

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ И ТЕХНОЛОГИИ

УДК 616-832-004.2-055-078.33-092(470.53-25)

DOI 10.17816/pmj35127-32

ИССЛЕДОВАНИЕ ПАТОГЕНЕЗА РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА КАК ОСНОВА ЕГО ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ

Т.В. Байдина^{1}, Е.М. Куклина², Н.В. Селянина¹, Т.Н. Трушников^{1,3},
Н.В. Сурсякова¹, И.Ю. Данченко³, Е.Е. Арбузова¹*

¹Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера,

²Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения
Российской академии наук, г. Пермь,

³Центр рассеянного склероза Пермского края, г. Пермь, Россия

STUDY OF MULTIPLE SCLEROSIS PATHOGENESIS AS THE BASIS OF ITS TARGET THERAPY

T.V. Baidina^{1}, E.M. Kuklina², N.V. Selyanina¹, T.N. Trushnikova^{1,3},
N.V. Sursyakova¹, I.Yu. Danchenko³, E.E. Arbuzova¹*

¹Academician Ye.A. Vagner Perm State Medical University,

²Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch
of the Russian Academy of Sciences, Perm,

³Center of Multiple Sclerosis of Perm Krai, Russian Federation

Цель. Изучение антигенпрезентирующей способности В-клеток, экспрессии семафорина IV класса Sema4D (CD100) и рецептора CD72 в иммунной системе у пациентов с рассеянным склерозом; изучение взаимосвязей полиморфизмов гена KIF1B и вариантов ответа на препараты, изменяющие течение рассеянного склероза, у пациентов с данным заболеванием.

Материалы и методы. Обследованы пациенты с достоверным диагнозом «рассеянный склероз» согласно критериям МакДональда 2010 г. с ремиттирующим типом течения заболевания. Используются

© Байдина Т.В., Куклина Е.М., Селянина Н.В., Трушников Т.Н., Сурсякова Н.В., Данченко И.Ю., Арбузова Е.Е., 2018

тел. +7 (342) 217 19 38

e-mail: tatiana_baidina@mail.ru

[Байдина Т.В. (*контактное лицо) – доктор медицинских наук, профессор кафедры неврологии им. В.П. Первушина; Куклина Е.М. – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции; Селянина Н.В. – доктор медицинских наук, доцент кафедры неврологии им. В.П. Первушина; Трушников Т.Н. – кандидат медицинских наук, ассистент кафедры неврологии им. В.П. Первушина, заведующая центром рассеянного склероза Пермского края; Сурсякова Н.В. – аспирант кафедры неврологии им. В.П. Первушина; Данченко И.Ю. – кандидат медицинских наук, врач центра рассеянного склероза; Арбузова Е.Е. – аспирант кафедры неврологии им. В.П. Первушина].

клинический метод, психометрическое тестирование, метод иммуноферментного анализа, иммунологический метод, метод последовательной цепной реакции.

Результаты. У больных РС изменена антигенпрезентирующая функция В-лимфоцитов, повышен уровень экспрессии семафорина Sema4D/CD100 на мембране Т-лимфоцитов, снижена экспрессия рецептора CD72 на мембране В-лимфоцитов. Изучаемые явления сопряжены с рядом клинических характеристик, которые позволяют считать, что они участвуют в патогенезе заболевания.

Выводы. Патогенетические характеристики рассеянного склероза дополнены новыми данными, которые могут стать мишенями терапевтических стратегий в виде использования анти-Sema4D- и анти-В-лимфоцитарных антител в качестве иммуномодулирующей терапии заболевания.

Ключевые слова. Рассеянный склероз, В-лимфоциты, семафорин Sema4D, ген KIF1B.

Aim. To study the antigen-presenting ability of B-cells, class IV semaphorin Sema4D (CD100) and CD72 receptor expression in the immune system of patients with multiple sclerosis (MS); to study the interaction between the KIF1B gene polymorphisms and the variants of response to preparation, changing the course of multiple sclerosis in MS patients.

Materials and methods. Patients with the established diagnosis of "Multiple sclerosis" by McDonald criteria 2010 with remitting type of the disease course were examined. Clinical method, psychometric testing, immune-enzyme analysis, immunologic method, PCR technique were used.

Results. Among patients with MS, the antigen-presenting function of B-lymphocytes was changed, semaphorin Sema4D/CD100 expression level on T-lymphocyte membrane was elevated, CD72 receptor expression on B-lymphocyte membrane was decreased. The studied phenomena are associated with a number of clinical characteristics that permits to consider them to participate in the pathogenesis of this disease.

Conclusions. Pathogenetic characteristics of multiple sclerosis are added by new data, which can be the targets for therapeutic strategies in the form of using anti-Sema4D- and anti-B-lymphocytic antibodies as immunomodulating therapy of MS.

Key words. Multiple sclerosis, B-lymphocytes, semaphorin Sema4D, KIF1B gene.

ВВЕДЕНИЕ

Рассеянный склероз (РС) – тяжелое инвалидизирующее заболевание центральной нервной системы. Вопросы его терапии активно разрабатываются на основании поиска мишеней для воздействия новых лекарственных препаратов. Такими мишенями являются отдельные звенья патогенеза заболевания.

Известно, что основной процесс в патогенезе РС – нарушение аутоотолерантности к миелиновой оболочке нервной ткани. Нарушение толерантности состоит не только в образовании аутоиммунных клеток – небольшое количество их образуется в организме здорового человека, но и в нарушении апоптоза аутоиммунных клеток в результате селекции. К нарушению толерантности к собственным тканям организма могут приводить различные факторы, основную роль играет наследственная предрасположенность. Собственные ком-

поненты белка миелина представляются антигенпрезентирующими клетками наивным Т-хелперам. После взаимодействия с антигенпрезентирующей клеткой происходят дифференцировка Т-клеток в аутоиммунные провоспалительные субпопуляции и их пролиферация. Провоспалительные субпопуляции Т-клеток проникают через гематоэнцефалический барьер и вырабатывают цитокины и интерлейкины, привлекающие другие иммунные клетки: Т-цитотоксические клетки, макрофаги, В-клетки. В результате воздействия клеток и цитокинов происходит поражение сначала миелиновой оболочки, а со временем и самих клеток нервной ткани [4]. Точками приложения препаратов, меняющих течение РС, являются отдельные этапы этого повреждающего каскада. Так, глатирамера ацетат, выступая аналогом основного белка миелина, принимает на себя иммунный ответ. Аутоиммунные клетки и аутоантитела в этом случае

действуют на периферии, а не в центральной нервной системе. Диметилфумарат активирует антиоксидантные гены факторов транскрипции ядерного фактора, тем самым подавляя дифференцировку наивных Т-лимфоцитов в провоспалительные субпопуляции, и стимулирует развитие противовоспалительных. Интерферон β является антагонистом интерферона γ , снижает проницаемость гематоэнцефалического барьера, смещает цитокиновый баланс в пользу противовоспалительных цитокинов, тормозит пролиферацию лейкоцитов и нарушает презентацию аутоантигенов. Натализумаб воздействует на молекулы клеточной адгезии на эндотелии гематоэнцефалического барьера и оболочки лимфоцитов, что препятствует миграции лимфоцитов в центральную нервную систему. Ритуксимаб – ингибитор кластера дифференциации 19, присутствующего на поверхности зрелых В-клеток, вызывает их апоптоз. Финголимод, взаимодействуя с рецептором сфингозин-1-фосфата, приводит к нарушению выхода лимфоцитов из лимфатических узлов, не позволяет осуществлять иммунный ответ на периферии [2]. Однако эффективность терапии остается недостаточной.

На кафедре неврологии им. В.П. Первухина Пермского государственного медицинского университета совместно с лабораторией иммунорегуляции РАМН проводятся исследования, направленные на выявление новых аспектов патогенеза рассеянного склероза для определения новых терапевтических мишеней. В частности, установлена недостаточность мозгового и цилиарного нейротрофических факторов при РС, которая усугубляет процессы нейродегенерации при РС и предполагает необходимость применения нейротрофических препаратов [7]; дефицитарность серотонинергической нейромедиации, обособывающаяся возможность использования селективных ингибиторов обратного захвата

серотонина [1]. Имеются экспериментальные данные, указывающие на возможное участие Sema4D (семафорина IV класса, известного также как CD100) в развитии аутоиммунного энцефаломиелита [5], явившиеся основанием для исследования экспрессии этой молекулы у пациентов с рассеянным склерозом [3]. Новым направлением в изучении патогенеза РС является определение особенностей функционирования В-лимфоцитов, роль которых до настоящего времени маскировалась основным участием Т-клеток в иммунопатологии РС. Перспективным также является изучение влияния генов, их отдельных полиморфизмов на развитие заболевания, скорость его прогрессирования, а также эффективность лечения с целью индивидуального подхода к терапии. Наиболее объективными методами исследования в этой сфере являются изучение генов-кандидатов и их ассоциаций с клиническими фенотипами и полногеномные поиски ассоциаций. Для РС преимущественно рассматриваются гены, так или иначе вовлеченные в иммунный ответ; гены, кодирующие процессы демиелинизации и ремиелинизации. В настоящее время нами проводится исследование, посвященное изучению взаимосвязей полиморфизмов гена члена семейства кинезинов 1В (Kinesin Family Member 1B, KIF1B) и скорости прогрессирования заболевания при различных видах терапии РС в Пермском крае. Ген KIF1B не относится к иммунорегулирующим генам, он кодирует продукцию белка, члена семейства кинезинов 1В, основной функцией которого является транспорт синаптических везикул и митохондрий. Помимо этого, этот белок принимает участие в процессе апоптоза [6]. Предполагается установить взаимосвязи между определенными аллелями однонуклеотидных полиморфизмов гена KIF1B, участвующего в процессе ремиелинизации, и скоростью прогрессирования заболевания при различных видах терапии.

Целью исследования явилось изучение некоторых аспектов патогенеза РС с целью определения возможных точек приложения новых терапевтических стратегий (выявление антигенпрезентирующей способности В-клеток вызывать дифференцировку наивных Т-лимфоцитов в провоспалительные субпопуляции Th1 и Th17; изучение экспрессии семафорина IV класса Sema4D (CD100) и рецептора CD72 в иммунной системе у пациентов с РС; изучение взаимосвязей полиморфизмов гена KIF1B и вариантов ответа на препараты, изменяющие течение рассеянного склероза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании антигенпрезентирующей функции В-лимфоцитов приняли участие 11 пациентов (6 мужчин и 5 женщин, средний возраст – $35,2 \pm 5,8$ г.) с РС и 9 здоровых доноров аналогичного пола и возраста. Уровень инвалидизации по шкале EDSS составил $3,2 \pm 1$ балл. Все пациенты принимали глатирамера ацетат (оригинальный «Копаксон») не менее 6 месяцев до исследования. Из крови выделяли В-лимфоциты, которые инкубировали с экзогенным антигеном, столбнячным анатоксином (Tetanus Toxoid, TT, 5 мкг/мл) или с аутоантигеном, ассоциированным с РС, – миелинолигодендроцитарным гликопротеином (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein, MOG, 5 мкг/мл), после чего удаляли несвязавшийся антиген и культивировали совместно с аутологичными мононуклеарными клетками. По окончании культивирования оценивали дифференцировку Th17 и Treg по экспрессии ключевых транскрипционных факторов и маркеров данных субпопуляций ROR γ t и FoxP3 с помощью соответствующих моноклональных антител.

Для исследования семафорина Sema4D обследованы 52 наивных пациента с ремиттирующим РС (41 – в стадии ремиссии, 11 – в стадии обострения, 35 женщин и 17 мужчин в возрасте 18–55 лет) и 24 здоровых донора. Применены клинические методы оценки (шкалы EDSS, HADS, MFI-20, MSIS-29, FAMS, PASAT-3) и лабораторные (выделение плазмы и мононуклеарных клеток из гепаринизированной венозной крови с их культивированием и определением экспрессии мембранных молекул проточной цитометрией с использованием соответствующих моноклональных антител).

Для генетического исследования рассчитана достаточная выборка исходя из объема генеральной совокупности больных РС в Пермском крае, которым будет проведено исследование полиморфизмов гена KIF1B методом полимеразной цепной реакции.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы Statistica 6.0. Сравнительный анализ данных в двух независимых группах выполнен с использованием *U*-критерия Манна-Уитни. При сравнении частот бинарных качественных признаков в двух независимых группах использованы критерий χ^2 и точный критерий Фишера. При сравнении двух зависимых групп брали критерий Вилкоксона. Корреляционный анализ произведен с помощью рангового коэффициента Спирмена (*R*). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принят равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В пробах с добавлением аутоантигена, MOG, у пациентов с РС наблюдалось статистически значимое усиление дифференцировки в Th17-лимфоциты в сопоставлении с соответствующими показателями для проб в условиях без антигена (процент CD4+ROR γ t+–клеток в

популяции CD4+Т-лимфоцитов у пациентов с РС: $2,5 \pm 1,44$ – для MOG, $2,04 \pm 1,31$ – для проб без антигена; $p = 0,02$). Отмечалась тенденция к возрастанию популяции Th17 в сравнении с пробами (процент CD4+ROR γ t+-клеток в популяции CD4+Т-лимфоцитов у пациентов с РС: $2,5 \pm 1,44$ – для MOG и $1,95 \pm 1,06$ – для проб без антигена, $p = 0,08$). У здоровых доноров статистически значимого Treg- или Th17-ответа на MOG, представленный В-лимфоцитами, по сравнению с контрольными пробами, не выявлено.

Уровень экспрессии Sema4D на Т-лимфоцитах – средняя интенсивность свечения (Mean Fluorescence Intensity, MFI) – значимо превалировал в субпопуляциях клеток у пациентов с РС: CD3 $^+$ 4 $^+$ ($p = 0,000$), CD3 $^+$ 8 $^+$ ($p = 0,000$), CD3 $^-$ ($p = 0,003$). Прослежена прямая корреляционная связь между процентом CD100 $^+$ -клеток в субпопуляции CD3 $^+$ CD4 $^+$ -лимфоцитов и значением FS2 – стволовые функции ($R = 0,418$, $p = 0,010$), FS7 – когнитивные функции ($R = 0,351$, $p = 0,033$), FS8 – показатель ходьбы ($R = 0,338$, $p = 0,041$) шкалы EDSS. При РС отмечен более значимый интервал снижения уровня экспрессии Sema4D/CD100 на мембране CD3 $^+$ -клеток в условиях активации 18-часовых клеточных культур в сравнении с 1-часовыми ($p = 0,007$) и с показателем *ex vivo* ($p = 0,000$). Уровень растворимого Sema4D (sSema4D) в плазме крови пациентов с патологией нервной системы был повышен ($p = 0,012$), а в супернатантах 18-часовых клеточных культур возрастал и преобладал в активированном варианте. В ремиссию прослежена обратная корреляция между уровнем sSema4D в плазме и длительностью заболевания ($R = -0,567$, $p = 0,035$), при эксацербации – прямая корреляция между уровнем sSema4D в плазме и количеством контрастируемых очагов ($R = 0,900$, $p = 0,037$). Выявлено значимое снижение процента CD72-позитивных CD19 $^+$ -клеток при РС. В условиях

активации клеток при РС происходило увеличение процента В-клеток, содержащих цитокины TNF- α ($p = 0,003$), LT- α ($p = 0,003$), IL-10 ($p = 0,040$), при блокаде Sema4D-CD72-сигнала – снижение процента В-клеток, продуцирующих TNF- α ($p = 0,004$ при блокаде Sema4D и $p = 0,006$ при блокаде CD72) и LT- α ($p = 0,017$ при блокаде Sema4D и $p = 0,004$ при блокаде CD72). Уровень экспрессии мембранной формы семафорина Sema4D/CD100 ассоциирован со значением FS2 стволовых функций, а концентрация растворимого семафорина (sSema4D) в плазме крови имеет обратную корреляционную связь с продолжительностью заболевания у пациентов с РС в стадии ремиссии и прямую – с количеством контрастируемых очагов в головном мозге в стадии обострения, что доказывает участие данной молекулы в патогенезе заболевания.

При ремиттирующем РС экспрессия семафорина (мембранной формы – на Т-лимфоцитах и растворимой – в плазме крови) в иммунной системе повышена, экспрессия рецептора для семафорина (CD72) на В-лимфоцитах снижена, семафорин-зависимый сигнал участвует в активации В-лимфоцитов. На основании вариабельности показателей семафорина в условиях имитации иммунного ответа можно утверждать, что Sema4D способен вызывать апоптоз незрелых нейронов и олигодендроцитов и, вероятно, оказывает непосредственное поражающее действие на нервные ткани, причем как в растворимой форме с проникновением через неполноценный при РС гематоэнцефалический барьер, так и в мембранной форме за счет инфильтрации центральной нервной системы Т-лимфоцитами и их активации в ответ на аутоантигены. Мембранный Sema4D может выступать не только в качестве лиганда, но и как рецептор, проводя сигнал в Т-клетку, причем сигнал является коstimулирующим, повышение его экспрессии при РС влияет на усиление активации

Т-лимфоцитов, в том числе аутоспецифичных Т-клеток – как во вторичных лимфоидных органах, так и в центральной нервной системе.

Выводы

Презентация В-клетками аутоантигена, ассоциированного с рассеянным склерозом, MOG, приводит к преимущественному развитию CD4⁺Т-лимфоцитов в Th17. В-зависимая презентация аутоантигена может быть одним из факторов, участвующих в индукции и прогрессии нейровоспаления при рассеянном склерозе.

Пациенты с рассеянным склерозом как в стадию ремиссии, так и в стадию обострения имеют повышенный уровень экспрессии семафорина Sema4D/CD100 на мембране Т-лимфоцитов (CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺-клеток) при оценке *ex vivo*, а также более интенсивное отщепление этой молекулы от мембраны в случае активации клеток в культуре.

У пациентов с рассеянным склерозом снижена экспрессия рецептора для Sema4D/CD100, CD72, на мембране В-лимфоцитов (CD19⁺ клеток), что, учитывая негативную роль молекулы CD72 в активации В-клеток, может быть одним из механизмов их гиперактивации при данной патологии. Sema4D/CD72-зависимый сигнал задействован в контроле продукции цитокинов В-лимфоцитами, индуцируя у пациентов с рассеянным склерозом синтез провоспалительных цитокинов и препятствуя синтезу противовоспалительных цитокинов, что, учитывая интенсивную инфильтрацию В-клетками центральной нервной системы при данной патологии, по-видимому, вносит вклад в развитие нейровоспаления и демиелинизации нервных волокон.

Выявленные патогенетические характеристики заболевания могут стать мишенями новых терапевтических стратегий в виде

использования анти-Sema4D- и анти-В-лимфоцитарных антител в качестве иммуномодулирующей терапии РС.

Библиографический список

1. Байдина Т.В., Акинцева Ю.В., Трушников Т.Н. Тромбоцитарный серотонин при рассеянном склерозе и его связь с синдромом усталости. *Нейрохимия* 2013; 30 (3): 254.
2. Бойко А.Н. Выбор оптимального препарата для лечения рассеянного склероза. *Медицинский совет* 2015; 5: 78–79.
3. Куклина Е.М., Байдина Т.В., Данченко И.Ю., Некрасова И.В. Семафорин Sema4D в иммунной системе при рассеянном склерозе. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2014; 157 (2): 198–201.
4. Переседова А.В., Завалишин И.А. Современное состояние проблемы рассеянного склероза. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии* 2009; 3 (1): 44–46.
5. Трушников Т.Н., Медведева Е.Л., Байдина Т.В., Данилова М.А. Мозговой и цилиарный нейротрофические факторы у больных рассеянным склерозом. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова* 2014; 114 (10–2): 33–36.
6. Ханох Е.В., Рождественский А.С., Кудрявцева Е.А., Какуля А.В., Делов Р.А., Филипенко М.Л. Исследование наследственных факторов предрасположенности к рассеянному склерозу и особенностей его течения в русской этнической группе. *Бюллетень СО РАМН* 2011; 31 (1): 113–118.
7. Kumanogob A.I., Marukawa S., Suzuki K., Takegabara N., Watanabe C., Ch'ng E., Ishida I., Fujimura H., Sakoda S., Yoshida K., Kikutani H. Class IV semaphorin Sema4A enhances T-cell activation and interacts with Tim-2. *Nature* 2002; 5: 629–633.

Материал поступил в редакцию 20.12.2017