



Особенности клеточного иммунитета у больных рассеянным склерозом, прервавших терапию ингибитором интегрина

Ю.А. Белова, Ю.Ю. Чуксина, С.В. Котов, И.А. Василенко

Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского, Россия, Москва

Аннотация

Введение. Натализумаб (НАТ) – гуманизированное моноклональное антитело (МАТ), селективный ингибитор молекулы адгезии $\alpha 4$ -интегрина, располагающейся на поверхности лимфоцитов, – предотвращает проникновение лимфоцитов в центральную нервную систему (ЦНС).

Целью исследования было выявление особенностей популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови (ПК) у пациентов с рассеянным склерозом (РС), прекративших терапию НАТ в связи с повышенным риском развития прогрессирующей мультифокальной лейкоэнцефалопатии.

Материалы и методы. Проведено открытое проспективное наблюдательное исследование 26 пациентов с РС, из них 6 – с быстро прогрессирующим РС; 10 – прервавших терапию НАТ с подтверждённым в дальнейшем обострением заболевания; 10 – получавших терапию НАТ без обострений заболевания в отмывочный период. В качестве референсных значений использованы аналогичные показатели 10 практически здоровых лиц. Параметры клеточного иммунитета оценивали методом проточной цитометрии с использованием панели МАТ к дифференцированным антигенам лимфоцитов ПК.

Результаты. У пациентов, прекративших терапию НАТ, обнаружено значительное снижение абсолютного числа лимфоцитов ПК, снижение содержания Т-цитотоксической, NKT- и V1-субпопуляций лимфоцитов, а также уровня активированных Т-лимфоцитов ($CD3^+HLA^+DR^+$), что может быть связано с их перераспределением, преодолением гематоэнцефалического барьера и проникновением в ЦНС. Уровень $CD20^+$ -В-лимфоцитов не отличался от нормальных значений. Иммунологическими дополнительными предикторами обострения РС после отмены НАТ могут служить снижение абсолютного количества лимфоцитов ПК; снижение содержания субпопуляций $CD3^+CD8^+$ -Т-лимфоцитов, NKT-лимфоцитов, V1-лимфоцитов ($CD19^+CD5^+$). Кроме того, обнаруженные данные о выраженном увеличении содержания активированных по $CD25^+$ - и $CD38^+$ -В-лимфоцитов по сравнению с нормальными величинами у «наивных» пациентов и лиц без обострения заболевания после отмены НАТ могут свидетельствовать о высоком активационном потенциале циркулирующего пула В-лимфоцитов, а следовательно, о высоком риске обострения РС.

Выводы. Выявленные изменения субпопуляционного состава лимфоцитов ПК у пациентов РС после отмены НАТ могут иметь прогностическое значение для оценки степени риска развития обострения заболевания и подтверждают адекватность перевода пациентов на анти-В-клеточную терапию.

Ключевые слова: натализумаб; воспалительный синдром восстановления иммунитета; ребаунд-феномен; Т-лимфоциты; В-лимфоциты

Этическое утверждение. Исследование было одобрено независимым этическим комитетом при МНИКИ им. М.Ф. Владимирского (протокол № 8 от 13.06.2019).

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешних источников финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Адрес для корреспонденции: 129110, Россия, Москва, ул. Щепкина, д. 61/2, корп. 10. МНИКИ им. М.Ф. Владимирского. E-mail: kotovsv@yandex.ru. Котов С.В.

Для цитирования: Белова Ю.А., Чуксина Ю.Ю., Котов С.В., Василенко И.А. Особенности клеточного иммунитета у больных рассеянным склерозом, прервавших терапию ингибитором интегрина. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии.* 2024;18(1):12–19.

DOI: <https://doi.org/10.54101/ACEN.2024.1.2>

Поступила 08.08.2023 / Принята в печать 15.09.2023 / Опубликовано 25.03.2024

Cell-Mediated Immunity in Multiple Sclerosis Patients Who Discontinued Therapy with an Integrin Inhibitor

Yuliana A. Belova, Yulia Yu. Chuksina, Sergey V. Kotov, Irina A. Vasilenko

M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. Natalizumab (NTZ) is a humanized monoclonal antibody (mAb) that selectively inhibits $\alpha 4$ -integrin adhesion molecule located on the surface of lymphocytes and prevents their trafficking into the central nervous system (CNS).

The aim of this study was to identify characteristics of lymphocyte population and subpopulation pattern in the peripheral blood (PB) of multiple sclerosis (MS) patients who discontinued NTZ due to an increased risk of developing progressive multifocal leukoencephalopathy.

Materials and methods. We conducted an open-label prospective observational study in 26 MS patients. Of those, 6 patients had rapidly progressive MS, 10 patients discontinued NTZ and had confirmed relapses afterwards, and 10 patients received NTZ and had no relapses during the washout period. Ten apparently healthy individuals were used as controls. Cell-mediated immunity parameters were evaluated by flow cytometry using a panel of mAbs to differentiation antigens of PB lymphocytes.

Results. Patients who discontinued NTZ had significantly decreased absolute lymphocyte counts in PB, decreased T-cytotoxic, NKT and B1 lymphocyte subpopulation levels, and decreased activated T-cell ($CD3^+HLA-DR^+$) levels, which may be related to their redistribution, passing through the blood-brain barrier, and trafficking into the central nervous system. $CD20^+$ B-cell levels did not differ from normal. Additional immune predictors of MS relapses after NTZ discontinuation can include decreased absolute count of PB lymphocytes and decreased percentage of $CD3^+CD8^+$ T-cell, NKT-cell, and B1-cell ($CD19^+CD5^+$) subpopulations. Significantly increased levels of $CD25^+$ - and $CD38^+$ -activated B-cells compared with the normal levels in naïve patients and subjects without relapses after NTZ discontinuation may suggest a high activation potential of the circulating B-cell pool and, therefore, a high risk of MS relapses.

Conclusions. The changes in the lymphocyte subpopulation pattern in the PB of MS patients after NTZ discontinuation may have a prognostic value for assessing the risk of relapses; they justified switching patients to anti-B-cell therapy.

Keywords: natalizumab, immune reconstitution inflammatory syndrome, rebound phenomenon, T-cells, B-cells

Ethics approval. The study was approved by the Independent Ethics Committee at the M.F. Vladimirsky Moscow Region Research Clinical Institute (Protocol No. 8, June 13, 2019).

Source of funding. The study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For correspondence: 129110, Russia, Moscow, Shchepkina str., 61/2, build. 10. M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute. E-mail: kotovsv@yandex.ru. Kotov S.V.

For citation: Belova Yu.A., Chuksina Yu.Yu., Kotov S.V., Vasilenko I.A. Cell-mediated immunity in multiple sclerosis patients who discontinued therapy with an integrin inhibitor. *Annals of Clinical and Experimental Neurology*. 2024;18(1):12–19. (In Russ.)

DOI: <https://doi.org/10.54101/ACEN.2024.1.2>

Received 08.08.2023 / Accepted 15.09.2023 / Published 25.03.2024

Введение

В настоящее время достигнуто понимание того, что рассеянный склероз (РС) – это гетерогенное, многофакторное иммуноопосредованное заболевание, в патогенезе которого важное значение имеют как Т-, так и В-клетки иммунной системы. Считается, что инициирующий этап развития РС обусловлен активацией периферических аутореактивных эффекторных $CD4^+$ -Т-клеток, которые мигрируют в центральную нервную систему (ЦНС) и инициируют процесс заболевания путём выработки цитокинов (интерферон- γ , фактор некроза опухоли, интерлейкины-17, -21 и -22), что ведёт к активации резидентных иммунных

клеток (микроглия, астроциты, макрофаги), повышенной функции антигенпредставляющих клеток и усиленной продукции активных форм кислорода и азота [1–3].

Методы лекарственной терапии РС, основанные на знаниях патогенеза заболевания, предполагают несколько подходов, таких как снижение числа Th1/Th17-клеток, потенцирующих заболевание, активизация Т-регуляторных клеток, подавление процесса транспорта лимфоцитов в нервную систему, воздействие на В-клетки. Препараты с такими различными механизмами воздействия объединены под названием «препараты, изменяющие течение РС» (ПИТРС).

Натализумаб (НАТ) – гуманизированное моноклональное антитело (МАТ), селективный ингибитор молекулы адгезии $\alpha 4$ -интегрина, располагающейся на поверхности лимфоцитов и необходимой для соединения с образующим гематозенцефалический барьер эндотелием капилляров головного мозга, – предотвращает прилипание лимфоцитов к эндотелию и их последующее проникновение в ЦНС. Препарат значительно снижает частоту клинических обострений, появление новых гиперинтенсивных очагов на T2-взвешенных изображениях и очагов, накапливающих гадолиний при магнитно-резонансной томографии, и инвалидизацию у пациентов с ремиттирующим РС [4, 5].

Как отмечено в фармакокинетических исследованиях, при проведении терапии НАТ происходит связывание молекул CD49d, являющихся α -субъединицами интегрина, на поверхности лимфоцитов с молекулами препарата в 76–84% случаев. Увеличение промежутков между введениями привело к возрастанию числа молекул CD49d [6]. А. Sobo-Calvo и соавт. обнаружили, что спустя 2 мес после прекращения терапии НАТ экспрессия CD49d и других молекул адгезии лимфоцитов (CD29 и CD11a) непрерывно возрастала, причём экспрессия CD49d до 3-го месяца после отмены НАТ была связана с активностью течения РС на момент прекращения терапии, а через 6 мес экспрессия CD49d на CD45⁺CD4⁺ и CD45⁺CD8⁺ коррелировала с продолжительностью лечения НАТ [7]. Авторы выявили, что «молекулярное восстановление» после отмены НАТ было более выраженным у пациентов с длительным сроком лечения НАТ, и предложили использовать определение CD49d для тщательного мониторинга активности РС у пациентов после отмены НАТ.

За десятилетие использования НАТ в отечественной практике профиль безопасности препарата достаточно хорошо изучен. Его введение обычно хорошо переносится, а нежелательные явления редки. Однако терапия НАТ увеличивает риск развития оппортунистической инфекции, прогрессирующей мультифокальной лейкоэнцефалопатии (ПМЛ)¹ – заболевания, проявляющегося гибелью олигодендроцитов и части астроцитов с появлением обширных очагов вторичной демиелинизации. Учитывая значение исходного уровня серопозитивности к вирусу Джона Каннингема (JCV), наличие иммуносупрессии в прошлом, длительности терапии НАТ, разработан план управления рисками ПМЛ, на основании которого пациентам при повышении риска осуществляется отмена НАТ и перевод на другую терапию. Однако прекращение терапии НАТ более чем в 38% случаев сопровождается развитием эпизодов обострения РС, что объясняется воспалительным синдромом восстановления иммунитета (ВСВИ), а в ряде случаев – развитием ребаунд-феномена (усугубление имеющихся и появление новых симптомов РС, часто по типу острого рассеянного энцефаломиелита) [8–10]. При этом короткий период «отмычки» после отмены НАТ снижал риск ВСВИ, но увеличивал риск ПМЛ [11, 12].

¹ Клинические рекомендации «Рассеянный склероз» 2022 г.
URL: <https://cr.minzdrav.gov.ru/recommend/739>

R. Planas и соавт. [13] изучили изменение популяций лимфоцитов периферической крови (ПК) у пациентов, получавших терапию НАТ, и выявили увеличение количества T-, NK- и особенно В-клеток. В то время как процент вышедших из лимфоидных органов, наивных, эффекторных и Т-клеток памяти оставался неизменным во время лечения, наблюдалось увеличение активированных (сходных с клетками памяти или маргинальной зоны), но не наивных В-клеток. T. Plavina и соавт. [14] указали на увеличение в ПК пациентов, получавших терапию НАТ, общего количества лимфоцитов более чем в 1,5 раза по сравнению с показателями до начала терапии, снижение их числа при прекращении терапии начиная с 8-й недели, возвращение к нормальным показателям, отмеченным до лечения, к 16-й неделе. К сожалению, авторы не провели более детальное изучение субпопуляций лимфоцитов.

Терапия НАТ сопровождается также снижением содержания CD4⁺- и CD8⁺-Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов (CD19⁺) и плазматических клеток в спинномозговой жидкости в результате подавления их проникновения в ликвор из ПК, в то время как при клинически проявляющихся обострениях после отмены терапии НАТ было обнаружено высокое содержание CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток, что расценивалось как ВСВИ [15, 16].

Поскольку стратегия управления рисками при лечении НАТ больных РС предполагает отмену препарата при повышении вероятности возникновения ПМЛ, необходимо выявить признаки, позволяющие оценить возможность возникновения обострений или развития ВСВИ у таких больных.

Целью нашего исследования было выявление особенностей популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов ПК у пациентов с РС, прекративших терапию НАТ в связи с повышенным риском развития ПМЛ.

Материалы и методы

Исследование носило характер открытого проспективного наблюдательного. Проведение исследования было одобрено независимым этическим комитетом при ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского (протокол № 8 от 13.06.2019).

Критерии включения в исследование:

- пациенты мужского или женского пола в возрасте 18–60 лет, подписавшие добровольное информированное согласие;
- высокоактивный РС или быстро прогрессирующий ремиттирующий РС;
- пациенты с индексом антител к JCV > 1,5 или с неоптимальным эффектом на терапию НАТ.

Критерии невключения:

- наличие противопоказаний для назначения анти-В-клеточной терапии;
- беременность;
- период грудного вскармливания;
- отказ от контрацепции в период терапии.

Критерии исключения:

- отказ пациента от дальнейшего участия в исследовании;
- несоблюдение пациентом процедур исследования.

Нами выполнено обследование 26 пациентов с РС, наблюдавшихся в Московском областном центре РС в 2019–2022 гг. Первую группу составили 6 пациентов с быстро прогрессирующим РС (БПРС): 2 мужчины и 4 женщины, средний возраст $27,0 \pm 4,6$ года, средняя продолжительность заболевания $2,6 \pm 0,8$ года, не получавшие ранее терапию ПИТРС. У них были зарегистрированы 2 и более клинических обострения в течение года, выявлено не менее 1 очага, накапливающего гадолиний, или новых очагов на T2-взвешенных изображениях, а также подтверждённое усиление инвалидизации на 1 и более балл по расширенной шкале оценки инвалидности (Expand Disability Status Scale, EDSS) за последний год.

Коррекция лечения потребовалась 20 пациентам (8 мужчин и 12 женщин в возрасте 19–44 лет; средний возраст $35,7 \pm 9,5$ года) с РС, получавшим терапию НАТ: у 17 человек смена терапии была обусловлена высоким индексом титра антител к JCV, длительностью лечения более 24 мес и высоким риском развития ПМЛ, у 3 были зарегистрированы обострения на 2-м году терапии с подтверждённым нарастанием баллов по шкале EDSS в следующие 24 нед наблюдения, тип течения определён как вторично прогрессирующий РС с обострениями. В связи с этими фактами пациенты являлись кандидатами на переключение на терапию окрелизумабом. Возраст дебюта – $22,3 \pm 4,6$ года, длительность заболевания от момента появления первых симптомов – $14,4 \pm 4,9$ года. При оценке неврологического статуса по шкале EDSS на исходном визите среднее значение составило $3,2 \pm 0,7$ балла, что соответствовало умеренным функциональным нарушениям. Десять пациентов из получавших терапию НАТ и прекративших её, после чего у них возникло клинически и нейровизуализационно подтверждённое обострение заболевания, составили 2-ю группу. Десять пациентов, прервавших терапию НАТ, после чего у них не выявлено признаков обострения заболевания, составили 3-ю группу.

В качестве референсных значений были использованы результаты составивших контрольную группу 10 практически здоровых лиц, обследованных по аналогичным показателям (4-я группа).

Проведена оценка параметров клеточного иммунитета у больных РС методом проточной цитометрии с использованием панели МАТ («Becton Dickinson») к дифференцировочным антигенам лимфоцитов ПК. Были исследованы популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов в пределах гейта лимфоцитов (CD45⁺): CD3⁺, CD19⁺, CD20⁺, CD3⁺CD16⁺CD56⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD3⁺HLA-DR⁺. Субпопуляционный состав В-лимфоцитов (В1-клетки, В-клетки памяти), экспрессию костимулирующих и активационных антигенов (CD40, CD25, CD38, CD95) определяли в пределах гейта CD19⁺ vs SSC.

Статистическую обработку материала проводили с использованием пакета программ «StatPlus Pro v. 7.6.5.0».

Количественные данные представлены в виде средних значений и стандартного отклонения ($M \pm SD$). Учитывая небольшие объёмы выборок, нормальность распределения оценивали при помощи критерия Шапиро–Уилка [17]. При анализе количественных данных, распределённых по закону, отличному от нормального закона распределения, для сравнения показателей трех независимых выборок с данными группы практически здоровых лиц применяли тест Манна–Уитни с поправкой Бонферрони (уровень значимости $p < 0,017$), для множественного сравнения независимых выборок – тест Краскела–Уоллиса [18]. Статистические тесты были проведены для двусторонней гипотезы, уровень статистической значимости принят равным 0,05.

Результаты

Нами были обследованы 26 пациентов с РС (10 мужчин и 16 женщин в возрасте 21–52 года), которым было проведено исследование параметров клеточного иммунитета методом проточной цитометрии перед началом терапии окрелизумабом. При переводе с терапии НАТ на иной ПИТРС пациенты должны соблюдать безопасный интервал «отмывки» от 12 нед до 6 мес, в зависимости от выбранного для дальнейшего лечения препарата. В обследованной группе период без лечения составил в среднем $7,9 \pm 1,9$ мес. Его длительность была обусловлена доступностью лекарственных препаратов и сроками проведения дополнительных исследований для минимизации рисков скорректированной терапии. Однако с увеличением срока периода «отмывки» возрастал риск обострений, у 10 (50%) пациентов зарегистрированы клинически проявившиеся обострения, подтверждённые данными нейровизуализации.

Показатели клеточного иммунитета у обследованных больных представлены в табл. 1.

У всех обследованных больных общее число лейкоцитов и процентное содержание лимфоцитов находились в нормальных пределах: 1-я группа – $7,290 \pm 1,277 \times 10^9/\text{л}$ и $26,3 \pm 2,3\%$; 2-я – $7,229 \pm 1,256$ и $26,1 \pm 6,6$; 3-я – $6,431 \pm 2,328$ и $30,8 \pm 10,3$; 4-я – $6,500 \pm 1,859$ и $33,3 \pm 5,6$ соответственно.

В 1-й группе пациентов содержание Т-, В-, естественных киллерных лимфоцитов (NK), Т-хелперной, Т-цитотоксической и NKT-субпопуляций (CD3⁺CD16⁺CD56⁺) не отличалось от референсных значений. У пациентов 2-й группы абсолютное содержание лимфоцитов было существенно снижено по сравнению со здоровыми испытуемыми. У пациентов 3-й группы, прекративших терапию НАТ и не имевших обострений, снижения данного показателя не отмечалось.

Хотя абсолютное число лимфоцитов в ПК у больных, прекративших терапию НАТ, было ниже, чем в контрольной группе или в группе больных с БПРС, доля В-лимфоцитов по обоим пан-В-клеточным маркерам (CD19⁺ и CD20⁺) существенно не отличалась как от группы «наивных» пациентов, так и от группы практически здоровых лиц.

Таблица 1. Показатели клеточного иммунитета у обследованных больных РС (% клеток в пределах гейта CD45⁺-лимфоцитов)

Table 1. Cell-mediated immunity parameters in MS patients (percentage of cells within CD45⁺-cell gate)

Показатель Parameter	Группа Group				p
	1 (n = 6)	2 (n = 10)	3 (n = 10)	4 (n = 10)	
Общее количество лимфоцитов, × 10 ⁹ /л Total lymphocyte count, × 10 ⁹ /liter	1,933 ± 2,160	1,774 ± 0,432	1,652 ± 0,613	2,070 ± 1,013	p = 0,009 p ₂₋₄ = 0,005
	Доля клеток, % Cell percentage, %				
CD3 ⁺	76,90 ± 6,06	71,9 ± 16,8	69,86 ± 12,29	74,33 ± 7,83	p = 0,117
CD3 ⁺ CD4 ⁺	40,47 ± 5,64	48,0 ± 12,1	42,79 ± 11,22	41,0 ± 5,01	p = 0,525
CD3 ⁺ CD8 ⁺	34,26 ± 7,01	22,87 ± 6,67	25,41 ± 8,24	33,00 ± 4,2	p < 0,001 p ₂₋₄ < 0,001
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	11,33 ± 2,36	16,6 ± 18,5	13,01 ± 5,97	12,47 ± 2,99	p = 0,831
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	6,13 ± 1,98	4,93 ± 3,23	2,52 ± 2,18	10,50 ± 4,51	p < 0,001 p ₂₋₄ = 0,003 p ₃₋₄ = 0,002
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	11,8 ± 0,47	6,6 ± 3,21	8,26 ± 2,75	13,30 ± 5,35	p < 0,001 p ₂₋₄ = 0,002 p ₃₋₄ = 0,012
CD19 ⁺	11,16 ± 2,83	12,0 ± 5,57	14,16 ± 7,33	11,79 ± 2,31	p = 0,417
CD20 ⁺	10,24 ± 2,17	10,66 ± 6,1	12,81 ± 6,53	11,19 ± 1,41	p = 0,219
CD19 ⁺ HLA-DR ⁺	9,80 ± 1,34	11,75 ± 5,57	13,09 ± 6,80	10,32 ± 1,41	p = 0,348

Примечание. Здесь и в табл. 2: p — показатель значимости различий между группами (критерий Краскела–Уоллиса); p₁₋₄ — между 1-й и 4-й группами; p₂₋₄ — между 2-й и 4-й группами; p₃₋₄ — между 3-й и 4-й группами.

Note. Here and in Table 2 p indicates significance of differences between the groups (Kruskal–Wallis test); p₁₋₄ between groups 1 and 4; p₂₋₄ between groups 2 and 4; p₃₋₄ between groups 3 and 4.

Таблица 2. Показатели В-клеточного иммунитета у пациентов с РС (доля клеток в пределах гейта CD19⁺-В-лимфоцитов, %)

Table 2. Parameters of B-cell immunity in MS patients (percentage of cells within CD19⁺-B-lymphocyte gate, %)

Клетки Cells	Группа Group				p
	1 (n = 6)	2 (n = 10)	3 (n = 10)	4 (n = 10)	
CD40 ⁺	51,13 ± 8,26	39,68 ± 27,13	55,76 ± 28,59	49,20 ± 3,69	p = 0,168
CD95 ⁺	19,27 ± 1,67	18,9 ± 10,84	33,29 ± 22,27	19,89 ± 1,41	p = 0,094
CD5 ⁺	19,30 ± 6,36	9,63 ± 3,3	19,08 ± 15,99	17,29 ± 4,47	p < 0,001 p ₂₋₄ < 0,001
CD27 ⁺	25,97 ± 5,22	32,08 ± 18,31	30,53 ± 14,18	28,30 ± 2,28	p = 0,441
CD38 ⁺	29,43 ± 6,96	20,8 ± 9,56	44,13 ± 18,18	16,10 ± 4,47	p < 0,001 p ₁₋₄ < 0,001 p ₃₋₄ < 0,001
CD25 ⁺	21,93 ± 5,51	16,37 ± 7,45	27,58 ± 8,05	13,79 ± 3,69	p = 0,003 p ₁₋₄ = 0,004 p ₃₋₄ = 0,016

Аналогичная картина отмечена при анализе содержания В-лимфоцитов, экспрессирующих антигены гистосовместимости 2 класса (CD19⁺HLA-DR⁺), отражающих их антигенпрезентирующую способность. Напротив, уровень активированных Т-лимфоцитов (CD3⁺HLA-DR⁺) у пациентов 2-й и 3-й групп был существенно снижен по сравнению с показателями референсной группы. Доля цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺) была значительно снижена (в 1,5 раза) у больных 2-й группы, имеющих обострение РС, в то время как содержание субпопуляции

пуляции НКТ-лимфоцитов было существенно снижено у пациентов 2-й и 3-й групп по сравнению со здоровыми испытуемыми.

Группа «наивных» пациентов с БПРС характеризовалась существенным увеличением содержания В-лимфоцитов, экспрессирующих активационные маркеры CD38, CD25, по сравнению со значениями контрольной группы (табл. 2). По остальным исследуемым параметрам (экспрессия костимулирующей молекулы CD40, количество В-клеток памяти

(CD27⁺), экспрессия антигенов CD5, CD95) значимых различий с показателями контрольной группы не выявлено.

У пациентов, прекративших терапию НАТ, у которых не было зафиксировано обострения РС, также выявлено значительное увеличение содержания активированных В-лимфоцитов (по экспрессии маркеров CD25 и CD38) по сравнению со значениями контрольной группы. У пациентов с обострением РС после прекращения терапии НАТ отмечено существенное снижение содержания субпопуляции В1-лимфоцитов (CD19⁺CD5⁺) по сравнению как с пациентами без лечения, так и с показателями контрольной группы.

По остальным исследуемым параметрам (экспрессия ко-стимулирующей молекулы CD40, количество В-клеток памяти (CD27⁺), экспрессия CD95) у пациентов, прекративших терапию НАТ, значимых различий с показателями «наивных» пациентов и контрольной группы не выявлено.

Обсуждение

По данным литературы, результаты исследования клеточного иммунитета у больных РС неоднозначны, поскольку имеется большое разнообразие типов течения, клинических проявлений, динамики нарастания неврологического дефицита, а также методов лечения больных РС.

В. Arneth на основе обследования 290 пациентов с РС указывает на высокую степень вариабельности всех исследованных субпопуляций лимфоцитов, особенно на фоне терапии ПИТРС [19]. При этом автором отмечено снижение содержания в ПК Т-лимфоцитов (CD3⁺), Т-хелперных лимфоцитов (CD4⁺), в том числе активированных (CD4⁺HLA-DR⁺), а также увеличение доли НКТ-клеток (CD3⁺CD16⁺CD56⁺). Выявлено повышенное количество активированных цитотоксических CD8⁺-Т-лимфоцитов, что позволило предполагать важную роль этой субпопуляции при РС.

Многочисленные экспериментальные и клинические исследования продемонстрировали провоспалительное энцефалитогенное действие CD8⁺-Т-клеток, возрастающее при контакте с молекулами основного белка миелина [20]. Миелинспецифичные CD8⁺-Т-клетки при РС могут усугублять воспаление головного мозга. CD8⁺-Т-клетки обнаруживаются в очагах поражения мозга у мышей с экспериментальным энцефаломиелитом и в веществе головного мозга у пациентов с РС.

В результате проведённого нами исследования в группе «наивных» больных с БПРС не установлено выраженных нарушений показателей НКТ-клеточного иммунитета по сравнению с референсными значениями. Создаётся парадоксальное впечатление, что параметры Т-клеточного иммунитета у «наивных» пациентов находятся в пределах нормальных значений. Возможно, этот факт можно объяснить недостаточным числом наблюдений.

При характеристике субпопуляционного состава В-лимфоцитов в группе «наивных» пациентов выявлено выраженное увеличение содержания активированных В-лимфоцитов (по экспрессии как CD25, так и CD38).

С другой стороны, в группе пациентов, прекративших лечение НАТ, зарегистрированы более выраженные изменения параметров Т- и В-клеточного иммунитета: уменьшение общего числа лимфоцитов, значительное снижение содержания субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺) и НКТ-лимфоцитов, осуществляющих специфическую киллерную эффекторную функцию, существенное снижение доли активированных Т-лимфоцитов (CD3⁺HLA-DR⁺).

Нельзя исключить, что зарегистрированное нами снижение содержания циркулирующих в ПК цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺), активированных Т-клеток (CD3⁺HLA-DR⁺) и НКТ-лимфоцитов у пациентов, прекративших терапию НАТ, могло быть связано с их перераспределением, преодолением гематоэнцефалического барьера и проникновением этих эффекторных субпопуляций лимфоцитов в вещество ЦНС, что может косвенно подтверждаться большим содержанием таких клеток в ПК пациентов без обострения.

С другой стороны, С.А. Wagner и соавт. получили данные о существенном увеличении числа циркулирующих CD8⁺-Т-клеток памяти, специфичных к миелиновым антигенам, по сравнению с контролем [21].

Первоначальное представление о РС как о Т-клеточно-опосредованном заболевании в настоящее время пересматривается, поскольку получено большое количество доказательств участия В-клеток в патогенезе заболевания. При РС в качестве механизма повреждения ЦНС предполагается аберрантная стимуляция плазматических и В-клеток, приводящая к выработке аутоантител против специфических антигенов миелина. В экспериментах было показано, что взаимодействие В-лимфоцитов с CD4⁺-Т-клетками инициирует адаптивный иммунный ответ на антигены миелина, а подавление В-клеточного иммунитета приводит к снижению воспаления и выраженности клинических проявлений [22, 23].

Я.А. Ломакин и соавт. проанализировали репертуар В-клеточных рецепторов регуляторных В-клеток ПК больных с РС и обнаружили, что частота встречаемости ряда генов регуляторных В-клеток отличалась от распределения генов иммуноглобулинов у здоровых лиц, причём этот сдвиг был более выражен у пациентов с высокоактивным РС [24]. Полученные данные позволили авторам предположить, что изменение репертуара регуляторных В-клеток при РС происходит на ранних этапах созревания В-клеток.

Исследование В-клеточной популяции лимфоцитов ПК у пациентов РС, прекративших терапию НАТ, по нашим наблюдениям, продемонстрировало сохранение содержания В-клеток по линейным антигенам (CD19⁺, CD20⁺), причём с сохранением их функциональной активности – антигенпрезентирующей способности.

При оценке особенностей субпопуляционного состава В-клеток у пациентов, прекративших лечение НАТ, мы получили ряд различий между подгруппами пациентов, различающихся между собой фактом развития или от-

сутствия у них обострения процесса. Так, именно в группе пациентов, получивших обострение процесса при отмене НАТ, нами было выявлено существенное снижение содержания субпопуляции В1-лимфоцитов (CD19⁺CD5⁺), т.е. клеток, ассоциированных с продукцией аутоантител при аутоиммунной патологии.

С другой стороны, у пациентов без развития обострения РС после отмены НАТ выявлено значительное увеличение субпопуляций В-лимфоцитов, активированных по рецептору интерлейкина-2 (CD25) и CD38 по сравнению с референсными величинами. Полученные данные свидетельствуют о значительном увеличении активационного потенциала В-лимфоцитов, что может выражаться в последующей усиленной пролиферации и дифференцировке их в плазматические клетки, секретирующие аутоантитела против специфических антигенов миелина.

Заключение

В результате проведенного исследования выявлено, что у пациентов с РС, являющихся кандидатами для переключения на терапию препаратом МАТ (анти-CD20) окрелизумабом, не обнаружено снижения, а напротив, выявлено

сохранение числа CD20⁺-В-лимфоцитов после длительной терапии НАТ.

Иммунологическими дополнительными критериями (предикторами) обострения РС после отмены НАТ могут служить следующие параметры:

- снижение абсолютного количества лимфоцитов в ПК;
- снижение содержания в ПК эффекторной субпопуляции CD3⁺CD8⁺-Т-лимфоцитов;
- снижение содержания субпопуляции НКТ-лимфоцитов;
- снижение содержания в ПК субпопуляции В1-лимфоцитов.

С другой стороны, выявленное нами выраженное увеличение содержания в циркуляции активированных по CD25 и CD38 В-лимфоцитов у пациентов с БПРС и в подгруппе пациентов без клинически диагностированного обострения заболевания после отмены НАТ может свидетельствовать о наличии в циркуляции пула В-лимфоцитов с высоким активационным потенциалом, а следовательно, о наличии выраженного риска развития обострения заболевания.

Полученные данные подтверждают целесообразность переключения этих пациентов на анти-В-клеточную терапию.

Список источников / References

1. Baecher-Allan C., Kaskow B.J., Weiner H.L. Multiple sclerosis: mechanisms and immunotherapy. *Neuron*. 2018;97(4):742–768. DOI: 10.1016/j.neuron.2018.01.021
2. Danikowski K.M., Jayaraman S., Prabhakar B.S. Regulatory T cells in multiple sclerosis and myasthenia gravis. *J. Neuroinflamm.* 2017;14(1):117. DOI: 10.1186/s12974-017-0892-8
3. Cencioni M.T., Mattosio M., Magliozzi R. et al. B cells in multiple sclerosis – from targeted depletion to immune reconstitution therapies. *Nat. Rev. Neurol.* 2021;17(7):399–414. DOI: 10.1038/s41582-021-00498-5
4. Хачанова Н.В. Высокоактивный рассеянный склероз – возможности выбора терапии моноклональными антителами. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2019;119(10, вып. 2):49–57. Khachanova N.V. Highly active multiple sclerosis: options for monoclonal antibody therapy. *Zhurnal Neurologii i Psikiatrii imeni S.S. Korsakova*. 2019;119(10, iss. 2):49–57. DOI: 10.17116/jnevro201911910249
5. Журавлева М.В., Давыдовская М.В., Лучинина Е.В. и др. Сравнение клинических преимуществ препаратов второй линии, изменяющих течение рассеянного склероза. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2020;120(8):148–153. Zhuravleva M.V., Davydovskaya M.V., Luchinina E.V. et al. Comparison of the clinical benefits of second-line drugs modifying the course of multiple sclerosis. *Zhurnal Neurologii i Psikiatrii imeni S.S. Korsakova*. 2020;120(8):148–153. DOI: 10.17116/jnevro2020120081148
6. Khoj K., Mariotte D., Defer G. et al. Natalizumab in multiple sclerosis treatment: from biological effects to immune monitoring. *Front. Immunol.* 2020;11:549842. DOI: 10.3389/fimmu.2020.549842
7. Cobo-Calvo Á., Figueras A., Bau L. et al. Leukocyte adhesion molecule dynamics after Natalizumab withdrawal in Multiple Sclerosis. *Clin. Immunol.* 2016;171:18–24. DOI: 10.1016/j.clim.2016.08.003
8. Белова А.Н., Растеряева М.В., Жулина Н.И. и др. Воспалительный синдром восстановления иммунитета и ребаунд-синдром при отмене некоторых препаратов иммуномодулирующей терапии рассеянного склероза: общие представления и собственное наблюдение. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. Спецвыпуски. 2017;117(2-2):74–84. Belova A.N., Rasteryaeva M.V., Zhulina N.I. et al. Immune reconstitution inflammatory syndrome and rebound syndrome in multiple sclerosis patients who stopped disease modification therapy: current understanding and a case report. *Zhurnal Neurologii i Psikiatrii imeni S.S. Korsakova*. 2017;117(2-2):74–84. (In Russ.). DOI: 10.17116/jnevro20171172274-84
9. Miravalle A., Jensen R., Kinkel R.P. Immune reconstitution inflammatory syndrome in patients with multiple sclerosis following cessation of natalizumab therapy. *Arch. Neurol.* 2011;68(2):186–191. DOI: 10.1001/archneurol.2010.257
10. Proschmann U., Inojosa H., Akgün K., Ziemssen T. Natalizumab pharmacokinetics and -dynamics and serum neurofilament in patients with multiple sclerosis. *Front. Neurol.* 2021;12:650530. DOI: 10.3389/fneur.2021.650530
11. Giovannoni G., Marta M., Davis A. et al. Switching patients at high risk of PML from natalizumab to another disease-modifying therapy. *Pract. Neurol.* 2016;16(5):389–93. DOI: 10.1136/practneurol-2015-001355
12. Sellner J., Rommer P.S. A review of the evidence for a natalizumab exit strategy for patients with multiple sclerosis. *Autoimmun. Rev.* 2019;18(3):255–261. DOI: 10.1016/j.autrev.2018.09.012
13. Planas R., Jelčić I., Schippling S. et al. Natalizumab treatment perturbs memory- and marginal zone-like B-cell homing in secondary lymphoid organs in multiple sclerosis. *Eur. J. Immunol.* 2012;42(3):790–798. DOI: 10.1002/eji.201142108
14. Plavina T., Muralidharan K.K., Kuesters G. et al. Reversibility of the effects of natalizumab on peripheral immune cell dynamics in MS patients. *Neurology*. 2017;89(15): 1584–1593. DOI: 10.1212/WNL.0000000000004485
15. Мельников М.В., Пашенков М.В., Бойко А.Н. Дендритные клетки при рассеянном склерозе. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. Спецвыпуски. 2017;117(2-2):22–30. Mel'nikov M.V., Pashchenkov M.V., Boiko A.N. Dendritic cells in multiple sclerosis. *Zhurnal Neurologii i Psikiatrii imeni S.S. Korsakova*. 2017;117(2-2):22–30. DOI: 10.17116/jnevro20171172222-30
16. Stüve O. The effects of natalizumab on the innate and adaptive immune system in the central nervous system. *J. Neurol. Sci.* 2008;274(1-2):39–41. DOI: 10.1016/j.jns.2008.03.022
17. Ядгаров М.Я., Кузовлев А.Н., Берикашвили Л.Б. и др. Важность оценки закона распределения данных: теория и практическое руководство. *Анестезиология и реаниматология*. 2021;(2):136–142. Yadgarov M.Ya., Kuzovlev A.N., Berikashvili L.B. et al. Importance of data distribution normality test: theory and practical guide. *Russian Journal of Anaesthesiology and Reanimatology*. 2021;(2):136–142. DOI: 10.17116/anaesthesiology2021021136

18. Наркевич А.Н., Виноградов К.А., Гржибовский А.М. Множественные сравнения в биомедицинских исследованиях: проблема и способы решения. Экология человека. 2020;10:55–64. Narkevich A.N., Vinogradov K.A., Grjibovski A.M. Multiple comparisons in biomedical research: the problem and its solutions. *Human Ecology*. 2020;10:55–64. DOI: 10.33396/1728-0869-2020-10-55-64
19. Arnetz B. Activated CD4⁺ and CD8⁺ T cell proportions in multiple sclerosis patients. *Inflammation*. 2016;39(6):2040–2044. DOI: 10.1007/s10753-016-0441-0
20. Kaskow B.J., Baecher-Allan C. Effector T cells in multiple sclerosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2018;8(4):a029025. DOI: 10.1101/cshperspect.a029025
21. Wagner C.A., Roqué P.J., Mileur T.R. et al. Myelin-specific CD8⁺ T cells exacerbate brain inflammation in CNS autoimmunity. *J. Clin. Invest.* 2020;130(1):203–213. DOI: 10.1172/JCI132531

22. Liu R., Du S., Zhao L. et al. Autoreactive lymphocytes in multiple sclerosis: Pathogenesis and treatment target. *Front. Immunol.* 2022;13:996469. DOI: 10.3389/fimmu.2022.996469
23. Poppel M., Hammel G., Ren Y. Immune regulatory functions of macrophages and microglia in central nervous system diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24(6):5925. DOI: 10.3390/ijms24065925
24. Ломакин Я.А., Овчинникова Л.А., Захарова М.Н. и др. Смещение репертуара генов зародышевой линии в-клеточных рецепторов при рассеянном склерозе. *Acta Naturae*. 2022;14(4):84–93. Lomakin Ya.A., Ovchinnikova L.A., Zakharova M.N. et al. Multiple sclerosis is associated with immunoglobulin germline gene variation of transitional B cells. *Acta Naturae*. 2022;14(4):84–93. DOI: 10.32607/actanaturae.11794

Информация об авторах

Белова Юлиана Алексеевна – к.м.н., с.н.с. неврологического отделения МНИКИ им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1509-9608>

Чуксина Юлия Юрьевна – к.м.н., с.н.с. лаб. биомедицинских методов исследования отдела экспериментальных и клинических исследований МНИКИ им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4393-1759>

Котов Сергей Викторович – д.м.н., профессор, зав. кафедрой неврологии Факультета усовершенствования врачей, г.н.с. неврологического отделения МНИКИ им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8706-7317>

Василенко Ирина Анатольевна – д.м.н., профессор, зав. лаб. биомедицинских методов исследований МНИКИ им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6374-9786>

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Information about the authors

Yuliana A. Belova – Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Neurological department, M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1509-9608>

Yulia Yu. Chuksina – Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of biomedical research methods, M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4393-1759>

Sergey V. Kotov – D. Sci. (Med.), Professor, Head, Department of neurology, Faculty of Advanced Training for Doctors; chief researcher, Neurological department, M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8706-7317>

Irina A. Vasilenko – D. Sci. (Med.), Professor, Head, Laboratory of biomedical research methods, M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6374-9786>

Author contribution. All the authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.