



И.И. Андреева, Л.П. Сизякина, З.А. Гончарова

ИНВЕРСИЯ ГОМЕОСТАТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПРИ РАССЕЯННОМ СКЛЕРОЗЕ

*Ростовский государственный медицинский университет,
Россия, 344022, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29. E-mail: iai3012@rambler.ru*

Цель: комплексная характеристика факторов адаптивного и врожденного иммунитета у больных рассеянным склерозом. **Материалы и методы:** с помощью проточной цитофлюориметрии, реакции бласттрансформации лимфоцитов, иммуноферментного анализа оценивали количественные и функциональные показатели иммунокомпетентных клеток. Под наблюдением находилось 85 больных рассеянным склерозом. **Результаты:** показаны особенности иммунного статуса в условиях обострения и клинической ремиссии рассеянного склероза. С позиции патогенетического подхода оценки изменений иммунного статуса дана характеристика процессам распознавания, активации, пролиферации, дифференцировки, эффекторным потенциам иммунокомпетентных клеток. **Выводы:** что в период обострения рассеянного склероза нарушены все этапы иммуногенеза. Ремиссия клинической манифестации ассоциирована со стабилизацией процессов распознавания антигена. Однако последующие этапы иммуногенеза не восстанавливаются.

Ключевые слова: рассеянный склероз, этапы иммуногенеза.

I.I. Andreeva, L.P. Sizyakina, Z.A. Goncharova

THE INVERSION OF HOMEOSTATIC PROPERTIES OF THE IMMUNE SYSTEM IN PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS

*Rostov State Medical University,
29 Nakhichevansky st., Rostov-on-Don, 344022, Russia. E-mail: iai3012@rambler.ru*

Purpose: the features of the innate and adaptive immunity of patients with multiple sclerosis was investigated. **Materials and methods:** the results of flow cytometry, reaction of blast transformation of lymphocytes, immunosorbent assay and other parameters of innate immunity of 85 patients with multiple sclerosis was investigated. **Results:** It is determined that the factors of innate immunity play a significant role in the pathogenesis of multiple sclerosis. We can see the evaluation of such immunogenesis stages as recognition, activation, proliferation, differentiation of immune cells. **Summary:** all stages of the immune response were disturbed during exacerbation of multiple sclerosis. The antigen recognition processes are restored with the remission of this disease. The stages of the activation, proliferation and differentiation of immune cells were without changes.

Keywords: multiple sclerosis, immunogenesis stages.



Введение

Рассеянный склероз (РС) — хроническое прогрессирующее заболевание, характеризующееся многоочаговостью поражения центральной нервной системы (ЦНС) — в настоящее время рассматривается в качестве классического примера патологического процесса, в основе которого лежит аутоиммунный вариант реакции иммунной системы [1]. Иммунологические подходы к диагностике, терапии, профилактике клинического обострения РС находят широкое распространение в практической медицине, что является доказательным критерием вовлечения иммунных механизмов в генез данного заболевания [2]. В то же время, иммунопатогенетические механизмы срыва толерантности и формирования аутоагрессивных процессов при РС далеки от окончательной расшифровки. Стремительное развитие клинической иммунологии, появление новых данных о регуляторном влиянии системы врожденного иммунитета на течение иммунологических процессов адаптивного иммунитета открывают новые перспективы в изучении аутоиммунного воспаления [3]. При этом особого интереса заслуживает анализ исследования иммунных процессов больных РС с позиции комплексной характеристики этапности иммунного ответа и выявления наиболее значимого уровня дефекта иммуногенеза [4]. Принципиально важно изучение взаимосвязи и взаимообусловленности регуляторного и эффекторного этапов аутоиммунной агрессии для выявления механизмов трансформации саногенетических иммунных реакций в патогенетически значимые [5].

Цель исследования — комплексный анализ системных реакций факторов адаптивного и врожденного иммунитета и их изменений исходя из патогенетического принципа оценки иммунного статуса у больных рассеянным склерозом.

Материалы и методы

Обследованы 85 человек с рецидивирующе-ремитирующим течением РС. Все пациенты находились на стационарном лечении и (или) амбулаторном наблюдении в отделении неврологии и нейрохирургии клиники РостГМУ. Диагноз РС выставлялся на основании критериев McDonald W. Ian с соавт. [6]. Все обследованные больные были разделены на 2 группы. В первую вошли 54 пациента, находившиеся в периоде обострения заболевания (PCO), вторая группа представлена 31 больным в стадии стойкой клинической ремиссии (PCP). Фенотипический анализ лимфоцитов, а именно определение экспрессии CD3, CD4, CD8, CD16, CD20, CD25, CD45RA, CD95, HLA DR, внутриклеточного содержания ИЛ-4, ИФН- γ , Foxp3 проводили с помощью реакции иммунофенотипирования с учетом результатов на проточном лазерном цитофлюориметре «FC 500» и с использованием соответствующих моноклональных антител с двойной и тройной меткой (BeckmanCoulter). Оценка пролиферативной способности Т-клеток осуществлялась посредством реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) на ФГА с радиометрическим учетом и расчётом индекса стимуляции (ИС). Апоптоз

лимфоцитов изучали методом, основанным на выявлении потери клетками части ДНК (гиподиплоидных клеток) с помощью пропидиума иодида и учета результатов на проточном цитофлюориметре. Результаты выражены в % гиподиплоидных МНПК при спонтанном и стимулированном ФГА культивировании и определении индекса стимуляции. Цитолитическую активность НК оценивали по опосредованной Fc γ R III типа (CD16) способности лизировать антиген и выражали показателем относительной и абсолютной цитотоксической активности (ЦТА) [7]. Содержание сывороточных иммуноглобулинов классов А, М, G определяли в реакции радиальной иммунодиффузии в геле по Манчини. Уровень фактора некроза опухоли- α (ФНО- α), интерлейкина-4 (ИЛ-4), интерферона- γ (ИФН- γ) в сыворотке крови определяли методом ИФА в тест-системах производства ЗАО «Вектор-Бест». Контрольную группу составили 10 практически здоровых доноров крови. Математическую обработку полученных данных проводили на ПК Microsoft Windows XP professional, используя программу Statistica 7.0. Достоверность различий в группах оценивали с помощью непараметрических критериев Манна-Уитни. Статистически значимыми считали различия в тех случаях, если вероятность случайного их характера не превышала 5% ($p < 0,05$).

Результаты и их обсуждение

Данные, характеризующие Т-систему адаптивного иммунитета при обострении РС, свидетельствуют об увеличении абсолютного количества Т-лимфоцитов в циркуляции. При этом отмечается усиление экспрессии маркеров, характеризующих раннюю (CD25) и позднюю (HLA DR) активацию. Исключение составил поздний активационный маркер CD95. Сниженная готовность к апоптозу, верифицируемая экспрессией CD95, нашла свое подтверждение при изучении количества лимфоцитов, вступивших в процесс программированной клеточной гибели. Так, количество гиподиплоидных лимфоцитов при добавлении Т-клеточного митогена меньше, чем в группе сравнения. Эти изменения отразились на снижении индекса стимуляции, что является свидетельством угнетения апоптоза Т-клеток. Соответственно, изучение пролиферативной активности Т-лимфоцитов демонстрирует активацию бласттрансформации. Увеличенное значение ИС РБТЛ подтверждает сопряженную с угнетением апоптоза высокую пролиферативную готовность Т-лимфоцитов. Усиление процессов созревания Т-лимфоцитов сопряжено с более значимым увеличением CD4+ лимфоцитов, что нашло свое отражение в значении ИРИ (табл. 1). CD4+-субпопуляция характеризуется также изменением структурно-функционального потенциала. Так, практически втрое больше, чем в контроле, CD4+CD45RA+-наивных Т-клеток. При этом в циркуляции существенно снижен пул CD4+CD25+Foxp3+-регуляторных лимфоцитов, обеспечивающих супрессию иммунного ответа. Дифференцировка Th0 усилена в сторону Th1, что подтверждается увеличением коэффициента соотношения Th1/Th2 (табл. 1). В гуморальном звене пациентов с обострением РС следует отметить увеличение количества



зрелых В-клеток. При этом статистически достоверно по отношению к контрольным цифрам усилена продукция только IgM, тогда как уровень сывороточных IgA и IgG не изменен. Тем не менее, содержание ЦИК повышено (табл.2). Весьма интересны данные, характеризующие клеточное звено врожденного иммунитета. Так, выявлено увеличение активности фагоцитирующих клеток – нейтрофилы статистически достоверно, в отношении контрольных данных, продуцируют большее количество активных метаболитов кислорода. Еще большее вовлечение в иммунопатогенез РС демонстрируют лимфоидные клетки врожденного иммунного ответа. У больных в период обострения отмечается статистически достоверная активация созревания НК, что документируется практически двукратным их абсолютным увеличением в циркуляции. В сочетании с повышением относительного литического потенциала это приводит к весьма значительному суммарному увеличению цитолитической активности. Изменения цитокинового спектра сыворотки крови проявляются отчетливо выраженной дихотомией – увеличением содержания провоспалительных цитокинов и снижением медиаторов противовоспалительной направленности. Как следствие, коэффициент соотношения основных иммунорегуляторных цитокинов изменен в сторону активации клеточноопосредованных процессов (табл. 3).

В период стойкой клинической ремиссии рассеянного склероза Т-лимфоциты и их активационные потенции не отличаются от показателей практически здоровых, однако при расчете абсолютных значений выявляется снижение общего числа зрелых Т-клеток и угнетение апоптотической готовности. В то же время, реализация процессов апоптоза, оцениваемая в тесте распределения ДНК в культуре клеток, демонстрирует отсутствие выраженных изменений запрограммированной клеточной гибели Т-лимфоцитов в сравнении с контрольными данными. В то же время способность отвечать на стимуляцию митогеном пролиферацией у CD3+-популяции больных РС в период ремиссии остается повышенной. Нарушение созревания Т-клеток в период ремиссии РС сопряжено с уменьшением как CD4+, так и CD8+-субпопуляций, однако их перерас-

пределение не нарушено. Значение ИРИ соответствует контрольным данным, так же, как и количество обеспечивающих антигенспецифическую индукцию иммунного ответа наивных лимфоцитов с фенотипом CD4+CD45RA+. Тем не менее, количество Т-клеток с супрессорной активностью продолжает оставаться ниже, чем в контроле. Показатели, характеризующие трансформацию Th0 в Th1 и Th2, свидетельствуют об увеличении IFN γ +CD4+-Т-клеток, что подтверждает превалирующую настроенность в сторону индукции клеточно-опосредованных иммунных реакций у больных РС даже в период клинической ремиссии (табл. 1). В гуморальном звене адаптивного иммунитета изменений, в сравнении с контрольными данными, не выявляется. Отмечается лишь незначительное увеличение уровня ЦИК, что, видимо, связано с дефектом элиминирующих свойств иммунной системы (табл. 2). Это предположение подтверждается анализом функциональных параметров фагоцитирующих клеток, свидетельствующих о снижении компенсаторных резервов в сравнении с нормативными данными (табл. 3). В то же время в условиях клинической ремиссии спонтанная продукция активных метаболитов кислорода нейтрофилами остается повышенной. Снижение процессов созревания НК в период клинической ремиссии документируется уменьшением количества CD16+-популяции. В результате общий литический потенциал, рассчитанный исходя из количества циркулирующих НК, соответствует нормативным данным, хотя относительная цитолитическая активность НК превышает контрольные цифры. Снижение активности воспалительных процессов в период клинической ремиссии находит свое подтверждение сывороточным содержанием провоспалительного медиатора ФНО- α на уровне контрольных значений, ИЛ-4 определяется в тех же концентрациях, что и в группе сравнения. Однако содержание ИФН- γ даже при клинической ремиссии остается повышенным. Соответственно, соотношение регулирующих направленность иммунных реакций цитокинов изменено и демонстрирует сдвиг в сторону клеточноопосредованных процессов (табл. 3).

Таблица 1

Количественные и функциональные показатели Т-лимфоцитов больных РС при обострении и ремиссии

Показатели	PCO	PCP	Контрольная группа
1	2	3	4
CD3+, %	67,36 \pm 1,10	65,50 \pm 1,55	68,88 \pm 0,38
CD3+, 10 ⁹ /л	**1,91 \pm 0,06	**0,81 \pm 0,03*	1,22 \pm 0,03
CD3+CD25+, %	**2,77 \pm 0,24	2,49 \pm 0,12	2,15 \pm 0,17
CD3+CD25+, 10 ⁹ /л	**0,08 \pm 0,01	0,03 \pm 0,01*	0,04 \pm 0,01
CD3+HLA DR+, %	**9,49 \pm 0,51	7,66 \pm 0,44*	8,04 \pm 0,14
CD3+HLA DR+, 10 ⁹ /л	**0,27 \pm 0,02	**0,10 \pm 0,01*	0,14 \pm 0,01
CD3+CD95+, %	**3,18 \pm 0,24	4,28 \pm 0,72	5,08 \pm 0,22
CD3+CD95+, 10 ⁹ /л	0,09 \pm 0,01	**0,05 \pm 0,01*	0,09 \pm 0,01
Гиподиплоидные МНПК сп, %	**9,89 \pm 0,50	9,50 \pm 2,50	11,12 \pm 0,36
Гиподиплоидные МНПК ФГА, %	**17,70 \pm 0,87	18,50 \pm 4,50	22,64 \pm 0,89



1	2	3	4
Гиподиплоидные МНПК ИС	**1,83±0,06	1,96±0,14	2,04±0,06
РБТЛ сп, имп/мин	209±11	195±5	197±3
РБТЛ ФГА,имп/мин	**16971±932	**14202±852	12581±204
РБТЛ ИС	**72,12±1,97	**73,14±4,91	63,60±0,87
CD4+,%	43,15±1,18	40,88±1,13	41,92±0,35
CD4+, 10 ⁹ /л	**1,23±0,05	**0,50±0,02*	0,74±0,02
CD8+, %	22,28±1,02	23,44±1,06	21,88±0,33
CD8+, 10 ⁹ /л	**0,63±0,03	**0,29±0,02*	0,39±0,01
ИРИ	**2,20±0,15	1,89±0,11*	1,93±0,04
CD4+CD45+RA+, %	**40,9±2,55	22,5±3,11*	29,2±6,1
CD4+CD45+RA+, 10 ⁹ /л	**1,17±0,06	0,29±0,05*	0,4±0,23
CD4+CD25+Foxp3+, %	**0,42±0,02	**0,66±0,03*	1,3± 0,3
CD4+CD25+Foxp3+, 10 ⁹ /л	**0,014±0,002	**0,009±0,004	0,023±0,006
CD4+ IFNγ+ (Th1), %	**5,70±0,24	**4,87±0,16*	3,50±0,04
CD4+ IL4+ (Th2), %	**1,02±0,06	1,49±0,10*	1,52 ±0,02
Th 1 / Th 2 сп., у.е.	**6,16±0,52	**3,41±0,26*	2,32±0,04

Примечание: Статистическая значимость различий p<0,05 между группами обозначена: ** – по отношению к контролю; *— PCO-PCP.

Таблица 2

Показатели гуморального звена больных РС при обострении и ремиссии

Показатели	PCO	PCP	Контрольная группа
CD20+, %	7,36±0,46	6,93±0,52	6,20±0,24
CD20+,10 ⁹ /л	**0,21±0,01	0,09±0,01*	0,11±0,01
IgA г/л	1,79±0,09	1,63±0,08	1,4 ±0,3
IgM г/л	**1,57±0,04	1, 08±0,04*	1,1 ±0,1
IgG г/л	10,82±0,25	10,20±0,28	10,3± 1,3
ЦИК, у.е.	**94,39±4,20	**81,07±3,93*	64,20±1,54

Примечание: Статистическая значимость различий p<0,05 между группами обозначена: ** – по отношению к контролю; *— PCO-PCP.

Таблица 3

Показатели клеточного звена врожденного иммунитета и цитокинового спектра больных РС при обострении и ремиссии

Показатели	PCO	PCP	Контрольная группа
НСТсп.,у.е.	**105,45±7,34	**108,70±7,92	90,12±1,01
НСТ ст., у.е.	**162,64±9,97	**171,00±11,85	193,64±2,03
Кст.	**1,55±0,04	**1,58±0,03	2,15±0,02
CD16+, %	**21,36±2,89	10,57±1,25*	12,12±0,25
CD16+, 10 ⁹ /л	**0,40±0,07	**0,14±0,02*	0,21±0,01
ЦТА, у.е.	**9,65±0,56	**6,59±0,89*	3,54±0,12
ЦТА, 10 ⁹ /л	**3,78±0,72	0,88±0,12*	0,75±0,02
ФНО-α, пг/мл	**9,48±0,96	1,46±0,11*	1,14 ±0,16
ИЛ-4, пг/мл	**0,85±0,36	1,69±0,12*	1,9± 0,2
ИФН- γ, пг/мл	**38,37±16,91	**19,98±8,50	6,2± 3,3
КИФН-γ/ИЛ-4,	**45,14±8,72	**11,75±7,23*	3,3±1,5

Примечание: Статистическая значимость различий p<0,05 между группами обозначена: ** – по отношению к контролю; *— PCO-PCP.



Таким образом, при клинически выраженном течении аутоиммунного процесса регистрируется значимая активация всех составных компонентов врожденного и адаптивного иммунитета. Период клинической ремиссии не сопровождается абсолютной нормализацией параметров функционирования иммунокомпетентных клеток. Полученные данные являются объективным доказательством трансформации защитных потенциалов иммунной системы в повреждающие.

В этой связи представляет несомненный интерес использование патогенетического подхода для интерпретации выявленных изменений применительно к этапам иммуногенеза.

Этап распознавания антигена при аутоиммунном процессе, оцениваемый количеством CD4+CD45RA+ наивных Т-клеток, ответственных за процессы антигенного распознавания, демонстрирует отчетливую активацию в условиях клинического обострения. В период ремиссии процессы антигенного распознавания находятся в пределах контрольной группы практически здоровых. Этап активации ИКК также имеет зависимость от клинических проявлений. Этап пролиферации иммуногенеза при РС демонстрирует усиление вне зависимости от клинических проявлений. Пролиферативная способность клеток адаптивного иммунитета в условиях аутоиммунного процесса не приходит в норму при клинической ремиссии. Данный этап иммуногенеза определяет особенности реагирования иммунной системы, свидетельствуя о постоянном напряжении пролиферативной способности в условиях срыва толерантности и развитии аутоагрессии. Этап дифференцировки ИКК свидетельствует об изменении процессов, его характеризующих, даже при отсутствии выраженных клинических проявлений. Эти изменения проявляются в снижении количества регуляторных клеток, обеспечивающих иммуносупрессивный эффект, преимущественной направ-

ленностью дифференциации в сторону клеточноопосредованных иммунных реакций. В условиях обострения РС эти изменения выражены в существенно большей степени. Итоговый этап реализации всех предшествующих стадий иммуногенеза демонстрирует наличие изменений функционирования клеток-эффекторов даже при клинической ремиссии РС. Этот вывод подтверждается повышенной продукцией активных форм кислорода нейтрофилами, превышающей контрольные значения литической активностью НК, высоким уровнем сывороточного ИФН- γ . Обострение аутоиммунного процесса приводит к дальнейшей активации эффекторных реакций, повышенных в ремиссию, а также к изменениям остальных параметров, а именно гипериммуноглобулинемии, дихотомии цитокинов в пользу провоспалительного ответа.

Заключение

Клиническое обострение РС проявляется на фоне совокупных изменений всех этапов иммуногенеза и характеризуется усилением процессов распознавания и активации, угнетением иммуносупрессии, доминированием пролиферации над апоптотической гибелью Т-лимфоцитов, дифференцировочным дисбалансом, усилением эффекторных реакций. Ремиссия клинической манифестации ассоциирована со стабилизацией процессов распознавания антигена. Однако последующие этапы иммуногенеза не восстанавливаются и проявляются угнетением супрессии, повышением пролиферации Т-клеток, изменениями направленности дифференцировки, высокой эффекторной реакцией клеточного звена врожденного иммунитета. Выявленные изменения иммуногенеза у больных рассеянным склерозом обеспечивают патогенетическую базу эффективности иммунного ответа в отношении собственных антигенов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Leist, T. P. The potential role for cladribine in the treatment of multiple sclerosis: clinical experience and development of an oral tablet formulation / T. P. Leist, P. Vermersch // *Curr Med Res Opin.* - 2007. - №23. - P.2667–2676.
2. Бойко, А. Н. Патогенетическое лечение рассеянного склероза: настоящее и будущее / А. Н. Бойко [и др.] // *Журнал неврологии и психиатрии им. Корсакова.* - 2009. - № 7. - С. 90–99.
3. Маркова Е.А., Сизякина Л.П., Балязин В.А., Гончарова З.А. Взаимосвязь систем врожденного и адаптивного иммунитета при различных клинических вариантах рассеянного склероза / Е.А. Маркова [и др.] // *Российский Аллергологический Журнал.* - 2013. - №2, ч.2. - С.191-192.
4. Пинегин Б.В., Чередеев А.Н., Хаитов Р.М. Оценка иммунной системы человека: сложности и достижения / Б.В.Пинегин [и др.] // *Вестник Российской Академии медицинских наук.* - 1999. - № 5. - С. 11-15.
5. Janssen E., Morbach H., Ullas S., Bannock J. M. Deducator of cytokinesis 8-deficient patients have a breakdown in peripheral B-cell tolerance and defective regulatory T cells/ E. Janssen [et al.] // *Allergy Clin Immunol.* - 2014. - №134. - P.1365-74.
6. Mc Donald W. I., Compston A., Edan G., MD, Goodkin D. Recommended Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: Guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis/ W. I. Mc Donald [et al.] // *AnnNeurol.* - 2001. - №50ю - P.121–127
7. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Ярилин А.А. Руководство по клинической иммунологии. - М.: ГЭОТАР-Медиа. 2009. - 345 с.

ПОСТУПИЛА: 02.03.2016