

УДК 616.832.522-002

Н. П. Волошина, О. В. Егоркина
**РОЛЬ ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ БОКОВОМ АМИОТРОФИЧЕСКОМ СКЛЕРОЗЕ: ДВЕ СТОРОНЫ
 ОДНОЙ МЕДАЛИ**

N. P. Voloshyna, O. V. Yegorkina
РОЛЬ ЗАПАЛЕННЯ ПРИ БІЧНОМУ АМІОТРОФІЧНОМУ СКЛЕРОЗІ: ДВІ СТОРОНИ ОДНІЄЇ МЕДАЛІ
THE ROLE OF INFLAMMATION IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS: TWO SIDES OF THE SAME COIN

Боковой амиотрофический склероз (БАС) — нейродегенеративное заболевание, при котором происходит избирательная гибель и нижних, и верхних двигательных нейронов. Потеря двигательных нейронов и активация иммунной системы образуют замкнутый круг, и какую роль играет нейровоспаление — положительную или отрицательную — все еще является предметом обсуждения с поддержкой двойной роли или дифференцированной активации микроглии.

Полученные результаты свидетельствуют об активном участии про- и противовоспалительных цитокинов в реализации патологического процесса при БАС. В условиях активации микроглии нами отмечена интенсивная экспрессия плеiotропного IL-4, наблюдаемая на фоне умеренного увеличения экспрессии провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF- α , что свидетельствует о невыполнении им нейропротективной функции и не исключает его роли в индукции апоптоза.

Ключевые слова: боковой амиотрофический склероз, нейровоспаление, цитокины

Бічний аміотрофічний склероз (БАС) — нейродегенеративне захворювання, при якому відбувається виборча загибель і нижніх, і верхніх рухових нейронів. Втрата рухових нейронів і активація імунної системи утворюють замкнуте коло, і — яку роль відіграє нейрозапалення — позитивну чи негативну, все ще є предметом обговорення з підтримкою подвійної ролі або диференційованої активації мікроглії.

Отримані результати свідчать про активну участь про- і протизапальних цитокинів в реалізації патологічного процесу при БАС. В умовах активації мікроглії нами відзначена інтенсивна експресія плеіотропного IL-4, яка спостерігається на тлі помірного збільшення експресії прозапальних цитокинів IL-1 β , IL-6 і TNF- α , що свідчить про невиконання ним нейропротективної функції і не виключає його ролі в індукції апоптозу.

Ключові слова: бічний аміотрофічний склероз, нейрозапалення, цитокини

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disorder that results in the selective death both lower and upper motor neurons. The loss of motor neurons and the activation of the immune system form a vicious circle, and the role played by neuroinflammation, either positive or negative, is still subject to discussion with the support of the dual role or differentiated activation of microglia.

The findings suggest that the active participation of both pro- and anti-inflammatory cytokines in the implementation of the pathological process in ALS. In conditions of microglial activation, we noted the intense expression of pleiotropic IL-4 on the background of the moderate increase of expression of proinflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α , indicating that it does not perform a neuroprotective function and does not exclude its role in the induction of apoptosis

Боковой амиотрофический склероз (БАС) — нейродегенеративное заболевание, при котором происходит избирательная гибель и нижних, и верхних двигательных нейронов, но причина дегенерации нейронов до настоящего времени остается гипотетической. Существуют сообщения об экспериментальных (на трансгенных мышиных моделях) и клинических наблюдениях участия иммунной системы в патогенезе БАС [19, 20, 23, 25] и ее нейропротективном или нейропротективном ответе на патологический процесс. И хотя некоторые иммуномодулирующие терапии показали свою эффективность на мышиных моделях: миноциклин отсрочивал начало и прогрессирование болезни [17]; ингибитор циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2) целекоксиб отсрочивал начало болезни [12]; ингибитор TNF- α и активированный протеин С увеличивали выживаемость мышей [24, 26], тем не менее, исследования этих иммунных терапий на людях не имели успеха [18]. Компанией Teva проведено клиническое исследование глатирамера ацетата (GA) (Сораконе®) (40 мг/мл подкожно ежедневно) для терапии БАС. Данный препарат, утвержденный для лечения ремиттирующего рассеянного склероза (20 мг/мл GA), является иммуно-

модулирующим препаратом, который имеет противовоспалительные и нейропротекторные свойства, и, как полагают, может иметь терапевтическое значение при БАС. Однако GA не оказал положительного эффекта при данном заболевании [10].

Иммунная система играет существенную роль в поддержании клеточного гомеостаза и ее причастность объясняет процесс нейровоспаления при нейродегенеративном заболевании с активацией микроглии, инициирующей цитокиновый ответ, участвующий в гибели нейрона (рис. 1) [9]. Потеря двигательных нейронов и активация иммунной системы образуют замкнутый круг, увеличивая стресс нейронов и приводя к увеличению нейровоспаления, хотя это только айсберг в патогенезе БАС. И какую роль играет нейровоспаление — положительную или отрицательную — все еще является предметом обсуждения.

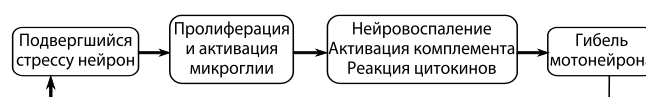


Рис. 1. Гипотеза активации врожденного иммунитета при боковом амиотрофическом склерозе

Микроглия, как основной медиатор системы иммунной защиты центральной нервной системы (ЦНС), активируясь, продуцирует либо нейропротективные, либо провоспалительные элементы, в том числе про- и противовоспалительные цитокины, хемокины, оксид азота, простагландины, факторы роста и разновидности супероксида, которые могут уменьшать или увеличивать темп первичной дегенерации мотонейронов, стимулируя ее принять либо M1 (цитотоксический), либо M2 (протективный) фенотип. Активированная микроглия является основным источником провоспалительных цитокинов в головном мозге и отмечено увеличение экспрессии IL-1 β , IL-6 и TNF- α [5, 11, 14, 15] с возрастом.

«Хорошая» микроглия или «плохая» является активно обсуждаемым вопросом, с поддержкой двойной роли или дифференцированной активации микроглии. Считается, что краткосрочная активация микроглии не вредна. Однако хроническая активация микроглии является самой разрушительной реакцией микроглии [7]. Гиперактивированная микроглия создает порочную самораспространяющуюся положительную обратную связь, которая приводит к неконтролируемой, длительной активации микроглии и гибели нейронов, приводя к хроническому прогрессирующему нейродегенерации [13].

Роль микроглии при спорадическом БАС, как это видим мы, представлена на рис. 2.

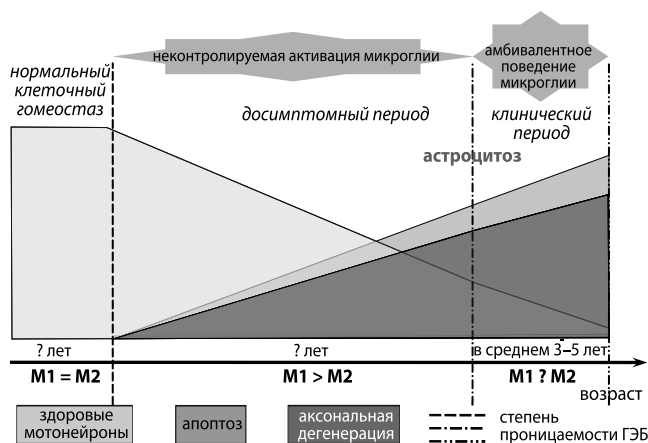


Рис. 2. Иммунологическая схематическая временная шкала течения спорадического бокового амиотрофического склероза. Указаны предлагаемые отношения M1 и M2 микроглии во времени. Схема не учитывает существующую возрастную активацию микроглии

С целью изучения цитокинопосредованных механизмов развития воспаления нами проведена оценка уровня цитокинов с провоспалительными (фактор

некроз опухоли α — TNF- α , интерлейкин-1 β — IL-1 β , интерлейкин-6 — IL-6) и противовоспалительными (интерлейкин-4 — IL-4) функциями у больных БАС.

В настоящей работе представлены результаты биохимического обследования 28 пациентов с БАС и 10 пациентов с другими неврологическими заболеваниями (НЗ), которые проходили лечение в отделении нейроинфекций и рассеянного склероза ГУ ИНПН НАМН Украины в 2010—2013 гг. В группу БАС были включены больные с диагнозом достоверного БАС, которые также были разделены на подгруппы в зависимости от формы и длительности заболевания.

Кровь для анализов брали в утренние часы (с 8 до 10 часов). Люмбальная пункция была проведена после получения информированного согласия. Пробы ликвора не хранились при комнатной температуре, а доставлялись для исследования в сухом льду (при температуре $-78,5^{\circ}\text{C}$).

Концентрацию цитокинов определяли методом иммуноферментного анализа с использованием соответствующих тест-систем (ЗАО «Вектор-Бест», Россия), выражали в пикограммах на миллилитр (пг/мл). Значения представлены в виде средних значений со стандартными отклонениями.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли методом вариационной статистики на персональном компьютере с использованием программы MS Excel путем расчета средних арифметических величин и ошибок средних. Для оценки достоверности различий двух величин использовали параметрический критерий Стьюдента. Критический уровень значимости при этом принимали равным 0,05.

Количественное распределение уровней цитокинов в сыворотке крови и ликворе обследованных пациентов приведено в таблице.

Средний уровень для здоровых людей (контрольные значения) взят из инструкций производителя реагентов [1—4].

У пациентов с БАС средние значения уровней цитокинов IL-1 β , IL-4, IL-6 и TNF- α в сыворотке крови и ликворе не имели достоверных отличий (рис. 3).

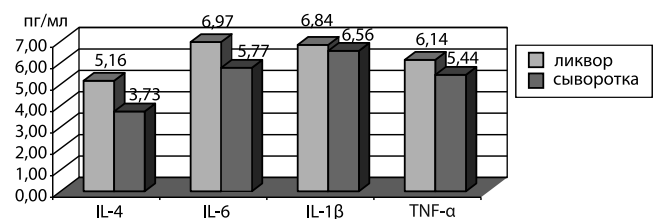


Рис. 3. Средние значения уровней цитокинов в сыворотке крови и ликворе у больных БАС

Показатели состояния иммунной системы в группах пациентов

Показатель	БАС		Группа сравнения		Контрольные значения
	сыворотка крови	ликвор	сыворотка крови	ликвор	
IL-1 β , пг/мл	6,56 \pm 3,98*	6,84 \pm 3,19*	8,13 \pm 6,47	8,93 \pm 4,73	1,63 \pm 0,48
IL-4, пг/мл	3,73 \pm 2,42*	5,16 \pm 1,97*	3,69 \pm 0,66	6,82 \pm 2,05	0,24 \pm 0,04
IL-6, пг/мл	5,77 \pm 4,33*	6,97 \pm 3,24*	8,24 \pm 2,60	9,24 \pm 4,12	2,08 \pm 0,12
TNF- α , пг/мл	5,44 \pm 4,70*	6,14 \pm 2,73*	6,59 \pm 1,39	7,63 \pm 4,74	0,51 \pm 0,20

Примечание: * — достоверность в сравнении с контролем ($p < 0,05$)

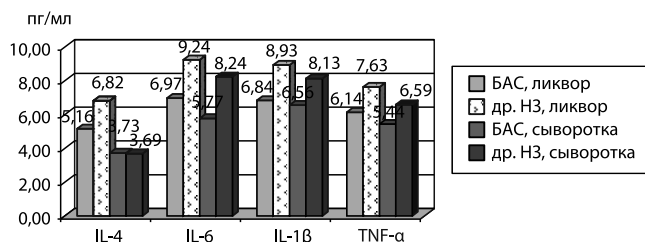


Рис. 4. Средние значения уровня цитокинов в сыворотке крови и ликворе пациентов с БАС и с другими НЗ

Не было достоверных отличий и между уровнями цитокинов у пациентов с БАС и пациентов с другими НЗ (рис. 4), тогда как уровни IL-1β, IL-4, IL-6 и TNF-α пациентов с БАС достоверно превысили средние значения этих показателей у здоровых людей, определенные производителем реагентов (рис. 5).

Цитокин IL-1β является важным медиатором воспалительной реакции, а также участвует в различных клеточных процессах, включая пролиферацию, дифференциацию и апоптоз. Уровень IL-1β, который является ключевым провоспалительным цитокином, варьировал от 3,45 до 16,80 пг/мл в сыворотке крови и от 2,90 до 13,20 пг/мл в ликворе. Средний уровень IL-1β равнялся в сыворотке крови $6,56 \pm 3,98$ пг/мл и в ликворе $6,84 \pm 3,19$ пг/мл, что достоверно выше приведенного в инструкции ($1,63 \pm 0,48$ пг/мл), определенного у здоровых людей производителем реагента [2], и превышал его в 4 раза. По отношению к группе сравнения достоверных отличий не выявлено (см. табл.).

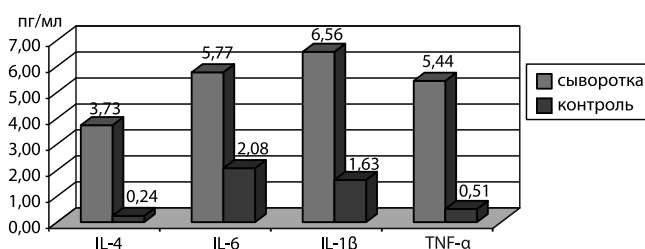


Рис. 5. Сравнение показателей средних уровней цитокинов в сыворотке крови пациентов с БАС и здоровых людей

Концентрация IL-4, подавляющего активность макрофагов и процесс биосинтеза ими цитокинов IL-1, TNF-α, IL-6, то есть оказывающего противовоспалительный эффект, в сыворотке крови и ликворе достоверно превысила среднее значение у здоровых, указанное в инструкции ($0,24 \pm 0,04$ пг/мл) [3], составив у обследованных нами пациентов с БАС $3,73 \pm 2,42$ пг/мл (предел колебаний от 2,20 до 10,30 пг/мл) и $5,16 \pm 1,97$ пг/мл (предел колебаний от 2,47 до 10,50 пг/мл), соответственно, и превышала его в 15,5 раза в сыворотке крови и в 21,5 раза в ликворе.

Концентрация IL-6, регулирующего острофазный ответ, воспаление и другие механизмы иммунного ответа, достоверно превысила среднее значение этого цитокина у здоровых людей, указанное в инструкции ($2,08 \pm 0,12$ пг/мл) [4], составив $5,77 \pm 4,33$ пг/мл в сыворотке крови (предел колебаний от 2,98 до 17,40 пг/мл) и $6,97 \pm 3,24$ пг/мл (предел колебаний от 3,50 до 15,30 пг/мл) в ликворе у обследованных нами пациентов и превысил среднее значение этого цитокина у здоровых людей в 2,8 и 3,3 раза, соответственно. Повышенный уровень IL-6 при БАС может отражать текущий гуморальный иммунный ответ, или IL-6 может быть

неспецифически экспрессируемым у этих пациентов, как предполагаемый нейротрофический фактор в ответ на дегенерацию нервных клеток [22].

TNF-α — плеотропный провоспалительный цитокин, по своей биологической активности близкий к IL-1β. TNF-α служит одним из медиаторов деструкции тканей, обычной при длительном, хроническом воспалении. Его уровень варьировал от 2,85 до 18,60 пг/мл в сыворотке крови, составив в среднем $5,44 \pm 4,70$ пг/мл, и от 2,99 до 16,00 пг/мл в ликворе, составив в среднем $6,14 \pm 2,73$ пг/мл в сравнении с указанным в инструкции для здоровых людей $0,51 \pm 0,20$ пг/мл [1] и превышал уровень в 10,7 раза в сыворотке крови и в 12 раз — в ликворе. По данным литературы, если TNF-α присутствует в большом количестве, он распространяется в системный кровоток, где стимулирует выработку IL-1β и IL-6 лейкоцитами и активирует образование интраваскулярных тромбов [8].

Функции TNF-α биологически зависят от количества продуцируемого цитокина. Он действует как аутокринный и паракринный медиатор воспаления в лейкоцитах и эндотелиальных клетках, определяет экспрессию поверхностных рецепторов для миграции лейкоцитов, действуя как ангиогенный фактор, и индуцирует апоптоз.

Мы обратили внимание, что у большинства пациентов с БАС концентрация TNF-α в плазме остается на повышенном уровне в течение всей продолжительности заболевания. Этот результат позволяет подтвердить предположение, что TNF-α путь может быть активирован уже на первой стадии заболевания [8]. (Примечание: к повышенным относили показатели, превышающие верхнюю границу референсного интервала, указанную в инструкциях к соответствующим наборам реагентов).

Известно, что нейропротективные Tregs увеличены в периферической крови пациентов с БАС на ранних стадиях заболевания, но их число уменьшается с прогрессированием заболевания [6, 16, 21].

У пациентов с БАС наблюдалась активация исследуемых цитокинов, однако, мы не нашли зависимости уровней цитокинов ни с формой заболевания (рис. 6), ни с его длительностью (рис. 7).

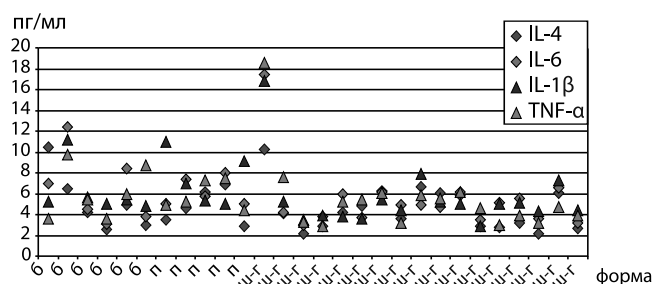


Рис. 6. Показатели уровней цитокинов у пациентов с БАС с разными формами заболевания (б — бульбарная, п — пояснично-крестцовая, ш-г — шейно-грудная)

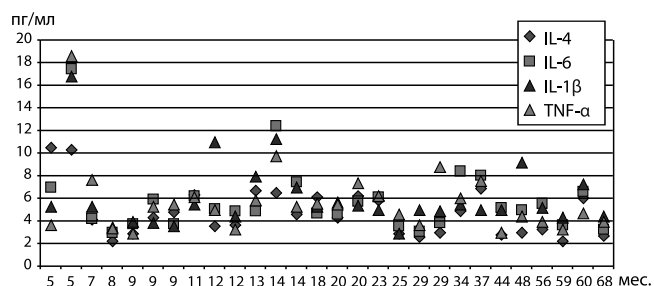


Рис. 7. Показатели уровней цитокинов у пациентов с БАС с разной длительностью заболевания

У пацієнтів з БАС не наблюдалось существенных изменений уровней исследуемых цитокинов в зависимости от тяжести заболевания, оцениваемой по функциональной шкале неврологического дефицита ALS FRS-R (ALS Functional Rating Scale Revised) (рис. 8) и жизненной емкости легких (ЖЕЛ) (рис. 9).

Полученные результаты свидетельствуют об активном участии про- и противовоспалительных цитокинов в реализации патологического процесса при БАС.

Отчетливо просматривается увеличение уровней IL-4 у больных БАС выше максимального референсного значения для здоровых людей. Интенсивная

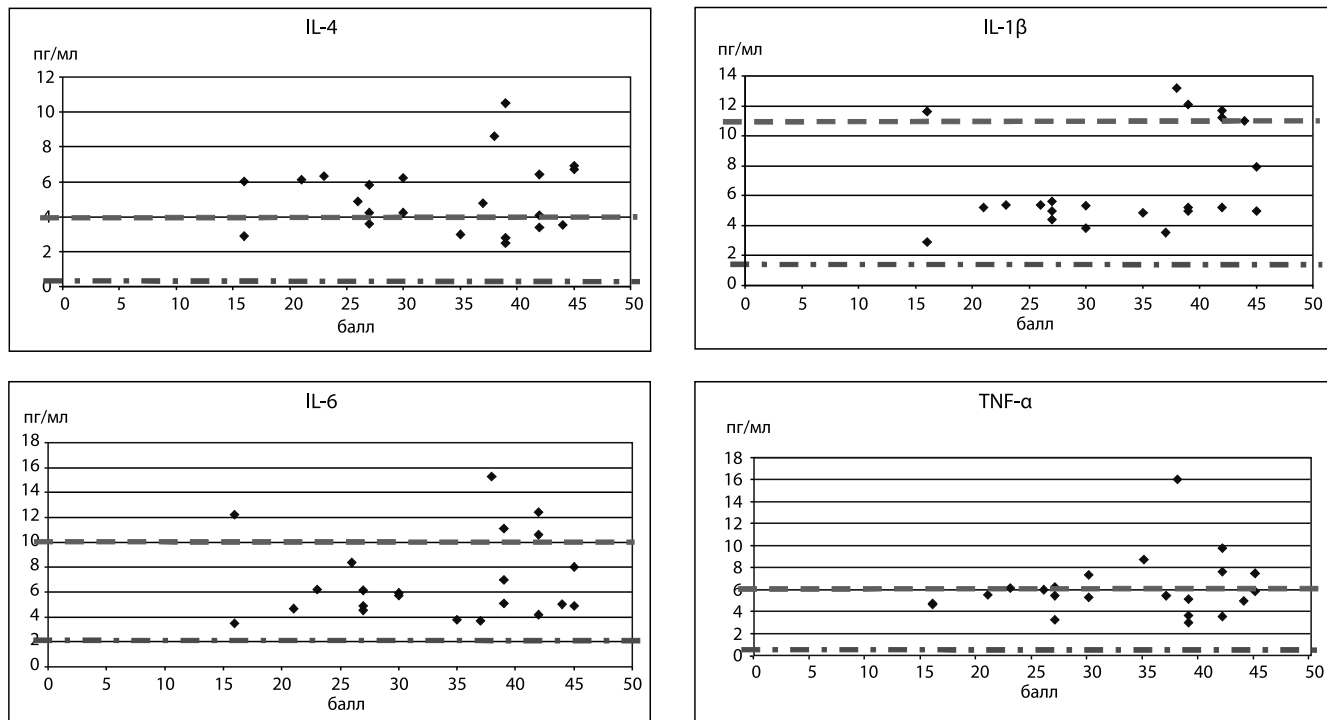


Рис. 8. Распределение уровней цитокинов у пациентов с БАС в зависимости от баллов ALS FRS-R (пунктирная линия — максимальное референсное значение, пунктирная прерывистая линия — среднее значение у здоровых людей)

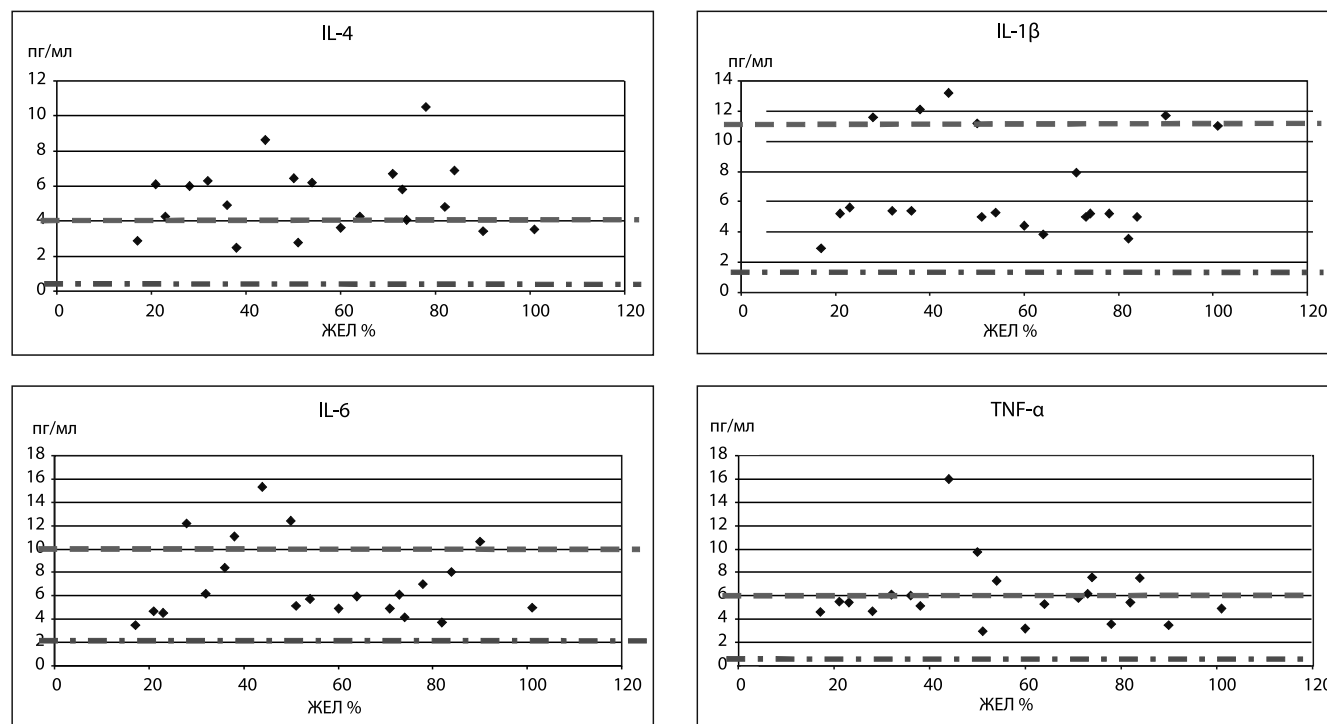


Рис. 9. Распределение уровней цитокинов у пациентов с БАС в зависимости от ЖЕЛ (пунктирная линия — максимальное референсное значение, пунктирная прерывистая линия — среднее значение у здоровых людей)

експресія IL-4 не корелює ні з формою БАС, ні з тяжкістю або з тривалістю захворювання, ні з тяжкістю дихальної дисфункції.

У пацієнтів з БАС спостерігається активація TNF- α . Однак рівень TNF- α не залежить ні від форми БАС, ні від тривалості захворювання, не пов'язаний ні з баллами ALS FRS-R, ні з життєвою ємкістю легких.

Таким образом, в умовах активації мікроглії нами відзначена інтенсивна експресія плейотропного IL-4, спостережувана на фоні помірного збільшення експресії провоспалительних цитокінів IL-1 β , IL-6 і TNF- α , що свідчить про невиконання їм нейропротективної функції і не виключає його ролі в індукції апоптозу.

Список литературы

1. Инструкция по применению набора реагентов для иммуноферментного определения концентрации фактора некроза опухоли-альфа [Текст] — Новосибирск : ЗАО «Вектор-Бест», 30.09.08. — 22 с.
2. Инструкция по применению набора реагентов для иммуноферментного определения концентрации человеческого интерлейкина-1 бета [Текст]. — Новосибирск : ЗАО «Вектор-Бест», 15.10.08. — 23 с.
3. Инструкция по применению набора реагентов для иммуноферментного определения концентрации человеческого интерлейкина-4 [Текст]. — Новосибирск : ЗАО «Вектор-Бест», 20.05.08. — 23 с.
4. Инструкция по применению набора реагентов для количественного определения человеческого интерлейкина-6 (ИЛ-6) в биологических жидкостях человека и культуральных средах [Текст]. — Новосибирск : ЗАО «Вектор-Бест», 20.05.08. — 23 с.
5. Association between cytokines and cerebral MRI changes in the aging brain [Текст] / [B. T. Baune, G. Ponath et al.] // *J Geriatr Psychiatry Neurol.* — 2009. — 22(1). — P. 23—34.
6. Endogenous regulatory T lymphocytes ameliorate amyotrophic lateral sclerosis in mice and correlate with disease progression in patients with amyotrophic lateral sclerosis [Текст] / [D. R. Beers, J. S. Henkel, W. Zhao et al.] // *Brain.* — 2011. — 134(Pt 5). — P. 1293—1314.
7. Block, M. L. Chronic microglial activation and progressive dopaminergic neurotoxicity [Текст] / M. L. Block, J. S. Hong // *Biochem Soc Trans.* — 2007. — 35(Pt 5). — P. 1127—1132.
8. TNF and sTNFR1/2 plasma levels in ALS patients [Текст] / [C. Cereda, C. Baiocchi, P. Bongioanni et al.] // *J Neuroimmunol.* — 2008. — 194(1—2). — P. 123—131.
9. The Role of TNF-Alpha in ALS: New Hypotheses for Future Therapeutic Approaches [Текст] / [C. Cereda, S. Gagliardi, E. Cova et al.] // *Amyotrophic Lateral Sclerosis, Prof. Martin Maurer (Ed.). — InTechOpen.* — 2012. — P. 413—436.
10. Clinical Trial of Glatiramer Acetate in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) [Электронный ресурс]. — Режим доступа : <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00326625>
11. Conde, J. R. Microglia in the aging brain [Текст] / J. R. Conde, W. J. Streit // *J Neuropathol Exp Neurol.* — 2006. — 65(3). — P. 199—203.
12. Cyclooxygenase 2 inhibition protects motor neurons and prolongs survival in a transgenic mouse model of ALS [Текст] / [D. B. Drachman, K. Frank M. Dykes-Hoberg et al.] // *Ann Neurol.* — 2002. — 52(6). — P. 771—778.
13. Gao, H. M. Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression [Текст] / H. M. Gao, J. S. Hong // *Trends Immunol.* — 2008. — 29(8). — P. 357—65.
14. Gelinas, D. S. PPAR-alpha expression inversely correlates with inflammatory cytokines IL-1beta and TNF-alpha in aging rats [Текст] / D. S. Gelinas, J. McLaurin // *Neurochem Res.* — 2005. — 30(11). — P. 1369—1375.
15. Godbout, J. P. Interleukin-6 in the aging brain [Текст] / J. P. Godbout, R. W. Johnson // *J Neuroimmunol.* — 2004. — 147(1—2). — P. 141—144.
16. Regulatory T-lymphocytes mediate amyotrophic lateral sclerosis progression and survival [Текст] / [J. S. Henkel, D. R. Beers, S. Wen, et al.] // *EMBO Mol. Med.* — 2013. — 5(1). — P. 64—79.
17. Keller, A. F. Treatment with minocycline after disease onset alters astrocyte reactivity and increases microgliosis in SOD1 mutant mice [Текст] / A. F. Keller, M. Gravel, J. Kriz // *Exp Neurol.* — 2011. — 228(1). — P. 69—79.
18. Neuronal phagocytosis by inflammatory macrophages in ALS spinal cord: inhibition of inflammation by resolvin D1 [Текст] / [Liu G., Fiala M., Mizwicki M. T., et al.] // *Am J Neurodegener Dis.* — 2012. — 1(1). — P. 60—74.
19. McGeer, P. L. Inflammatory processes in amyotrophic lateral sclerosis [Текст] / P. L. McGeer, E. G. McGeer // *Muscle Nerve.* — 2002. — 26(4). — P. 459—470.
20. Moisse, K. Innate immunity in amyotrophic lateral sclerosis [Текст] / K. Moisse, M. J. Strong // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2006. — 1762(11—12). — P. 1083—1093.
21. Alterations of T cell subsets in ALS: a systemic immune activation? [Текст] / [Rentzos M., Evangelopoulos E., Sereti E., et al.] // *Acta Neurol. Scand.* — 2012. — 125(4). — P. 260—264.
22. Cerebrospinal fluid interleukin 6 in amyotrophic lateral sclerosis: immunological parameter and comparison with inflammatory and non-inflammatory central nervous system diseases [Текст] / [Sekizawa T1., Openshaw H., Ohbo K., et al.] // *J Neurol Sci.* — 1998. — 154(2). — P. 194—9.
23. Innate and adaptive immunity in amyotrophic lateral sclerosis: Evidence of complement activation [Текст] / [Sta M., Sylva-Steenland R. M., Casula M., et al.] // *Neurobiol Dis.* — 2011. — 42(3). — P. 211—20.
24. The arachidonic acid 5-lipoxygenase inhibitor nordihydroguaiaretic acid inhibits tumor necrosis factor alpha activation of microglia and extends survival of G93A-SOD1 transgenic mice [Текст] / [West M., Mhatre M., Ceballos A., et al.] // *J Neurochem.* — 2004. — 91(1). — P. 133—143.
25. Neuro-inflammation as a therapeutic target amyotrophic lateral sclerosis [Текст] / [Weydt P., Weiss M. D., Möller T., Carter G. T.] // *Curr. Opin. Investig. Drugs.* — 2002. — 3(12). — P. 1720—1724.
26. Activated protein C therapy slows ALS-like disease in mice by transcriptionally inhibiting SOD1 in motor neurons and microglia cells [Текст] / [Ilieva Z., Ilieva H., Hallagan L., et al.] // *J Clin Invest.* — 2009. — 119(11). — P. 3437—3449.

Надійшла до редакції 13.03.2014 р.

ВОЛОШИНА Наталья Петровна, доктор медичинських наук, професор, науковий керівник відділу нейроінфекцій і розсіяного склерозу Государственного учреждения «Інститут неврології, психіатрії і наркології Національної академії медичинських наук України» (ГУ «ІНПН НАМН України»), г. Харків; e-mail: proapril@mail.ru

ЕГОРКИНА Ольга Викторовна, науковий співробітник відділу нейроінфекцій і розсіяного склерозу ГУ «ІНПН НАМН України», г. Харків; e-mail: oegorkina@ukr.net

VOLOSHYNA Natalia Petrivna, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of Department of Neuroinfections and Multiple Sclerosis of the State Institution "Institute of Neurology, Psychiatry and Narcology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine" (SI "INPN of NAMS of Ukraine"), Kharkiv; e-mail: proapril@mail.ru

YEGORKINA Olga Viktorivna, Researcher of the Department of Neuroinfections and Multiple Sclerosis of the SI "INPN of NAMS of Ukraine", Kharkiv; e-mail: oegorkina@ukr.net