

АНАЛИЗ МИГРАЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ЭНЦЕФАЛИТОГЕННЫХ Т-КЛЕТОК *IN VITRO*

Носов М.А.^{1,2}, Корнева Е.А.¹

¹ НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург

² Институт регенерационной медицины, Национальный Университет Ирландии, Голуэй, Ирландия

Резюме. Адоптивный переносной экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит вызывается введением животному активированных Т-клеток, специфичных к антигену центральной нервной системы, например, основному белку миелина. Развитие аутоиммунного воспаления в данной модели сопряжено с изменениями функционального состояния энцефалитогенных Т-клеток в процессе развития заболевания, что выражается в изменении степени активации, пролиферации и подвижности этих клеток. В данной работе описывается созданный нами метод, позволяющий анализировать подвижность энцефалитогенных Т-клеток *in vitro* и исследовать влияние отдельных компонентов экстраклеточного матрикса на миграционную и функциональную активность ЭГ Т-клеток.

Ключевые слова: экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит, энцефалитогенные Т-клетки, экстраклеточный матрикс.

Nosov M.A., Korneva E.A.

IN VITRO ANALYSIS OF MIGRATION ACTIVITY OF ENCEPHALYTOGENIC T CELLS

Abstract. Experimental autoimmune encephalomyelitis in an adoptive transfer model is caused by injecting animal with activated T cells specific for a CNS antigen, e.g., basic myelin protein. Development of autoimmune inflammation in such a model is connected with changed functional state of encephalytogenic (EG) T cells in the course of disease progression, as reflected by changes in their activation, proliferation and motility levels. Present work describes an original technique allowing for *in vitro* analysis of encephalytogenic T cell motility, and studying effects of certain components of extracellular matrix upon migration and functional activities of EG T cells. (*Med. Immunol.*, vol. 12, N 6, pp 565-568)

Keywords: experimental autoimmune encephalomyelitis, encephalytogenic T cells, migration, extracellular matrix.

Введение

В модели адоптивного переносного экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (апЭАЭ) патологический процесс, сходный с развивающимся при рассеянном склерозе (РС), вызывается введением здоровому животному активированных энцефалитогенных Т-клеток (ЭГ Т-клетки), сенсibilизированных к антигенам ЦНС, в частности к основному белку миелина (МВР). Патогенез апЭАЭ характеризуется развитием воспаления в ЦНС и обратимым нарушени-

ем проводящей функции аксонов, хотя и протекает без выраженной демиелинизации в отличие от РС у людей [6]. Обратимое нарушение проводящей функции аксонов, а не полная ее потеря, объясняет монофазный характер течения заболевания, вызванного введением ЭГ Т-клеток, сенсibilизированных к МВР у крыс линии Lewis, которое заканчивается полным восстановлением утраченных функций. Хотя патогенез апЭАЭ не включает всей совокупности процессов, происходящих при развитии РС, адекватность этой модели для изучения роли Т-клеточной составляющей в инициации и развитии патогенеза РС общепризнанна [4].

Течение апЭАЭ у крыс линии Lewis может быть разделено на 3 фазы: преklinическая фаза, клиническая фаза и восстановление. Преklinическая фаза наиболее важна для понимания механизмов инициации заболевания, опосредованного ЭГ Т-лимфоцитами. Несмотря на то, что апЭАЭ

Адрес для переписки:

Носов Михаил Анатольевич,

НИИЭМ СЗО РАМН,

Отдел Общей патологии и патологической физиологии

197376, Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, 12.

Тел.: (812) 234-07-64.

E-mail: mikhael.nosov@gmail.com

вызывается введением активированных Т-клеток, сенсibilизированных к МВР и готовых к прямой экспансии в ЦНС, большинство Т-клеток достигает ЦНС только через 2-3 суток после введения, что было показано в прямых экспериментах с трансгенными по зеленому флуоресцентному белку (GFP) энцефалитогенными Т-клетками [3]. По предположению A. Flugel, на преклиническом этапе апЭАЭ формируется «миграционный фенотип» энцефалитогенных Т-клеток, который необходим для их проникновения через гемато-энцефалический барьер (ГЭБ) и инициации воспаления в ЦНС [2]. Несмотря на большое количество работ, посвященных изучению патогенеза апЭАЭ, остается не до конца ясным, какие клеточные и экстраклеточные компоненты тканей, с которыми взаимодействуют энцефалитогенные клетки в ходе миграции на преклиническом этапе, вовлечены в формирование «миграционного фенотипа» и какие изменения, происходящие с ЭГ клетками, его определяют. В данной работе описывается созданный нами метод, позволяющий анализировать миграционную активность (подвижность) Т-клеток *in vitro* и исследовать влияние отдельных компонентов экстраклеточного матрикса на миграционную и функциональную активность ЭГ Т-клеток.

Методы

Для получения антиген-сенсibilизированных лимфоцитов и их генетической модификации применяли методы, описанные в работе A. Flugel [3]. Полученные линии ЭГ Т-клеток экспрессирующих GFP (Th1 фенотип) использовали для индукции апЭАЭ. Для изучения роли экстраклеточного матрикса (ЭКМ), гиалуронана в частности, в формировании «миграционного» фенотипа ЭГ Т-клеток, мы разработали метод для оценки подвижности клеток *in vitro*. Используя флуоресцентный микроскоп (ZEISS, Германия, Oberkochen, Axiovert 200M), отслеживали миграцию ЭГ Т-клеток, которые были предварительно рестимулированы в присутствии специфического антигена (МВР), антигенпредставляющих клеток и различных компонентов ЭКМ (Матригель – 4%; гиалуронан – 25 мкг/мл инкубационной среды). После стимуляции в присутствии ЭКМ, ЭГ Т-клетки отмывали, и их подвижность отслеживалась в Матригеле (Matrigel, BD Bioscience, Germany; 50% Матригель в DMEM и 10% FCS) в течение 30 мин при 37 °С и при контроле уровня CO₂ и O₂ (путем сканирования в с интервалом в 30 с). Полученные таким образом микрофильмы анализировали с помощью программы ImageJ (National Institute of Mental Health (NIMH), USA). Результаты представлены

в виде совмещенных траекторий отдельных клеток и средних скоростей миграции клеток.

Результаты и обсуждение

При сравнении миграционной активности ЭГ Т-клеток активированных *in vitro* (48 ч после стимуляции) и тех же клеток, но выделенных с помощью проточной цитометрии из ЦНС животных (на 4-ый день после введения), с апЭАЭ (*ex vivo*), было обнаружено, что *ex vivo* ЭГ Т-клетки способны мигрировать через ЭКМ значительно интенсивнее, чем клетки, которые инкубировали *in vitro* (рис. 1 А, Б). Средняя скорость миграции культуральных клеток составляла 3,4 мкм/мин, а максимальная – 24 мкм/мин против 5,74 мкм/мин и 39 мкм/мин для *ex vivo* изолированных клеток соответственно. Таким образом, разработанный нами метод позволяет визуализировать функциональные изменения ЭГ Т-клеток, выражающиеся в способности клеток мигрировать через ЭКМ. Используя описанный метод, было изучено влияние компонентов ЭКМ на миграционную активность ЭГ Т-клеток. В этих целях клетки рестимулировали в присутствии смеси компонентов ЭКМ и в присутствии высокомолекулярного гиалуронана, а затем определяли миграционную активность этих клеток, степень их активации, пролиферации, а также уровень экспрессии KLF2.

Оказалось, что присутствие в инкубационной среде Матригеля ведет к повышению миграционной активности ЭГ Т-клеток по сравнению с таковой у клеток, которые были рестимулированы без добавлений (средняя скорость 3,8 мкм/мин и 6,3 мкм/мин; максимальная – 26 мкм/мин и 39 мкм/мин для ЭГ Т-клеток, стимулированных без добавок и в присутствии Матригеля соответственно) (рис. 1 А и Г). Большинство клеток, которые были рестимулированы в присутствии Матригеля, двигались со средней скоростью более 5 мкм/мин. Присутствие высокомолекулярного гиалуронана в инкубационной среде так же стимулировало активацию миграции ЭГ Т-клеток через ЭКМ (рис. Д) (средняя скорость 4,9 мкм/мин; максимальная – 34 мкм/мин, для ЭГ Т-клеток, стимулированных в присутствии высокомолекулярного гиалуронана). Кроме того, рестимуляция ЭГ Т-клеток в присутствии ЭКМ ведет к снижению пролиферативной активности клеток. Присутствие в инкубационной среде гиалуронана снижает интенсивность пролиферации активированных Т-клеток по сравнению с контрольными, но наиболее выраженный ингибирующий эффект на пролиферацию клеток обнаружен при рестимуляции ЭГ Т-клеток в присутствии Матригеля. В этом случае пролиферация, определенная по уровню встраивания 3Н-тимидина, снижалась на 50% (рис. 2 А). Не-

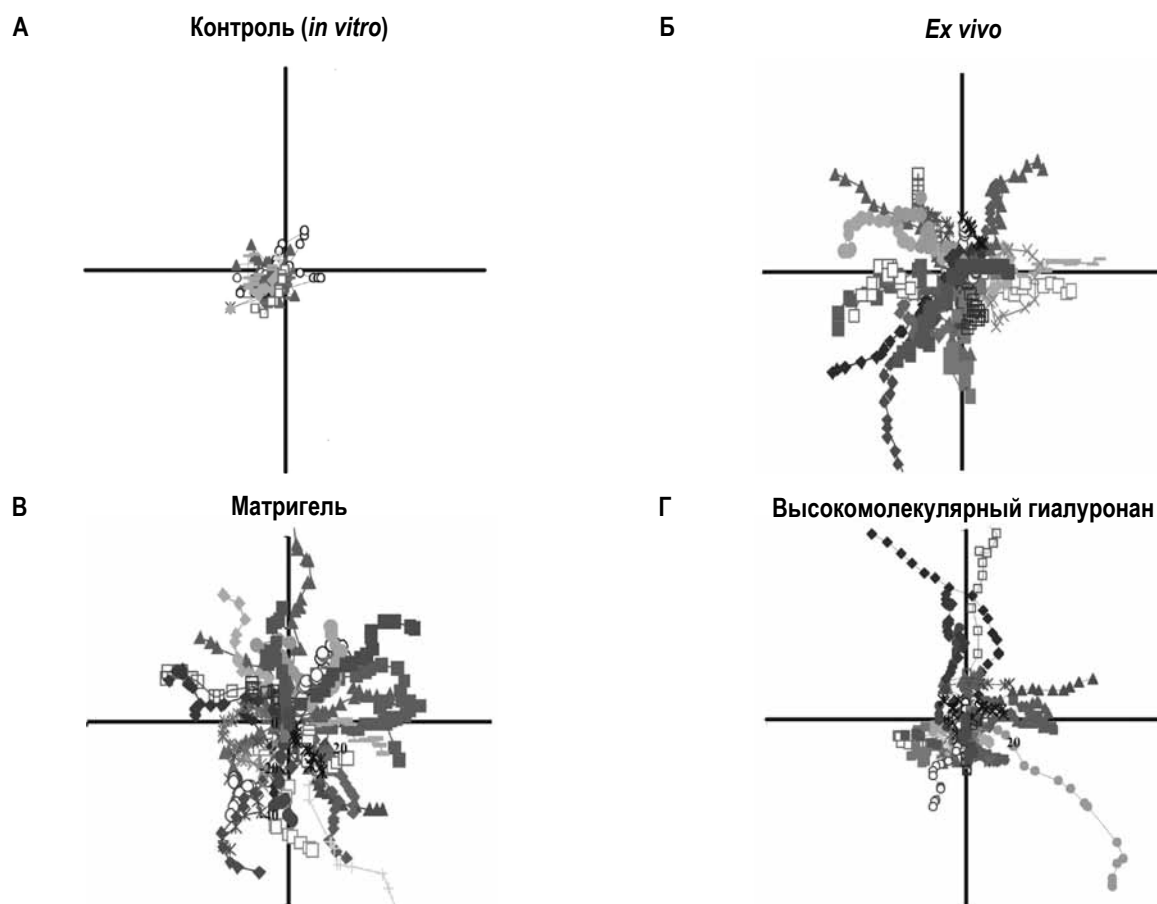


Рисунок 1. Изучение подвижности энцефалитогенных Т-клеток в 3D модели *in vitro*

А – анализ подвижности культуральных энцефалитогенных Т-клеток, Б – клеток, выделенных из ЦНС с помощью проточной цитометрии (FACS) и ЭГ Т-клеток, рестимулированных в присутствии матригеля – (В) или Гиалуронана – (Г) *in vitro*. Результат представлен в виде совмещенных в стартовой точке траекторий миграции отдельных клеток в течение 30 мин в 3D матриксе.

смотря на снижение пролиферативной активности энцефалитогенных Т-клеток при их стимуляции в присутствии ЭКМ, уровень их активации соответствовал таковому у клеток в контроле. Уровень маркеров активации OX40 и CD25 сохранялся примерно на одном уровне после стимуляции клеток в присутствии Матригеля, гиалуронана или без добавок. Более того, клетки, которые были рестимулированы в присутствии ЭКМ, экспрессировали KLF2 на более высоком уровне по сравнению с клетками, которые были стимулированы без добавок (рис. 2 Б). Подобное наблюдение находится в полном согласии с данными литературы. Так, известно, что активация экспрессии KLF2 генно-инженерными методами приводит к супрессии пролиферации Т-клеток линии Jurkat через сМус – зависимый механизм [1]. Таким образом, KLF2 выступает как ингибирующий транскрипционный фактор, который контролирует спонтанную активацию и пролиферацию наивных Т-лимфоцитов через активацию p21 – ингибитора циклин-зависимых киназ [7]. KLF2, как транскрипционный фактор,

положительно регулирует сфингозин 1-фосфат рецептор 1 (S1P1) и L-selectin (CD62L), которые вовлечены в обеспечение миграции лимфоцитов в лимфатические узлы и из них [5]. В нормальных условиях KLF2 экспрессируется в зрелых тимоцитах, наивных Т-лимфоцитах и клетках памяти, но его экспрессия значительно снижается после стимуляции Т-клеточного рецептора [5].

В завершение был исследован энцефалитогенный потенциал ЭГ Т-клеток после рестимуляции в присутствии Матригеля или гиалуронана. Введение ЭГ Т-клеток, которые были рестимулированы с ЭКМ, вызывало развитие ЭАЭ, начиная с 4-х суток после их введения у животных всех исследованных групп. Тем не менее животные, которым вводили ЭГ Т-клетки, рестимулированные с Матригелем, продемонстрировали развитие более тяжелых клинических симптомов (рис. 2 В). Введение клеток, рестимулированных в присутствии гиалуронана, вызывало развитие заболевания, которое протекало тяжелее, чем у животных контрольной группы, но менее тя-

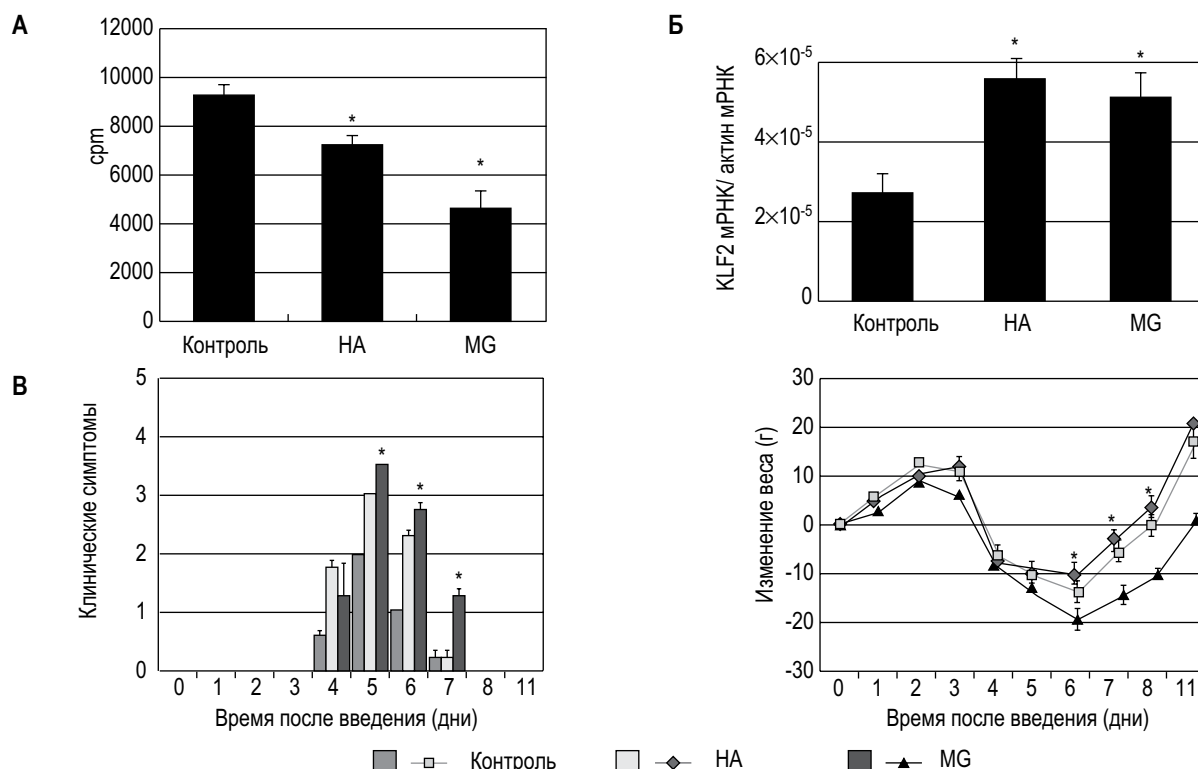


Рисунок 2. Влияние экстраклеточного матрикса на функциональную активность энцефалитогенных Т-клеток

Интенсивность пролиферации (А) и экспрессии KLF2 (Б) в ЭГ Т-клетках, рестимулированных в присутствии экстраклеточного матрикса. А – связывание ³H-тимидина (срп) при рестимуляции клеток в присутствии высокомолекулярного (НА) и матригеля (МГ). Б – уровень экспрессии KLF2 в ЭГ Т-клетках, растимулированных с высокомолекулярным гиалуронатом (НА) или матригелем (МГ). В – клинические симптомы, проявляющиеся при введении энцефалитогенных Т-клеток, рестимулированных в присутствии экстраклеточного матрикса (высокомолекулярного гиалуронана – НА и матригеля – МГ). * – $p < 0,05$ по отношению к контролю.

жело, чем у животных, которым вводили клетки, активированные в присутствии Матригеля.

Таким образом, компоненты экстраклеточного матрикса могут играть существенную роль в формировании фенотипа ЭГ Т-клеток, в частности в активации миграционной активности клеток, подавлении пролиферации без влияния на их способность к активации и усилению энцефалитогенных свойств лимфоцитов, сенсibilизированных к антигену ЦНС.

Список литературы

1. Anderson K.P., Kern C.B., Crable S.C., Lingrel J.B. Isolation of a gene encoding a functional zinc finger protein homologous to erythroid Kruppel-like factor: identification of a new multigene family // *Mol Cell Biol.* – 1995. – Vol. 15. – P. 5957-5965.
2. Flugel A., Berkowicz T., Ritter T., Labeur M., Jenne D.E., Li Z., Ellwart J.W., Willem M., Lassmann H., Wekerle H. Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis // *Immunity.* – 2001. – Vol. 14. – P. 547-560.
3. Flugel A., Willem M., Berkowicz T., Wekerle H. Gene transfer into CD4⁺T lymphocytes: green

fluorescent protein-engineered, encephalitogenic T cells illuminate brain autoimmune responses // *Nat Med.* – 1999. – Vol. 5. – P. 843-847.

4. Gold R., Linington C., Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research // *Brain.* – 2006. – Vol. 129. – P. 1953-1971.

5. Grayson J.M., Murali-Krishna K., Altman J.D., Ahmed R. Gene expression in antigen-specific CD8⁺ T cells during viral infection // *J. Immunol.* – 2001. – Vol. 166. – P. 795-799

6. Linington C., Bradl M., Lassmann H., Brunner C., Vass K. Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein // *Am J. Pathol.* – 1988. – Vol. 130. – P. 443-454.

7. Wu J., Lingrel J.B. KLF2 inhibits Jurkat T leukemia cell growth via upregulation of cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 // *Oncogene.* – 2004. – Vol. 23. – P. 8088-8096.

поступила в редакцию 20.09.2010
принята к печати 27.09.2010