

Е.В. ПОПОВА^{1,2}, к.м.н., М.В. МЕЛЬНИКОВ^{2,3}, к.м.н., А.Н. БОЙКО^{1,2}, д.м.н., профессор, М.В. ПАЩЕНКОВ³, д.м.н.

¹Межкрупное отделение рассеянного склероза (Городская клиническая больница №24 Департамента здравоохранения г. Москвы)

²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва

³Лаборатория клинической иммунологии ГНЦ «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, Москва

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕДПОСЫЛКИ ПЕРЕВОДА С НАТАЛИЗУМАБА НА ФИНГОЛИМОД

В данной статье представлены результаты исследования CD4⁺ Т-клеток и Th17-клеток, а также продукции интерлейкина-17 (ИЛ-17) в группах пациентов, получающих терапию препаратами натализумаб и финголимод. Полученные результаты могут рассматриваться как один из критериев предпочтительного перевода пациентов с ремиттирующим рассеянным склерозом после завершения терапии препаратом натализумаб на терапию препаратом финголимод.

Ключевые слова: ремиттирующий рассеянный склероз, натализумаб, финголимод, CD4⁺ Т-клетки, Th17-клетки, интерлейкин-17.

E.V. POPOVA^{1,2}, PhD in medicine, M.V. MELNIKOV³, PhD in medicine, A.N. BOYKO², MD, Prof., M.B. PASCHENKOV³, MD

¹Interregional Department of Disseminated Sclerosis (Municipal Clinical Hospital No. 24 of the Moscow Healthcare Department)

²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

³Clinical Immunology Laboratory of State National Center Immunology Center of the Federal Medical and Biological Agency, Moscow

IMMUNOLOGICAL PRECONDITIONS OF CONVERSION FROM NATALIZUMAB TO FINGOLIMOD

This article presents the results of the immunological profile of CD4⁺ T cells and Th17 cells and production of interleukin-17 (IL-17) in two groups of patients receiving treatment natalizumab and fingolimod. The results can underpin the justification for the preferred transfer of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis after treatment by natalizumab to fingolimod.

Keywords: relapsing-remitting multiple sclerosis, natalizumab, fingolimod, CD4⁺ T-cells, Th17-cells, interleukin-17.

Рассеянный склероз (РС) является хроническим аутоиммунным заболеванием, на самых ранних стадиях которого отмечаются как воспалительные, так и нейродегенеративные процессы. В течение длительного периода времени постановка диагноза являлась сильным психотравмирующим фактором и для пациента, и для его семьи, так как патогенетическое лечение отсутствовало. Однако начиная с 1993 г. стали активно регистрироваться препараты, изменяющие течение рассеянного склероза (ПИТРС). К настоящему времени в качестве ПИТРС широко применяются бета-интерфероны и глатирамера ацетат, эффективность и безопасность которых доказаны при длительном, многолетнем использовании, в связи с чем они рассматриваются как препараты первого ряда терапии. Согласно проведенным исследованиям бета-интерфероны и глатирамера ацетат снижают частоту обострений ремиттирующего рассеянного склероза (РРС) в среднем лишь на 30%, а у части пациентов их введение оказывается неэффективным. Таким образом, существует определенная группа пациентов, нуждающихся в более агрессивной терапии. Для этого применяются препараты второй линии ПИТРС, к которым относятся натализумаб и финголимод. В настоящее время разработаны критерии неэффективности терапии первой линии: возникновение как минимум 1 обострения в течение года лечения или появление как минимум 9 гиперинтенсивных очагов в режиме T2 или как минимум 1 очага в режиме T1, накапливающего контрастное вещество при магнитно-резонансной томографии (МРТ) головного мозга. Данное изменение тактики лечения называется эскалацией терапии [1]. Помимо этого, у 20–25% пациентов с РРС с самого начала отмечается агрессивное течение заболевания (2 обострения

в год с неполными ремиссиями или нарастание по шкале EDSS на 2 балла за один год и наличие 1 контрастируемого очага на МРТ за последние 3 мес.) [2]. В данной ситуации пациенту сразу назначается индукционная терапия для подавления активности заболевания. Одним из наиболее эффективных препаратов второго ряда является натализумаб, который достаточно успешно применяется на территории Российской Федерации с 2010 г.

В настоящее время разработаны критерии неэффективности терапии первой линии: возникновение как минимум 1 обострения в течение года лечения или появление как минимум 9 гиперинтенсивных очагов в режиме T2 или как минимум 1 очага в режиме T1, накапливающего контрастное вещество при магнитно-резонансной томографии головного мозга

По завершении курса индукции возникает вопрос о дальнейшей тактике ведения пациентов в связи с тем, что существуют опасения по поводу реактивации заболевания после прекращения курса терапии препаратом натализумаб и перевода на ПИТРС первой линии. В связи с этим на базе Межкрупного отделения рассеянного склероза ГБУЗ «ГКБ №24 ДЗМ» было проведено наблюдение за 29 пациентами с РРС, получавших терапию препаратом натализумаб и переведенных по завершении лечения на терапию инъекционными ПИТРС первой линии (8 пациентов) и финголимод (21 пациент). Из первой линии инъекционных ПИТРС 2 пациента были переведены на глатирамера ацетат и 6 пациентов на бета-интерфероны.

Всем пациентам была проведена терапия препаратом натализумаб в количестве 26 инфузий (2 года), на фоне которой обострений не отмечалось. По завершении терапии пациенты через 4 недели после последней инфузии препарата натализумаб начали получать терапию первой линии инъекционными ПИТРС (8 пациентов) и препаратом финголимод (21 пациент).

В период терапии препаратом натализумаб у 6 пациентов было проведено комплексное иммунологическое обследование (3 женщин и 3 мужчин). Длительность заболевания на момент включения в исследование составляла от 3 до 7 лет. На момент забора крови все больные получали терапию препаратом натализумаб от 3 до 6 месяцев и на момент обследования находились в стадии клинической ремиссии. Все исследуемые больные более 3 месяцев не получали лечение кортикостероидной терапией. Также было проведено исследование 9 пациентов, получающих терапию препаратом финголимод (4 мужчины и 5 женщин). Контрольную группу составили 20 условно здоровых человек (11 женщин и 9 мужчин). Все исследуемые группы были сопоставимы по полу и возрасту. Клинико-демографические характеристики больных РС и группы здоровых доноров представлены в *таблице 1*.

Таблица 1. Клинические и демографические характеристики больных РС и контрольной группы

Показатель	Больные РС, получающие натализумаб, n = 6	Больные РС, получающие финголимод, n = 9	Здоровые доноры, n = 20
Возраст, годы	29 (26; 36)	27 (25; 29)	26,5 (25; 28,3)
Мужчины/женщины (% женщин)	3/3 (50)	4/5 (55,5)	9/11 (55)
Длительность РС, годы	3 (3; 3,8)	2 (2; 3)	-
EDSS, баллы	1 (1; 1,5)	1 (1; 1,5)	-

Примечание: Представлено значение медианы, в скобках – 25-й и 75-й проценти.

Все больные подписали информированное согласие на участие в данном исследовании. Проведение исследования было одобрено этическим комитетом Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова.

Процент субпопуляций Т-хелперов определяли методом многоцветной проточной цитофлуорометрии. Для этого образцы цельной крови (объем 100 мкл) окрашивали ECD-мечеными моноклональными антителами (MAT) к CD4 (Beckman Coulter, США) в сочетании с флуоресцеин-изотиоцианат-мечеными (FITC) MAT к CD26 (Beckman Coulter), PE-Cy7-мечеными MAT к CD161 (eBioscience, США) и фикоэритрин-мечеными (PE) MAT к CD196 (eBioscience). Далее проводили лизирование образцов раствором OptiLyse C (Beckman Coulter), после чего образцы ресуспендировали в 500 мкл фосфатно-солевого буфера (ФСБ, pH7,3) и анализировали на 5-канальном



Несклер®

ООО «БиоИнтегратор»

Капсулы

МНН: финголимод



1 капсула Несклер содержит

финголимода гидрохлорид 0,56 мг (соответствует 0,50 мг финголимода основания)

Фармакологическая группа

Иммунодепрессивное средство. Средство для лечения рассеянного склероза

Применение

Ремитирующий рассеянный склероз (PPC) – для уменьшения частоты клинических обострений болезни и снижения риска прогрессирования нетрудоспособности

Способ применения и дозы

Рекомендуемая доза препарата – одна капсула 0,5 мг внутрь 1 раз в сутки, независимо от времени приема пищи. В случае пропуска приема, на следующий день препарат применяют в обычное время. Препарат предназначен для длительного лечения.

Rx отпускается по рецепту

**ТОВАР СЕРТИФИЦИРОВАН
И ПРОИЗВОДИТСЯ В СООТВЕТСТВИИ
СО СТАНДАРТАМИ GMP**

www.biointegrator.com
+7 495 995 49 41

ИНФОРМАЦИЯ ПРЕДНАЗНАЧЕНА ДЛЯ МЕДИЦИНСКИХ
И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ РАБОТНИКОВ

Реклама

проточном цитометре Beckman Coulter FC500 с использованием программы CXP (Beckman Coulter). Оценивали процент CD4⁺, а также Th17-клеток. Th17-клетки идентифицировали как CD4CD26CD161CD196-позитивные события [3, 4]. В контрольные пробы добавляли антитела тех же меток и изотипа, но не имеющие антигенных мишеней в клетках человека (изотип-контроль). Для поправки на неспецифическое окрашивание из полученного значения вычитали процент клеток, позитивных при окраске изотип-контролем (как правило, <1%).

На фоне терапии препаратом финголимод происходит блокировка S1P-рецепторов, препятствующая выходу Т-клеток из лимфатических узлов, существенно снижая количество циркулирующих Т-лимфоцитов, включая аутоагрессивные Th17-клетки

Для оценки функциональной активности Th17-клеток из венозной крови (взятой в утренние часы в пластиковую пробирку с EDTA) выделяли мононуклеарные клетки периферической крови (МНКПК) путем центрифугирования на градиенте плотности фиколл-урографина (ПанЭко, Россия), трижды отмывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ, pH 7,3) и ресуспендировали в культуральной среде RPMI 1640 (ПанЭко) с добавлением 2 mM L-глутамина (ПанЭко) и 10% фетальной телячьей сыворотки (ПанЭко). Затем МНКПК в количестве 8×10^4 в 200 мкл на лунку вносили в 96-луночный круглодонный планшет и стимулировали магнитными микрочастицами, покрытыми анти-CD3/анти-CD28-антителами (Life Technologies, Норвегия). Далее образцы инкубировали 72 ч в CO₂-инкубаторе, после чего отбирали супернатант и замораживали при -70 °C.

Уровни спонтанной и индуцированной продукции ИЛ-17 в супернатантах клеточной культуры определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием наборов фирмы eBioscience (США). Уровень ИЛ-17 выражали в пг/мл.

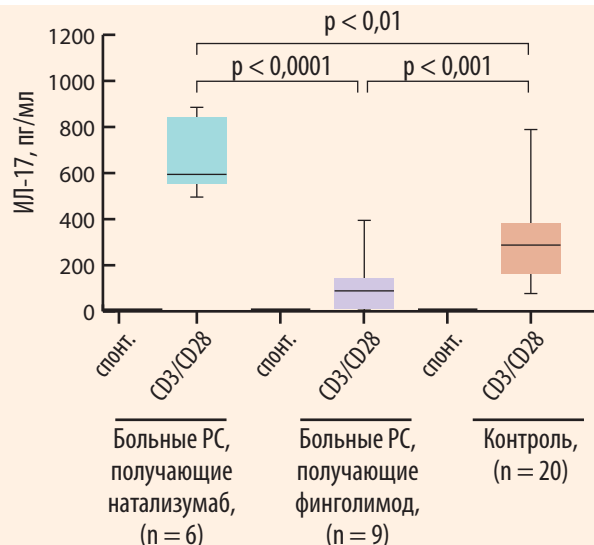
Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Prism 6. Для оценки разли-

Таблица 2. Распределение субпопуляций Т-хелперов (процент позитивных клеток), по данным проточной цитометрии, у больных РС, получающих финголимод, натализумаб, и в группе здоровых доноров

Т-клетки, %	Больные РС, получающие натализумаб, n = 6	Больные РС, получающие финголимод, n = 9	Здоровые доноры, n = 20
CD4 ⁺ , % от лимфоцитов	32,5 (30,8; 35,5)	10,9* (5,6; 13,1)	39,33 (32,9; 41,7)
CD4 ⁺ CD26 ⁺ CD161 ⁺ CD196 ⁺ , % от CD4 ⁺ Т-клеток	3,3 (2; 4)	0,5* (0,3; 0,9)	3,39 (2,1; 3,8)

* отличие от больных РС, получающих натализумаб, и группы здоровых доноров статистически достоверно с p < 0,001

Рисунок. Продукция ИЛ-17 МНКПК больных РС, получающих натализумаб, финголимод, и здоровых доноров in vitro



МНКПК (в количестве 8×10^4 в 200 мкл на лунку), полученные от больных РС и группы здоровых доноров, были активированы микрочастицами, покрытыми анти-CD3 и анти-CD28 антителами. После 72-часовой инкубации в CO₂-инкубаторе в супернатантах клеточной культуры определяли уровни спонтанной и стимулированной продукции ИЛ-17 методом ИФА. Горизонтальная линия в боксе обозначает значение медианы, нижняя и верхняя границы бокса – 25-й и 75-й процентиля. Вертикальные линии – диапазон значений.

чий между двумя независимыми группами использовали U-критерий Манна – Уитни. Статистически значимыми различия считались при p < 0,05.

В ходе исследования было отмечено отсутствие обострений на фоне терапии препаратом натализумаб. В группе пациентов, переведенных на терапию препаратом финголимод, обострения в течение первых 3 месяцев отмечены были в 9,52% случаев (2 пациента). В группе больных, переведенных на терапию первой линии инъекционных ПИТРС, в 75% случаев (6 пациентов) данные различия между двумя исследуемыми группами оказались значимыми – $\chi^2 = 5,99$, p = 0,0144.

Согласно данным многоцветной проточной цитофлуориметрии, у больных РС, получающих натализумаб, процент CD4⁺ Т-клеток и Th17-клеток оказался существенно выше, чем в группе больных РС, получающих финголимод, при этом был сопоставим с таковым в группе здоровых доноров (табл. 2). В то же время, по данным ИФА, продукция ИЛ-17 стимулированными МНКПК у больных РС, получающих натализумаб, была достоверно выше, чем у больных, получающих финголимод или в контрольной группе (рис. 1).

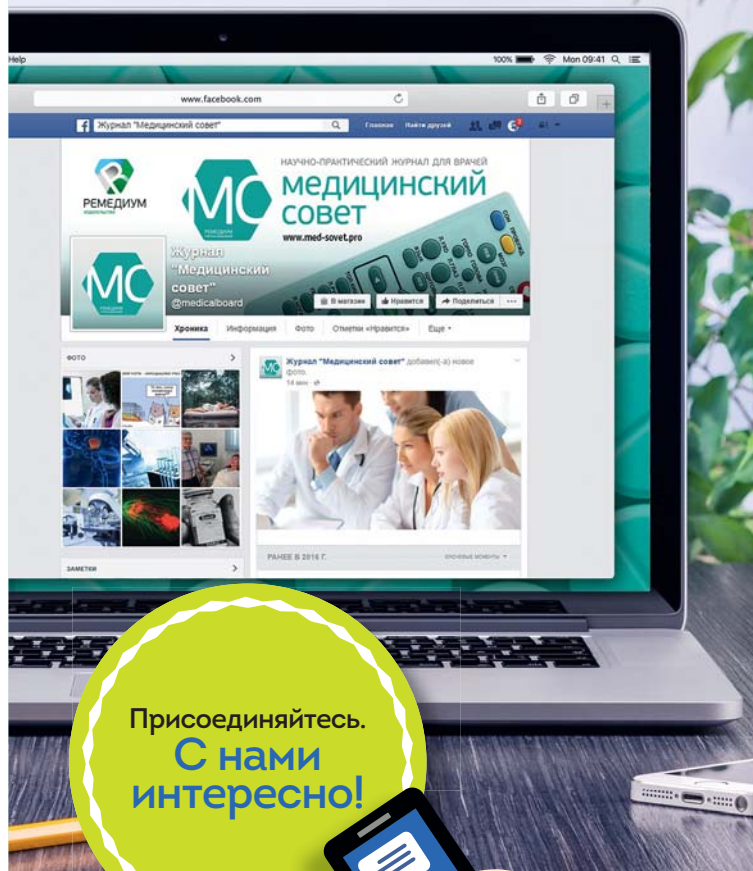
Полученная значимая разница в проценте обострений в первые три месяца после последней инфузии препарата натализумаб между пациентами на препарате финголимод и первой линии инъекционных ПИТРС (глутирамера ацетат и бета-интерферон) заставляет обра-

таться к механизму действия препаратов. Натализумаб является антагонистом интегрин- $\alpha 4$, селективным ингибитором молекул адгезии [5]. Он связывается с интегрин- $\alpha 4$ на поверхности активированных Т-клеток, предотвращая адгезию между Т-клетками и эндотелиальными клетками и прерывая, таким образом, аутоиммунный воспалительный каскад. В результате этого в периферической крови отмечается относительный лимфоцитоз, в т. ч. отмечено увеличение процента CD4⁺ Т-клеток и Th17-клеток, а также повышенная продукция ИЛ-17 [6]. Все это при выведении препарата натализумаб из организма будет приводить к повышению проницаемости гемато-энцефалического барьера (ГЭБ). На фоне же терапии препаратом финголимод происходит блокировка S1P-рецепторов, препятствующая выходу Т-клеток из лимфатических узлов, существенно снижая количество циркулирующих Т-лимфоцитов, включая аутоагрессивные Th17-клетки [7,8]. В связи с этим мы отмечаем незначимое увеличение частоты обострений при переводе пациента с препарата натализумаб на препарат финголимод и выраженное увеличение обострений при переводе на инъекционные ПИТРС первой линии, так как эта группа препаратов не обладает данным механизмом действия. Вполне логичным является заключение, что именно препарат финголимод является одним из первых препаратов выбора после отмены терапии препаратом натализумаб, и своевременный перевод на него может обеспечить снижение риска возможных обострений.



ЛИТЕРАТУРА

1. Kappos L, Kuhle J, Gass A, Achtnichts L and Radue E. Alternatives to current disease-modifying treatment in MS: what do we need and what can we expect in the future? *Journal of Neurology*, 2004, 251(S5): v57-v64. doi: 10.1007/s00415-004-1509-6.
2. Freedman M, Rush C. Severe, Highly Active, or Aggressive Multiple Sclerosis. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*, 2016, 22: 761-784. doi:10.1212/con.0000000000000331.
3. Приложение. Критерии неэффективности терапии и отмены ПИТРС первой линии и замены на препараты второй линии. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*, 2015, 115(8): 44-44. doi: 10.17116/jnevro20151158244.
4. Bengsch B, Seigel B, Flecken T, Wolanski J, Blum H and Thimme R. Human Th17 Cells Express High Levels of Enzymatically Active Dipeptidylpeptidase IV (CD26). *The Journal of Immunology*, 2012, 188(11): 5438-5447. doi: 10.4049/jimmunol.1103801.
5. Bossowski A, Moniuszko M, Idzkowska E, Dąbrowska M, Jeznach M, Sawicka B, Borysewicz-Sańczyk H, Bossowska A, Rusak M, Bodzenta-Łukaszyk A. Evaluation of CD4+CD161+CD196+ and CD4+IL-17+ Th17 cells in the peripheral blood of young patients with Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab.*, 2012, 18(3):9-95.
6. Попова Е.В., Мельников М.В., Бойко А.Н., Муругин В.В., Пашенков М.В. Вопросы тактики ведения больных с труднокурабельным ремиттирующим рассеянным склерозом. *Медицинский совет*. 2015, 10: 63-65. doi: http://dx.doi.org/10.21518/2079-701X-2015-10-63-65.
7. Sormani MP, Stefano N. Natalizumab discontinuation in the increasing complexity of multiple sclerosis therapy. *J Neurol*, 2014, 82: 1-2.
8. Попова Е.В., Ялымов А.А., Бойко А.Н., Давыдовская М.В., Коляк Е.В., Трактирская О.В., Хачанова Н.В., Шур С.Г. Финголимод в лечении ремиттирующего рассеянного склероза: опыт применения в Московском городском центре рассеянного склероза. *Медицинский совет*, 2014, 5: 60-63. doi: http://dx.doi.org/10.21518/2079-701X-2014-5-60-63.
9. Brinkmann V, Davis M, Heise C et al. The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. *J. Biol. Chem.*, 2002. 277: 21453-21457.



медицинский совет online

- актуальные новости о разных разделах медицины
- интересные события и открытия в России и в мире
- анонсы журнала «Медицинский совет»
- инфографика
- заметки в помощь практикующим врачам
- история науки и медицины



Наша группа в «Фейсбуке»
facebook.com/medicalboard



Наша группа в «ВКонтакте»
vk.com/med_sovetpro