

Т.М. Сивцева, Р.И. Чemezova, В.А. Владимирцев,
Р.С. Никитина, А.П. Данилова, Т.Е. Попова,
Л.Т. Окoneшникoва, В.Л. Oсaкoвский

ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОГО СТАТУСА И ИНТРАТЕКАЛЬНЫЙ СИНТЕЗ ОЛИГОКЛОНАЛЬНЫХ IgG У БОЛЬНЫХ ВИЛЮЙСКИМ ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТОМ И РАССЕЯНЫМ СКЛЕРОЗОМ

УДК [616.831-002+616.832-004.2]:612.017

В работе представлены результаты исследования интерлейкинов-6, -18 и интерферона- γ (ИНФ γ) в сыворотке крови и ликворе больных виллюйским энцефаломиелитом (ВЭ), рассеянным склерозом (РС) и другими неврологическими заболеваниями. Выявлены статистически значимые различия в уровне интерлейкина-18 (ИЛ-18) и ИНФ γ в ликворе больных ВЭ и РС. Показано, что больные ВЭ характеризуются повышенным уровнем ИЛ-18 в СМЖ, а больные РС – ИНФ γ в СМЖ и сыворотке крови. Установлена ассоциация повышенного уровня ИНФ γ в ликворе с выявлением интратекального синтеза IgG у больных РС.

Ключевые слова: виллюйский энцефаломиелит, рассеянный склероз, цитокины, интратекальный синтез IgG.

In work results of interleukin-6, -18 and interferon - γ (INF γ) investigation in blood serum and liquor of patients with Viliuisk encephalomyelitis (VE) and multiple sclerosis (MS) and other neurologic diseases are presented. Statistically significant distinctions in level of interleukin-18 (IL-18) and INF γ in liquor of VE and MS patients are revealed. It is shown that VE patients are characterized by IL-18 raised level in cerebrospinal fluid (CSF), and MS patients - INF γ in CSF and blood serum. The association of INF γ raised level in liquor with revealing intrathecal synthesis IgG in MS patients is ascertained.

Keywords: Viliuisk encephalomyelitis, multiple sclerosis, cytokines, intrathecal synthesis IgG.

Этиология и патогенез заболевания виллюйским энцефаломиелитом (ВЭ) по сей день остаются неясными. Гистопатологические находки острого и хронического воспаления в головном и спинном мозге умерших от ВЭ указывают на персистирующий воспалительный процесс [11]. В ликворе больных выявлен интратекальный (в пределах мозговых оболочек) синтез олигоклональных IgG [15]. Однако механизмы и причины развития локального иммунного ответа при этом заболевании недостаточно изучены.

Многие авторы указывают на значительную роль иммуногенетических факторов в патогенезе ВЭ [3, 5, 8]. В крови показан дисбаланс в соотношении популяций лимфоцитов и угнетение системы интерферона- α [2, 4]. Выявлена существенная связь заболевания ВЭ с двумя нуклеотидными заменами в третьем интроне гена интерферона- γ (ИНФ γ) [3].

ФГНУ «Институт здоровья»: СИВЦЕВА Татьяна Михайловна – к.б.н., с.н.с., sivtceva@list.ru, ЧЕМЕЗОВА Рита Ивановна – зав. лаб., ВЛАДИМИРЦЕВ Всеволод Афанасьевич – к.м.н., вед.н.с., НИКИТИНА Раиса Семеновна – зав. клиникой, ДАНИЛОВА Альбина Прокопьевна – врач-невролог, ПОПОВА Татьяна Егоровна – к.м.н., доцент МИ СВФУ им. М.К. Аммосова, научный консультант ЦРС и ДДЗ в РС(Я), ОКОНЕШНИКОВА Людмила Тимофеевна – зав. отделением РБ №2-ЦЭМП, руководитель ЦРС и ДДЗ в РС(Я), ОСАКОВСКИЙ Владимир Леонидович – к.б.н., зав. лаб., iz_labgene@mail.ru.

В последние годы в якутской популяции стало распространяться другое заболевание нервной системы, в патогенезе которого существенную роль играют иммунопатологические реакции - рассеянный склероз. В нарушение иммунного равновесия в мозге при РС и других воспалительных заболеваниях центральной нервной системы (ЦНС) значительный вклад вносят изменения в цитокиновом статусе больных, которые могут влиять на активность локального иммунного ответа, приводить к срыву иммунологической толерантности и развитию аутоиммунных процессов [6, 7].

Цель исследования: сравнительный анализ уровня провоспалительных цитокинов в ликворе и крови больных ВЭ и РС и их ассоциации с интратекальным синтезом олигоклональных IgG

Материалы и методы исследования. Были исследованы три группы неврологических больных:

Виллюйский энцефаломиелит. Анализированы сыворотка крови и ликвор 16 больных ВЭ, обследованных в стационаре и во время экспедиций Института здоровья. Все больные имели хроническую форму заболевания продолжительностью от 3 до 54 лет (в среднем 22,3 \pm 13,4 года). В группу входили 6 женщин, 10 мужчин в возрасте от 38 до 74 лет (в среднем 51,9 \pm 11,2 лет), из них 14 – саха, 2 – эвенки.

Рассеянный склероз. Анализированы сыворотка крови и ликвор 11 боль-

ных РС, проходивших обследование в Республиканской больнице №2-Центр экстренной медицинской помощи. По типу течения заболевания больные распределялись следующим образом: ремитирующий – 7, первично-прогрессирующий – 1, вторично-прогрессирующий – 3 чел., продолжительность заболевания составила от 1 года до 18 лет (в среднем 7,1 \pm 5,3 лет). В группу входили 6 женщин, 5 мужчин в возрасте от 17 до 55 лет (в среднем 38,5 \pm 12,3 года), из них 9 чел. европейского происхождения и 2 саха.

Другие неврологические заболевания (др.н.з.). В эту группу вошли 9 чел. с другими невоспалительными заболеваниями нервной системы со следующими диагнозами: сенситивная дистония – 1, гидроцефалия – 1, инсульт – 2, дисциркуляторная энцефалопатия – 2, эпилепсия – 3 чел., все якутской национальности, 7 женщин, 2 мужчин в возрасте от 18 до 72 лет (в среднем 40,1 \pm 19,0 лет).

Интратекальный синтез IgG выявляли методом изоэлектрофокусирования с иммуноблоттингом, описанным ранее [10]. Тест считался положительным при выявлении олигоклональных (двух и более) полос IgG на общем поликлональном фоне в спинномозговой жидкости (СМЖ) при отсутствии полос в параллельно исследованной сыворотке того же пациента.

В сыворотке крови и ликворе больных исследовали содержание ИНФ γ , интерлейкина-6 (ИЛ-6), интерлейкина-

18 (ИЛ-18) с помощью иммуноферментного анализа с использованием набора реагентов ЗАО «Вектор-бест» на оборудовании ЗАО «ПИК-Н», Россия. За норму принимались концентрации в сыворотке (плазме) крови, взятой у условно здоровых доноров юго-восточной зоны Западной Сибири, исследованных тем же набором реагентов.

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 8.0. Результаты описаны с помощью вычисления медианы (Me) 25 и 75 процентилей (25-75%). Сравнение полученных результатов в группах проводили с использованием непараметрических критериев Краскела-Уоллиса, Манна-Уитни и Вальда-Вольфовитца.

Результаты и обсуждение

Инtrateкальный синтез IgG. Инtrateкальный синтез олигоклональных IgG выявлен у 9 из 16 больных ВЭ. Продолжительность заболевания этих больных составила $15,3 \pm 4,9$ года ($n=9$), т.е. индуцированная продукция IgG сохранялась у больных более 10 лет. Отрицательный результат связан с большей длительностью заболевания, более 20 лет, в среднем $31,1 \pm 15,9$ года ($n=7$), что статистически значимо выше, чем у больных с положительным результатом ($p=0,02$ по критерию Манна-Уитни). Эти данные согласуются с ранее полученными результатами [1].

В группе больных РС инtrateкальный синтез IgG выявлен у 6 из 11 больных. Это 5 больных с ремитирующим и один с первично-прогрессирующим типом течения, все европейского происхождения. Отрицательный результат получен у 5 чел.: 1 – с диагнозом оптикомиелит Девика, еще 1 – с атипичной формой РС (псевдотуморозной), 1 – с демиелинизирующей оптикомиелопатией.

Содержание ИЛ-6, ИНФγ, ИЛ-18 в сыворотке крови и СМЖ больных ВЭ, РС и др.н.з

Показатель	Группа больных	Сыворотка, пг/мл		СМЖ, пг/мл	
		Me (25-75%)	n	Me (25-75%)	n
ИЛ-6	ВЭ	4 (3,4-15,4)	11	1,25 (1,15-1,45)	12
	РС	5,7 (5,2-8,5)	10		
	др.н.з.	5,7 (5,5-8,2)	8		
ИНФγ	ВЭ	4 (3-4)*	11	7 (3,5-9,5)*	12
	РС	7 (6-19)*	11	20 (10-30)*	11
	др.н.з.	5 (3,75-6,5)*	8	18 (19-18,5)*	9
ИЛ-18	ВЭ	139,5 (90-210)	14	15,5 (13-20)*	10
	РС	125 (110-166)	11	4,6 (4,15-5,1)*	8
	Др.н.з.	141 (110-219)	8	4,6 (3,8-7,8)*	9

Примечание. Me (25-75%) – значение медианы и межквартильного размаха, n – число обследованных, * – $p < 0,05$.

Двое остальных имели ремитирующее и вторично-прогрессирующее течение заболевания. В этой подгруппе двое больных были якутской национальности, остальные европейской.

Группа больных с другими неврологическими заболеваниями составлена из пациентов с невоспалительными заболеваниями ЦНС, у которых не выявлен инtrateкальный синтез IgG.

Цитокины ИЛ-6, ИНФγ, ИЛ-18. Результаты исследования уровня цитокинов ИЛ-6, ИНФγ, ИЛ-18 в трех группах больных представлены в таблице.

Содержание ИЛ-6 в сыворотке крови не различается в трех исследованных группах ($p=0,16$ по критерию Краскела-Уоллиса). В группе больных ВЭ повышенный уровень (свыше 10 пг/мл) выявлен у 3 чел., что отражается в более широком межквартильном размахе. Он может отражать предрасположенность пациентов к системному воспалению, не связанному с исследуемой патологией. Содержание ИЛ-6 в СМЖ исследовано только у больных ВЭ и не выявило существенного повышения.

Содержание ИНФγ в сыворотке крови у больных ВЭ и в группе др.н.з.

сопоставимо с уровнем этого цитокина у условно здоровых доноров, исследованных тем же набором реагентов, и не превышает значения 10 пг/мл. У больных РС этот показатель статистически значимо выше ($p=0,01$) (рис.1).

В СМЖ содержание белка ИНФγ повышено в трех группах больных по сравнению с сывороткой (таблица), что свидетельствует о протекании воспалительного процесса в головном мозгу этих больных. Несмотря на повышенный уровень ИНФγ у больных ВЭ, этот показатель статистически значимо ниже ($p=0,006$) по сравнению с больными РС и др.н.з. (рис. 1). Он указывает на ограниченность продукции белка этого цитокина у больных ВЭ по сравнению с другими неврологическими заболеваниями, что является характерной особенностью патологии ВЭ.

Содержание ИЛ-18 в сыворотке крови не различается в трех группах, тогда как в СМЖ выявлены статистически значимые различия (таблица). При этом наиболее высокие значения выявлены у больных ВЭ (рис.2). Это вторая характерная особенность патологии ВЭ, которая указывает на уча-

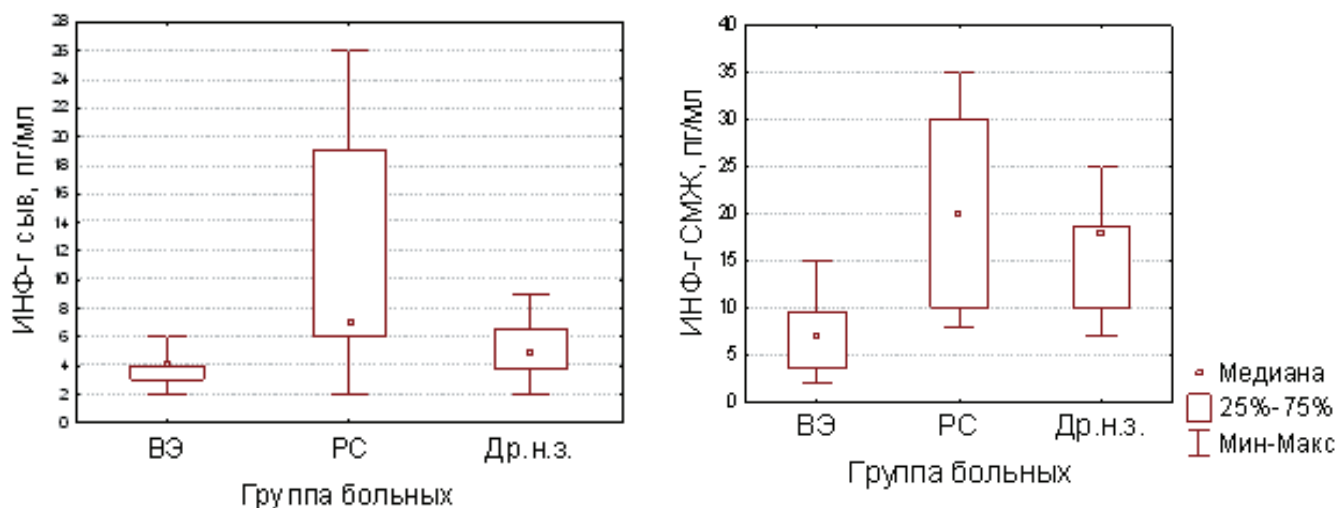


Рис. 1. Уровень ИНФγ в сыворотке крови и в СМЖ больных трех групп

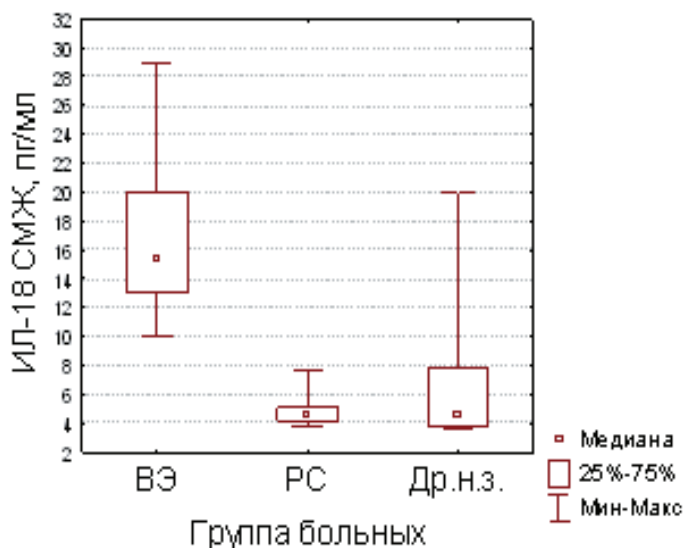


Рис. 2. Уровень ИЛ-18 в СМЖ больных трех групп

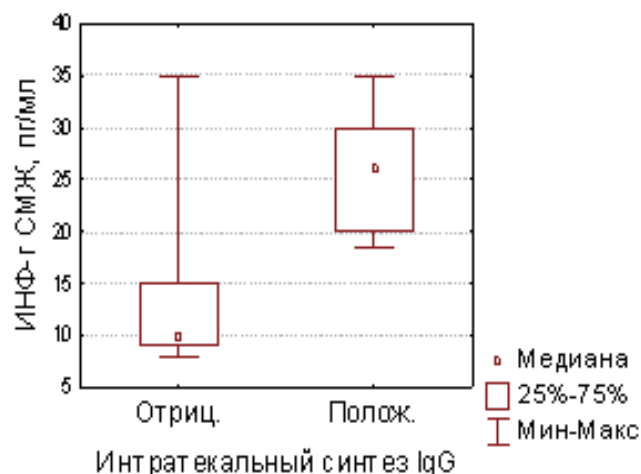


Рис. 3. Уровень ИНФ-г в СМЖ больных РС с отрицательным и положительным результатом выявления интратекального синтеза олигоклональных IgG

тие в патогенезе заболевания клеток тканей мозга, продуцирующих цитокин ИЛ-18.

Цитокиновый статус больных в зависимости от интратекального синтеза IgG. В трех группах больных как с интратекальным синтезом IgG, так и в отсутствии его, уровень цитокинов ИЛ-6, ИНФ-γ и ИЛ-18 в сыворотке крови не изменяется. Положительная ассоциация с интратекальным синтезом IgG выявлена только в СМЖ у больных РС и только с цитокином ИНФ-γ (рис.3). При сравнении полученных результатов с помощью непараметрического критерия Вальда-Вольфовитца получены статистически значимые различия ($p=0,02$). Другие цитокины (ИЛ-6, ИЛ-18) не проявляют такой зависимости.

Полученные данные указывают на некоторые особенности иммунного ответа в мозге у больных ВЭ и РС. Как известно, в развитии локальной иммунной реакции в ЦНС участвуют как клетки периферической иммунной системы, проникающие через гемато-энцефалический барьер, в частности Т- и В-клетки, которые при активации Т-лимфоцитов в Th2 клетки начинают интратекальный синтез антител, так и клетки самого головного мозга. Ключевыми участниками врожденного иммунитета головного мозга являются активированные микроглия и астроциты, которые выполняют функцию антигенпрезентирующих клеток в ЦНС [14]. Сенсибилизированные эндогенным или экзогенным фактором клетки микроглии и астроциты стимулируют активацию Т-лимфоцитов и продуцируют цитокины ИНФ-γ и ИЛ-18 соответствен-

но [13]. При этом ИЛ-18 является одним из первичных факторов индукции микроглией ИНФ-γ [9]. Глиальные популяции клеток при активации лимфоцитов проявляют поляризацию, так, микроглия способна активировать Th1 (клеточный иммунитет) и Th2 клетки, а астроциты - Th2 (гуморальный иммунитет) [12]. Эта особенность будет проявляться в той или иной степени формирования клеточного или гуморального иммунитета при воспалительном процессе головного мозга.

Низкий уровень ИЛ-18 в СМЖ у больных РС и другими неврологическими заболеваниями по сравнению с больными ВЭ указывает, что у них предпочтительно формируется клеточный тип иммунного ответа, что прослеживается и достаточно высоким уровнем у них ИНФ-γ.

Больные ВЭ предпочитают формировать гуморальный тип иммунного ответа, что подтверждается высоким уровнем ИЛ-18 и достоверно низким уровнем ИНФ-γ. По-видимому, у больных ВЭ существует проблема с продукцией ИНФ-γ, которая уравнивается активацией и пролиферацией астроцитов (глиоз). Эти данные подтверждают ранее установленную связь заболевания ВЭ с геном ИНФ-γ. Дисфункция взаимосвязи микроглии и астроцитов проявляется в особой форме иммунопатологии мозга у больных ВЭ.

Заключение. Больные ВЭ характеризуются повышенным уровнем ИЛ-18 и ИНФ-γ в СМЖ по сравнению с сывороткой крови. При этом более выражены изменения в интратекальном содержании ИЛ-18, в СМЖ больных

ВЭ его уровень значительно выше, чем при РС и других неврологических заболеваниях. Несмотря на повышенный уровень ИНФ-γ в СМЖ, у больных ВЭ этот показатель статистически значимо ниже ($p=0,006$) по сравнению с больными РС и др.н.з. Он указывает на ограничение продукции белка этого цитокина у больных ВЭ по сравнению с другими неврологическими заболеваниями, что является характерной особенностью патологии ВЭ. В группе больных ВЭ отсутствует ассоциация уровня исследованных цитокинов с интратекальным синтезом IgG.

У больных РС выявлено повышение содержания ИНФ-γ как в крови, так и в СМЖ, причем в СМЖ наиболее высокий уровень выявляется при наличии интратекального синтеза олигоклональных IgG, что указывает на положительную ассоциацию этих показателей.

Полученные результаты отражают различия в механизмах развития иммунопатологии мозга при ВЭ и РС. Если при РС большее значение имеет повышенная продукция ИНФ-γ в крови и в СМЖ, то при ВЭ – интратекальный синтез ИЛ-18.

Литература

1. Данилова А.П. Диагностика хронических форм виллюского энцефаломиелимита / А.П. Данилова, Т.М. Сивцева, М.Н. Яковлева. // Проблемы виллюского энцефаломиелимита и других нейродегенеративных заболеваний в Якутии: тезисы докл. III междунар. науч.-практич. конф. - Якутск, 2006. - С. 44-45.
2. Danilova A.P. Diagnostic of chronic Viliuisk encephalomyelitis / A.P. Danilova, T.M. Sivtseva, Yakovleva M.N. // Problems of Viliuisk Encephalomyelitis and other Neurodegenerative

Diseases in Yakutia: abstracts of the 3rd International Conference. – Yakutsk, 2006. – P. 44-45.

2. Дубов А.В. Вилийский энцефаломиелит: проблемы и факты / А.В. Дубов, В.П. Алексеев, В.А. Владимирцев. – Якутск, 1991. – 21с.

Dubov A.V. Viliisk Encephalomyelitis: problems and facts / A.V. Dubov, V.P. Alexeev, V.A. Vladimirtsev. – Yakutsk, 1991. – 21 p.

3. Осаковский В.Л. Гипотеза иммуногенетической природы вилийского энцефаломиелита / В.Л. Осаковский // Якутский медицинский журнал. – 2009. - № 4. – С.125-128.

Osakovsky V.L. The Hypothesis of Immunogenetic Nature of Viliisk Encephalomyelitis / V.L. Osakovsky // Yakut Medical Journal. – 2009. - N4. – P. 125-128.

4. Федоров А.И. Иммунология вилийского энцефаломиелита / А.И. Федоров, В.Л. Осаковский // Проблемы вилийского энцефаломиелита, нейродегенеративных и наследственных заболеваний нервной системы: тезисы докл. Второй междунар. науч.-практич. конф. - Якутск, 2000. - С. 65-66.

Fedorov A.I. Immunology of Viliisk Encephalomyelitis / A.I. Fedorov, V.L. Osakovsky // Problems of Viliisk Encephalomyelitis, Neurodegenerative and Hereditary Diseases of the Nervous System: abstracts of the 2nd

International Conference. – Yakutsk, 2000. – P. 65-66.

5. Фефелова В.В. Изучение распределения генетических маркеров системы HLA в связи с проблемой вилийского энцефалита / В.В. Фефелова, Т.Я. Николаева, В.А. Владимирцев // Вилийский энцефаломиелит: материалы Первой междунар. науч.-практич. конф. - Якутск, 1996. - С. 122-123.

Fefelova V.V. Study of HLA Genetic Markers Distribution in relation to problem of Viliisk Encephalomyelitis / V.V. Fefelova, T.Ya. Nikolaeva, V. A. Vladimirtsev // Viliisk Encephalomyelitis: materials of the 1st International Conference. – Yakutsk, 1996. – P. 122-123.

6. Boraschi D. IL-18 in autoimmunity: review / D. Boraschi, C.A. Dinarello // Eur. Cytokine Netw. – 2006. – No. 17 (4). - P. 224-252.

7. Brandao C.O. Cytokines and intrathecal IgG synthesis in multiple sclerosis patients during clinical remission / C.O. Brandao // Arq. Neuro-Psiquiatr. – 2005. – Vol. 63. – P. 914-919.

8. High frequency of HLA DQA1*01301 in Yakut: no correlation with IDDM incidence / I.V. Mersynova [et.al.] // Diabetologia. – 1995. – Vol. 38. – P. 749-750.

9. IL-18: a key player in neuroinflammation and degeneration? / U. Felderhoff-Mueser [et.al.]

// Trends in Neurosciences. – 2005. – Vol. 28. – P. 487-493.

10. Keir G. Isoelectric focusing of cerebrospinal fluids immunoglobulin G / G. Keir, P.W. Luxton, E.J. Thomson // Ann. Clin. Biochem. - 1990. – Vol. 27. – P. 436-443.

11. Masters C.L. Viliisk encephalomyelitis: morphologic spectrum of disease, including demyelination following self-inoculation with cerebrospinal fluid / C.L. Masters, V.P. Alexeev, V.A. Vladimirtsev // Viliisk Encephalomyelitis: Materials of First International Conference. – Yakutsk, 1996. – С. 90-98.

12. Mikroglia are more efficient than astrocytes in antigen processing and in Th1, but not Th2 cell activation / F. Aloisi [et.al.] // The Journal of Immunology. – 1998. – No. 160. - P. 4671-4680.

13. Production of interferon- γ by microglia / J. Kawanokuchi [et.al.] // Multiple sclerosis. – 2006. – Vol. 12, No. 5. – P. 558-564.

14. TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes / C.S. Jack [et.al.] // The Journal of Immunology. – 2005. – No. 175. - P. 4320 - 4330.

15. Viliisk encephalomyelitis: intrathecal synthesis of oligoclonal IgG / A.J. Green [et.al.] // Journal of Neurological Science. – 2003. – No. 212(1-2). – P. 69-73.

С.К. Степанова, М.Г. Спиридонова, А.В. Марусин,
А.Л. Сухомясова, В.А. Степанов

ГАПЛОТИПИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ В ГЕНЕ DMPK В ВЫБОРКЕ БОЛЬНЫХ МИОТОНИЧЕСКОЙ ДИСТРОФИЕЙ ИЗ РЕСПУБЛИКИ САХА (ЯКУТИЯ) И В ПОПУЛЯЦИЯХ СЕВЕРНОЙ ЕВРАЗИИ

УДК 577.21:575.17:575.12.018.3:572.575

Проведён анализ шести однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в гене мышечной протеинкиназы (DMPK), ответственном за развитие миотонической дистрофии (МД). Исследовались шесть популяционных выборок Северной Евразии (N=778) и выборка представителей коренного населения Якутии, больных МД (N=87). Дана популяционно-генетическая характеристика выборок по исследованным локусам, проведено сравнение выборок по частотам аллелей, гаплотипов, проанализирована структура неравновесия по сцеплению во всех наблюдаемых выборках. Найдены гаплотипы, ассоциированные с заболеванием, выявлены значимые отличия по исследованным локусам между популяциями кетов, бурят, хантов и русских, показаны блоки сцепления в популяционных выборках.

Ключевые слова: ген мышечной протеинкиназы, DMPK, полиморфный маркер, структура гаплотипов, неравновесие по сцеплению, якутская популяция, популяции Северной Евразии.

Analysis of six SNP in the muscle protein kinase (DMPK) gene, responsible for development of myotonic dystrophy (DM) was done. Six populations of Northern Eurasia (N = 778) and DM patients of the indigenous Yakut population (N = 87) were investigated. Population-genetical characterization of the studied loci, allele and haplotype frequencies comparison were performed

and coupling disequilibrium structure was analyzed. Haplotypes associated with the disease were found, significant differences for the studied loci among Ket, Buryat, Russian and Khanty populations were revealed, haplotype blocks of coupling disequilibrium in the investigated samples were shown.

Keywords: muscle protein gene (DMPK), polymorphic marker (SNP), haplotype structure, coupling disequilibrium, Yakut population, populations of Northern Eurasia.

СТЕПАНОВА Светлана Кимовна – с.н.с. ЯНЦ комплексных медицинских проблем СО РАМН, svetkim@rambler.ru; **СПИРИДОНОВА Мария Геннадьевна** – к.б.н., с.н.с. ГУ НИИ медицинской генетики СО РАМН, maria.spiridonova@medgenetics.ru; **МАРУСИН Андрей Викторович** – к.б.н., с.н.с. ГУ НИИ медицинской генетики СО РАМН, andrey.marusin@medgenetics.ru; **СУХОМЯСОВА Айтилина Лукична** – к.м.н., зав. МГК РБ№1-НЦМ, зав.лаб. ЯНЦ КМП СО РАМН, AitalinaS@yandex.ru; **СТЕПАНОВ Вадим Анатольевич** – д.б.н., зам. директора по науке ГУ НИИ СО РАМН, vadim.stepanov@medgenetics.ru.

Введение. Миотоническая дистрофия Россолимо-Штейнерта – Куршманна-Баттена (МД) – это аутосомно-доминантное, мультисистемное заболевание со стойкой совокупностью клинических признаков, включающих миотонию, мышечную дистрофию, дефекты сердца, последующие иризирующие катаракты и эндокрин-

ные нарушения. Известно 3 типа миотонической дистрофии. МД 1-го типа (около 98% всех заболевших) характеризуется началом мышечной слабости от дистальных мышц к проксимальным и была описана более 100 лет назад в европейских и североамериканских популяциях. Мутация, приводящая к развитию заболевания, была иден-