

Лежнёва Вера Рунаровна

младший научный сотрудник
ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский)
федеральный университет»
г. Казань, Республика Татарстан

Давидюк Юрий Николаевич

канд. биол. наук, доцент, старший научный сотрудник
ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский)
федеральный университет»
г. Казань, Республика Татарстан

ведущий научный сотрудник
ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный
педагогический университет им. И.Н. Ульянова»
г. Ульяновск, Ульяновская область

Муллахметова Ася Радиковна

студентка
ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский)
федеральный университет»
г. Казань, Республика Татарстан

Ожегов Георгий Дмитриевич

младший научный сотрудник
ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский)
федеральный университет»
г. Казань, Республика Татарстан

Захаров Александр Владимирович

канд. мед. наук, доцент
ФГБОУ ВО «Самарский государственный
медицинский университет»
г. Самара, Самарская область

Ризванов Альберт Анатольевич

д-р биол. наук, профессор, директор
Научно-клинический центр прецизионной
и регенеративной медицины
ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский)
федеральный университет»
г. Казань, Республика Татарстан

Хайбуллина Светлана Францевна

д-р мед. наук, главный научный сотрудник
ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский)
федеральный университет»
г. Казань, Республика Татарстан

Мартынова Екатерина Владимировна

канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник
ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский)
федеральный университет»
г. Казань, Республика Татарстан

DOI 10.31483/r-102300

АНТИГЕРПЕСВИРУСНЫЕ АНТИТЕЛА В СЫВОРОТКЕ ПАЦИЕНТОВ С РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ В САМАРЕ

Аннотация: рассеянный склероз (РС) – это нейродегенеративное заболевание центральной нервной системы, причины которого в настоящее время остаются неизвестными. Выявление взаимосвязи между наличием антител IgG к нейротропным герпесвирусам и РС может служить диагностическим маркером развития заболевания. В результате определения уровня антител у больных РС установлено, что во время ремиссии у пациентов наблюдается статистически значимо большее количество IgG к цитомегаловирусу по сравнению с пациентами во время обострения заболевания. Полученные результаты позволяют выдвинуть предположение о влиянии цитомегаловируса на развитие РС.

Ключевые слова: рассеянный склероз, герпес, вирусы, антитела.

Актуальность: Рассеянный склероз (РС) – это нейродегенеративное заболевание центральной нервной системы, поражающее миелиновую оболочку нервных волокон и вследствие этого приводящее к стойкой инвалидизации пациентов [18]. Причины возникновения данного заболевания на данный момент не выяснены. В качестве факторов риска развития РС выделяют дозозависимое воздействие табачного дыма при активном или пассивном курении [9]. Также одним из значимых факторов окружающей среды является недостаточный уровень солнечного воздействия, потенциально влияющий на развитие РС как напрямую, так и через уровень витамина Д в организме пациентов [10].

Существует предположение о вирусной этиологии РС, однако на сегодняшний день конкретный вирус, вызывающий данный комплекс симптомов не обнаружен. В связи с гетерогенностью возможных этиологических факторов РС предполагается, что одной из причин заболевания может быть комплексная вирусная нагрузка на генетически предрасположенного к РС человека [14]. В ряде исследований была показана зависимость между наличием антител к вирусу Эпштейн Барра (ВЭБ) и риском развития РС [1; 15; 19]. Ещё одним доказательством вовлеченности ВЭБ в патогенез РС служит большая предрасположенность к развитию РС у детей, рожденных женщинами с повышенным уровнем IgG к ВЭБ во время беременности [20]. Также потенциально участвующими в развитии РС считаются Варицелла-Зостер вирус (ВЗВ) и цитомегаловирус (ЦМВ). Так, в популяционном исследовании 800 пациентов с РС и 1000 условно-здоровых контролей был обнаружен значительно более высокий титр антител к ВЗВ и ЦМВ у больных, что свидетельствует о значимой роли данных вирусов в патогенезе РС [11]. Одним из наиболее распространенных герпесвирусов, ассоциированных с РС, считается вирус герпеса человека шестого типа (ВГЧ-6) [17]. Было показано, что повышенный уровень титра антител к ВГЧ-6 имел прямую корреляцию с высокой вероятностью рецидива у пациентов с рецидивирующе-реммитирующим РС (РРРС) [23]. У серопозитивных по ВГЧ-6 пациентов с РС наблюдался также повышенный уровень провоспалительных

цитокинов в сыворотке крови, а значение показателей по расширенной шкале оценки степени инвалидизации (EDSS) было значительно выше, по сравнению с серонегативными пациентами [12]. Для установления достоверной взаимосвязи герпесвирусов с развитием заболевания и выявления их качестве потенциальной терапевтической и/или диагностической мишени, необходимо проведение большего количества исследований в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Таким образом, целью данного исследования было выявление корреляции между наличием гуморального иммунного ответа к герпесвирусам и риском развития РС в когорте пациентов из Самары.

Материалы и методы: 1. Пациенты и сбор образцов: Данное исследование было одобрено этической экспертной комиссией по биомедицине Республиканского клинического неврологического центра, Республика Татарстан, Российская Федерация (N:218, 15.11.2012). Все пациенты и условно-здоровые контроли, без рассеянного склероза подписали информированное согласие в соответствии с протоколом клинических и экспериментальных исследований. Диагноз РС был поставлен лечащим врачом согласно критериям Макдональда [26].

В ходе исследования были собраны 99 образцов крови от пациентов с рассеянным склерозом и 50 образцов от условно-здоровых контролей, без рассеянного склероза из Самарского Государственного Медицинского Университета (СамГМУ), кафедра неврологии и нейрохирургии (табл. 1).

Таблица 1

Клинические характеристики пациентов и условно-здоровых контролей, включенных в исследование.

	РС	Контроли
Общее количество, чел	99	50
Пол		
Мужской	38	12
Женский	61	37
Соотношение женщины : мужчины	1,60:1	3,08:1
Возраст на начало болезни		
Медиана	30	
Диапазон	12–51	

Течение заболевания		
КИС ¹	5 (5,05%)	
РРРС ²	79 (79,80%)	
ППРС ³	1 (1,01%)	
ВПРС ⁴	14 (14,14%)	
Образец забран во время обострения	15	
Образец забран во время ремиссии	81	
Лечение		
Интерфероны	20	
Иммунодепрессанты	32	
Иммуномодуляторы	14	
Значения MSSS		
0–3	34 (34,34%)	
3–6	36 (36,36%)	
6–10	29 (29,29%)	
Диапазон	0,19–9,35	
Медиана MSSS ⁵	3,69	

¹ КИС – клинически изолированный синдром, ² РРРС – рецидивирующе-реммитирующий РС, ³ ППРС – первично-прогрессирующий РС, ⁴ ВПРС – вторично-прогрессирующий РС, ⁵ MSSS – шкала оценки степени тяжести рассеянного склероза.

2. ИФА на ЭБВ, ВЗВ, ЦМВ, ВГЧ-6: ИФА на наличие антител класса IgG в сыворотке проводился с использованием наборов ННВ-6-IgG-ИФА-БЕСТ (кат. D2166, Вектор-Бест, Россия), ВектоVZV-IgG (кат. 2192, Вектор-Бест, Россия), ВектоЦМВ-IgG (кат. 1554, Вектор-Бест, Россия), ВектоВЭБ-НА-IgG (кат. 2170, Вектор-Бест, Россия) согласно прилагаемым инструкциям. В две лунки стрипа вносилось по 100 мкл отрицательного контрольного образца, в одну лунку вносили 100 мкл положительного контрольного образца. В остальные лунки вносили по 90 мкл раствора для разведения сывороток и по 10 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов сыворотки, перемешивали пипетированием. Планшет заклеивали плёнкой и инкубировали в термостате при температуре 37±1 °С в течение 30 минут. По окончании инкубации лунки планшета промывались 400 мкл промывочного раствора (ФСБ-Т) 5 раз, после промывки остатки влаги удалялись постукиванием планшетов по фильтровальной бумаге. Затем

во все лунки вносили по 100 мкл рабочего раствора конъюгата. Планшеты инкубировали в термостате при температуре 37 ± 1 °С в течение 30 минут. Затем планшеты снова промывались, как описано выше. После промывки во все лунки добавляли по 100 мкл раствора тетраметилбензидина (ТМБ) и инкубировали в защищенном от света месте в течение 25 минут при комнатной температуре. После инкубации, для завершения реакции окрашивания, в каждую лунку добавляли по 100 мкл стоп-реагента. Величину оптической плотности растворов в лунках измеряли на спектрофотометре вертикального сканирования Infinite 200 PRO (Tecan Trading AG, Швейцария) при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения 620 нм.

3. Статистический анализ: Анализ данных ИФА проводили с использованием двустороннего точного критерия Фишера.

Результаты: в ходе анализа сравнивались качественные показатели по наличию анти-герпесвирусных IgG в группах пациентов ($n = 99$) и контролей ($n = 50$) и устанавливалась корреляция между данными показателями и РС. Антитела к ВЗВ были обнаружены у 87 пациентов с РС и 44 контролей ($p > 0,999$), к ЦМВ 85 пациентов и 42 контролей ($p = 0,999$), к ВЭБ 98 пациентов и 50 контролей ($p > 0,999$), к ВГЧ-6 62 пациента и 31 контроля ($p > 0,999$).

Также, с помощью ИФА было обнаружено 59 пациентов с лечением и 29 без лечения пациентов серопозитивных по ВЗВ ($p = 0,746$), 59 пациентов с лечением и 26 без лечения серопозитивных по ЦМВ ($p = 0,371$), 66 леченых и 32 пациента без лечения были позитивны по наличию IgG к ВЭБ ($p > 0,999$), 44 человека с лечением и 18 без лечения имели антитела к ВГЧ-6 ($p = 0,383$). В результате статистического анализа было установлено, что наличие антител к нейротропным герпесвирусам не коррелирует с наличием РС. Также, судя по полученным результатам, наличие терапии также не влияет на данные показатели у пациентов с РС.

В результате определения разницы между группами пациентов с ремиссией ($n = 84$) и во время обострения ($n = 15$) по наличию анти-герпесвирусных IgG установлено, что антитела к ВЗВ были обнаружены у 14 пациентов с

обострением и 73 пациентов в ремиссии ($p > 0,686$). У 14 пациентов во время обострения и 84 в ремиссии имели антитела к ВЭБ ($p = 0,152$), а 10 пациентов, сдавших кровь во время обострения и 52 человек во время ремиссии были серопозитивны по ВГЧ-6 ($p = 0,781$). Таким образом, в данных группах пациентов была выявлена статистически значимая разница в серопозитивности по отношению к ЦМВ у пациентов с РС во время ремиссии по сравнению с пациентами во время обострения ($p = 0,036$) (рис. 1).

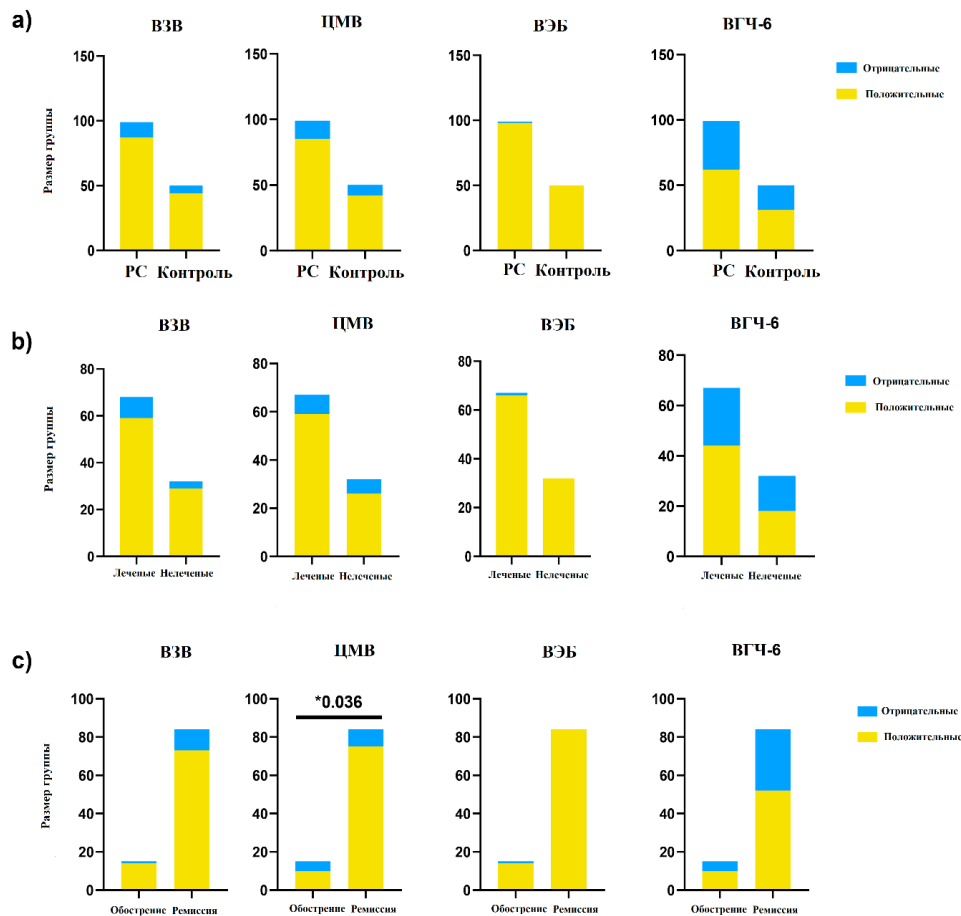


Рис. 1. Корреляционный анализ между сывороточными IgG и клинической картиной РС

а) – соотношение анти-ВЗВ, ЦМВ, ВЭБ и ВГЧ-6 положительных РС и контролей; б) – соотношение положительных и отрицательных образцов пациентов с РС на антитела к ВЗВ, ЦМВ, ВЭБ и ВГЧ-6, получающих и не получающих лечение; в) – соотношение положительных и отрицательных проб на антитела к ВЗВ, ЦМВ, ВЭБ и ВГЧ-6 при РС в период рецидива и ремиссии.

Обсуждение: В настоящее время РС является неизлечимым заболеванием и в некоторых случаях сложно поддающимся терапии. На данный момент специфические методы лечения находятся только на стадии разработки. Однако, раннее начало приёма препаратов достоверно снижает скорость развития инвалидизации пациентов. Сложность диагностики РС заключается в том, что до сих пор не известны точные причины развития заболевания, а также связана с поздним началом неврологических симптомов. В данном исследовании нами было проведено исследование 99 пациентов с РС и 50 представителей контрольной группы из Самары по присутствию гуморального иммунного ответа к нейротропным вирусам.

Так как вирусы семейства *Herpesviridae* часто ассоциируются с наличием РС у пациентов, нами была изучена наличие гуморального иммунного ответа на вирус Эпштейн-Барр (ВЭБ), Варицелла-Зостер (ВЗВ), Цитомегаловирус (ЦМВ) и вирус герпеса человека 6 типа (ВГЧ-6) [3; 6; 22]. Изученные нами вирусы имеют способность персистировать в организме человека в латентном состоянии после первого случая заражения в определённых клетках и тканях, что затрудняет их идентификацию [4; 27]. Однако при воздействии провоцирующих факторов, данные вирусы имеют способность реактивироваться и возобновлять инфицирование новых клеток [28]. Возможно поэтому до сих пор многие ученые получают противоположные результаты в отношении наличия вирусной ДНК у пациентов с РС [2].

Интересно, что в когорте пациентов с РС из Швеции было обнаружено, что наличие антител к цитомегаловирусу коррелирует со сниженным риском развития РС [8], что весьма значимо противоречит предыдущим исследованиям [11]. Получены сведения о том, что В-клетки памяти у серонегативных по отношению к ЦМВ пациентов с РС проявляют повышенную секрецию провоспалительных цитокинов [29], что может указывать на положительный эффект данного вируса на течение РС. Однако, такие противоречивые результаты могут зависеть от региона проживания, что подтверждается результатами мета-анализов [25]. При этом в нашем исследовании мы не обнаружили статистиче-

ски значимой разницы в присутствии ДНК ЦМВ и антител к нему в исследуемой и контрольной группе. Согласно полученным нами данным, в когорте пациентов с РС из Самары во время ремиссии наблюдается статистически значительно больше количество IgG к ЦМВ, чем у пациентов во время обострения. Возможно, это указывает на то, что у пациентов сформировался вторичный иммунный ответ после инфицирования или реактивации ЦМВ при обострении. Однако, мы не обнаружили статистически значимого увеличения содержания матрицы ЦМВ у пациентов во время обострения. Таким образом, мы предполагаем, что скорее всего ЦМВ не играет триггерную роль при обострении РС, однако это не может свидетельствовать о его невовлеченности в патогенез РС.

В когорте пациентов из Польши было обнаружено статистически значительно большее содержание антител к ВЭБ и ВГЧ-6 по сравнению с контрольной группой [5]. У пациентов с РРРС и КИС из Северной Германии обнаружена 100% серопозитивность к ВЭБ [1]. В популяции пациентов из Кипра также обнаружено статистически значительно большее количество антител к ВЭБ у пациентов с РС и также установлено, что инфекция не находится в острой стадии [6]. В выборке пациентов из Берлина присутствие антител к ВЭБ превышало значение в контрольной группе, при этом нагрузка вирусной ДНК в слюне не отличалась между исследуемой и контрольной группой, а также они обнаружили, что уровень антител к ВЭБ и ДНК в сыворотке и слюне не коррелирует с прогрессированием заболевания [7]. В исследовании пациентов из южной Тасмании повышенный титр антител к ВГЧ-6 свидетельствовал о высокой вероятности возникновения рецидива РС [23]. В нашем исследовании мы не обнаружили статистически значимой корреляции между наличием IgG и ДНК ВЭБ и ВГЧ-6 в группах пациентов с РС и здоровых людей, а также различия в данных показателях в зависимости от наличия терапии или обострения. Исходя из этого, можно предположить, что данные вирусы скорее всего не являются триггерными факторами обострений заболевания. Также мы можем предположить, что применявшаяся в данной выборке терапия не влияет на иммунный ответ и персистенцию данных вирусов в крови пациентов с РС.

Было обнаружено, что вирусная ДНК ВЗВ присутствует в 100% образцов спинномозговой жидкости (СМЖ) пациентов во время обострения и в 31% образцов во время ремиссии, а также большее количество ДНК ВЗВ было найдено в СМЖ по сравнению с моноклеарами периферической крови у пациентов с прогрессирующим РС [24]. Результаты исследования крови пациентов в популяции северного Ирана показали, что наличие ДНК ВЗВ статистически значимо коррелирует с РС, однако корреляции с наличием антител к данному вирусу обнаружено не было [21]. В популяции Иордании у пациентов с РС было обнаружено преобладающее количество антител к ВЗВ [13], но стоит учитывать, что образцы были собраны без учета обострений. Однако, в нашем исследовании мы не обнаружили статистически значимой разницы в присутствии ДНК ВЗВ и антител к нему в исследуемых группах и группах сравнения. Таким образом, мы предполагаем, что данный вирус не имеет влияния на развитие РС, а также не связан с обострениями заболевания. При этом наличие терапии не влияет на иммунный ответ к ВЗВ и реактивацию вируса.

Остается актуальным вопрос об участии нейротропных герпесвирусов в патогенезе РС, так как существует множество исследований с противоречивыми результатами. И до сих пор не известно, являются ли эти вирусы триггерами обострений или способствуют развитию рассеянного склероза. Наши данные указывают на возможную роль ЦМВ в патогенезе РС. Поэтому представляется обоснованным включение препаратов используемых для лечения ЦМВ инфекции в протокол лечения РС.

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета.

References

1. Abrahamyan S. et al. Complete Epstein-Barr virus seropositivity in a large cohort of patients with early multiple sclerosis // Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry. – 2020. – Т. 91. №. 7. – С. 681–686.

2. Asouri M. et al. Molecular Detection of Epstein-Barr Virus, Human Herpes Virus 6, Cytomegalovirus, and Hepatitis B Virus in Patients with Multiple Sclerosis // Middle East journal of digestive diseases. – 2020. – T. 12. №3. – C. 171.
3. Biström M. et al. Epstein-Barr virus infection after adolescence and human herpesvirus 6A as risk factors for multiple sclerosis // European journal of neurology. – 2021. – T. 28. №2. – C. 579–586.
4. Chen J. J. et al. Varicella zoster virus (VZV) infects and establishes latency in enteric neurons // Journal of neurovirology. – 2011. – T. 17. №6. – C. 578–589.
5. Czarnowska A. et al. Herpesviridae seropositivity in patients with multiple sclerosis: first Polish study // European neurology. – 2018. – T. 80. №5–6. – C. 229–235.
6. Deeba E. et al. Evaluation of Epstein-Barr virus-specific antibodies in Cypriot multiple sclerosis patients // Molecular immunology. – 2019. – T. 105. – C. 270–275.
7. Gieß R. M. et al. Epstein-Barr virus antibodies in serum and DNA load in saliva are not associated with radiological or clinical disease activity in patients with early multiple sclerosis // PloS one. – 2017. – T. 12. №4. – C. e0175279.
8. Grut V. et al. Cytomegalovirus seropositivity is associated with reduced risk of multiple sclerosis—a presymptomatic case-control study // European journal of neurology. – 2021. – T. 28. №. 9. – C. 3072–3079.
9. Hedström A.K., Olsson T., Alfredsson L. Smoking is a major preventable risk factor for multiple sclerosis // Multiple Sclerosis Journal. – 2016. – T. 22. №8. – C. 1021–1026.
10. Hedström A. K. et al. Low sun exposure increases multiple sclerosis risk both directly and indirectly // Journal of neurology. – 2020. – T. 267. №4. – C. 1045–1052.
11. Karampoor S. et al. Cytomegalovirus and varicella zoster virus seropositivity of Iranian patients with multiple sclerosis: A population-based study // Journal of neuroimmunology. – 2017. – T. 309. – C. 4–6.

12. Keyvani H. et al. The role of human herpesvirus-6 and inflammatory markers in the pathogenesis of multiple sclerosis // *Journal of Neuroimmunology*. – 2020. – Т. 346. – С. 577313.
13. Kofahi R. M. et al. Prevalence of seropositivity of selected herpesviruses in patients with multiple sclerosis in the North of Jordan // *BMC neurology*. – 2020. – Т. 20. №1. – С. 1–8.
14. Krone B., Grange J. M. Multiple sclerosis: are protective immune mechanisms compromised by a complex infectious background? // *Autoimmune diseases*. – 2011. – Т. 2011.
15. Langer-Gould A. et al. Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, and multiple sclerosis susceptibility: A multiethnic study // *Neurology*. – 2017. – Т. 89. №13. – С. 1330–1337.
16. Lee H. L. et al. Serum Peptide Immunoglobulin G Autoantibody Response in Patients with Different Central Nervous System Inflammatory Demyelinating Disorders // *Diagnostics*. – 2021. – Т. 11. №8. – С. 1339.
17. Leibovitch E. C., Jacobson S. Evidence linking HHV-6 with multiple sclerosis: an update // *Current opinion in virology*. – 2014. – Т. 9. – С. 127–133.
18. Leray E. et al. Epidemiology of multiple sclerosis // *Revue neurologique*. – 2016. – Т. 172. №. 1. – С. 3–13.
19. Levin L. I. et al. Primary infection with the Epstein-Barr virus and risk of multiple sclerosis // *Annals of neurology*. – 2010. – Т. 67. №. 6. – С. 824–830.
20. Munger K.L. et al. Epstein-barr virus and multiple sclerosis risk in the finnish maternity cohort // *Annals of neurology*. – 2019. – Т. 86. №3. – С. 436–442.
21. Najafi S. et al. The high prevalence of the varicella zoster virus in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a case-control study in the north of Iran // *Jundishapur Journal of Microbiology*. – 2016. – Т. 9. №3.
22. Rice E. M., Thakolwiboon S., Avila M. Geographic heterogeneity in the association of varicella-zoster virus seropositivity and multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis // *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. – 2021. – Т. 53. – С. 103024.

23. Simpson Jr S. et al. Anti-HHV-6 IgG titer significantly predicts subsequent relapse risk in multiple sclerosis // *Multiple Sclerosis Journal*. – 2012. – T. 18. №6. – C. 799–806.
24. Sotelo J. et al. The participation of varicella zoster virus in relapses of multiple sclerosis // *Clinical neurology and neurosurgery*. – 2014. – T. 119. – C. 44–48.
25. Thakolwiboon S. et al. Regional differences in the association of cytomegalovirus seropositivity and multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis // *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. – 2020. – T. 45. – C. 102393.
26. Thompson A. J. et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria // *The Lancet Neurology*. – 2018. – T. 17. №. 2. – C. 162–173.
27. Van Sciver N. et al. $\Delta Np63\alpha$ promotes Epstein-Barr virus latency in undifferentiated epithelial cells // *PLoS pathogens*. – 2021. – T. 17. №11. – C. e1010045.
28. Yang Y., Gao F. Clinical characteristics of primary and reactivated Epstein-Barr virus infection in children // *Journal of medical virology*. – 2020. – T. 92. №12. – C. 3709–3716.
29. Zabalza A. et al. Impact of cytomegalovirus infection on B cell differentiation and cytokine production in multiple sclerosis // *Journal of neuroinflammation*. – 2020. – T. 17. №1. – C. 1–8.