

*На правах рукописи*

**Сурсякова Надежда Владимировна**

**ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В-ЛИМФОЦИТОВ И  
Т-ХЕЛПЕРОВ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ IL-17 (ТН17),  
ПРИ РАССЕЯННОМ СКЛЕРОЗЕ**

3.1.24. Неврология (медицинские науки)

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Пермь, 2022

Работа выполнена на кафедре неврологии и медицинской генетики в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации (и.о ректора – д.м.н., профессор Н.В Минаева).

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор, профессор  
кафедры неврологии и медицинской генетики  
ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский  
университет имени акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России,  
г. Пермь

**Байдина Татьяна Витальевна**

доктор биологических наук,  
ведущий научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции  
ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов»  
УрО РАН, г. Пермь

**Куклина Елена Михайловна**

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор,  
профессор кафедры неврологии с курсами нейрохирургии  
и медицинской генетики ГБОУ ВПО  
«Башкирский государственный медицинский университет»  
Минздрава России, г. Уфа

**Бахтиярова Клара Закиевна**

доктор медицинских наук, профессор, заведующая  
кафедрой неврологии и нейрохирургии с курсом ДПО  
ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский  
университет» Минздрава России. г. Барнаул.

**Смагина Инна Вадимовна**

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Томск. Московский тракт, 2

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 года в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 21.2.052.01 при ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 614990, г. Пермь, ул. Петропавловская, 26.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации (614990 г. Пермь, ул. Петропавловская, 26) и на сайте [www.psmu.ru](http://www.psmu.ru), [www.minobrнауки.gov.ru](http://www.minobrнауки.gov.ru).

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор медицинских наук, доцент

**Шулятникова Оксана Александровна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования

Рассеянный склероз (РС) - одно из наиболее социально значимых заболеваний нервной системы. Актуальность исследований, направленных на разработку методов борьбы с РС, усиливается ростом заболеваемости РС в Пермском крае и в стране в целом. Патогенез РС в основном изучен, но понимание основных механизмов его развития не привело к созданию достаточно эффективных и безопасных методов лечения. Это диктует необходимость углубленного изучения отдельных этапов его патогенеза для определения новых мишеней терапии.

Ведущую роль в патогенезе РС играет Т-клеточное звено иммунитета, в первую очередь – аутореактивные Т-хелперы (Th), индуцирующие воспалительные процессы в центральной нервной системе (ЦНС) за счет продукции провоспалительных цитокинов. Ключевым игроком в этих процессах выступает субпопуляция Т-хелперов, продуцирующих IL-17 (Th17), что подтверждается многочисленными исследованиями *in vivo* и *in vitro*: уровень IL-17 повышен как у животных с экспериментальными аутоиммунными энцефаломиелимитами (Experimental Autoimmune Encephalomyelites, EAE, модель РС у животных), так и у пациентов с РС, и коррелирует с тяжестью заболевания, тогда как дефицит IL-17 в модели EAE, ассоциирован с устойчивостью к развитию патологии. Эти данные позволили рассматривать клетки, продуцирующие IL-17, и IL-17, как многообещающую мишень для лечения РС. Функционирование клеток Th17 связано с другой Th-хелперной субпопуляцией – регуляторными Т-лимфоцитами (Treg), продуцирующими противовоспалительные цитокины и подавляющими развитие нейровоспаления при РС. Обе субпопуляции развиваются из общего Т-клеточного предшественника, и конечный результат зависит не столько от содержания и активности отдельных субпопуляций Th17 и Treg, сколько от их баланса.

Другим важнейшим звеном патогенеза РС являются В-лимфоциты, которые выявляются в значительных количествах в мозге пациентов с РС и способны формировать в ЦНС фолликулоподобные структуры, аналогичные зародышевым центрам вторичных лимфоидных органов. Истощение популяции В-лимфоцитов снижает выраженность заболевания как в модели EAE, так и у пациентов с РС, и является одной из стратегий лечения данной патологии. Роль В-клеток в развитии РС связывают не столько с продукцией аутоантител, сколько с альтернативными функциями этих клеток – презентацией антигенов (в том числе – аутоантигенов) Т-лимфоцитам и продукцией провоспалительных цитокинов.

За счет реализации альтернативных функций В-лимфоциты могут изменять микроокружение и промотировать воспаление в ЦНС.

Ряд данных литературы свидетельствует о том, что между популяцией Th17 и В-лимфоцитами существует тесная взаимосвязь. Клетки Th17 вносят существенный вклад в развитие и регуляцию В-лимфоцитов, а В-лимфоциты играют важную роль в дифференцировке и активации Th17. В условиях, имитирующих интенсивный воспалительный процесс, В-лимфоциты способны репрограммировать регуляторные Т-клетки в Th17. У В-лимфоцитов и Th17 есть общий эндогенный активатор: показано, что фактор активации В-лимфоцитов (B cell activating factor, BAFF) участвует и в стимуляции Th17. Недавними исследованиями механизмов противовирусного иммунитета показана способность В-лимфоцитов синтезировать ключевой для популяции Th17 цитокин IL-17.

#### **Степень разработанности темы исследования:**

Основная часть перечисленных выше данных получена или на моделях, не связанных с аутоиммунитетом, или на животных с ЕАЕ. Для пациентов с РС связь между В-лимфоцитами и Th17 требует детального исследования и косвенно подтверждается тем фактом, что терапия РС, основанная на истощении популяции CD20<sup>+</sup>В-лимфоцитов, сопровождается снижением уровня Th17 и соответствующего цитокина, IL-17, в периферической крови. Оценка взаимодействия Th17 и В-лимфоцитов у пациентов с РС важна для лучшего понимания механизмов патогенеза данного заболевания и имеет большую клиническую значимость, поскольку данные лимфоцитарные субпопуляции (В-лимфоциты) в настоящее время используются или рассматриваются в перспективе (Th17) как терапевтические мишени в лечении РС.

**Цель исследования:** исследовать механизмы взаимодействия В-лимфоцитов и Т-хелперов (Th17), продуцирующих IL-17, при рассеянном склерозе.

#### **Задачи исследования**

1. Определить *ex vivo* уровень факторов, характеризующих активность В-лимфоцитов и Т-хелперных субпопуляций Th17/Treg, в периферической крови пациентов с РС и оценить связь этих показателей между собой, а также с клиническим состоянием пациентов.

2. Оценить влияние некоторых препаратов, изменяющих течение рассеянного склероза (ПИТРС): (интерферон-β, глатирамера ацетат, натализумаб) на уровень факторов, характеризующих активность В-лимфоцитов и клеток Th17/Treg.

3. Исследовать *in vitro* роль В-зависимой презентации антигена в дифференцировке наивных Т-клеток в Th17/Treg у пациентов с РС.

4. Оценить собственную продукцию IL-17 В-лимфоцитами пациентов с РС.

#### **Научная новизна исследования**

Все представленные в работе данные по взаимодействию и взаимной регуляции В-лимфоцитов и провоспалительной Т-хелперной субпопуляции Th17 при РС получены впервые. В частности, впервые показан вклад антигенпрезентирующей активности В-клеток пациентов с РС в дифференцировку Th17, а способность В-лимфоцитов продуцировать провоспалительный цитокин IL-17 выявлена впервые не только для РС, но и в целом для аутоиммунной патологии. Новыми являются данные по влиянию ПИТРС на содержание В-клеточного эндогенного активатора BAFF в сыворотке крови пациентов с РС. Связь уровня ключевого хемокина для наивных В-лимфоцитов CXCL-13 в периферической крови с функциональным состоянием пациентов с РС также была показана впервые. Кроме того, выявлено достоверно высокое содержание IL-17 у пациентов с баллом по EDSS с последующим снижением при прогрессии заболевания, и наоборот, увеличение уровня CXCL-13 при повышении EDSS.

#### **Теоретическая значимость работы**

Выявленные в работе новые данные позволяют расширить теоретические знания по взаимодействию и регуляции В-лимфоцитов и Th17 при РС. Обозначена антигенпрезентирующая активность В-клеток пациентов с РС в дифференцировке Th17, а так же способность В-лимфоцитов продуцировать провоспалительный цитокин IL-17. Кроме того были установлены новые связи между цитокинами CXCL-13, BAFF, IL-10, IL-17. Полученные данные увеличивают познания о патогенезе РС.

#### **Практическая значимость работы**

Обе лимфоцитарные популяции, находящиеся в фокусе настоящей работы, В-лимфоциты и Th17, играют ключевую роль в патогенезе РС, и, как следствие, являются (В-клетки) или рассматриваются в перспективе (Th17) как терапевтические мишени для данного заболевания. Представленные в работе данные по взаимодействию и взаимной позитивной регуляции В-лимфоцитов и Th17 при РС позволяют объяснить имеющиеся на сегодняшний день результаты терапии с использованием моноклональных антител (например, снижение уровня IL-17 на фоне истощения популяции В-лимфоцитов ритуксимабом), а также прогнозировать результаты такой терапии, что необходимо для ее корректного и эффективного применения, для снижения рисков нежелательных последствий (для принятия решения о целесообразности такой терапии).

Выявленная в работе связь клинического и функционального состояния больных РС с содержанием в периферической крови ключевого В-клеточного хемокина CXCL-13 позволяет говорить о диагностическом или прогностическом потенциале данного показателя.

Причем, в соответствии с данными о взаимодействии В-лимфоцитов и Th17 при РС, содержание CXCL-13 в крови может отражать не только уровень миграции В-лимфоцитов в ЦНС, но и уровень В-зависимой дифференцировки провоспалительной Т-хелперной популяции Th17.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. Уровень факторов, характеризующих активность Т-хелперных субпопуляций Th17/Treg и В-лимфоцитов, в периферической крови существенно изменяется при РС, и эти изменения взаимосвязаны. В частности, содержание провоспалительного цитокина IL-17 повышено на ранних этапах заболевания до достижения EDSS 2 баллов, а затем последовательно снижается. Уровень противовоспалительного цитокина IL-10 в сыворотке пациентов с РС, напротив, снижается по сравнению со здоровыми донорами, сдвигая баланс Th17/Treg в направлении провоспалительной субпопуляции Th17. Содержание ключевого В-клеточного хемокина CXCL-13 ниже такового у контрольной группы, но при этом имеет прямую корреляционную связь с клиническими и функциональными показателями пациентов с РС. Концентрации общего IgG и эндогенного активатора В-клеточной дифференцировки BAFF у пациентов с РС сопоставимы с соответствующими показателями у здоровых доноров, однако высокий уровень IL-17 ассоциирован с повышенной концентрацией BAFF.

2. Исследования *in vitro* выявили возможные механизмы участия В-лимфоцитов в активации Т-зависимых реакций при РС, ассоциированные с реализацией альтернативных (не связанных с продукцией антител) функций В-клеток – презентацией антигена Т-лимфоцитам и собственной продукцией цитокинов. Во-первых, у пациентов с РС В-зависимая презентация экзоантигена более эффективна в индукции пролиферативного ответа Т-лимфоцитов в сопоставлении с контрольной группой. Во-вторых, В-зависимая презентация аутоантигена (MOG) у пациентов с РС, в отличие от здоровых доноров, индуцирует преимущественное развитие наивных Т-лимфоцитов в Th17, но не влияет на дифференцировку Treg, сдвигая баланс Th17/Treg в направлении Th17 и внося вклад в продукцию IL-17 при РС. В-третьих, В-лимфоциты способны сами продуцировать IL-17, причем В-клетки пациентов с РС делают это значительно более эффективно, что также вносит вклад в общую продукцию данного цитокина при РС.

3. Терапия РС снижает содержание провоспалительного цитокина IL-17 и не оказывает влияния на противовоспалительный цитокин IL-10, а также на факторы, участвующие в развитии В-клеток. В большей степени на провоспалительные цитокины влияет терапия Натализумабом, относящаяся ко второй линии терапии.

## Методология и методы исследования

Общая совокупность обследуемых составила 81 человек, из них 68 - пациенты с диагнозом РС и 13 – здоровые доноры. Для исследования был использован дизайн открытого поперечного контролируемого исследования. Критериями включения в основную группу были: возраст 18 - 60 лет, ремиттирующий-рецидивирующий тип течения РС, отсутствие обострения РС в период исследования и за 30 дней до него, достоверный диагноз РС соответственно критериям McDonald (2010).

Критериями исключения были: возраст моложе 18 и старше 60 лет, первично-прогрессирующий и вторично-прогрессирующий тип РС, установленная беременность на момент исследования, сопутствующие аутоиммунные, онкологические и тяжелые соматические заболевания, острые воспалительные заболевания или обострение РС на момент исследования, прием глюкокортикоидной терапии менее чем за 30 дней до исследования.

Клиническое обследование пациентов включало сбор данных о длительности заболевания, частоте обострений, симптомов в дебюте заболевания. Всем пациентам с РС была проведена оценка неврологического статуса по шкале EDSS.

В исследуемой группе было 40 женщин (59%) и 28 мужчин (41%) (соотношение 1,4:1) в возрасте 20 - 57 лет. Между мужчинами и женщинами не было выявлено различия по EDSS ( $p=0,400$ ), продолжительности заболевания ( $p=0,950$ ) и частоте обострений ( $p=0,260$ ).

В зависимости от характера терапии выделено 4 подгруппы пациентов:

1 группа - 19 человек, принимавших интерфероны  $\beta$  в течение не менее 6 месяцев (Интерферон бета-1a по 12000000МЕ (44мкг) 0,5мл внутримышечно 3 раза в неделю, интерферон бета-1a по 6000000 МЕ (30 мкг) 1 мл внутримышечно 1 раз неделю, интерферон бета-1b 9600000 МЕ (30 мкг) по 1мл внутримышечно через день).

2 группа - 18 человек, которые принимали глатирамера ацетат в течение не менее 6 месяцев (по 20 мг 1 раз в день в виде подкожной инъекции).

3 группа - 20 человек, получавших натализумаб в течение не менее 6 месяцев (300 мг в виде внутривенной инфузии 1 раз в 28 дней).

4 группа – 11 человек не получали ПИТРС в течение как минимум 6 месяцев до начала исследования. В эту группу вошли пациенты, которым диагноз РС был поставлен недавно и иммуномодулирующая терапия только планировалась, либо пациенты, отказавшиеся от ПИТРС по различным соображениям (плохая переносимость, личные особенности пациентов). Клиническая характеристика пациентов с РС представлена в табл. 1.

Таблица 1.

## Клиническая характеристика пациентов с РС

Показатель	Пациенты, принимавшие ПИТРС (n=57)	Интерфероны $\beta$ (n=19)	Глатирамера ацетат (n=18)	Натализумаб (n=20)	Без ПИТРС (n=11)	p
	1	2	3	4	5	
Возраст (лет)	36,00 (30,00; 41,00)	39,00 (27,50; 42,00)	38,00 (32,25; 44,00)	33,00 (28,75; 36,50)	33,00 (26,00; 37,50)	нет
Пол (n) (Ж/М)	33/24	11/8	12/6	10/10	7/4	
Длительность заболевания (лет)	7,0 (4,0;11,0)	5,0 (3,0;7,0)	9,5 (6,5; 12,5)	7,0 (5,0;9,25)	1,01 (0;3,0)	$p^{1-5}=$ 0,000
Частота обострений (количество в год)	0,50 (0,20;1,00)	0,40 (0,50; 1,00)	0,55 (0,20; 1,00)	0,50 (0,20; 1,12)	1,00 (0,85; 1,75)	$p^{1-5}=$ 0,009
EDSS (баллы)	3,50 (2,50;4,00)	3,00 (2,25; 4,00)	3,00 (2,50; 4,00)	3,75 (3,00; 4,00)	2,00 (1,50; 2,50)	$p^{1-5}=$ 0,020

*Примечание:* здесь и далее представлены только статистически значимые различия.

## Основные методы исследования

Психометрическое тестирование включало следующие шкалы:

- госпитальная шкала тревоги и депрессии (Hospital Anxiety and Depression Scale) для оценки аффективных расстройств,
- шкала MSIS-29 (Multiple Sclerosis Impact Scale) для оценки влияния заболевания на физическое и психическое состояние (для пациентов с РС),
- опросник FSS (Fatigue Severity Score, функциональная оценка РС) для оценки утомляемости.

Тестирование функциональных способностей включало слуховой тест на сложение в заданном темпе PASAT-3 (Paced Auditory Serial Addition Test), тест ходьбы на 25 футов для определения функциональных возможностей нижних конечностей и старт-реакций, и девяти-



луночный тест для определения функциональных возможностей верхних конечностей и зрительного контроля. Функциональная характеристика пациентов представлена в табл. 2.

Таблица 2

**Функциональные возможности пациентов с РС по группам сравнения**

Показатель	Группы сравнения		Me [LQ;UQ]	р
Ходьба на 25 футов (секунды)	1	Интерфероны β	4,55(4,35;6,10)	Нет значимых различий
	2	глатирамера ацетат	4,68(4,25;5,65)	
	3	натализумаб	4,93(4,15;6,12)	
	4	Без терапии	4,45(4,05;6,15)	
9-ти луночный тест доминантной руки (секунды)	1	Интерфероны β	21,75 (18,25;25,20)	Нет значимых различий
	2	глатирамера ацетат	20,17 (18,9;22,10)	
	3	натализумаб	19,87 (18,42;25,25)	
	4	Без терапии	20,20 (18,55;23,65)	
9-ти луночный тест недоминантной руки (секунды)	1	интерфероныβ	21,80 (19,45;25,2)	Нет значимых различий
	2	глатирамера ацетат	21,95 (19,45;25,85)	
	3	натализумаб	22,42 (19,68;26,56)	
	4	Без терапии	21,15 (20,15;24,55)	
PASAT (ответы)	1	Интерфероны β	46 (38;51)	p <sup>2-3</sup> =0,026
		глатирамера ацетат	48 (40;54)	
		натализумаб	39 (34;45)	p <sup>3-4</sup> =0,037
		Без терапии	41 (37;44)	

**Лабораторные методы исследования**

У всех пациентов и здоровых доноров были взяты образцы периферической крови. Венозную кровь в сухих пробирках (10мл) центрифугировали при 3000 оборотах в минуту в течение 10 минут, затем отделившуюся сыворотку отбирали в эппендорфы и хранили при температуре - 20° С для дальнейшего определения уровней IL-17A, IL -10, CXCL-13, BAFF и общего Ig иммуноферментным анализом (ИФА).

Одновременно был исследован потенциальный вклад В-лимфоцитов в синтез IL-17 при РС – двумя путями: 1) *in vitro* оценивали роль В-зависимой презентации антигенов в регуляции дифференцировки Т-хелперов (Th17/Treg) – по экспрессии соответствующих внутриклеточных маркеров - проточной цитометрией, а также по уровню ключевых цитокинов (IL-17/IL-10) в культуральных супернатантах - иммуноферментным анализом; 2)

*ex vivo* определяли способность В-лимфоцитов непосредственно синтезировать ИЛ-17 – по внутриклеточной экспрессии данного цитокина в свежесыведенных клетках - проточной цитометрией.

Наряду с этим, *ex vivo* оценивали исходное содержание Т-хелперных субпопуляций Th17 и Treg, а также В-лимфоцитов в периферической крови – по экспрессии соответствующих внутриклеточных маркеров, проточной цитометрией. Для этого дополнительно 15 мл крови собирали в стерильные пластиковые пробирки, содержащие гепарин (25 ед/мл крови).

Исследования проводили в Лаборатории иммунорегуляции Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (г.Пермь). Дизайн лабораторного исследования приведен на рисунке 1.



Рис. 1. Дизайн лабораторного исследования

### Пример алгоритма цитометрического исследования.

На первом этапе в соответствии с параметрами переднего (FSC-H) и бокового (SSC-H) светорассеяния выделяли лимфоцитарный гейт – R1 (рис. 2а). На втором этапе в лимфоцитарном гейте на основе экспрессии мембранных маркеров идентифицировали субпопуляции CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов или В-лимфоцитов (CD19<sup>+</sup>-клетки) – гейт R2 (рис. 2б). На третьем этапе в субпопуляциях CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов или В-лимфоцитов (CD19<sup>+</sup>-клетки) определяли экспрессию внутриклеточных молекул – транскрипционных факторов RORγt/FoxP3 или цитокина IL-17 (рис. 2в). Аналогичной была стратегия цитометрического анализа клеток в культуре.

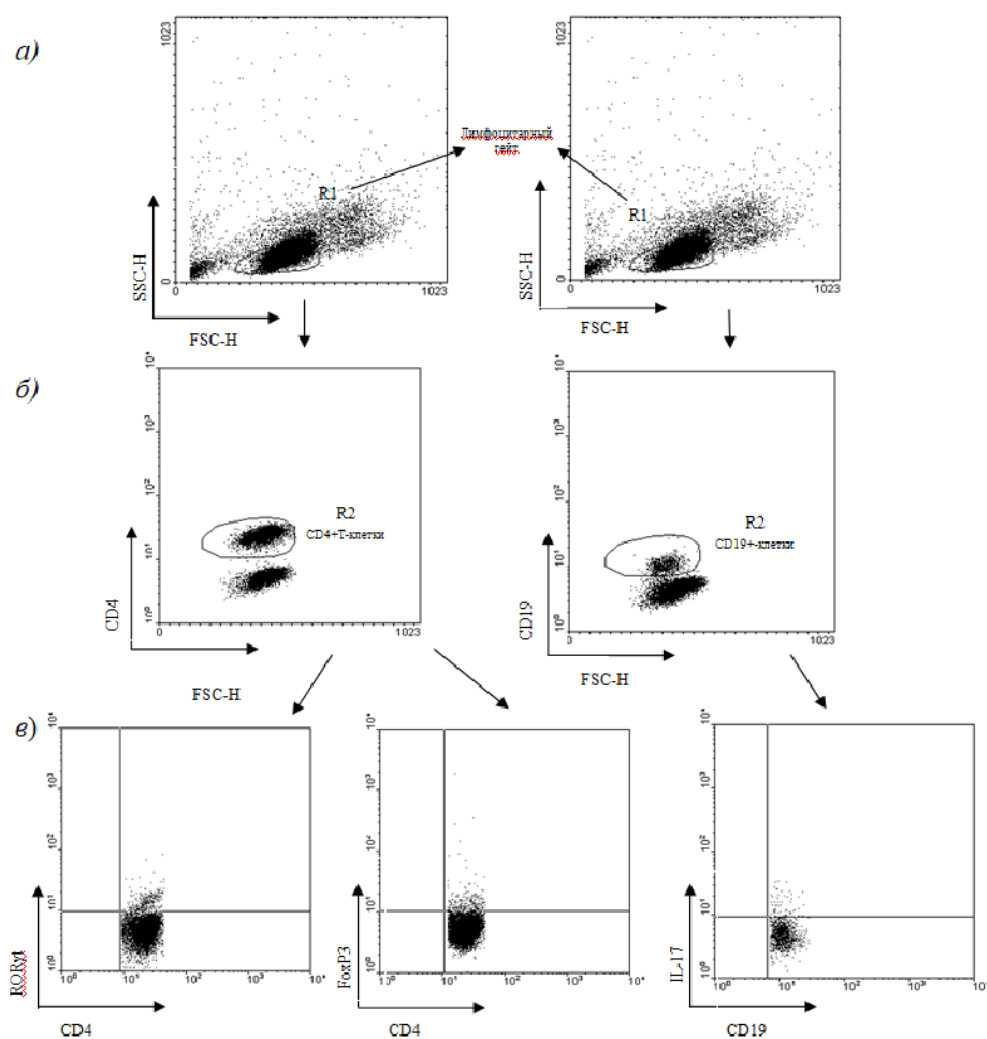


Рис. 2. Стратегия анализа результатов цитометрического исследования.

а – гейтирование общей лимфоцитарной популяции на основе параметров переднего и бокового светорассеяния; б – гейтирование субпопуляций CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов и CD19<sup>+</sup>В-клеток на основе экспрессии мембранных маркеров CD4<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>; в – анализ экспрессии выделенными субпопуляциями внутриклеточных факторов RORγt, FoxP3 и IL-17

### **Оценка уровня цитокинов в плазме крови**

В сыворотке крови были исследованы концентрации IL-17A, IL -10, CXCL-13, BAFF и общего IgG методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Использовались двухфазные варианты анализов, когда моноклональное антитело к одному из эпитопов было зафиксировано на твердофазном носителе (ячейках планшета), а к другому - в реагенте с конъюгатом.

Исследование IL-17A, IL -10 проводилось с помощью наборов «ИФА- IL-17A» и «ИФА -IL -10» производства ООО «Цитокин», Россия, исследование CXCL-13 - с помощью «ELISAKitforB-LymphocyteChemoattractant 1(BCL-1)», Cloud-CloneCorp, USA. Исследование BAFF проведено с помощью «HumanBAFFInstantELISA» производителя eBioscience, Austria. Исследование общего IgG проведено с помощью набора «IgG-общий-ИФА-БЕСТ», Вектор-БЕСТ, Россия.

### **Связь работы с научными программами**

Тема диссертации утверждена на заседании научно - координационного совета по неврологии федерального государственного бюджетного образовательное учреждения высшего образования «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации 9.09.2015. (протокол №183).

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

В соответствии с формулой специальности 3.1.24. Неврология (медицинские науки) представленная диссертационная работа представляет собой исследование закономерностей патогенеза РС, ориентированное на поиск механизмов и методов повышения эффективности лечения этого заболевания и относится к области исследований демиелинизирующих заболеваний нервной системы.

### **Степень достоверности**

Степень достоверности полученных в диссертационном исследовании данных определяется дизайном поперечного сравнительного исследования с применением критериев доказательной медицины и оценкой эффективности, а также достаточным объемом и репрезентативным характером выборки обследуемых пациентов, использованием современных адекватных методов клинического и лабораторного обследования. Используемые статистические методы адекватны поставленным задачам, а сформулированные положения, выводы и рекомендации аргументированы и логически вытекают из полученных данных.

Статистическая обработка данных исследования проводилась с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 10.0 (StatSoftInc., USA). В виду небольшого объема выборок и неправильного распределения значений были использованы непараметрические статистические методы. Для описания количественных признаков использовался формат с указанием медианы, первого и третьего квартиля – Me (UQ; LQ). Сравнительный анализ полученных в ходе исследования количественных данных в 2-х независимых группах был выполнен с использованием U критерия Манна-Уитни, в 3-х и более по анализу ANOVA, а в случае сравнения показателей в группе – критерий Уилкоксона. Корреляционный анализ произведен с использованием рангового коэффициента Спирмена (R). Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

### **Личный вклад диссертанта в исследование**

Материал, представленный в диссертации, получен, обработан и проанализирован лично автором. Обследование больных, статистическая обработка и анализ полученных данных выполнялись лично автором. Пробы биологического материала были взяты лично автором, а при трудностях венепункции при помощи процедурных медсестер ГБУЗ Пермского края «Пермская краевая клиническая больница» Старцевой Л.С. и Носковой Л.В. Иммунологические исследования выполнены совместно с к.м.н., научным сотрудником И.В.Некрасовой в лаборатории иммунорегуляции ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (г. Пермь). Автором освоены принципы проведенных лабораторных исследований и работы с данными, полученными при цитометрическом исследовании. Автор благодарит заведующую центром РС ГБУЗ ПК ПККБ Т.Н.Трушникову, заведующую лабораторией иммунорегуляции ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, д.м.н., профессора, заслуженного деятеля науки РФ С.В.Ширшева и заведующего лабораторией экологической иммунологии ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, к.м.н., доцента кафедры иммунологии ПГМУ Б.А.Бахметьева за сотрудничество.

### **Апробация работы.**

Материалы диссертации доложены и обсуждены на научной сессии ПГМУ им. акад. Е.А. Вагнера (Пермь, 2016), конференции «Неврологические чтения в Перми» (г.Пермь, 2017), итоговой научно-практической конференции ПГМУ им. акад. Е.А. Вагнера (г.Пермь, 2018), научно-практической конференции «Неврологические чтения в Перми» (г.Пермь, 2018), научной сессии ПГМА им. акад. Е.А. Вагнера (г.Пермь, 2014), конференции

«Неврологические чтения в Перми» (г.Пермь, 2020), заседании научно-координационного совета по неврологии с участием кафедр неврологии и медицинской генетики, а также представителей кафедры иммунологии 27 апреля 2021 года.

### **Внедрение результатов работы в практику**

Основные положения работы внедрены в практическую работу ГБУЗ Пермского края «Пермская краевая клиническая больница» и в учебный процесс на кафедре неврологии и медицинской генетики ГБОУ ВПО ПГМУ им. акад. Е.В. Вагнера Минздрава России.

### **Публикации.**

По материалам диссертации опубликовано 13 научных работ, в том числе 9 - в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации, 1 - в международной базе цитирования Scopus.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация представляет рукопись на русском языке объемом 142 страницы машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы исследования», 2 глав собственных исследований, обсуждения (заключения), выводов и практических рекомендаций. Список литературы содержит 212 источников, в том числе 15 отечественных и 197 иностранных. Диссертация иллюстрирована 37 таблицами, 16 рисунками, 2 клиническими примерами.

Настоящее исследование проведено в период с 2018 по 2020 г.г. в условиях регионального Центра рассеянного склероза на лечебной базе поликлиники ГБУЗ Ордена Знак Почета Пермская краевая клиническая больница. Лабораторные исследования проводились в лаборатории иммунорегуляции ФГБУН ИЭГМ УрОРАН (г. Пермь).

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Результаты исследований и обсуждение

Содержание цитокинов и общего IgG у пациентов с РС и здоровых доноров указано в таблице 3.

Выявилось, что прием терапии первой линии одинаково влиял на продукцию IL-17, приближая его концентрацию в сыворотке крови к значению здоровых доноров. При проведении корреляционного анализа выявлена отрицательная связь содержания IL-17 с длительностью заболевания ( $R=-0,26$ ,  $p=0,035$ ).

Уровень IL-10 в сыворотке у пациентов с РС был пониженным в сравнении с содержанием этого интерлейкина у здоровых доноров ( $U=266$ ,  $p=0,009$ ). Уровень IL-10 был особенно низким у тех пациентов с РС, которые не получали терапию.

Содержание BAFF в крови пациентов с РС и у здоровых доноров практически не различалось ( $p=0,910$ ).

Таблица 3

**Цитокины и общий IgG в сыворотке крови у пациентов с РС и здоровых доноров,  
Me [LQ;UQ]**

Показатель	IL-17, пг/мл	IL-10, пг/мл	BAFF, нг/мл	CXCL-13, пг/мл	IgG, мг/мл
Интерфероны $\beta$ (n=19)	51.62 (11.63; 70.80)	32,64 (9.07; 47.99)	0.40 (0.21; 0.83)	34.25 (19.77; 42.82)	93.22 (78.99; 104.86)
Глатирамер ацетат (n=18)	43.37(32.67; 56.39)	26,89 (21.20; 47.73)	0.22 (0.16; 5.46)	40.12 (32.67;52.72)	93.99 (85.08; 106.97)
Натализумаб (n=20)	24.45 (16.28; 37.38)	17,77 (13.88; 35.68)	0.26 (0.17; 2.41)	54.32 (43.77; 71.43)	83.70 (75.67; 92.24)
Без ПИТРС (n=11)	78.06 (65.98; 175.40)	6.69 (2.90; 72.44)	0.56 (0.40; 1.26)	18.5 (11.04; 19.77)	87.80 (86.18; 91.7)
Все пациенты с РС (n=68)	39,75(18,6;70, 81)	22,68(11,24;48, 52)	0,35 (0,19;1,48)	39,96(24,48; 54,32)	87,80(81,48; 103,33)
Здоровые (n=13)	48.05(39.75; 124.48)	43,60(35.93; 51.39)	0.30 (0.25; 0.80)	61.75 (49.84; 184.13)	85.31(81.90; 94.68)



Уровень CXCL-13 у пациентов с РС был достоверно ниже, чем у здоровых добровольцев ( $p=0,000$ ). Однако установлена связь концентрации CXCL-13 с показателем инвалидизации по EDSS ( $R=0,38$ ,  $p=0,001$ ), а так же с нарушениями в функциональных системах: мозжечковой ( $R=0,29$ ,  $p=0,014$ ), тазовых органов ( $R=0,37$ ,  $p=0,002$ ) и корковой ( $R=0,31$ ,  $p=0,009$ ). Концентрация CXCL-13 в сыворотке крови была связана с длительностью заболевания ( $R=0,28$ ,  $p=0,018$ ), с качеством жизни по MSIS-29 ( $R=0,29$ ,  $p=0,015$ ) и утомляемостью по FSS ( $R=0,27$ ,  $p=0,022$ ). Обнаружена связь CXCL-13 с функциональными возможностями ног по тесту на ходьбы 25 футов ( $R=0,26$ ,  $p=0,030$ ).

Концентрация IgG в сыворотке крови пациентов с РС и здоровых доноров достоверно не отличались.

Концентрации IL-10 и IL17 в сыворотке крови пациентов с РС прямо коррелировали ( $R=0,42$ ,  $p=0,000$ ). Кроме того, уровень IL-10 статистически значимо коррелировал с концентрацией CXCL13 в сыворотке крови пациентов с РС ( $R=0,24$ ,  $p=0,045$ )

При сравнении методом ANOVA было выявлено достоверно высокое содержание IL-17 у пациентов с баллом по EDSS ( $p=0,049$ ) с последующим снижением, и наоборот, увеличение уровня CXCL-13 при повышении EDSS ( $p=0,043$ ).

При исследовании в экспериментах *ex vivo* были получены следующие результаты.

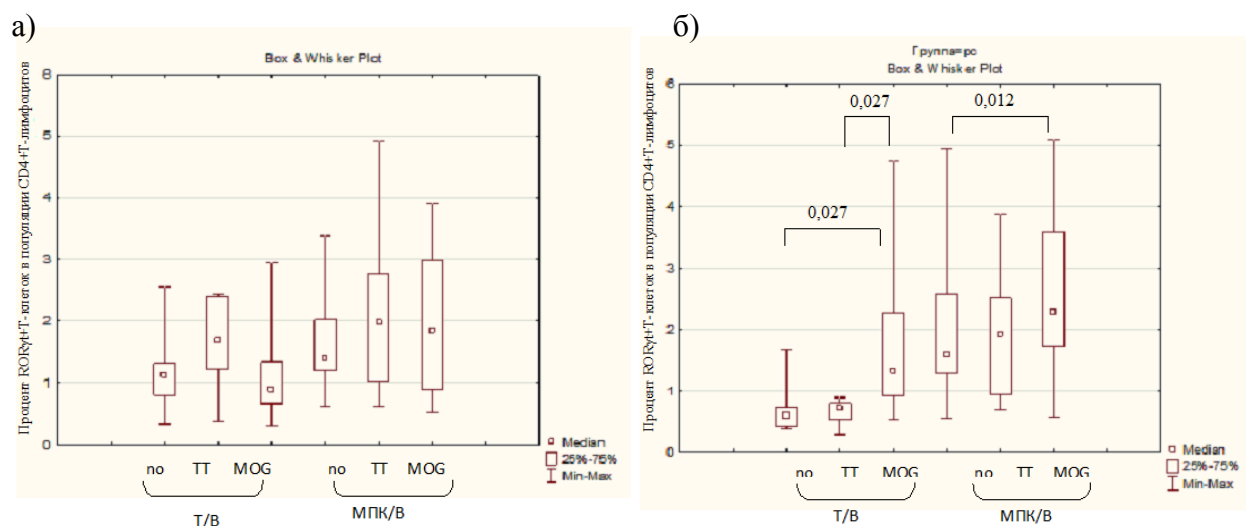


Рис. 3. Содержание Th17 в ко-культуре CD3<sup>+</sup>T-клеток или МПК с аутологичными В-лимфоцитами, нагруженными экзо- или аутоантигеном, у здоровых доноров (а) и пациентов с РС (б). Значимость отличий оценивалась с помощью парного критерия Вилкоксона, представлены значения  $p < 0,05$

В группе здоровых доноров содержание Th17 в культуре не изменялось в присутствии экзо- или аутоантигенов, представленных аутологичными В-лимфоцитами, (рис.3а), однако у

пациентов с РС оно статистически значимо возросло в ответ на ключевой аутоантиген-МОГ, в совместной культуре В-лимфоцитов как с изолированными CD4<sup>+</sup>Т-клетками, так и с МПК в качестве источника Т-лимфоцитов (рис. 3б).

Сопоставление эффектов конкретного антигена в разных группах доноров выявило статистически значимо более высокий эффект МОГ в отношении дифференцировки Th17 у пациентов с РС по сравнению с таковым у здоровых доноров (рис. 4).

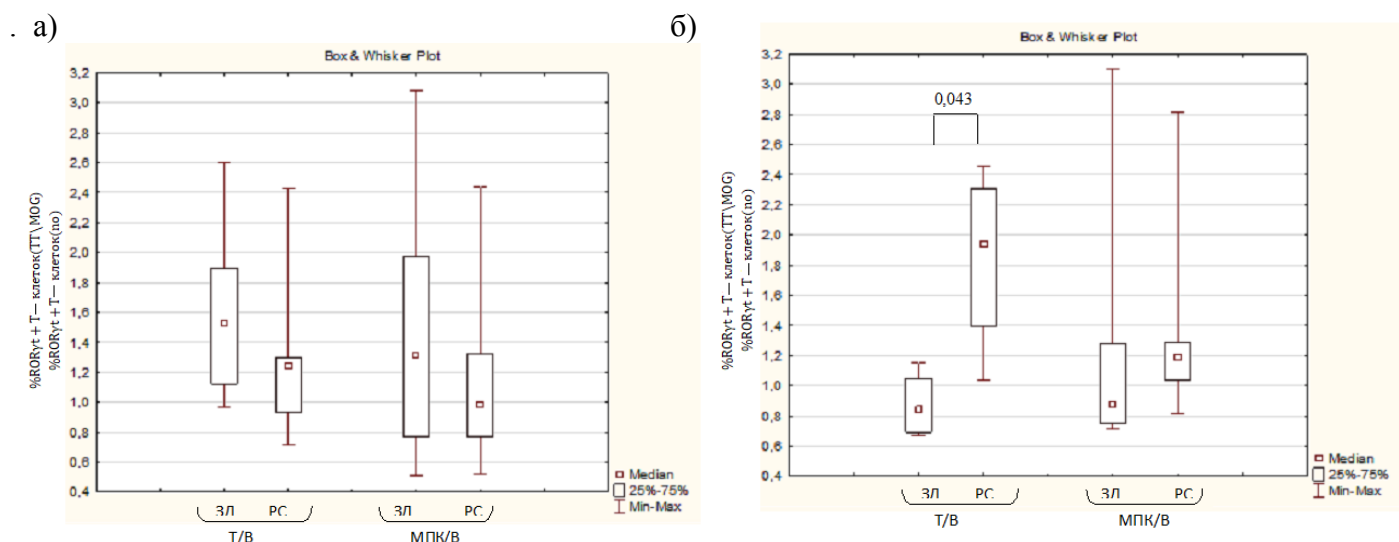


Рис. 4. Сопоставление эффектов антигенов, представленных В-лимфоцитами, в отношении дифференцировки Th17, выраженных как отношение процента Th17 в пробе с антигеном к таковому в соответствующей пробе без антигена, у здоровых доноров (а) и пациентов с РС (б). Значимость отличий оценивалась с помощью U-критерия Манна — Уитни, представлены  $p < 0,05$ .

Исследования в отношении дифференцировки Treg выявили статистически значимое повышение содержания этих клеток в ответ на облигатный антиген (ТТ) В-лимфоцитов с изолированными CD4<sup>+</sup>Т-клетками и с МПК – это показано для здоровых доноров (рис. 5а), но не для пациентов с РС (рис. 5б).

Соотношение Th17/Treg было статистически значимо более высоким в ответ на МОГ в сопоставлении с облигатным антигеном как у здоровых доноров, в ко-культуре В-лимфоцитов с МПК (рис. 6а), так и у пациентов с РС, в ко-культуре В-клеток с изолированными CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитами (рис. 6б).

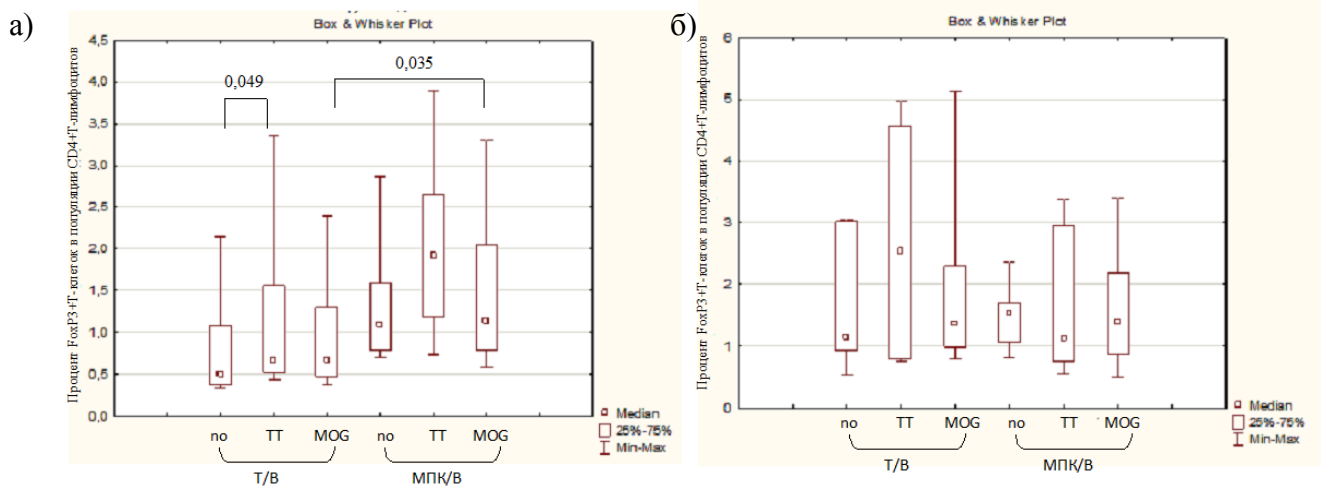


Рис. 5. Содержание Treg в ко-культуре CD3<sup>+</sup>T-клеток или МПК с аутологичными В-лимфоцитами, нагруженными экзо- или аутоантигеном, у здоровых доноров (а) и пациентов с РС (б). Значимость отличий оценивалась с помощью парного критерия Вилкоксона, представлены значения  $p < 0,05$ .

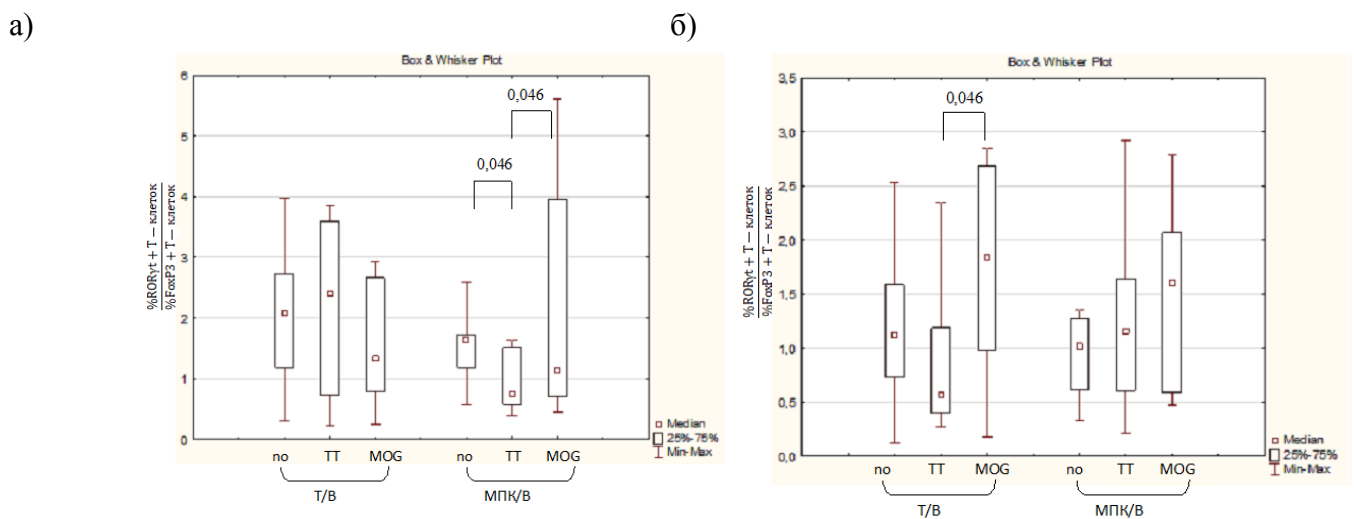


Рис. 6. Соотношение Th17/Treg в ко-культуре CD3<sup>+</sup>T-клеток или МПК с аутологичными В-лимфоцитами, нагруженными экзо- или аутоантигеном, у здоровых доноров (а) и пациентов с РС (б). Значимость отличий оценивалась с помощью парного критерия Вилкоксона, представлены значения  $p < 0,05$ .

При исследовании также показано статистически значимо более высокое содержание IL-17-позитивных В-лимфоцитов при РС что, наряду с В-зависимой презентацией аутоантигенов, должно вносить вклад в продукцию цитокина при данной патологии (рис. 7).

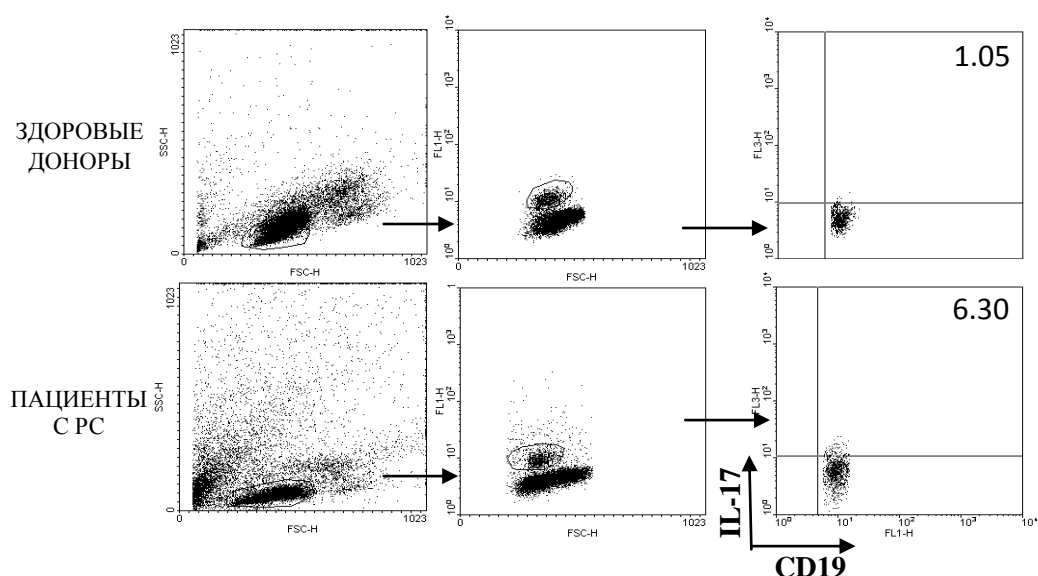


Рис. 7. Экспрессия IL-17 В-лимфоцитами (CD19<sup>+</sup> клетками) здоровых доноров и пациентов с РС *ex vivo* одного из экспериментов для здоровых доноров и одного экспериментов для пациентов с РС.

Полученные исследования показывают так же, что активность продуцентов IL-17 в пробах с облигатным антигеном выше, чем в пробах без антигена у обеих исследуемых групп, но только у пациентов с РС их активность также высока в пробе с аутоантигеном.

## ВЫВОДЫ

1. Содержание провоспалительного цитокина IL-17 в крови пациентов с РС достоверно повышено на ранних этапах заболевания до достижения выраженности неврологического дефицита 2 баллов по EDSS, а затем последовательно снижается. Концентрация противовоспалительного цитокина IL-10 в сыворотке пациентов с РС значительно ниже такового у здоровых доноров, но при этом имеет прямую связь с клиническими проявлениями заболевания.
2. Уровни факторов, ассоциированных с активацией В-лимфоцитов, BAFF и IgG, у пациентов с РС, сопоставимы с соответствующими показателями у здоровых доноров, тогда как концентрация ключевого В-клеточного хемокина CXCL-13 у пациентов с РС существенно ниже нормы и прямо коррелирует с клиническими и функциональными показателями.
3. Терапия препаратами как первого, так и второго ряда сопровождается нормализацией уровня факторов, ассоциированных с активностью Т-хелперов Th17/Treg и В-лимфоцитов, у пациентов с РС: снижением сывороточной концентрации провоспалительного цитокина IL-17 (интерферон-- $\beta$ , натализумаб), повышением концентрации противовоспалительного

- цитокина IL-10 (все препараты), увеличением содержания В-клеточного хемокина CXCL-13 (все препараты) – фактически, до уровня соответствующих показателей у здоровых доноров.
4. Высокие концентрации IL-17 и В-клеточного активатора BAFF у пациентов с РС сопряжены друг с другом.
  5. Антигенпрезентирующие функции В-лимфоцитов пациентов с РС отличны от таковых у здоровых доноров. Пролиферативный ответ Т-лимфоцитов на экзоантиген, представленный В-клетками, эффективнее аналогичного ответа в контрольной группе. Т-хелперная дифференцировка также имеет особенности: В-зависимая презентация аутоантигена у пациентов с РС, в отличие от здоровых доноров, индуцирует преимущественное развитие наивных Т-лимфоцитов в Th17, но не влияет на дифференцировку Treg, сдвигая баланс Th17/Treg в направлении Th17 и внося вклад в продукцию IL-17 при РС.
  6. В-лимфоциты способны сами продуцировать IL-17, причем В-клетки пациентов с РС делают это значительно более эффективно, что также вносит вклад в общую продукцию данного цитокина при РС.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Цитокины IL-17 и CXCL-13 могут быть использованы в качестве биомаркеров, но не для установления диагноза. IL-17 возможно использовать для оценки эффективности лечения, а CXCL-13 - для оценки тяжести заболевания.
2. Для лечения пациентов с РС более эффективны препараты второй линии, поэтому в терапии пациентов с активным течением предпочтительно использовать индукционные методы лечения. Суть индукционного метода лечения в назначении в дебюте заболевания препаратов второй линии, а после стабилизации течения заболевания - переход на препараты первой линии, как более безопасные.
3. Для разработки новых препаратов рекомендовано обратить внимание на такие точки приложения как В-клетки и Th17-лимфоциты. Расширение спектра препаратов, а особенно препаратов точечного действия, позволит подходить к лечению пациентов с РС более персонализировано

## СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Байдина Т.В. Патогенетические и клинические особенности рассеянного склероза / Т.В.Байдина, Е.М. Куклина, Т.Н. Трушникова, Ю.А. Пичкалева, Н.В. Сурсякова, И.Ю. Данченко, Е.Л. Медведева, А.В. Фотева //Пермский медицинский журнал. - 2016.- Т. XXXIII, № 4.- С.17-22 (из перечня ВАК).
2. Куклина Е.М. В-лимфоциты при рассеянном склерозе: TN17-зависимая активация как потенциальный механизм развития заболевания /Е.М.Куклина, Н.В. Сурсякова, Т.В.Байдина, И.Ю. Данченко, И.В.Некрасова // Российский иммунологический журнал. – 2016. - Том 10 (19), № 2 (1). - С. 271-273 (из перечня ВАК).
3. Сурсякова Н.В. Антигенпрезентирующая функция В-клеток у пациентов с ремиттирующим рассеянным склерозом / Сурсякова Н.В., Куклина Е.М., Байдина Т.В. // Российский иммунологический журнал. - 2017. - Т. 11. № 3. - С. 519-521 (из перечня ВАК).
4. Сурсякова Н.В.. Презентация В-клетками аутоантигенов при рассеянном склерозе/ Н.В.Сурсякова, Е.М.Куклина, Т.В.Байдина // Медицинский альманах. - 2017. - №5(50). - С.115-116 (из перечня ВАК).
5. Куклина Е.М. В-лимфоциты как антигенпрезентирующие клетки при аутоиммунных патологиях / Е.М. Куклина, Е.Н.Смирнова, Т.В.Байдина, И.В.Некрасова, Т.С.Балашова, Н.В.Сурсякова, И.Ю.Данченко // Вестник Пермского научного центра. - 2017. - № 3. - С. 36-41 (из перечня ВАК).
6. Сурсякова Н.В. Влияние В-клеточного активирующего фактора и хемокина 13 на клиническое и функциональное состояние пациентов с рассеянным склерозом /Н. В. Сурсякова, Т. В. Байдина, Е. М. Куклина, Т. Н. Трушникова // Медицинский альманах. - 2018.- № 5 (56). - С. 88-90 (из перечня ВАК).
7. Байдина Т.В. Исследование патогенеза рассеянного склероза как основа его таргетной терапии / Байдина Т.В., Куклина Е.М., Селянина Н.В., Трушникова Т.Н., Сурсякова Н.В., Данченко И.Ю., Арбузова Е.Е. // Пермский медицинский журнал. - 2018. - Т. 35, № 1. - С. 27-32 (из перечня ВАК).
8. Н.В. Сурсякова. Факторы, регулирующие активность В-лимфоцитов, как потенциальные биомаркеры рассеянного склероза /Н.В.Сурсякова, Т.В.Байдина, Е.М.Куклина, Т.Н. Трушникова, Т.В.Ожгибесова // Журнал неврологии и психиатрии им.С.С.Корсакова. - 2019. - № 2, Вып. 2. - С.49-51 (из перечня ВАК).
9. Байдина Т.В. Динамика интерлейкина 17 у пациентов с рассеянным склерозом и двухфазная модель патогенеза заболевания /Байдина Т.В., Куклина Е.М., Данилова М.В.,

Трушникова Т.Н., Сурсякова Н.В. // Пермский медицинский журнал. - 2021. - Т. 38, № 4. - С. 48-53 (из перечня ВАК).

10. Сурсякова Н.В. Провоспалительные и противовоспалительные субпопуляции лимфоцитов у пациентов с рассеянным склерозом в период ремиссии / Н.В.Сурсякова, Т.В.Байдина, Е.М.Куклина // Нейроиммунология. Рассеянный склероз. - 2017. - Том XIV, № 1-2. - С.64.

11. Сурсякова Н.В. Влияние хемокина CXCL-13 на клиническое и функциональное состояние пациентов с рассеянным склерозом в стадии ремиссии / Н.В. Сурсякова, Е.М. Куклина, Т.В. Байдина, И.В. Некрасова // Медицинский академический журнал. - 2019. Спецвыпуск. - С.117- 119. ISSN 1608-4101.

12. Сурсякова Н.В. Исследование продукции IL-17 В-лимфоцитами при рассеянном склерозе / Н.В. Сурсякова, Т.Н Трушникова // Неврологические чтения в Перми: сборник материалов межрегиональной научно-практической конференции. - 2020. - С.125-129.

13. Байдина Т.В. Рассеянный склероз. Современное представление / Байдина Т.В., Сурсякова Н.В. // Ремедиум Приволжье. - 2017. - №7 (157). - С. 25-28.

## СПИСОК ТЕРМИНОЛОГИЧЕСКИХ СОКРАЩЕНИЙ

**МПК** – мононуклеарные клетки периферической крови

**ПИТРС** – препараты, изменяющие течение рассеянного склероза -

**РС** – рассеянный склероз

**ЦНС** – центральная нервная система

**BAFF** - B cell activating factor, фактор активации В-лимфоцитов

**CD** – The Cluster of Differentiation, молекулы дифференцировки лимфоидных клеток

**CXCL-13** – хемокин 13.

**EAE** – экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит

**EDSS** – Expanded Disability Status Scale, расширенная шкала инвалидизации Курцке

**FSS** - Fatigue Severity Score, шкала оценки утомляемости

**IL** – interleukin, интерлейкин

**MOG** – Myelinoligodendrocyteglycoprotein; олигодентроцитарный гликопротеин миелина

**MSIS-29** – Multiple Sclerosis Impact Scale, шкала влияния рассеянного склероза

**PASAT-3** – Paced Auditory Serial Addition Test, слуховой тест на сложение в заданном темпе

**Th 17** – Т-хелпер, продуцирующий интерлейкин 17

**Treg** – Т-регуляторные клетки

Сурсякова Надежда Владимировна  
Особенности взаимодействия В-лимфоцитов и Т-хелперов, продуцирующих IL-17 (Th17), при  
рассеянном склерозе.

Автореф. дисс. на соискание учёной степени кандидата медицинских наук.

Подписано в печать 18.02.2022. Заказ №210727

Формат 60×90/16. Усл. печ. л. 1 Тираж 100 экз.

Типография ООО «Интер-ЕС»

614068, Пермь, ул Плеханова, 39. Тел (342) 2-150-170