

ОСОБЕННОСТИ ДИНАМИКИ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ И ЭКСПРЕССИРУЕМЫХ ЦИТОКИНОВ ПРИ ИНДУКЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЛЕРГИЧЕСКОГО ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТА

Житнухин Ю.Л., Абдурасулова И.Н., Тарасова Е.А.,
Соколов Д.И., Новикова Т.А.

Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург

Резюме. Экспериментальный аллергический энцефаломиелит (ЭАЭ) — воспалительное демиелинизирующее заболевание ЦНС, общепринятая экспериментальная модель рассеянного склероза. Цель настоящей работы заключалась в изучении продукции про- и противовоспалительных цитокинов и их экспрессии в спинном мозге крыс, инокулированных энцефалитогенной смесью, в сопоставлении с развитием ЭАЭ. Гистологические проявления ЭАЭ характеризовались менингеальной, периваскулярной и перивентрикулярной инфильтрацией в стволе, мозжечке и спинном мозге. Очаги демиелинизации были связаны с воспалительными очагами и располагались по краю инфильтратов. У сенсibilизированных животных отмечено повышение уровня сывороточного TNF α , который был более высоким у заболевших животных в сравнении со здоровыми как в латентный период, так и в стадии неврологических расстройств. Увеличение количества циркулирующего IL-10 совпало с началом ЭАЭ, а также наблюдалось у выздоравливающих животных. Раннее возрастание уровня IL-10 предопределяло легкое течение болезни, сопровождавшееся снижением активности TNF α , тогда как низкий уровень IL-10 зарегистрирован в это же время у тяжело больных крыс с высоким уровнем TNF α и последующим летальным исходом. мРНК TNF α была обнаружена в острой стадии ЭАЭ, IL-10 — в период выздоровления. Экспрессия TNF α наблюдалась в течение длительного времени в случаях затяжного течения заболевания и отсутствовала у крыс без клинических признаков ЭАЭ. Полученные результаты указывают на то, что высокий уровень TNF α в сыворотке крови в латентный и особенно в постлатентный период способствуют возникновению повреждений в ЦНС. Центральный пул цитокинов вовлечен в развитие неврологических расстройств, влияя таким образом на продолжительность и тяжесть заболевания.

Ключевые слова: ЭАЭ, цитокины, экспрессия мРНК, демиелинизация, крысы.

Адрес для переписки:

Житнухин Юрий Леонидович
Отдел иммунологии
НИИ экспериментальной медицины РАМН,
197376, Санкт-Петербург,
ул. Академика Павлова, 12.
Тел.: (812) 234-16-69.
Факс: (812) 234-94-89.
E-mail: marivita@inbox.ru

Zhitnukhin Yu.L., Abdurasulova I.N., Tarasova E.A.,
Sokolov D.I., Novikova T.A.

**DYNAMICS OF CIRCULATING AND EXPRESSED
CYTOKINES UPON INDUCTION OF EXPERIMENTAL
ALLERGIC ENCEPHALOMYELITIS**

Abstract. Experimental allergic encephalomyelitis (EAE) represents an inflammatory demyelinating CNS disease, thus being regarded as an experimental model of multiple sclerosis. The aim of present work was to study production of pro- and anti-inflammatory

cytokines, and their expression in spinal cord of rats challenged with encephalitis-inducing mixture, in the course of EAE progression. Pathological features of EAE were characterized by meningeal, perivascular, and periventricular infiltration of brain stem, cerebellum and spinal cord. The areas of demyelination were associated with inflammatory foci, being located at the edges of infiltrates. In sensitized animals, increased levels of serum TNF α were detectable, being higher in diseased animals, as compared with healthy ones, both in latent phase and during advanced neurological disorder. Increase in circulating IL-10 was in parallel with initial phase of EAE, being also observed in recovering animals. Early increase of IL-10 levels predetermined mild course of the disease, accompanied by decrease in TNF α activity, whereas low IL-10 levels were registered in severely ill rats with high TNF α , followed by lethal outcome. TNF α -specific mRNA was revealed in acute phase of EAE, IL-10 mRNA was detectable at the time of recovery. TNF α expression was observed for a long time in cases of protracted disease, being, however, absent in EAE-free rats. The data demonstrate that higher levels of TNF α in blood serum during latent period, and, especially, at later time, may promote development of damage in central nervous system. The central cytokine pool is involved into progression of neurological disorders, thus influencing duration and severity of the disease. (*Med. Immunol.*, 2008, vol. 10, N 2-3, pp 193-202)

Введение

Аутоиммунные воспалительные демиелинизирующие заболевания ЦНС, такие как рассеянный склероз (РС) и его модель на животных – экспериментальный аллергический энцефаломиелит (ЭАЭ), имеют общие гистопатологические и иммунологические особенности. Повышенная продукция фактора некроза опухолей-альфа (TNF α) вовлечена в патогенез аутоиммунных расстройств и воспалительных тканевых повреждений [32]. Исследования *in vitro* и *in vivo* свидетельствуют о том, что TNF α является сильным иммунным медиатором, способствующим усилению воспалительной инфильтрации [28] и участвующим в образовании и увеличении демиелинизирующих бляшек [42]. Участие TNF α в патогенезе ЭАЭ подтверждается возможностью усиления тяжести заболевания при введении экзогенного TNF α [17, 28], тогда как введение анти-TNF α антител [37, 41] или ингибитора продукции TNF α – пентоксифиллина [4] – тормозило развитие ЭАЭ.

Повышение продукции TNF α в супернатантах ЛПС-стимулированных моноцитов периферической крови наиболее отчетливо выявлялось у больных с активным течением РС, причем не только при сравнении с контрольной группой, но и с показателями больных со стабильным течением РС [2]. Участие TNF α в иммунорегуляции показано также при хронически прогрессирующих формах рассеянного склероза [3].

Для индукции иммунопатологического процесса в ЦНС исключительно важно то, что TNF α усиливает экспрессию молекул адгезии и антигенпредставления на эндотелии сосудов и повышает проницаемость гематоэнцефалического барьера [15]. Патогенетическая роль TNF α в развитии демиелинизирующих заболеваний отмечена многими исследователями [17, 24, 29]. Показано, что TNF α не только инициирует развитие воспалительных реакций и демиелинизирующего процесса в ЦНС, но и обладает цитотоксическим действием на олигодендроциты [40]. При патологических процессах в ЦНС цитокины продуцируются непосредственно в нервной си-

стеме клетками микроглии, астроцитами, клетками эндотелия сосудов [22] и могут иметь иную функцию, чем в иммунной системе: в частности, TNF α может оказывать нейропротективное действие, способствуя выживанию культивируемых нейронов [26].

Противовоспалительные цитокины, в частности интерлейкин-10 (IL-10), рассматриваются как естественные регуляторы продукции провоспалительных цитокинов. IL-10 подавляет экспрессию провоспалительных цитокинов [6], ингибирует аутоиммунные процессы в ЦНС [18]. Ряд авторов связывает резистентность к ЭАЭ, более легкое течение заболевания или спонтанное выздоровление с действием эндогенного IL-10 [20, 23]. Показано, что введение экзогенного IL-10 препятствует развитию или смягчает ЭАЭ [36, 45]. Кроме того, мыши с повышенной продукцией IL-10 полностью резистентны к индукции ЭАЭ [13], тогда как мыши с нокаутом гена IL-10 болеют ЭАЭ значительно тяжелее, чем мыши с нормальной продукцией IL-10 [39]. Все это указывает на защитную роль IL-10 в развитии ЭАЭ.

Вместе с тем, продукция IL-10 на разных этапах развития ЭАЭ изучена недостаточно. Данные о паттерне экспрессии про- и противовоспалительных цитокинов в спинном мозге при ЭАЭ неоднозначны. Показано повышение экспрессии провоспалительных цитокинов на пике клинических проявлений ЭАЭ, а противовоспалительных – в период выздоровления [23]. Другие исследователи выявили экспрессию IL-10 на пике заболевания одновременно с провоспалительными цитокинами [25]. Отсутствуют сведения о зависимости выраженности неврологических нарушений от характера экспрессии различных цитокинов в ЦНС.

Поскольку вовлеченность TNF α и IL-10 в патогенез ЭАЭ не вызывает сомнений, представляло интерес сравнительное изучение продукции этих цитокинов с выявлением динамики их уровней в сыворотке крови животных с различной тяжестью заболевания, а также сопоставление

паттерна экспрессируемых цитокинов в ЦНС с выраженностью неврологических нарушений при ЭАЭ.

Материалы и методы

ЭАЭ индуцировали у крыс Wistar и беспородных взрослых морских свинок – самцов массой тела соответственно 150-180 г и 300-350 г однократной подкожной инокуляцией энцефалитогенной смеси, содержащей 100 мг гомогената ткани гомологичного спинного мозга, 0,1 мл изотонического раствора NaCl и 0,15 мл полного адьюванта Фрейнда (содержание сухих, убитых нагреванием туберкулезных микобактерий – 5 мг/мл).

Регистрировали время начала заболевания, его продолжительность и летальность среди животных. Степень выраженности неврологических расстройств оценивали от 1 до 4 баллов: 0 – отсутствие клинических проявлений ЭАЭ, 1 – мышечная слабость, атаксия, парезы хвоста; 2 – стойкие парезы лап; 3 – параличи задних конечностей, у морских свинок – нарушения функций тазовых органов; 4 – тремор, нистагм, гиперкинезы, судороги, гипотермия, агональное состояние. В опытах по изучению экспрессии цитокинов тяжесть заболевания оценивали по наличию у крыс мышечной слабости (0,5 балла), стойких парезов (1 балл) и параличей (1,5 балла). При поражении нескольких конечностей баллы суммировались для расчета клинического индекса (КИ).

В разные сроки после инокуляции у животных брали кровь посредством сердечной пункции (под эфирным наркозом) для исследования сывороток с целью оценки цитотоксического эффекта содержащегося в них TNF α на чувствительную линию мышечных фибробластов L-929 [9]. IL-10 определяли методом иммуноферментного анализа (ELISA) согласно стандартному протоколу, Immunoassay kit IL-10 rat, «Bio-source» (США). Экспрессию мРНК TNF α и IL-10 в спинном мозге крыс определяли методом обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР). Поясничной отдел спинного мозга замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -70°C . Тотальную мРНК выделяли в соответствии со стандартным протоколом [38] с использованием гуанидина тиоционата («Promega», США). Обратную транскрипцию и ПЦР проводили по ранее описанной процедуре [1]. Программа «Primer-Master 1.0» была использована для подбора специфических праймеров по нуклеотидным последовательностям соответствующих мРНК и ДНК крыс, полученным из Европейского молекулярного банка данных. В качестве внутреннего стандарта для оценки прохождения реакции обратной транскрипции использовали мРНК β -актина. Анализ ПЦР-продуктов проводили с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием для визуализации мРНК. Фотографирование гелей производили

цифровым фотоаппаратом «Canon» (Power Shot S30) в проходящем УФ-свете на трансиллюминаторе «Vilber Lourmat» (Франция).

Для выявления патоморфологических изменений в ЦНС животных с неврологическими расстройствами предварительно перфузировали смесью 4% параформальдегида и 1,25% глутаральдегида на PBS (0,1 М фосфатный буфер, 0,9% NaCl, pH 7,4). Материал для исследования, взятый из различных областей головного и спинного мозга, фиксировали дополнительно в той же смеси и выдерживали в 30% растворе сахарозы на PBS в течение 24 часов. Срезы толщиной 30 мкм изготавливали на замораживающем микротоме, окрашивали по Нисслю для выявления очагов воспаления. Для обнаружения демиелинизации ткань ЦНС дофиксировали в 1% растворе OsO $_4$ 2 часа, проводили дегидратацию и заливали в аралдит. Исследовали срезы толщиной 1 мкм, окрашенные толуидиновым синим.

В работе применяли статистические методы: вычисление средних величин, квадратичного отклонения, доверительных интервалов. Достоверность различия между средними величинами и относительными показателями определяли с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты

Неврологические симптомы ЭАЭ появились у заболевших животных через 9 и более дней после инокуляции (д.п.и.) энцефалитогенной смеси (ЭГС). В таблице 1 представлены данные о развитии ЭАЭ, его течении и исходе в трех группах животных – у крыс разного пола и у морских свинок. Как видно, наибольшая заболеваемость и тяжесть ЭАЭ с кратковременным сверхострым течением и высокой летальностью отмечены у морских свинок. Иными были показатели, характеризующие патологический процесс у крыс, при этом отмечались определенные различия между самцами и самками: последние заболевали чаще, с более коротким латентным периодом и относительно более тяжелой симптоматикой – наличием параличей, возрастанием числа крыс с парезами лап. В то же время лишь у $1/4$ части иммунизированных крыс-самцов наблюдались умеренные неврологические нарушения (1-2 балла) в более поздние сроки. В целом можно заключить, что крысы болели значительно реже, чем морские свинки, в более легкой форме и с отсутствием летальных исходов.

В процессе развития ЭАЭ наблюдалось снижение веса тела крыс, причем этот показатель коррелировал с тяжестью заболевания. При введении ПАФ (контрольная группа) у животных отмечалось постепенное увеличение веса тела, которое к 14 суткам (пик заболевания у животных с индуцированным ЭАЭ) в среднем составило 20 г. Снижения веса тела не происходило также в группе крыс без видимых клинических проявлений. Минимальное уменьшение веса ($-5,2$ г)

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ РАЗВИТИЯ ЭАЭ У КРЫС И МОРСКИХ СВИНОК, ИММУНИЗИРОВАННЫХ ЭНЦЕФАЛИТОГЕННОЙ СМЕСЬЮ

Животные		Число животных	Заболели		Латентный период сутки	Число животных с указанными степенями тяжести ЭАЭ				Длительность заболевания сутки	Погибли	
вид	пол		число	%		1	2	3	4		число	%
Крысы	♂	35	9	25,7**	17,0±0,8*	5	4	0	0	6,8±0,5**	0	0
Крысы	♀	35	19	54,3	12,7±0,6	8	8	3	0	8,4±0,4	0	0
Мор. свинки	♀	36	33	94,3*	13,1±0,5	0	1	1	31*	4,1±0,3*	29	83*

Примечание. * – $p < 0,001$ в сравнении с соответствующими показателями в других группах животных; ** – $p < 0,02$ в сравнении с соответствующим показателем у крыс ♀.

на пике заболевания обнаруживалось у легко болеющих животных, потеря свыше 60 г от первоначального веса тела оказывалась критичной, такие животные, как правило, погибали (рис. 1).

Исследование замороженных срезов ткани ЦНС животных с ЭАЭ в световом микроскопе выявило поражения мозжечка, ствола мозга и отделов спинного мозга, которые выражались в появлении периваскулярных инфильтратов и менингеальных воспалений. В мозжечке воспалительный процесс был обнаружен в белом веществе folia, в стволе мозга – в участке, прилегающем к IV желудочку. В спинном мозге наблюдалось воспаление в субпиальной области белого вещества. В других отделах мозга – коре, базальных ядрах, таламусе и гипоталамусе воспаление не выявлено. Очаги демиелинизации (обломки миелина и оголенные аксоны) были связаны с воспалительными очагами и располагались по краю периваскулярных и менингеальных инфильтратов (рис. 2).

У иммунизированных животных было проведено тестирование сывороточного TNF α по его биологической активности *in vitro*. Полученные

данные представлены в таблице 2. Необходимо отметить, что большая часть сывороток от интактных животных, полученных до введения энцефалитогена, обладала цитотоксической активностью разной степени. При сопоставлении показателей активности TNF α в разные сроки после иммунизации выявлены определенные закономерности, зависящие от вида и пола животных. Так, уровни TNF α у крыс-самцов возросли на 7 день с последующим снижением. При этом не было существенных различий в уровнях TNF α между болевыми и неболевыми в середине (7 д.п.и.) и в конце (14 д.п.и.) латентного периода. Исходный уровень TNF α был выше у впоследствии заболевших самок. Показатели содержания TNF α в сыворотках этих животных возросли на 7 и 14 дни после индукции ЭАЭ и упали ниже исходного уровня в период 21–35 дней, в то время как у неболевших самок крыс подъем TNF α отмечен только на 7 день. Содержание TNF α в сыворотках самок с ЭАЭ на 14 день было значительно больше, чем у оставшихся здоровыми ($p < 0,02$). У морских свинок с ЭАЭ при более высокой концентрации TNF α

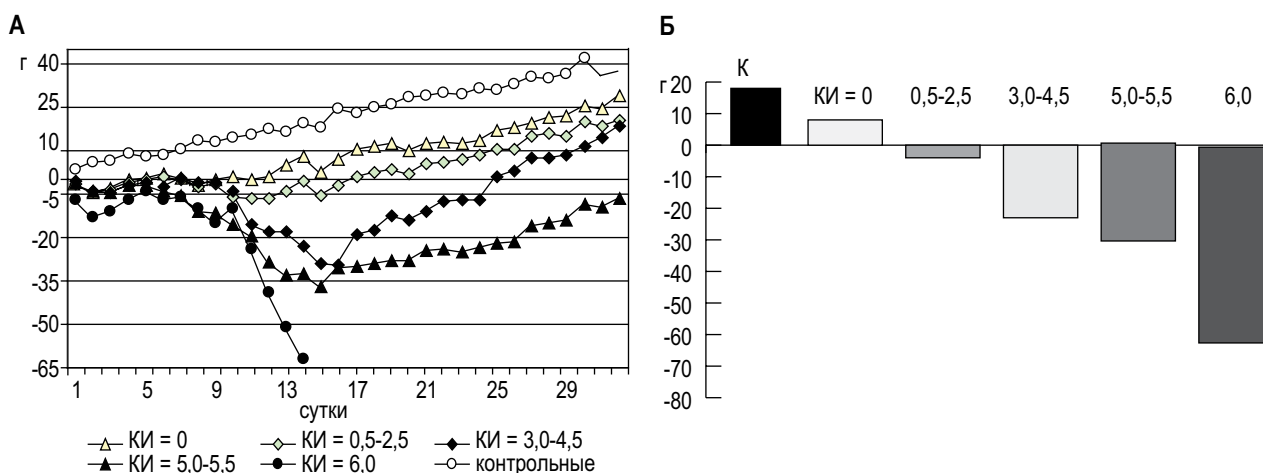


Рисунок 1. Динамика веса тела больных крыс (А) и максимальная потеря веса у крыс с разной тяжестью заболевания (Б)

Примечание: КИ (клинический индекс) – сумма баллов оценки тяжести неврологических нарушений (максимальный – 6).

ТАБЛИЦА 2. УРОВНИ ЦИРКУЛИРУЮЩЕГО TNF α У КРЫС И МОРСКИХ СВИНОК В УСЛОВИЯХ ИНДУКЦИИ ЭАЭ

Животные		ЭАЭ	Содержание TNF α (пг/мл) в разные сроки (дни) после инокуляции ЭГС					
вид	пол		0	7	14	21	28	35
Крысы	♂	+	20,0 \pm 4,1	37,5 \pm 7,1*	24,0 \pm 6,8	17,0 \pm 6,5	19,2 \pm 5,1	21,0 \pm 4,9
		-	23,5 \pm 3,5	34,1 \pm 2,2*	32,2 \pm 7,1	20,6 \pm 4,8	17,2 \pm 2,6	18,7 \pm 8,5
Крысы	♀	+	46,9 \pm 9,2	79,2 \pm 11*	78,3 \pm 10*	28,2 \pm 7,7	28,0 \pm 8,7	21,8 \pm 7,1
		-	36,4 \pm 14	63,1 \pm 12	40,7 \pm 9**	17,3 \pm 4,4	13,6 \pm 3,3	18,7 \pm 3,8
Мор. свинки	♂	+	49,2 \pm 7,6***	58,5 \pm 8,4***	160 \pm 15****	132 \pm 25	127 \pm 42	31,0 \pm 12
		-	45,5 \pm 13	61,5 \pm 28	82,0 \pm 22	61,0 \pm 31	45,5 \pm 26	41,0 \pm 19

Примечание. * – $p < 0,05$ в сравнении с показателем в 0 день; ** – $p < 0,02$ в сравнении с показателем у болевших крыс ♀ на 14 день; *** – $p < 0,001$ в сравнении с 14 днем в той же группе животных; **** – $p < 0,02$ в сравнении с соответствующим показателем у неболевших морских свинок.

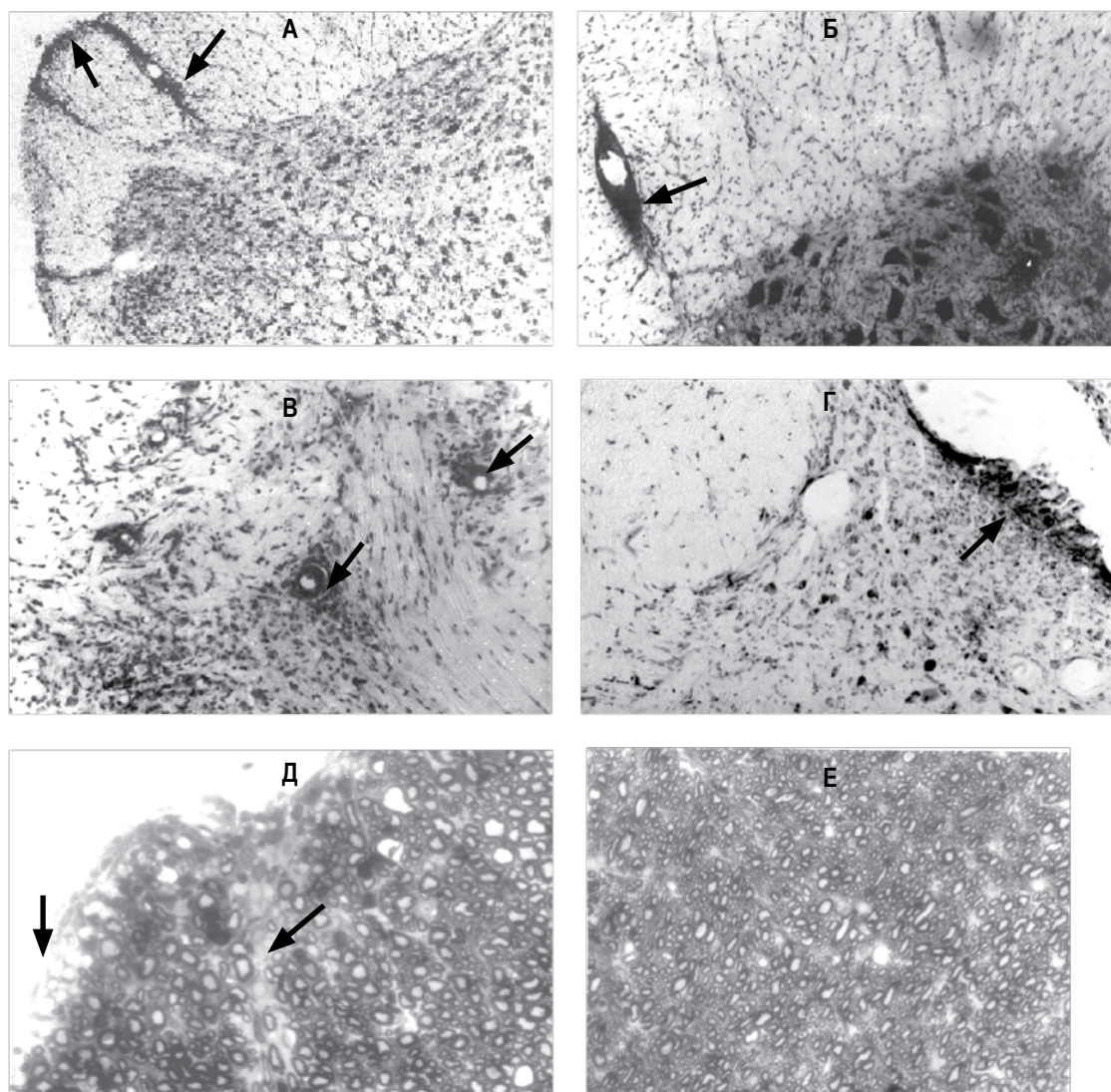


Рисунок 2. Воспалительные инфильтраты и очаги демиелинизации в различных отделах ЦНС

Примечание. А-Г – воспалительные инфильтраты (окраска по Нисслю): А – в поясничном отделе спинного мозга; Б – в шейном отделе спинного мозга; В – в мозжечке; Г – в стволе мозга; Д – очаги демиелинизации в поясничном отделе спинного мозга (окраска толуидиновым синим); Е – нормальное белое вещество спинного мозга. Стрелками отмечены воспалительные инфильтраты и очаги демиелинизации.

до начала опыта обращает на себя внимание резкое увеличение соответствующего показателя на 14 день, что многократно превосходит уровни как 0 дня, так и 7 дня ($p < 0,001$), а также уровень TNF α на 14 день у не болевших животных, причем, показатели TNF α оставались высокими на 21 и 28 дни.

До инокуляции ЭГС самцы и самки крыс не различались существенно по уровню IL-10 в крови: у незаболевших животных и у животных с легкими клиническими проявлениями – 478 ± 30 и 502 ± 21 пг/мл, соответственно, а у крыс с умеренными и тяжелыми расстройствами – 556 ± 10 и 530 ± 12 пг/мл. В процессе развития заболевания, однако, наблюдались различия в изменении уровня циркулирующего IL-10 у тяжело и легко болевших животных. Крысы с незначительной и умеренной выраженностью неврологических нарушений имели двухволновую динамику IL-10 в крови с максимумами на 14 (768 ± 64 пг/мл) и 28 (802 ± 72 пг/мл) сутки после индукции ЭАЭ. Эти сроки соответствовали началу клинических проявлений болезни и фазе выздоровления. Следует отметить, что повышение продукции IL-10 у этих животных наблюдалось уже в индуктивную фазу (7 сутки). У тяжело болевших крыс достоверного увеличения уровня IL-10 в крови не отмечалось ни на одном из исследованных сроков.

Сопоставление уровней IL-10 и TNF α в крови животных при развитии ЭАЭ показало, что эти

цитокины взаимосвязаны и динамика их отличается в группах крыс с разной тяжестью заболевания (рис. 3).

При изучении экспрессии цитокинов в ЦНС были выявлены различные паттерны экспрессии мРНК про- и противовоспалительных цитокинов в зависимости от тяжести заболевания. Так, TNF α и IL-10 не были выявлены в спинном мозге интактных крыс, равно как у инокулированных животных на 7 д.п.и. У животных без видимых неврологических расстройств экспрессия цитокинов не определялась в течение всего периода наблюдения. На пике заболевания (14 д.п.и.) выявлена экспрессия мРНК TNF α у части животных с легкими клиническими симптомами и у всех тяжело болевших крыс. На 33 д.п.и. выявлена экспрессия мРНК IL-10 и наблюдалась закономерность: у животных с экспрессией мРНК IL-10 отсутствовала экспрессия мРНК TNF α (рис. 4).

Обсуждение

Проведенные исследования показали, что используемая нами модель ЭАЭ является адекватной для изучения патогенеза аутоиммунных демиелинизирующих заболеваний. Общность патогенетических механизмов при ЭАЭ и рассеянном склерозе доказывается сходством природы заболевания, клинических симптомов и морфологических изменений в ЦНС, а также ролью цитокинов и других факторов.

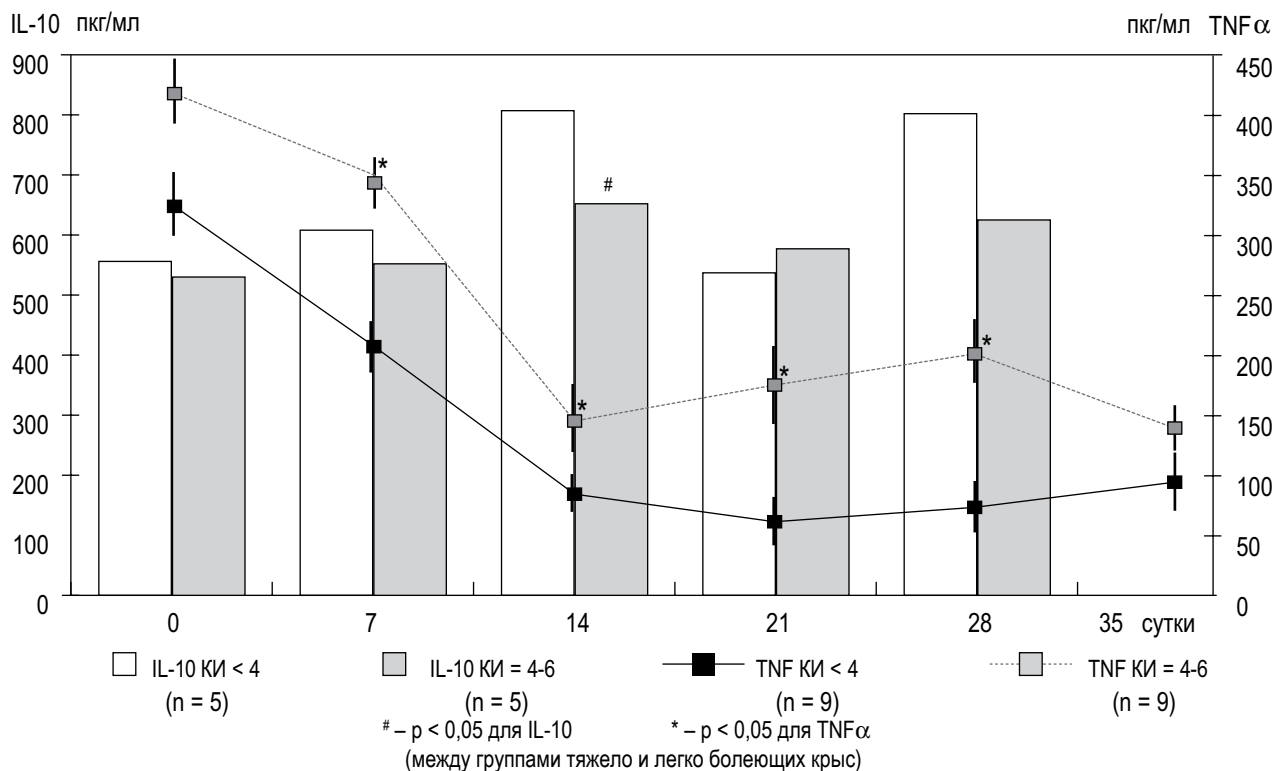


Рисунок 3. Динамика уровня циркулирующих в крови IL-10 и TNF α у крыс с легкими и тяжелыми неврологическими нарушениями при ЭАЭ

Примечания: по оси абсцисс: дни после индукции ЭАЭ; по левой оси ординат: уровень IL-10; по правой оси ординат: уровень TNF α ; столбики – динамика IL-10; кривые – динамика TNF α .

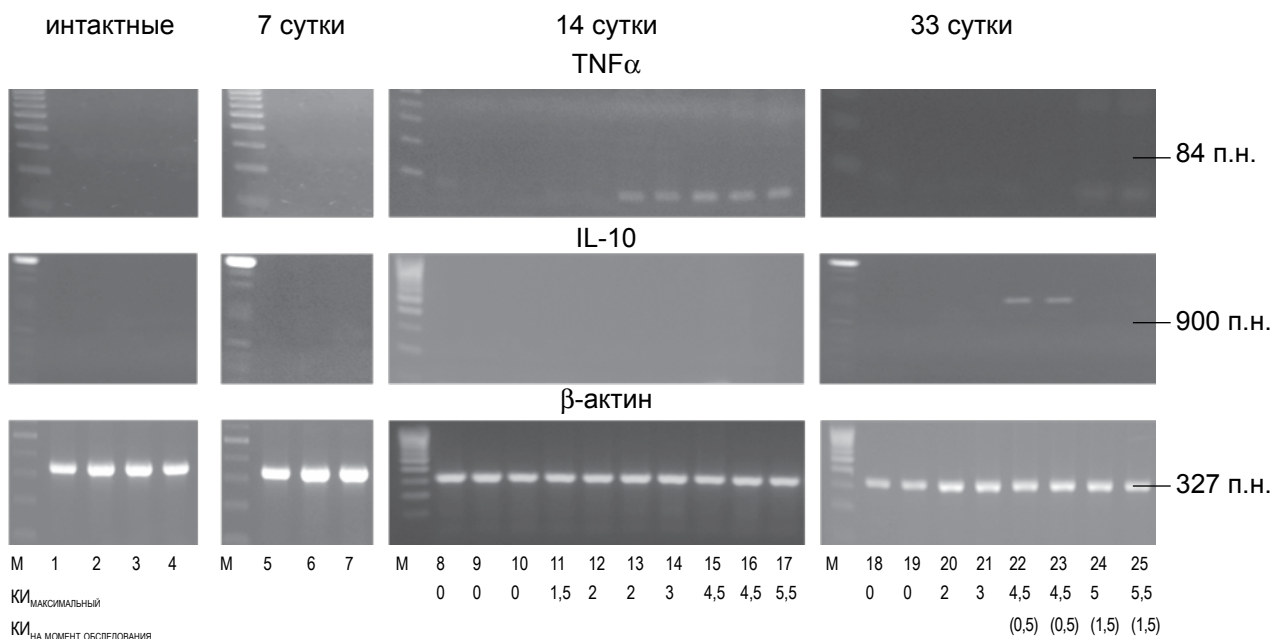


Рисунок 4. Экспрессия мРНК цитокинов в спинном мозге крыс в процессе развития ЭАЭ

Примечания. М – маркер молекулярного веса; п.н. – пар нуклеотидов; 1-4 – интактные животные; 5-7 – животные без симптомов заболевания в индуктивную фазу; 8, 9, 10, 18, 19 – незаболевшие животные (КИ = 0); 11-14 – легко болевшие животные в период пика заболевания (КИ = 1,5-3); 15-17 – тяжело болевшие животные в период пика заболевания (КИ = 4,5-5,5); 20, 21 – легко болевшие животные (КИ = 2-3), выздоровевшие к 33 суткам; 22-25 – тяжело болевшие животные (КИ = 4,5-5,5) с остаточными нарушениями (КИ = 0,5-1,5) на 33 сутки.

Генетическая разнородность крыс Вистар определяет различную тяжесть заболевания животных и подтверждает роль генетических факторов в предрасположенности к аутоиммунным заболеваниям. Об этом же свидетельствуют литературные данные о неодинаковой восприимчивости разных линий крыс и мышей к ЭАЭ: от высоко чувствительных с рецидивирующим течением крыс Dark Agouti, с острым – Lewis, до резистентных – Wrawn Norway [43]. Показано, например, что даже инбредные животные различаются по восприимчивости и/или тяжести заболевания, что может быть связано с полиморфизмом гена TNF α , влияющим на структуру или экспрессию TNF α белка [21]. Эти авторы выявили полиморфизм 42 аллелей различных генов среди 6 линий крыс (ACI, BB, Wrawn Norway, Dark Agouti, F344 и Lewis).

На модели активно индуцированного ЭАЭ показано наличие TNF α в сыворотках интактных морских свинок и крыс до иммунизации и динамика этого цитокина в процессе развития заболевания. Установлено время максимального накопления циркулирующего TNF α и его снижения до исходного уровня у неболевших и перенесших ЭАЭ животных. Максимальная цитотоксическая активность тестированных образцов сывороток совпала по времени с появлением неврологических расстройств у высоко чувствительных к ЭАЭ морских свинок и менее чувствительных самок крыс Wistar, тогда как у крыс с низкой воспроизводимостью заболевания обнаружено снижение уровня TNF α в период развития ЭАЭ при повышении этого уровня лишь на 7-й д.п.и.

Такое наблюдение позволяет допустить, что одним из факторов, способствующих реализации повреждений ЦНС при ЭАЭ, может быть высокий уровень сывороточного TNF α не только в латентном периоде, но и после его окончания. Это подтверждается данными о сохранении высоких уровней TNF α на протяжении, по крайней мере, 2-х недель у морских свинок, у которых ЭАЭ протекает крайне тяжело и заканчивается гибелью более 80% животных. Возможно также, что начальный уровень сывороточного TNF α является «фактором риска», повышающим вероятность или тяжесть заболевания в условиях индукции ЭАЭ: экспериментальные данные указывают на большую цитотоксическую активность (в отношении клеток L 929) сывороток интактных морских свинок и самок крыс по сравнению с мало чувствительными к ЭАЭ самцами крыс. Вместе с тем, нельзя не отметить, что максимальные концентрации TNF α в крови морских свинок превосходили таковые у крыс в 2-7 раз в разные сроки после иммунизации. Результаты проведенного исследования свидетельствуют об участии TNF α в патогенезе ЭАЭ и о наличии определенных клинико-иммунологических корреляций при индукции ЭАЭ у животных разных видов.

Как известно, помимо регуляции иммунного ответа и воспаления, TNF α проявляет избирательную цитотоксичность в отношении некоторых опухолевых клеток и угнетает синтез ключевого фермента липогенеза – липопротеинкиназы [5]. Кахексия – один из наиболее известных биологических эффектов избытка TNF α у раковых

больных [11, 14]. Было показано, что мышцы, инокулированные секреторирующим TNF α опухолевыми клетками, прогрессивно истощаются и быстрее умирают, чем мышцы, инокулированные опухолевыми клетками, не секреторирующими TNF α [31]. Максимальная концентрация TNF α в крови заболевших животных в период неврологических расстройств, истощение, наблюдаемое у тяжело больных животных в наших экспериментах, указывают на то, что потеря веса тела в процессе развития ЭАЭ может быть следствием избыточной продукции TNF α у животных, инокулированных энцефалитогенной смесью.

Полученные нами данные о различной динамике TNF α у животных с разной выраженностью неврологических нарушений согласуются с клиническими наблюдениями Kraus с соавторами [27], показавшими, что при более тяжелом течении РС в крови отмечается более высокий уровень TNF α .

Различный базовый уровень TNF α и отсутствие подъема уровня IL-10 в крови также указывает на генетический или приобретенный дефект супрессорного звена. Об этом же свидетельствуют данные Ozenci с соавторами [33], показавшими, что у больных РС повышен уровень TNF α и снижен уровень IL-10 в крови. Высокая врожденная продукция TNF α и низкая IL-10 в 4 раза увеличивают риск развития РС [19].

Нами получены приоритетные данные о двухволновой динамике циркулирующего в крови IL-10. Выявленные изменения содержания IL-10 в крови крыс с различной тяжестью заболевания свидетельствуют о защитной роли этого цитокина, так как неспособность крыс к повышению уровня или активности IL-10 генетическая или приобретенная приводит к развитию более выраженных нарушений. С повышением уровня IL-10 в крови больных РС связывают эффективность терапии интерфероном- β [16]. Вероятно, защитное действие IL-10 связано с его способностью подавлять синтез провоспалительных цитокинов, играющих ведущую патогенетическую роль в развитии ЭАЭ.

Общепризнано, что повышение уровня IL-10 происходит на поздних этапах развития ЭАЭ, и с этим связывают спонтанное выздоровление животных с монофазным течением болезни. Наблюдаемый нами второй подъем, по-видимому, отражает это событие. Мы предполагаем также, что повышение и поддержание в дальнейшем высокого уровня IL-10 участвует в репаративных процессах и предохраняет животных от рецидивов заболевания, поскольку у крыс Lewis, болеющих однофазно, в стадии выздоровления выявляется высокий уровень мРНК IL-10, тогда как у крыс DA, болеющих с рецидивами, продукция мРНК IL-10 в этот период снижена [20].

У больных РС уровень IL-10 в крови в стадию ремиссии существенно выше, чем при обострениях, тогда как уровень TNF α более высокий при обострениях [34].

Обнаруженное нами раннее повышение уровня IL-10 в крови еще до клинических проявлений, вероятно, играет роль в супрессии патологического действия провоспалительных цитокинов, ограничивая распространение цитотоксических Т-клеток и очаг воспаления. Именно у тяжело больных крыс не наблюдается увеличения IL-10 и остается повышенным уровень TNF α , что и предопределяет исход заболевания. Увеличение мРНК IL-10 в индуктивную фазу и на пике заболевания животных показано также [25, 44].

Повышенная продукция IL-10 клетками крови у животных при более легком течении заболевания, по-видимому, свидетельствует о нейропротективных свойствах эндогенного IL-10 при развитии ЭАЭ и прогностической роли этого цитокина. Недостаточность супрессорного звена иммунитета приводит к повышению активности провоспалительных цитокинов, что также показано Agnello с соавторами [7] на мышцах с дефицитом гена IL-10. Преобладанию провоспалительных цитокинов может также способствовать длительная циркуляция популяции Т-клеток за счет снижения интенсивности апоптоза, вызванного подавлением Fas-опосредованного сигнального пути [10].

Различная динамика уровня IL-10 у крыс с различной тяжестью заболевания согласуется также с данными Almeras с соавторами [8], показавшими, что полиморфизм генов IL-10, хотя и не влияет на предрасположенность к развитию РС, но может влиять на тяжесть и прогрессирование болезни. Причем при тяжелом течении вторично прогрессирующего рассеянного склероза уровень IL-10 в клетках крови снижен [35].

Цитокины, присутствующие в ЦНС, могут участвовать в формировании неврологических нарушений при ЭАЭ. Обнаружение TNF α только у животных с неврологическими нарушениями свидетельствует в пользу представлений о патогенетической роли этого цитокина. Ранее нами показана важность баланса про- и противовоспалительных цитокинов, а также путей внутриклеточной сигнальной трансдукции, опосредуемых разными типами рецепторов цитокинов, которые могут кардинально изменить свойства цитокинов [1]. В частности, сигнальный путь, опосредуемый рецепторами TNF α I типа, играет ключевую роль в контроле воспаления и демиелинизации в ЦНС, в развитии острой фазы заболевания [26]. Показана также роль этого сигнального пути в ослаблении апоптоза Т-клеток, что поддерживает длительную активацию иммунной системы [10]. Напротив, при связывании TNF α с рецепторами II типа цитокин оказывает нейропротективные свойства.

Повышенная продукция IL-10 в период выздоровления является, вероятно, одним из адаптационных механизмов, способствующих выздоровлению, в то время как снижение экспрессии мРНК IL-10 предшествует возникновению рецидивов хронического ЭАЭ [20].

Выявленные различия динамики циркулирующих в крови цитокинов и паттерна их экспрессии в ЦНС у крыс с различной тяжестью заболевания свидетельствуют о том, что уровень цитокинов и их наличие в ЦНС определяют вероятность развития и тип течения заболевания. К такому же выводу пришли Begolka с соавторами [12], обнаружившие, что разная кинетика экспрессии цитокинов вместе с природой персистирующих воспалительных клеток определяют различия клинического течения в двух моделях демиелинизирующих заболеваний (ЭАЭ и вирус-индуцированной). Используя модели монофазного и рецидивирующего ЭАЭ Okuda с соавторами [30] также показали, что паттерн экспрессии цитокинов в ЦНС может влиять на тип заболевания.

Таким образом, регуляция баланса цитокинов и внутриклеточных путей проведения сигнала может стать мишенью для терапевтического воздействия.

Список литературы

1. Абдурасулова И.Н., Житнухин Ю.Л., Тарасова Е.А., Клименко В.М. Экспрессия мРНК цитокинов в селезенке и спинном мозге крыс с различной тяжестью ЭАЭ // *Мед. иммунология*. — 2004. — Т. 6. — № 1-2. — С. 37-46.
2. Гусев Е.И., Демина Т.Д., Бойко А.Н. Рассеянный склероз. — М., 1997. — 463 с.
3. Демина Т.Л., Бойко А.Н., Оганезов В.К. Участие фактора некроза опухолей-альфа в иммунорегуляции при хронически-прогрессирующих формах рассеянного склероза // *Иммунология*. — 1991. — № 4. — С. 40-44.
4. Житнухин Ю.Л., Никитина Е.Ю., Фрейдлин И.С. Развитие активно индуцированного экспериментального аллергического энцефаломиелита в условиях введения пентоксифиллина // *Нейроиммунология, нейроинфекции, демиелинизация*. — СПб., 1997. — С. 22-25.
5. Тотолян А.А., Фрейдлин И.С. Клетки иммунной системы. — СПб.: Наука, 2000. — 231 с.
6. Фрейдлин И.С. Иммунная система и ее дефекты. — СПб.: НТФФ «Полисан», 1998. — 111 с.
7. Agnello D., Villa P., Ghezzi P. Increased tumor necrosis factor and interleukin-6 production in the central nervous system of interleukin-10-deficient mice // *Brain Res.* — 2000. — Vol. 869, N 1-2. — P. 241-243.
8. Almeras L., Meresse B., Seze J., De Lefranc D., Dubucquoi S., Fajardy I., Vermersch P., Prin L. Interleukin-10 promoter polymorphism in multiple sclerosis: association with disease progression // *Eur. Cytokine Netw.* — 2002. — Vol. 13, N 2. — P. 200-206.
9. Baarsch M.J., Wannemuehler V.J., Molitor T.W., Murtangh M.P. Detection of tumor necrosis factor- α from porcine alveolar macrophages using an L-929 fibroblast bioassay // *J. Immunol. method.* — 1991. — Vol. 140. — P. 15-22.
10. Bachmann R., Eugster H.P., Frei K., Fontana A., Lassmann H. Impairment of TNF receptor-1 signaling but not fas signaling diminishes T-cell apoptosis in myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide-induced chronic demyelinating autoimmune encephalomyelitis in mice // *Am. J. Pathol.* — 1999. — Vol. 154, N 5. — P. 1417-1422.
11. Balkwill F., Osborne R., Burke F., Naylor S., Talbot D., Durbin H., Tavernier J., Fiers W. Evidence for tumor necrosis factor/cachectin production in cancer // *Lancet.* — 1987. — Vol. 2. — P. 1229-1232.
12. Begolka W.S., Vanderlugt C.L., Rahbe S.M., Miller S.D. Differential expression of inflammatory cytokines parallels progression of central nervous system pathology in two clinically distinct models of multiple sclerosis // *J. Immunol.* — 1998. — Vol. 161, N 8. — P. 4437-4446.
13. Bettelli E., Das M.P., Howard E.D., Weiner H.L., Sobel R.A., Kuchroo V.K. IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10 and IL-4 deficient and transgenic mice // *J. Immunol.* — 1998. — Vol. 161, N 7. — P. 3299-3306.
14. Beutler B., Cerami A. Cachectin: more than a tumor necrosis factor // *N. Engl. J. Med.* — 1987. — Vol. 316. — P. 379-385.
15. Cannella B., Raine C.S. The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions // *Ann. Neurol.* — 1995. — Vol. 37, N 4. — P. 424-435.
16. Clerici M., Saresella M., Trabattoni D., Speciale L., Fossati S., Ruzzante S., Cavaretta R., Filippi M., Caputo D., Ferrante P. Single-cell analysis of cytokine production shows different immune profiles in multiple sclerosis patients with active or quiescent disease // *J. Neuroimmunol.* — 2001. — Vol. 121, N 1-2. — P. 88-101.
17. Crisi G.M., Santambrogio L., Hochwald G.M., Smith S.R., Carlino J.A., Thorbecke G.J. Staphylococcal enterotoxin B and tumor-necrosis factor- α -induced relapses of experimental allergic encephalomyelitis: protection by transforming growth factor- β and interleukin-10 // *Eur. J. Immunol.* — 1995. — Vol. 25, N 11. — P. 3035-3040.
18. Cua D.J., Groux H., Hinton D.R., Stohlman S.A., Coffman R.L. Transgenic interleukin 10 prevents induction of experimental allergic encephalomyelitis // *J. Exp. Med.* — 1999. — Vol. 189, N 6. — P. 1005-1010.
19. de Jong B.A., Schrijver H.M., Huizinga T.W., Bollen E.L., Polman C.H., Uitdehaag B.M., Kersbergen M.C., Sturk A., Westendorp R.G. Innate production of interleukin-10 and tumor necrosis factor affects the risk of multiple sclerosis // *Ann. Neurol.* — 2000. — Vol. 48, N 4. — P. 641-646.
20. Diab A., Zhu J., Xiao B.G., Mustafa M., Link H. High IL-6 and IL-10 in the central nervous system are associated with protracted relapsing EAE in DA rats // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* — 1997. — Vol. 56, N 6. — P. 641-650.
21. Furuya T., Joe B., Salstrom J.L., Hashiramoto A., Dobbins D.E., Wilder R.L., Remmers E.F. Polymorphisms of the tumor necrosis factor alpha locus among autoimmune disease susceptible and resistant inbred rat strains // *Genes Immun.* — 2001. — Vol. 2, N 4. — P. 229-232.

22. Hopkins S.J., Rothwell N.J. Cytokines and the nervous system: expression and recognition // *Trends Neurosci.* – 1995. – Vol. 18, N 2. – P. 83-88.
23. Issazadeh S., Lorentzen J.C., Mustafa M., Hojberg B., Mussener A., Olsson T. Cytokines in relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in DA rats: persistent mRNA expression of proinflammatory cytokines and absent expression of interleukin-10 and transforming growth factor-beta // *J. Neuroimmunol.* – 1996. – Vol. 69, N 1-2. – P. 103-115.
24. Jacobs C.A., Baker P.E., Roux E.R., Picha K.S., Toivola B., Waugh S., Kennedy M.K. Experimental autoimmune encephalomyelitis is exacerbated by IL-1 α and suppressed by soluble IL-1 receptor // *J. Immunol.* – 1991. – V. 146, N 9. – P. 2983-2989.
25. Jander S., Pohl J., D'Urso D., Gillen C., Stoll G. Time course and cellular localization of interleukin-10 mRNA and protein expression in autoimmune inflammation of the rat central nervous system // *Am. J. Pathol.* – 1998. – Vol. 152, N 4. – P. 975-982.
26. Kassiotis G., Kollias G. Uncoupling the proinflammatory from the immunosuppressive properties of tumor necrosis factor (TNF) at the p55 TNF receptor level: implications for pathogenesis and therapy of autoimmune demyelination // *J. Exp. Med.* – 2001. – Vol. 193, N 4. – P. 427-434.
27. Kraus J., Kuehne B.S., Tofighi J., Frielinghaus P., Stolz E., Blaas F., Laske C., Engelhardt B., Traupe H., Kaps M., Oschmann P. Serum cytokine levels do not correlate with disease activity and severity assessed by brain MRI in multiple sclerosis // *Acta Neurol. Scand.* – 2002. – Vol. 105, N 4. – P. 300-308.
28. Kuroda Y., Shimamoto Y. Human tumor necrosis factor – alpha augments experimental autoimmune encephalomyelitis in rats // *J. Neuroimmunol.* – 1991. – Vol. 34, N 2-3. – P. 159-164.
29. Mikova O., Yakimova R., Bosmans E., Kenis G., Maes M. Increased serum tumor necrosis factor alpha concentration in major depression and multiple sclerosis // *Eur. Neuropsychopharmacol.* – 2001. – Vol. 11, N 3. – P. 203-208.
30. Okuda Y., Sacoda S., Bernard C.C., Yanagihara T. The development of autoimmune encephalomyelitis provoked by myelin oligodendrocyte glycoprotein is associated with an upregulation of both proinflammatory and immunoregulatory cytokines in the central nervous system // *J. Interferon Cytokine Res.* – 1998. – Vol. 18, N 6. – P. 415-421.
31. Oliff A., Defeo-Jones D., Boyer M., Martinez D., Kiefer D., Vuocolo G., Wolfe A., Socher S.H. Tumors secreting human TNF/cachectin induce cachexia in mice // *Cell.* – 1987. – Vol. 50. – P. 555-563.
32. Olsson T. Cytokine-producing cells in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis // *Neurology.* – 1995. – Vol. 45, N 6. – P. 11-15.
33. Ozenci V., Kouwenhoven M., Huang Y.M., Kivisakk P., Link H. Multiple sclerosis is associated with an imbalance between tumour necrosis factor-alpha (TNFalpha)- and IL-10-secreting blood cells that is corrected by interferon-beta (IFN-beta) treatment // *Clin. Exp. Immunol.* – 2000. – Vol. 120, N 1. – P. 147-153.
34. Perrella O., Sbreglia C., Perrella M., Spetrini G., Gorga F., Pezzella M., Perrella A., Atripaldi L., Carrieri P. Interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha: model of immunomodulation in multiple sclerosis // *Neurol Res.* – 2006. – Vol. 28, N 2. – P. 193-195.
35. Petereit H.F., Pukrop R., Fazekas F., Bamborsche S.U., Ropele S., Kolmel H.W., Merkelbach S., Japp G., Jongen P.J., Hartung H.P., Hommes O.R. Low interleukin-10 production is associated with higher disability and MRI lesion load in secondary progressive multiple sclerosis // *J. Neurol. Sci.* – 2003. – Vol. 206, N 2. – P. 209-214.
36. Bott O., Fleischer B., Cash E. Interleukin-10 prevents experimental allergic encephalomyelitis in rats // *Eur. J. Immunol.* – 1994. – Vol. 24. – P. 1434-1440.
37. Ruddle N.H., Bergman C.M., McGrath K.M., Lingenheld E.G., Grunnet M.L., Padula S.J., Clark R.B. An antibody to lymphotoxin and tumor necrosis factor prevents transfer of experimental allergic encephalomyelitis // *J. Exp. Med.* – 1990. – Vol. 172. – P. 1193-1200.
38. Sambrook J., Fritsch F., Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual* // Gold Spring Harbor Laboratory. – 2nd ed. – 1989. – Vol. 2. – P. 14.18-14.19.
39. Samoiloa E.B., Horton J.L., Chen Y. Acceleration of experimental autoimmune encephalomyelitis in interleukin-10-deficient mice: roles of interleukin-10 in disease progression and recovery // *Cell Immunol.* – 1998. – Vol. 188, N 2. – P. 118-124.
40. Selmaj K.W., Raine C.S. Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro // *Ann. Neurol.* – 1988. – Vol. 23, N 4. – P. 339-346.
41. Selmaj K.W., Raine C.S. Experimental autoimmune encephalomyelitis: immunotherapy with anti-tumor necrosis factor antibodies and soluble tumor necrosis factor receptor // *Neurol.* – 1995. – Vol. 45, N 6. – P. 44-49.
42. Sharief M.K., Hentges R. Association between tumor necrosis factor-alpha and disease progression in patients with multiple sclerosis // *N. Engl. J. Med.* – 1991. – Vol. 326, N 4. – P. 467-472.
43. Stefferl A., Linington C., Holsboer F., Reul J.M. Susceptibility and resistance to EAE: relationship with hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis responsiveness in the rat // *Endocrinol.* – 1999. – Vol. 140, N 11. – P. 4932-4938.
44. Tanuma N., Kojima T., Shin T., Aikawa Y., Kohji T., Ishihara Y., Matsumoto Y. Competitive PCR quantification of pro- and anti-inflammatory cytokine mRNA in the central nervous system during autoimmune encephalomyelitis // *J. Neuroimmunol.* – 1997. – Vol. 73, N 1-2. – P. 197-206.
45. Xiao B.G., Bai X.F., Zhang G.X., Link H. Suppression of acute and protracted-relapsing experimental allergic encephalomyelitis by nasal administration of low-dose IL-10 in rats // *J. Neuroimmunol.* – 1998. – Vol. 84, N 2. – P. 230-237.

поступила в редакцию 23.11.2007
 принята к печати 27.12.2007