

ВРЕМЕННАЯ ДИНАМИКА ЦИТОКИНОВ В КРОВИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АУТОИММУННОМ ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТЕ У КРЫС

Н. В. Позднякова¹, В. И. Туробов², Е. Е. Гаранина³, О. А. Рябая¹, Ю. К. Бирюкова⁴, Н. И. Минкевич², Е. В. Трубникова⁵, А. Б. Шевелев⁶, Т. В. Кузнецова⁷, А. В. Белякова⁴, И. П. Удовиченко^{2,8}✉

¹ Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина, Москва

² Филиал Института биоорганической химии имени академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Пушкино

³ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

⁴ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов имени М. П. Чумакова РАН, Москва

⁵ Курский государственный университет, Курск

⁶ Институт биохимической физики имени Н. М. Эмануэля РАН, Москва

⁷ Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова РАН, Москва

⁸ Пушкинский государственный естественнонаучный институт, Пушкино

Изучена динамика содержания цитокинов у крыс линии Dark Agouti с индуцированным экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелитом (ЭАЭ). В экспериментальную группу включили 11 животных, которым в подушечки задних лап инъецировали гомогенат спинного мозга беспородных крыс, смешанный с неполным адьювантом Фрейнда. В контрольную группу включили 7 животных, которым в подушечки задних лап вводили по 100 мкл физиологического раствора, смешанного с неполным адьювантом Фрейнда. У животных ежедневно с 1 по 7 сутки отбирали по 500 мкл крови. Был выполнен мультиплексный цитокиновый тест с помощью набора реагентов Bio-Plex Pro Rat Cytokine 24-plex Assay на платформе Bio-Plex. Показано, что в контексте цитокинового профиля модель ЭАЭ у крыс отражает течение рассеянного склероза у человека в части динамики содержания системных лимфопролиферативных и гемопозитических факторов: IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 и IL-7. В части динамики факторов таксиса лимфоцитов, моноцитов и других клеток иммунной системы изученная модель удовлетворительно имитирует динамику содержания IL-17, RANTES (CCL-5) и MCP-1 (CCL-2), но отличается по динамике GRO/KC (CXCL1). В отношении факторов, влияющих на цитотоксические и апоптотические реакции, сходство модели с заболеванием человека было выявлено по таким ключевым факторам, как IFN γ , IL-6 и IL-17, но не по TNF α .

Ключевые слова: рассеянный склероз, экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит, миелин, иммунизация, мультиплексный цитокиновый тест

Благодарности: авторы благодарят Бориса Шевелева за участие в иммунизации животных.

Финансирование: исследование поддержано Министерством образования и науки Российской Федерации (Соглашение о предоставлении субсидии № 14.607.21.0133 от 27.10.2015, уникальный идентификатор RFMEFI60715X0133).

✉ **Для корреспонденции:** Удовиченко Игорь Петрович
Пр-т Науки, д. 6, г. Пушкино, Московская обл., 142290; iudovichenko1@yandex.ru

Статья получена: 15.12.2017 **Статья принята к печати:** 20.12.2017

TEMPORAL DYNAMICS OF CYTOKINES IN THE BLOOD OF RATS WITH EXPERIMENTALLY INDUCED AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS

Pozdniakova NV¹, Turobov VI², Garanina EE³, Ryabaya OA¹, Biryukova YuK⁴, Minkevich NI², Trubnikova EV⁵, Shevelev AB⁶, Kuznetsova TV⁷, Belyakova AV⁴, Udovichenko IP^{2,8}✉

¹ Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow, Russia

² Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Pushchino branch

³ Kazan Federal University, Kazan, Russia

⁴ Chumakov Federal Center for Research and Development of Immunobiological Products, the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

⁵ Kursk State University, Kursk, Russia

⁶ Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

⁷ Vavilov Institute of General Genetics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

⁸ Pushchino State Institute of Natural Sciences, Pushchino, Russia

In this work we explore the temporal dynamics of cytokines in Dark Agouti rats with experimentally induced autoimmune encephalomyelitis (EAE). The main group consisted of 11 animals who were injected with 100 μ l (per leg) of spinal cord homogenate obtained from random-bred rats and combined with incomplete Freund's adjuvant to the hind footpads. The control group included 7 animals who received 100 μ l of normal saline mixed with incomplete Freund's adjuvant. Blood samples (500 μ l) were collected daily, starting from day 1 through day 7. We ran a Bio-Plex-based multiplex cytokine assay on the samples using the Bio-Plex Pro Rat Cytokine 24-plex Assay kit. EAE in rats was shown to simulate progression of multiple sclerosis in humans in terms of temporal dynamics of lymphoproliferative and hematopoietic factors IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, and IL-7. The studied model satisfactory imitates the dynamics of factors stimulating migration of lymphocytes, monocytes and other immune cells, including IL-17, RANTES (CCL-5) and MCP-1 (CCL-2) but excluding GRO/KC (CXCL1), which shows a different dynamics. The model also resembles patterns of human multiple sclerosis in terms of factors affecting cytotoxic and apoptotic reactions, including IFN γ , IL-6 and IL-17, but excluding TNF α .

Keywords: multiple sclerosis, experimental autoimmune encephalomyelitis, myelin, immunization, multiplex cytokine assay

Acknowledgements: the authors thank Boris Shevelev for help in immunization of the animals.

Funding: this work was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (Grant agreement 14.607.21.0133 dated October 27, 2015, ID RFMEFI60715X0133).

✉ **Correspondence should be addressed:** Igor Udovichenko
Pr-t Nauki, d. 6, Puschino, Moscow oblast, Russia, 142290; iudovichenko1@yandex.ru

Received: 15.12.2017 **Accepted:** 20.12.2017

Рассеянный склероз (РС) представляет собой тяжелое нейродегенеративное заболевание аутоиммунной природы. Актуальность борьбы с ним обусловлена высокой частотой встречаемости, а также тяжестью течения, приводящей к частичной или полной потере подвижности. Большинство пациентов с РС полностью утрачивают подвижность через 25 лет после появления первых симптомов заболевания. Более половины пациентов с РС через 15 лет после начала болезни могут передвигаться только на костылях. До настоящего времени для лечения этой болезни не предложено эффективного этиотропного средства.

Заболевание возникает, как правило, у достаточно молодых людей: у 70–80 % пациентов первые симптомы РС проявляются в возрасте от 20 до 40 лет [1]. Диагностика РС основана на клиническом осмотре невропатологом, магнитно-резонансном исследовании (МРТ) центральной нервной системы, гистологическом анализе материалов биопсии и аутопсии [2]. Болезнь имеет множество различающихся клинических проявлений, затрагивающих функции спинного и головного мозга, черепных нервов, мозжечка, когнитивные функции. При этом не выработано метода клинической диагностики, позволяющего однозначно оценивать тяжесть заболевания. Результаты МРТ, электроэнцефалографии и биохимического анализа пунктатов спинномозговой жидкости, хотя и являются ценными сведениями о состоянии больного, не всегда могут быть интерпретированы однозначно. Многие частные проявления РС могут быть вызваны не связанными с ним причинами: инфекционными заболеваниями, сосудистыми патологиями, аутоиммунными заболеваниями различной природы [3].

Выделяют четыре формы РС: возвратно-ремиттирующую (приступообразную), RRMS — 80–85 % случаев; первичную прогрессирующую, PPMS — 10–15 % случаев; возвратно-прогрессирующую, PRMS — 5 % случаев; вторично-прогрессирующую, SPMS [4, 5]. Около половины пациентов с RRMS приобретают симптомы SPMS через 10 лет после начала заболевания. Свыше 90 % пациентов с RRMS в конечном итоге приобретают симптоматику SPMS [6].

Основным патогностическим признаком РС является демиелинизация оболочек нейронов ЦНС, вызываемая скоплениями на их поверхности Т- и В-лимфоцитов. Для РС также характерно накопление олигоклональных антител в спинномозговой жидкости. Однако ответа на вопрос, где и как происходит первоначальный запуск клональной экспансии лимфоцитов, специфичных к основному белку миелина MBP, протекает ли этот процесс непосредственно в ЦНС при участии миелиновых оболочек или за пределами ЦНС с последующим накоплением в ней аутореактивных клеточных компонентов, нет [7].

Разработка средств лечения РС требует использования животных моделей, максимально точно воспроизводящих течение заболевания у человека. В качестве такой модели часто используют экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЭАЭ) у мышей и крыс. Заболевание вызывают введением суспензии миелина или MBP в неполном адьюванте Фрейнда в подушечки лап [8]. В результате паралич задних конечностей инициируется через 1 мес. после иммунизации и длится в течение 4–6 мес. [9]. У крыс линии Dark Agouti (DA) ЭАЭ характеризуется существенно более быстрой динамикой. Паралич конечностей проявляется на 10–11 сутки и заканчивается на 14 сутки. Наиболее значимым отличием ЭАЭ у мышей от РС у человека является полное клиническое излечение иммунизи-

рованных животных, недостижимое на сегодня для пациентов с РС.

В работе [10] приведены данные исследования цитокинового профиля у 19 пациентов с РС, в том числе у 16 — с возвратно-ремиттирующей формой, у 1 — с первично-прогрессирующей и у 2 — с вторично-прогрессирующей формой, в зависимости от длительности заболевания: группа 1 — $4,2 \pm 0,8$ мес. и группа 2 — $76,6 \pm 14,3$ мес. с момента постановки первичного диагноза. В работе было показано, что на ранней стадии РС в сравнении с поздней стадией и данными для контрольной группы (люди без РС) в структуре цитокинов преобладают интерферон гамма (IFN γ) и противовоспалительный лимфокин IL-10. На поздней стадии снижается содержание IL-1RA, IL-8, IL-12(p70), CCL-3, CCL-7, CCL-11, CXCL-10, FGF, IFN α , а значительная представленность характерна для IL-1a, IL-1b, IL-2RA, IL-3, IL-4, IL-7, IL-12(p40), IL-18, CCL-5 (RANTES), CCL-27, HGF, MIF, M-CSF и TRAIL. Особое внимание авторы обратили на повышение содержания в крови больных РС IL-17, известного в качестве ключевого фактора развития псориатических повреждений кожи [11], а также IL-22 — у пациентов с RRMS. При анализе динамики цитокинов в спинномозговой жидкости пациентов авторы [10] пришли к выводу о ключевой роли накопления в ней IFN γ и MIF (ключевого фактора дегенерации суставной сумки при артрозе), а также факторов миграции лимфоцитов, индуцируемых ими: CCL-5 (RANTES), CCL-2 и CCL-27. Для спинномозговой жидкости, но не крови пациентов с РС оказалось характерным накопление проапоптотических факторов TNF- α и TRAIL.

Анализируя эти данные, можно сделать вывод о том, что для РС характерно длительное системное повышение активности факторов гемопоеза, особенно направленных на гранулоцитарный компонент, длительное поддержание Th1-ответа, избыток факторов миграции лимфоцитов и моноцитов при отсутствии выраженной провоспалительной реакции в виде факторов, стимулирующих продукцию и таксис нейтрофилов. Результаты исследования [10] важны для понимания динамики содержания различных цитокинов в крови и спинномозговой жидкости пациентов с РС, но в силу ограничений статистических методов значимость выявленных закономерностей остается под вопросом.

С учетом изложенного в рамках работы мы решали две задачи:

1) исследовать краткосрочную динамику цитокинов в модели ЭАЭ у крыс, для которой характерна высокая скорость патологического процесса;

2) сопоставить данные о содержании цитокинов при РС у человека и ЭАЭ у крыс с целью оценить пригодность этой модели для тестирования кандидатных средств для терапии РС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Индукция ЭАЭ у крыс

Эксперименты на лабораторных животных были проведены в соответствии с «Правилами работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 № 755) и с соблюдением принципов, изложенных в Хельсинкской декларации (2013).

Гомогенат спинного мозга беспородных крыс готовили по методике [12]. Далее использовали крыс линии Dark

Agouti массой 220–250 г. В экспериментальную группу включили 11 животных, которым в день 0 вводили в подушечки каждой из двух задних лап заранее приготовленный гомогенат спинного мозга, смешанный с неполным адьювантом Фрейнда в пропорции 1 : 1, общим объемом 100 мкл в каждую лапу. Животным контрольной группы ($n = 7$) вводили 100 мкл физиологического раствора, смешанного с неполным адьювантом Фрейнда также в пропорции 1 : 1. С 1 по 7 сутки (за исключением 6-х суток) эксперимента у крыс ежедневно отбирали по 500 мкл крови из хвостовой вены. Из отобранной крови немедленно готовили сыворотку по следующей методике: кровь помещали в вакуумные пробирки Vacuette Z serum sepclot activator (для сыворотки) и центрифугировали в течение 15–20 мин при 2500 об./мин и температуре +4 °С. Сыворотку (около 100 мкл) переносили в микроцентрифужные пробирки и замораживали при –20 °С. Крыс ежедневно взвешивали и фиксировали в баллах индекс тяжести клинических проявлений ЭАЭ по следующей шкале: 0 — нет симптомов, 1 — снижение тонуса хвоста, 2 — нарушение установочного рефлекса, 3 — частичный паралич, 4 — полный паралич, 5 — животные погибли или умирают. В сомнительных случаях индекс фиксировали с занижением. Явные признаки ЭАЭ у животных контрольной группы фиксировали с 8 по 14 день с начала эксперимента. Пик заболевания длился 2–3 дня и приходился на 11–14 сутки с начала эксперимента.

Мультиплексный цитокиновый тест

Анализ выполнялся на платформе Bio-Plex (Bio-Rad, США) с помощью набора реагентов Bio-Plex Pro Rat Cytokine 24-plex Assay (Bio-Rad), работа которого основана на использовании магнитных частиц с нанесенными моноклональными антителами к цитокинам крысы, согласно инструкции производителя и в соответствии с ранее опубликованным протоколом [13]. Для анализа использовали аликвоты сыворотки объемом 50 мкл. Среднюю интенсивность флуоресценции каждого образца определяли на приборе Luminex 200 analyzer (Luminex Corporation, США). Для сбора данных использовали программное обеспечение MasterPlex CT и MasterPlex QT analysis software (Hitachi Solutions America, США). Для каждого анализа строили калибровочный график с использованием 7 концентраций, выражая ее в пг/мл сыворотки.

Статистическая обработка данных

Для экспериментальной и контрольной групп для каждого цитокина на каждые сутки эксперимента вычисляли медианное значение содержания для группы и два квартильных значения. После этого проводили сопоставление достоверности различий между группами с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни, используя пакет программ Statistica 8.0 для Windows. При p -value > 0,05 различия были недостоверны; также использовали три порога достоверности: первый — $\leq 0,05$; второй — $\leq 0,01$; третий — $\leq 0,001$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящее время сведений о краткосрочной динамике цитокинов в крови человека и лабораторных животных все еще недостаточно, т. к. мультиплексные тесты дороги, а ежедневный отбор крови у больных и животных сопря-

жен с техническими и этическими трудностями. Анализ динамики содержания цитокинов в контрольной группе показал, что введение неполного адьюванта Фрейнда в подушечки лап само по себе является фактором, вызывающим значительные волнообразные колебания уровня цитокинов в крови, хотя и не приводит к развитию ЭАЭ. Это обстоятельство снижает достоверность оценки влияния гомогената спинного мозга на развитие экспериментального заболевания и требует использования статистических методов анализа динамики содержания цитокинов.

У всех животных экспериментальной группы наблюдали паралич задних конечностей. Восходящая фаза заболевания пришлась на 11–13 сутки, нисходящая — на 12–17 сутки. К 18 суткам симптомы паралича у всех животных полностью исчезали. Таким образом, отбор крови, который производили в 1–7 сутки, осуществляли на стадии, когда внешние проявления ЭАЭ отсутствовали.

Анализ данных (табл. 1 и 2), показал, что в первые сутки эксперимента содержание 13 из 24 анализируемых цитокинов — IL-1a, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12(p70), IL-17, IL-18, G-CSF, IFN- γ , RANTES (CCL-5) и MCP-1 (CCL-2) — в экспериментальной группе было существенно выше, чем в контрольной, (например, до 220 % — для IL-4) по второму и третьему порогам достоверности (рис. 1). Во вторые сутки ни по одному цитокину достоверных различий не наблюдали. На третьи сутки были выявлены различия для

Таблица 1. Оценка достоверности различий между экспериментальной и контрольной группами животных с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни с поправкой Йейста на непрерывность. Результат проверки гипотезы об отсутствии значимых различий между выборками выражен виде критерия Фишера (p). При $p > 0,05$ различия были недостоверны; также использовали 3 порога достоверности: первый — $\leq 0,05$; второй — $\leq 0,01$; третий — $\leq 0,001$ (в таблице обозначены цифрами 1, 2 и 3 соответственно)

Цитокин	Сутки эксперимента					
	1	2	3	4	5	7
IL-1a	3	–	–	–	2	2
IL-1b	–	–	1	–	2	–
IL-2	2	–	–	–	–	1
IL-4	3	–	–	–	–	2
IL-5	2	–	–	–	–	2
IL-6	3	–	–	–	–	1
IL-7	2	–	–	–	–	2
IL-10	–	–	–	–	–	2
IL-12	2	–	–	–	–	–
IL-13	–	–	–	–	2	–
IL-17	3	–	–	–	–	2
IL-18	3	–	–	–	–	2
Эритропоэтин EPO	–	–	–	–	1	2
G-CSF	3	–	–	–	–	–
GM-CSF	–	–	–	–	–	3
GRO/KC	–	–	–	–	–	–
IFN- γ	2	–	–	–	–	1
M-CSF	–	–	–	–	–	–
MIP-3a	–	–	–	–	–	–
RANTES	2	–	–	–	–	2
TNF α	–	–	–	–	–	–
VEGF	–	–	1	–	–	–
Лептин	–	–	–	–	–	–
MCP-1	2	–	–	–	–	2

Таблица 2. Описательная статистика изменения содержания цитокинов в экспериментальной и контрольной группах крыс с экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелиитом

Цитокин	Сутки эксперимента												
	Пара-метр	1		2		3		4		5		7	
		Контроль	Опыт										
IL-1a	Среднее	195	387	182	206	268	181	193	144	319	138	203	359
	N	6	10	8	12	6	11	7	11	7	11	7	11
	Ст. откл.	87	92	65	61	148	122	113	76	279	75	84	134
	Q25	132	304	133	170	160	68	98	83	182	90	139	218
	Медиана	188	347	175	204	218	200	195	155	184	121	184	411
	Q75	288	487	226	264	396	237	274	210	396	187	269	462
IL-1b	Среднее	433	401	412	274	1033	493	469	265	819	250	319	571
	N	6	10	8	12	6	11	7	11	7	11	7	11
	Ст. откл.	386	382	244	184	427	362	432	157	861	164	180	288
	Q25	251	236	211	148	701	134	119	101	279	151	180	300
	Медиана	315	270	399	222	967	441	412	310	607	214	204	536
	Q75	411	367	550	370	1 477	782	553	409	730	307	504	821
IL-2	Среднее	356	607	366	436	367	500	472	414	579	373	744	1092
	N	6	10	8	12	6	11	7	11	7	11	7	11
	Ст. откл.	103	138	127	207	209	303	292	180	286	215	245	348
	Q25	278	579	285	319	186	311	213	260	396	205	543	776
	Медиана	374	597	345	331	332	432	308	362	557	284	657	1145
	Q75	443	626	463	629	523	608	762	647	668	509	914	1368
IL-4	Среднее	11	36	9	19	9	24	14	18	19	16	41	90
	N	6	10	8	12	6	11	7	11	7	11	7	11
	Ст. откл.	6	16	4	19	8	23	12	16	13	15	27	40
	Q25	6	27	5	5	4	4	4	5	9	4	17	57
	Медиана	11	30	8	8	6	17	8	12	15	14	33	76
	Q75	17	38	12	37	10	32	29	34	33	23	64	128
IL-5	Среднее	77	128	59	69	56	88	69	74	91	68	136	193
	N	6	10	8	12	6	11	7	11	7	11	7	11
	Ст. откл.	25	27	33	51	47	59	62	45	43	49	46	34
	Q25	55	110	26	22	23	26	22	20	43	22	106	174
	Медиана	78	123	63	54	30	83	23	67	88	83	130	193
	Q75	97	147	78	121	113	133	144	106	118	106	176	212
IL-6	Среднее	232	503	351	273	468	1595	515	540	600	316	668	1145
	N	6	10	8	12	6	11	7	11	7	11	7	11
	Ст. откл.	79	204	226	255	404	3960	572	743	284	269	292	496
	Q25	172	379	169	63	170	96	76	85	414	46	456	640
	Медиана	224	444	340	182	349	428	190	240	584	261	521	1240
	Q75	287	463	540	470	758	635	1 132	559	713	556	877	1624
IL-7	Среднее	103	254	68	123	70	178	111	114	125	106	228	612
	N	6	10	8	12	6	11	7	11	7	11	7	11
	Ст. откл.	50	96	62	128	83	169	129	115	77	98	146	236
	Q25	58	181	14	16	12	13	11	16	50	10	119	428
	Медиана	102	226	63	72	23	144	20	64	109	108	161	724
	Q75	145	350	90	246	159	281	239	224	209	165	391	787
IL-10	Среднее	149	240	105	180	121	215	163	157	208	132	403	634
	N	6	10	8	12	6	11	7	11	7	11	7	11
	Ст. откл.	70	80	53	131	93	200	129	99	70	106	160	226
	Q25	91	208	61	57	56	63	56	58	144	44	254	420
	Медиана	142	220	101	183	67	149	88	116	214	116	413	557
	Q75	217	280	129	284	237	277	294	272	287	208	550	821

Продолжение табл. 2

IL-12	Среднее	46	125	35	56	43	81	58	54	68	47	155	288
	N	6	10	8	12	6	11	7	11	7	11	7	11
	Ст. откл.	29	62	35	61	56	102	68	61	50	59	98	143
	Q25	16	88	5	6	5	6	6	6	15	4	81	173
	Медиана	49	99	32	23	10	53	12	29	59	26	125	277
	Q75	74	133	46	123	98	118	135	70	104	81	212	425
IL-13	Среднее	31	32	15	16	20	22	22	13	19	13	33	61
	N	6	10	8	12	6	11	7	11	7	11	7	11
	Ст. откл.	28	31	8	15	8	20	26	11	6	8	21	37
	Q25	18	16	9	6	13	9	7	6	15	6	19	29
	Медиана	21	20	14	9	20	13	13	9	18	11	23	44
	Q75	28	37	22	20	23	28	26	15	22	17	58	95
IL-17	Среднее	24	55	17	25	19	36	26	27	36	25	67	119
	N	6	10	8	12	6	11	7	11	7	11	7	11
	Ст. откл.	12	20	15	28	24	36	32	23	22	24	38	43
	Q25	12	43	3	3	3	3	3	4	16	3	38	84
	Медиана	24	49	16	15	4	34	5	21	35	28	62	108
	Q75	37	56	24	44	50	52	52	42	58	45	102	168
IL-18	Среднее	1110	2360	909	1480	976	2004	1351	1829	1628	1562	2476	4182
	N	6	10	8	12	6	11	7	11	7	11	7	11
	Ст. откл.	340	822	345	828	600	1513	895	1390	455	1557	774	1495
	Q25	846	1671	623	707	591	582	615	779	1494	426	1663	3219
	Медиана	1009	2167	877	1444	609	1677	1064	1157	1616	1152	2334	3808
	Q75	1462	2766	1094	2243	1701	3435	2055	2367	1831	2632	3217	4100
Эритропоэтин EPO	Среднее	202	263	186	242	197	310	238	246	281	175	342	745
	N	6	10	8	12	6	11	7	11	7	11	7	11
	Ст. откл.	68	60	77	141	62	240	71	95	86	91	117	345
	Q25	154	235	127	110	158	127	173	153	209	107	249	504
	Медиана	175	258	179	219	202	272	209	223	247	166	360	585
	Q75	235	287	225	346	241	352	300	346	373	197	415	1060
G-CSF	Среднее	3	6	3	4	3	6	4	4	5	4	9	15
	N	6	10	8	12	6	11	7	11	7	11	7	11
	Ст. откл.	1	3	1	3	2	6	3	2	1	2	6	9
	Q25	3	4	2	2	2	2	2	2	3	2	4	8
	Медиана	3	6	3	3	2	4	2	3	4	3	6	12
	Q75	4	7	3	6	5	8	6	5	6	5	14	24
GM-CSF	Среднее	5	7	5	5	6	9	8	5	6	4	8	2
	N	6	10	8	12	6	11	7	11	7	11	7	11
	Ст. откл.	3	3	3	3	4	10	6	2	4	2	2	1
	Q25	2	6	3	2	3	4	4	3	2	2	7	1
	Медиана	5	7	6	5	6	9	9	5	5	5	8	2
	Q75	6	10	8	8	9	10	10	7	11	5	10	3
GRO/KC	Среднее	161	237	156	165	217	153	201	90	153	116	163	178
	N	6	10	8	12	6	11	7	11	7	11	7	11
	Ст. откл.	93	104	79	65	134	97	115	31	128	43	62	57
	Q25	72	124	101	135	75	64	84	62	82	74	103	153
	Медиана	142	267	140	157	239	133	198	96	90	119	155	170
	Q75	270	331	191	189	341	272	299	116	324	145	184	222
IFN γ	Среднее	36	79	30	42	32	63	61	45	53	40	107	215
	N	6	10	8	12	6	11	7	11	7	11	7	11
	Ст. откл.	14	46	13	40	23	77	62	41	19	35	45	122
	Q25	27	52	20	14	17	14	17	15	36	12	65	87
	Медиана	30	64	27	20	20	43	24	28	52	27	98	206
	Q75	46	74	41	60	56	64	95	66	76	69	148	290

Продолжение табл. 2

M-CSF	Среднее	132	174	92	89	91	121	100	79	93	104	113	164
	N	6	10	8	12	6	11	7	11	7	11	7	11
	Ст. откл.	42	44	46	38	70	83	116	49	54	60	55	74
	Q25	99	143	64	55	32	53	32	33	39	41	52	110
	Медиана	124	159	80	88	71	106	40	69	69	105	141	149
Q75	175	205	122	111	174	183	164	121	147	164	165	234	
MIP-3a	Среднее	70	88	55	49	45	88	69	64	76	45	88	128
	N	6	10	8	12	6	11	7	11	7	11	7	11
	Ст. откл.	19	38	44	40	44	95	80	59	45	40	36	44
	Q25	52	47	19	13	12	21	14	13	25	11	65	107
	Медиана	76	94	41	31	21	53	19	51	91	34	83	139
Q75	86	122	85	83	99	134	161	83	122	90	102	171	
RANTES	Среднее	685	1070	342	470	295	696	364	505	574	456	757	1311
	N	6	10	8	12	6	11	7	11	7	11	7	11
	Ст. откл.	230	247	277	422	306	541	403	381	208	389	147	388
	Q25	545	966	80	73	108	60	37	51	437	39	726	814
	Медиана	665	1052	334	387	139	679	57	545	634	660	758	1495
Q75	805	1129	558	855	481	1212	821	777	687	735	846	1580	
TNF α	Среднее	58	39	25	30	29	33	30	28	33	27	54	82
	N	6	10	8	12	6	11	7	11	7	11	7	11
	Ст. откл.	26	10	15	18	18	19	20	14	11	19	26	42
	Q25	42	29	17	16	16	16	17	16	21	14	32	51
	Медиана	57	39	19	21	19	27	23	25	36	24	57	72
Q75	72	49	26	47	46	44	49	34	39	29	82	106	
VEGF	Среднее	130	87	88	55	128	73	107	46	133	65	92	110
	N	6	10	8	12	6	11	7	11	7	11	7	11
	Ст. откл.	110	90	57	79	73	80	78	24	149	49	44	50
	Q25	41	52	42	20	53	37	54	32	33	29	57	57
	Медиана	119	60	88	35	129	44	78	36	97	46	84	100
Q75	132	74	128	44	178	84	185	58	136	89	146	139	
Лептин	Среднее	158	217	59	131	121	264	129	90	231	213	239	460
	N	6	10	8	12	6	11	7	11	7	11	7	11
	Ст. откл.	161	240	77	184	163	255	202	167	219	199	237	358
	Q25	10	1	20	11	11	16	3	4	12	17	0	20
	Медиана	150	137	24	27	21	312	21	20	246	286	324	620
Q75	301	437	83	273	304	482	375	30	447	419	404	745	
MCP-1	Среднее	1979	2662	2277	2317	2428	3097	2071	2468	2117	2254	1910	3300
	N	6	10	8	12	6	11	7	11	7	11	7	11
	Ст. откл.	413	365	949	754	576	1120	830	1141	830	623	557	879
	Q25	1592	2353	1606	1729	2130	2126	1501	1575	1651	1889	1340	2986
	Медиана	2102	2606	2155	2063	2428	3108	1849	2192	2012	2448	1946	3411
Q75	2317	2864	2909	3047	2904	3762	2369	3021	2189	2750	2405	3846	

IL-1b и VEGF ($\leq 0,05$), но на четвертые сутки вновь ни для одного цитокина достоверных различий не было. На пятые сутки эксперимента в экспериментальной группе достоверно снизилось содержание IL-1a, IL-1b, IL-13 и эритропоэтина (рис. 2).

На седьмые сутки различия между группами были выявлены по 14 цитокинам из 24 исследованных. Это были практически все те же цитокины, различия по которым наблюдали в первые сутки эксперимента, с тем отличием что были зафиксированы статистически значимые изменения по IL-10 и эритропоэтину GM-CSF и не были зафиксированы — по IL-12(p70) и G-CSF (рис. 3). Необходимо отметить, что содержание 13 из 14 цитокинов в экспери-

ментальной группе оказалось выше, чем в контрольной. Исключение составил только GM-CSF, содержание которого снизилось с 8,17 пг/мл до 2,00 пг/мл.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Резкий рост содержания различных цитокинов в первые сутки эксперимента с последующим падением во вторые сутки следует интерпретировать как острый клонально-неспецифичный ответ на появление избытка миелина вне ЦНС. Вероятно, реакция на миелин в виде одновременного выброса нескольких лимфопротерогенных факторов стимулируется гиперпродукцией IL-1b, источником

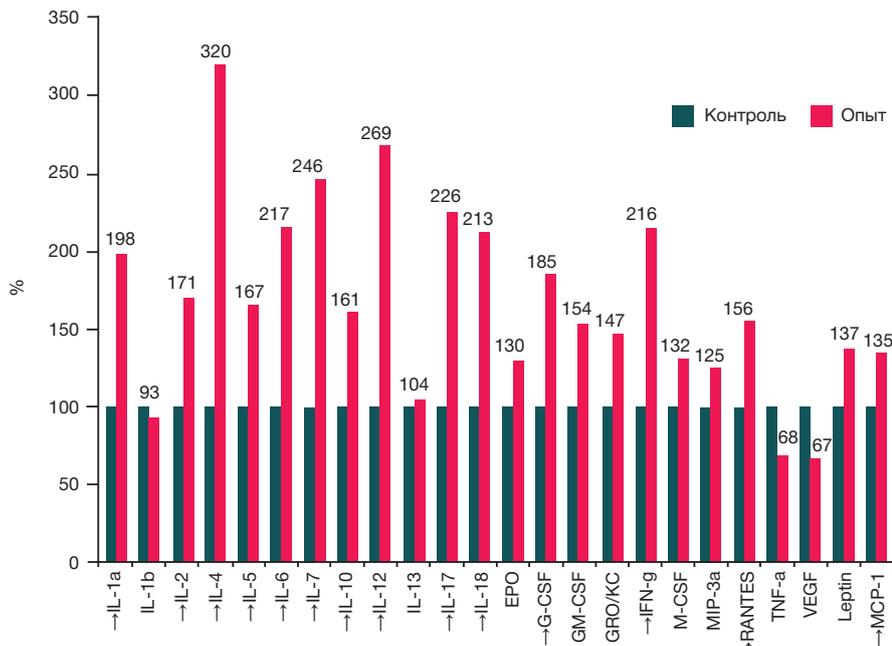


Рис. 1. Изменение содержания цитокинов в сыворотке крови крыс экспериментальной группы по сравнению с крысами контрольной группы через 1 сутки после иммунизации. Содержание цитокинов в крови животных контрольной группы были приняты за 100 %. Достоверные различия показаны стрелками

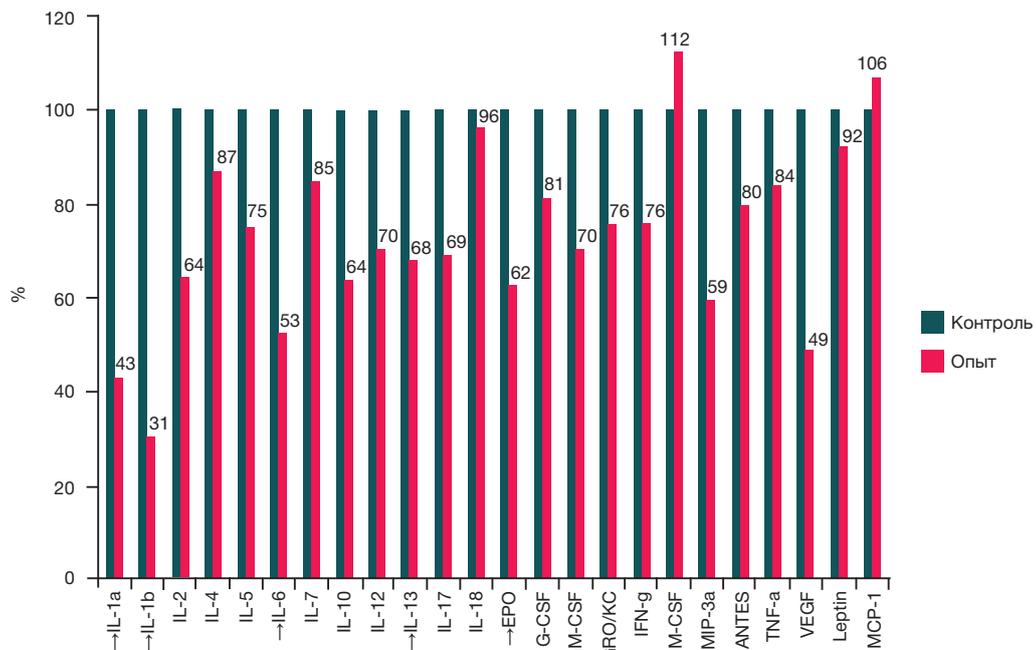


Рис. 2. Изменение содержания цитокинов в сыворотке крови крыс экспериментальной группы по сравнению с крысами контрольной группы через 5 суток после иммунизации. Содержание цитокинов в крови животных контрольной группы были приняты за 100 %. Достоверные различия показаны стрелками

которого являются макрофаги, дендритные клетки или фибробласты кожи.

Рост уровня продукции цитокинов на пятые и особенно седьмые сутки эксперимента, скорее всего, можно объяснить накоплением в организме животных клонально-специфичных лимфоцитов различных типов, среди которых могут быть лимфоциты с аутологичной реактивностью в отношении миелина. Для системной клональной экспансии Т-лимфоцитов характерна именно такая длительность реакции, после чего возникают внешние проявления физиологической реакции.

Наиболее значимые в абсолютном выражении различия между экспериментальной и контрольной группами на седьмые сутки эксперимента были выявлены для IL-18 — 2475,85/4182,05 пг/мл, RANTES — 756,78/1310,78 пг/мл,

MCP-1 (CCL-2) — 1909,68/3300,50 пг/мл и IL-2 — 743,52/1091,57 пг/мл. С учетом того, что для IL-2 доказана способность индуцировать продукцию многих других ростовых и гемопоэтических факторов [14], можно предположить, что именно этот лимфокин является индуктором таких неспецифических для иммунной системы факторов, как VEGF и эритропоэтин, а также IL-13, всплеск продукции которых запаздывал по фазе относительно IL-2. С учетом длительной персистенции высоких уровней продукции IL-2, по данным [10], характерной для пациентов с РС, можно предположить главную роль этого лимфокина в характерной для РС массовой пролиферации лимфоцитов за пределами ЦНС. Повышение уровня продукции IL-4, IL-5, IL-6, IL-7 и IL-13, также представляющих собой лимфопротерогенные и гемопоэтические факторы, на

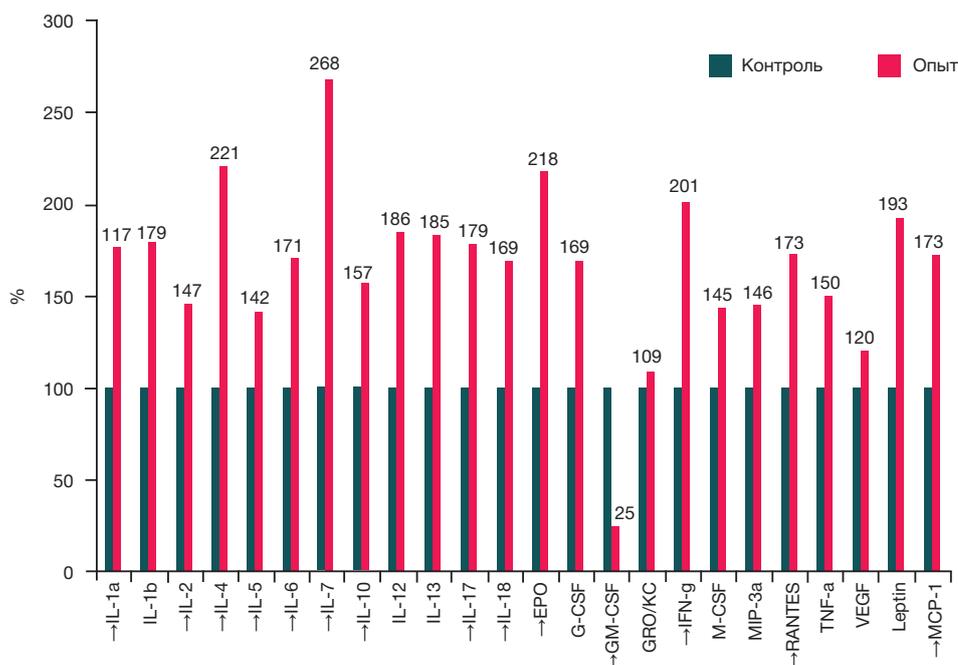


Рис. 3. Изменение содержания цитокинов в сыворотке крови крыс экспериментальной группы по сравнению с крысами контрольной группы через 7 суток после иммунизации. Содержание цитокинов в крови животных контрольной группы были приняты за 100 %. Достоверные различия показаны стрелками

фоне падения уровня продукции GM-CSF, можно рассматривать в качестве каскада, индуцированного при участии IL-2.

Для ЭАЭ у крыс в отличие от РС у человека не характерна продукция проапоптотических факторов, прежде всего TNF- α , несмотря на подъем уровня синтеза его классических индукторов — цитокинов IL12, IL-18 и IFN- γ [14]. Таким образом, рост содержания TNF- α при РС следует рассматривать скорее в качестве результата, а не причины поражения миелиновых оболочек. В то же время TNF- α может вносить существенный вклад в поражение астроцитов и нейронов на поздних стадиях развития РС.

В соответствии с описанной в работе [10] закономерностью, наблюдавшиеся нами подъем и спад продукции IFN- γ и RANTES (CCL-5) у крыс с ЭАЭ, происходившие синхронно, следует рассматривать как процессы, характерные и для РС у человека.

На ранней стадии развития ЭАЭ у крыс нами не было выявлено изменение уровня накопления в крови GRO/KC (CXCL1), ответственного за инфильтрацию лимфоцитов в ЦНС, что отличает модель от течения РС у человека (по данным [10]).

Для ЭАЭ у крыс и РС у человека в равной мере характерна гиперпродукция IL-17, которая может способствовать накоплению специфических лимфоцитов в ЦНС и активации у них цитотоксических функций.

Несмотря на выраженную гиперпродукцию IL-1b, для РС у человека характерно отсутствие участия в патогенетических реакциях нейтрофилов и факторов их таксиса и активации. В случае с моделью наблюдали похожую реакцию системы нейтрофилов. Фактор пролиферации предшественников нейтрофилов M-CSF не изменял своего содержания в процессе моделирования. То же наблюдали для MIP-3a (CCL20) — фактора защиты слизистых от бактериальной инфекции и лептина, отвечающего за повышение температуры при инфекции.

Гиперпродукцию IL-4 и IL-10 при ЭАЭ у крыс, особенно на фоне повышенного содержания IL-5, IL-13 и GM-CSF, следует рассматривать в качестве фактора, стимулирующего пролиферацию В-лимфоцитов. Теоретически этот

набор факторов может способствовать появлению олигоклональных антител, однако такой факт до настоящего времени никем не был описан.

Отвечая на вопрос о локализации очага пролиферации миелин-специфических лимфоцитов — внутри или вне ЦНС, необходимо отметить, что выбранная модель демонстрирует принципиальную возможность запуска этой реакции вне ЦНС. Однако динамика развития заболевания при ЭАЭ у крыс и РС у человека значительно различается. Нельзя исключать, что при развитии РС у человека первым событием является инфильтрация в ЦНС лимфоцитов, не прошедших клональную экспансию, которые затем подвергаются селекции в условиях избытка миелина. На аномальное поведение лимфоцитов в модели может влиять их первоначальная клонально-неспецифическая гиперпролиферация под действием системного или местного избытка лимфопролиферативных факторов и/или возникновение градиента лимфотактических факторов, исходящего из ЦНС. Альтернативой может быть инициация аномально быстрой деградации миелина в ЦНС, приводящая к массовому выходу продуктов его распада в системную циркуляцию. В этом случае модель является наиболее адекватной ранним стадиям РС у человека.

ВЫВОДЫ

Данные о динамике содержания цитокинов при ЭАЭ у крыс, полученные с помощью мультиплексного цитокинового теста, показали, что с точки зрения цитокинового профиля модель соответствует течению рассеянного склероза у человека в части динамики содержания системных лимфопролиферативных и гемопоэтических факторов: IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 и IL-7. В отношении факторов таксиса лимфоцитов, моноцитов и других клеток иммунной системы модель удовлетворительно имитирует поведение IL-17, RANTES (CCL-5) и MCP-1 (CCL-2), но отличается по поведению GRO/KC (CXCL1). Применительно к факторам, влияющим на цитотоксические и апоптотические реакции, модель схожа с течением РС у человека по таким ключевым факторам, как IFN γ , IL-6 и IL-17, но не по TNF α .