

© Коллектив авторов, 2018
УДК 616-002-008.953-092+616-092.9

Сахаров В.Н.¹, Литвицкий П.Ф.¹, Алексеева Е.И.^{1,2}, Маянский Н.А.², Закиров Р.Ш.²

Изменения экспрессии IL-4 и IFN- γ в моноцитах и Т-лимфоцитах-хелперах при моделировании системного ювенильного идиопатического артрита у крыс Wistar

¹ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, г. Москва, Россия, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

² ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России, 119991, г. Москва, Россия, Ломоносовский просп., д. 2, стр. 1

Цель исследования — изучение перепрограммирования мононуклеарных лейкоцитов на модели системного ювенильного идиопатического артрита (сЮИА), воспроизводимой у крыс Wistar с использованием полного адьюванта Фрейнда и липополисахарида. **Методика.** сЮИА воспроизведен у 6-месячных крыс-самцов Wistar. На 40-е сут. эксперимента животные были разделены на 3 группы: 1-я группа — контроль; 2-я — группа доксицилина; 3-я — группа дексаметазона. Взятие проб крови у животных проводили на нулевые, 41-е и 55-е сут. Мононуклеарные клетки периферической крови выделяли гравиметрически, после чего окрашивали их на маркеры и внутриклеточные цитокины. Дифференцировали моноциты (CD3-CD4+) и Т-хелперы (CD3+CD4+). Анализировали динамику внутриклеточной экспрессии интерлейкина IL-4 (рассматривали как маркер про-M2 фенотипа, так как в случае выделения из клетки ИЛ-4 служит стимулятором M2 поляризации макрофагов) и IFN- γ (как маркер про-M1 фенотипа) по данным проточной цитофлуориметрии. Применяли непараметрический статистический тест Mann-Whitney-Wilcoxon в программе R для статистической обработки данных. **Результаты и заключение.** При моделировании сЮИА выявлено закономерное изменение фенотипа моноцитов. Применение же доксицилина и дексаметазона приводило к более ранней поляризации их по про-M2-пути в отношении моноцитов (на 41-е сут.) в сравнении с контролем. Про-M1 эффект (на 55-е сут., в сравнении с контролем) выявлен также в группах доксицилина и дексаметазона. У животных разных групп обнаружены характерные динамические изменения внутриклеточной экспрессии цитокинов. Важно, что различная направленность поляризации фенотипа при сЮИА и применении препаратов наблюдается не только у моноцитов, но и у Т-хелперов.

Ключевые слова: системный ювенильный идиопатический артрит; фенотип; моноциты; Т-хелперы; макрофаги.

Для цитирования: Сахаров В.Н., Литвицкий П.Ф., Алексеева Е.И., Маянский Н.А., Закиров Р.Ш. Изменения экспрессии IL-4 и IFN- γ в моноцитах и Т-лимфоцитах-хелперах при моделировании системного ювенильного идиопатического артрита у крыс Wistar. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(2): 61—69.

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.61-69

Для корреспонденции: Сахаров Владимир Николаевич, аспирант, ассистент каф. патофизиологии лечебного факультета ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), Scopus Author ID: 56712440000, e-mail: vladimirsah91@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена при федеральной бюджетной поддержке ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет), реализующего программы подготовки в аспирантуре.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 10.07.2017

Sakharov V.N.¹, Litvitskiy P.F.¹, Alekseeva E.I.^{1,2}, Mayansky N.A.², Zakirov R.Sh.²

Changes of IL-4 and IFN- γ expression in monocytes and T-helper lymphocytes while modeling of systemic juvenile idiopathic arthritis in Wistar rats

¹ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenovskiy University), Trubetskaya Str. 8-2, Moscow, 119991, Russia

² National Scientific and Practical Center of Children's Health, Lomonosovsky Prospekt 2, 1, Moscow 119991, Russia

The study objective was to evaluate targeted reprogramming of peripheral blood mononuclear cells in systemic juvenile idiopathic arthritis (sJIA) modeled in 6-month-old male Wistar rats by co-administration of complete Freund's adjuvant and lipopolysaccharide. **Methods.** On day 40 of the experiment, rats were divided into three groups: control, doxycycline, and dexamethasone groups. Blood samples were collected on days 0, 41, and 55. Peripheral blood mononuclear cells were

isolated gravimetrically and stained for markers and cytokines. Monocytes (CD3-CD4+) and T-helpers (CD3+CD4+) were differentiated as target cells. IL-4 was considered a marker for the pro-M2 phenotype since IL-4 can activate M2 macrophage polarization; IFN- γ was considered a marker for the pro-M1 phenotype. Time-related changes in the intracellular expression of IL-4 and IFN- γ were studied using flow cytometry. Data were analyzed using nonparametric statistical tests (Mann-Whitney-Wilcoxon) in the R environment for statistical computing. **Results and conclusions.** Monocytes (like macrophages) underwent reprogramming during the development of modeled sJIA disease. In monocytes of doxycycline and dexamethasone treatment groups, pro-M2 effects were observed earlier (day 41) than in the control group. Pro-M1 effects were observed in monocytes of doxycycline and dexamethasone groups on day 55, as compared with the control group. Characteristic time-related changes of intracellular cytokine expression were described for different groups. Importantly, the differently directed phenotype polarization was observed in sJIA and treatment groups for both monocytes and T-helpers.

Keywords: systemic juvenile idiopathic arthritis; phenotype; monocytes; T-helpers; macrophages.

For citation: Sakharov V.N., Litvitskiy P.F., Alekseeva E.I., Mayansky N.A., Zakirov R.S. Changes of IL-4 and IFN- γ expression in monocytes and T-helper lymphocytes while modeling of systemic juvenile idiopathic arthritis in Wistar rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(2): 61—69.

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.61-69

For correspondence: Sakharov Vladimir Nikolaevich, post-graduate, assistant of the Department of Pathophysiology, Faculty of Medicine, FSAEI HE I.M. Sechenov First MSMU MOH Russia (Sechenovskiy University), e-mail: vladimirsah91@mail.ru

Acknowledgment. The work has federal budgetary support of FSAEI HE I.M. Sechenov First MSMU MOH Russia (Sechenovskiy University) which provides post-graduate training courses.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Information about authors:

Sakharov V.N., Scopus Author ID: 56712440000

Litvitskiy P.F., <http://orcid.org/0000-0003-0151-9114>, Scopus Author ID: 56624867400; Researcher ID: N-7294-2014; SPIN 6657-5937

Alekseeva E.I., <http://orcid.org/0000-0002-3874-4721>; Scopus Author ID: 7006883469; Researcher ID: J-1169-2014

Mayansky N.A., <http://orcid.org/0000-0001-8077-5313>

Zakirov R.S., <http://orcid.org/0000-0002-3101-0207>

Accepted 10.07.2017

Введение

Цель исследования — изучение возможностей направленной модификации процесса перепрограммирования мононуклеарных клеток на авторской [1, 2] биологической модели системной формы ювенильного идиопатического артрита (сЮИА) у крыс Wistar. Известно, что сЮИА является тяжелой формой патологии, осложняющейся у части пациентов жизнеугрожающим состоянием — синдромом активации макрофагов. Изучение патогенеза этой формы патологии необходимо для разработки эффективной патогенетически обоснованной терапии сЮИА. Именно для сЮИА, среди других форм ЮИА, показано максимальное вовлечение в его патогенез механизмов системы врожденного иммунитета, доказана ключевая роль аутовоспалительного компонента [3]. В то же время, полностью исключить аутоиммунную составляющую патогенеза сЮИА нельзя, так как имеются данные и в ее пользу [4]. Учитывая эти факты, а также то, что существовавшие ранее модели артрита имеют существенные

ограничения в связи с описанными выше особенностями патогенеза сЮИА, была разработана авторская модель [1, 2]. Принималось во внимание то, что у молодых крыс ниже воспроизводимость артрита. В связи с этим при разработке указанной модели ранее были использованы 8-месячные крысы, а при воспроизведении модели в данном исследовании — 6-месячные. На основании данных [5] об усредненном соотношении продолжительности жизни человека и лабораторных крыс, 8- и 6-месячный возраст последних соответствует примерно 14 и 11 годам человека.

Авторская модель сЮИА имеет ряд преимуществ в сравнении с другими моделями артрита. Она адекватна для изучения процессов перепрограммирования моноцитов/макрофагов в патогенезе артрита, патогенетически наиболее близка к сЮИА (сочетает в себе аутоиммунный компонент и действие стимулятора M1 ответа), имеет более выраженные (по сравнению с «классическим» адьювантным артритом) проявления, не приводит к существенной дезорганизации

межклеточного матрикса. Последнее чревато искажением результатов из-за потенцирования коллагенообразования и M2 ответа [6], что возможно при ряде других моделей и рассматривается нами как их недостаток при решении поставленных нами задач.

В настоящей работе на модели сЮИА у крыс Wistar оценивалась внутриклеточная продукция моноцитами и Т-лимфоцитами-хелперами цитокинов, вызывающих перепрограммирование макрофагов: интерлейкина-4 (IL-4) и гамма-интерферона (IFN- γ). Оценивалось влияние на экспрессию этих веществ доксициклина и дексаметазона. При этом клетки, вырабатывавшие IFN- γ , рассматривались как про-M1, а клетки, продуцировавшие IL-4 — как про-M2 в связи со способностью указанных цитокинов после выделения их из клеток активировать макрофаги (т.е. указанные клетки обладают потенциальной способностью вызывать M1 и M2 эффекты).

В качестве фармакологических препаратов, модифицирующих течение модельного сЮИА, были выбраны доксициклин и дексаметазон. Доксициклин привлекает внимание потому, что на моделях различных форм патологии описана его способность ингибировать M2 активацию макрофагов [7, 8]. Перспективен этот препарат еще и потому, что он способен изменять конформационную стабильность белковых молекул (из-за чего он рассматривался даже как потенциальное средство для борьбы с прионными заболеваниями, демонстрируя убедительные результаты *in vitro* [9]). Возможно, широкий спектр эффектов доксициклина обусловлен его способностью снижать активность одних белков (в том числе регуляторных) и повышать ее у других. Глюкокортикоиды же определенно относят к группе стимуляторов M2 активации макрофагов [10], в связи с чем они введены в стандарты лечения ревматических заболеваний.

Полученные результаты позволяют оценить изменение фенотипа популяций клеток (моноцитов и Т-хелперов) в целом на протяжении моделирования, в том числе под действием модифицирующих веществ, т.е. позволяют говорить о структуре популяции клеток (по выбранным маркерам) и ее изменении в условиях воспалительного процесса и действия использованных фармакологических препаратов. Полученные данные, в том числе о наличии нескольких противоречивых эффектов у оцениваемых препаратов, позволили заключить, что важно оценивать профиль эффектов лекарственного препарата и сравнивать его с профилем интересующего заболевания, а также что общий «противовоспалительный эффект» препарата может включать и провоспалительные его компоненты. Это может объяснить формирование нежелательных эффектов лекарственных средств (при неполном перекрытии вышеуказанных профилей) и открывает еще одно перспектив-

ное направление для создания управляемых и «заточенных» под конкретные провоспалительные профили заболеваний стратегий лечения.

Методика

Модифицированная модель системного ювенильного идиопатического артрита [1, 2] воспроизведена на 24 крысах Wistar (самцы, 6 мес.). Схема дизайна исследования приведена на рис. 1. Использовано двукратное введение животным полного адьюванта Фрейнда (внутрикожные многоточечные инъекции общим объемом 0,5 мл адьюванта, 1 мг/мл, (Sigma Aldrich, USA) на нулевые и 40-е сут.) и трехкратное липополисахарида (Медгамал, Россия) в возрастающих количествах: нулевые сутки — из расчета 5 мкг/кг массы тела животных, 18-е сут. — из расчета 10 мкг/кг, 40 сут. — по 10 мкг каждому животному. На 40-е сут. все крысы были разделены на 3 группы: в группе «доксициклин» дополнительно подкожно введен раствор доксициклина (Саратов, Россия) из расчета 50 мг/кг массы тела; в группе «дексаметазон» подкожно инъецирован раствор дексаметазона (KRKA, Словения) из расчета 4 мг/кг. В группе «контроль» подкожно введено по 0,2 мл физиологического раствора хлорида натрия (Борисовский завод медицинских препаратов, Борисов, Беларусь). Аналогичные количества доксициклина, дексаметазона и физраствора вводили повторно на 54-е сут. исследования. Взятие образцов крови (для оценки внутриклеточных цитокинов) осуществляли на нулевые, 41-е и 55-е сут.

В подготовленных с помощью RPMI-1640 пробах крови форменные элементы подвергались гравиметрическому разделению: 400g на градиенте Histopaque 1083 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Мононуклеарные клетки окрашивались с помощью антител Biotin Anti-Rat CD3, BD Pharmingen; APC Anti-rat CD4 (domain 2) Antibody, SONY; PE Anti-rat IL-4 Antibody, SONY; PE Anti-rat IFN- γ Antibody, SONY. Этап пермебиализации (для внутриклеточных маркеров) проводился с использованием Cytofix/Cytoperm (BD Cytotfix/Сytoperm). Пробы анализировались на проточном цитофлуориметре (Cell Analyzer BD FACSCanto II (USA)). Процедуры выполнялись в соответствии с инструкциями производителей.

CD3-CD4⁺ клетки рассматривались с учетом информации BD Biosciences (www.bdbiosciences.com) как моноциты, а CD3⁺CD4⁺ клетки как Т-лимфоциты-хелперы [11].

Оценка статистической значимости различий показателей проводилась с использованием программного обеспечения R [12] путем проведения теста Mann-Whitney-Wilcoxon. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

На графиках представлены диаграммы размаха для изученных показателей. На указанном типе диаграмм черная горизонтальная линия — медиана. Ящики ограничены 25-м и 75-м перцентилями (Q1 и Q3 соответственно), верхняя граница соответствует $Q3 + 1,5 * (Q3 - Q1)$, нижняя: $Q1 - 1,5 * (Q3 - Q1)$. Отдельными точками отмечаются выбросы. Ряд статистических приложений, в том числе и R при формировании ящиков определяет не непосредственно квартили 1 и 3, а медианы верхней и нижней половин данных [13], которые могут несколько отличаться от квартилей, в частности, в зависимости от того, четные или нечетные показатели.

Результаты и обсуждение

Доля клеток, экспрессирующих IL-4, среди популяции моноцитов (CD3-CD4+) при моделировании сЮИА у крыс Wistar

Доли иммунологически выявленных моноцитов (CD3-CD4+) с внутриклеточной продукцией IL-4 (рис. 2) статистически значимо изменялись на протяжении исследования, причем обнаружены существенные особенности в различных группах животных.

Так, у крыс группы контроля (естественное течение экспериментального сЮИА) обнаружена отсроченность изменений по сравнению с другими группами

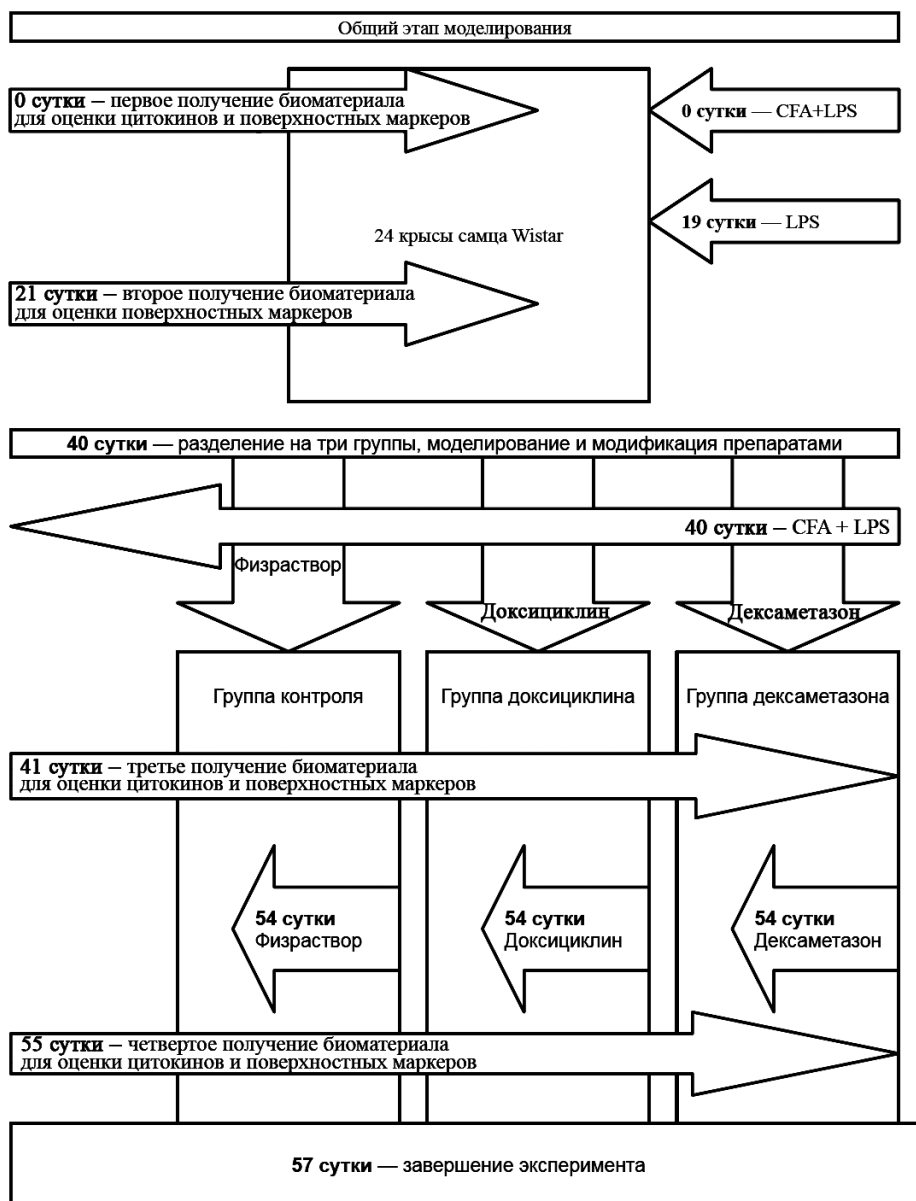


Рис. 1. Схематичное представление дизайна исследования. CFA — полный адьювант Фрейнда, LPS — липополисахарид.

животных: на 41-е сут. показатель доли клеток, экспрессирующих IL-4, среди популяции моноцитов статистически значимо не отличался от исходных данных. При применении дексаметазона наибольшие медианные значения показателя определялись уже на 41-е сут., на 55-е сут. значения не отличались от таковых на 41-е сут. При этом на 41-е сут. группа «дексаметазон» демонстрировала статистически значимо более высокие доли продуцирующих IL-4 моноцитов по сравнению с контролем. Группа животных «доксидиклин» также значимо отличается по указанному показателю от исходных значений уже на 41-е сут. (имея меньшие медианные значения), но не отличается существенно от показателей групп «дексаметазон» и «контроль». Вместе с тем следует отметить, что для долей моноцитов, продуцирующих IL-4, в группе «доксидиклин» на 41-е сут. в сравнении с контролем разница была статистически не значима ($p = 0,054$).

У животных групп «контроль» и «доксидиклин» отмечено статистически значимое увеличение этого показателя в период между 41-ми и 55-ми сут., а с 55-х сут. все показатели трех групп крыс уже статистически значимо не различались.

Таким образом, можно сделать вывод, что как реализация патогенетических звеньев модели сЮИА, так и применение в условиях ее развития вышеуказанных препаратов приводят к перепрограммированию моноцитов в динамике. При этом и доксидиклин, и дексаметазон вызывали более раннее (на 41-е сут.)

статистически значимое повышение доли моноцитов, экспрессирующих IL-4. Следовательно, оба указанных препарата обладают про-M2 действием, так как после выделения указанного цитокина из клеток он может действовать как аутокринно, так и через влияние на другие мононуклеарные фагоциты. При естественном же течении экспериментального сЮИА в контрольной группе (напомним, что в этой группе на 40-е сут. использовался липополисахарид, полный адъювант Фрейнда и физиологический раствор хлорида натрия) изменения оказываются отсроченными.

Доля клеток, экспрессирующих IL-4, среди популяции Т-лимфоцитов-хелперов (CD3+CD4+) при моделировании сЮИА у крыс Wistar

Обнаружены особенности динамики изменения показателя долей клеток, продуцирующих IL-4 и среди Т-хелперов (рис. 3). Так, статистически значимое увеличение (по сравнению с исходными данными) указанного показателя наблюдалось только на 55-е сут. При этом у животных группы «дексаметазон» отмечены наибольшие медианные значения и статистически значимое различие с показателями группы «доксидиклин». От контроля показатели группы «дексаметазон» не отличались.

Таким образом, можно заключить, что моделирование сЮИА у крыс сопровождалось повышением в динамике доли Т-хелперов, продуцирующих IL-4. Также обращает на себя внимание тот факт, что при-

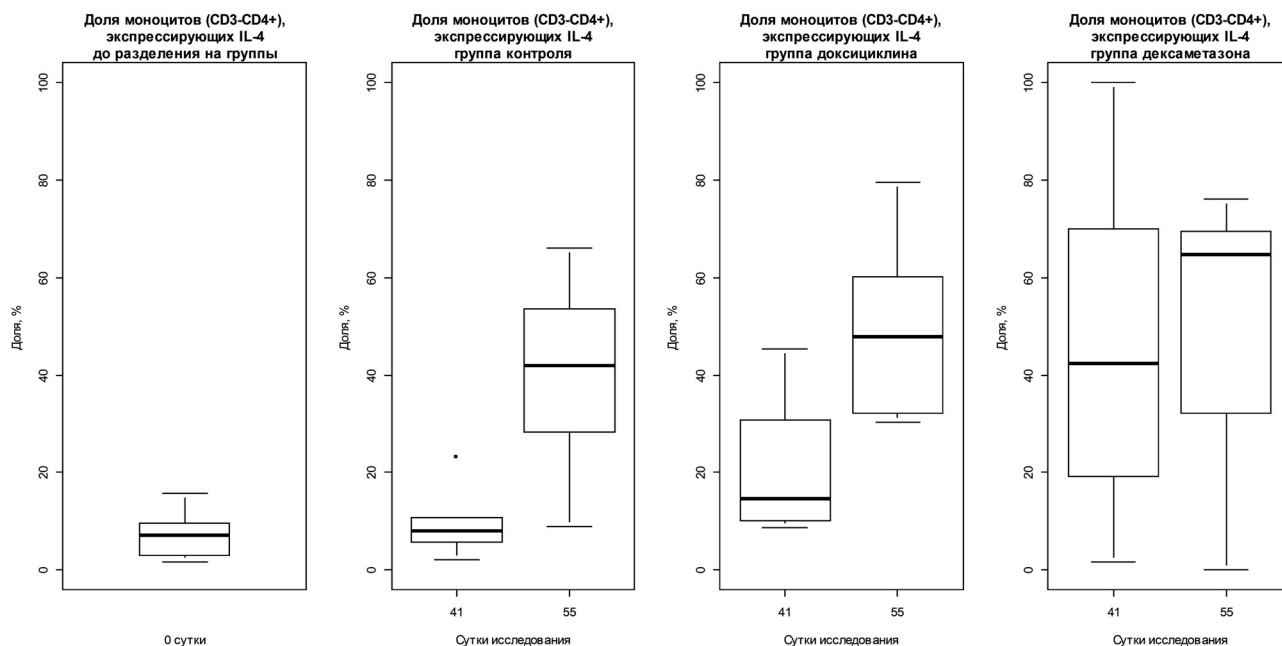


Рис. 2. Доли моноцитов, экспрессирующих IL-4, при моделировании сЮИА у крыс Wistar. Статистически значимые отличия (по данным теста Mann-Whitney-Wilcoxon) показателей от исходных данных: группа контроля: 55-е сут. ($p = 0,001243$); группа «доксидиклин»: 41-е сут. ($p = 0,01041$), 55-е сут. ($p = 0,0001554$); группа «дексаметазон»: 41-е сут. ($p = 0,006993$), 55-е сут. ($p = 0,01041$). Статистически значимые различия между группами: группа контроля — группа «дексаметазон» на 41-е сут. ($p = 0,0289$).

менение дексаметазона приводит к большему (статистически значимому по сравнению с доксициклином) увеличению этого показателя, т.е. имеет место значимое перепрограммирование популяции Т-хелперов.

Доля клеток, экспрессирующих IFN-γ, среди популяции моноцитов (CD3-CD4+) при моделировании сЮИА у крыс Wistar

В популяции моноцитов (рис. 4) на 41-е сут. моделирования сЮИА в условиях применения как доксициклина, так и дексаметазона происходило статистически значимое увеличение процентного содержания моноцитов, вырабатывающих IFN-γ, по сравнению с исходными показателями. У контрольных животных отмечено, что показатель долей вырабатывающих IFN-γ моноцитов на 41-е сут. был значимо ниже таковых в группах «доксициклин» и «дексаметазон», но не отличался от исходных значений.

На 55-е сут. наблюдалось статистически значимое снижение показателя долей моноцитов, вырабатывающих IFN-γ, по сравнению с 41-ми сут. во всех группах крыс. При этом у животных групп «доксициклин» и «дексаметазон» показатели не отличались от исходного уровня. В контрольной же группе доли моноцитов, экспрессирующих IFN-γ, были статистически значимо ниже исходных.

Таким образом, при естественной реализации патогенетических звеньев модели сЮИА у крыс происходит статистически значимое уменьшение доли про-M1 моноцитов (ниже исходного уровня!) и возрастание доли про-M2. В то же время увеличение показателя про-M2 ответа в контрольной группе не было столь выраженным, как в других группах.

У животных групп «доксициклин» и «дексаметазон» доли моноцитов, вырабатывающих IFN-γ, на 55-е сут. статистически значимо не отличались от исходных, а в контрольной группе в это же время отмечено их статистически значимое снижение по сравнению с исходными данными. Нарастание про-M2 ответа моноцитов в динамике моделирования сЮИА наблюдалось раньше в группах «доксициклин» и «дексаметазон».

Таким образом, выявлена существенная роль дексаметазона и доксициклина в перепрограммировании не только макрофагов (что было известно), но и моноцитов.

Доля клеток, экспрессирующих IFN-γ, среди Т-лимфоцитов-хелперов (CD3+CD4+) при моделировании сЮИА у крыс Wistar

В динамике изменений долей Т-хелперов, продуцирующих IFN-γ (рис. 5), выявлены следующие изменения: на 41-е сут. только у животных в группе «дексаметазон» обнаружено статистически значимое увеличение таких долей по сравнению с исходными

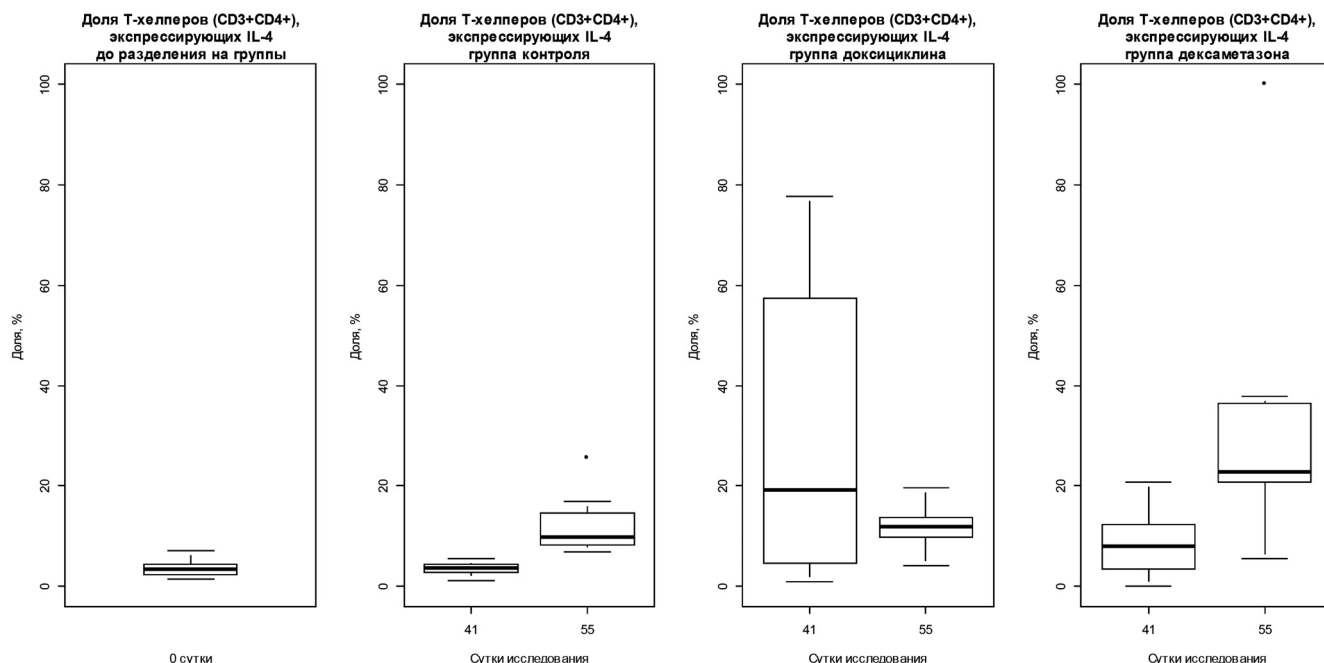


Рис. 3. Доли Т-лимфоцитов хелперов, экспрессирующих IL-4, при моделировании сЮИА у крыс Wistar. Статистически значимые отличия (по данным теста Mann-Whitney-Wilcoxon) показателей от исходных данных: группа контроля: 55-е сут. (p = 0,001243); группа «доксициклин»: 55-е сут. (p = 0,001088); группа «дексаметазон»: 55-е сут. (p = 0,0003108). Статистически значимые различия между группами: группа «доксициклин»-группа «дексаметазон» на 55-е сут. (p = 0,006993).

значениями. При этом на 55-е сут. отмечены значимо большие доли продуцирующих IFN- γ Т-хелперов в группе «дексаметазон» по сравнению с группой «доксциклин».

Таким образом, выявлен факт перепрограммирования популяции Т-хелперов в динамике моделирования сЮИА у крыс Wistar. В группе «дексаметазон» по сравнению с группой «доксциклин» на 55-е сут.

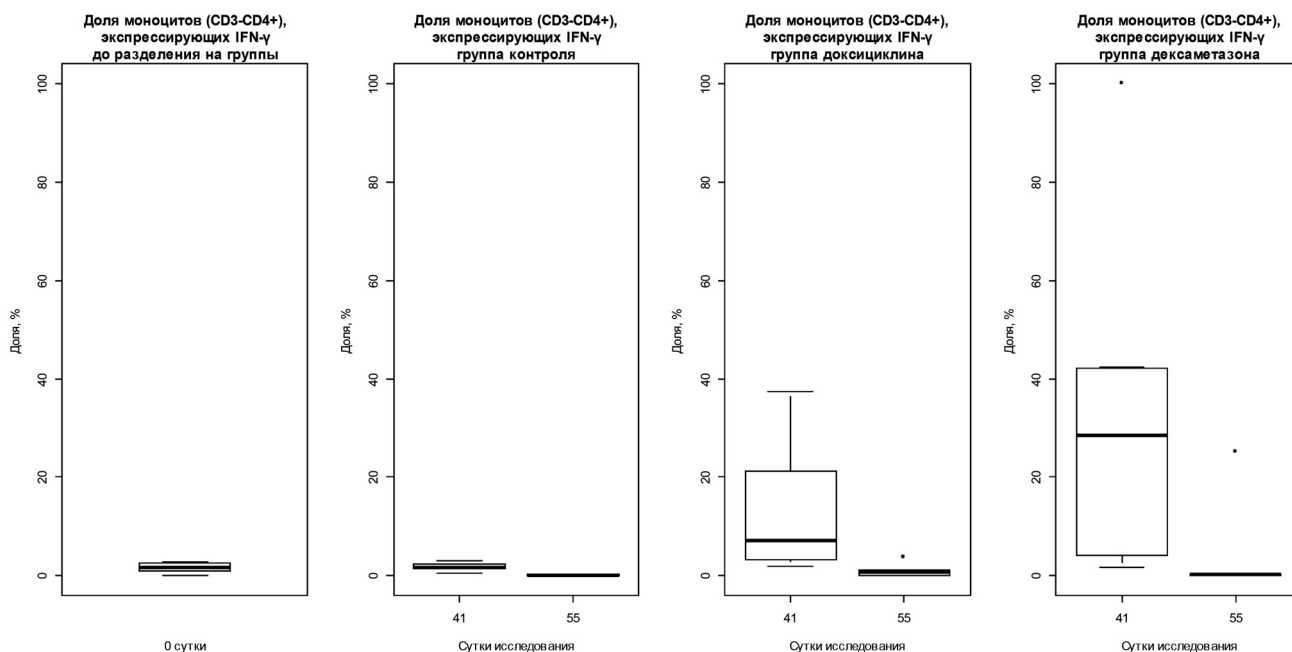


Рис. 4. Доли моноцитов, экспрессирующих IFN- γ , при моделировании сЮИА у крыс Wistar. Статистически значимые отличия (по данным теста Mann-Whitney-Wilcoxon) показателей от исходных данных: группа контроля: 55-е сут. ($p = 0,009155$); группа «доксциклин»: 41-е сут. ($p = 0,002953$); группа «дексаметазон»: 41-е сут. ($p = 0,001865$). Статистически значимые различия между группами: группа контроля-группа «доксциклин» на 41-е сут. ($p = 0,005905$), группа контроля-группа «дексаметазон» на 41-е сутки ($p = 0,005905$).

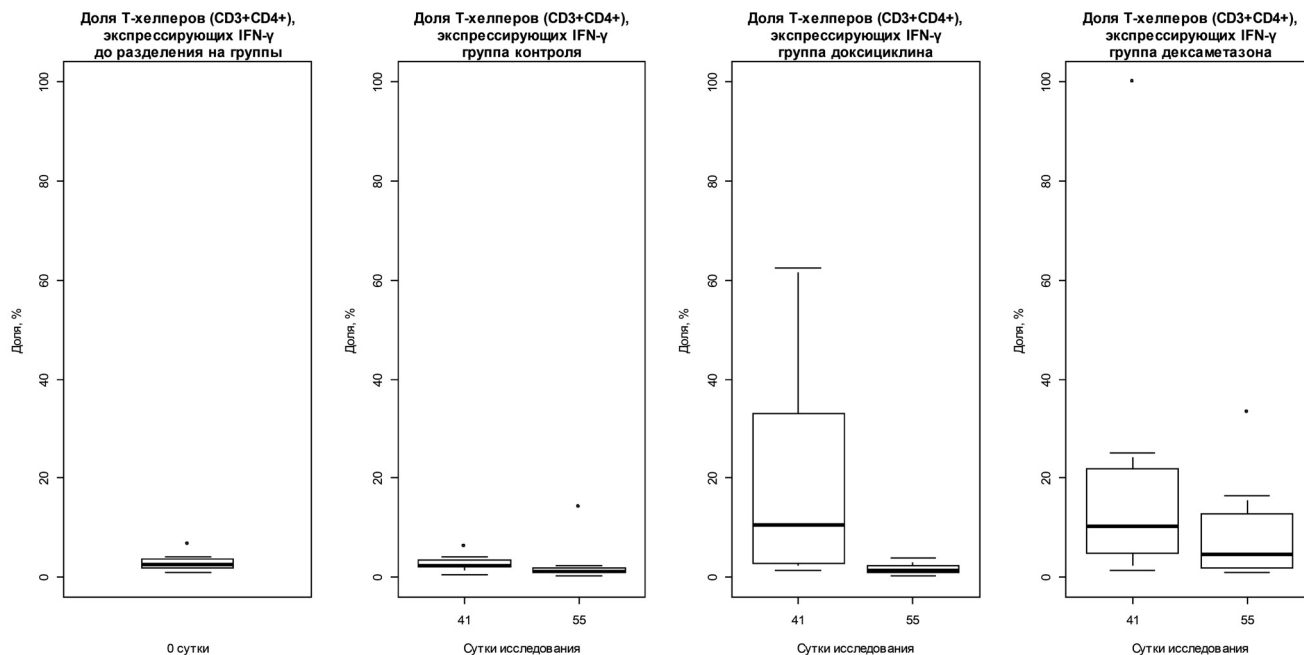


Рис. 5. Доли Т-лимфоцитов хелперов, экспрессирующих IFN- γ , при моделировании сЮИА у крыс линии Wistar. Статистически значимые отличия (по данным теста Mann-Whitney-Wilcoxon) показателей от исходных данных: группа «дексаметазон»: 41-е сут. ($p = 0,03792$). Статистически значимые различия между группами: группа «доксциклин»-группа «дексаметазон» на 55-е сут. ($p = 0,02813$).

наблюдался наибольший процент лимфоцитов, вырабатывающих как IL-4, так и IFN-γ. Роль указанной группы клеток при сЮИА требует специального исследования. С одной стороны, продемонстрированный факт может отражать различную активацию Т-хелперов 1 и 2 типа при применении указанных препаратов. Тем не менее, внутри группы CD3+CD4+ описана (и в последнее время интенсивно изучается при самых различных формах патологии) группа Т-регуляторных CD25+ клеток [14]. Однако эта ли субпопуляция привела к обнаруженному в нашем исследовании явлению перепрограммирования Т-хелперов, сказать пока невозможно (что и не было целью данного исследования).

В целом по данным оценки про-М1 и про-М2 ответа моноцитов и Т-хелперов можно сделать заключение (таблица), что при применении дексаметазона, в отличие от доксициклина, реализуется большее число компонентов как про-М1, так и про-М2 ответа (т.е. про-М1 и про-М2 ответы моноцитов, а также про-М1 и про-М2 ответы лимфоцитов). Следовательно, можно предположить, что результирующее влияние этих компонентов на проявления сЮИА у крыс зависит от выраженности каждого компонента и их конкретного вклада.

Выводы

1. Реализация патогенетических звеньев модели сЮИА у крыс Wistar приводит к статистически значимому перепрограммированию популяции моноцитов.
2. Раздельное применение доксициклина и дексаметазона при моделировании сЮИА обуславливает:

а) перепрограммирование не только макрофагов (что было известно), но и моноцитов крови (по данным о количестве клеток, продуцирующих IFN-γ и IL-4);

б) более раннее (в сравнении с контрольной группой) значимое повышение доли моноцитов, экспрессирующих IL-4, что свидетельствует о наличии у обоих препаратов про-М2 эффекта.

с) ограничение степени снижения показателя про-М1-ответа моноцитов (про-М1 эффект препаратов).

Таким образом, как доксициклин, так и дексаметазон при моделировании сЮИА у крыс Wistar оказывают двоякое воздействие на моноциты: вызывают и про-М1, и про-М2 эффект.

3. Развитие самой модели сЮИА характеризуется определенной динамикой перепрограммирования моноцитов: статистически значимым уменьшением доли про-М1 моноцитов и возрастанием доли про-М2.

4. На 55-е сут. моделирования сЮИА у крыс Wistar выявляется снижение про-М1-ответа моноцитов не только до исходного уровня, но и значимо ниже такового. При этом увеличение показателя про-М2 ответа не было максимально выраженным.

5. Применение при моделировании сЮИА дексаметазона (в сравнении с доксициклином) обуславливает включение большего числа компонентов ответа как про-М1, так и про-М2 направленности.

6. Реализация модели сЮИА у крыс сопровождается перепрограммированием популяции Т-хелперов (увеличением показателя про-М2 ответа на 55-е сут.).

Таблица

Ключевые эффекты модификации доксициклином и дексаметазоном про-М1 и про-М2 ответа моноцитов и Т-лимфоцитов хелперов при моделировании сЮИА у крыс линии Wistar

Показатель	Эффект доксициклина	Эффект дексаметазона
Моноциты (про-М2): доля экспрессирующих IL-4	Более раннее увеличение показателя (41-е сут.) при сравнении с динамикой изменения в группе контроля.	1. Более раннее увеличение показателя (41-е сут.) при сравнении с динамикой изменения в группе контроля. 2. Большие значения показателя (41-е сут.) по сравнению с группой контроля
Лимфоциты (про-М2): доля экспрессирующих IL-4		Большие значения показателя по сравнению с группой "доксициклин" (55-е сут.).
Моноциты (про-М1): доля экспрессирующих IFN-γ	1. Увеличение показателя в динамике группы (41-е сут.) по сравнению с динамикой контрольной группы. 2. Большие значения показателя (41-е сут.) по сравнению с группой контроля. 3. Ограничение снижения показателя в динамике группы (55-е сут.) по сравнению с динамикой контрольной группы.	1. Увеличение показателя в динамике группы (41-е сут.) по сравнению с динамикой показателя контрольной группы. 2. Большие значения показателя (41-е сут.) по сравнению с группой контроля. 3. Ограничение снижения показателя в динамике группы (55-е сут.) по сравнению с динамикой контрольной группы.
Лимфоциты (про-М1): доля экспрессирующих IFN-γ		Большие значения показателя по сравнению с группой "доксициклин" (55-е сут.).

7. Использование дексаметазона, в отличие от доксицилина, при моделировании сЮИА у крыс приводит к более выраженному перепрограммированию Т-хелперов (что проявляется увеличением доли клеток, продуцирующих факторы активации как М1-, так и М2-ответа (IFN- γ и IL-4 соответственно).

References

1. Litvitskiy P., Sakharov V., Alexeeva E. et al. THU0212 Model of Arthritis with The Typical Systemic Manifestations in Wistar Rats. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2016; 75: 264.
2. Litvitskiy P.F., Sakharov V.N., Alekseeva E.I., Mayanskij N.A. *Method for creation biological model of systemic juvenile idiopathic arthritis in experiment*. Invention patent RU 2612843 C1. Application 18.02.2016. Registration date 13.03.2017.
3. Sikora K.A., Grom A.A. Update on the pathogenesis and treatment of systemic idiopathic arthritis. *Curr Opin Pediatr*. 2011; 23 (6): 640-6. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22045308>.
4. Ombrello M.J., Remmers E.F., Tachmazidou I., Grom A., Foell D., Haas J.P., Martini A. et al. HLA-DRB1*11 and variants of the MHC class II locus are strong risk factors for systemic juvenile idiopathic arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015; 112(52): 15970-5. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26598658>.
5. Yushkov B.G., Chereshev V.A. *Definition of normal parameters in physiology (physiological constants in laboratory animals. [Ponyatie normy v fiziologii (fiziologicheskie konstanty laboratornykh zhivotnykh)]*. Moscow; NP «Tsentr strategicheskogo Partnerstva»; 2016, 189. (in Russian)

Сведения об авторах:

Сахаров Владимир Николаевич, аспирант, ассистент каф. патофизиологии лечебного факультета ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), Scopus Author ID: 56712440000, e-mail: vladimirsah91@mail.ru

Литвицкий Петр Францевич, доктор мед. наук, проф., чл.-корр. РАН, зав. каф. патофизиологии лечебного факультета ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), e-mail: litvicki@mma.ru;

Алексева Екатерина Иосифовна, доктор мед. наук, проф., зав. каф. педиатрии и детской ревматологии педиатрического факультета, декан педиатрического факультета ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрав России (Сеченовский Университет), зав. отд-нием детской ревматологии ФГАУ НМИЦЗД Минздрава России;

Маянский Николай Андреевич, доктор мед. наук, проф., руководитель лаб. отд-ния ФГАУ НМИЦЗД Минздрава России, e-mail: mayansky@nczd.ru;

Закиров Р.Ш., врач клинично-лабораторной диагностики лаб. отд-ния ФГАУ НМИЦЗД Минздрава России, e-mail: biochemic@bk.ru

6. McWhorter F.Y., Wang T., Nguyen P., Liu W.F. Modulation of macrophage phenotype by cell shape. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110 (43): 17253-8 URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24101477>.

7. He L., Marneros A.G. Doxycycline inhibits polarization of macrophages to the proangiogenic M2-type and subsequent neovascularization. *The Journal of Biological Chemistry*. 2014; 289 (12): 8019 — 8028. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24505138>.

8. Han L., Su W., Huang J., Zhou J., Qiu S., Liang D. Doxycycline inhibits inflammation-induced lymphangiogenesis in mouse cornea by multiple mechanisms. *PLoS One*. 2014; 9 (9): e108931. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25268699>.

9. Haik S., Marcon G., Mallet A., Tettamanti M., Welaratne A., Giaccone G. et al. Doxycycline in Creutzfeldt-Jakob disease: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol*. 2014; 13 (2): 150-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24411709>.

10. Martinez F.O., Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Reports*. 2014; 6: 13 URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3944738/> (дата обращения: 05.04.2014).

11. *Rat immunology. From Genes to Proteins to Cells*. BD Biosciences (www.bdbiosciences.com)

12. R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>

13. Krzywinski M., Altman N. Points of significance: Visualizing samples with box plots. *Nat Methods*. 2014; 11(2): 119-20 URL: <http://www.nature.com/nmeth/journal/v11/n2/full/nmeth.2813.html>.

14. Sakaguchi S., Yamaguchi T., Nomura T., Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008; 133(5): 775-87 URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18510923>.