

# Особенности показателей врожденного и адаптивного иммунитета у пациентов с болезнью Паркинсона. Фокус на “минорной” субпопуляции Т-лимфоцитов

И.В. Красаков<sup>1, 2</sup>, И.В. Литвиненко<sup>2</sup>, Н.И. Давыдова<sup>1</sup>,  
А.А. Калашникова<sup>1</sup>, С.С. Алексанин<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ “Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова” МЧС России (Санкт-Петербург)

<sup>2</sup> ФГБВОУ ВО “Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова” Минобороны России (Санкт-Петербург)

Болезнь Паркинсона (БП) является одной из значимых медицинских проблем XXI века. С целью разработки новых методов лечения БП предлагаются патогенетические теории заболевания, основанные на изучении показателей как локального, так и системного воспаления, в том числе иммунологических данных. Изучение патогенеза БП выявило дисфункцию иммунной системы, в частности врожденного нейровоспалительного ответа как потенциального фактора предрасположенности к заболеванию [1–3].

Т-клеточное звено иммунной системы играет существенную роль в нейровоспалительной активности при БП [4]. В настоящее время активно изучается гетерогенная субпопуляция  $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов, доминирующая в слизистых оболочках и коже, сочетающая свойства и функции клеток как врожденного, так и адаптивного иммунитета.

Закладка эпителия тимуса происходит на 6-й неделе развития плода. Клетки-предшественники, мигрирующие в тимус из фетальной печени на 8-й неделе эмбрионального развития, созревают в  $\gamma\delta$ Т-клетки с ограниченной вариабельностью Т-клеточного рецептора (Т-cell receptor, TCR); далее они перемещаются из тимуса в кожу, слизистые оболочки языка и репродуктивную систему, в последующем эти клетки самостоятельно поддерживаются локально. Позже в тимусе формируются  $\gamma\delta$ Т-лимфоциты с более широким спектром специфичностей TCR, покидающие тимус после рождения (до 13-х суток) и заселяющие слизистые оболочки различных органов.

В постнатальном периоде прекоммитированные к развитию в Т-клетки лимфоциты проходят в вилочковой железе следующие основные этапы

своего развития [5]: 1) стадия дубль-негативных (DN) клеток CD4–CD8 (CD – кластер дифференцировки); 2) формирование более зрелой популяции с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> – дубль-позитивные клетки, слабо экспрессирующие на мембране CD3. На стадии DN происходит дивергенция тимоцитов к дифференцировке в различные линии  $\alpha\beta$  или  $\gamma\delta$ , запускается основное событие дифференцировки Т-лимфоцитов – перестройка V-генов TCR в последовательности  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\beta$  [6]. Уже на стадии DN3 тимоцит экспрессирует  $\gamma\delta$ TCR и быстро эмигрирует из тимуса. У человека переменные домены  $\gamma\delta$ TCR кодируются 3 основными V $\delta$ -генами и не менее чем 6 V $\gamma$ -генами, что обуславливает высокий полиморфизм  $\gamma\delta$ TCR, большой потенциал к формированию разнообразных лигандсвязывающих участков [7]. Не более 5% от общего числа покинувших тимус Т-лимфоцитов составляют  $\gamma\delta$ Т-клетки. Большинство Т-клеток имеют TCR, которые содержат  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи, они взаимодействуют с пептидными антигенами, представляемыми в комплексе с молекулами системы HLA (главный комплекс гистосовместимости) антигенпрезентирующими клетками (классические Т-лимфоциты). Популяция  $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов экспрессирует уникальный Т-клеточный рецептор, способный распознавать собственные и чужеродные антигены непептидной природы в отсутствие необходимых для презентации молекул I или II класса системы HLA [8].

$\gamma\delta$ Т-лимфоциты впервые были описаны в середине 1980-х годов Н. Saito et al. и Y.H. Chien et al. [9, 10]. В периферической крови взрослого человека  $\gamma\delta$ Т-клетки составляют около 5% от общего числа CD3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. Во всех лим-

фоидных органах (тимус, селезенка, лимфатические узлы, миндалины), в эпителии репродуктивных органов, респираторного тракта, языка общее содержание  $\gamma\delta$ T-клеток также составляет менее 5% от зрелых T-лимфоцитов [11, 12]. Существуют корреляции экспрессии  $\gamma\delta$ TCR с определенными анатомическими зонами. Так, резидентные  $\gamma\delta$ T-клетки с вариантами  $CD3^+V\delta 1^+$  TCR или  $CD3^+V\delta 3^+$  TCR доминируют в слизистых оболочках желудочно-кишечного, респираторного и урогенитального трактов, а в крови основная субпопуляция T-лимфоцитов имеет  $V\gamma 9V\delta 2$  TCR [13].

Функциональная активность  $\gamma\delta$ T-клеток определяется экспрессией на их мембране различных рецепторов, в том числе рецепторов клеток врожденного иммунитета. Так,  $\gamma\delta$ T-клетки экспрессируют активационные рецепторы натуральных киллерных клеток NKG2D, которые при взаимодействии с лигандами реализуют цитотоксическую функцию, т.е. противовирусную, противоопухолевую защиту. Уничтожение этих клеток-мишеней  $\gamma\delta$ T-лимфоцитами через индукцию апоптоза – важная особенность данной субпопуляции лимфоцитов. Активация супрессирующих рецепторов  $CD94/NKG2A$  и  $CD94/NKG2C$  на мембране  $\gamma\delta$ T-клеток подавляет уничтожение клеток-мишеней [14].

На мембране  $\gamma\delta$ T-клеток определены рецепторы, распознающие патогенассоциированные молекулярные паттерны: Toll-подобные рецепторы (TLR), рецепторы к полисахаридам бактерий, грибам,  $CD36$ , рецепторы молекул “мусорщиков” (scavengers) и др.; такая рецепторная специфичность обуславливает участие этих клеток в антибактериальной защите. При контактах с бактериями эта клеточная субпопуляция может менять регуляторную функцию (продукция цитокинов) на антигенпрезентирующую, начиная экспрессировать антигены класса HLAII, необходимые для эффективной презентации антигенов классическим  $CD4^+$  T-хелперам; всё это свидетельствует о функциональной пластичности  $\gamma\delta$ T-клеток. Популяция  $V\gamma 9V\delta 2$  T-лимфоцитов распознает фосфатные антигены pAgs, которые имеют микробное происхождение или являются эндогенными промежуточными продуктами мевалонатного пути (изопренилпирофосфат) и накапливаются в клетках, “инфицированных” вирусами, а также в опухолевых клетках.  $V\gamma 9V\delta 2$  T-лимфоциты осуществляют иммунный надзор [15].

$\gamma\delta$ T-клетки экспрессируют на мембране рецепторы цитокинов ИЛ-2R (ИЛ – интерлейкин), ИЛ-15R, ИЛ-23R и др., которые активируют или подавляют эффекторные функции этих клеток, в том числе пролиферативную и регуляторную [8]. Активация  $\gamma\delta$ T-клеток через TCR стимулирует продукцию интерферона- $\gamma$  (ИФН- $\gamma$ ), ИЛ-17, фактора некроза опухоли (ФНО), CCL3/4, CCL5, которые являются промоторами активации и миграции других клеток иммунной системы в зону воспаления; активация через костимуляторные молекулы  $CD27$ ,  $CD30$  способствует продукции ИФН- $\gamma$  и ИЛ-4. Различные функциональные фенотипы  $\gamma\delta$  ( $\gamma\delta T1$  и  $\gamma\delta T17$ ) генерируются в течение пренатального развития тимуса. Коммитированная к продукции ИЛ-17 субпопуляция  $\gamma\delta$ T-лимфоцитов характеризуется экспрессией ИЛ-23R, CCR6 и отсутствием  $CD27$  на клеточной мембране. Подавление нейроиммунного воспаления при БП реализует противовоспалительный цитокин ИЛ-10: он на периферии продуцируется клетками врожденного иммунитета (дендритными, макрофагами, эозинофилами, нейтрофилами, тучными клетками, NK-клетками) и клетками адаптивного иммунитета – T-хелперами (Th1, T2, Th17), T- и B-регуляторными клетками [16, 17]. В центральной нервной системе ИЛ-10 экспрессируется клетками микроглии, астроцитами и нейронами [18, 19]. Интерлейкин-10 ингибирует продукцию ФНО, ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12 и ИЛ-23, а также пролиферацию и синтез цитокинов Th1 (ИЛ-2 и ИФН- $\gamma$ ) и Th2 (ИЛ-4, ИЛ-5), но не ингибирует синтез ИЛ-17 Th17 [20, 21].

Роль  $\gamma\delta$ T-клеток в иммунном ответе на чужеродные антигены, в противоопухолевой защите, в патогенезе аутоиммунных заболеваний характеризуется рядом особенностей.  $\gamma\delta$ T-клетки способны распознавать различные типы антигенов, спонтанно продуцировать цитокины, обладают различными и уникальными функциями, в том числе антигенпрезентирующей, имеют определенную анатомическую локализацию. Этим клеткам принадлежит решающая роль в защите от специфических патогенов, они способны к активации дендритных клеток.

Несмотря на то что  $\gamma\delta$ T-клетки являются “минойной” субпопуляцией, между их количеством и вариантами течения/исходами заболеваний были выявлены значимые корреляции [22–24]. Так, содержание  $\gamma\delta$ T-клеток резко возрастает (до

60% от общего количества Т-клеток) в крови больных с различными инфекционными заболеваниями [25–27].  $\gamma\delta$ Т-лимфоциты первыми запускают иммунный ответ при острых инфекциях (сальмонеллез, туляремия, листериоз, токсоплазмоз). Внедрение в организм возбудителей активирует  $\gamma\delta$ Т-клетки, что сопровождается продукцией цитокинов: ИФН- $\gamma$  при *Listeria monocytogenes* и ИЛ-4 при *Nippostrongylus brasiliensis*. На экспериментальных моделях инфекционных и аутоиммунных заболеваний было показано, что  $\gamma\delta$ Т-клетки являются основными продуцентами ИЛ-17 [28], который инициирует воспалительные реакции, стимулируя созревание и рекрутирование нейтрофилов из костного мозга [29]. Кроме того, на ранних стадиях рассеянного склероза также описано повышенное содержание  $\gamma\delta$ Т-клеток (до 20–30% от общего количества Т-клеток) [30].

В 1994 г. в работе U. Fiszer et al. впервые показано, что у пациентов с БП содержание  $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов как в периферической крови, так и в ликворе было выше, чем у пациентов с другими неврологическими заболеваниями [31]. Стимулом к изучению субпопуляций Т-лимфоцитов при БП послужили исследования, определившие важный вклад системного воспаления в патогенез БП.

Среди возможных “регуляторов” системного воспаления при БП кишечная микробиота в последние годы стала одним из самых популярных объектов исследования. Подробное изучение ее состава стало возможным благодаря внедрению в практику современных методов лабораторной диагностики. Кишечная микробиота находится в тесном контакте с эпителиальным барьером кишечника, подавляющее число иммунных процессов происходит в барьерных тканях, которые подвергаются постоянной антигенной нагрузке. Эпителиальные клетки экспрессируют рецепторы, взаимодействие которых с микроорганизмами приводит к активации и продукции противомикробных пептидов, синтезу цитокинов, усилению экспрессии на эпителиоцитах корецепторов для клеток иммунной системы. М-клетки эпителиального слоя контролируют перенос через барьер чужеродного материала. Такой контролируемый “трафик” необходим для сигнализации иммунной системе о дисбалансе микробиоты. В подэпителиальной рыхлой соединительной ткани *lamina propria* (собственная пластинка)

диффузно расположены клетки врожденного иммунитета, под эпителием в *lamina propria* – “изолированные лимфоидные фолликулы” с Т-, В-клеточными зонами и герминативным центром, где присутствуют  $\alpha\beta$ TCR CD4<sup>+</sup> Т-хелперы (Th1, Th2, Th17) и продуцирующие ИЛ-10 Т-регуляторные клетки, а также В-лимфоциты. Доставляемый М-клетками в фолликулы антигенный материал запускает адаптивный (специфический) иммунный ответ с участием региональных лимфатических образований (аппендикс, миндалины, пейеровы бляшки и др.), а далее локальный иммунный ответ переходит на системный уровень [32].

Эволюция организма-хозяина проходила совместно с бактериями-комменсалами кишечника с целью реализации симбиотических отношений посредством медиаторного синтеза и реагирования на некоторые общие медиаторы. Результатом совместной эволюции явилось расширение функций микробиоты: добавилось или расширилось ее участие в метаболизме нерасщепляемых углеводов, обеспечении хозяина энергоносителями (аденозинтрифосфат), жирными и желчными кислотами, синтезе витаминов, конкуренции с патогенными микроорганизмами, предотвращении колонизации ими кишечного тракта хозяина и стимуляции его мукозального иммунитета. Кишечник стал местом синтеза веществ, способных влиять на секрецию гормонов, работу нервной и иммунной систем посредством синтеза нейромедиаторов, метаболитов и жирных кислот.

Для объяснения влияния микробиоты кишечника на физиологию хозяина были предложены три механизма [33]:

- секреция нейромедиаторов, нейропептидов и метаболитов, которые могут непосредственно стимулировать рецепторы в нейронах кишечной нервной системы (тем самым модулируя физиологию кишечника) или мигрировать через блуждающий нерв в центральную нервную систему;
- возможность метаболитов и гормонов, производимых микробиотой в кишечном тракте, диффундировать через стенку кишечника в портальную систему и оказывать влияние дистанционно;
- стимуляция медиаторами кишечной микробиоты рецепторов, экспрессированных на мембране клеток иммунной системы, – таким образом, микробиота участвует в регуляции

иммунного ответа как на локальном, так и на системном уровнях.

Ранее с использованием метода газовой хроматографии, совмещенного с масс-спектрометрией, нами было показано, что у пациентов с развернутой стадией БП в пристеночном слое кишечника отмечается увеличение общего количества микробных маркеров на 43% по сравнению с группой контроля [34]. Увеличение происходило за счет двукратного повышения количества маркеров условно-патогенной микрофлоры, что сопровождалось снижением вдвое количества микробных маркеров полезной микрофлоры.

В случае развития клинически значимых запоров у пациентов с БП количество бактерий в кишечнике увеличивается, приводя к развитию синдрома избыточного бактериального роста (СИБР). Показано, что СИБР коррелирует с тяжестью двигательных расстройств, нарушениями ходьбы, застываниями и выраженностью моторных флуктуаций [35]. Полученные корреляции в первую очередь объясняются снижением биодоступности (поступления из кишечника в кровь) противопаркинсонических препаратов на фоне СИБР [36]. Данная теория подтверждается результатами исследований, проведенных V. Maini Rekdal et al. [37]. Авторами было продемонстрировано, что микроорганизм *Enterococcus faecalis* способен декарбоксилировать леводопу до дофамина и далее дегидроксилировать дофамин до тирамина бактерией *Eggerthella lenta*.

Целью настоящего исследования являлось изучение отдельных субпопуляций лимфоцитов, неклассических  $\gamma\delta$ -лимфоцитов и продукции цитокинов у пациентов с III стадией БП, испытывающих моторные флуктуации.

В исследование было включено 20 пациентов (11 мужчин, 9 женщин; средний возраст  $69 \pm 4,5$  года) с БП, получающих комбинированную (препараты леводопы + агонисты дофаминовых рецепторов) дофаминергическую терапию; средняя эквивалентная доза леводопы составила  $730,4 \pm 150,6$  мг/сут. С учетом предполагаемой роли хронического запора в поддержании дисбиотических состояний и хронического воспаления при БП, наличие запоров являлось критерием включения пациента в исследование.

Критерии включения:

- III стадия БП по шкале Хен–Яра;
- наличие моторных флуктуаций;
- наличие симптомов хронического запора.

Наличие моторных флуктуаций определяли с помощью краткого опросника для выявления феномена истощения действия дозы леводопы (9-item Wearing-Off Questionnaire) [38]. Верификация хронического запора у пациентов с БП проводилась согласно клиническому рекомендациям Российской гастроэнтерологической ассоциации по диагностике и лечению взрослых пациентов с хроническим запором [39].

Группу контроля составили 20 пациентов (8 мужчин, 12 женщин; средний возраст  $67 \pm 2,5$  года) с хроническими цереброваскулярными заболеваниями (дисциркуляторная энцефалопатия I и II стадий).

Критерии невключения:

- верифицированные заболевания крови, желудочно-кишечного тракта, эндокринных органов;
- показатель по Монреальской шкале оценки когнитивных функций (Montreal Cognitive Assessment) менее 26 баллов.

Всем пациентам проведена оценка субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови, а также определение уровня цитокинов. Для визуализации субпопуляций лимфоцитов использовали моноклональные антитела: HLADR-FITC, CD4-PE, CD3-ECD, CD56-PC5.5, CD25-PC7, CD8-APC, CD19-APC-AF700, CD45-APC-AF750. Пробы анализировали на проточном цитофлюориметре Navios в многоцветном протоколе (Beckman Coulter), популяцию лимфоцитов оценивали как CD45+brightSSdim-клетки. Определение субпопуляций В-лимфоцитов проводили с использованием моноклональных антител CD19-FITC, CD27-PE, CD5-PC5. Пробы анализировали на проточном цитофлюориметре Cytomics FC 500 в многоцветном протоколе (Beckman Coulter), популяцию лимфоцитов оценивали как FSdimSSdim-клетки. При определении субпопуляций  $\gamma\delta$ -лимфоцитов использовали моноклональные антитела CD4-FITC, CD8-PE, CD3-ECD, TCR $\gamma\delta$ -PC5, CD8-APC, CD45-APC-AF750. Пробы анализировали на проточном цитофлюориметре Navios в многоцветном протоколе, популяцию лимфоцитов оценивали как CD45+brightSSdim-клетки. Уровни цитокинов ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ФНО, ИЛ-10 в культуральных средах (спонтанная, индуцированная продукция) и в сыворотке определяли с использованием наборов реагентов для иммуноферментного анализа (ВЕКТОР-БЕСТ, Россия).

Статистическую обработку проводили в программе Statistica 8.0. Для выявления различий применяли непараметрический критерий Манна–Уитни, для выявления зависимости — коэффициент корреляции Спирмена. Результаты анализа считали значимыми при  $p < 0,05$ . Данные представлены в виде Ме [Q1; Q3] (медиана [1-й квартиль; 3-й квартиль]).

При исследовании лимфоцитов периферической крови было установлено, что количественные характеристики популяций лимфоцитов у пациентов с БП и у лиц группы сравнения не выходили за границы референсного интервала. Однако общее количество зрелых Т-лимфоцитов CD3<sup>+</sup> (табл. 1) в группе пациентов с БП было значимо ниже (медиана 74% (57,3–83,5)), чем в группе сравнения (медиана 80% (73,0–86,0);  $p = 0,014$ ). По количеству Т-хелперов CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, Т-цитотоксических лимфоцитов CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> группы были сопоставимы. Количество ТНК-клеток CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> в группе пациентов с БП было достоверно ниже (медиана 4,7% (1,3–7,7)), чем в группе сравнения (медиана 7,8% (0,8–24);  $p = 0,036$ ). При этом в группе пациентов с БП количество НК-клеток CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> было значимо выше (медиана 16,4% (9–34)), чем в группе сравнения (медиана 8,7% (5–15);  $p = 0,001$ ). Кроме того, в основной группе было выявлено значимое повышение количества активированных НК-клеток CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (медиана 7% (4,5–13,5)), в группе сравнения этот показатель составил 3,5% (0,86–4,9;  $p < 0,001$ ). Общее количество В-лимфоцитов, количество В1-лимфоцитов было сопоставимо в обеих группах, однако у пациентов с БП значимо снижено количество В-клеток памяти CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>.

При оценке субпопуляций  $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов получены следующие результаты (табл. 2): количество Т-хелперов CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> TCR $\gamma\delta$  было достоверно меньше в группе пациентов с БП (медиана 13,6% (6,2–7,0)), чем в группе сравнения (медиана 29,8% (4–52,1);  $p = 0,016$ ). По остальным субпопуляциям Т-лимфоцитов значимых различий между группами не выявлено.

При исследовании уровней цитокинов в группе пациентов с БП (табл. 3) было выявлено значимое повышение индуцированной продукции ИЛ-1 $\beta$ , а также высокая спонтанная продукция ИЛ-10, которая в исследованной группе составила 227,5 пг/мл при норме 0–23 пг/мл. Уровень медианы индуцированной продукции ИЛ-10 в

**Таблица 1.** Результаты иммунофенотипирования лимфоцитов периферической крови (в % (Ме [Q1; Q3]))

Показатель	Норма	БП	Группа сравнения	Критерий Манна–Уитни
CD3 <sup>+</sup>	52–76	74,0 [60,0; 77,0]	80,0 [75,0; 82,0]	0,014
CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	0,1–8	4,7 [2,7; 5,2]	7,8 [3,4; 14,2]	0,038
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	31–46	45,0 [39,0; 53,6]	49,2 [43,0; 60,0]	0,274
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	23–40	24,3 [20,0; 32,0]	26,4 [20,0; 32,0]	0,722
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	0,1–1,1	1,5 [0,7; 3,7]	1,0 [0,6; 1,5]	0,285
CD3 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	1,5–6	7,0 [5,4; 9,1]	3,5 [2,3; 4,1]	0,001
CD3 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup>	9–19	16,4 [13,2; 21,6]	8,7 [7,0; 13,0]	0,001
CD3 <sup>+</sup> TCR $\gamma\delta$	2–7	1,8 [1,2; 3,5]	1,4 [1,1; 3,1]	0,602
CD19 <sup>+</sup>	6–18	7,5 [5,0; 11,0]	13,0 [10,0; 16,0]	0,194
CD19 <sup>+</sup> CD5 <sup>+</sup>	0–3,5	1,4 [0,5; 1,9]	2,5 [1,7; 3,3]	0,451
CD19 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup>	2–7	2,0 [1,7; 2,6]	4,7 [3,1; 6,3]	0,031

исследуемой группе не выходил за границы референсных значений, однако следует отметить сильный разброс полученных результатов (Q1 – 94 пг/мл, Q3 – 447 пг/мл), что требует отдельного анализа и, возможно, определяет гетерогенность течения БП.

Проведенный корреляционный анализ субпопуляции Т-хелперов CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> TCR $\gamma\delta$  и цитокинов в группе пациентов с БП (табл. 4) продемонстрировал наличие достоверной ( $p = 0,048$ ) обратной связи этой субпопуляции Т-хелперов с индуцированной продукцией ИЛ-10 ( $r = -0,745$ ) и достоверной ( $p = 0,042$ ) прямой связи с содержанием провоспалительного цитокина ИЛ-1 $\beta$  ( $r = 0,648$ ). Кроме того, была выявлена тенденция к повышению спонтанной продукции ИЛ-10 ( $r = -0,602$ ;  $p = 0,0506$ ) при снижении числа Т-хелперов CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> TCR $\gamma\delta$ .

Среди работ отечественных авторов, посвященных изучению субпопуляционного состава лимфоцитов и клеток врожденного иммунитета у пациентов с БП, представляют интерес данные, изложенные в статье Е.В. Бочарова и соавт. [40].

**Таблица 2.** Результаты иммунофенотипирования  $\gamma\delta$ T-лимфоцитов (в % (Ме [Q1; Q3]))

Показатель	БП	Группа сравнения	Критерий Манна–Уитни
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	25,1 [22,2; 35,5]	19,1 [18,0; 27,3]	0,250
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	17,6 [10,3; 32,1]	43,4 [21,9; 50,8]	0,052
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	13,6 [8,4; 19,5]	29,8 [17,0; 37,7]	0,016
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup>	2,9 [1,5; 7,5]	4,2 [1,5; 10,9]	0,660
CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup>	57,4 [52,8; 67,6]	47,9 [37,2; 58,7]	0,163
CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup>	23,6 [13,5; 40,0]	22,5 [9,8; 39,5]	0,827
CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	15,6 [9,0; 20,9]	20,2 [13,6; 33,8]	0,155
CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>-</sup>	78,7 [64,6; 84,3]	78,0 [64,7; 83,0]	0,743

**Таблица 3.** Результаты оценки уровней цитокинов у пациентов с болезнью Паркинсона (в пг/мл (Ме [Q1; Q3]))

Показатель	Норма	Результаты
ИЛ-1 $\beta$ sp	0–107	2,3 [1; 8]
ИЛ-1 $\beta$ ind	50–1200	1796,0 [491; 3181]
ИЛ-1 $\beta$ s	0–11	1,5 [1; 4]
ИЛ-6 sp	30–280	1,0 [1; 1]
ИЛ-6 ind	11 450–42 200	11 249,5 [8951; 14 041]
ИЛ-6 s	0–10	1,0 [1; 1]
ФНО sp	7–30	1,0 [1; 4]
ФНО ind	2810–5700	2532,5 [931; 10 199]
ФНО s	0–6	8,5 [1; 56]
ИЛ-10 sp	0–23	227,5 [13; 482]
ИЛ-10 ind	66–335	241,0 [94; 447]
ИЛ-10 s	0–31	2 [1; 5]

Обозначения: s – содержание в сыворотке. Здесь и в табл. 4: ind – индуцированная продукция, sp – спонтанная продукция.

**Таблица 4.** Результаты корреляционного анализа субпопуляции Т-хелперов CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> TCR $\gamma\delta$  и ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-10 ind, ИЛ-10 sp

Показатель	Субпопуляция Т-хелперов CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> TCR $\gamma\delta$	
	r	p
ИЛ-1 $\beta$	0,648	0,042
ИЛ-10 ind	-0,745	0,048
ИЛ-10 sp	-0,602	0,0506

Ими были выявлены следующие изменения: снижение общего числа Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>), преимущественно за счет Т-хелперов (CD4<sup>+</sup>), иммунорегуляторного индекса CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, а также снижение количества В-лимфоцитов (CD20<sup>+</sup>) и лимфоцитов, экспрессирующих HLA-DR (антигены HLA II), что сочеталось с увеличением количества лимфоцитов с экспрессией рецептора к ИЛ-2 (CD25<sup>+</sup>) и количества клеток, несущих на мембране CD95<sup>+</sup> – маркер готовности к апоптозу. Врожденный иммунитет характеризовался увеличением количества макрофагов (CD11b<sup>+</sup> и CD18<sup>+</sup>) и натуральных киллеров (NK16<sup>+</sup>). Общими изменениями в субпопуляционном составе лимфоцитов крови, выявленными в исследовании цитируемых авторов и в нашей работе, являются: снижение количества Т-лимфоцитов у пациентов с БП; увеличение в крови количества NK-клеток CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>; признаки активности иммунного ответа (увеличение количества лимфоцитов, экспрессирующих маркер ранней активации в CD25<sup>+</sup>, а в нашей работе – увеличение количества активированных NK-клеток, значимое повышение индуцированной продукции провоспалительного цитокина ИЛ-1 $\beta$ ).

Компоненты мембраны и внутреннего содержания клеток комменсалов и патогенов распознаются TLR эпителия кишечника и клетками врожденного иммунитета [41], а микробиота непрерывно подает сигналы мукозоассоциированной лимфоидной ткани и поддерживает барьерный иммунитет в состоянии “хронической” активации. Однако микробиота обладает и иммуносупрессивными/толерогенными свойствами. *Bacteroides fragilis* при взаимодействии с TLR2 на клетках врожденного иммунитета может блокировать их провоспалительную активность [32]. Микробиота может активировать комменсалспецифические Т-регуляторные клетки, что приводит к продукции ими противовоспалительного цитокина ИЛ-10 [42]. Таким образом, эти процессы обусловлены взаимодействием микробиоты, барьерного эпителия и клеток врожденного и адаптивного иммунитета в сайте воспаления.

В работе С. Zhou et al. продемонстрировано снижение в крови пациентов с тяжелым течением БП количества TNF и  $\gamma\delta$ T-лимфоцитов в сравнении с этими показателями у здоровых лиц [43]. В нашем исследовании количество

CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> TCR $\gamma\delta$  в периферической крови было достоверно меньше в группе пациентов с БП и сочеталось с aberrантной спонтанной продукцией ИЛ-10. Спонтанная продукция цитокинов  $\gamma\delta$ Т-лимфоцитами участвует в поддержании баланса между воспалением и толерантностью [14]. Известно, что основными продуцентами ИЛ-10 являются Т-регуляторные клетки, TCR которых представлены  $\alpha\beta$ - или  $\gamma\delta$ -цепями, а также В-регуляторные клетки. Вероятно, выраженная спонтанная продукция ИЛ-10 у пациентов с БП связана в том числе с повышенной активностью CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> TCR $\gamma\delta$ -клеток, а именно с регуляторной субпопуляцией.

В некоторых работах показано, что количество Т-лимфоцитов меняется в процессе прогрессирования нейродегенерации при БП. Промонстрирована взаимосвязь уровня так называемых  $\alpha$ -синуклеинреактивных Т-лимфоцитов со стадией заболевания, возрастом пациента и дозой леводопы [44].  $\alpha$ -синуклеинреактивные Т-лимфоциты появляются на премоторной стадии БП, достигают максимума на этапе развития моторных симптомов и значительно снижаются на развернутых стадиях. Нельзя исключать, что уровень  $\gamma\delta$ Т-клеток также меняется в процессе прогрессирования БП; принимая во внимание роль данных клеток в антибактериальной защите, можно предположить, что эти изменения могут быть связаны и с составом микробиоты.

Таким образом, полученные нами данные позволяют по-новому оценить вклад  $\gamma\delta$ Т-клеток в патогенез БП, указывают на их роль в прогрессировании заболевания, а также на взаимосвязь с изменениями (качественными и количественными) кишечной микробиоты при этой патологии.

### Список литературы

1. Литвиненко И.В. и др. Современная концепция патогенеза нейродегенеративных заболеваний и стратегия терапии. Журн. неврол. и психиатр. им. С.С. Корсакова. 2017;117(6-2):3-10.
2. Członkowska A et al. Immune processes in the pathogenesis of Parkinson's disease – a potential role for microglia and nitric oxide. Med. Sci. Monit. 2002;8(8):RA165-77.
3. Whitton PS. Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. Br. J. Pharmacol. 2007;150(8):963-76.
4. Chen Z et al. The role of T cells in the pathogenesis of Parkinson's disease. Prog. Neurobiol. 2018;169:1-23.
5. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2010. 752 с.
6. Janeway CA et al. Immunobiology. The immune system in health and disease. 5th ed. New York, NY: Garland Science; 2001. 884 p.

7. Нижегородова Д.Б., Зафранская М.М.  $\gamma\delta$ Т-лимфоциты: общая характеристика, субпопуляционный состав, биологическая роль и функциональные особенности. Мед. иммунол. 2009;11(2-3):115-30.
8. Hedges JF, Jutila MA. Harnessing  $\gamma\delta$  T cells as natural immune modulators. Mucosal Vaccines. 2020;20:773-87.
9. Saito H et al. Complete primary structure of a heterodimeric T-cell receptor deduced from cDNA sequences. Nature. 1984;309(5971):757-762.
10. Chien YH et al. A new T-cell receptor gene located within the alpha locus and expressed early in T-cell differentiation. Nature. 1987;327(6124):677-82.
11. Groh V et al. Human lymphocytes bearing T cell receptor gamma/delta are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. J. Exp. Med. 1989;169(4):1277-94.
12. Parker CM et al. Evidence for extrathymic changes in the T cell receptor gamma/delta repertoire. J. Exp. Med. 1990;171(5):1597-612.
13. McCarthy NE et al. Azathioprine therapy selectively ablates human V $\delta$ 2<sup>+</sup> T cells in Crohn's disease. J. Clin. Invest. 2015;125(8):3215-25.
14. Paul S et al. Phenotypic and functional plasticity of gamma-delta ( $\gamma\delta$ ) T cells in inflammation and tolerance. Int. Rev. Immunol. 2014;33(6):537-58.
15. Harly C et al. Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human  $\gamma\delta$  T-cell subset. Blood. 2012;120(11):2269-79.
16. Moore KW et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. Annu. Rev. Immunol. 2001;19:683-765.
17. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. Nat. Rev. Immunol. 2010;10(3):170-81.
18. Gutierrez J et al. Introduction to neuropathic pain syndromes. Neurosurg. Clin. N. Am. 2014;25(4):639-62.
19. Tarazi FI et al. Emerging therapies for Parkinson's disease: from bench to bedside. Pharmacol. Ther. 2014;144(2):123-33.
20. Naundorf S et al. IL-10 interferes directly with TCR-induced IFN-gamma but not IL-17 production in memory T cells. Eur. J. Immunol. 2009;39(4):1066-77.
21. Sabat R et al. Biology of interleukin-10. Cytokine Growth Factor Rev. 2010;21(5):331-44.
22. Moore TA et al. Gamma delta-T cells are critical for survival and early proinflammatory cytokine gene expression during murine *Klebsiella pneumoniae*. J. Immunol. 2000;165(5):2643-50.
23. Toth B et al. The role of gammadelta T cells in the regulation of neutrophil-mediated tissue damage after thermal injury. J. Leukoc. Biol. 2004;76(3):545-52.
24. Koohsari H et al. The role of gamma delta T cells in airway epithelial injury and bronchial responsiveness after chlorine gas exposure in mice. Respir. Res. 2007;8(1):21.
25. Balbi B et al. T-lymphocytes with gamma delta + V delta 2+ antigen receptors are present in increased proportions in a fraction of patients with tuberculosis or with sarcoidosis. Am. Rev. Respir. Dis. 1993;148(6 Pt 1):1685-90.
26. Bertotto A et al. Lymphocytes bearing the gamma delta T cell receptor in acute *Brucella melitensis* infection. Eur. J. Immunol. 1993;23(5):1177-80.
27. Caldwell CW et al. Apoptosis of gamma/delta T cells in human ehrlichiosis. Am. J. Clin. Pathol. 1996;105(5):640-6.
28. Chien YH et al.  $\gamma\delta$  T cells: first line of defense and beyond. Annu. Rev. Immunol. 2014;32:121-55.
29. Stark MA et al. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. Immunity. 2005;22(3):285-94.



30. Wucherpfennig KW et al. Gamma delta T-cell receptor repertoire in acute multiple sclerosis lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992;89(10):4588-92.
31. Fiszer U et al. Gamma delta+ T cells are increased in patients with Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* 1994;121(1):39-45.
32. Козлов И.Г. Микробиота, мукозальный иммунитет и антибиотики: тонкости взаимодействия. *Рус. мед. журн.* 2018;8(1):19-27.
33. Campos-Acuña J et al. T-cell-driven inflammation as a mediator of the gut-brain axis involved in Parkinson's disease. *Front. Immunol.* 2019;10:239.
34. Красаков И.В. и др. Оценка микробиоты кишечника у пациентов с болезнью Паркинсона с помощью метода газовой хромато-масс-спектрометрии. *Анн. клин. эксперимент. неврол.* 2018;12(4):23-9.
35. Fasano A et al. The role of small intestinal bacterial overgrowth in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 2013;28(9):1241-9.
36. Fasano A et al. Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. *Lancet. Neurol.* 2015;14(6):625-39.
37. Maini Rekdal V et al. Discovery and inhibition of an inter-species gut bacterial pathway for levodopa metabolism. *Science.* 2019;364(6445):eaau6323.
38. Stacy M et al. Identification of motor and nonmotor wearing-off in Parkinson's disease: comparison of a patient questionnaire versus a clinician assessment. *Mov. Disord.* 2005;20(6):726-33.
39. Ивашкин В.Т. и др. Клинические рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации по диагностике и лечению взрослых пациентов с хроническим запором. *Рос. журн. гастроэнтерол. гепатол. колопроктол.* 2017;27(3):75-83.
40. Бочаров Е.В. и др. Нарушение иммунной и антиоксидантной защиты при болезни Паркинсона. *Патогенез.* 2012;10(1):34-8.
41. Bouskra D et al. Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. *Nature.* 2008;456(7221):507-10.
42. Ubeda C, Pamer EG. Antibiotics, microbiota, and immune defense. *Trends Immunol.* 2012;33(9):459-66.
43. Zhou C et al. Reduction of peripheral blood iNKT and  $\gamma\delta$ T cells in patients with Parkinson's disease: an observational study. *Front. Immunol.* 2020;11:1329.
44. Lindestam Arlehamn CS et al.  $\alpha$ -synuclein-specific T cell reactivity is associated with preclinical and early Parkinson's disease. *Nat. Commun.* 2020;11(1):1875.