

УДК 571.27

УРОВЕНЬ ПРОТИВОВИРУСНЫХ АНТИТЕЛ К БЕЛКУ EBNA-1 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ НЕ ЗАВИСИТ ОТ ТЯЖЕСТИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

© 2024 г. Л. А. Овчинникова¹, С. С. Джелад¹, Т. О. Симанив², М. Н. Захарова²,
академик РАН А. Г. Габиров^{1, 3, *}, Я. А. Ломакин^{1, **}

Поступило 10.11.2023 г.

После доработки 22.11.2023 г.

Принято к публикации 23.11.2023 г.

Рассеянный склероз (РС) – иммунноопосредованное демиелинизирующее заболевание, без терапии приводящее к глубокой инвалидизации. РС поражает около 1% населения Земли трудоспособного возраста, преимущественно женщин. Механизмы, запускающие развитие РС, остаются непознанными, что служит причиной трудностей в выборе терапии. В связи с этим исследования в области активации процесса демиелинизации приобретают особое значение. Недавние работы выявили прямую корреляцию риска развития РС с инфицированием вирусом Эпштейна-Барр (ВЭБ). В результате анализа титра ВЭБ-специфичных антител среди больных РС и здоровых доноров русской этнической группы было подтверждено, что РС характеризуется повышенным уровнем сывороточных IgG, связывающих EBNA-1 (EBV nuclear antigen 1). Количество пациентов с повышенным уровнем EBNA-1-специфичных антител статистически достоверно не различается у двух групп с диаметрально противоположными течениями РС: доброкачественным РС или высокоактивным РС. Мы предполагаем, что основной вклад ВЭБ в развитии РС обусловлен инициацией заболевания и не влияет на тяжесть его течения.

Ключевые слова: рассеянный склероз, РС, EBNA-1, аутоантитела, ВЭБ, вирус Эпштейна – Барр.

DOI: 10.31857/S2686738924020174, **EDN:** WEJGMJ

Рассеянный склероз (РС) – хроническое иммунноопосредованное демиелинизирующее заболевание центральной нервной системы (ЦНС). РС – крайне гетерогенное заболевание, развитие которого может быть спровоцировано сочетанием таких факторов, как генетическая предрасположенность, бактериальные и вирусные инфекции (в первую очередь – герпесвирусы), неблагоприятная окружающая среда и наличие вредных привычек [1]. При этом механизм инициации данного заболевания до конца не установлен. В последнее десятилетие особую роль в развитии данного заболевания отводят вирусу Эпштейна – Барр (ВЭБ)

[2,3]. Было показано, что риск развития РС увеличивается в 32 раза при инфицировании ВЭБ [2]. При этом противовирусные антитела обнаруживаются в крови в среднем за 10 лет до первых клинических проявлений РС [4]. Вирус поражает В-клетки человека и после этого переходит в латентную фазу, во время которой экспрессия вирусных белков заметно снижается по сравнению с активной инфекцией [5]. Данный процесс частично способствует сохранению инфицированных В-клеток и поддержанию инфекции в организме человека. Однако наиболее важные для поддержания жизнедеятельности ВЭБ-белки, среди которых наиболее изучен ядерный антиген-1 (EBNA-1), необходимый для сохранения вирусного генома, продолжают экспрессироваться даже в латентной фазе [6].

Ранее у пациентов с РС было показано наличие кросс-реактивных моноклональных антител, одновременно узнающих фрагмент вирусного антигена EBNA-1 (386–405 а.о.) и аутоантигена глиальных клеток GlialCAM (370–389 а.о.) [7]. Изучение титра антител к вирусным антигенам у пациентов с РС поможет прояснить, как связаны между собой уровень активации иммунной системы при ответе

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

² Научный центр неврологии, Москва, Россия

³ Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

*E-mail: gabibov@gmail.com

**E-mail: yasha.l@bk.ru

Таблица 1. Характеристика пациентов с РС, БАС, ЗСОНМ и здоровых доноров, участвующих в исследовании

	ЗД	РС	ДРС	ВАРС	БАС	ЗСОНМ
Количество	19	29	9	20	14	5
Возраст (лет)	42 ± 9	39 ± 11	48 ± 11	35 ± 8	56 ± 9	55 ± 18
Пол (% женщин)	52%	66%	75%	44%	64%	100%
Длительность заболевания 1–5 лет	—	51.7%	11.1%	70%	100%	60%
Длительность заболевания 6–10 лет	—	13.8%	11.1%	15%	—	20%
Длительность заболевания Более 10 лет	—	34.5%	77.8%	15%	—	20%
EDSS		3.7 ± 1.8	3.6 ± 1.7	3.8 ± 2.0	—	—

Примечание: ЗД – здоровые доноры; РС – рассеянный склероз; ДРС – доброкачественный РС; ВАРС – высокоактивный РС; EDSS – расширенная шкала нарушений жизнедеятельности Куртцке [12] (от 0 до 10, где 0 – норма, 10 – смерть от РС).

на ВЭБ и тяжесть протекания РС. Таким образом, целью нашего исследования являлось определение уровня противовирусных антител к EBNA-1 (386–405 а.о.) в крови пациентов с агрессивным течением РС (высокоактивный РС (ВАРС) и менее тяжелой формой заболевания – доброкачественным РС (ДРС) [8, 9].

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Определение количества антиген-специфичных антител к EBNA-1 (386–405 а.о.) в сыворотках крови пациентов с РС и здоровых доноров (ЗД) проводилось методом иммуноферментного анализа (ИФА). В данной работе мы рассматриваем два клинических варианта течения ремиттирующе-рецидивирующего РС – доброкачественный РС (ДРС) и более агрессивный – высокоактивный РС (ВАРС) [8, 9]. ДРС характеризуется медленной прогрессией при отсутствии специфичного лечения и относительно низким значением расширенной шкалы нарушений жизнедеятельности Куртцке (EDSS) – менее 4. При этом у пациентов с данной формой РС часто выявляются различные когнитивные нарушения [10]. Для более тяжелой формы заболевания – ВАРС характерны высокая скорость образования новых очагов демиелинизации в ЦНС и неполное восстановление в период ремиссии, наличие двух и более рецидивов за год [11]. Для сравнения РС с другими неврологическими заболеваниями мы измерили уровень противовирусных антиген-специфичных антител у пациентов с боковым амиотрофическим склерозом (БАС) и заболеваниями спектра оптиконевромиелита (ЗСОНМ). Данные заболевания характеризуются частично перекрывающейся с РС симптоматикой, однако их патогенез существенно отличается. Исследование уровня антительного ответа на вирусные антигены проводили на выборках ЗД ($n = 19$) и РС

($n = 29$) (с делением на ДРС ($n = 9$) и ВАРС ($n = 20$), БАС ($n = 14$), ЗСОНМ ($n = 5$)) (табл. 1).

Определение уровня антительного ответа проводилось с использованием химически синтезированного пептида EBNA-1 (386–405 а.о. – SQSSSSGSPRRPPPGRRPF) с чистотой >90%, что позволяет избежать ложно-положительного сигнала от связывания неспецифичными антителами сыворотки побочных продуктов, часто образующихся при прокариотической экспрессии белков. Пептид наносился на дно лунки сорбирующей плашки в концентрации 1 мкг/мл в карбонатном буфере (pH = 9.0), инкубация длилась 16 ч при +4 °С. Затем оставшиеся места связывания на дне лунки блокировались раствором 2% сухого обезжиренного молока в карбонатном буфере (pH = 9.0) в течение 1 ч при помешивании, 37 °С. Сыворотка крови разводилась в 100 раз в конъюгатном буфере (фосфатно-солевой буфер (pH = 7.4), 0.05% “Твин-20”, 0.5% сухого обезжиренного молока). После инкубации при комнатной температуре в течение 1 ч при помешивании, плашки отмывались 5 раз буфером для отмывки (фосфатно-солевой буфер (pH = 7.4), 0.1% “Твин-20”). Связавшиеся антитела детектировались вторичными антителами к F(ab')₂ фрагменту антител человека класса IgG, конъюгированными с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, A2290). После инкубации со вторичными антителами проводили 6 циклов отмывки с последующим добавлением 3, 3', 5, 5'-тетраметилбензидина гидрохлорида (ТМБ), который служит субстратом для пероксидазы хрена. Реакцию останавливали добавлением раствора 10%-ной серной кислоты. Регистрация сигнала связывания осуществлялась с использованием плащечного многофункционального анализатора Varioskan LUX при длине волны 450 нм. Для статистической обработки результатов

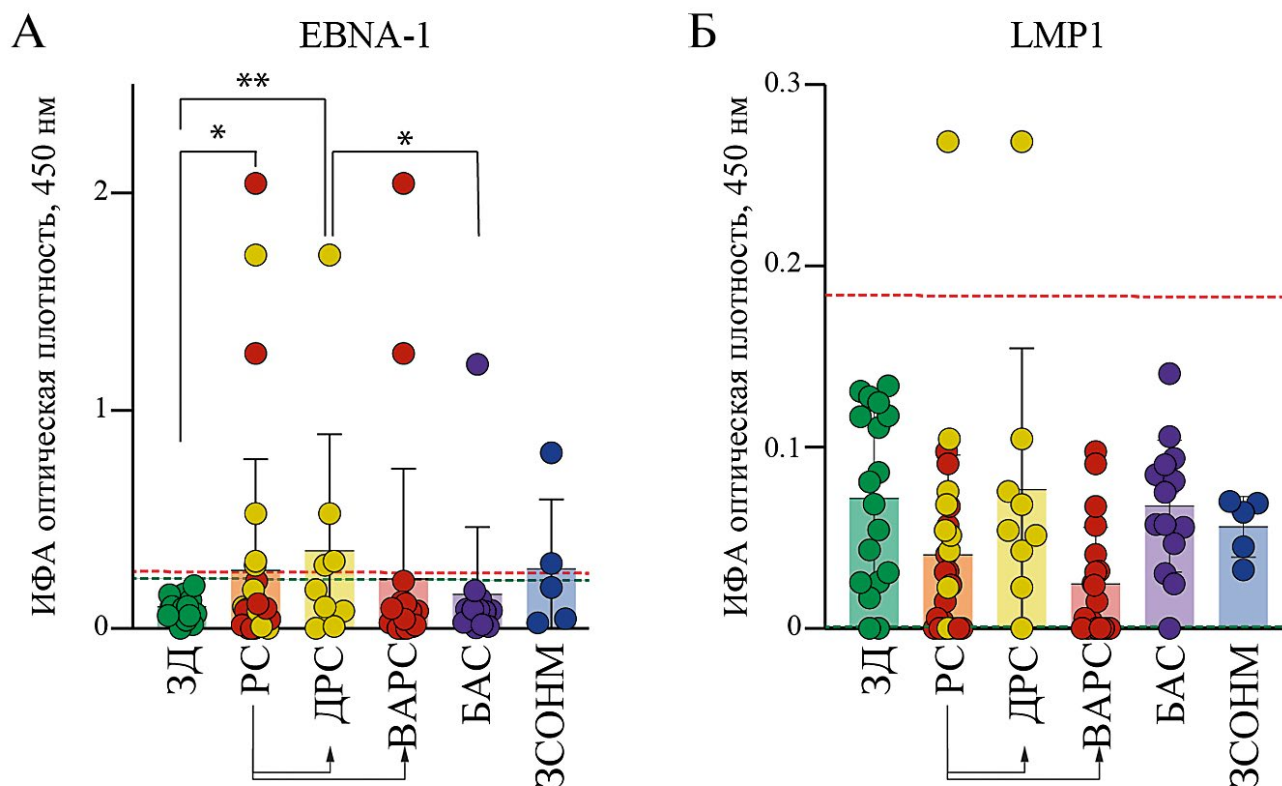


Рис. 1. Сывороточный уровень антиген-специфических IgG к фрагментам ВЭБ: связывание химически синтезированного пептида EBNA-1 (386–405 а.о.) (а); связывание химически синтезированного контрольного пептида LMP1 (7–26 а.о.) (б). ЗД – здоровые доноры, РС – пациенты с рассеянным склерозом, ДРС – пациенты с доброкачественным рассеянным склерозом, ВАРС – пациенты с высокоактивным рассеянным склерозом, БАС – пациенты с боковым амиотрофическим склерозом, ЗСОНМ – пациенты с заболеванием спектра оптиконевромиелита. Красной пунктирной линией обозначено пороговое значение оптической плотности, выше которого сыворотка считается серопозитивной на исследуемый антиген. Пунктирной зеленой линией обозначено контрольный сигнал связывания исследуемого антигена препаратом IVIG (объединенные IgG от 1000 здоровых доноров) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, Хи-квадрат Пирсона).

использовали программное обеспечение GraphPad Prism, версия 9.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для подтверждения измерения титра антител, специфически связывающих именно кросс-реактивный вирусный пептид EBNA-1 (386–405 а.о.), потенциально ассоциированный с развитием РС, а не общий титр противовирусных антител, был дополнительно проведен анализ антиген-специфических антител к контрольному фрагменту другого белка ВЭБ латентной фазы – LMP1 (latent membrane protein 1). Использование данного контроля позволяет удостовериться, что повышенный уровень реактивности антител к EBNA-1 (386–405 а.о.) у пациентов с РС не связан с иммуновоспалением в целом и персистенцией ВЭБ в организме. Результаты проведенного исследования представлены на рис. 1. Уровень противовирусного антительного ответа к EBNA-1 (386–405 а.о.) достоверно повышен

для пациентов с РС независимо от тяжести заболевания по сравнению с ЗД. Также для пациентов с ДРС наблюдается статистически значимое различие в количестве серопозитивных доноров по сравнению с ЗД. Внутри группы РС уровень связывания вирусного антигена EBNA-1 (386–405 а.о.) и количество серопозитивных доноров статистически значимо не отличается между пациентами с ДРС и ВАРС. В отличие от РС ни для одного из других заболеваний (БАС и ЗСОНМ) не было обнаружено статистически достоверной разницы в уровне антиген-специфических антител к EBNA-1 (386–405 а.о.) по сравнению со ЗД. Необходимо заметить, что уровень связывания пептида LMP1 сывороточными антителами пациентов с РС не отличается от уровня связывания в группах ЗД и пациентов с другими неврологическими заболеваниями и остается на относительно низком уровне, что подтверждает взаимосвязь РС и антиген-специфических антител к фрагменту EBNA-1 (386–405 а.о.).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам последних исследований можно практически наверняка заключить, что ВЭБ является иницирующим фактором РС, однако его влияние на тяжесть протекания РС до конца не установлено (рис. 2). Одним из наиболее вероятных элементов ВЭБ, индуцирующих образование кросс-реактивных патогенных антител при РС, считается антиген EBNA-1 (386–405 а.о.). В данной работе мы сравнили уровни связывания синтетического пептида вирусного антигена EBNA-1 (386–405 а.о.) антителами из сывороток крови пациентов с различным течением РС (ДРС и ВАРС). По нашим данным, уровень противовирусных антител в сыворотке не зависит от тяжести течения РС. На основании полученных данных можно предположить, что ВЭБ действует скорее как инициатор, нежели как активатор РС (см. рис. 2). Однако роль ВЭБ в прогрессировании РС до конца не ясна, и возможно, дальнейшее изучение этого влияния и более детальный анализ пациентов с первично- и вторично-прогрессирующими типами течения РС помо-

гут скорректировать терапию таким образом, чтобы замедлить развитие данного заболевания.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей работы.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 17-74-30019.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

Все исследования с клиническими образцами проводились в соответствии с рекомендациями, изложенными в Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации. Исследование одобрено локальным этическим комитетом Научного центра неврологии. У всех пациентов, включенных в исследование, было получено письменное согла-

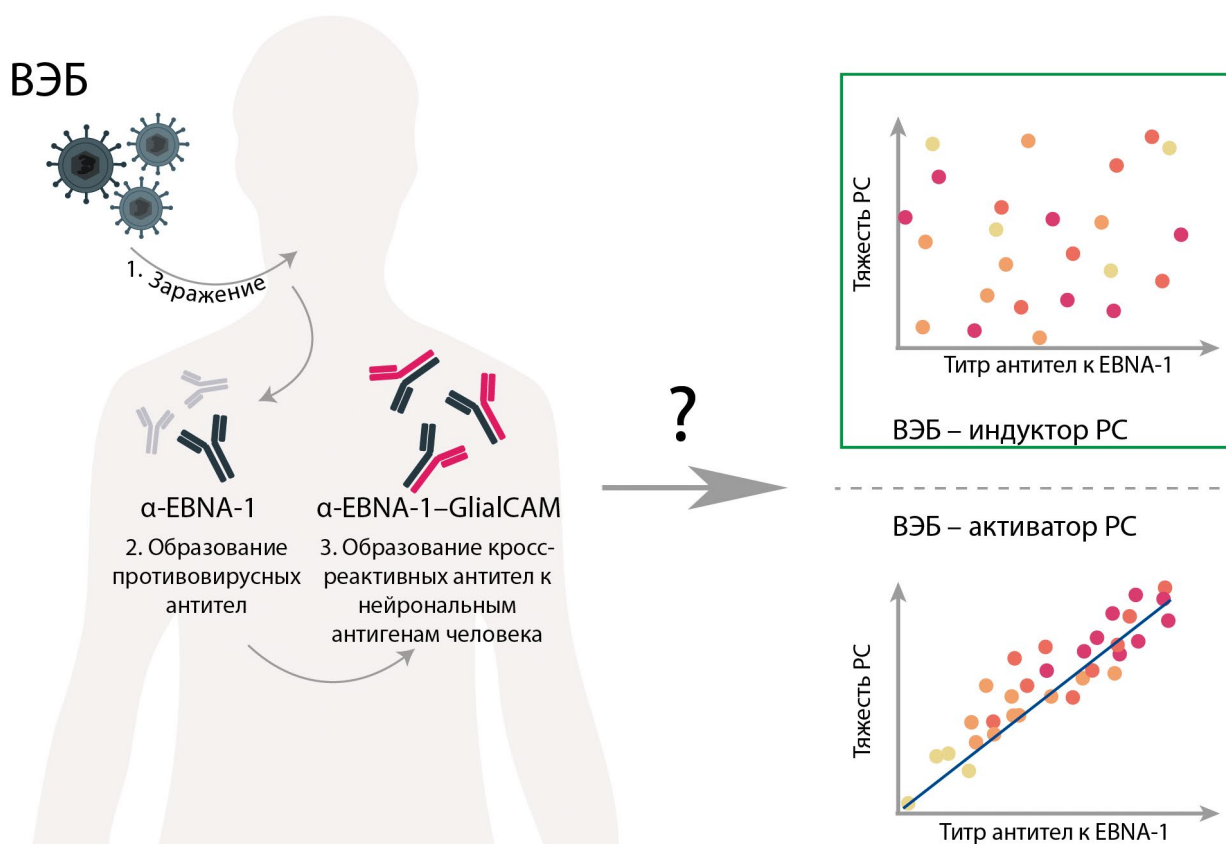


Рис. 2. Предполагаемая схема участия вируса Эпштейна – Барр в развитии рассеянного склероза. 1. Вирус проникает в организм человека и заражает Б-клетки. 2. Происходит накопление вирусных антигенов (например, EBNA-1, VCA и др.) и образование противовирусных антител к данным антигенам. 3. Образовавшиеся противовирусные иммуноглобулины в процессе созревания и соматической гипермутации становятся кросс-реактивными к нейрональным антигенам человека. ВЭБ – вирус Эпштейна – Барр, РС – рассеянный склероз.

сие. Все клинические образцы были использованы в работе после их деидентификации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baecher-Allan C., Kaskow B.J., Weiner H.L. Multiple sclerosis: mechanisms and immunotherapy // *Neuron*. 2018a. T. 97. № 4. C. 742–768.
2. Bjornevik K. u др. Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis // *Science*. 2022b. T. 375. № 6578. C. 296–301.
3. Lomakin Y. u др. Exposure to the Epstein-Barr Viral Antigen Latent Membrane Protein 1 Induces Myelin-Reactive Antibodies In Vivo // *Front. Immunol*. 2017c. T. 8. C. 777.
4. Jons D. u др. Seroreactivity against lytic, latent and possible cross-reactive EBV antigens appears on average 10 years before MS induced preclinical neuroaxonal damage // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr*. 2023d.
5. Liu M., Wang R., Xie Z. T cell-mediated immunity during Epstein-Barr virus infections in children // *Infect. Genet. Evol*. 2023e. T. 112. C. 105443.
6. Kang M.-S., Kieff E. Epstein-Barr virus latent genes // *Exp. Mol. Med*. 2015f. T. 47. № 1. C. e131.
7. Lanz T.V. u др. Clonally expanded B cells in multiple sclerosis bind EBV EBNA1 and GlialCAM // *Nature*. 2022g. T. 603. № 7900. C. 321–327.
8. Lomakin Y.A. u др. Multiple Sclerosis Is Associated with Immunoglobulin Germline Gene Variation of Transitional B Cells // *Acta Naturae*. 2022h. T. 14. № 4. C. 84–93.
9. Lomakin Y.A. u др. Deconvolution of B cell receptor repertoire in multiple sclerosis patients revealed a delay in tBreg maturation // *Front. Immunol*. 2022i. T. 13. C. 803229.
10. Correale J., Ysrraelit M.C., Fiol M.P. Benign multiple sclerosis: does it exist? // *Curr. Neurol. Neurosci. Rep*. 2012j. T. 12. № 5. C. 601–609.
11. Díaz C., Zarco L.A., Rivera D.M. Highly active multiple sclerosis: An update // *Mult. Scler. Relat. Disord*. 2019k. T. 30. C. 215–224.
12. Kurtzke J.F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS) // *Neurology*. 1983l. T. 33. № 11. C. 1444–1452.

THE LEVEL OF ANTI-VIRAL ANTIGEN-SPECIFIC ANTIBODIES TO EBNA-1 IN THE SERUM OF MS PATIENTS DOES NOT DEPEND ON THE SEVERITY OF THE DISEASE

L. A. Ovchinnikova^a, S. S. Dzhelad^a, T. O. Simaniv^b, M. N. Zakharova^b,
Academician of the RAS A. G. Gabibov^{a, #}, Ya. A. Lomakin^{a, ##}

^aShemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russian Federation

^bResearch Center of Neurology, Moscow, Russian Federation

^cLomonosov Moscow State University Moscow, Russian Federation

[#]E-mail: gabibov@gmail.com

^{##}E-mail: yasha.l@bk.ru

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune neurodegenerative disease leading to inevitable disability and primarily affecting the young and middle-aged population. Recent studies have shown a direct correlation between the risk of MS development and Epstein-Barr virus (EBV) infection. Analysis of the titer of EBV-specific antibodies among patients with MS and healthy donors among Russian population confirmed that MS is characterized by an increased level of serum IgG binding EBNA-1 (EBV nuclear antigen 1). The number of patients with elevated levels of EBNA-1-specific antibodies does not differ statistically significantly between two groups with diametrically opposite courses of MS: benign MS or highly active MS. It can be assumed that the primary link between EBV and the development of MS is restricted to the initiation of the disease and does not impact its severity.

Keywords: MS, multiple sclerosis, EBNA-1, autoantibodies, EBV, Epstein – Barr virus.