

МИКРОГЛИЯ И ДЕНДРИТНЫЕ КЛЕТКИ КАК ИСТОЧНИК ИЛ-6 В МЫШИНОЙ МОДЕЛИ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

© 2024 В.С. Гоголева^{1*}, К.Т. Нгуен², М.С. Друзцкая¹

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,
Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины,
117997 Москва, Россия; электронная почта: violettegogoleva@mail.ru

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 06.12.2023

После доработки 01.02.2024

Принята к публикации 06.02.2024

Рассеянный склероз (РС) – это комплексное аутоиммунное заболевание центральной нервной системы (ЦНС), приводящее к разрушению миелиновой оболочки нейронов и нарушению проводимости нервных сигналов. Изучение молекулярных механизмов развития РС критически важно, так как заболевание характеризуется ранней манифестацией, хроническим течением и терапией, основанной на симптоматическом лечении. Известно, что цитокины играют ключевую роль в патогенезе РС, при этом одним из ключевых медиаторов является интерлейкин-6 (ИЛ-6). В настоящей работе была исследована роль ИЛ-6, продуцируемого микроглией и дендритными клетками, в развитии экспериментального аутоиммунного энцефаломиелимита (ЕАЕ), широко используемой модели РС на мышах. Работу проводили на мышах с клеточно-специфичным удалением ИЛ-6 из $CD3^+CD11b^+$ -клеток, в том числе из микроглии, и из дендритных клеток $CD11c^+$. Было установлено, что мыши с удалением ИЛ-6 из микроглии или из дендритных клеток развивают более слабые симптомы по сравнению с мышами дикого типа. В ЦНС мышей с инактивацией ИЛ-6 в микроглии на пике ЕАЕ происходило повышение доли регуляторных Т-клеток (T_{reg}) и снижение процентного содержания патогенетических ИФН γ -продуцирующих $CD4^+$ Т-клеток, что коррелировало с уменьшением количества провоспалительных моноцитов. В то же время при удалении ИЛ-6 из микроглии наблюдалось увеличение содержания $CCR6^+$ Т-клеток и GM-CSF-продуцирующих Т-клеток. У мышей с дефицитом ИЛ-6 в дендритных клетках наблюдалось не только ранее описанное увеличение доли T_{reg} и уменьшение доли Т-хелперов, продуцирующих ИЛ-17А (T_H17 -клеток), но и уменьшение продукции GM-CSF и ИФН γ во вторичных лимфоидных органах. Таким образом, функции ИЛ-6 в организме зависят от источника и локализации иммунного ответа: ИЛ-6 из микроглии выполняет как патогенетические, так и протективные функции именно в ЦНС, в то время как ИЛ-6 из дендритных клеток, помимо критически важного участия в соотношении T_{reg} и T_H17 -клеток, может стимулировать продукцию цитокинов, ассоциированных с патогенетическими функциями Т-клеток.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: интерлейкин-6, микроглия, дендритные клетки, экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит, рассеянный склероз, мышинные модели.

DOI: 10.31857/S0320972524050106 EDN: YOAHNSJ

ВВЕДЕНИЕ

Рассеянный склероз (РС) представляет собой хроническое аутоиммунное заболевание, поражающее центральную нервную систему (ЦНС) и

вызывающее такие серьезные последствия, как нарушения зрения, опорно-двигательного аппарата и когнитивных функций. В течение последних десятилетий наблюдается тенденция к увеличению количества людей, у которых диагностирован РС,

Принятые сокращения: ГЭБ – гематоэнцефалический барьер; РС – рассеянный склероз; ЦНС – центральная нервная система; ЕАЕ – экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит; ИЛ – интерлейкин; T_H – Т-хелперы; T_{reg} – регуляторные Т-клетки; ΔDC – удаление гена только в дендритных клетках; ΔMG – удаление гена только в микроглии.

* Адресат для корреспонденции.

однако на данный момент доступны методы терапии, направленные исключительно на модуляцию симптомов заболевания [1]. В связи с этим поиск новых терапевтических мишеней остается крайне актуальной задачей. Одной из наиболее востребованных экспериментальных моделей РС на мышах является экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЕАЕ) [2]. Патогенез ЕАЕ главным образом обусловлен активацией, последующей дифференцировкой и инфильтрацией в ЦНС CD4⁺ Т-клеток в ответ на иммунизацию антигенами, входящими в состав миелиновой оболочки нейронов, в полном адьюванте Фрейнда [3]. Критическую роль в патогенезе ЕАЕ выполняют цитокины, одним из которых является ИЛ-6. В частности, было показано, что фармакологическая и генетическая инактивация ИЛ-6 в мышинной модели рассеянного склероза приводит к уменьшению тяжести заболевания [4] или абсолютной резистентности [5].

Установлено, что патогенетическая роль ИЛ-6 обусловлена различными механизмами, участвующими в регуляции проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и развития популяций CD4⁺ Т-клеток. Было показано, что при иммунизации миелиновым пептидом MOG₃₅₋₅₅ у мышей дикого типа, по сравнению с мышами, дефицитными по ИЛ-6, на поверхности эндотелиальных клеток, входящих в состав ГЭБ, наблюдалась повышенная экспрессия таких молекул адгезии, как VCAM-1 и ICAM-1 [5]. Известно, что для передачи сигнала от ИЛ-6 необходима активация двух субъединиц рецепторного комплекса ИЛ-6 – ИЛ-6Rα и gp130. Оказалось, что *транс*-презентация ИЛ-6 (передача внутриклеточного сигнала за счет взаимодействия комплекса ИЛ-6R–ИЛ-6 на поверхности одной клетки с gp130 на поверхности другой) необходима для поляризации патогенетических Т-хелперов, продуцирующих ИЛ-17А (Т_H17-клетки) в модели ЕАЕ [6]. В подтверждение этому удаление gp130 с поверхности Т-клеток подавляет дифференцировку CD4⁺ Т-клеток в регуляторные Т-клетки (T_{reg}), экспрессирующие транскрипционный фактор FoxP3, тем самым способствуя развитию Т_H17-клеток, экспрессирующих транскрипционный фактор RORγt⁺ [7]. Примечательно, что существует положительная обратная связь между ИЛ-6 и ИЛ-17А, продуцируемым патогенетическими Т_H17-клетками: ИЛ-17А стимулирует продукцию ИЛ-6 астроцитами, что дополнительно способствует поляризации таких Т_H17-клеток [8, 9].

Основными источниками ИЛ-6 в ЦНС выступают различные клетки неиммунного происхождения, а именно: нейроны, астроциты и эндотелиальные клетки [10], однако в модели ЕАЕ главный источник ИЛ-6 представлен миелоидными клетками [6], а именно: дендритными клетками и микро-

глией (резидентные макрофаги ЦНС). Несмотря на то что имеется много данных, свидетельствующих о различных функциях ИЛ-6 в модели ЕАЕ, недостаточно изучены особенности продукции цитокинов Т-клетками в ходе развития заболевания в зависимости от конкретной субпопуляции миелоидных клеток, что и стало предметом исследования настоящей работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Мыши. Работу проводили на линиях мышей с делецией гена *Il6* в миелоидных клетках: *Cd11c^{Cre} × Il6^{fl/fl}* (мышь с делецией гена *Il6* преимущественно в дендритных клетках) [11] и *Cx3cr1^{CreER} × Il6^{fl/fl}* (мышь с делецией гена *Il6* в миелоидных клетках CX₃CR1⁺, в том числе в микроглии). Для получения линии мышей с делецией гена *Il6* в миелоидных клетках CX₃CR1⁺ скрещивали мышью *Il6^{fl/fl}* [12] и мышью *Cx3cr1^{CreER}* [13]. В экспериментах были использованы самки и самцы возрастом 9–12 недель. Мышей разводили и содержали на базе SPF-вивария ИЦиГ СО РАН и Автономного экспериментально-биологического комплекса для временного размещения и исследования генетически модифицированных линий лабораторных мышей категории SPF при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2019-1660). Эксперименты на генетически-модифицированных мышах в модели ЕАЕ были одобрены Биоэтическим комитетом ИМБ РАН (Протокол № 3 от 21.09.2023).

Введение тамоксифена. Тамоксифен («Sigma Aldrich», США) растворяли в кукурузном масле («Sigma Aldrich») из расчета 15 мг/мл путем длительной инкубации и постоянного перемешивания на термошейкере при 37 °С в защищенном от света месте в течение ночи. Полученный раствор раскатывали по 2 мл в пробирки и хранили при +4 °С в течение 5 дней. Для удаления ИЛ-6 в микроглии мышам *Cx3cr1^{CreER} × Il6^{fl/fl}* и контрольной группе мышей дикого типа (*Il6^{fl/fl}*) в возрасте 8–9 недель вводили 100 мкл раствора тамоксифена внутрибрюшинно из расчета 75 мг/кг каждый день в течение 5 дней.

Индукция ЕАЕ. Мышей подкожно иммунизировали 100 мкл суспензии MOG₃₅₋₅₅-пептида (миелин-олигодендроглиальный гликопротеин; «Anaspec», США) в полном адьюванте Фрейнда («Sigma Aldrich») с добавлением 5 мг/мл убитых *Mycobacterium tuberculosis* («Difco», США). После введения суспензии MOG₃₅₋₅₅-пептида в тот же день и еще через 2 дня мышам вводили коклюшный токсин («Sigma Aldrich») внутрибрюшинно из расчета 200 нг на мышь для увеличения проницаемости ГЭБ. После индукции ЕАЕ проводили оценку

развития клинических симптомов заболевания по шкале от 0 до 5, где 5 – наибольшая степень заболевания; 0 – нет симптомов; 0,5 – частичная потеря тонуса хвоста; 1 – полная потеря тонуса хвоста; 1,5 – частичное нарушение рефлекса переворачивания; 2 – полное нарушение рефлекса переворачивания; 3 – отказ одной задней конечности; 3,5 – отказ обеих задних конечностей; 4 – отказ одной передней конечности и обеих задних конечностей; 4,5 – отказ всех конечностей.

Выделение клеток. Для выделения периферических лейкоцитов крови мыши проводили забор крови в пробирки, содержащие раствор гепарина; затем проводили центрифугирование в градиенте плотности Фиколла в течение 30 мин без ускорения и торможения (1,077 г/см³, «ПанЭко», Россия). Для последующего анализа отбирали фракции, содержащие периферические мононуклеазы. Суспензию клеток из селезенки и лимфатических узлов получали путем механической гомогенизации через 70-мкм фильтр («NEST», Китай) в растворе PBS с добавлением 2% FBS. Лизис эритроцитов в суспензии спленоцитов проводили путем добавления буфера ACK (Ammonium-Chloride-Potassium: 1,5 M NH₄Cl; 100 mM KHCO₃; 10 mM EDTA-2Na в дистиллированной воде; pH 7,2). Иммунные клетки из ЦНС выделяли по ранее описанному протоколу [14]. Вкратце, мышей подвергали анестезии и проводили транскардиальную перфузию с использованием 0,9%-ного раствора NaCl. Затем извлекали спинной и головной мозг и механически гомогенизировали. Ферментативную диссоциацию проводили в растворе DPBS с добавлением 1,5 мг/мл коллагеназы II («Gibco») и 50 мкг/мл ДНКазы I («Roche», Швейцария). Реакцию останавливали путем добавления большого объема холодного PBS, содержащего 2% FBS. Полученную суспензию клеток гомогенизировали с помощью шприца с иглой размером 18G × 1,5". Затем проводили разделение фракции иммунных клеток в градиенте плотности Перколла («GE Healthcare», США) 30/37/70 при центрифугировании (500 g, 25 °C, 40 мин, без ускорения и торможения).

Цитофлуориметрический анализ. Для измерения продукции цитокинов CD4⁺ Т-клетками суспензию клеток из селезенки или лимфатических узлов инкубировали в течение 4 ч при 37 °C, в атмосфере 5% CO₂ в присутствии 50 нг/мл форбол-12-миристан-13-ацетата (ФМА; «Sigma Aldrich»), 500 нг/мл иономицина («Sigma Aldrich») и 3 мкг/мл брэфельдина А («eBioscience», США). Для блокировки неспецифического связывания антител с Fcγ-рецепторами все клеточные суспензии инкубировали в течение 20 мин при 4 °C с антителами к CD16/CD32 (клон 2.4G2, коллекция in-house DRFZ), после чего клетки отмывали центрифугированием в PBS, содержащем 2% FBS. К клеткам

добавляли эпитопспецифичные антитела к поверхностным маркерам: anti-CD45 (клон 30-F11, «BioLegend», США), anti-CD11b (клон M1/70, «BioLegend»), anti-Ly6C (клон HK1.4, «Invitrogen», США), anti-MHCII (клон M5/114.15.2, «BioLegend»), anti-CX₃CR1 (клон SA011F11, «BioLegend»), anti-CD4 (клон RM4-5, «BioLegend»), anti-TCRb (клон H57-597, «eBioscience»), anti-IFNγ (клон XMG1.2, «BioLegend»), anti-IL-17A (клон eBio17B7, «BioLegend»), anti-GM-CSF (клон MP1-22E9, «BioLegend»), anti-FoxP3 (клон FJK-16s, «Invitrogen»), anti-RORγt (клон B2D, «Invitrogen»). Для окрашивания мертвых клеток и их исключения из последующего анализа использовали Fixable Viability Dye («eBioscience»). Цитофлуориметрический анализ проводили на приборе BD FACSCanto II или BDFACSAria III («Beckton Dickinson», США). Популяцию CD45⁺CD4⁺CX₃CR1⁺ моноцитов крови или CD45⁺CD11b⁺CX₃CR1⁺ микроглии сортировали на приборе BDFACSAria III с чистотой >90%. Полученные данные анализировали с помощью FlowJo Software («Beckton Dickinson»).

Иммуноферментный анализ. Отсортированные моноциты и клетки микроглии активировали липополисахаридом (LPS, (100 нг/мл в течение 4 ч). Затем оценивали концентрацию IL-6 в супернатанте методом ИФА с использованием набора для IL-6 мыши ELISA Ready-SET-Go! («eBioscience», США), следуя протоколу производителя.

Статистический анализ. Статистическую обработку данных проводили с помощью GraphPad Prism 9. Выборки проверяли на нормальность распределения с помощью критериев Шапиро–Уилка или Колмогорова–Смирнова. В случае нормального распределения для сравнения выборок использовали *t*-критерий Стьюдента или однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). В противном случае использовали непараметрические тесты Манна–Уитни или Крускалла–Уоллиса. Различия считали достоверными при *p* < 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

IL-6 из миелоидных клеток выполняет критически важную роль в патогенезе ЕАЕ. Для изучения роли IL-6 из миелоидных клеток в развитии ЕАЕ эксперименты проводили на двух группах генетически модифицированных мышей с генетической инактивацией IL-6: 1) только в дендритных клетках (IL6^{ΔDC}), 2) только в микроглии (IL6^{ΔMG}). Контрольная группа была представлена мышами дикого типа из того же помета (IL6^{fl/fl}). Мыши с удалением IL-6 в дендритных клетках были ранее получены в лаборатории и характеризуются конститутивной инактивацией IL-6 в клетках CD11c⁺ [11, 15]. Получение мышей с дефи-

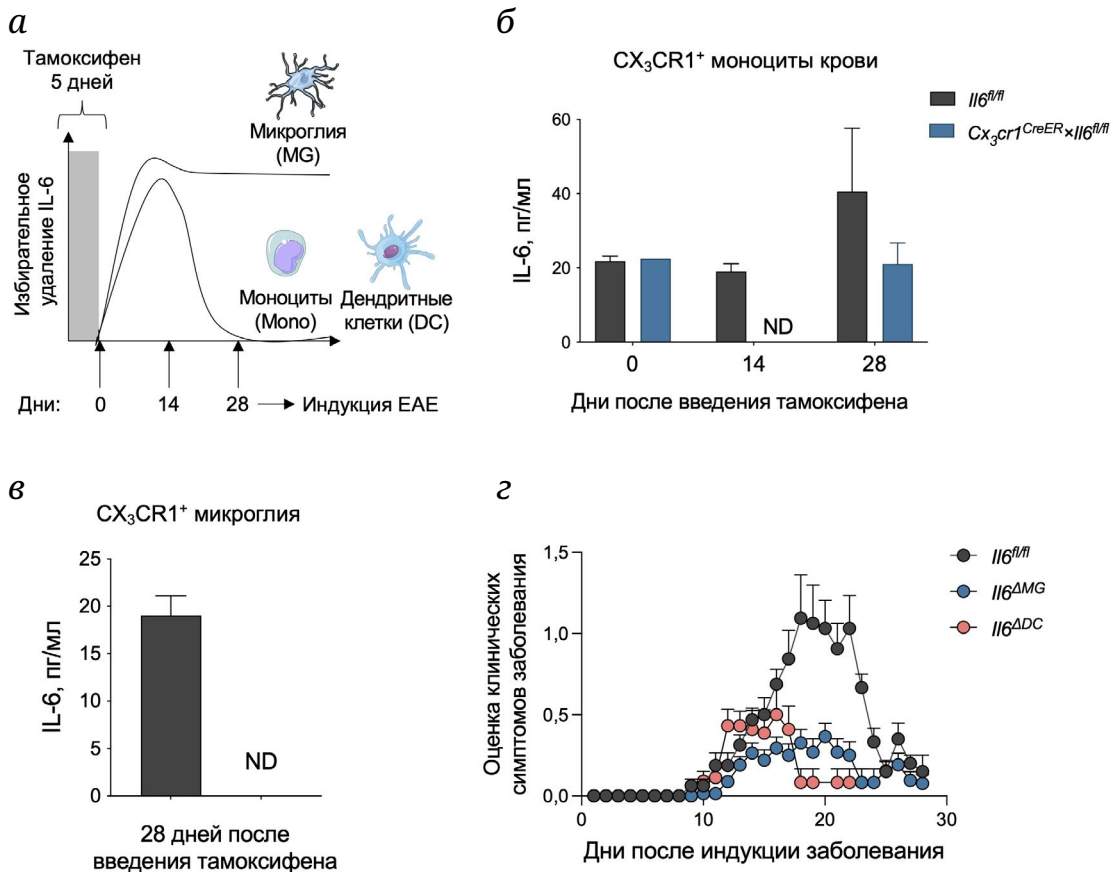


Рис. 1. Мыши с тамоксифен-зависимой инактивацией IL-6 в CX_3CR1^+ микроглии устойчивы к развитию ЕАЕ. *а* – Схема эксперимента. Мышам вводили тамоксифен из расчета 75 мкг/г в течение 5 дней. Далее, через 7–14 дней после курса тамоксифена удаление IL-6 детектировали как в тканерезидентных макрофагах, так и в моноцитах, но уже через 28 дней происходило обновление пула моноцитов из костного мозга и дефицит IL-6 наблюдали только в тканерезидентных макрофагах, в том числе в микроглии; *б* – концентрация IL-6 в супернатанте отсортированных моноцитов CX_3CR1^+ , выделенных из периферической крови мышей $Cx3cr1^{CreER} \times Il6^{fl/fl}$ на 0, 14, 28 дни после введения тамоксифена и активированных LPS в течение 4 ч; ND – не детектируется; *в* – концентрация IL-6 в супернатанте отсортированной микроглии CX_3CR1^+ , выделенной из ЦНС мышей $Cx3cr1^{CreER} \times Il6^{fl/fl}$ на 28 день после введения тамоксифена и активированной LPS в течение 4 ч; *г* – динамика развития клинических симптомов ЕАЕ у мышей дикого типа ($Il6^{fl/fl}$), мышей с удалением IL-6 только в микроглии ($Il6^{\Delta MG}$) и мышей с удалением IL-6 только в дендритных клетках ($Il6^{\Delta DC}$), иммунизированных MOG_{35–55}-пептидом в полном адьюванте Фрейнда. Результаты представлены как среднее значение \pm SEM и подтверждены в трех независимых экспериментах с минимальным количеством мышей в группе $n = 4$ в каждом эксперименте

цитом IL-6 в микроглии проводили путем скрещивания мышей $Cx3cr1^{CreER}$, экспрессирующих тамоксифен-зависимую Cre-рекомбиназу под контролем промотора CX_3CR1 [13], и мышей с «флосированным» геном $Il6$ ($Il6^{fl/fl}$) [12]. Принцип работы этой системы заключается в клеточно-специфичном удалении окаймленного loxP-сайтами («флосированного») гена $Il6$ Cre-рекомбиназой, спшитой с мутантной формой эстрогенового рецептора, только в клетках CX_3CR1^+ в ответ на введение тамоксифена (рис. 1, *а*).

Для тканеспецифичной инактивации IL-6 исключительно в клетках микроглии мышам $Cx3cr1^{CreER} \times Il6^{fl/fl}$ и контрольным мышам дикого типа ($Il6^{fl/fl}$) вводили тамоксифен из расчета 75 мкг/г в течение 5 дней; через 14 дней после введения

тамоксифена удаление IL-6 происходило как в моноцитах (рис. 1, *б*), дендритных клетках, так и в микроглии [13]. После полного обновления пула миелоидных клеток CX_3CR1^+ из костного мозга, а именно через 28 дней после введения тамоксифена, такие мыши сохраняли делецию $Il6$ только в популяции долгоживущих тканерезидентных макрофагов, в том числе в клетках микроглии (рис. 1, *в*).

Индукцию ЕАЕ проводили путем иммунизации MOG_{35–55}-пептидом в полном адьюванте Фрейнда и последующего введения коклюшного токсина для повышения проницаемости ГЭБ. Оценку клинических симптомов заболевания начинали с 8-го дня после иммунизации. Было установлено, что мыши с дефицитом IL-6 только в микроглии или только в дендритных клетках

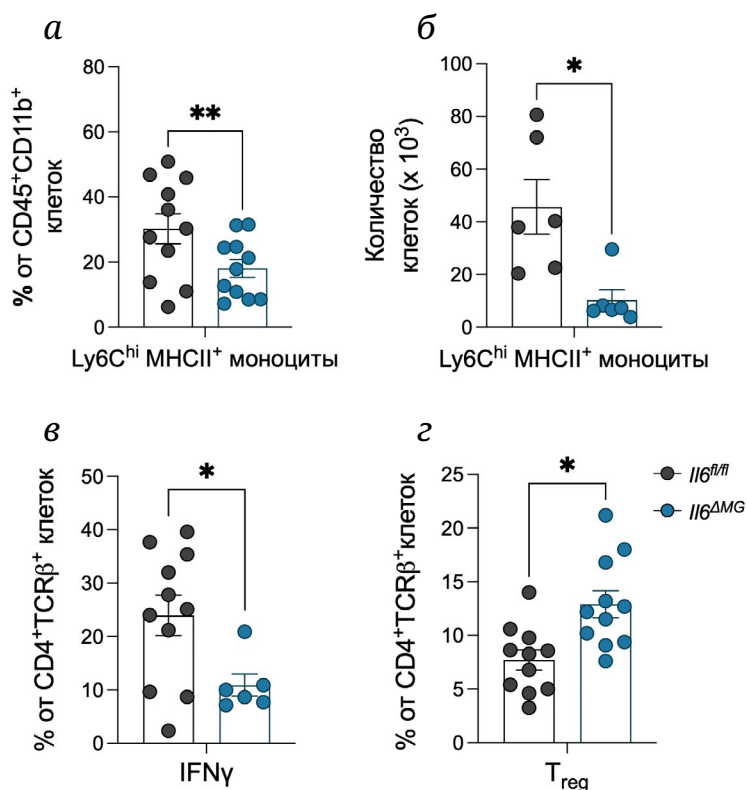


Рис. 2. IL-6, продуцируемый микроглией, стимулирует развитие патогенетических моноцитов в ЦНС и продукцию IFN γ на пике ЕАЕ. *а* – Доля Ly6C^{hi}MHCII⁺-клеток от CD45⁺CD11b⁺-клеток в ЦНС на пике ЕАЕ; *б* – абсолютное количество Ly6C^{hi}MHCII⁺-клеток в ЦНС на пике ЕАЕ; *в* – доля IFN γ -продуцирующих клеток, рестимулированных ФМА/иономицином, от клеток CD4⁺TCR β ⁺ в ЦНС на пике ЕАЕ; *г* – доля FoxP3⁺ T_{reg} от CD4⁺TCR β ⁺-клеток в ЦНС на пике ЕАЕ. Представлены объединенные (*а*, *в* и *г*) или репрезентативные данные (*б*) с числом мышей каждого генотипа $n = 5-6$. Данные представлены как среднее \pm SEM. Использовали *t*-критерий Стьюдента или критерий Манна–Уитни; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

развивают более слабые симптомы заболевания по сравнению с контрольной группой мышей дикого типа (рис. 1, *г*). Эти результаты согласуются с литературными данными о том, что именно дендритные клетки [6] и микроглия [16] являются критически важными источниками IL-6 в модели ЕАЕ.

IL-6 из микроглии регулирует иммунный ответ в ЦНС на пике ЕАЕ. Поскольку микроглия – это тканерезидентные макрофаги ЦНС, то предполагается, что опосредуемые этими клетками функции будут в основном затрагивать процессы, происходящие в ЦНС. В связи с этим на 16-й день после иммунизации, что соответствовало эффекторной фазе заболевания, проводили цитофлуориметрический анализ содержания миелоидных клеток и антиген-специфичных CD4⁺ T-клеток в ЦНС. Было установлено, что у мышей с инактивацией IL-6 в микроглии происходило уменьшение процентного (рис. 2, *а*) и абсолютного (рис. 2, *б*) содержания Ly6C^{hi}MHCII⁺-моноцитов, являющихся исключительно патогенетическими в модели ЕАЕ. Кроме этого, происходило уменьшение процентного содержания IFN γ -продуцирующих CD4⁺ T-клеток

(рис. 2, *в*). Эти результаты согласуются между собой, т.к. именно IFN γ обеспечивает дифференцировку Ly6C^{hi}-моноцитов в MHCII⁺-эффекторные дендритные клетки [17]. Параллельно, эти результаты соответствуют литературным данным о стимуляции развития T_{reg} (рис. 2, *г*) при низких концентрациях IFN γ [18].

Как было установлено в ходе текущей работы, мыши с делецией гена, кодирующего IL-6, в микроглии развивают более слабые симптомы ЕАЕ, по сравнению с мышами дикого типа, однако они не обладают полной устойчивостью к развитию заболевания (рис. 1, *г*). При этом у таких мышей происходит повышение процентного содержания T_{reg}, подавляющих развитие ЕАЕ (рис. 2, *г*), то есть, возможно, присутствует дополнительный компонент, обеспечивающий развитие клинических симптомов. Нами было выдвинуто предположение, что у таких мышей может происходить увеличение инфильтрации патогенетических T-клеток в ЦНС. Известно, что ось CCR6/CCL20 является ключевой для миграции иммунных клеток в ЦНС и особенно необходима для первой волны инфильтрации T-клеток в ЦНС [19]. Действительно, у мышей

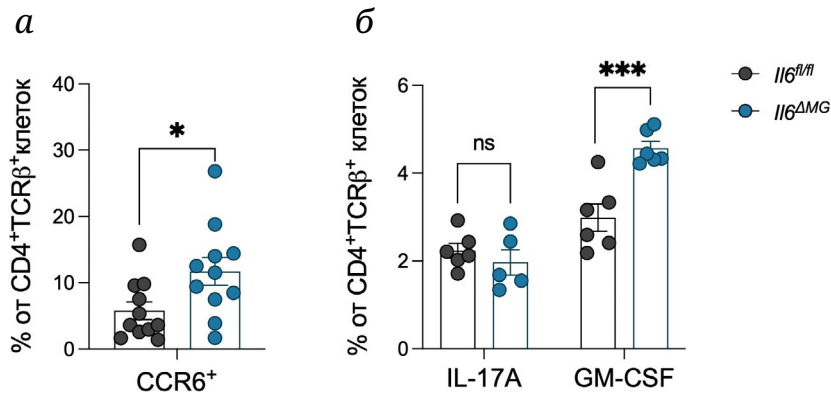


Рис. 3. Делеция гена, кодирующего IL-6 в микроглии, приводит к увеличению миграции Т-клеток и индукции GM-CSF-продуцирующих CD4⁺ Т-клеток в ЦНС. *а* – Процентное содержание CCR6⁺-клеток от CD4⁺TCRβ⁺-клеток в ЦНС на пике ЕАЕ. *б* – Доля GM-CSF-продуцирующих клеток, рестимулированных ФМА/иономицином, от CD4⁺TCRβ⁺-клеток в ЦНС на пике ЕАЕ. Представлены объединенные (*а*) или репрезентативные данные (*б*) с числом мышей каждого генотипа *n* = 5–6. Данные представлены как среднее ± SEM. Использовали *t*-критерий Стьюдента или критерий Манна–Уитни; * *p* < 0,05; *** *p* < 0,001; ns – недостоверные отличия

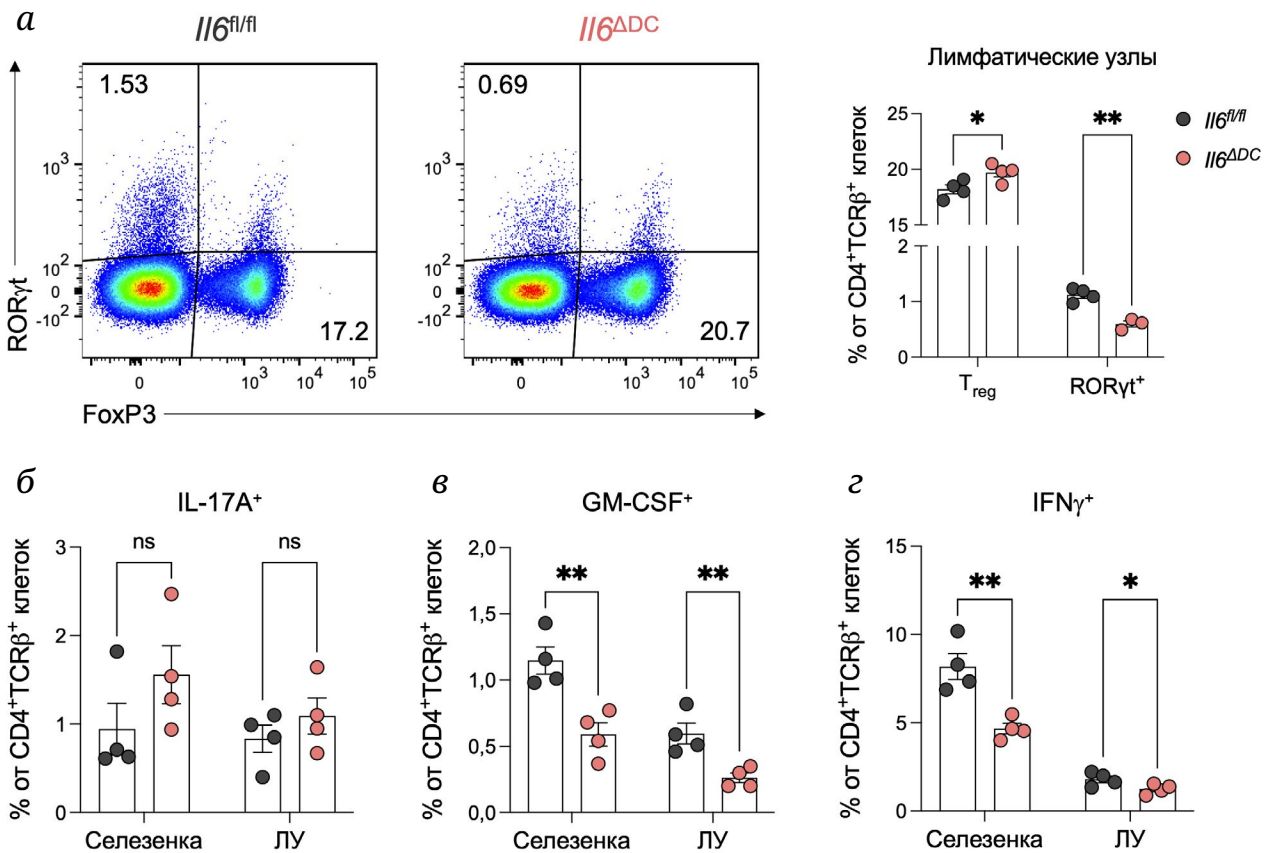


Рис. 4. IL-6 из дендритных клеток стимулирует продукцию цитокинов CD4⁺ Т-клетками в периферических лимфоидных органах на пике ЕАЕ. *а* – Репрезентативные поточечные диаграммы (слева) и процентное содержание (справа) RORγt⁺ и FoxP3⁺ CD4⁺ Т-клеток, выделенных из лимфатических узлов мышей *Il6^{fl/fl}* и *Il6^{ΔDC}* на пике ЕАЕ. *б–г* – Процентное содержание IL-17A-, GM-CSF-, IFNγ-продуцирующих CD4⁺ Т-клеток, выделенных из селезенки и лимфатических узлов и рестимулированных ФМА/иономицином. Результаты представлены как среднее значение ± SEM и подтверждены в двух независимых экспериментах. Использовали *t*-критерий Стьюдента или критерий Манна–Уитни; * *p* < 0,05; *** *p* < 0,001; ns – недостоверные отличия

с удалением IL-6 в микроглии было обнаружено повышение доли CCR6⁺ Т-клеток в ЦНС (рис. 3, *а*). Более того, у таких мышей увеличивалось про-

центное содержание GM-CSF-, но не IL-17A-продуцирующих CD4⁺ Т-клеток (рис. 3, *б*). Известно, что продукция GM-CSF Т-клетками в модели ЕАЕ кри-

тически важна для патогенеза заболевания [20, 21]. При этом GM-CSF способствует миграции иммунных клеток в ЦНС [22]. Таким образом, повышенное содержание CCR6⁺ Т-клеток в ЦНС коррелирует с увеличением поляризации Т-клеток в GM-CSF-продуцирующие клетки.

Таким образом, у мышей с инактивацией IL-6 в микроглии, в соответствии с уменьшением тяжести клинических симптомов ЕАЕ, обнаружено снижение процентного и количественного содержания воспалительных Ly6C^{hi}MHCII⁺-моноцитов в ЦНС, коррелирующее со сниженной продукцией IFN γ Т-клетками и увеличением доли протективных T_{reg}. В то же время у мышей с инактивацией IL-6 в микроглии частичная устойчивость к ЕАЕ может быть связана с повышением миграции Т-клеток в ЦНС в совокупности с увеличением процентного содержания GM-CSF-продуцирующих CD4⁺ Т-клеток.

IL-6 из дендритных клеток не только определяет соотношение T_H17/T_{reg}, но и влияет на продукцию IFN γ и GM-CSF в периферических лимфоидных органах в модели ЕАЕ. Известно, что одной из функций IL-6 в модели ЕАЕ является ингибирование транскрипционного фактора FoxP3, что, в свою очередь, подавляет развитие протективных T_{reg} [23]. С другой стороны, IL-6 критически важен для развития T_H17-клеток [6]. Действительно, у мышей с удалением IL-6 в дендритных клетках было обнаружено уменьшение процентного содержания ROR γ t⁺ T_H17-клеток и увеличение процентного содержания FoxP3⁺ T_{reg} (рис. 4, а) в лимфатических узлах на пике ЕАЕ, что согласуется со всеми литературными сведениями о патогенетической роли IL-6, продуцируемого дендритными клетками.

На следующем этапе изучали продукцию цитокинов Т-клетками, выделенными из лимфатических узлов и селезенки мышей *IL6^{fl/fl}* и *IL6^{ΔDC}* на пике ЕАЕ и рестимулированными ФМА/иономицином. Было выявлено, что удаление IL-6 из дендритных клеток не влияет на продукцию IL-17А Т-клетками (рис. 4, б), что согласуется с литературными данными [6]. Однако *IL6^{ΔDC}*-мыши характеризовались снижением продукции GM-CSF (рис. 4, в) и IFN γ (рис. 4, г) как в лимфатических узлах, так и в селезенке.

Таким образом, мыши с удалением IL-6 в дендритных клетках характеризуются увеличением доли T_{reg} и уменьшением продукции IFN γ и GM-CSF Т-клетками в периферических лимфоидных органах, что объясняет развитие слабых симптомов ЕАЕ. При этом результаты настоящей работы говорят о том, что IL-6 из дендритных клеток может не только участвовать в индукции патогенетических T_H17-клеток [6], но и стимулировать продукцию GM-CSF и IFN γ Т-клетками.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Цитокины играют ключевую роль в патогенезе ЕАЕ. IL-6 является одним из немногих цитокинов, абсолютно необходимых для развития ЕАЕ [24, 25]. Несмотря на то что в ЦНС главным источником IL-6 являются астроциты [10], показано, что в модели ЕАЕ главным источником IL-6 являются миелоидные клетки [6]. При этом удаление IL-6 в миелоидных клетках LysM⁺ (макрофагах, нейтрофилах) не влияет на течение заболевания [6, 26]. Оказалось, что критически важными для патогенеза ЕАЕ популяциями, продуцирующими IL-6, являются микроглия и дендритные клетки [6].

Действительно, результаты этой работы демонстрируют, что удаление IL-6 в микроглии приводит к развитию слабых симптомов ЕАЕ по сравнению с мышами дикого типа. Стоит отметить, что в другом исследовании было выявлено, что удаление IL-6 в микроглии обеспечивало уменьшение тяжести клинических симптомов ЕАЕ у самок, но не у самцов [16], тем самым подтверждая корреляцию преобладания развития РС у женщин. В настоящей работе было установлено, что у мышей с удалением IL-6 в микроглии происходит уменьшение количества провоспалительных Ly6C^{hi}MHCII⁺-моноцитов, играющих центральную роль в процессе демиелинизации. Этот результат согласуется с литературными данными, демонстрирующими снижение уровня демиелинизации в спинном мозге при удалении IL-6 в микроглии [16]. С другой стороны, речь может идти об одной из *вырожденных* функций IL-6, поскольку тот же фенотип наблюдается при удалении IL-6 из различных его источников в ЦНС, а именно астроцитов и нейронов [16]. Кроме этого, при удалении IL-6 в микроглии наблюдалось уменьшение продукции IFN γ Т-клетками, что, с одной стороны, объясняет снижение количества Ly6C^{hi}MHCII⁺-моноцитов [17], с другой стороны, согласуется с увеличением процентного содержания протективных T_{reg} в ЦНС [18].

При этом в противоречии с уменьшением клинических симптомов ЕАЕ у мышей с удалением IL-6 в микроглии происходило увеличение миграции CD4⁺ Т-клеток в ЦНС и продукции ими GM-CSF. Действительно, в другом исследовании было показано, что инфильтрация Т-клеток при удалении IL-6 из различных клеточных источников в ЦНС не изменяется [16]. Кроме того, полученные результаты служат доказательством корреляции коэкспрессии CCR6 и GM-CSF в инфильтрирующих ЦНС Т-клетках [27]. В совокупности эти данные позволяют предположить, что в контексте нейровоспаления клетки микроглии выполняют как протективные, так и патогенетические функции.

С другой стороны, результаты настоящей работы указывают на исключительно патогенетическую роль IL-6 из дендритных клеток [6]. Действительно, IL-6 из дендритных клеток важен для поддержания баланса ROR γ t⁺ T_H17-клеток и FoxP3⁺ T_{reg}. В недавних исследованиях был предложен вариант терапевтического таргетирования этого сигнального пути за счет ингибирования STAT3 малой молекулой [28] для иммуномодуляции клинической картины у пациентов с РС. Примечательно, что в настоящей работе показано, что IL-6 из дендритных клеток также важен для стимуляции продукции Т-клетками IFN γ и GM-CSF, хотя IL-6 не считался цитокином, необходимым для стимуляции продукции GM-CSF [21].

Таким образом, IL-6, продуцируемый клетками микроглии, может выполнять как патогенетические, так и протективные функции, тогда как IL-6 из дендритных клеток играет исключительно патогенетическую роль.

Вклад авторов. М.С. Друцкая – концепция и руководство работой; В.С. Гоголева, К.Т. Нгуен –

проведение экспериментов, обсуждение результатов исследования, написание текста; М.С. Друцкая – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-24-00389).

Благодарности. Авторы выражают благодарность К.-С.Н. Атретханы, Д.М. Поташниковой, А.П. Дыгай, Р.В. Зварцеву за ценные советы и методическую помощь в работе. Авторы выражают признательность С.А. Недоспасову за ценные замечания и общее руководство проектом. Работа по сортировке клеток поддержана программой развития МГУ (комплекс для клеточной сортировки на базе FACSAria SORP; «Beckton Dickinson», США).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждения, в котором проводились исследования, и утвержденным правовым актам РФ и международных организаций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Charabati, M., Wheeler, M. A., Weiner, H. L., and Quintana, F. J. (2023) Multiple sclerosis: neuroimmune crosstalk and therapeutic targeting, *Cell*, **186**, 1309-1327, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.03.008>.
- Steinman, L., Patarca, R., and Haseltine, W. (2023) Experimental encephalomyelitis at age 90, still relevant and elucidating how viruses trigger disease, *J. Exp. Med.*, **220**, <https://doi.org/10.1084/jem.20221322>.
- Krishnarajah, S., and Becher, B. (2022) T(H) cells and cytokines in encephalitogenic disorders, *Front. Immunol.*, **13**, 822919, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.822919>.
- Gijbels, K., Brocke, S., Abrams, J. S., and Steinman, L. (1995) Administration of neutralizing antibodies to interleukin-6 (IL-6) reduces experimental autoimmune encephalomyelitis and is associated with elevated levels of IL-6 bioactivity in central nervous system and circulation, *Mol. Med.*, **1**, 795-805.
- Eugster, H. P., Frei, K., Kopf, M., Lassmann, H., and Fontana, A. (1998) IL-6-deficient mice resist myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis, *Eur. J. Immunol.*, **28**, 2178-2187, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199807\)28:07<2178::AID-IMMU2178>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199807)28:07<2178::AID-IMMU2178>3.0.CO;2-D).
- Heink, S., Yogev, N., Garbers, C., Herwerth, M., Aly, L., Gasperi, C., Husterer, V., Croxford, A. L., Moller-Hackbarth, K., Bartsch, H. S., Sotlar, K., Krebs, S., Regen, T., Blum, H., Hemmer, B., Misgeld, T., Wunderlich, T. F., Hidalgo, J., Oukka, M., Rose-John, S., et al. (2017) Trans-presentation of IL-6 by dendritic cells is required for the priming of pathogenic T(H)17 cells, *Nat. Immunol.*, **18**, 74-85, <https://doi.org/10.1038/ni.3632>.
- Korn, T., Mitsdoerffer, M., Croxford, A. L., Awasthi, A., Dardalhon, V. A., Galileos, G., Vollmar, P., Stritesky, G. L., Kaplan, M. H., Waisman, A., Kuchroo, V. K., and Oukka, M. (2008) IL-6 controls Th17 immunity *in vivo* by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3⁺ regulatory T cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 18460-18465, <https://doi.org/10.1073/pnas.0809850105>.
- Ogura, H., Murakami, M., Okuyama, Y., Tsuruoka, M., Kitabayashi, C., Kanamoto, M., Nishihara, M., Iwakura, Y., and Hirano, T. (2008) Interleukin-17 promotes autoimmunity by triggering a positive-feedback loop via interleukin-6 induction, *Immunity*, **29**, 628-636, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.07.018>.
- Ma, X., Reynolds, S. L., Baker, B. J., Li, X., Benveniste, E. N., and Qin, H. (2010) IL-17 enhancement of the IL-6 signaling cascade in astrocytes, *J. Immunol.*, **184**, 4898-4906, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000142>.
- Erta, M., Quintana, A., and Hidalgo, J. (2012) Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system, *Int. J. Biol. Sci.*, **8**, 1254-1266, <https://doi.org/10.7150/ijbs.4679>.
- Круглов А. А., Носенко, М. А., Корнеев, К. В., Свириева Е. Н., Друцкая М. С., Идальго Х., Недоспасов, С. А. (2016) Получение и предварительная характеристика мышей с генетическим дефицитом IL-6 в дендритных клетках, *Иммунология*, **37**, 316-319, <https://doi.org/10.18821/0206-4952-2016-37-6-316-319>.

12. Quintana, A., Erta, M., Ferrer, B., Comes, G., Giralt, M., and Hidalgo, J. (2013) Astrocyte-specific deficiency of interleukin-6 and its receptor reveal specific roles in survival, body weight and behavior, *Brain Behav. Immun.*, **27**, 162-173, <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.10.011>.
13. Yona, S., Kim, K. W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Williams, M., Misharin, A., Hume, D. A., Perlman, H., Malissen, B., Zelzer, E., and Jung, S. (2013) Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis, *Immunity*, **38**, 79-91, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.12.001>.
14. Mufazalov, I. A., and Waisman, A. (2016) Isolation of central nervous system (CNS) infiltrating cells, *Methods Mol. Biol.*, **1304**, 73-79, https://doi.org/10.1007/7651_2014_114.
15. Gubernatorova, E. O., Gorshkova, E. A., Namakanova, O. A., Zvartsev, R. V., Hidalgo, J., Drutskaya, M. S., Tumanov, A. V., and Nedospasov, S. A. (2018) Non-redundant functions of IL-6 produced by macrophages and dendritic cells in allergic airway inflammation, *Front. Immunol.*, **9**, 2718, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02718>.
16. Sanchis, P., Fernandez-Gayol, O., Comes, G., Escriu, A., Giralt, M., Palmiter, R. D., and Hidalgo, J. (2020) Interleukin-6 derived from the central nervous system may influence the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis in a cell-dependent manner, *Cells*, **9**, 330, <https://doi.org/10.3390/cells9020330>.
17. Amorim, A., De Feo, D., Friebel, E., Ingelfinger, F., Anderfuhren, C. D., Krishnarajah, S., Andreadou, M., Welsh, C. A., Liu, Z., Ginhoux, F., Greter, M., and Becher, B. (2022) IFN γ and GM-CSF control complementary differentiation programs in the monocyte-to-phagocyte transition during neuroinflammation, *Nat. Immunol.*, **23**, 217-228, <https://doi.org/10.1038/s41590-021-01117-7>.
18. Ottum, P. A., Arellano, G., Reyes, L. I., Iruetagoiena, M., and Naves, R. (2015) Opposing roles of interferon-gamma on cells of the central nervous system in autoimmune neuroinflammation, *Front. Immunol.*, **6**, 539, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00539>.
19. Reboldi, A., Coisne, C., Baumjohann, D., Benvenuto, F., Bottinelli, D., Lira, S., Uccelli, A., Lanzavecchia, A., Engelhardt, B., and Sallusto, F. (2009) C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE, *Nat. Immunol.*, **10**, 514-523, <https://doi.org/10.1038/ni.1716>.
20. Codarri, L., Gyulveszi, G., Tosevski, V., Hesske, L., Fontana, A., Magnenat, L., Suter, T., and Becher, B. (2011) ROR γ drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation, *Nat. Immunol.*, **12**, 560-567, <https://doi.org/10.1038/ni.2027>.
21. Komuczki, J., Tuzlak, S., Friebel, E., Hartwig, T., Spath, S., Rosenstiel, P., Waisman, A., Opitz, L., Oukka, M., Schreiner, B., Pelczar, P., and Becher, B. (2019) Fate-mapping of GM-CSF expression identifies a discrete subset of inflammation-driving T helper cells regulated by cytokines IL-23 and IL-1 β , *Immunity*, **50**, 1289-1304.e1286, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.04.006>.
22. McQualter, J. L., Darwiche, R., Ewing, C., Onuki, M., Kay, T. W., Hamilton, J. A., Reid, H. H., and Bernard, C. C. (2001) Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: a new putative therapeutic target in multiple sclerosis, *J. Exp. Med.*, **194**, 873-882, <https://doi.org/10.1084/jem.194.7.873>.
23. Korn, T., and Hiltensperger, M. (2021) Role of IL-6 in the commitment of T cell subsets, *Cytokine*, **146**, 155654, <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155654>.
24. Samoilova, E. B., Horton, J. L., Hilliard, B., Liu, T. S., and Chen, Y. (1998) IL-6-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: roles of IL-6 in the activation and differentiation of autoreactive T cells, *J. Immunol.*, **161**, 6480-6486.
25. Okuda, Y., Sakoda, S., Bernard, C. C., Fujimura, H., Saeki, Y., Kishimoto, T., and Yanagihara, T. (1998) IL-6-deficient mice are resistant to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis provoked by myelin oligodendrocyte glycoprotein, *Int. Immunol.*, **10**, 703-708, <https://doi.org/10.1093/intimm/10.5.703>.
26. Drutskaya, M. S., Gogoleva, V. S., Atretkhany, K. S. N., Gubernatorova, E. O., Zvartsev, R. V., Nosenko M. A., and Nedospasov, S. A. (2018) Proinflammatory and immunoregulatory functions of interleukin 6 as identified by reverse genetics, *Mol. Biol.*, **52**, 963-974, <https://doi.org/10.1134/S0026893318060055>.
27. Restorick, S. M., Durant, L., Kalra, S., Hassan-Smith, G., Rathbone, E., Douglas, M. R., and Curnow, S. J. (2017) CCR6⁺ Th cells in the cerebrospinal fluid of persons with multiple sclerosis are dominated by pathogenic non-classic Th1 cells and GM-CSF-only-secreting Th cells, *Brain Behav. Immun.*, **64**, 71-79, <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.03.008>.
28. Aqel, S. I., Yang, X., Kraus, E. E., Song, J., Farinas, M. F., Zhao, E. Y., Pei, W., Lovett-Racke, A. E., Racke, M. K., Li, C., and Yang, Y. (2021) A STAT3 inhibitor ameliorates CNS autoimmunity by restoring T_H17:T_{REG} balance, *JCI Insight*, **6**, e142376, <https://doi.org/10.1172/jci.insight.142376>.

MICROGLIA AND DENDRITIC CELLS AS A SOURCE OF IL-6 IN A MOUSE MODEL OF MULTIPLE SCLEROSIS

V. S. Gogoleva^{1*}, Q. Chi Nguyen², and M. S. Drutskaya¹

¹ Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine,
Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,
117997 Moscow, Russia; e-mail: violettegogoleva@mail.ru

² Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

Multiple sclerosis (MS) is a complex autoimmune disease of the central nervous system (CNS), characterized by myelin sheath destruction and compromised nerve signal transmission. Understanding the molecular mechanisms driving MS development is critical due to its early onset, chronic course, and therapeutic approaches based only on symptomatic treatment. Cytokines are known to play a pivotal role in the pathogenesis of MS, with interleukin-6 (IL-6) being one of the key mediators. This study investigates the contribution of IL-6 produced by microglia and dendritic cells to the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), a widely used mouse model of MS. Mice with conditional inactivation of IL-6 in CX₃CR1⁺ cells, including microglia, or CD11c⁺ dendritic cells, displayed less severe symptoms as compared to their wild-type counterparts. Mice with microglial IL-6 deletion exhibited an elevated proportion of regulatory T cells and a reduced percentage of pathogenic IFN γ -producing CD4⁺ T cells, accompanied by a decrease in pro-inflammatory monocytes, in the CNS at the peak of EAE. At the same time, deletion of IL-6 from microglia resulted in an increase of CCR6⁺ T cells and GM-CSF-producing T cells. Conversely, mice with IL-6 deficiency in dendritic cells showed not only the previously described increase in the proportion of regulatory T cells and a decrease in the proportion of T_H17 cells, but also a reduction in the production of GM-CSF and IFN γ in secondary lymphoid organs. In summary, IL-6 functions during EAE depend on both the source and the localization of the immune response: microglial IL-6 exerts both pathogenic and protective functions specifically in the CNS, whereas dendritic cell-derived IL-6, in addition to being critically involved in the balance of regulatory T cells and T_H17 cells, may stimulate the production of cytokines associated with the pathogenetic functions of T cells.

Keywords: interleukin-6, microglia, dendritic cells, experimental autoimmune encephalomyelitis, multiple sclerosis, mouse models