

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

РАЗЛИЧНЫЕ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ, ПРОДУЦИРУЕМОГО МИЕЛОИДНЫМИ КЛЕТКАМИ И Т-ЛИМФОЦИТАМИ, В МЫШИНОЙ МОДЕЛИ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

© 2012 г. А.А. Круглов^{*,**}, С.А. Недоспасов^{*,**,*}

^{*}Институт Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского и Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

^{**}Немецкий Ревматологический Исследовательский Центр (DRFZ), Институт Лейбница, Берлин, Германия;

^{***}ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Поступила: 16.08.2012. Принята: 10.09.2012

Фактор некроза опухолей (TNF) — провоспалительный и иммунорегуляторный цитокин, играющий важную роль в защите организма от внутриклеточных паразитов, а также в структурной организации лимфоидных органов. Сверхпродукция TNF может приводить к аутоиммунным заболеваниям, таким, как ревматоидный артрит, болезнь Крона и болезнь Бехтерева, причем при терапии всех этих заболеваний эффективны блокаторы TNF. С другой стороны, хотя повышенная концентрация TNF в больных рассеянным склерозом была установлена, клинические испытания блокаторов TNF при этом заболевании закончились неудачей. Нами исследованы специфические функции TNF, продуцируемого миелоидными клетками и лимфоцитами, в патогенезе экспериментального аутоиммунного энцефаломиелимита (ЭАЭ) — мышинной модели рассеянного склероза. Используя панель мышей с тканеспецифической инактивацией гена TNF, установлено, что TNF из миелоидных клеток ответственен за начальную фазу заболевания, а продуцируемый Т-клетками участвует в повреждении ЦНС. Частичная или полная блокировка TNF приводит к существенным иммунорегуляторным эффектам на развитие аутореактивных Th1 и Th17 клеток. Последнее обстоятельство и может быть причиной неэффективности терапии РС, основанной на системной блокировке TNF.

Ключевые слова: экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит, генетический нокаут, вторичные лимфоидные органы

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на свое название, физиологические функции фактора некроза опухолей (TNF) не связаны с иммунным контролем за опухолями [1, 2]. TNF является цитокином, регулирующим множество аспектов развития и поддержания функционального статуса иммунной системы. Исследования на мышах продемонстрировали важную роль TNF в защите организма от внутриклеточных патогенов,

а также в развитии и поддержании структуры вторичных лимфоидных органов [2, 3]. С другой стороны, повышенная продукция TNF может лежать в основе патогенеза острого или хронического воспаления, в т.ч. ассоциированного с целым рядом заболеваний, таких как ревматоидный артрит, болезнь Бехтерева, болезнь Крона, псориаз [4, 5], а также некоторые неоплазии [1]. Считается, что TNF может иметь отношение и к развитию рассеянного склероза (РС), хотя опубликованные данные на этот счет противоречивы. Известно, что для лечения некоторых аутоиммунных заболеваний, в первую очередь, артрита,

успешно применяются фармакологические блокаторы TNF [4, 5], однако клинические испытания, по крайней мере, одного блокатора, Летанерсепта, при РС провалились [6].

С другой стороны, системная нейтрализация такого важного иммунорегуляторного цитокина как TNF может приводить к серьезным побочным эффектам: реактивации туберкулеза, развитию других аутоиммунных заболеваний, повышению вероятности развития лимфом [7]. Кроме того, в недавних работах описаны нежелательные эффекты терапии на микроархитектуру лимфоидных органов и гуморальный иммунный ответ на вакцины [8, 9].

В предыдущих работах нашей лаборатории была экспериментально обоснована идея о том, что конкретные функции TNF могут быть опосредованы цитокином, произведенным только каким-то определенным типом или типами клеток [10, 11]. Работы, выполненные на панели мышей с генетической инактивацией TNF в том или ином клеточном компартменте, показали, что некоторые (не все) биологические функции TNF действительно обусловлены типом клеток-продуцентов. Так TNF, продуцируемый макрофагами, важен для защиты от листериоза. TNF, производимый В-лимфоцитами, важен для поддержания гомеостаза лимфоидных органов, в частности, для созревания кластеров фолликулярных дендритных клеток (ФДС), для синтеза гомеостатических хемокинов, ответственных за пространственную сегрегацию Т- и В-клеточных зон первичных фолликулов, и для качества иммунного ответа. С другой стороны, TNF, производимый макрофагами и нейтрофилами, играет центральную роль в патогенезе септического шока, индуцированного липополисахаридом (LPS) [10]. Признанной мышью моделью РС является экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЭАЭ), вызываемый иммунизацией пептидом из миелинового олигодендрогликового гликопротеина (MOG). Именно эта экспериментальная методика индукции заболевания была применена к панели мышей с тканеспецифической инактивацией гена TNF. Отметим, что в литературе имеются противоречия друг другу публикации о роли TNF в ЭАЭ [12–14].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Линии мышей

Используемые линии мышей были описаны ранее [10, 15]. Специфическая делеция

гена TNF осуществлялась с помощью системы loxP-Cre рекомбинации, причем у T-TNF KO мышей ген рекомбиназы Cre находился под контролем промотора-энхансера CD4 (но при этом из-за стадии двойных положительных Т-клеток, удаление гена TNF происходило и в CD4, и в CD8 клетках), у B-TNF KO мышей — под контролем промотора CD19, и у M-TNF KO мышей — под контролем промотора лизозимового гена Mlys. Все линии были на генетической основе C57BL/6. Для получения линии M+T-TNF KO, были скрещены между собой T-TNF KO и M-TNF KO, а затем особи, содержащие оба трансгена, были отобраны генотипированием. В большинстве экспериментов в качестве контролей использовались мыши из тех же поместов, но с генотипом мышей дикого типа.

Индукция экспериментального аутоиммунного энцефалита (ЭАЭ) и оценка течения заболевания

Мышей иммунизировали подкожно 50 мкг пептида из белка MOG (аминокислоты 35–55) в полном адъюванте Фрейнда. Коклюшный токсин (220 нг/мышь) вводился внутривенно на 0 и 2 день. Тяжесть заболевания (в условных единицах от 0 до 6) оценивалась по следующим показателям: 0 — нет признаков болезни, 1 — вялый хвост, 2 — нарушение рефлекса переворачивания со спины на живот, 3 — частичный паралич задних конечностей, 4 — полный паралич задних конечностей, 5 — полный паралич задних конечностей и частичный паралич передних конечностей, 6 — животные при смерти.

Анализ клеток из периферических лимфоидных органов

Свежевыделенные клетки селезенки суспендировались в концентрации 8×10^6 клеток на мл и рестимулировались пептидом MOG_{35–55} в конечной концентрации 40 мкг/мл в течение ночи. Для внутриклеточного окрашивания цитокинов на последние 4 часа инкубации добавлялся брефельдин А (Sigma, B6542) до концентрации (5 мкг/мл).

Проточная цитофлуориметрия

Перед окрашиванием Fc рецепторы на клетках блокировали антителом 2.4G2 (10 мкг/мл). Анализ иммунофенотипа клеток осуществлялся антителами к соответствующим поверхностным антигенам: CD4-biotin, CD4-Cy5

(GK1.5), а также цитокинов: IFN γ -FITC (AN18.17.24), IL-17 (PE, TC11-18H10). Вторичные реагенты были от BD Biosciences. Измерения проводились на приборе FACSCalibur (BD Biosciences).

Статистический анализ

Результаты оценивали по критерию Стьюдента ($p < 0,05$ считали статистически значимым).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Различия в развитии ЭАЭ у мышей с частичной генетической блокировкой продукции *TNF*

В первой серии экспериментов заболевание индуцировали у трех линий мышей, с делецией генов *TNF*, соответственно, в миелоидных клетках (М-*TNF* KO), Т-лимфоцитах (Т-*TNF* KO) и В-лимфоцитах (В-*TNF* KO), и сравнивали кинетику развития и тяжесть заболевания с таковыми для мышей дикого типа (рис. 1). Мыши, не способные производить *TNF* миелоидными клетками, демонстрировали задержку в развитии клинических симптомов паралича (рис. 1А), что свидетельствовало о том, что *TNF*, производимый миелоидными клетками участвует в индукции заболевания. Удаление *TNF* в Т-лимфоцитах не влияло на время индукции паралича, но существенно снижало тяжесть заболевания (рис. 1Б), демонстрируя тем самым важную роль *TNF*, производимого Т-клетками, в патогенезе заболевания.

Протекание ЭАЭ у В-*TNF* KO мышей проходило так же, как у контрольных мышей (рис. 1В), что свидетельствует о том, что *TNF* из В-клеток не важен для развития данной модели заболевания, хотя он важен для поддержания структуры лимфоидных органов [11, 16], также может быть патогенным при других болезнях.

Эти результаты показали, что патогенный *TNF* в ЭАЭ происходит, по крайней мере, из двух клеточных источников — миелоидных клеток (макрофагов и нейтрофилов) и Т-лимфоцитов.

Вклад *TNF*, продуцируемого миелоидными и Т-клетками, в патогенез заболевания

В следующей серии экспериментов мы поставили задачу оценить суммарный вклад миелоидных клеток и Т-клеток, как продуцентов патогенного *TNF*, в развитие ЭАЭ. Для

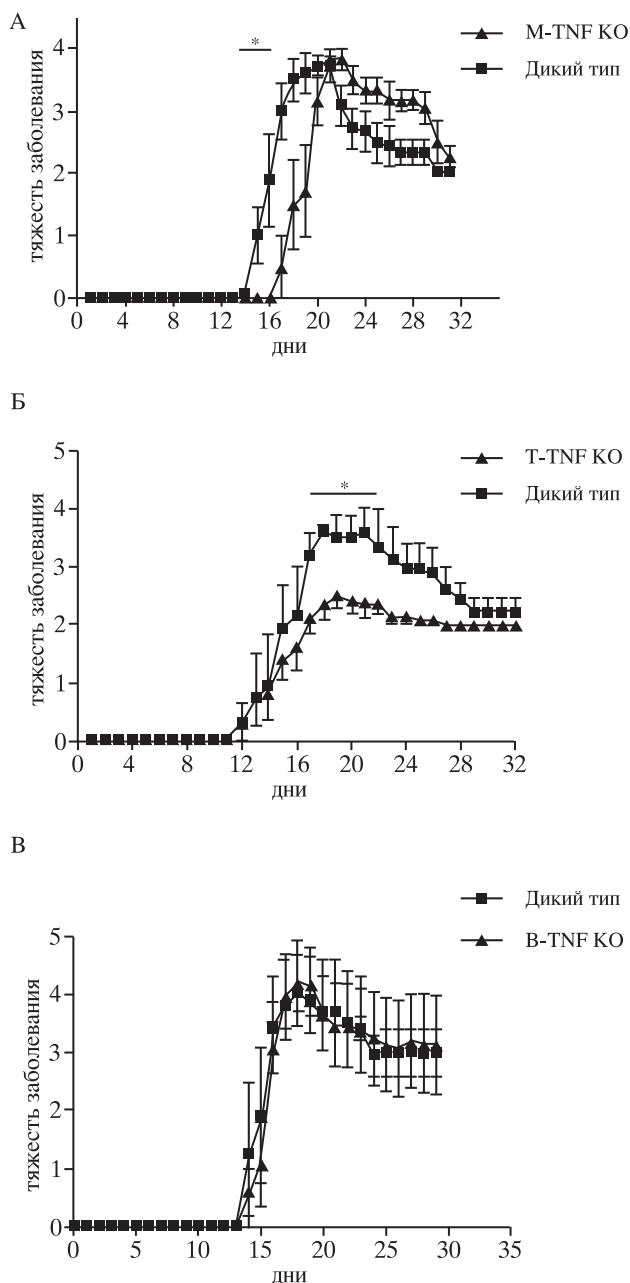


Рис. 1. Особенности индукции и протекания ЭАЭ у мышей с тканеспецифической делецией гена *TNF*. ЭАЭ индуцировали в М-*TNF* KO (А), Т-*TNF* KO (Б) и В-*TNF* KO (В) мышах и мышах дикого типа. Анализ тяжести заболевания оценивали каждый день согласно критериям, описанным в разделе «Материалы и методы».

этого была получена еще одна линия мышей, М,Т-*TNF* KO, в которой делеция гена *TNF* проходила с высокой эффективностью и в миелоидных клетках, и в Т-лимфоцитах. Это возможно, поскольку трансгенные конструкторы, контролирующие экспрессию *Cre* рекомбиназы у М-*TNF* KO и Т-*TNF* KO, разные и находятся в разных участках генома.

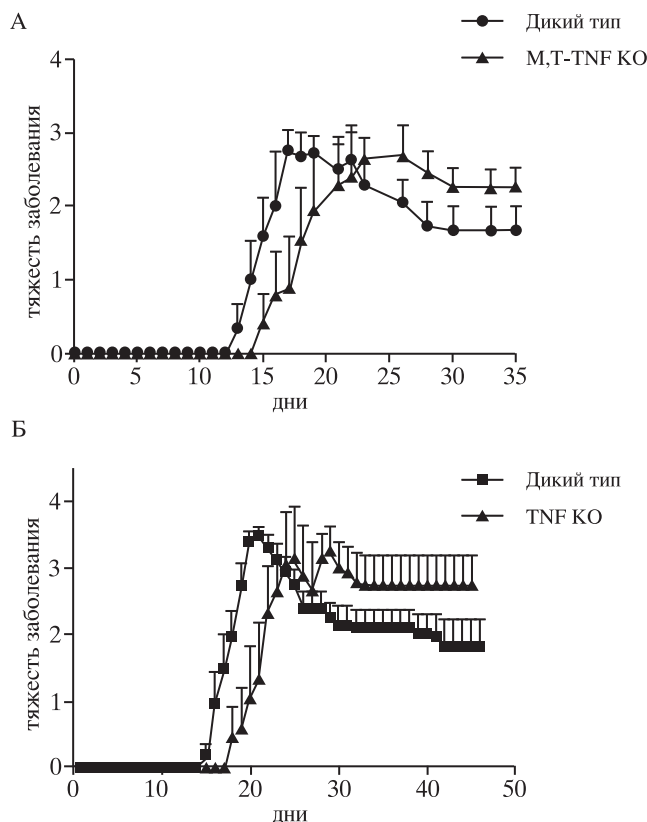


Рис. 2. Сравнение болезни у мышей с комбинированной инактивацией TNF (M,T-TNF KO) и мышей полностью дефицитных по TNF (TNF KO).

ЭАЭ индуцировали в M,T-TNF KO (А), TNF KO (Б) мышцах и мышцах дикого типа. Анализ тяжести заболевания оценивали каждый день согласно критериям, описанным в разделе «Материалы и методы».

Развитие заболевания у M,T-TNF KO мышей сравнивали с таковым у мышей с полной инактивацией TNF (во всех клетках) — TNF KO (рис. 2). Оказалось, что у M,T-TNF KO практически воспроизводится картина развития заболевания в TNF KO мышцах — оно отличается от мышей дикого типа как запаздыванием развития симптомов и снижением тяжести заболевания на пике, так и переходом в хроническую форму (рис. 2 А, Б).

Таким образом, мы установили, что TNF, продуцируемый суммарно миелоидными клетками и Т-лимфоцитами, и составляет основной «патогенный» TNF для ЭАЭ. При этом, эти два типа клеток могут действовать в разных гистологических компартментах и с разной кинетикой относительно хода развития заболевания. Эти данные хорошо коррелируют с результатом из рис. 1, указывающим на то, что TNF из В-клеток не вносит заметного вклада в ЭАЭ.

Системные эффекты блокировки TNF и продукция Th1 и Th17 клеток в периферических лимфоидных органах

Терапия аутоиммунных заболеваний блокаторами TNF имеет ряд побочных эффектов, которые объясняются тем, что физиологическая активность TNF проявляется в разных органах и тканях и необязательно связана собственно с заболеванием. Например, лимфоидные органы пациентов, проходящих терапию, связанную с хронической блокировкой TNF, имеют те же признаки разрушенной микроархитектуры, как и лимфоидные органы TNF KO мышей, или мышей дикого типа, в который вводился фармакологический блокатор TNF [8].

Допуская, что эффекты полной или частичной генетической блокировки TNF при ЭАЭ, могут проявиться и вне ЦНС, мы проанализировали развитие иммунного ответа в лимфоидных органах из больных мышей. Исходя из того, что Т-хелперные лимфоциты важны для развития ЭАЭ, мы измерили как делеция TNF в отдельных видах клеток влияет на их содержание в селезенке. Нами было обнаружено, что частота и абсолютное количество обоих субтипов Т-клеток значительно повышена в T-TNF KO и M-TNF KO мышцах на пике заболевания (день 20-й после иммунизации) (рис. 3А, Б). В то же время на 35-й день после индукции заболевания, повышенное содержание наблюдалось только в T-TNF KO и TNF KO мышцах (рис. 3В). Подобная закономерность была обнаружена ранее при лечении экспериментального артрита фармакологической блокировкой TNF в мышцах [17].

Таким образом, при ЭАЭ блокировка TNF приводит как к локальным эффектам в ЦНС, так и к системным эффектам, на уровне периферических лимфоидных органов.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе продолжено начатое нашей лабораторией систематическое исследование специфических, отдельных функций TNF, продуцируемого отдельными типами клеток. В этом исследовании мы интересовались ролью TNF из миелоидных клеток и из лимфоцитов, в патогенезе экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ) — мышинной модели рассеянного склероза. Следует сразу подчеркнуть,

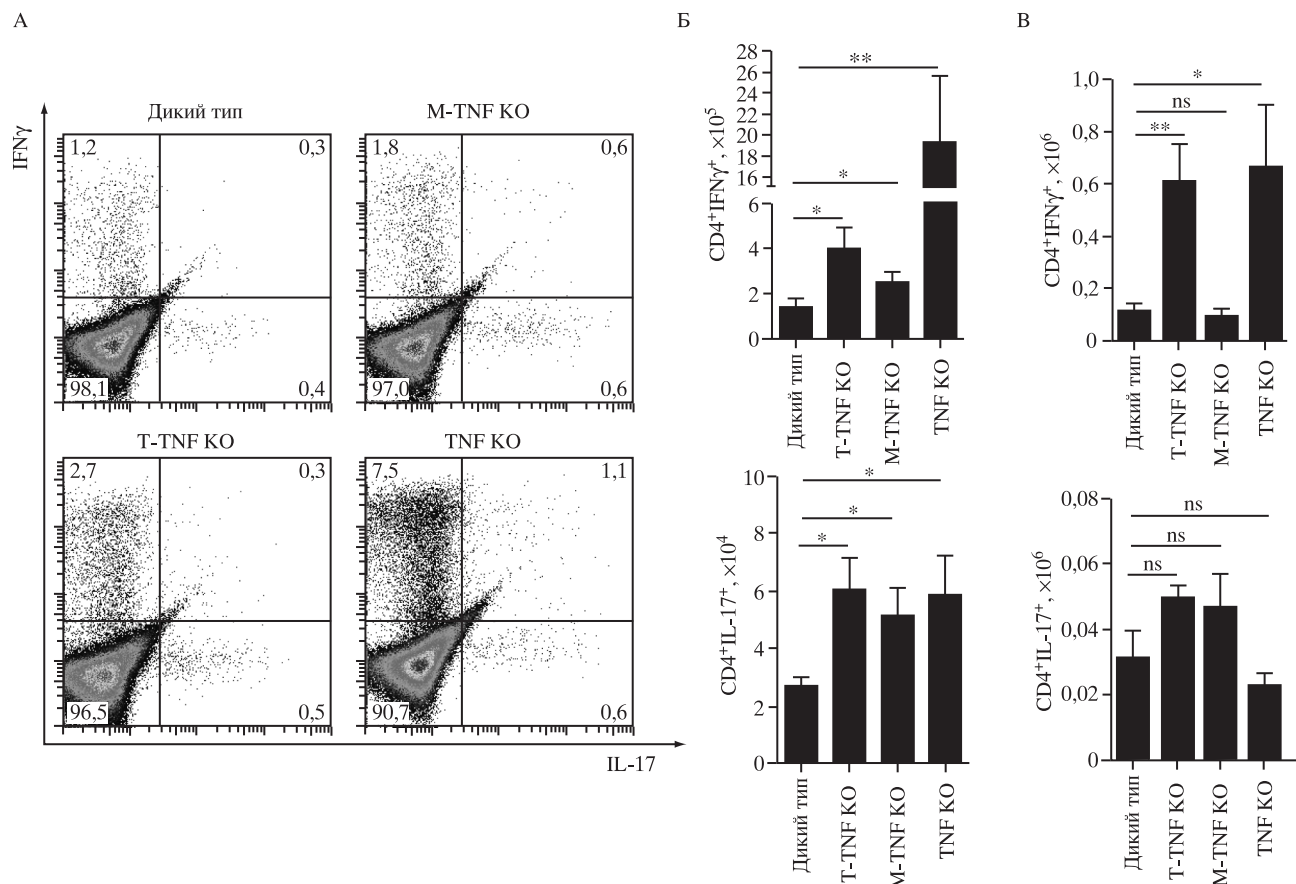


Рис. 3. Развитие хелперов Th1 и Th17 типа в лимфоидных органах мышей с полной или частичной инактивацией *TNF*.

А. Типичные точечные диаграммы $CD4^+$ Т-клеток селезенки, производящих $IFN\gamma$ (Th1) и IL-17 (Th17) на 20-й день после иммунизации в T-TNF KO, M-TNF KO, TNF KO мышах и в мышах дикого типа. Количество Th1 ($CD4^+IFN\gamma^+$) и Th17 ($CD4^+IL-17^+$) в селезенке на 20-й (**Б**) и 35-й день (**В**) после индукции заболевания в T-TNF KO, M-TNF KO, TNF KO и в мышах дикого типа.

что наши генетические данные однозначно поддерживают идею о патогенной роли *TNF* в ЭАЭ. Далее, используя панель мышей с кондиционной инактивацией гена *TNF*, мы установили, что *TNF* из миелоидных клеток ответственен за начальную фазу заболевания. *TNF*, продуцируемый Т-клетками, участвует в повреждении ЦНС в эффекторной стадии развития заболевания. Хотя *TNF* из В-лимфоцитов важен для организации микроструктуры лимфоидных органов и продукции антител [11, 16], он не вносит заметного вклада в патогенез ЭАЭ. Тот факт, что один и тот же цитокин из различных клеточных источников, может действовать по-разному в развитии заболевания, может быть объяснено либо различной кинетикой его продукции, разной реакцией на разные стимулы, разным вкладом клеток из конкретных гистологических отделов, а также различиями в молекулярной форме *TNF*. Хотя специфичные для

разных клеток-продуцентов пост-синтетические модификации *TNF* не установлены, известно, что Т-лимфоциты производят больше мембранно-связанного *TNF*, чем макрофаги или В-клетки. Тем самым, часть биологических эффектов *TNF*, продуцируемого Т-клетками, предполагает специфические контакты Т-клеток с клетками, экспрессирующими рецепторы *TNF*.

Нами показано, что кроме воздействия на клетки ЦНС частичная или полная блокировка *TNF* приводит к существенным иммунорегуляторным эффектам во вторичных лимфоидных органах, т.к. полное удаление гена *TNF*, или удаление его в миелоидных клетках и — особенно — в Т-клетках, приводит к значительному увеличению аутореактивных Th1 и Th17 клеток. Одним из молекулярных медиаторов этого процесса является IL-6 [18]. Эти обстоятельства и могут объяснять неэффективность терапии РС, основан-

ной на системной блокировке TNF. Наши результаты позволяют предположить, что фармакологическая блокировка TNF только на «главных» типах клеток, вносящих вклад в патогенез конкретного аутоиммунного заболевания, может иметь преимущества перед существующими схемами анти-цитокиновой терапии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа осуществлена при поддержке гранта Президиума РАН «Фундаментальные науки — медицине», гранта РФФИ 11-04-12159-ОФИ-М и Госконтракта № 16.512.11.2054 Министерства образования и науки РФ.

Мы благодарны В. Лампропулу и С. Филатре за методическую помощь и Л.Н. Друцкой за генотипирование мышей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 2009, 9(5), 361 — 371.
2. Nedospasov S.A., Grivennikov S.I., Kuprash D.V. Physiologic roles of members of the TNF and TNF receptor families as revealed by knockout models. In: *Contemporary immunology: Cytokine Knockouts*, 2nd edition, Fantuzzi G. (ed.), Humana Press, Inc., Totowa, NJ 2003, 439 — 460.
3. Kruglov A.A., Kuchmiy A.A., Grivennikov S.I., Tumanov A.V., Kuprash D.V., Nedospasov S.A. Physiological functions of Tumor Necrosis Factor and the consequences of its pathologic overexpression or blockade: mouse models. *Cytokine Growth Factors Rev.* 2008, 19, 231 — 244.
4. Tracey D., Klareskog L., Sasso E.H., Salfeld J.G., Tak P.P. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol. Ther.* 2008, 117(2), 244 — 279.
5. Feldmann M., Maini R.N. Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Annu. Rev. Immunol.* 2001, 19, 163 — 196.
6. The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group. TNF neutralization in MS: results of a randomized, placebo-controlled multicenter study. *Neurology* 1999, 53, 457 — 465.
7. Winthrop K.L. Risk and prevention of tuberculosis and other serious opportunistic infections associated with the inhibition of tumor necrosis factor. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 2006, 2(11), 602 — 610.
8. Anolik J.H., Ravikumar R., Barnard J., Owen T., Almudevar A. et al. Anti-tumor necrosis factor therapy in rheumatoid arthritis inhibits memory B lymphocytes via effects on lymphoid germinal centers and follicular dendritic cell networks. *J. Immunol.* 2008, 180(2), 688 — 692.
9. Kobie J.J., Zheng B., Bryk P., Barnes M., Ritchlin C.T. et al. Decreased influenza-specific B cell responses in rheumatoid arthritis patients treated with anti-tumor necrosis factor. *Arthritis Res. Ther.* 2011, 13(6), R209.
10. Grivennikov S.I., Tumanov A.V., Liepinsh D.J., Kruglov A.A., Nedospasov S.A. et al. Distinct and nonredundant in vivo functions of TNF produced by T cells and macrophages/neutrophils: protective and deleterious effects. *Immunity* 2005, 22(1), 93 — 104.
11. Tumanov A.V., Grivennikov S.I., Kruglov A.A., Kuprash D.V., Nedospasov S.A. Cellular source and molecular form of TNF specify its distinct functions in organization of secondary lymphoid organs. *Blood*. 2010, 116(18), 3456 — 3464.
12. 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, 172, 1193 — 1200.
13. Liu J., Marino M.W., Wong G., Grail D., Dunn A., Bettadapura J., Slavin A.J., Old L., Bernard C.C. TNF is a potent anti-inflammatory cytokine in autoimmune-mediated demyelination. *Nat. Med.* 1998, 4, 78 — 83.
14. Arnett H.A., Mason J., Marino M., Suzuki K., Matsushima G.K., Ting J.P. TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat. Neurosci* 2001, 4, 1116 — 1122.
15. Kuprash D.V., Tumanov A.V., Liepinsh D.J., Grivennikov S.I., Nedospasov S.A. et al. Novel tumor necrosis factor-knockout mice that lack Peyer's patches. *Eur. J. Immunol.* 2005, 35(5), 1592 — 1600.
16. Endres R., Alimzhanov M.B., Nedospasov S.A., Rajewsky K., Pfeffer K. Mature follicular dendritic cell networks depend on expression of lymphotoxin beta receptor by radioresistant stromal cells and of lymphotoxin beta and tumor necrosis factor by B cells. *J. Exp. Med.* 1999, 189(1), 159 — 168.
17. Notley C.A., Inglis J.J., Alzabin S., McCann F.E., McNamee K.E., Williams R.O. Blockade of tumor necrosis factor in collagen-induced arthritis reveals a novel immunoregulatory pathway for Th1 and Th17 cells. *J. Exp. Med.* 2008, 205(11), 2491 — 2497.
18. Kruglov A.A., Lampropoulou V., Fillatreau S., Nedospasov S.A. Pathogenic and protective functions of TNF in neuroinflammation are defined by its expression in T lymphocytes and myeloid cells. *J. Immunol.* 2011, 187, 5660 — 5670.

DIFFERENT PROINFLAMMATORY EFFECTS OF TUMOR NECROSIS FACTOR PRODUCED BY MYELOID CELLS AND T-CELLS, IN A MOUSE MODEL OF MULTIPLE SCLEROSIS

A.A. Kruglov^{*,**}, S.A. Nedospasov^{*,**,*}

**Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Faculty of Fundamental Medicine
M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;*

***German Rheumatism Research Centre (DRFZ), a Leibniz Institute, Berlin, Germany;*

****Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

Tumor Necrosis Factor (TNF) is an important proinflammatory and immunomodulatory cytokine which plays critical role in host defense against intracellular bacterial infections and in the maintenance of lymphoid tissues microstructure. TNF overexpression may lead to autoimmune diseases, such as rheumatoid arthritis, Crohn's disease, ankylosing spondylitis, and some others, and in such cases TNF blockers are effective therapeutics. On the other hand, although increased concentrations of TNF in multiple sclerosis (MS) were observed, clinical trials with TNF blockers have failed in this disease. We have analyzed the specific functions of TNF produced by myeloid cells and by lymphocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis – a mouse model of MS. Using a panel of mice with tissue-specific inactivation of TNF gene, we found that TNF from myeloid cells is responsible for the initial phase of the disease, while TNF produced by T cells contributes to CNS damage. Partial or complete TNF inactivation has immunoregulatory effects on the development of autoreactive Th1 and Th17 subsets. This may be the reason for inefficiency of the MS therapies based on systemic TNF blockade.