

СПОНТАННЫЙ АПОПТОЗ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА

Пчелина С.Н.^{1,2}, Усенко Т.С.^{1,2}, Боганькова Н.А.³,
Якимовский А.Ф.², Емельянов А.К.^{1,2}, Вавилова Т.В.³,
Шварцман А.Л.¹

¹ ПИЯФ РАН им. Б.П. Константинова, г. Гатчина

² СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург

³ СПбГМА им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург

Резюме. Потеря дофаминергических нейронов черной субстанции головного мозга человека является основным патоморфологическим признаком болезни Паркинсона (БП). Предполагается, что гибель нейронов происходит посредством программируемой клеточной гибели (апоптоза). Признаки апоптоза могут наблюдаться в лимфоцитах крови у пациентов с БП. Методом проточной цитофлуорометрии (окраска на PI + Annexin V FITC) нами проведено исследование апоптоза лимфоцитов периферической крови у 9 пациентов с БП (4, получающих препараты Л-ДОФА, и 5 – не получающих) и 9 лиц контрольной группы. При инкубации лимфоцитов *in vitro* в течение 24 часов наблюдали повышенный уровень спонтанного апоптоза у пациентов с БП по сравнению с контролем ($p < 0,01$). Уровень апоптоза был ниже у пациентов, принимающих терапию Л-ДОФА, по сравнению с пациентами, не получающими терапию ($p < 0,01$). Полученные данные подтверждают роль апоптоза в патогенез БП и предполагают влияние проводимой терапии препаратами Л-ДОФА на уровень апоптоза лимфоцитов периферической крови.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, апоптоз, лимфоциты.

Pchelina S.N., Usenko T.S., Bogankova N.A., Yakimovskii A.F., Emelyanov A.K., Vavilova T.V., Shvartsman A.L.

INCREASED SPONTANEOUS APOPTOSIS OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES FROM PATIENTS WITH PARKINSON'S DISEASE

Abstract. Progressive loss of dopaminergic neurons from substantia nigra is the major pathomorphological sign in Parkinson's disease (PD). Neuronal death is suggested to occur by programmed cell death (apoptosis) in PD patients, thus being involved into the mechanisms of neurodegeneration. Indirect signs of apoptosis may be revealed in peripheral blood lymphocytes (PBL) from PD patients. Using flow cytometry and annexin V-binding kit (PI + Annexin V FITC), we estimated PBL apoptosis in nine patients with PD (four untreated cases and five persons treated with L-DOPA), as compared with nine control persons. Spontaneous apoptosis at 24 h was higher in PD patients, as compared with controls ($p < 0.01$). Apoptosis rate was lower in patients receiving therapy with L-DOPA, than in untreated patients ($p < 0.01$). Our results support a possible role of apoptosis in PD pathogenesis, and suggest some effects of L-DOPA treatment upon apoptotic rates of peripheral blood lymphocytes. (*Med. Immunol.*, 2012, vol. 14, N 1-2, pp 149-152)

Keywords: Parkinson's disease, apoptosis, lymphocytes.

Болезнь Паркинсона (БП) – широко распространенное нейродегенеративное заболевание,

которое характеризуется прогрессивной потерей дофаминергических нейронов черной субстанции головного мозга человека. Нарушение регуляции апоптоза дофаминергических нейронов черной субстанции рассматривается как один из возможных механизмов их гибели при БП. Признаки апоптоза обнаруживаются как при анализе аутопатов у пациентов с БП, так и в экс-

Адрес для переписки:

Пчелина Софья Николаевна,
СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова
197089, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, 6/8.
Тел./факс: (812) 347-55-46.
E-mail: sorpchelina@hotmail.com

периментах, выполненных на модельных животных [11, 17, 19]. Следует, однако, отметить, что не все посмертные исследования мозга пациентов с БП выявляют морфологические признаки апоптоза [13]. Таким образом, вопрос о механизме гибели нейронов черной субстанции при БП остается открытым. В частности не исключается возможность участия факторов воспаления и аутофагии [3, 20].

Лимфоциты периферической крови часто используются для изучения механизма патогенеза нейродегенеративных заболеваний [7, 15]. В силу сходства процессов, связанных с обменом дофамина в нейронах и лимфоцитах, выявляемые в лимфоцитах пациентов с БП молекулярные нарушения могут отражать особенности патогенеза заболевания [8, 9].

Настоящее исследование посвящено оценке спонтанного апоптоза лимфоцитов периферической крови у пациентов с БП.

Материалы и методы

Характеристика обследованных групп

Группа пациентов с БП состояла из 9 человек (средний возраст 64 ± 9 лет, 2 мужчин, 7 женщин). Среди пациентов с БП были исключены наиболее распространенные наследственные формы БП, ассоциированные с мутациями в гене LRRK2 [14]. Пациенты с БП проходили неврологическое обследование в консультативно-диагностическом центре Санкт-Петербургского Государственного Медицинского Университета им. акад. И.П. Павлова. Критериями отбора служило сочетание хотя бы двух фенотипических проявлений, характерных для БП: гипокинезия, ригидность, тремор покоя, постуральная неустойчивость. Течение заболевания соответствовало I-II степени согласно принятой международной классификации [2]. Контрольная группа состояла из 9 добровольных доноров (средний возраст 60 ± 6 лет, 4 мужчин, 5 женщин), с отсутствием нейродегенеративных заболеваний. Исследованные группы были сопоставимы по полу и возрасту на момент проведения исследования ($p > 0,05$) (табл. 1). Все индивидуумы, вошедшие в настоящее исследование, являлись жителями Санкт-Петербурга. Исследование одобрено этическим комитетом Санкт-Петербургского Государственного Медицинского Университета им. акад. И.П. Павлова.

Оценка апоптоза

Лимфоциты выделяли из свежесобранной венозной крови методом градиентного центрифугирования с использованием «Фикол» (БиоЛот) по методике описанной ранее [1]. Полученные клетки отмывали 2 раза в среде RPMI-1640, а затем ресуспендировали в культуральной среде (RPMI-1640, 10% фетальной сыворотки). Полученная суспензия содержала 5×10^6 клеток/мл. Клеточную суспензию распределяли в лунки на плашке по 2 мл. Клетки культивировались в CO_2 -инкубаторе (5% CO_2 , 37 °C) в течение 48 часов.

Для оценки количества клеток на ранних и поздних стадиях апоптоза использовали проточную цитофлуориметрию с двойным флуоресцентным окрашиванием клеток конъюгированным с флуорохромом – флуоресцеин изотиоционатом аннексина V (Annexin V-FITC) и пропидиум йодидом (PI) (FITC ANNEXIN V APOPTOSIS DETECTION KIT1, BD Pharmingen, USA). Данный метод основан на способности белка аннексина V связывать фосфатидилсерины, транслоцируемые на мембрану клеток на ранних стадиях апоптоза [17]. Использование параллельного окрашивания PI позволяет выявлять некротические клетки, а также клетки, находящиеся на поздних стадиях апоптоза. Для анализа клеточную суспензию дважды отмывали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) и осаждали центрифугированием на 1000. К полученному осадку клеток добавляли 50 мкл связывающего буфера, ресуспендировали и инкубировали с 2,5 мкл Annexin V-FITC и 2,5 мкл PI (2 мМ/л) в темноте при комнатной температуре в течение 15 мин. Измерения проводили на проточном цитометре Beckman Coulter Cytomics FC 500 (USA) в течение часа после окрашивания. Такой же забор материала проводился через 24 и 48 часов с момента начала культивирования лимфоцитов.

Анализировали параметры флуоресценции (зеленой (FITC-530 нм) и красной (PI – 650 нм) в области лимфоцитарных клеток, выделяемых по показателям малоуглового (FSC) и бокового (FSS) светорассеяний, характеризующих размер и гранулярность клетки, соответственно. Регистрировалось не менее 2000 событий. Пример цитограмм представлен на рисунке 1. Для каждого измерения регистрировали суммарный процент клеток, находящихся на ранних и поздних стадиях апоптоза, от общего количества клеток.

Статистическая обработка результатов

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ОБСЛЕДОВАННЫХ ГРУПП

	БП	БП Л-ДОФА «-»	БП Л-ДОФА «+»	Контроль
N	N = 9	N = 5	N = 4	N = 9
Пол (ж/м)	7/2	4/1	3/1	5/4
Возраст (лет)	64 ± 9	69 ± 8	63 ± 10	60 ± 6
Продолжительность заболевания (лет)	9 ± 2	$9,6 \pm 3,4$	$9 \pm 0,5$	
Дозы Л-ДОФА (мг/день)			250 ± 50	

ТАБЛИЦА 2. УРОВЕНЬ АПОПТОЗА ЛИМФОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С БП И В КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЕ ЧЕРЕЗ 1, 24 И 48 ЧАСОВ ИНКУБАЦИИ

Группа	Количество лимфоцитов, вошедших в апоптоз, %		
	1	24	48
Время культивирования, ч			
Пациенты с БП (N = 9)	4,40±2,44	8,87±3,18*	8,39±2,87
Пациенты с БП, не принимающие Л-ДОФА (N = 5)	5,18±3,14	9,84±2,92**	8,92±3,77
Пациенты с БП, принимающие Л-ДОФА (N = 4)	3,43±0,67	6,78±1,71	7,73±1,37
Контрольная группа (N = 9)	3,33±2,00	4,76±2,40	6,42±3,34

Примечание. * $p = 0,007$ по сравнению с контрольной группой;

** $p = 0,009$, по сравнению с контрольной группой; $p = 0,05$ по сравнению с пациентами, принимающими препараты Л-ДОФА.

Результаты обрабатывали с использованием программы SPSS 12. Показатели, полученные в различных группах, сравнивали с помощью непараметрического метода – U-теста Манна–Уитни, $p < 0,05$ принимали за значимый уровень достоверности. Средние значения приведены со стандартным отклонением ($\pm SD$).

Результаты и обсуждение

Средний уровень апоптоза лимфоцитов периферической крови у пациентов с БП и контрольной группе представлен в процентах клеток, вошедших в апоптоз, от общего количества клеток (табл. 2). Через 24 часа культивирования наблюдали статистически значимое увеличение уровня спонтанного апоптоза лимфоцитов периферической крови у пациентов с БП ($p < 0,01$) по сравнению с контролем. Пример цитограмм от пациента с БП и контроля, полученных при окраске лимфоцитов (аннексин V + PI) после 24 инкубации *in vitro* представлены на рисунке 1.

В нашем исследовании группа пациентов с БП в зависимости от приема Л-ДОФА-содержащих препаратов была разделена на 2 группы: на пациентов, принимающих ($n = 4$) и не принимающих Л-ДОФА-содержащие препараты ($n = 5$). Через 24 часа инкубации лимфоцитов в стандартных условиях был выявлен повышенный спонтанный апоптоз лимфоцитов периферической крови у пациентов с БП не принимающих терапию Л-ДОФА в сравнении как с контрольной группой ($p < 0,01$), так и с пациентами получающие препараты Л-ДОФА ($p < 0,05$) (табл. 2).

Литературные данные свидетельствуют о снижении количества циркулирующих лимфоцитов периферической крови пациентов с БП при увеличении числа их активированных форм (CD4(+)CD25(+)), что предполагает активацию апоптоза [5]. У пациентов с БП в лимфоцитах выявлены также изменение маркеров апоптоза: снижение уровня BCL-2, увеличение экспрессии FAS, возрастание уровня активных каспаз 3, 8 и 9 [6, 12]. В нашем исследовании выявлено усиление спонтанного апоптоза лимфоцитов периферической крови у пациентов с БП по сравнению с контролем. Ранее аналогичные данные получены в работе Calora с соавт. [7]. Полученные нами результаты, а также данные зарубежных исследователей, свидетельствуют об усилении апоптоза лимфоцитов периферической крови при БП. Выявленные изменения могут отражать индукцию апоптоза в нейронах мозга.

В настоящем исследовании выявлено влияние Л-ДОФА на уровень спонтанного апоптоза у пациентов с БП. Действительно, наблюдаемые нами увеличение уровня апоптоза лимфоцитов относились только к пациентам, не принимавшим препараты Л-ДОФА. У таких пациентов уровень спонтанного апоптоза был выше как по сравнению с контролем, так и с пациентами, получающими лечение Л-ДОФА. Ранее Calora и соавт также отмечали снижение апоптоза лимфоцитов периферической крови у пациентов, принимающих препараты Л-ДОФА по сравнению с пациентами, не получающими препараты этой группы [7]. Напротив, в исследованиях Schaefer с соавт.



Рисунок 1. Пример цитограмм спонтанного апоптоза лимфоцитов периферической крови у пациента с БП (А) и контроля (Б)

Примечание. Левый нижний квадрат – клетки, находящиеся на ранних стадиях апоптоза (Annexin-V* /PI). Левый верхний квадрат – поздний апоптоз (Annexin-V* /PI*).

и Blandini с соавт. сообщается о том, что прием Л-ДОФА может вызывать индукцию проапоптотических белков [6, 16]. Исследования *in vitro* показали зависимое от дозы влияние Л-ДОФА на апоптоз лимфоцитов: высокие концентрации усиливали апоптоз лимфоцитов, а низкие, напротив, замедляли [10]. В нашем исследовании все пациенты получали лечение относительно низкими дозами Л-ДОФА (200-300 мг/сутки), что может объяснять наблюдаемое снижение уровня апоптоза лимфоцитов в данной группе. Суммируя полученные данные, можно сделать предположение о том, что умеренные дозы препарата Л-ДОФА могут снижать уровень апоптоза лимфоцитов периферической крови у пациентов с БП.

Необходимо отметить, что изменение уровня апоптоза лимфоцитов периферической крови может наблюдаться при различных заболеваниях. В частности аутоиммунные заболевания характеризуются снижением числа апоптотических лимфоцитов крови [3]. Выявленный в настоящем исследовании повышенный уровень апоптоза лимфоцитов периферической крови у пациентов с БП может отражать усиленную индукцию апоптоза в нейронах мозга и вносить вклад в патогенез заболевания.

Исследование поддержано грантом Российского фонда фундаментальных исследований (09-04-00934-а).

Список литературы

1. Натвиг Дж.Б., Перлманн П., Визгель Х. Лимфоциты: выделение, фракционирование и характеристика. — М.: Медицина, 1980. — 416 с.
2. Скоромец А.А., Скоромец А.П., Скоромец Т.А. Нервные болезни. — М.: МЕДпресс-информ, 2005. — 544 с.
3. Уразова О. И., Кравец Е.Б., Новицкий В.В., Рогалева А.В., Будкина Т.Е., Синюкова О.А., Недосекова Ю.В., Кузнецова В.Н. Апоптоз лимфоцитов крови у больных аутоиммунными тиреопатиями // Медицинская иммунология. — 2008. — Т. 10, № 2-3. — С. 187-192.
4. Aktas O., Ullrich O., Infante-Duarte C. Neuronal damage in brain inflammation // Arch Neurol. — 2007. — Vol. 64, N 2. — P. 185-189.
5. Bas J., Calopa M., Mestre M. Lymphocyte populations in Parkinson's disease and in rat models of parkinsonism // J. Neuroimmunol. — 2001. — Vol. 113, N 1. — P. 146-152.
6. Blandini F., Mangiagalli A., Cosentino M., Marino F. Peripheral markers of apoptosis in Parkinson's disease: the effect of dopaminergic drugs // Ann N Y Acad. Sci. — 2003. — Vol. 1010. — P. 675-678.
7. Calopa M., Bas J., Call n A., Mestre M. Apoptosis of peripheral blood lymphocytes in Parkinson patients // Neurobiol Dis. — 2010. — Vol. 38, N 1. — P. 1-7.
8. Caronti B., Antonini C., Calderaro C. Dopamine transporter immunoreactivity in peripheral blood lymphocytes in Parkinson's disease. // J. Neural Transm. — 2001. — Vol. 108. — P. 803-807.
9. Carotini B., Tanda G., Colosimo C. Reduced dopamine in peripheral blood lymphocytes in Parkinson's disease // NeuroReport. — 1999. — Vol. 10. — P. 2907-2920.
10. Colombo C., Cosentino M., Marino F. Dopaminergic modulation of apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 2003. — Vol. 1010. — P. 679-682.
11. Fukae J., Sato S., Shiba K., Sato K. Programmed cell death-2 isoform1 is ubiquitinated by parkin and increased in the substantia nigra of patients with autosomal recessive Parkinson's disease // FEBS Lett. — 2003. — Vol. 3. — P. 521-525.
12. Kim S., Beom S.. Jeon Alpha-synuclein induces apoptosis by altered expression in human peripheral lymphocyte in Parkinson's disease // The FASEB Journal. — 2009. — Vol. 13. — P. 1615-1618.
13. Moos T., Jensen P.H. Absence of prostate apoptosis response-4 protein in substantia nigra of Parkinson's disease autopsies // Acta Neuropathol. — 2004. — Vol. 1. — P. 23-26.
14. Pchelina S.N., Yakimovskii A.F., Emelyanov A.K., Ivanova O.N., Schwarzman A.L., Singleton A.B. Screening for LRRK2 mutations in patients with Parkinson's disease in Russia: identification of a novel LRRK2 variant // Eur. J. Neurol. — 2008. — Vol. 15. — P. 692-696.
15. Pellican M., Bulati M., Buffa S. Systemic immune responses in Alzheimer's disease: in vitro mononuclear cell activation and cytokine production // J. Alzheimers Dis. — 2010. — Vol. 21, N 1. — P. 181-192.
16. Schaefer S., Vogt T., Nowak T., Kann P.H., German KIMS board. Pituitary function and the somatotrophic system in patients with idiopathic Parkinson's disease under chronic dopaminergic therapy // J. Neuroendocrinol. — 2008. — Vol. 20, N 1. — P. 104-109.
17. Tatton N.A. Increased caspase 3 and BAX immunoreactivity accompany nuclear GAPGH translocation and neuronal apoptosis in Parkinson disease // Exp. Neurol. — 2000. — Vol. 166. — P. 29-43.
18. Vermes I., Haanen C., Reutelingsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death // J Immunol Methods. 2000 — Vol. 243. — P. 167-190.
19. Yamada M., Kida K., Amutuhair W., Ichinose F., Kaneki M. Gene disruption of caspase-3 prevents MPTP-induced Parkinson's disease in mice. Biochem Biophys // Res. Commun. — 2010. — Vol. 402, N 2. — P. 312-318.
20. Yang Q., Mao Z. Parkinson disease: a role for autophagy // Neuroscientist. — 2010. — Vol. 16, N 4. — P. 335-341.

поступила в редакцию 16.04.2011

отправлена на доработку 06.05.2011

принята к печати 21.09.2011