

## ДИНАМІКА ПОКАЗНИКІВ ІМУННОГО СТАТУСУ У ПАЦІЄНТІВ З РЕЦИДИВНО-РЕМІТУЮЧИМ РОЗСІЯНИМ СКЛЕРОЗОМ ДО ТА ПІСЛЯ ЛІКУВАННЯ ПРЕПАРАТОМ «БЕТФЕР-1А»

Вдовіченко Н. І.<sup>1</sup>, Коляда Т. І.<sup>1</sup>, Тупотілов О. В.<sup>1</sup>,  
Білозоров О. П.<sup>1</sup>, Негреба Т. В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України» (м. Харків),

<sup>2</sup>ДУ «Інститут неврології, психіатрії та наркології Національної академії медичних наук України» (м. Харків)

Причини виникнення такого аутоімунного нейродегенеративного захворювання ЦНС як розсіяний склероз (РС) залишаються нез'ясованими. Наразі немає ефективної терапії РС, а лікувальні дії направлені, головним чином, на лікування загострень і періодів різкого наростання активності захворювання. На теперішній час запропоновано ряд засобів впливу на перебіг захворювання (disease modifying drugs (DMD)), що сприяють уповільненню нейродегенеративного процесу. Оцінка терапевтичної ефективності DMD здійснюється з використанням шкали оцінки ступеню інвалідизації (Expanded Disability Status Scale (EDSS)), що відображує швидкість прогресування захворювання за клініко-рентгенологічними ознаками. Прогресування РС не є лінійним процесом та залежить від багатьох факторів. Інтерферон бета (IFN- $\beta$ ) є першим DMD, впровадженим в клінічну практику в 90-х роках минулого сторіччя. Завдяки відносно непоганому (у порівнянні з іншими DMD) рівню безпечності він лишається препаратом першого вибору при рецидивно-ремітуючому РС (PPPC). Його клінічна ефективність підтверджена в чисельних дослідженнях, однак у 20- 25% випадків IFN $\beta$ -терапія не забезпечує покращення стану [1].

Власне, незважаючи на тривалу історію використання препаратів IFN- $\beta$ , механізми, що забезпечують його терапевтичний ефект при РС залишаються нез'ясованими. IFN- $\beta$  є плейотропним цитокином. Складна система механізмів негативного зворотного зв'язку, що забезпечує контроль активації імунної системи на різних рівнях сигнального каскаду, суттєво ускладнює розуміння природи фармакотерапевтичного ефекту тривалої IFN- $\beta$ -терапії.

Зв'язок розсіяного склерозу з генетичним поліморфізмом також є предметом сучасних досліджень. На сьогоднішній день визначено десятки генів, поліморфізм яких пов'язують з високим ризиком розвитку РС, підвищеним рівнем аутоімунних порушень, проникності гемато-енцефалічного бар'єру, та навіть з резистентністю до деяких видів патогенетичної терапії (зокрема, терапією IFN- $\beta$ ). Гени HLA у поєднанні з імунологічними показниками

можуть використовуватися в якості діагностичних і прогностичних маркерів ризику розвитку і прогресії РС. Нещодавні дослідження свідчать, що HLA-DRB1\*1501 є одним з важливих алелей генетичного ризику розвитку РС [2].

**Метою** дослідження було надати характеристику клінічної ефективності лікування IFN- $\beta$  в залежності від клініко-імунологічного стану пацієнтів з РС.

### Матеріали та методи

Було проведено обстеження 58 пацієнтів з PPPC, що проходили терапію IFN- $\beta$ , а також 27 практично здорових осіб (контрольна група). Група пацієнтів складалася з 9 чоловіків і 49 жінок з середнім віком  $34,8 \pm 7,4$  років та середньою тривалістю захворювання -  $9,4 \pm 7,7$  років. Клінічне обстеження пацієнтів з PPPC включало встановлення активності захворювання та оцінку ступеню інвалідизації за шкалою EDSS. Критерієм включення в дослідження була наявність верифікованого діагнозу «розсіяний склероз» (код G35 за МКХ-10) [3], а також відсутність терапії з використанням препаратів, що модифікують перебіг хвороби, або іншої імуносупресивної терапії протягом щонайменше півроку до проведення обстеження.

Клінічна характеристика пацієнтів з розсіяним склерозом включала встановлення форми (спорадична або сімейна) та актуального типу перебігу захворювання, його тривалості, оцінку ступеню інвалідизації за шкалою EDSS.

Отримання біологічного матеріалу та проведення імунологічного дослідження проводилося безпосередньо до початку лікування та після завершення річного курсу лікування препаратом рекомбінантного інтерферону бета-1а людини «Бетфер-1а» (Біофарма, Україна), що призначався за стандартною схемою. Під час терапії не було зафіксовано випадків ускладнень або непереносимості препарату.

Клінічна ефективність лікування визначалася через 12 місяців від початку лікування. Пацієнти, в яких протягом року було встановлено наявність щонайменше одного рецидиву та/або збільшення ступеню інвалідизації за шкалою EDSS на 1 бал або більше, класифікувалися як пацієнти з негативною динамікою, а ефективність терапії визначалася як незадовільна. Пацієнти, в яких було визначено зниження показнику EDSS на 1 бал при відсутності рецидивів РС, класифікувалися як пацієнти з позитивною динамікою [4].

Дизайн дослідження, крім оцінки клінічного стану хворих, включав оцінку стану системного імунітету, а також аналіз хворобо-асоційованих поліморфних варіантів HLA-DR.

Визначали кількість та фенотип лейкоцитів периферичної крові з використанням імунофлюоресцентних моноклональних антитіл до CD3, CD4, CD8, CD16, CD19; вміст імуноглобулінів класів M, G, A, лімфоцитотоксичних аутоантитіл,

циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові.

Вміст IgM, IgG, IgA у сироватці крові визначали методом твердофазного імуноферментного аналізу з використанням тест-системи виробництва ТОВ НВЛ «Гранум» (Україна) за допомогою імуноферментного аналізатора Stat-Fax 303 (США) згідно з інструкціями виробника.

Визначення субпопуляцій лімфоцитів в периферичній крові хворих проводили з використанням тест-систем виробництва «Гранум» (Україна) відповідно до інструкцій виробника.

Визначення циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) в сироватці крові проводили методом селективної преципітації комплексів антигенів 3,5% розчином поліетиленгліколю з м.м.6000 (AppliChem GmbH, Німеччина), оптичну щільність преципітату визначали спектрофотометрично на аналізаторі Stat-Fax 303 при довжині хвилі 450 нм [5].

Вміст лімфоцитотоксичних аутоантитіл (ЛЦТ) у сироватці крові оцінювали за допомогою комплекмент-залежного лімфоцитотоксичного тесту, заснованого на визначенні життєздатності клітин за фарбуванням трипановим синім.

Комплементарну активність сироватки крові оцінювали за 50% гемолізом еритроцитів барана в присутності гомологічних антитіл [6].

Аналіз поліморфізму HLA, зокрема наявність гаплотипу HLA-DRB1\*1501-DQB1\*0602 (HLA-DR15) визначали за його специфічним маркером SNP rs9271366. Біологічним матеріалом служили зразки букального епітелію, отримані від пацієнтів з РС та практично здорових людей. Виділення високомолекулярної ДНК (40 - 50 x 10<sup>3</sup> пар нуклеотидів (н.п.), ОЩ 260 / 280 нм) проводили на магніточутливому сорбенті за допомогою набору NeoPrep<sup>100</sup> DNA Magnet (NeoGene, Україна). SNP поліморфізм rs9271366 A/G типували з використанням методики аель-специфічної ампліфікації з електрофоретичною детекцією результатів. Підбір праймерів виконували за методом [7] із введенням додаткової невідповідності (місматчу) у третьому положенні на 3' кінці. Використовували праймери MS92AF 5'-CACGTAATATAA-ATGGTTGCAAAGGA-3', MS92GF 5'-CACGTAATATAAATGGTTGCA-AAGGG-3' та MS92R5'-AACCTGTATGTAACAGA(C/T)CTCTA-3' (Eurofins Genomics), а також Taq-mut полімерази виробництва «Літех» (РФ). Ампліфікацію проводили на багатоканальному ампліфікаторі «Терцик» (РФ). Режим ампліфікації: денатурація при 96°C протягом 3 хв. та 35 циклів, що включали денатурацію при 95°C протягом 30 сек., відпал при 58°C протягом 30 сек. і синтез при 72°C протягом 30 сек. Довжина амплікона дорівнювала 233 нп. Електрофорез проводили в 2% гелі агарози в ТАЕ буфері. Аналіз електрофореграм проводили на транслюмінаторі UVT 1 (Біоком, РФ).

Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням програми STATISTICA 11.0 (StatSoft, Inc) та XLSTAT 19.6 (Addinsoft). Для визначення достовірності відмінностей між

показниками в досліджуваних вибірках використовували U-критерій Манна-Уїтні та критерій хі-квадрат Пірсона з поправкою Йейтса, при нормальному розподілі використовували t-критерій Стьюдента.

### Результати та обговорення

На першому етапі дослідження було проведено клінічне неврологічне обстеження всіх пацієнтів з розсіяним склерозом для встановлення форми та актуального типу перебігу, часових етапів перебігу (дебюту, рецидивного етапу при рецидивно-ремітуючому типу перебігу, характеру прогнозу), активності, тривалості захворювання, оцінки ступеню інвалідації хворих.

Було проведено обстеження 58 пацієнтів з рецидивно-ремітуючим розсіяним склерозом (PPPC), що проходили терапію IFN-β. З обстежених 58 хворих, в 46 осіб (5 чоловіків і 41 жінок) було встановлено спорадичну форму, у 12 осіб (4 чоловіків і 8 жінок) – «сімейну» форму. Показник інвалідації пацієнтів до початку терапії дорівнював 2,4 ± 1,5 бали.

За даними клінічного обстеження з урахуванням активності захворювання до лікування 27,6% пацієнтів (16 осіб) були у стадії загострення (клінічна та радіологічна активність) та 72,4% (42 особи) у стадії клінічно-радіологічної ремісії. Після лікування 10,35% перебували у стадії загострення та 89,65% у стадії клінічно-радіологічної ремісії.

В залежності від встановленої ефективності лікування пацієнтів було розділено на дві групи:

– Група (MS) (IFN+) – (Multiple sclerosis) (IFN+), пацієнти з позитивною клінічною динамікою, в яких протягом року від початку лікування не було жодного рецидиву, ступінь інвалідації за шкалою EDSS залишався незмінним або зменшився. Група включала 37 осіб (64%), EDSS в групі до початку терапії дорівнював 2,2 ± 1,4 бали. Після терапії EDSS дорівнював 2,1 ± 1,4 бали.

– Група (MS) (IFN-) – (Multiple sclerosis) (IFN-), пацієнти з негативною клінічною динамікою, в яких протягом року було встановлено наявність щонайменше одного рецидиву та/або збільшення ступеню інвалідації за шкалою EDSS на 1 бал або більше, що включала 21 особу. EDSS до початку терапії дорівнював 2,5 ± 1,5 бали. Після терапії EDSS в групі дорівнював 3,0 ± 1,5 бали.

Дослідження показників клітинної ланки імунітету у пацієнтів з PPPC не залежно від клінічної ефективності лікування (рис. 1) виявило достовірне у порівнянні з контролем зниження відносної кількості CD3+, CD4+, CD8+ та CD16+ клітин. Пригнічення клітинної ланки імунітету також спостерігали в роботі Vališ M. [8].

Відносний вміст CD4+ клітин до лікування був нижче норми у 51,3% хворих (19 осіб) групи MS(IFN+) та 62% хворих (13 осіб) групи MS(IFN-), а CD8+ клітин – в 81% (30 осіб) та 62% (13 осіб) випадків відповідно. Відносна кількість CD19+ клітин у пацієнтів обох груп була достовірно нижче контролю

до початку лікування.

При порівнянні показників клітинної ланки імунітету після лікування в групах MS(IFN+) та MS(IFN-), спостерігали достовірно знижені показники відносної кількості CD3+, CD4+ та CD8+ клітин ( $p < 0,05$  відносно групи контролю). Рівень CD16+ клітин

був знижений після лікування тільки в групі пацієнтів з негативною динамікою. Відносна кількість CD19+ клітин у пацієнтів з позитивною динамікою після лікування не відрізнялась від контролю, а у пацієнтів з негативною динамікою була достовірно вище контролю.

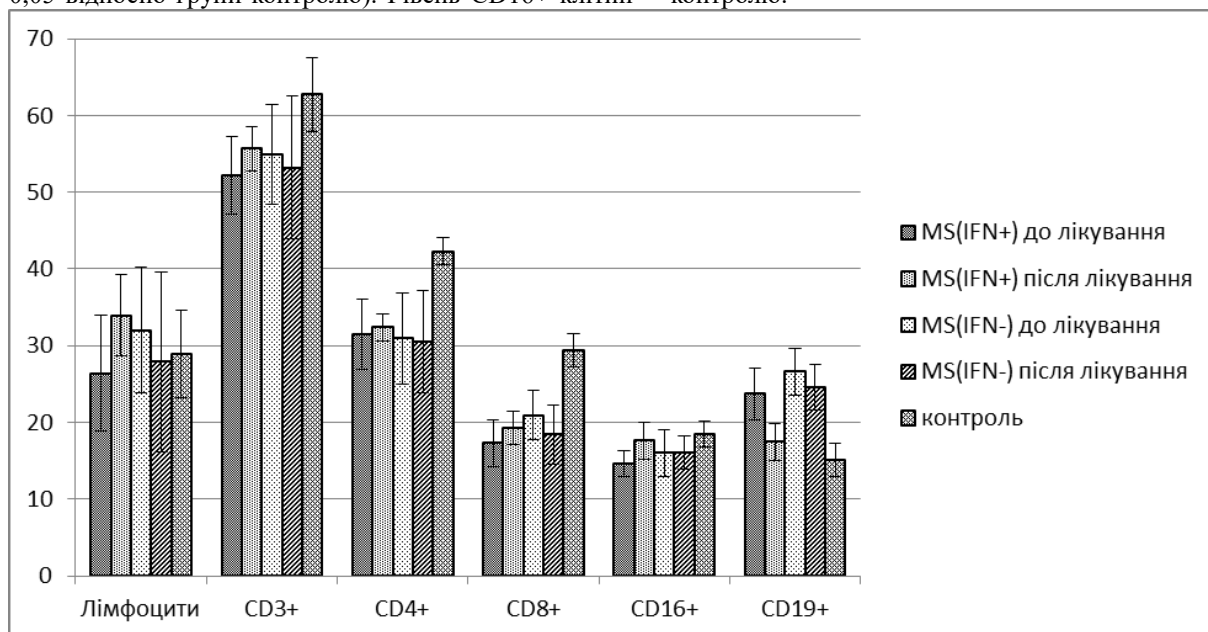


Рисунок 1 – Показники клітинної ланки імунітету пацієнтів з позитивною та негативною динамікою до та після лікування (відносна кількість клітин, %)

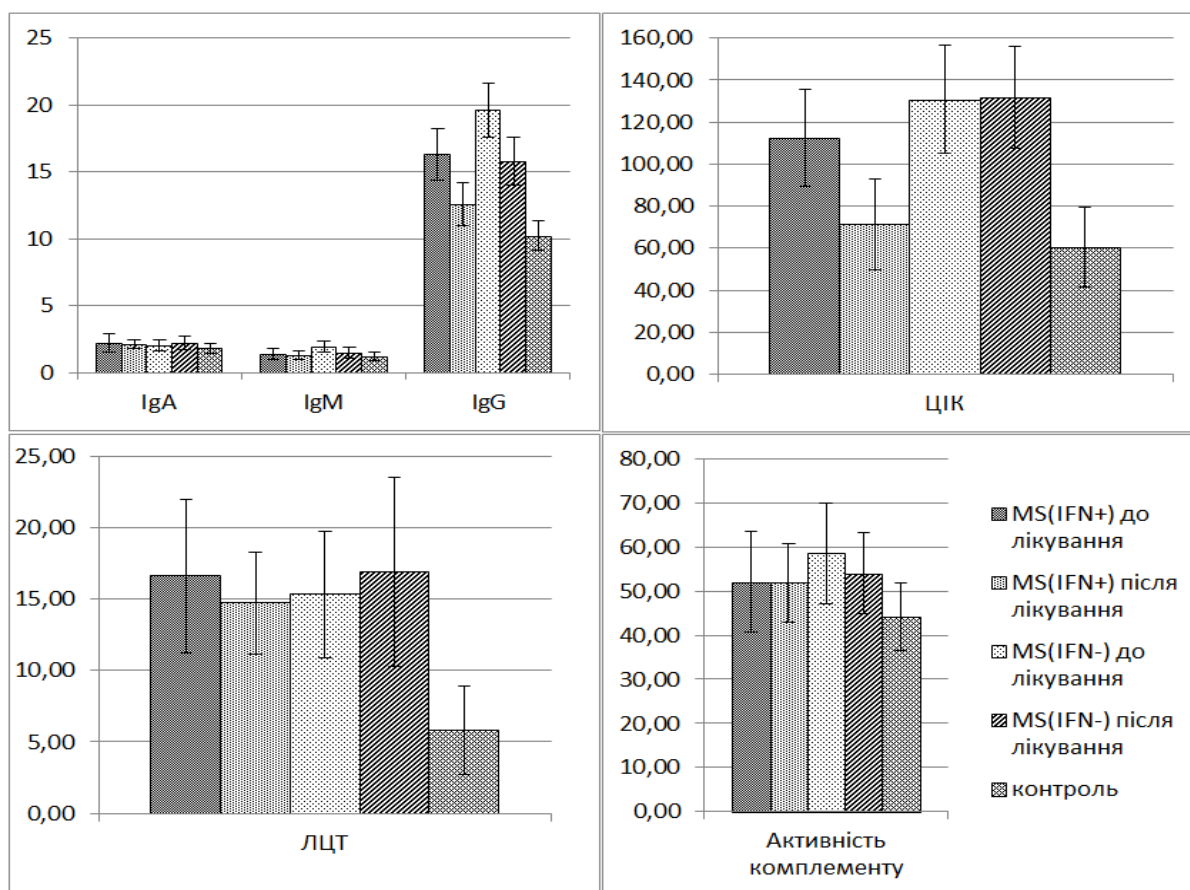
Результати дослідження показників гуморальної ланки імунітету пацієнтів груп MS(IFN+) та MS(IFN-) з PPPC наведено на рис. 2. Рівень лімфоцитотоксичних аутоантитіл до лікування в обох групах був достовірно вище показнику практично здорових людей контрольної групи більш, ніж в 2 рази ( $p < 0,05$ ). В досліджуваних групах спостерігали також достовірно підвищений відносно контролю рівень IgG. У пацієнтів групи MS(IFN-) було визначено ознаки запального процесу, про що свідчив достовірно підвищений відносно контролю рівень IgM. Також у пацієнтів обох груп до лікування спостерігалось достовірне підвищення рівня ЦІК та активності комплементу. При цьому, показники ЦІК відрізнялися від контролю у пацієнтів групи MS(IFN+) в 1,9 разів, а у пацієнтів MS(IFN-) - в 2 рази ( $p < 0,05$ ).

Після курсу терапії в групі пацієнтів MS(IFN-) показник IgG був достовірно вище контролю. Зниження рівню IgM, а також активності комплементу, у пацієнтів з негативною динамікою до показників контрольної групи вказує на зменшення запалення. Рівень ЦІК в групі MS(IFN-) після лікування перевищував відповідний показник у пацієнтів з позитивною динамікою в 1,8 рази та показник здорових осіб в 2,2 рази ( $p < 0,05$ ). Показник ЛЦТ у хворих обох груп був достовірно вищим показнику в контрольній групі. При цьому показник ЛЦТ у пацієнтів з негативною динамікою перевищував значення у контрольній групі до лікування в 2,6 рази та після лікування в 2,9 рази ( $p < 0,05$ ). Рівень активності комплементу у пацієнтів групи MS(IFN-) був достовірно вищим показнику практично здорових

людей контрольної групи.

До числа спадкових факторів, що підвищують ризик розвитку розсіяного склерозу, відноситься поліморфізм генів головного комплексу гістосумісності класу II. Порушення нормального функціонування системи HLA призводить до розвитку цілого ряду патологій, зокрема тих, в основі яких лежить аутоімунний компонент [9].

Для проведення генетичних досліджень у рамках визначення наявності хворобо-асоційованих поліморфних варіантів HLA-DR, зокрема визначення наявності гаплотипу HLA-DRB1\*1501-DQB1\*0602 (HLA-DR15) було розроблено та апробовано методику типування одиночного поліморфізму rs9271366 A/G. Наявність цього гаплотипу встановлювали для визначення зв'язку хворобо-асоційованого поліморфізму HLA-DR з ефективністю терапії IFN- $\beta$  в пацієнтів груп MS(IFN+) та MS(IFN-). Одним з специфічних маркерів (tag SNP) гаплотипу HLA-DRB1\*1501-DQB1\*0602 є алель G SNP rs9271366. Виявлення HLA-DR15 за типуванням SNP rs9271366 має високий рівень чутливості та специфічності - більше 97% [10]. Використана нами методика дозволила чітко диференціювати алелі даного локусу. Наявність мінорного хворобо-асоційованого алелю G було визначено у 11 з 37 пацієнтів з позитивною динамікою (29,7%) (гетерозиготні), ще 26 пацієнтів (70,3%) були гомозиготними за мажорним алелем А. В групі пацієнтів з негативною динамікою 9 осіб (42,9%) були гетерозиготні, 12 (57,1%) - гомозиготними за мажорним алелем А.



**Рисунок 2 – Показники гуморальної ланки імунітету пацієнтів з позитивною та негативною динамікою до та після лікування: вміст імуноглобулінів класів А, М, G (г/л), циркулюючих імунних комплексів (ум.од.), лімфоцитотоксичних аутоантител (%) та активність комплементу (гем.од.).**

Отже, аналіз поліморфізму HLA серед пацієнтів з PPPC, мешканців м. Харкова та Харківської області, не виявив статистично значимі відмінності у частоті зустрічальності гаплотипу HLA-DRB1\*1501-DQB1\*0602 в групах пацієнтів з позитивною та негативною динамікою на терапію препаратом «Бетфер-1а плюс» (OR=0,564).

Результати порівняльного аналізу клінічних показників та даних генетичного дослідження свідчили про те, що форма захворювання (сімейна, спорадична), показник EDSS та швидкість прогресування у обстежених пацієнтів не мали кореляцій з алелем G SNP rs9271366.

Link et al. показали, що гаплотип HLA-DRB1\*1501-DQB1\*0602 (HLA-DR15), пов'язаний з ризиком розвитку РС, також може бути асоційованим із резистентністю до терапії препаратами ІФН-β-1а. Показано, що під час терапії існує підвищений ризик виникнення високих титрів нейтралізуючих антител до ІФН-β-1а у пацієнтів з PPPC, які були носіями HLA-DR15 [11].

Гени HLA у поєднанні з імунологічними показниками можуть використовуватися в якості діагностичних і прогностичних маркерів ризику розвитку, прогресії РС та ефективності терапії.

В роботі [12] було встановлено, що наявність поліморфного варіанту HLA-DRB1\*15:01 дає

трикратне збільшення ризику захворювання, а у випадку монозиготності ризик розвитку розсіяного склерозу збільшується в декілька разів.

Таким чином, розробка та удосконалення сучасних інформативних показників активності патологічного процесу при розсіяному склерозі, а також ефективності лікування з метою своєчасної корекції призначеної терапії є важливим медико-біологічним завданням і потребує дослідження зв'язку між ризиком розвитку РС (у тому числі наявністю хворобо-асоційованих поліморфних варіантів генів), типом його перебігу, а також імунним статусом пацієнтів з РС.

## Висновки

Після курсу терапії ІФН-β, у пацієнтів з PPPC незалежно від клінічної ефективності лікування залишилися достовірно знижені показники відносної кількості CD3+, CD4+, CD8+ та CD16+клітин. Відносна кількість CD19+ клітин у групі пацієнтів з позитивною динамікою після лікування не відрізнялась від контрольних значень, на відміну від пацієнтів з негативною динамікою. Показники ЦІК та ІgG у хворих після лікування нормалізувалися, на відміну від ЛЦТ та комплементу, що залишилися підвищеними. При порівнянні показників гуморальної ланки імунітету в групі пацієнтів з позитивною динамікою рівні ІgG, ЦІК та активності комплементу після

лікування не відрізнялися від контрольних значень. В групі пацієнтів з негативною динамікою після лікування рівні IgG, ЦІК та ЛЦТ залишилися підвищеними відносно контролю.

#### Abstract

#### DYNAMICS OF IMMUNE STATUS INDICATORS IN PATIENTS WITH RELAPSING-REMITTING MULTIPLE SCLEROSIS BEFORE AND AFTER TREATMENT OF BETFER-1A DRUG

Vdovichenko N.I., Kolyada T. I., Tupotilov O. V., Negreba T. V., Kolyada O. M.

The article presents the results of examination of 58 patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS) treated IFN- $\beta$ . Depending on the effectiveness of treatment, patients were divided into two groups: responders, included 37 persons (64%), in this group patients did not relapse during the year from the beginning of treatment, the degree of EDSS remained unchanged or decreased, the group EDSS before the start of therapy was  $2.2 \pm 1.4$  points. After therapy, EDSS was  $2.1 \pm 1.4$  points. - non-responders, this group included 21 individuals, the patient was included in the group if he had at least one relapse during the year and / or an increase in the degree of disability on the EDSS was found to be 1 point or more. The group EDSS before the start of therapy was  $2.5 \pm 1.5$  points. After therapy, EDSS was  $3.0 \pm 1.5$  points. The immunological characteristics of the patients are presented, depending on the clinical efficacy of the treatment; the presence of disease-associated polymorphic variants of HLA-DR has been determined. After the course of therapy with IFN- $\beta$ , in patients with RRMS, regardless of the clinical efficacy of treatment, the relative number of T-lymphocytes and natural killer cells remained significantly reduced. In the group of responders levels of circulating immune complexes and IgG levels did not differ from control after treatment, in contrast to the levels of lymphocytotoxic autoantibodies and complement activity, which remained elevated relative to the control. After treatment in patients with low efficacy of IFN- $\beta$  therapy (nonresponders), the relative number of CD19+ cells, as well as the levels of IgG, circulating immune complexes and lymphocytotoxic autoantibodies remained elevated relative to the control group. The presence of the haplotype HLA-DRB1\*1501-DQB1\*0602 (one of its specific markers is allele G SNP rs9271366) is established to determine the association between the disease-associated polymorphism of HLA-DR and the effectiveness of IFN- $\beta$  therapy. The presence of the minor disease-associated G allele was determined in 11 responders (29.7%) (heterozygous), another 26 patients (70.3%) were homozygous for major allele A. In the group of non-responders, 9 persons (42, 9%) were heterozygous, 12 (57.1%) were homozygous for major allele A.

**Keywords:** multiple sclerosis, IFN- $\beta$ , immune status, disease-associated gene polymorphism

#### Література

1. Rudick R.A., Lee J.C., Simon J., et al. Defining

interferon beta response status in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol.* 2004. V 56. P.548–555

2. Lill C. M. Recent advances and future challenges in the genetics of multiple sclerosis. *Front. Neurol.* 2014. N 5: 130. URL: <http://dx.doi.org/10.3389/fneur.2014.00130>

3. Наказ МОЗ України №487 від 17.08.2007 р. «Про затвердження клінічних протоколів надання медичної допомоги за спеціальністю «Неврологія»». Київ. 2007

4. Hegen H., Auer M., Deisenhammer F. Predictors of response to multiple sclerosis therapeutics in individual patients. *Drugs.* 2016. 76: 1421

5. Frolov V.M., Rychnev V. E. Investigation of circulating immune complexes: diagnostic and prognostic value. *Laboratory work.*1986. 3. 159-16

6. Reznikova L.S. Complement and its Importance in Immunological Reactions. Moscow: Medicine,1967

7. Liu, Jing et al. An Improved Allele-Specific PCR Primer Design Method for SNP Marker Analysis and Its Application. *Plant Methods.* 2015. 8. 34. PMC.

8. Vališ M, Vyšata O, Sobíšek L, Klímová B, Andrys C, Vokurková D, et al. Monitoring of lymphocyte populations during treatment with Interferon-b-1b to predict multiple sclerosis disability progression. *Journal of interferon & cytokine research.* 2019. 39(3). P. 164-173. doi: 10.1089/jir.2018.0100.

9. Miranda-Hernandez S, Baxter AG. Role of toll-like receptors in multiple sclerosis. *American journal of clin. and experim. immunol.* 2013. 2(1). P. 75-93. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3714200>

10. Hedström A. K., Bomfim I. L., Barcellos L. F. et al] Interaction between passive smoking and two HLA genes with regard to multiple sclerosis risk // *Int. J. Epidemiol.* 2014. Vol. 43. P. 1791–1798. <http://dx.doi.org/10.1093/ije/dyu195>

11. Link J., Lundkvist R. M., Fink K. et al. Human leukocyte antigen genes and interferon beta preparations influence risk of developing neutralizing anti-drug antibodies in multiple sclerosis. *PLoS One.* 2014. 9(3). e90479. doi:10.1371/journal.pone.0090479

12. George M. F., Briggs B. S., Shao X. et al Multiple sclerosis risk loci and disease severity in 7,125 individuals from 10 studies. *Neurology: Genetics.* 2016. Vol. 2 (4). e87. <http://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000087>