УДК 616.832-004.2:612.017.1

ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

Ковтун О.П., Невмержицкая К.С., Смолкин А.Д., Молдованов А.В.

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Уральская государственная медицинская академия» Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию

Рассеянный склероз – хроническое демиелинизирующее заболевание нервной системы. Благодаря успехам молекулярной иммунологии выяснено, что в основе патогенеза рассеянного склероза лежит иммунопатологический механизм, опосредованный CD4+ клетками. Понимание этого аспекта современным неврологом-клиницистом позволяет правильно интерпретировать данные иммунного статуса пациента в разные периоды развития заболевания для выбора терапевтической тактики.

Ключевые слова: рассеянный склероз, иммунокомпетентные клетки, цитокины.

IMMUNOLOGICAL DIAGNOSIS OF MULTIPLE SCLEROSIS

Kovtun O.P., Nevmerzhitskaya K.S., Smolkin A.D., Moldovanov A.V.

State educational institution of higher education "Urals State Medical Academy", Federal Agency for Health and Social Development

Multiple sclerosis is a chronic demyelinating disease of the central nervous system. Owing to recent advances in molecular immunology it is clarified that the basis of pathogenesis of this disorder is a mechanism mediated by CD4+cells. Comprehension of this mechanism by clinicians is significant to interpret immunological data in the course of disease for treatment strategies choice.

Keywords: multiple sclerosis, immune cells, cytokines.

Рассеянный склероз (РС) - хроническое прогрессирующее заболевание, характеризующееся многоочаговостью поражения центральной нервной системы (ЦНС), вариабельностью неврологических симптомов, началом болезни у лиц молодого возраста. [14]. Благодаря современным научным исследованиям в настоящее время становится общепринятым мнение, что РС – заболевание с мультифакториальной этиологией [4,6,19]. Выяснено существование наследственной предрасположенности к этому заболеванию, представляющей собой комплекс генов, контролирующих особенности иммунного реагирования и метаболизма в совокупности с вариантами строения белков и липидов мозговой ткани. Провоцирующими и поддерживающими заболевание считаются внешнесредовые факторы, наиболее значимыми из которых являются вирусные инфекции, стресс, географические факторы, некоторые интоксикации [14,21].

Исследования на модели рассеянного склероза экспериментальном аллергическом энцефалите, а так же патоморфологические данные очагов демиелинизации в ЦНС больных позволили объяснить многие аспекты патогенеза РС, а так же обосновать эффективность применения иммуномодулирующей терапии этого заболевания [20].

В основе развития рассеянного склероза лежит аутоиммунный процесс, приводящий к воспалению, демиелинизации, на поздних этапах сменяющейся дегенеративными изменениями нервных волокон[17,19]. Отмечено, что нейродегенерация может протекать и параллельно развитию аутоиммунного воспаления [2,14]. Необходимым условием запуска иммунопатологического процесса является активация аутореактивных Т-лимфоцитов (CD4+) на периферии специфическими антигенами (микроорганизмы, собственные антигены и пр.), которые представляются антиген-презентирующими клетками (АПК) [1,6]. В последнее время большее значение придается дендритным клеткам как антиген-презентирующим и активирующим Т-клетки антигенами путем молекулярной мимикрии [14,21]. Кроме того, в первичной активации CD4+, а так же в их дальнейшей дифференцировке, определяющей направление иммунного ответа, играет роль экспрессия тех или иных цитокинов [5,8].

Цитокины - это низкомолекулярные белки, вырабатываемые иммунокомпетентными клетками, обеспечивающие межклеточные взаимодействия при реализации иммунного ответа. Активированные антигеном, цитокины связываются на клетках-мишенях со своим специфичным рецептором и передают информацию от одной клетки к другой. Сила воздействия цитокина определяется уровнем его выработки, величиной экспрессии рецептора и модулирующим влиянием других цитокинов [4]. Ведущую роль в развитии и регуляции характерного для рассеянного склероза аутоиммунного ответа играют цитокины, вырабатываемые Т-хелперами (Тх) и макрофагами. Цитокины, синтезируемые Тх 1 типа (Тх1), активируют клеточные иммунные реакции и играют роль в запуске патологического процесса при РС [4,8,17,21]. К ним относят интерлейкин 1 (ИЛ-1), ИЛ-2, интерферон-гамма (ИФН-гамма), фактор некроза опухолей (ФНО) и пр. Тх 2 типа (Тх2) продуцируют цитокины, стимулирующие гуморальный иммунитет, и включающие ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-13. Выделяют

клетки субпопуляции Тх0, способные вырабатывать цитокины обоих типов и являющиеся предшественниками Тх1 и Тх2 типов [14]. Дифференцировка активированных Тх0 в определенном направлении определяется средой, создаваемой АПК и другими клетками иммунной системы, способными синтезировать цитокины. Так, дифференцировка Тх0 в Тх1 типа происходит в присутствии ИЛ-12, который регулирует выработку ИФН-гамма, ингибирующего пролиферацию Тх2 клеток. А для Тх 2 типа основным дифференцировочным агентом является ИЛ-4, так же при участии ИЛ-10 и ИФН-бета [4,14]. При рассеянном склерозе имеет место усиленная дифференцировка Тх1 лимфоцитов[14,21].

Активированные Т-клетки сами становятся источниками провоспалительных цитокинов, таких, как ИНФ-гамма, ФНО-альфа, ИЛ-1, и проникают в ЦНС через нарушенный гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) путем адгезии к стенке сосуда, диапедеза и миграции в периваскулярное пространство. Указанные цитокины повышают экспрессию молекул адгезии различных классов, находящихся на стенке эндотелия сосудов ЦНС, а также ухудшают контакты между эндотелиальными клетками, что обеспечивает беспрепятственное проникновение иммунокомпетентных клеток через ГЭБ, где направление их миграции определяется хемокинами [18].

Попадая в ЦНС, сенсибилизированные Т-хелперы повторно активируются аутоантигенами. Антиген-презентирующими клетками на ранних этапах становятся макрофаги. Т-клеточный ответ при РС реализуется на многие белки, которые предложено называть энцефалитогенные пептиды [14]. При определенных условиях (структурные мутации их генов, посттрансляционные изменения) повышается их иммуногенность, что инициирует иммунопатологичесие реакции в ЦНС. Наиболее изученными белками являются модификации основного белка миелина (ОБМ), протеолипидного протеина (ПЛП) и миелин-олигодендроцитарного гликопротеина (МОГ) [6,8]. К претендентам на роль энцефалитогенных пептидов можно отнести миелин-ассоциированный гликопротеин, галактоцереброзиды, олигодендроцитарный специфический протеин и др. Гиперактивация Т-клеток сопровождается снижением их элиминации вследствие ингибирования их апоптоза, имеющего место при РС, что поддержи-

вает хронизацию иммунопатологического процесса[14].

Синтезируемые провоспалительные цитокины в очаге миграции Т-хелперов могут оказывать прямое повреждающее действие на миелин, способствуя его фагоцитозу макрофагами. Но наиболее значимым является привлечение других клеток иммунной системы и микроглии, нарастание воспалительных медиаторов (продуктов перекисного окисления липидов, цитокинов), что, в конечном счете, ведет к вторичному повреждению ГЭБ, увеличению экспрессии молекул адгезии, клеточной инфильтрации ткани. Привлеченные плазматические клетки продуцируют антитела к нейропептидам и липидам, оказывая свое повреждающее действие посредством прямого связывания с антигеном, а так же путем активации различных компонентов комплемента, что приводит к протеолизу белков миелина и олигодендроцитов. Дальнейшее повреждающее действие, наносимое продуктами свободнорадикального окисления, накоплением оксида азота в микроглии, протеолитическими ферментами, носит цитотоксический характер и приводит к дегенерации нервного волокна [2,17].

Несмотря на универсальность развития иммунопатологического процесса с участием аутоактивированных Т-клеток, существует генетически детерминированные различия процесса демиелинизации, различающиеся у индивидов и характеризующиеся преимущественным вовлечением тех или иных звеньев патогенеза. Первый тип демиелинизации носит название макрофаг-ассоциированный, при котором синтезируемые макрофагами и астроцитами провоспалительные цитокины и продукты свободнорадикального окисления являются основными повреждающими факторами. При втором типе, антителоиндуцируемом, важнейшим фактором развития демиелинизации является энцефалитогенный пептид МОГ, анти-МОГ-антитела и активация системы комплемента. Дистальная олигодендроглиопатия - третий тип демиелинизации - характеризуется дистрофией олигодендроцитов и признаками их апоптоза. Самый редкий тип – четвертый, называемый первичная олигодендроцитарная дегенерация, характеризуется гибелью олигодендроцитов неапоптотическим путем, вследствие наследственного метаболического дефекта миелин-образующих клеток [15].

По причинам, не вполне уточненным в настоящее время, после эпизода

воспалительной демиелинизации (дебюта или обострения) наступает стадия ремиссии. Ведущий механизм реализации ремиссии не выяснен, но имеют место следующие процессы. Во-первых, исчезновение провоцирующих факторов обострения способствует снижению первичной системной активации лимфоцитов. Клетки, находящиеся в бляшке РС, в определенные периоды имеют способность синтезировать нейротрофические факторы, участвовать в ремиелинизации и механически отграничивать очаг воспаления. На стадии затухающего обострения повышается системная продукция противовоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-10, трансформирующий ростовой фактор-бета (ТРФ-бета) [14,16].

Для установления достоверного диагноза рассеянного склероза необходим анализ совокупности клинических и анамнестических данных, результатов магнитно-резонансной томографии (МРТ) головного и спинного мозга и нейрофизиологических паттернов [15]. Современные диагностические критерии не подразумевают изолированное исследование иммунологических параметров, поскольку они не являются высокоспецифическими и некоторые из них могут обнаруживаться при других аутоиммунных заболеваниях [13,15]. Однако при уже установленном диагнозе исследование иммунологического фенотипа обусловлено следующими данными:

- Системный анализ иммунных реакций позволяет уточнить степень активности иммунопатологического процесса, верифицировать обострение и ремиссию;
- Адекватный иммунологический мониторинг обеспечивает своевременное выявление иммунологических нарушений, предшествующих клиническим;
- Выявление сопутствующих иммунодефицитных состояний;
- Диагностированная различная экспрессия цитокинов предопределяет эффективность иммуномодулирующей терапии
- Возможность комплексной оценки эффективности патогенетической терапии в совокупности с клиническими и МРТ-критериями.

Наиболее информативными показателями для оценки указанных параметров являются исследование субпопуляций лимфоцитов в периферической крови с измерением их активности, оценка показателей

гуморального иммунитета и определение цитокинового статуса [3,5,8,11,16].

Исследование субпопуляций лимфоцитов проводится с помощью метода проточной цитометрии, непрямой иммунофлюоресценции, лимфотоксического теста. Для выполнения этих методов необходимы моноклональные антитела к дифференцировочным антигенам Т-лимфоцитов. С помощью поверхностных антигенных маркеров можно определить популяцию и субпопуляцию клеток, стадию их дифференцировки и активации. Наиболее доступный метод иммунофлюоресценции основан на способности моноантител фиксироваться на поверхности жизнеспособных клеток и позволяет выявить специфические антигенные детерминанты: CD3+, CD4+, CD8+ и др. Многими авторами отмечено снижение уровня CD3+ (зрелых лимфоцитов) при обострении рассеянного склероза и нормализация их уровня во время ремиссии[12,16]. Но наиболее характерным в период обострения заболевания считается повышение уровня CD4+ и снижение CD8+, а также увеличение показателя, демонстрирующего отношение CD4+/CD8+[16,21]. В последнее время показано увеличение содержания Т-reg – регуляторных клеток, экспрессирующих рецептор CD25 к ИЛ-2, особенно в начале развития заболевания [4,12]. Эти клетки относят к субпопуляции Т-хелперов, они обладают супрессорным влиянием на Тх1, опосредованно подавляя воспалительный ответ при аутоиммунных заболеваниях. Лимфоциты HLA-DR+ так же повышаются, но в большей степени у больных с небольшим стажем болезни. Содержание клеток с фенотипом CD95+, т.е. готовых к апоптозу, снижено [12]. Методом проточной цитометрии при обострении рассеянного склероза обнаруживаются признаки преобладания Тх1 иммунного ответа - увеличено содержание Тх1 клеток, экспрессирующих хемокиновые рецепторы CCR5 и CXCR3, и снижение Тх2 лимфоцитов, продуцирующих ИЛ-4 [21].

Исследование функционального состояния лимфоцитов в острый период болезни характеризуется снижением супрессорной активности и повышением пролиферативной активности в ответ на митогены в тестах бласттрансформации лимфоцитов [16].

Состояние фагоцитарного звена оценивается путем использования теста восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест), основанного на способности восстановления поглощенного фагоцитом растворимого

красителя нитросинего тетразолия в нерастворимый диформазан под влиянием супероксиданиона, образующегося в НАДФ-Н-оксидазной реакции. Фагоцитарная активность нейтрофилов при обострении РС в НСТ-тесте демонстрирует снижение резервного коэффициента, свидетельствующего об угнетении потенциальных ресурсов фагоцитоза в условиях стимуляции внутриклеточного метаболизма при рассеянном склерозе [11].

В дебюте и периоды обострения заболевания выявляется гиперчувствительность лимфоцитов к аутоантигенам мозговой ткани, обнаруживаемая в реакции торможения адгезии лимфоцитов (РТАЛ). РТАЛ основана на прекращении адгезии сенсибилизированных лейкоцитов к пластиковым поверхностям в присутствии специфических антигенов. Индекс адгезии (ИА) рассчитывается как отношение среднего числа прилипших клеток в опытных лунках (содержащих раствор антигена) к таковому в контрольных лунках. Индекс менее 0,7 расценивается как положительная реакция, индекс более 1,33 – как слабоположительная. Наибольшая степень сенсибилизации отмечается к ОБМ, в меньшей степени к белку S-100, галактоцереброзиду [7,11].

Изменение гуморального звена иммунитета имеет следующие характеристики. Содержание CD22+ (В лимфоцитов) может быть снижено или находится в пределах нормы [11,12]. В сыворотке крови наблюдается дисиммуноглобулинемия – снижение содержания IgG, IgA и повышение концентрации IgM [9,11]. Наряду с этими изменениями имеет место увеличение содержания иммунных комплексов, особенно с удлинением времени заболевания. Нарушение В-клеточной толерантности и активацию В-клеток отражают так же олигоклональные Ig и наличие свободных легких цепей Ig в ликворе больных. Выявление олигоклональных групп IgG в ликворе не является специфичным для РС тестом. В то же время, около 5% больных с клинически достоверным РС могут не иметь олигоклональные группы IgG в ликворе, а специфичность олигоклональных Ig может меняться по мере развития заболевания [15,16].

Исследование цитокинового статуса является наиболее информативным методом оценки активности РС [8,14]. Поскольку цитокины являются локальными медиаторами, более целесообразно измерять их уровни в соответствующих тканях или в естественных жидкостях (так, в случае

РС исследуют уровень цитокинов в бляшках или ликворе, при невозможности забора материала в активированных мононуклеарах периферической крови). Анализ экспрессии цитокина проводится на основании содержания матричной РНК методами генной диагностики или по концентрации самого белка путем иммуноферментного анализа.

Еще до возникновения клинического обострения отмечается увеличение продукции ИЛ-12 и ИФН-гамма активированными мононуклеарами периферической крови (МПК), что отражает значимость этих цитокинов в инициальных стадиях запуска иммунопатологического процесса. Затем закономерно увеличивается выработка ФНО [8,16]. В активную стадию обострения присоединяется усиленный синтез других провоспалительных цитокинов – ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-15 [14,21]. Некоторыми авторам показано увеличение содержания ИЛ-2 и ИЛ-6 в сыворотке и ликворе больных [16]. Выход из обострения характеризуется увеличением содержания ИЛ-4, ИЛ-10, ТРФ-бета, хотя уровни провоспалительных цитокинов остаются повышенными по сравнению со здоровыми пациентами [8,10]. Интерфероновый статус также претерпевает значительные изменения в различные периоды заболевания. В период обострения обнаруживается значительное повышение сывороточного интерферона, снижение ИФН-альфа и повышение ИФН-гамма. В дальнейшем, при стабилизации состояния на фоне относительной ригидности напряженности уровня сывороточного интерферона определялось значительное уменьшение степени индукции гамма-интерферона [11].

Таким образом, современный взгляд на иммунопатогенез рассеянного склероза позволяет использовать иммунологические показатели для мониторинга активности заболевания, в том числе при использовании иммуномодулирующей терапии.

Список литературы

1. Бойко А.Н, Фаворова О.О. Рассеянный склероз: молекулярные и клеточные механизмы / А.Н Бойко, О.О. Фаворова // Мол биол.- 1995.- № 29.- С 727—749
2. Бойко А.Н., Петров С.В., Нестерова В.А Механизмы развития нейродегенеративного процесса при рассеянном склерозе - нейропротективное влияние препаратов бета-интерферона сегодня и нейротрофические факторы завтра / А.Н.Бойко, С.В.Петров, В.А Нестерова // Журн неврол и психиат. Приложение «Рассеянный склероз».- 2003.- С.83-90.
3. Бринар В.В., Позер Ч.М. Лабораторные методы в диагностике рассеянного склероза / В.В.Бринар, Ч.М. Позер // Журн неврол и психиат Приложение «Рассеянный склероз».- 2002.- С. 7-14.
4. Гусев Е.И. Рассеянный склероз / Е.И.Гусев, А.Н.Бойко, И.Д. Столяров.- М.:Реал Тайм, 2009.-296с.
5. Гусев Е.И., Беляева И.А., Чехонин В.П. Сравнительный клинико-иммунохимический анализ ремиттирующего и вторично-прогрессирующего течения рассеянного склероза. / Е.И.Гусев, И.А.Беляева, В.П. Чехонин// Журн неврол и психиат.- 2000.- №6.- С. 51-57
6. Завалишин И.А., Захарова М.Н. Рассеянный склероз: современные аспекты этиологии и патогенеза. / И.А.Завалишин, М.Н. Захарова //Журн неврол и психиат.- 2003.-№ 103.-С. 2: 10—17.
7. Карлова И.З. Клинико-иммунологические особенности оптического неврита при рассеянном склерозе: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.- М., 1995.-115 с.
8. Кулакова О.Г.,Бойко А.Н., Сланова А.В.Комплексный анализ функционального состояния иммунной системы у больных рссеянным склерозом на различных стадиях патологического процесса. / О.Г.Кулакова, А.Н.Бойко, А.В Сланова // Иммунология.- 2003.- №2.-С. 80
9. Нероев В. В., Карлова И. З., А. Н. Бойко Клинические особенности течения оптического неврита и изменения локального иммунного ответа у больных рассеянным склерозом / В. В. Нероев И. З. Карлова А. Н. Бойко // Журн неврол и психиат.- 2004.- №9.- С.24-26
10. Нестерова В.А., Бойко А.Н., Сланова А.В. Клинико-иммунологические особенности «мягкого» течения рассеянного склероза. / В.А. Нестерова, А.Н.Бойко, А.В. Сланова // Организация специализированной медицинской помощи больным рассеянным склерозом.- Томск: Полимаг, 2003.- С.84-85.
11. Никифорова И.Г. Особенности взаимосвязи нейроиммунологических нарушений и демиелинизирующего поражения при рассеянном склерозе: дисс…канд. / Никифорова Ирина Григорьевна; Российская академия наук. Институт мозга человека.- СПб., 2003.- 230 с.
12. Орлова Ю. Ю., Алифирова В. М., Чердынцева Н. В. Результаты трехлетнего клинико-иммунологического наблюдения за больными рассеянным склерозом, получающими копаксон / Ю. Ю. Орлова В. М. Алифирова Н. В. Чердынцева // Журн. неврол. и психиат..- 2005.- №5.- С.12-14
13. Пизова Н. В. Дифференциальная диагностика рассеянного склероза и системных васкулитов / Н. В.Пизова // Журн неврол и психиат.- 2004.- №10.- С.27-30
14. Рассеянный склероз и другие демиелинизирующие заболевания / Под ред. Е.И. Гусева, И.А. Завалишина, А.Н. Бойко.- М.:Миклош, 2004.- 540с.
15. Рассеянный склероз: клинические аспекты и спорные вопросы. / Под ред. Томпсона А.Д. ; пер с англ . Н.А.Тотолян.- СПб.:Политехника, 2001.- 235с.
16. Столяров И.Д., Осетрова Б.А. Рассеянный склероз. / И.Д.Столяров, Б.А. Осетрова.- СПб.:Политехника,2002.- 315с.
17. Bruck W. The pathology of multiple sclerosis is the result of focal inflammatory demyelination with axonal damage. // J Neurol.- 2005.-№ 252.- P. 3-9

18. Hemmer B., Cepok S., Zhou D., Sommer N. Multiple sclerosis - a coordinated immune attack across the blood brain barrier. //Curr Neurovasc Res.- 2004.-№ 1.- P. 141-150.
19. Lassmann H. Mechanisms of demyelination and tissue destruction in multiple sclerosis. //Clin Neurol Neurosurg.- 2002.- № 104.-P. 168-171
20. Martin R. Immunological aspects of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis and their application for new therapeutic strategies. // J Neural Transm. Suppl .- 1997.-№ 49.- P. 53—67
21. Matsui M. Multiple sclerosis immunology for clinicians //Neurology Asia.- 2008.-№13.-P. 195 – 198

Невмержицкая Кристина Сергеевна, асс. кафедры детской неврологии и неонатологии ГОУ ВПО УГМА Росздрава, 650013, г. Екатеринбург, ул Репина д. 3, e-mail: nks16@list.ru

Дата поступления статьи: 15.12.2010