

А. Г. Байда<sup>1</sup>, А. С. Федулов<sup>2</sup>, В. В. Смольникова<sup>3</sup>

**Динамика субпопуляций лимфоцитов при проведении лечения препаратом «Лейккладин» у больных рассеянным склерозом**

A. G. Baida<sup>1</sup>, A. S. Fedulau<sup>2</sup>, V. V. Smolnikova<sup>3</sup>

<sup>1</sup>УЗ «9-я городская клиническая больница» г. Минска

<sup>2</sup> УО «Белорусский государственный медицинский университет»

<sup>3</sup> Республиканский центр трансплантологии и клеточных биотехнологий

Байда А.Г. <sup>1</sup>, Федулов А.С. <sup>2</sup>, Смольникова В.В. <sup>3</sup>

**Динамика субпопуляций лимфоцитов при проведении лечения препаратом «Лейккладин» у больных рассеянным склерозом**

УЗ «9-я городская клиническая больница» г. Минска <sup>1</sup>,

УО «Белорусский государственный медицинский университет»<sup>2</sup>,

Республиканский центр трансплантологии и клеточных биотехнологий<sup>3</sup>

Статья посвящена изучению влияния препарата «Лейккладин» на иммунный профиль больных рассеянным склерозом. При оценке результатов лечения было выявлено увеличение количества CD8+ (Т - супрессоров), возросло количество незрелых тимоцитов (CD4+CD8+), увеличилось число активированных Т-лимфоцитов (CD3+HLA - DR+), снизилось количество В-лимфоцитов (CD19+). Полученные результаты согласуются с ранее опубликованными данными по влиянию кладрибина на состав лимфоцитов крови, и подтверждают отсутствие продолжительной и глубокой иммуносупрессии при применении препарата «Лейккладин».

Ключевые слова: рассеянный склероз, препарат «Лейккладин», иммунный профиль.

Baida A.G.<sup>1</sup>, Fedulau A.S.<sup>2</sup>, Smolnikova V.V.<sup>3</sup>

**The dynamics of lymphocyte subpopulations of after treatment with «Leicladin» to patients with multiple sclerosis.**

The article is dedicated to the study of the influence of «Leicladin» on the immune profile of multiple sclerosis patients. The analysis of results of treatment showed the increase of CD8+ (T - suppressors), the number of immature thymocytes (CD4+CD8+) and the number of activated T - lymphocytes (CD3+HLA - DR+), the decrease of B - lymphocytes (CD19+). Our results prove the previously received results concerning the effect of «Cladribine» on lymphocyte subpopulations and confirm the absence of profound and longitudinal immunosuppression on after the treatment with «Leicladin».

Key words: a multiple sclerosis, a preparation «Leicladin».

Рассеянный склероз (РС) – это хроническое прогрессирующее воспалительно-дегенеративное заболевание центральной нервной системы, характеризующееся образованием множественных очагов демиелинизации в центральной нервной системе. В настоящее время общепринятой считается точка зрения на РС как на мультифакториальное заболевание, имеющее полигенетическую природу, развивающееся в результате влияния внешних повреждающих факторов у лиц с наследственной предрасположенностью [5].

Многолетние исследования РС свидетельствуют на сегодняшний день о непрерывности течения при нем иммунопатологического процесса с постоянным повышением активности мононуклеарной системы в условиях стойкого повышения проницаемости гематоэнцефалического барьера. Спектр клеточных и гуморальных факторов, участвующих в осуществлении иммунопатологического процесса при этом заболевании, очень широк и включает аутореактивные клоны антигенпрезентирующих клеток, все виды глиальных и эндотелиальных клеток, систему про- и противовоспалительных цитокинов, адгезивных молекул, обеспечивающих процессы миграции и межклеточного взаимодействия, иммуноглобулины и иммунные комплексы.

Лечение РС остается одной из наиболее серьезных проблем современной неврологии. Если ранее терапевтическая помощь этим пациентам сводилась лишь к попыткам купирования обострений и проведению симптоматической терапии, то в настоящее время появились пути воздействия на течение болезни, что стало возможным благодаря разработке современных подходов, опирающихся на знаниях иммунопатогенеза РС [3]. В настоящее время разработан ряд лекарственных средств (бетаферон, ребиф, копаксон), которые, вызывая иммуномодулирующий эффект, способствуют уменьшению количества обострений у больных РС, замедлению прогрессирования заболевания и улучшению качества жизни больных.

Препарат «Лейклагин», разработанный в Республике Беларусь, относится к классу нуклеозидов. Он является аналогом 2 - дезоксиаденозина, входящего в состав ДНК, у которого атом водорода во 2 - й позиции пуринового гетероцикла замещен на атом хлора. «Лейклагин» проникает через клеточную мембрану и фосфорилируется клеточными киназами до 5' - трифосфата, который и является его биологически активной формой. Он в определенной мере способен встраиваться вместо дезоксиаденозин - 5' - монофосфата в растущую цепь ДНК. При этом после последовательного встраивания двух и более молекул аналога, удлинение цепи ДНК прекращается.

Цель настоящего исследования - изучение влияния препарата «Лейклагин» на иммунный профиль пациентов РС.

## **Материал и методы исследования**

Оценка иммунного профиля проведена у 34 больных РС (17 пациентов основной группы и 17 пациентов контрольной группы). Больные РС основной группы получали «Лейклагин» в виде внутривенной инфузии на 0.9% - 200.0 мл изотонического раствора NaCl из расчета 0.1 мг/ кг. массы тела в сутки, ежедневно на протяжении 5 дней. Повторные курсы лечения назначались на 28 день от начала предыдущего цикла (всего 5 курсов терапии). Больные РС контрольной группы получали симптоматическую терапию.

Исследование иммунологических показателей у больных РС проводили на лазерном проточном цитофлуориметре FACScan фирмы Becton Dickinson с аргоновым лазером 488 нм в регионе CD45+ клеток. Анализ проводили методом прямого иммунофлуоресцентного окрашивания моноклональными антителами (Becton Dickinson) к соответствующим антигенам.

Для статистической обработки данных с использованием приведенных выше критериев использовался пакет прикладных программ STATISTICA - 6.0 в среде WINDOWS XP. Оценка результатов проводилась исходя из средних значений с учетом стандартного отклонения, стандартной ошибки. Для оценки динамики изменений применялись методы непараметрической статистики - критерий Вилконсона и U - критерий Манна - Уитни.

## **Результаты исследования**

При сравнении показателей в группе пациентов, получавших «Лейклагин», с контрольной группой больных РС до начала терапии достоверных различий в популяциях Т - лимфоцитов периферической крови не было.

После проведения курса лечения в контрольной группе пациентов не выявлено достоверных изменений в изученных популяциях, кроме повышения относительного количества CD 19+ клеток (В - лимфоцитов) с  $9,31 \pm 2,16\%$  до лечения до  $12,73 \pm 3,35\%$  после лечения ( $p = 0,03$ ).

Оценка иммунного профиля, проведенная у больных РС основной группы, выявила следующее: препарат «Лейклагин» повлиял на супрессорную функцию Т - лимфоцитов (увеличилось количество CD8+ клеток с  $30,75 \pm 5,5\%$  до  $33,41 \pm 11,02\%$ ,  $p = 0,31$ ), возросло количество незрелых тимоцитов (CD4+CD8+ клеток с  $2,36 \pm 1,8\%$  до  $2,12 \pm 1,3\%$ ,  $p = 0,85$ ), увеличилось число активированных Т - лимфоцитов (CD3+HLA-DR+ клеток с  $9,35 \pm 2,45\%$  до  $10,47 \pm 1,45\%$ ,  $p = 0,48$ ), снизилось относительное количество В - лимфоцитов (CD19+ клеток с  $9,54 \pm 3,46\%$  до  $8,18 \pm 1,99\%$ ,  $p = 0,58$ ).

Сравнение субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови группы больных РС, получавших симптоматическую терапию, с группой больных, получавших «Лейклагин», выявило достоверные различия в составе В - лимфоцитов (CD19+ клеток) и Т - супрессоров (CD8+ клеток), незрелых тимоцитов (CD4+CD8+), а также активированных Т - лимфоцитов (CD3+HLA - DR+ клеток) (табл. 1).

**Таблица 1 - Сравнение субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови больных рассеянным склерозом в основной и контрольной группах после курсов терапии (в %)**

Популяции лимфоцитов	контрольная группа, n = 17	основная группа, n = 17	p
CD3+	71,73±7,01	83,22±8,64	0,93
CD19+	12,73±3,35	8,18 ± 1,99	0,02*
CD+4	42,82±3,06	40,67±12,02	0,48
CD8+	25,91±4,5	33,41 ± 11,02	0,04*
CD4+CD8+	1,65±0,69	1,13±0,51	0,02*
CD16+56+	14,07±3,35	9,75±5,58	0,1
CD3+HLA - DR+	9,35±2,45	10,47 ± 1,45	0,02*
CD3+CD16+CD56+	8,73±2,13	9,88±6,45	0,58
CD4+CD8+	1,82±0,28	2,12 ± 1,3	0,51

Примечание: \*- различие статистически значимо

### **Обсуждение и выводы**

На современном этапе патогенез РС рассматривается следующим образом: потенциально агрессивные Т - лимфоциты, специфичные к основным белкам миелина и другим аутоантигенам ЦНС, изначально существуют в иммунной системе человека. В дебюте заболевания происходит активация этих клеток. К специфическим механизмам активации относятся молекулярная мимикрия, двойственная экспрессия Т - клеточных рецепторов (ТКР) и стимуляция Т - клеток суперантигеном. Активированные Т - клетки проникают через ГЭБ в ЦНС. Первыми клетками проникающими в ЦНС, являются CD4+ Т - клетки, которые узнают свои антигены, расположенные на молекулах главного комплекса гистосовместимости класса II макрофагов и клеток микроглии [5]. Проникшие в нервную систему активированные Т - клетки, вторично активированные макрофаги и клетки микроглии выделяют провоспалительные цитокины: интерферон-гамма (ИФН -  $\gamma$ ), лимфотоксин (ЛТ), фактор некроза опухоли -  $\alpha$  (ФНО -  $\alpha$ ), что ведет к развитию ограниченной воспалительной реакции. Изменяется проницаемость ГЭБ и в результате открывается доступ вторичного потока моноцитов и других клеток воспаления. В очагах воспаления начинают продуцироваться миелиновые антитела, происходит процесс

демиелинизации и гибель олигодендроцитов, который прогрессирует вследствие активации системы комплемента и макрофагов/макроглии. Часть медиаторов и цитотоксических факторов выделяется активированными клетками глии, дополнительно повреждают миелин и олигодендроциты. Стимулируются клетки воспаления, усугубляющие процесс демиелинизации [4, 5]. При РС обнаружены изменения в продукции нескольких цитокинов, секреция которых характерна для определенных субпопуляций лимфоцитов, в частности различных типов Т - хелперов. В связи с этим патогенез РС часто рассматривают с точки зрения Т - хелперов 1 - го (Тх1) и 2 - го (Тх2) типов в запуске и поддержании иммунного ответа. При несостоятельности Тх1 - ответа происходит распространения повреждений и присоединения Тх2 - ответа. В свою очередь Тх2 - клетки способны ограничить неадекватный Тх1 - ответ и с этих позиций являются частью супрессорного механизма, направленного против чрезмерного Тх1 - ответа. Т - хелперы обоих типов продуцируют определенные цитокины: Тх1 - ИФН -  $\gamma$ , интерлейкин - 1 $\beta$  (ИЛ - 1 $\beta$ ), ИЛ - 2, ФНО -  $\alpha$ ; Тх2 - ИЛ - 4, ИЛ - 5, ИЛ - 6, ИЛ - 10. У больных РС обнаружено преобладание Тх1 - иммунного ответа [9].

В настоящее время фенотипирование лимфоцитов имеет диагностическое значение при первичных и приобретенных иммунодефицитах, аутоиммунных заболеваниях. CD4+ - корцепторная структура Т- клеточного рецептора, представлена на Т - хелперах и участвует в распознавании антигена в контексте с молекулами главного комплекса гистосовместимости II класса. CD8+ - также корцепторная структура Т - клеточного рецептора, представлена на цитотоксических Т - клетках и участвует в распознавании антигена в контексте с молекулами главного комплекса гистосовместимости I класса. НК - клетки представляют собой особую популяцию больших гранулярных лимфоцитов. Эти клетки способны лизировать клетки - мишени, инфицированные вирусами и другими внутриклеточными агентами, мутировавшие опухолевые клетки, а также любые другие клетки аллогенного или ксеногенного происхождения. Литическая активность НК - клеток проявляется при первичном контакте без предварительной сенсibilизации, в отличие от Т - клеток. При фенотипическом анализе НК - клеток выделяют CD3+CD16+CD56+ клетки. В - клетки являются продуцентами антител. На поверхности В - лимфоцита расположены антитела определенной специфичности, которые функционируют как В - клеточный рецептор. Эти антитела называют поверхностными или мембранными иммуноглобулинами.

Преобладающей формой мембранных иммуноглобулинов является IgM, который присутствует на поверхности всех зрелых В - лимфоцитов, не контактировавших с антигенами. В - клеточный рецептор кроме иммуноглобулина содержит дополнительные молекулы, не связанные с распознаванием, но необходимые для передачи сигнала. Среди них CD19+, CD21+, которые формируют корцепторный комплекс вместе с CD81+. Кроме молекул рецепторного и

корцепторного комплекса на поверхности В - клеток экспрессируются молекулы гистосовместимости II класса HLA - DR. HLA - DR - антигены могут экспрессироваться на всех активированных иммунокомпетентных клетках. HLA - DR - антигены встречаются и затем связываются с пептидом экзогенного происхождения, что ведет к формированию популяции Th1 - и Th2 - клеток. Помимо регуляции иммунного ответа система HLA обеспечивает также и такой «терминальный» этап регуляции этой реакции как апоптоз различных типов антигенпредставляющих клеток (АПК). Роль антигенов HLA - DR не ограничивается регуляцией апоптоза «профессиональных» АПК. Они принимают также непосредственное участие и в апоптозе В - лимфоцитов. Возрастание экспрессии молекул HLA-DR на клеточных мембранах является одним из механизмов апоптоза, особенно в отношении лимфоцитов, утративших способность к экспрессии Fas - антигена [10].

При ремитирующем РС снижено число Т - лимфоцитов CD3+, Т - супрессоров CD8+; повышено количество CD25+ клеток, несущих рецептор к ИЛ - 2 и CD95+ клеток, несущих рецептор сигналов к развитию апоптоза. Прогрессирующий тип течения РС характеризуется более выраженным снижением содержания субпопуляций лимфоцитов: на фоне абсолютной лейко - и лимфопении снижено количество Т - лимфоцитов CD3+, Т - хелперов CD4+, Т - супрессоров CD8+. При этом в отличие от ремитирующего РС, при прогрессивном течении не обнаружено повышения содержания CD25+, а также не изменяется количество CD95+ клеток. Можно предположить, что при прогрессивном течении происходит срыв компенсаторных реакций иммунной системы приводящей к нарастающему дефициту всех субпопуляций Т - лимфоцитов [2].

Во время обострения заболевания обнаруживается снижение Т - лимфоцитов CD3+ и CD8+ при нормальном уровне CD22+ [8]. Другими исследователями также было выявлено достоверное снижение популяции зрелых Т - лимфоцитов (CD3+), цитотоксических лимфоцитов, экспрессирующих маркер готовности к апоптозу (CD8+CD95+), при этом процентное содержание CD8+ клеток не отличалось от нормы. В периферической крови больных РС было отмечено достоверное повышение процента лимфоцитов, экспрессирующих рецептор к ИЛ - 4 (CD124+), отмечена тенденция к повышению количества В - лимфоцитов (CD19+) [6].

В проведенном нами исследовании показано, что при применении препарата «Лейкладин» увеличилось количество CD8+ (Т - супрессоров), возросло количество незрелых тимоцитов (CD4+CD8+), снизилось количество В - лимфоцитов (CD19+), увеличилось число активированных Т - лимфоцитов (CD3+HLA - DR+). Состояние иммунной системы пациентов с РС основной группы в свою очередь обусловило и клиническую стабилизацию в неврологическом статусе в период наблюдения один год [1].

Основной мишенью терапевтических опций при рассеянном склерозе является воздействие на иммунную систему как по неспецифическому пути (системная иммуносупрессия при использовании цитотоксических препаратов), так и при помощи иммуномодуляции с целью подавления воспалительного процесса, который приводит к демиелинизации.

Клинические исследования препарата «Кладрибин» (аналога «Лейкладина») начаты в 1994 году Sipe J.C., далее продолжались Buetler E. (1996год) и Romine J.S. (1999год). Приведенные ими данные показали определенную эффективность кладрибина в улучшении течения как прогрессирующего, так и рецидивирующего РС. Авторы отметили улучшение неврологического статуса больных, а также значительное снижение частоты рецидивов по сравнению с группой, получавшей плацебо [11, 12, 13].

Leist T. P., Vermersch P. проанализировали результаты трех крупных двойных слепых плацебо - контролируемых исследований с парентеральным применением «кладрибина», в которых участвовали 262 пациента с рецидивирующим или прогрессирующим вариантами клинического течения РС. Пациенты получали кумулятивную дозу кладрибина 0,7 - 2,8 мг/кг на протяжении 4 - 6 месяцев, после чего в течение 6 - 12 месяцев за ними осуществлялся врачебный контроль. Были получены следующие результаты: 1) уменьшение количества и объема участков повышенного накопления гадолиния на T<sub>1</sub> - взвешенных изображениях; 2) уменьшение объема поражений на T<sub>2</sub> - взвешенных изображениях; 3) снижение частоты обострений; 4) снижение скорости прогрессирования заболевания [14]. В настоящее время начато клиническое исследование эффективности и безопасности таблетированной формы кладрибина при рецидивирующем течении РС. В исследовании CLARITY (кладрибин для перорального приема в таблетках для лечения РС) принимают участие 1200 пациентов с ремитирующей формой РС. Исследование с длительностью фазы лечения 2 года имеет своей целью изучение влияния лечения «кладрибина» на частоту клинических обострений, нарастание степени инвалидизации и количество очагов на МРТ. Разрабатываются структурные аналоги кладрибина на основе арабинозы, которые в культурах мононуклеарных клеток крови больных РС оказывают цитотоксическое действие на активированные фитогемагглютинином мононуклеарные клетки (в основном на T - лимфоциты) [7].

Данные проведенного нами исследования по оценке ближайших результатов лечения больных РС препаратом «Лейкладин» позволяют сделать следующие **выводы:**

1. При динамическом наблюдении субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови больных РС основной группы после терапии препаратом «Лейкладин» было выявлено увеличение количества CD8<sup>+</sup> (T - супрессоров), возросло количество незрелых тимоцитов (CD4+CD8<sup>+</sup>), снизилось количество В - лимфоцитов (CD19<sup>+</sup>) и увеличилось число

активированных Т - лимфоцитов (CD3+HLA - DR+), что является одним из механизмов апоптоза, особенно в отношении лимфоцитов, утративших способность к экспрессии Fas - антигена.

2. Сравнение субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови группы больных РС, получавших стандартную терапию, с группой больных, получавших «Лейкладин», выявило достоверные различия в составе В - лимфоцитов и Т - супрессоров, а также CD3+HLA - DR+ лимфоцитов.

3. Полученные результаты согласуются с ранее опубликованными данными по влиянию аналога «Лейкладина» на состав лимфоцитов крови, и подтверждают отсутствие продолжительной и глубокой иммуносупрессии, чреватой серьезными инфекционными осложнениями, при применении этого препарата.

### **Литература**

1. *Байда, А. Г.* Отдалённые результаты лечения препаратом «Лейкладин» у больных рассеянным склерозом / А. Г. Байда, А. С. Федулов // Неврология и нейрохирургия. 2010. № 4. С. 113–124.
2. *Бисага, Г. Н.* Иммунопатогенетические различия ремитирующего и прогрессивного рассеянного склероза / Г. Н. Бисага [и др.] // Иммунология. 2000. № 3. С. 41–43.
3. *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.
4. *Гусев, Е. И.* Сравнительный клинико-иммунологический анализ вторично-прогрессирующего рассеянного склероза / Е. И. Гусев // Журнал неврологии и психиатрии им. Корсакова. 2000. № 6. С. 51–57.
5. *Гусев, Е. И.* Рассеянный склероз и другие демиелинизирующие заболевания / Е. И. Гусев, И. А. Завалишин, А. Н. Бойко. М: Миклош., 2004. 540 с.
6. *Калашникова, А. А.* Особенности субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови больных рассеянным склерозом / А. А. Калашникова [и др.] // Неврология, иммунология: сб. науч. трудов X науч.-практ. конф. неврологов. СПб., 2001. С. 123.
7. *Константинова, И. Д.* Оценка терапевтического потенциала новых структурных аналогов кладрибина в культурах мононуклеарных клеток крови больных рассеянным склерозом / И. Д. Константинова, О. Г. Кулакова, И. С. Музыка // Нейроиммунология. 2009. Т. VII, № 1. С. 51.

8. Никифорова, И. Г. Иммунологические исследования в диагностике рассеянного склероза / И. Г. Никифорова // Неврологический журнал. 2003. Т. 8, № 5. С. 9–14.
9. Одинак, М. М. Иммуногенетическая рестрикция цитокинов при рассеянном склерозе / М. М. Одинак [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии им. Корсакова. 2001. № 9. С. 39–44.
10. Ярилин, А. А. Основы иммунологии / А. А. Ярилин. М.: «Медицина», 1999.
11. Beutler, E. The treatment of chronic progressive multiple sclerosis with cladribine / E. Beutler [et al.] // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93, № 4. P. 1716–1720.
12. Rice, G. P. Cladribine and progressive MS: clinical and MRI outcomes of a multicenter controlled trial. Cladribine MRI study group / G. P. Rice, M. Filippi, G. Comi // Neurology. 2000. Vol. 54, № 5. P. 1145–1155.
13. Langtry, H. D. Cladribine: a review of its use in multiple sclerosis / H. D. Langtry, H. M. Lamb // BioDrugs. 1998; 9: 419–433.
14. 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: 2667–2676.