

М.М. Охотина, Т.М. Сивцева, В.Л. Осаковский

СИСТЕМА CD40-CD40L В ИММУНОПАТОГЕНЕЗЕ ВИЛЮЙСКОГО ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТА

Аннотация. Вилюйский энцефаломиелит (ВЭ) является нейродегенеративным заболеванием, распространенным только среди коренных жителей Якутии, в патогенезе которого значительную роль играют иммунопатологические процессы. У больных ВЭ показано повышение уровня растворимого лиганда sCD40L, экспрессирующегося на иммунных клетках и тромбоцитах крови, и который может влиять на развитие патологии сосудов и воспалительные процессы в головном мозге. Предполагается, что в этот процесс могут вносить свой вклад ферменты металлопротеиназы с повышенной протеазной активностью. Целью работы являлась экспериментальная проверка гипотезы о эндопротеазной активности сыворотки больного ВЭ. Результаты исследования при инкубации тромбоцитов здорового донора с сывороткой больных ВЭ подтвердили повышение у больных ВЭ уровня растворимого лиганда sCD40L в периферической крови за счет протеазной активности. Повышенная активность в крови металлопротеиназ, отщепляющих лиганд sCD40L от тромбоцитов, может приводить к микрососудистой патологии мозга и быть основным фактором в патогенезе первично-хронического ВЭ.

Ключевые слова: вилюйский энцефаломиелит, нейродегенерация, тромбоцит, sCD40L, металлопротеиназы, сыворотка крови

М.М. Okhotina, T.M. Sivtseva, V.L. Osakovsky

CD40-CD40L SYSTEM IN THE IMMUNOPATHOGENESIS OF VILUIISK ENCEPHALOMYEELITIS

Abstract. Viliuisk encephalomyelitis (VE) is a neurodegenerative disease that is common only among the indigenous inhabitants of Yakutia, in whose pathogenesis immunopathological processes play a significant role. VE patients demonstrate an increased level of soluble sCD40L ligand, expressed on immune cells and blood platelets, and which can affect the development of vascular pathology and inflammatory processes in the brain. It is suggested that metalloproteinase enzymes with increased protease activity can contribute to this process. The aim of the work was an experimental verification of the hypothesis of endoprotease activity of serum of VE patients. The results of the study during platelet incubation of a healthy donor with serum of VE patients confirmed the increase in the level of soluble sCD40L ligand in peripheral blood in VE patients due to protease

ОХОТИНА Мария Михайловна – магистрант II курса, Институт естественных наук, ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова». Телефон: +79141004596. E-mail: mariaokhotina@mail.ru

ОКХОТИНА Maria Mikhailovna – 2nd year Master's student undergraduate, Institute of Natural Sciences, M.K. Ammosov North-Eastern Federal University. Phone: +79141004596. E-mail: mariaokhotina@mail.ru

СИВЦЕВА Татьяна Михайловна – канд. биол. наук, старший научный сотрудник, Научно-исследовательский центр Медицинского института, ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова». Телефон: +79142237432. E-mail: tm.sivtseva@s-vfu.ru

СИВЦЕВА Tatyana Mikhailovna – Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Research Center of the a Medical Institute of Medicine, M.K. Ammosov North-Eastern Federal University. Phone: +79142237432. E-mail: tm.sivtseva@s-vfu.ru

ОСАКОВСКИЙ Владимир Леонидович – канд. биол. наук, главный научный сотрудник, Научно-исследовательский центр Медицинского института, ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова». Телефон: +79248703167. E-mail: iz_labgene@mail.ru

OSAKOVSKY Vladimir Leonidovich – Candidate of Biological Sciences, Chief Researcher, Research Center of the Institute of a Medicinal Institute, M.K. Ammosov North-Eastern Federal University. Phone: +79248703167. E-mail: iz_labgene@mail.ru

activity. Increased activity in the blood of metalloproteinases that cleave sCD40L ligand from platelets can lead to microvascular pathology of the brain and be a major factor in the pathogenesis of primary chronic VE.

Keywords: Viliuisk encephalomyelitis, neurodegeneration, platelet, sCD40L, metalloproteinase, blood serum

Введение. Вилуийский энцефаломиелит (ВЭ), известный на якутском языке как «бохоорор» (скованный, якут.), является нейродегенеративным заболеванием, распространенным только среди коренных жителей Республики Саха (Якутия) [1]. На данный момент этиология ВЭ еще неизвестна, однако показана ключевая роль иммунопатологии. Основой заболевания является первично-хронический дегенеративный процесс в центральной нервной системе (ЦНС), который может осложняться острым воспалительным эпизодом асептического характера [2].

В патогенезе заболевания вилуийского энцефаломиелита показано участие системы рецептора-лиганда CD40-CD40L [3]. Выявлено, что у больных ВЭ повышен уровень растворимой формы лиганда и рецептора в крови. Система CD40-CD40L участвует в гуморальном иммунном ответе. Рецептор CD40, член семейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNF), экспрессируется В-клетками, профессиональными антиген-презентирующими клетками, а также неиммунными клетками: дендритными клетками, моноцитами, тромбоцитами и макрофагами, а также негематопоэтическими клетками: миофибробластами, фибробластами, эпителиальными и эндотелиальными клетками. Рецептор CD40 связывает свой лиганд CD40L, который временно экспрессируется на Т-клетках в условиях воспаления, а также на тромбоцитах и индуцируется на моноцитарных клетках, естественных киллерах, тучных клетках и базофилах [4]. Тромбоциты также могут экспрессировать CD40L под влиянием тромбинов и агонистов его рецепторов и высвобождают его в растворимой форме, известной как sCD40L. Белок sCD40L включает сигнальный путь, который осуществляет механизм гибели клетки и дегенерации ткани [5]. Противовоспалительные свойства системы CD40-CD40L обуславливают увеличение синтеза молекул клеточной адгезии и различных хемокинов, усиливают экспрессию тканевого фактора, а также матриксных металлопротеаз [4].

Кровь больных хроническим ВЭ характеризуется повышенным содержанием тромбоцитов, которые могут являться основными продуцентами растворимого sCD40L в периферической крови больных [6]. Однако причина повышения этого показателя остается неясной. Предполагается участие активированных протеаз, отщепляющих мембран-связанные CD40L от поверхности тромбоцитов крови больного ВЭ. Показано, что отщепление от мембраны лиганда CD40L с образованием провоспалительной растворимой формы sCD40L происходит с участием матричных металлопротеиназ ADAM10 или ADAM17 [7]. В этом процессе также может участвовать эндопептидаза ADAMTS14, гетерозиготный вариант, который выявлен у больных ВЭ [1]. Нами выдвинута следующая гипотеза: повышенный уровень sCD40L в крови больных ВЭ может быть связан с повышенной активностью ферментов металлопротеиназ, отщепляющих лиганд CD40L от мембран тромбоцитов и лимфоцитов; следовательно, добавление сыворотки больных к клеточной суспензии тромбоцитов и лимфоцитов приведет к повышению уровня sCD40L в инкубационной среде. Целью работы являлась экспериментальная проверка гипотезы об эндопротеазной активности сыворотки больного ВЭ.

Материалы и методы. В эксперименте использовались суспензии тромбоцитов и лимфоцитов от одного донора, полученные в одно время. Эксперимент проводился в день взятия образца. Клетки получали методом центрифугирования в растворе фиколла плотностью $\rho = 1,077$ г/мл. Для анализа протеазной активности в суспензию клеток добавляли сыворотку крови и цереброспинальную жидкость (ЦСЖ) больных ВЭ (с высоким уровнем протеазной активности) и рассеянным склерозом (РС). Определение ферментативной активности проводилось инкубацией суспензии клеток донора (объемом 1 мл) и добавлением сыворотки или ЦСЖ (объемом 0,2 мл) двух больных ВЭ и одного РС при 37°C в течение разных промежутков времени: 0, 1, 3, 6 и 20,5 часов. Всего было получено 25 вариантов опыта. По истечении времени добавляли ингибитор ЭДТА и осаждали клетки центрифугированием. Надосадочная жидкость анализировалась на содержание sCD40L с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием набора RayBio Human CD40L (RayBiotech, USA) на оборудовании SF-4300-Chromate-revA

STAT FAX 4300 (AWARENESS technology ing, USA). Этапы метода соответствовали инструкции производителя. Измерение проводилось во всех образцах двукратно.

Результаты и обсуждение. Уровень содержания sCD40L в надосадочной жидкости при инкубации тромбоцитов здорового донора с сывороткой и ЦСЖ больных ВЭ и РС в течение разных промежутков времени представлен на рис. 1. Добавляемые к ним сыворотки и ЦСЖ отличались начальным уровнем sCD40L. Наиболее высокий уровень был в сыворотке больного ВЭ, в его ликворе в 40 раз меньше. Сыворотка больного РС (нейродегенеративное заболевание с иммунопатологическим механизмом развития) имела низкий уровень sCD40L (в 7 раз меньше, чем в сыворотке больного ВЭ), несмотря на то, что в некоторых работах отмечается повышение данного показателя при этой патологии [3].

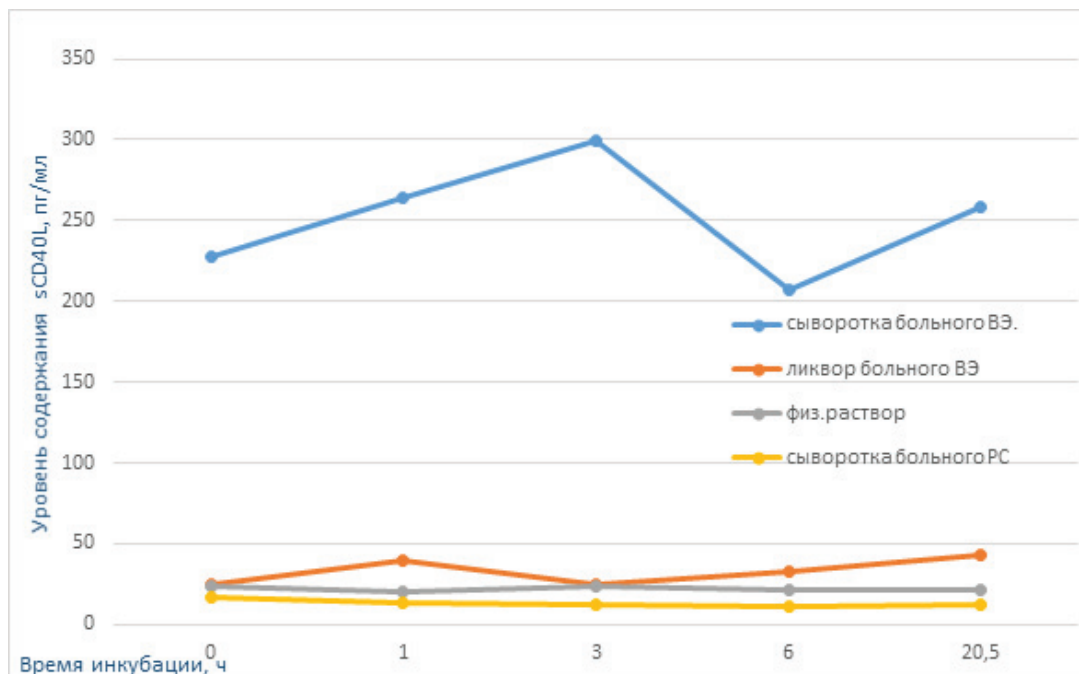


Рисунок 1 – Уровень содержания sCD40L при инкубации

При инкубации тромбоцитов здорового донора с физраствором уровень содержания sCD40L в надосадочной жидкости составлял в среднем 22,25 пг/мл и практически сохранял этот уровень в течение всей инкубации, что свидетельствует о стабильности мембранных CD40L тромбоцитов донора.

При инкубации тромбоцитов здорового донора с сывороткой больного ВЭ наблюдался рост уровня sCD40L в течение 3 часов инкубации от исходной 227 пг/мл до 298 пг/мл с последующим падением. При инкубации ЦСЖ больных ВЭ содержание sCD40L в суспензии тромбоцитов донора повышалось незначительно только в течение первого часа инкубации (от 25,3 до 39,5 пг/мл).

При инкубации тромбоцитов с сывороткой больного РС наблюдалось снижение уровня sCD40L с 16,8 пг/мл в образце без инкубации до 11,3 пг/мл через 6 часов инкубации.

Полученные результаты подтверждают высокий уровень sCD40L в крови больного ВЭ. Наблюдаемое повышение уровня растворимого sCD40L при инкубации с сывороткой больного ВЭ показывает наличие активной протеазы в сыворотке больного ВЭ, отщепляющего мембранный CD40L тромбоцита донора. В отличие от больного ВЭ, сыворотка больного РС не проявляет такой активности. Причиной этого может являться лечение иммуносупрессивными препаратами при РС.

Секреция sCD40L тромбоцитами может индуцировать экспрессию мембранных рецепторов иммунных и эндотелиальных клеток микрососудов, что влечет связывание иммуноактивных

клеток с внеклеточным матриксом и клетками эндотелия и может провоцировать микрососудистую патологию. Показано участие sCD40L в повышенной проницаемости гематоэнцефалического барьера [8]. Размер белка sCD40L позволяет проникать ему в паренхиму головного мозга, действуя на нейронные и глиальные клетки, что приводит к нарушению трофической функции, ухудшению доступа в ткани мозга кислорода. Развивающаяся микрососудистая патология в мозге может быть причиной дегенерации и апоптоза ткани головного мозга [2]. Тромбоциты, секретирующие sCD40L в периферическую кровь, могут быть основным фактором в патогенезе первично-хронического ВЭ.

Заключение. Полученные результаты подтверждают повышенный уровень эндопептидазной активности сыворотки больных ВЭ, которая способствует повышению sCD40L. Повышенный уровень sCD40L в периферической крови у больных ВЭ может быть основной причиной микрососудистой патологии в мозге, приводя к необратимым дегенеративным изменениям и таким образом играя центральную роль в патогенезе заболевания.

Работа выполнена в рамках госзадания Министерства науки и высшего образования РФ 2020-2022 гг. (проект FSRG-2020-0016 «Широкогеномные исследования генофонда коренного населения арктического побережья Якутии»).

Литература

1. Гольдфарб, Л.Г. Виллоуикий энцефаломиелит / Л.Г. Гольдфарб, В.А. Владимирцев, Н.М. Ренвик, Ф.А. Платонов. Новосибирск: Издательство СО РАН, 2014. 256 с.
2. Осаковский, В.Л. Виллоуикий энцефаломиелит как первично-хроническая нейродегенеративная патология / В.Л. Осаковский, Т.М. Сивцева // Якутский медицинский журнал. – 2019. – № 4 (68). – С. 106-110.
7. Осаковский, В.Л. Роль системы CD40-CD40L в патогенезе виллоуицкого энцефаломиелита / В.Л. Осаковский, Т.М. Сивцева // Проблемы виллоуицкого энцефаломиелита и других нейродегенеративных заболеваний: современные этиологии и патогенеза: тезисы докладов V Междунар. науч.-практ. конф. Якутск: Алаас, 2016. С. 23-26.
13. Noelle Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system / Raul Elgueta, Micah J. Benson, Victor C. de Vries, Anna Wasiuk1, Yanxia Guo, and Randolph J. Noelle // NIH-PA Author Manuscript. – 2009. – 229(1). doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00782.x.
14. The Role of Platelets sCD40L to Atherogenesis (Peran sCD40L Trombosit terhadap Aterogenesis) / Liong Boy Kurniawan // Clinical pathology and medical laboratory. – 2016. – No. 3. Vol. 22. – P. 284-288.
15. Сизикова, Л.П. Особенности картины крови у больных виллоуиским энцефаломиелитом / Л.П. Сизикова, А.А. Дадаева, Е.Л. Субботина и др. // Сибирский медицинский журнал. – 2008. – № 3. – С. 47-50.
21. CD154 Is Released from T-cells by a Disintegrin and Metalloproteinase Domain-containing Protein 10 (ADAM10) and ADAM17 in a CD40 Protein-dependent Manner / Daniel Yacoub, Nadir Benslimane, Loubna Al-Zoobi, Ghada Hassan, Amal Nadiri, and Walid Mourad // The journal of biological chemistry. – 2013. – Vol.288. No. 50. – P. 30683 – 30693.
22. Soluble CD40 ligand contributes to blood – brain barrier breakdown and central nervous system inflammation in multiple sclerosis and neuromyelitis optica spectrum disorder / H. Masuda, M. Mori, T. Uchida, et.al. // J. Neuroimmunol. – 2017. – 305. – P. 102–107. doi:10.1016/j.jneuroim.2017.01.024.

References

1. Gol'dfarb L.G. Viljujskij jencefalomielit [Viliuisk encephalomyelitis]. Gol'dfarb L.G., Vladimircev V.A., Renvik N.M., Platonov F.A. Novosibirsk: Izdatel'stvo SO RAN, 2014. 256 p.
2. Osakovskij V.L. Viljujskij jencefalomielit kak pervichno-hronicheskaja nejrodegenerativnaja patologija [Viliuisk encephalomyelitis as a primary chronic neurodegenerative pathology]. Osakovskij V.L., Sivceva T.M. Jakutskij medicinskij zhurnal [Yakut Medical Journal], 2019, no. 4(68). pp. 106-110.
3. Osakovskij V.L. Rol' sistemy CD40-CD40L v patogeneze viljujskogo jencefalomielita [The role CD40-CD40L system in the pathogenesis of Viliuisk encephalomyelitis]. Osakovskij V.L., Sivceva T.M. Problemy viljujskogo jencefalomielita i drugih nejrodegenerativnyh zaboolevanij: sovremennye jetiologii i patogeneza:

tezisy dokladov V Mezhdunarodnoj NPK [Problems of Viliuisk encephalomyelitis and other neurodegenerative diseases: modern etiology and pathogenesis: abstracts of the V International Scientific and Practical Conference]. Yakutsk: Alaas, 2016. pp. 23-26.

4. Noelle Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. Raul Elgueta, Micah J. Benson, Victor C. de Vries, Anna Wasiuk1, Yanxia Guo, and Randolph J. Noelle. NIH-PA Author Manuscript, 2009. 229(1). doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00782.x.

5. The Role of Platelets sCD40L to Atherogenesis (Peran sCD40L Trombosit terhadap Aterogenesis). Liang Boy Kurniawan. Clinical pathology and medical laboratory, 2016. no. 3. Vol. 22. pp. 284-288.

6. Sizikova L.P., Osobennosti kartiny krovi u bol'nyh Viljujskim jencefalomielitom [Features of the blood picture in patients with Viliuisk encephalomyelitis]. Sizikova L.P., Dadaeva A.A., Subbotina E.L. i dr. Sibirskij medicinskij zhurnal [Siberian Medical Journal], 2008. no 3. pp. 47-50.

7. CD154 Is Released from T-cells by a Disintegrin and Metalloproteinase Domain-containing Protein 10 (ADAM10) and ADAM17 in a CD40 Protein-dependent Manner. Daniel Yacoub, Nadir Benslimane, Loubna Al-Zoobi, Ghada Hassan, Amal Nadiri, and Walid Mourad. The journal of biological chemistry, 2013. Vol.288. no. 50. pp. 30683 – 30693.

8. Soluble CD40 ligand contributes to blood – brain barrier breakdown and central nervous system inflammation in multiple sclerosis and neuromyelitis optica spectrum disorder. H. Masuda, M. Mori, T. Uchida, et.al. J. Neuroimmunol, 2017. 305. pp. 102–107. doi:10.1016/j.jneuroim.2017.01.024.