

УДК 616.832-004.2:612.112.94:57.082.13

DOI: 10.22141/2224-0713.3.89.2017.104241

Негрич Н.О.<sup>1</sup>, Мироновський С.Л.<sup>2</sup>, Негрич Т.І.<sup>1</sup>, Кіт Ю.Я.<sup>2</sup>, Стойка Р.С.<sup>2</sup><sup>1</sup>Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, м. Львів, Україна<sup>2</sup>Інститут біології клітини, Національна академія наук України, м. Львів, Україна

## Сучасне уявлення про роль В-лімфоцитів у патогенезі розсіяного склерозу: використання В-клітинних біомаркерів у клінічній практиці

**Резюме. Актуальність.** Метою роботи було дослідити взаємозв'язок між рівнем 48 кДа форми неконвенційного міозину Іс (48 кДа Муо Іс) (маркер апоптозу В-клітин) у сироватці крові хворих на розсіяний склероз (РС) та особливостями дебюту захворювання в контексті сучасного уявлення про ключову роль В-лімфоцитів уже на початковій стадії патологічного процесу при РС. **Матеріали та методи.** У дослідженні взяли участь 61 хворий на РС та 20 практично здорових осіб віком від 19 до 57 років. Методи дослідження: клінічні — аналіз скарг, анамнезу захворювання та життя, загальний та неврологічний огляди; лабораторні — шляхом послідовного осадження сироваткових білків, електрофорезу та цифрового аналізу одержаних електрофореграм сироватки крові хворих на розсіяний склероз визначали вміст 48 кДа Муо Іс, при цьому наявність Муо Іс підтверджували за допомогою вестерн-блоту з анти-Муо Іс антитілами. **Результати.** У групі хворих на РС з високим рівнем 48 кДа Муо Іс середній вік обстежених на момент початку захворювання був найнижчим, однак вірогідних статистичних залежностей між концентрацією 48 кДа Муо Іс у сироватці крові хворих та віком дебюту РС не було виявлено. При дебюті РС у вигляді порушення гостроти зору в сироватці крові хворих вірогідно частіше виявляли середній рівень 48 кДа Муо Іс, а при дебюті з окорохових розладів — низький рівень, що вказує на менш сприятливий перебіг захворювання внаслідок зниженого апоптозу автореактивних В-лімфоцитів. Рівень 48 кДа Муо Іс у сироватці крові обстежених осіб статистично вірогідно не залежав від активності захворювання у хворих на РС на момент огляду та забору крові, а отже, використання даного біомаркера є можливим не лише при загостренні хвороби, а й в ремісії. **Висновки.** Сучасні дослідження доводять, що при РС В-лімфоцити беруть участь не лише в синтезі олігоклональних автоантитіл, а також в антитілонезалежних механізмах, насамперед у презентації антигенів Т-лімфоцитам, синтезі прозапальних цитокінів, утворенні ектопічних лімфоїдних фолікулоподібних скупчень у центральній нервовій системі. Саме тому є обґрунтованим використання В-клітинних маркерів, у тому числі 48 кДа Муо Іс, у клінічній практиці, зокрема для прогнозування агресивності перебігу РС та оцінки ефективності хворобомодифікуючої терапії.

**Ключові слова:** розсіяний склероз; В-лімфоцити; біомаркери; неконвенційний міозин

### Вступ

Розсіяний склероз (РС) є автоімунним запальним захворюванням центральної нервової системи (ЦНС), що характеризується ушкодженням мієлінової оболонки та дегенерацією аксонів [1]. РС є однією з основних причин інвалідизації молодих людей у цілому світі [2, 3].

У глобальному плані РС призводить до значних матеріальних витрат і належить до соціальних захворювань [4].

Традиційно в розвитку РС ключову роль відводили Т-лімфоцитам, а хвороба вважалась Т-клітинно-опосередкованою [5]. Було доведено, що під дією невідомих достеменно чинників у периферичних

лімфатичних вузлах відбувається активація наївних Т-лімфоцитів автоантиген-презентуючими клітинами або ж реактивація Т-клітин пам'яті. У подальшому настає адгезія активованих лімфоцитів до гематоенцефалічного бар'єра та трансміграція через нього в ЦНС. Потрапивши туди, активовані Т-клітини залучаються до локальних внутрішньомозкових автоімунних реакцій [5].

## Ключові положення

— В-лімфоцити відіграють важливу роль у патофізіології розсіяного склерозу (рис. 1):

- В-клітини представляють нейроантигени Т-клітинам і активують їх;

- В-клітини секретиують прозапальні цитокіни, що посилює імунну відповідь інших імунних клітин;

- В-клітини продукують автоантитіла, що викликають пошкодження нервової тканини;

- В-лімфоцити беруть участь у формуванні ектопічних лімфоїдних фолікулоподібних структур.

— Використання при РС моноклональних антитіл проти компонентів В-клітин має патогенетичне підґрунтя й доведені позитивні результати клінічних досліджень.

— При РС важливе визначення клінічних біомаркерів.

—  $\text{Muo1c}$  — білок, що експресується в плазматичній мембрані активованих В-лімфоцитів, особливо в периферичних відростках, таких як мікрворсинки.

— Рівень 48 кДа  $\text{Muo1c}$  у сироватці крові може використовуватись як біомаркер прогнозу хвороби та оцінки ефективності терапії.

— Підвищення рівня 48 кДа  $\text{Muo1c}$  у сироватці крові свідчить про посилення апоптозу автореактивних В-лімфоцитів і може говорити про більш сприятливий перебіг хвороби.

— Зниження рівня 48 кДа  $\text{Muo1c}$  вказує на менш сприятливий перебіг захворювання внаслідок зниженого апоптозу автореактивних В-лімфоцитів.

З урахуванням вищезгаданих механізмів було розроблено ряд засобів хворобомодифікуючої терапії (ХМТ), дія яких направлена на блокування певної патогенетичної стадії РС. Однак навіть при їх використанні у 25 % пацієнтів з рецидивуючо-ремітуючим (РР) РС розвиток хвороби не припинявся. На додаток дані препарати ХМТ, що, як правило, діють на Т-клітинний імунітет, виявились абсолютно неспроможними впливати на прогресуючі форми РС [6]. А тому з метою пошуку нових ефективних засобів патогенетичного лікування було переглянуто патогенез РС, а саме переоцінено роль усіх імунних клітин у розвитку автоімунного процесу, що й привело до відкриття важливих патологічних функцій В-лімфоцитів у патогенезі цього захворювання.

Раніше при РС В-клітинам відводили лише єдину функцію — утворення олігоклональних автоантитіл після їх активації Т-лімфоцитами [7]. Потенційними мішенями антитіл є автоантигени мієліну (основний білок мієліну, мієлін-олігодендрокітарний гліко-

протеїн, протеоліпідні білки), олігодендрокітів (циклічний нуклеотид фосфодіестерази, транскетоксилази, трансальдолази), нейронів та аксонів (нейрофіламенти, тубулін, нейрофасцин), астроцитів (калієві канали KIR4.1), різноманітних клітинних іонних каналів (аноктамін 2), неспецифічні автоантигени (ядерні білки, білки теплового шоку) і мікробні (наприклад, вірусні антигени) [8, 9].

Стійке інтратекральне (всередині ЦНС) запалення, про що свідчить наявність олігоклональних антитіл (ОКА) в цереброспінальній рідині та підвищений індекс імуноглобулінів класу G (співвідношення IgG в лікворі/ IgG в сироватці крові) [10], є однією з основних ознак РС приблизно у 87,7 % хворих на цю недугу та підтверджує роль В-клітин у патогенезі РС [11, 12]. Для виявлення ОКА застосовують методику електрофорезу в гелі — формуються типові олігоклональні смуги IgG (ОКС IgG). У свою чергу, визначення ОКС IgG та індексу IgG є єдиними обов'язковими лабораторними аналізами при постановці діагнозу РС згідно з критеріями McDonald перегляду 2010 року, а саме для підтвердження первинно-прогресуючого (ПП) РС [13]. Крім того, визначення ОКС IgG має й прогностичне значення: існує прямий кореляційний зв'язок між числом олігоклональних смуг у лікворі та темпами прогресування хвороби [14]. Саме тому проведення люмбальної пункції з дослідженням ліквору повинно бути стандартною процедурою для первинних хворих із підозрою на РС [15].

Сучасні дослідження доводять участь В-лімфоцитів в антитілонезалежних механізмах, насамперед у презентації антигенів Т-лімфоцитам, синтезі прозапальних цитокінів, утворенні ектопічних лімфоїдних фолікулоподібних скупчень у ЦНС [16].

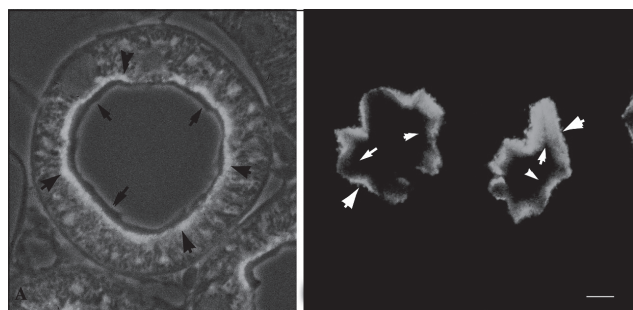
Якщо раніше вважали, що при РС Т-клітини активують В-клітини, то тепер доведено, що й В-лімфоцити презентують автонеуроантигени Т-лімфоцитам, викликаючи їх активацію та проліферацію. Окрім того, при РС В-клітини секретиують прозапальні цитокіни у відносно більших пропорціях, ніж захисні, а саме: лімфотоксин  $\alpha$ , фактор некрозу пухлини, інтерлейкіни (IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-16 та IL-23). У свою чергу, це призводить до посиленої імунної відповіді інших імунних клітин та їх зниженої здатності адекватно регулювати імунні реакції [17].

Зовсім нещодавно було встановлено, що в ЦНС хворих на РС присутні В-клітинні агрегати — ектопічні лімфоїдні фолікулоподібні структури (ЕЛФПС) або третинні лімфоїдні органи, що нагадують периферичні лімфатичні вузли та можуть забезпечувати велику кількість реакцій В- і Т-клітин, в тому числі: диференціацію та дозрівання В-лімфоцитів, соматичну гіпермутацію та переключення класу В-клітин, індукцію ефекторних функцій, розмноження олігоклональних лімфоцитів, які локально (інтратекально) продукують олігоклональні антитіла [18]. ЕЛФПС найчастіше виявляли в мозкових оболонках та білій речовині мозку, особливо в місцях активної демієлінізації. Детекція ЕЛФПС асоціювалась із більш вираженим ураженням як білої, так

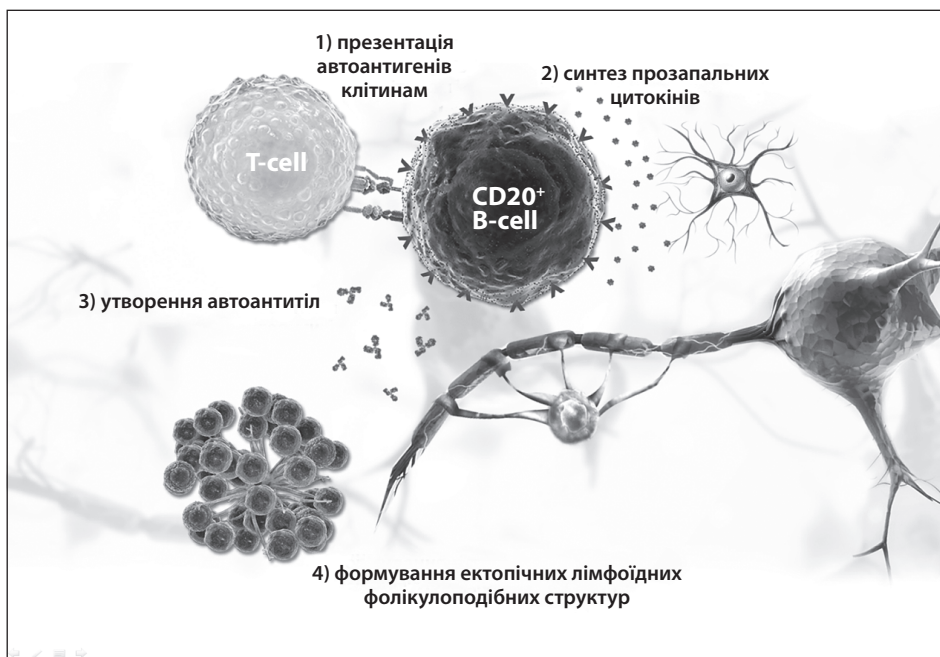
і сірої речовини головного мозку порівняно із хворими, у яких таких утворень не було знайдено. Окрім того, виявлення ЕЛФПС було пов'язане з початком захворювання в більш молодому віці, прискоренням часу до прогресування (переходом у вторинно-прогресуючий РС), швидкою інвалідизацією та ранньою смертю [19].

З огляду на нові дані про участь В-клітин в патогенезі РС останні стали активно досліджуватись з позиції клінічних біомаркерів. Раніше нами було показано діагностичні можливості 48 кДа форми неконвенційного (позам'язового) міозину 1с (48 кДа Myo1c) як біомаркера апоптозу активованих В-клітин [20]. Myo1c у великій кількості експресується в активованих В-лімфоцитах, а саме в плазматичній мембрані, особливо в периферичних відростках, таких як мікрворсинки (рис. 2) [21]. Після активації В-лімфоцитів останнім відводиться обмежений час на виконання їх основної функції — пошуку антигенів. Якщо ж активація відбувається надто довго або активований лімфоцит не знаходить тривалий час своєї мішені, він елімінується шляхом активаційно-індукованої загибелі клітин (activation-induced cell death) [22]. У свою чергу, у кров потрапляють у значній кількості продукти деградації активованих В-лімфоцитів, зокрема 48 кДа Myo1c [20].

**Метою цього дослідження** було дослідити взаємозв'язок між рівнем 48 кДа Myo1c у сироватці крові хворих на РС та особливостями дебюту захворювання



**Рисунок 2.** Myo1c у великій кількості експресується в активованих В-лімфоцитах, а саме в плазматичній мембрані, особливо в периферичних відростках, таких як мікрворсинки (мікрофотографія В-лімфоцитів, їх мікрворсинок, «зафіксованого» міозину)



**Рисунок 1.** В-лімфоцити відіграють важливу роль у патофізіології розсіяного склерозу

**Примітки:** 1) В-клітини представляють нейроантигени Т-клітинам і активують їх; 2) В-клітини секретують прозапальні цитокіни в патологічній кількості, що посилює імунну відповідь Т-лімфоцитів та інших імунних клітин; 3) В-клітини (плазмоцити) продукують аутоантитіла, що викликають пошкодження нервової тканини; 4) В-лімфоцити беруть участь у формуванні ектопічних лімфоїдних фолікулоподібних структур, що підтримують запалення в ЦНС.

в контексті сучасного уявлення про роль В-лімфоцитів вже на початковій стадії патологічного процесу при РС.

## Матеріали та методи

Подана робота була виконана на кафедрі неврології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького та у Львівському обласному науковому центрі з вивчення проблем розсіяного склерозу та інших демієлінізуючих захворювань, що знаходиться на базі Львівської обласної клінічної лікарні.

Дослідження ґрунтувалось на положеннях Гельсінської декларації. Комісією з питань біомедичної етики Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (протокол № 2 від 15 лютого 2016 р.) встановлено, що ця наукова робота відповідає етичним та морально-правовим вимогам згідно з наказом МОЗ України № 281 від 01.11.2000. Від усіх учасників дослідження було отримано письмову інформовану згоду на участь у ньому.

Критеріями включення пацієнтів були: вік від 18 до 60 років, вірогідний РС згідно з критеріями McDonald (2010) [13], відсутність застосування препаратів ХМТ чи цитостатиків за останні 6 місяців, згода хворого на участь у дослідженні. Критерії виключення: вік до 18 років та понад 60 років, наявність супутніх захворювань, прийом препаратів ХМТ/цитостатиків в останні 6 місяців, вагітність.

У дослідженні взяв участь 61 хворий на РС віком від 19 до 57 років, середній вік становив  $36,6 \pm 1,4$  року. Співвідношення жінок і чоловіків — 2,4 : 1. Жінок — 43 особи (70,5 %) віком 19–57 років (середній вік  $37,0 \pm 1,6$  року). Чоловіків у дослідній групі було 18 (29,5 %) віком від 20 до 52 років, середній вік становив  $35,8 \pm 2,6$  року.

Усіх пацієнтів із РС умовно поділили на 3 групи залежно від рівня 48 кДа форми неконвенційного міозину 1с у сироватці крові. У першій групі показник був меншим за 0,01 мкг/мл (низький рівень), у другій — 0,01–8,00 мкг/мл (середній рівень), а в третій — понад 8,00 мкг/мл (високий рівень).

У дослідженні використали такі методи: клінічні — аналіз скарг, анамнезу захворювання та життя, детальний соматичний та неврологічний огляди з оцінкою ступеня інвалідизації за шкалою EDSS Куртцке [23]; лабораторні — шляхом послідовного осадження сироваткових білків, електрофорезу та цифрового аналізу одержаних електрофореграм у сироватці крові хворих на розсіяний склероз визначали вміст 48 кДа Муо1с, при цьому наявність Муо1с підтверджували за допомогою вестерн-блоту з анти-Муо1с антитілами [20]; інструментальні — магнітно-резонансна томографія головного та/або спинного мозку (лише для діагностики РС).

Статистична обробка отриманих результатів була проведена за допомогою комп'ютерної програми Statistica 6.0 (StatSoft, Inc.). Характер розподілу отриманих варіаційних рядів було перевірено за допомогою критерію Шапіро — Франсія, що засвідчив правильний характер розподілу даних.

При виконанні статистичної обробки отриманих даних було застосовано такі методи: розрахунок середнього арифметичного та його середньої похибки ( $M \pm m$ ); проведення оцінки вірогідності різниці отриманих результатів у порівнюваних групах (критерій Стьюдента). Відмінності визнавалися вірогідними при  $p < 0,05$ .

## Результати та обговорення

Першочергово було оцінено залежність рівня 48 кДа Муо1с у сироватці крові хворих на РС від віку дебюту цього захворювання (табл. 1).

Хоча у групі осіб з високим рівнем 48 кДа Муо1с середній вік хворих на момент початку захворювання був найнижчим, вірогідних статистичних залежностей між концентрацією 48 кДа Муо1с в сироватці крові хворих та віком дебюту РС не було виявлено.

Проаналізували структуру неврологічних проявів при дебюті захворювання в групах пацієнтів, поділених за рівнем 48 кДа Муо1с у сироватці крові (табл. 2).

**Таблиця 1. Зміни рівня 48 кДа Муо1с у сироватці крові хворих на РС залежно від віку дебюту захворювання (середні значення досліджуваного показника та його середня похибка ( $M \pm m$ ), роки)**

Досліджуваний показник	Групи пацієнтів залежно від рівня 48 кДа Муо1с у сироватці крові		
	1-ша група, < 0,01 мкг/мл (n = 42)	2-га група, 0,01–8,00 мкг/мл (n = 13)	3-тя група, > 8,00 мкг/мл (n = 6)
Вік дебюту РС	$30,42 \pm 1,50$	$26,54 \pm 2,10$	$24,25 \pm 3,78$

**Таблиця 2. Структура неврологічних симптомів дебюту захворювання у хворих на РС залежно від рівня 48 кДа Муо1с у сироватці крові (середні значення досліджуваного показника та його середня похибка ( $M \pm m$ ), %)**

Досліджуваний показник	Групи пацієнтів залежно від рівня 48 кДа Муо1с у сироватці крові		
	1-ша група, < 0,01 мкг/мл (n = 42)	2-га група, 0,01–8,00 мкг/мл (n = 13)	3-тя група, > 8,00 мкг/мл (n = 6)
Атаксія	$26,19 \pm 6,78$	$7,69 \pm 7,40$	$33,33 \pm 19,25$
Порушення чутливості	$23,81 \pm 6,57$	$30,77 \pm 12,80$	$33,33 \pm 19,25$
Пірамідна симптоматика	$33,33 \pm 7,27$	$23,08 \pm 11,70$	$16,67 \pm 15,21$
Порушення гостроти зору	$23,81 \pm 6,57$	$61,54 \pm 13,50^*$	$16,67 \pm 15,21^{**}$
Сфінктерні розлади	$4,76 \pm 3,29$	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$
Окорухові розлади	$11,90 \pm 5,00$	$0 \pm 0^*$	$0 \pm 0^{\#}$
Ураження лицевого нерва	$2,38 \pm 2,35$	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$
Дизартрія	$2,38 \pm 2,35$	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$
Порушення слуху	$2,38 \pm 2,35$	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$
Загальна слабкість	$2,38 \pm 2,35$	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$

**Примітки:** \* — вірогідна відмінність показників між 1-ю і 2-ю групами при  $p < 0,05$ ; \*\* — вірогідна відмінність показників між 2-ю і 3-ю групами при  $p < 0,05$ ; # — вірогідна відмінність показників між 1-ю і 3-ю групами при  $p < 0,05$ .

**Таблиця 3. Зміни рівня 48 кДа Муо1с у сироватці крові хворих на РС залежно від активності захворювання (загострення/ремісія) на момент огляду (середні значення досліджуваного показника та його середня похибка ( $M \pm m$ ), %)**

Період хвороби	Групи пацієнтів залежно від рівня 48 кДа Муо1с у сироватці крові		
	1-ша група, < 0,01 мкг/мл (n = 42)	2-га група, 0,01–8,00 мкг/мл (n = 13)	3-тя група, > 8,00 мкг/мл (n = 6)
Загострення	66,67 ± 7,27	53,85 ± 13,80	50,00 ± 20,41
Ремісія	33,33 ± 7,27	46,15 ± 13,80	50,00 ± 20,41

Встановили, що дебют хвороби вірогідно частіше траплявся у вигляді порушення гостроти зору в групі із середнім рівнем 48 кДа Муо1с ( $61,54 \pm 13,50$  %) порівняно з двома іншими групами ( $23,81 \pm 6,57$  % для 1-ї групи та  $16,67 \pm 15,21$  % — для 3-ї). У той же час дебют з окорухових розладів значущо превалював у групі з низьким рівнем 48 кДа Муо1с ( $11,90 \pm 5,00$  % проти  $0 \pm 0$  % у двох інших групах,  $p < 0,05$ ). Початок захворювання із появи окорухових розладів вважається прогностично несприятливим [24], а низький рівень 48 кДа Муо1с і, відповідно, знижений апоптоз активованих В-клітин, очевидно, й пояснюють більш тяжку клінічну картину захворювання.

Велика кількість біомаркерів при РС є маркерами загального запалення, тож їх використання обмежене стадією активності хвороби [25]. З метою перевірки можливості використання 48 кДа Муо1с як біомаркера при будь-якій активності захворювання дослідили залежність між рівнем 48 кДа Муо1с у сироватці крові хворих на РС та активністю захворювання на момент огляду та забору крові в пацієнтів (табл. 3).

Рівень 48 кДа Муо1с у сироватці крові обстежених осіб статистично вірогідно не залежав від активності захворювання у хворих на РС на момент огляду та забору крові. Це передбачає можливість проведення оцінки активності процесу апоптозу автореактивних В-лімфоцитів за допомогою пропонованого біомаркера не лише при загостренні РС, а й у ремісії, що узгоджується з даними про наявність перманентного аутоімунного процесу при РС [26].

Відкриття нових, центральних механізмів участі В-клітин у патогенезі РС призвело до формування нової концепції: В-лімфоцити як терапевтична мішень при РС [27]. Це в подальшому відобразилось появою препаратів ХМТ класу моноклональних антитіл проти компонентів В-клітин. Станом на сьогодні ці препарати проходять I–III фази клінічних випробувань, а один із них — Окрелізумаб (гуманізоване анти-CD20 моноклональне антитіло) — вже затверджений американською асоціацією FDA як перший та єдиний препарат для лікування як РР, так і ПП РС [28]. У свою чергу, 48 кДа Муо1с має хороші шанси стати біомаркером терапевтичної ефективності при використанні засобів ХМТ, що впливають на В-лімфоцити.

## Висновки

Дослідження В-лімфоцитів та їх ролі в імунній відповіді раніше традиційно були зосереджені на їх потенціалі диференціюватися в клітини, що продукують

антитіла. Проте останніми роками було доведено важливу роль В-клітин у антитіло-незалежних функціях імунної системи.

При дебюті РС у вигляді порушення гостроти зору в сироватці крові хворих вірогідно частіше виявляли середній рівень 48 кДа Муо1с. При дебюті з окорухових розладів — низький рівень, що вказує на менш сприятливий перебіг захворювання внаслідок зниженого апоптозу автореактивних В-лімфоцитів.

Використання при РС моноклональних антитіл проти компонентів В-клітин має як патогенетичне підґрунтя, так і доведені добрі результати клінічних досліджень, зокрема вперше при первинно-прогресуючому РС. Це підтверджує можливість застосування 48 кДа Муо1с як біомаркера оцінки ефективності даного виду терапії за будь-якої активності патологічного процесу.

**Конфлікт інтересів.** Не заявлений.

## Список літератури

- Lassmann H., Brück W., Lucchinetti C.F. *The immunopathology of multiple sclerosis: an overview* // *Brain Pathol.* — 2007. — Vol. 17. — P. 210–8. doi:10.1111/j.1750-3639.2007.00064.x.
- Соколова Л.И. *К вопросу о современных методах диагностики и лечения рассеянного склероза* // *Мед. вестник.* — 2008. — № 1. — С. 28–32.
- Евтушенко С.К., Москаленко М.А. *Рассеянный склероз у детей.* — К., 2009. — 385 с.
- Волошина Н.П., Левченко Г.Л. *Фармакоекономічне обґрунтування патогенетичного лікування розсіяного склерозу* // *Міжнародний неврологічний журнал.* — 2006. — № 4. — С. 91–98.
- Weiner H.L. *Multiple sclerosis is an inflammatory T-cell-mediated autoimmune disease* // *Archives of Neurology.* — 2004. — Vol. 61(10). — P. 1613–1615. doi:10.1001/archneur.61.10.1613.
- O'Brien K., Gran B., Rostami A. *T-cell based immunotherapy in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiplesclerosis* // *Immunotherapy.* — 2010. — Vol. 2(1). — P. 99–115.
- Disanto G., Morahan J.M., Barnett M.H., Giovannoni G., Ramagopalan S.V. *The evidence for a role of B cells in multiple sclerosis* // *Neurology.* — 2012. — Vol. 78(11). — P. 823–832. doi:10.1212/WNL.0b013e318249f6f0.
- Miljković D., Spasojević I. *Multiple Sclerosis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities* // *Antioxid Redox Signal.* — 2013. — Vol. 19(18). — P. 2286–334. doi:10.1089/ars.2012.5068.
- Шоробура М.С., Негрич Т.І., Стойка Р.С. *Здатність імуноглобулінів сироватки крові хворих на розсіяний склероз різного віку (діти й дорослі особи) впливати на імунокомпетентні клітини* // *Міжнародний неврологічний журнал.* — 2008. — Т. 2(18).

10. Villar L.M., Masterman T., Casanova B., Gómez-Rial J., Espiño M., Sádaba M.C. et al. CSF oligoclonal band patterns reveal disease heterogeneity in multiple sclerosis // *J. Neuroimmunol.* — 2009. — Vol. 211. — P. 101-4. doi:10.1016/j.jneuroim.2009.03.003.
11. Dobson R., Ramagopalan S., Davis A., Giovannoni G. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in multiple sclerosis and clinically isolated syndromes: a meta-analysis of prevalence, prognosis and effect of latitude // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* — 2013. — Vol. 84. — P. 909-14. doi:10.1136/jnnp-2012-304695.
12. Meinl E., Krumbholz M., Hohlfeld R. B lineage cells in the inflammatory central nervous system environment: migration, maintenance, local antibody production, and therapeutic modulation // *Ann. Neurol.* — 2006. — Vol. 59. — P. 880-92. doi:10.1002/ana.20890.
13. Polman C.H., Reingold S.C., Banwell B. et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria // *Ann. Neurol.* — 2011. — Vol. 69(2). — P. 292-302. doi:10.1002/ana.22366.
14. Franciotta D., Salvetti M., Lolli F., Serafini B., Aloisi F. B cells and multiple sclerosis // *The Lancet Neurology.* — 2008. — Vol. 7(9). — P. 852-858. doi:10.1016/S1474-4422(08)70192-3.
15. Link H., Huang Y.M. Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness // *Journal of neuroimmunology.* — 2006. — Vol. 180(1). — P. 17-28. doi:10.1016/j.jneuroim.2006.07.006.
16. Ireland S.J., Blazek M., Harp C.T., Greenberg B., Frohman E.M., Davis L.S., Monson N.L. Antibody-independent B cell effector functions in relapsing remitting multiple sclerosis: clues to increased inflammatory and reduced regulatory B cell capacity // *Autoimmunity.* — 2012. — Vol. 45(5). — P. 400-414. doi:10.3109/0891934.2012.665529.
17. Lisak R.P., Benjamins J.A., Nedelkoska L., Barger J.L., Ragheb S., Fan B., Bar-Or A. Secretory products of multiple sclerosis B cells are cytotoxic to oligodendroglia in vitro // *Journal of neuroimmunology.* — 2012. — Vol. 246(1). — P. 85-95. doi:10.1016/j.jneuroim.2012.02.015.
18. Magliozzi R., Howell O.W., Reeves C., Roncaroli F., Nicholas R., Serafini B. et al. A Gradient of neuronal loss and meningeal inflammation in multiple sclerosis // *Annals of neurology.* — 2010. — Vol. 68(4). — P. 477-493. doi:10.1002/ana.22230.
19. Howell O.W., Reeves C.A., Nicholas R., Carassiti D., Radotra B., Gentleman S.M. et al. Meningeal inflammation is wide spread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis // *Brain.* — 2011. — Vol. 134(9). — P. 2755-2771. doi:10.1093/brain/awr182.
20. Myronovkij S., Negrych N., Nehrych T. et al. Identification of a 48 kDa form of unconventional myosin 1c in blood serum of patients with autoimmune diseases // *Biochemistry and Biophysics Reports.* — 2016. — Vol. 5. — P. 175-179. doi:10.1016/j.bbrep.2015.12.001.
21. Maravillas-Montero J., Gillespie P., Patiño-López G. et al. Myosin 1c participates in B cell cytoskeleton rearrangements, is recruited to the immunologic synapse, and contributes to antigen presentation // *J. Immunol.* — 2011. — Vol. 187(6). — P. 3053-3063. doi:10.4049/jimmunol.1004018.
22. Cencioni M.T., Santini S., Ruocco G. et al. FAS-ligand regulates differential activation-induced cell death of human T-helper 1 and 17 cells in healthy donors and multiple sclerosis patients // *Cell Death and Disease.* — 2015. — Vol. 6. — P. e1741. doi:10.1038/cddis.2015.100.
23. Kurtzke J.F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS) // *Neurology.* — 1983. — Vol. 33 (11). — P. 1444-52. doi:10.1212/WNL.33.11.1444.
24. Confavreux C., Vukusic S. The clinical course of multiple sclerosis // *Handbook of Clinical Neurology.* — 2014. — Vol. 122. — P. 343-369. doi:10.1016/B978-0-444-52001-2.00014-5.
25. Housley W.J., Pitt D., Hafler D.A. Biomarkers in multiple sclerosis // *Clinical Immunology.* — 2015. — Vol. 161(1). — P. 51-58. doi:10.1016/j.clim.2015.06.015.
26. Frischer J.M., Bramow S., Dal-Bianco A. et al. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains // *Brain.* — 2009. — Vol. 132(5). — P. 1175-1189. doi:10.1093/brain/awp070.
27. Dalakas MC. B cells as therapeutic targets in autoimmune neurological disorders // *Nature Clinical Practice Neurology.* — 2008. — Vol. 4(10). — P. 557-567. doi:10.1038/ncpneuro0901.
28. Montalban X., Hauser S.L., Kappos L., Lapierre Y., O'Connor P., Devonshire V. et al. Ocrelizumab in Primary Progressive and Relapsing Multiple Sclerosis // *N. Engl. J. Med.* — 2017. — Vol. 376. — P. 1692-1694. doi:10.1056/NEJMc1702076.

Отримано 07.02.2017 ■

Негрич Н.О.<sup>1</sup>, Мироновский С.Л.<sup>2</sup>, Негрич Т.І.<sup>1</sup>, Кит Ю.Я.<sup>2</sup>, Стойка Р.С.<sup>2</sup><sup>1</sup>Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого, г. Львов, Украина<sup>2</sup>Институт биологии клетки, Национальная академия наук Украины, г. Львов, Украина

### Современное представление о роли В-лимфоцитов в патогенезе рассеянного склероза: использование В-клеточных биомаркеров в клинической практике

**Резюме. Актуальность.** Целью работы было исследовать взаимосвязь между уровнем 48 кДа формы неконвенционного миозина 1с (48 кДа Myo1c) (маркер апоптоза В-клеток) в сыворотке крови больных рассеянным склерозом (РС) и особенностями дебюта заболевания в контексте современного представления о ключевой роли В-лимфоцитов на начальной стадии патологического процесса при РС. **Материалы и методы.** В исследовании приняли участие 61 больной с РС и 20 практически здоровых доноров в возрасте от 19 до 57 лет. Методы исследования: клинические — анализ жалоб, анамнеза заболевания и жизни, общий и неврологический осмотр; лабораторные — путем последовательного осажде-

ния сывороточных белков, электрофореза и цифрового анализа полученных электрофореграмм сыворотки крови больных РС определяют содержание 48 кДа Myo1c, при этом присутствие Myo1c подтверждают с помощью вестерн-блоттинга с анти-Myo1c антителами. **Результаты.** В группе больных РС с высоким уровнем 48 кДа Myo1c средний возраст обследованных на момент начала заболевания был самым низким, однако достоверных статистических зависимостей между концентрацией 48 кДа Myo1c в сыворотке крови больных и возрастом пациентов при дебюте РС не было обнаружено. При начале болезни в виде нарушения остроты зрения в сыворотке крови больных достоверно чаще обнаруживали

средний уровень 48 кДа Myo1c, а при дебюте с глазодвигательных расстройств — низкий уровень, что указывает на менее благоприятное течение заболевания вследствие сниженного апоптоза аутореактивных В-лимфоцитов. Уровень 48 кДа Myo1c в сыворотке крови обследованных лиц статистически достоверно не зависел от активности заболевания у больных РС на момент осмотра и забора крови, а следовательно, использование данного биомаркера возможно не только при обострении болезни, но и в ремиссии. **Выводы.** Современные исследования доказывают, что при РС В-лимфоциты участвуют не только в синтезе олигоклональ-

ных аутоантител, а также в антителонезависимых механизмах, прежде всего в презентации антигенов Т-лимфоцитам, синтезе провоспалительных цитокинов, образовании эктопических лимфоидных фолликулоподобных скоплений в центральной нервной системе. Именно поэтому является обоснованным использование В-клеточных маркеров, в том числе 48 кДа Myo1c, в клинической практике, в частности для прогнозирования агрессивности течения РС и оценки эффективности болезнь-модифицирующей терапии.

**Ключевые слова:** рассеянный склероз; В-лимфоциты; биомаркеры; неконвенционный миозин

N.O. Negrych<sup>1</sup>, S.L. Myronovskij<sup>2</sup>, T.I. Nehrych<sup>1</sup>, Yu.Ya. Kit<sup>2</sup>, R.S. Stoika<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

<sup>2</sup>Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv, Ukraine

### Modern aspects of B lymphocytes in the pathogenesis of multiple sclerosis: the use of B-cell biomarkers in clinical practice

**Abstract. Background.** The purpose was to investigate the correlation between the level of 48 kDa form of unconventional myosin 1c (48 kDa Myo1c) (marker of apoptosis in cells) in the blood serum of patients with multiple sclerosis (MS), and features of the disease debut in the context of the modern understanding of the key role of B lymphocytes even at the early stage of pathological process in MS. **Materials and methods.** 61 patients with multiple sclerosis and 20 healthy donors aged 19–57 years participated in the research. Methods of investigation: clinical (complaints, life and disease history, general and neurological examination), laboratory (identification of 48 kDa Myo1c in the blood serum by consequent serum protein sedimentation, electrophoresis and digital analysis of electrophoregrams; presence of Myo1c was confirmed by Western blot with anti-Myo1c antibodies). **Results.** In the group of MS patients with high level of 48 kDa Myo1c, the average age of the patients at the time of disease onset was the lowest, but significant statistical relationships between concentrations of 48 kDa Myo1c in the serum of patients and age of MS debut were not found. At the onset of MS as a reduction of visual acuity, the average level

of 48 kDa Myo1c in the blood serum of patients was revealed significantly more often, and at the onset of oculomotor disorders — a low level, indicating a less favorable course of the disease due to the low apoptosis of autoreactive lymphocytes. Levels of serum 48 kDa Myo1c were not significantly dependent on the disease activity in MS patients at the time of examination and blood sampling, and therefore the use of this biomarker is possible not only during the exacerbation of the disease, but also during remission. **Conclusions.** Modern researches show that in MS B lymphocytes are involved not only in the synthesis of oligoclonal autoantibodies, but also in the antibody-independent mechanisms, especially in the presentation of antigens to T cells, synthesis of pro-inflammatory cytokines, the formation of ectopic lymphoid follicle-like clusters in the central nervous system. Therefore, it is a reasonable to use B cell markers, including 48 kDa Myo1c, in clinical practice, particularly, to predict the course of MS aggressiveness and effectiveness of disease-modifying therapies.

**Keywords:** multiple sclerosis; B cells; biomarkers; unconventional myosin