза требует подтверждения, однако если Т-клетки, специфичные к α -синуклеину, действительно вызывают нейродегенерацию при БП, то методы диагностики и лечения БП могут быть адаптированы с целью выявления аутоиммунных клеток у пациентов и воздействия на них [10].

Установленное в нашем исследовании многократное повышение экспрессии α -синуклеина в лимфоцитах крови пациентов с БП разного возраста, коррелирующее с этим показателем в черной субстанции, подтверждает эту гипотезу.

Рис. 3. Гипотеза аутореактивных Т-клеток при БП. Т-клетки, специфичные к α -синуклеину, проникают в ЦНС и распознают антиген, представленный микроглией и дофаминергическими нейронами. (А) До повреждения ГЭБ периферические Т-клетки, специфичные к α -синуклеину, циркулируют по крови в присутствии провоспалительных цитокинов. Агрегаты α -синуклеина формируются в дофаминергических нейронах и микроглии. (Б) Повышенная проницаемость ГЭБ позволяет Т-клеткам, специфичным к α -синуклеину, проникать через ГЭБ. На ГКГС-1 дофаминергических нейронов и ГКГС-2 микроглии представлены фрагменты α -синуклеина, распознаваемые Т-клетками. Активация Т-клеток ведет к высвобождению гранзимов и провоспалительных цитокинов. Дофаминергические нейроны в конечном итоге умирают в присутствии устойчивого воспаления и цитотоксической среды [10]

Заключение. Повышенная экспрессия τ -протеина в черной субстанции головного мозга и аналогичное повышение концентрации этого белка в образцах периферической крови у пациентов при БП по сравнению с возрастной нормой позволяют предположить возможность прижизненной оценки уровня τ -протеина. Возможно использование периферической крови рекомендуется для прижизненной оценки уровня τ -протеина, α -синуклеина, TGF α и NF- κ B у людей пожилого и старческого возраста с целью ранней диагностики БП.

Список литературы

1. Михайлусова О.И., Куташов В.А. Болезнь Паркинсона: этиология, патогенез, клиника, диагностика и принципы лечения. Молодой ученый. 2015. №24. С. 269-273.
2. Overk C.R., Masliah E. Pathogenesis of synaptic degeneration in Alzheimer's disease and Lewy body disease. Biochemical Pharmacology (journal). 2014. Vol. 88. № 4. P. 508-516.
3. Anderson G., Maes M. Neurodegeneration in Parkinson's disease: interactions of oxidative stress, tryptophan catabolites and depression with mitochondria and sirtuins. Mol. Neurobiol. 2014. Vol. 49(2). P. 771-783.
4. Абдурасулова И.Н., Клименко В.М. Роль иммунных и глиальных клеток в процессах нейродегенерации. Медицинский академический журнал. 2011. Т. 11. № 1. С. 12-29.
5. Tahmasebinia F., Pourgholaminejad A. The role of Th17 cells in auto-inflammatory neurological disorders. Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry. 2017. Vol. 37. P. 408-416.
6. Zhang X., Gao F., Wang D., Li C., Fu Y., He W., Zhang J. Tau Pathology in Parkinson's Disease. Front Neurol. 2018. Vol. 9. P. 809.
7. Ojeda S.R., Ma Y.J., Rage F. The transforming growth factor alpha gene family is involved in the neuroendocrine control of mammalian puberty. Mol. Psychiatry. 1997. Vol. 2(5). P. 355-358.
8. McInnes C., Wang J., Al Moustafa A.E., Yansouni C., O'Connor-McCourt M., Sykes B.D. Structure-based minimization of transforming growth factor-alpha (TGF-alpha) through NMR analysis of the receptor-bound ligand. Design, solution structure, and activity of TGF-alpha 8-50. J. Biol. Chem. 1998. Vol. 273(42). P. 27357-27363.
9. Staudt L.M. Oncogenic activation of NF-kappaB. Cold Spring Harbor Perspect. Biol. 2010. Vol. 2. N 6. P.a000109. DOI: 10.1101/cshperspect.a000109.
10. Garretti F., Agalliu D., Lindestam Arlehamn C.S., Sette A., Sulzer D. Autoimmunity in Parkinson's Disease: The Role of α -Synuclein-Specific T Cells. Front Immunol. 2019. Vol. 10. P. 303. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00303.