

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ВІРУСІВ РОДИНИ HERPESVIRIDAE 4, 6 ТИПІВ ТА ЕНДОГЕННИХ РЕТРОВІРУСІВ ЛЮДИНИ НА ПЕРЕБІГ РОЗСІЯНОГО СКЛЕРОЗУ

**Олег Коляда¹, Ірина Кучма², Тетяна Коляда³,
Анатолій Скляр³, Людмила Тиннініка⁴,**

1- Харківський національний медичний університет

2- Навчально-наукового медичний інститут

Національного технічного університету

«Харківський політехнічний інститут»

3-Інститут мікробіології та імунології ім. І. І.

Мечникова НАМН України

4- Приватний вищий навчальний заклад

"Харківський міжнародний медичний університет"

Вступ

Розсіяний склероз (РС) - це хронічне, гетерогенне, імуноасоційоване захворювання центральної нервової системи, яке характеризується утворенням осередків запалення та пошкодженням мієлінової оболонки нервових волокон у головному та спинному мозку, що призводить до стійкої інвалідності [1,2,3,4]. Протягом останніх десятиліть все більше підтверджень знаходить гіпотеза про ключову патогенетичну роль у розвитку РС вірусів родини Herpesviridae та ендемічних ретровірусів людини (HERV) [3,5,6,8]. Приблизно у 85% пацієнтів з РС діагностують рецидивно-ремітуючий тип перебігу захворювання (PPPC), який характеризується зміною періодів загострень і ремісій без наростання симптомів між загостреннями. При цьому в більшості випадків PPPC з часом трансформується у РС з прогресуючим типом перебігу (ПРС). Гетерогенність імунорегуляторних й патоморфологічних змін обумовлює різноманіття клінічних проявів та різні варіанти перебігу РС [3]. Частота загострень, тривалість ремісій, ступінь відновлення неврологічних функцій та швидкість прогресування незворотних уражень мають індивідуальний характер. Зокрема, в залежності від активності патологічного процесу, виражений неврологічний дефіцит до 6,0 балів за розширеною шкалою оцінки ступеня інвалідизації (Expanded Disability Status Scale – EDSS) може сформуватися як через 40 років після першої клінічної маніфестації – в разі низької активності, так й вже через 10 років у разі високої активності [4]. В останні роки отримано значну кількість даних, які вказують на існування певних відмінностей імунопатологічних механізмів, що лежать в основі PPPC та ПРС [3,4]. У той самий час, не викликає сумнівів існування загальних імунорегуляторних механізмів, що відіграють важливу роль у патогенезі РС при всіх типах та стадіях захворювання. Особливості порушень цитокінової регуляції у різних когорт

пацієнтів з РС залишаються предметом численних досліджень та обговорень [3]. Цитокіни є ключовими факторами розвитку запалення в ЦНС, пошкодженням олігодендроцитів, дегенерації аксонів та, як наслідок, неврологічної дисфункції, що супроводжує РС [3,7]. Таким чином, вивчення зв'язку між станом цитокіногенезу та активністю РС, а також типом перебігу захворювання, є одним з актуальних напрямків досліджень імунопатогенезу РС.

Численні гіпотези, які запропоновані для встановлення етіології РС, демонструють багатофакторну природу, як результат складної взаємодії ендемічних генетичних і екзогенних факторів ризику цього захворювання. Зокрема за даними сучасних досліджень серед них виділяють збудники вірусних інфекцій, що здатні довго персистувати у організмі і можуть ініціювати довготривалий патологічний процес. На сьогодні жоден із асоційованих з РС агентів не визнаний збудником. Гетерогенність захворювання свідчить про те, що РС не викликається і не запускається лише одним вірусом, а їх комбінація може грати роль триггеру у генетично сприйнятливих осіб [6,8,9,10].

Метою нашої роботи було встановлення ролі EBV і HHV-6 інфекцій та ендемічних ретровірусів HERV-W у патогенезі розсіяного склерозу, яка опосередкована їх участю у загостренні і прогресуванні хвороби шляхом впливу на системну відповідь цитокінів

Матеріали та методи

Було проведено обстеження 98 пацієнтів, середній вік яких складав $37,2 \pm 11,1$ років, що знаходились на обліку у відділі нейроінфекцій та розсіяного склерозу ДУ «Інститут неврології, психіатрії та наркології НАМН України». Критерієм включення в дослідження була наявність верифікованого діагнозу «розсіяний склероз» відповідно наказу МОЗ України № 487 від 17.08.2007 р. «Про затвердження клінічних протоколів надання медичної допомоги за спеціальністю «Неврологія»» (код G35 за МКХ-10 – Розсіяний склероз). При цьому у 66 пацієнтів було діагностовано PPPC, а у 32 – ПРС (первинно-прогресуючий та вторинно-прогресуючий типи) відповідно. Пацієнти не отримували терапії з використанням препаратів, що модифікують перебіг хвороби, або іншої імуносупресивної терапії протягом щонайменше півроку до проведення обстеження. Контрольну групу склали 27 практично здорових осіб – донорів крові середнім віком ($30,1 \pm 8,2$) років. У залежності від активності захворювання було сформовано наступні підгрупи:

MS (multiple sclerosis) (R1) - підгрупа пацієнтів з рецидивно-ремітуючим типом РС у стадії загострення (клінічна та радіологічна активність), n=24, показник інвалідизації за шкалою EDSS дорівнював ($2,7 \pm 1,3$) бали;

MS (R2) - підгрупа пацієнтів з рецидивно-ремітуючим типом РС у стадії клінічно-радіологічної

ремісії, $n=42$, показник інвалідації за шкалою EDSS ($2,0\pm 1,1$) бали;

MS (P1) - група пацієнтів з прогресуючими типами РС з неухильним прогресуванням, $n=21$, показник інвалідації за шкалою EDSS ($5,3\pm 1,0$) бали;

MS (P2) - група пацієнтів з прогресуючими типами РС на етапі стабілізації, $n=11$, показник інвалідації за шкалою EDSS – ($5,5\pm 1,2$) балів.

Критеріями включення в контрольну групу були відсутність гострих інфекцій протягом, щонайменше, 1 місяця до обстеження, відсутність хронічних запальних, алергічних та аутоімунних захворювань. Проводився всебічний клінічний аналіз зазначених форм РС за допомогою методу анкетування, клінічного неврологічного обстеження та МРТ головного та спинного мозку. У лабораторії клінічної імунології та алергології ДУ “Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України” було проведено імунологічні дослідження вмісту IgM та IgG проти EBV та HHV-6, глікопротеїну Human Endogenous Retrovirus-W (HERV-W) та рівнів цитокінів - IFN- γ , IL-1 β , IL-10 та IL-12 в сироватці крові [11].

Визначення вмісту IgM та IgG до ядерного антигену EBV (EBNA1) і HHV-6, рівнів IFN- γ , IL-1 β , IL-10, IL-12 і глікопротеїну HERV-W у сироватці крові здійснювали методом твердофазного ІФА з використанням сертифікованих в Україні тест-систем «Ig A, M, G» виробництва ТОВ НВЛ «Гранум» (Україна), «Vitrotest EBNA-IgG» (Україна), «Вірус герпесу 6 типу (ВПГ-6), антитіла IgG D-2166», «Вірус герпесу 6 типу (ВПГ-6), антитіла IgM D-2167», а також « γ -інтерферон - ІФА Бест» А-8752, «Інтерлейкін-10 - ІФА Бест» А-8774, «Інтерлейкін-1 бета - ІФА Бест» А-8766 виробництва «Вектор Бест-Україна» та тест-системи «Human IL-12 (p70)» та глікопротеїну HERV-W-ENV Platinum ELISA Kit виробництва eBioscience (США) за допомогою імуоферментного аналізатора Stat-Fax 303 згідно з інструкцією виробника. Усім дослідженим проводилося визначення ДНК EBV та HHV-6 у сироватці крові методом ПЛР.

Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням програми STATISTICA 11.0 (StatSoft, Inc) та XLSTAT 19.6 (Addinsoft). Для визначення достовірності відмінностей між показниками в досліджуваних вибірках використовували U-критерій Манна-Уїтні, при нормальному розподілі використовували t-критерій Стьюдента. Як показник критерія достовірності відмінностей було обрано рівень значимості $p<0,05$. Для визначення взаємозв'язку між явищами використовували кореляційний аналіз Спірмена.

Результати та обговорення

Аналіз клінічних даних пацієнтів з різними типами перебігу РС показав відмінності важливих в

прогностичному відношенні показників, таких як тяжкість і тривалість дебютів, ступінь інвалідації, повнота і тривалість клінічних ремісій, частота і тривалість рецидивів, особливості перебігу з різноманітними неврологічними синдромами, які виникають у генетично схильної людини внаслідок дії одного чи декількох факторів навколишнього середовища.

Сучасний погляд на патогенез РС передбачає тісний взаємозв'язок між впливом вірусів, що асоційовані з розвитком РС та імунною відповіддю організму. Відомо, що для хворих РС характерною рисою є висока частота вірусних інфекцій [2,6,8,9], а саме, реактивація вірусу співпадає із загостреннями хвороби, сприяючи гіперсенсibiliзації організму та підвищенню проникності гематоенцефалічного бар'єру. Але залишається актуальним питання щодо вірусів, які є тригерами розвитку РС і приймають участь в імунному запаленні, що викликає осередкову демієлінізацію і процеси руйнування олігодендроглії, та не з'ясовані конкретні механізми вірус-опосередкованих імунопатологічних реакцій. Віруси родини Herpesviridae: EBV та HHV-6 розглядаються як основні потенційні кандидати ризику розвитку РС. Для визначення можливої патогенетичної ролі цих вірусів при різному перебігу РС нами було проведено дослідження вмісту IgM та IgG до ядерного антигену EBV та до HHV-6, а також якісне і кількісне визначення ДНК цих вірусів в сироватці крові хворих в порівнянні з групою контролю. (рис.1, рис.2, рис.3).

IgM до EBNA1 та до HHV-6 не були виявлені у жодного із досліджених. На підставі отриманих даних (рис. 1А) було показано, що IgG до EBNA1 виявлено у 92 % пацієнтів з РС (90 з 98) та у 84 % здорових людей (22 з 27). Кількість серопозитивних хворих з РС достовірно перевищувала серопозитивних осіб групи контролю ($p=0,0475$). IgG до HHV-6 були виявлені у 84 % (82 особи) пацієнтів з РС і у 77 % (20 осіб) в контрольній групі – різниця була статистично значущою ($p=0,0486$). Детальний аналіз показників IgG проти EBNA1 та HHV-6 при різних типах перебігу РС показав, що більша кількість серопозитивних осіб виявлена в групах ПРС - як в MS(P1) з неухильним прогресуванням (97 % та 93 % відповідно), так і в (MS)P2 в період стабілізації (95 % та 87,5 %). Загалом 78,5 % хворих на РС були одночасно серопозитивними щодо EBV та HHV-6; серед здорових донорів серопозитивними до обох герпесвірусів були лише 63 %.

ДНК EBV була виявлена в сироватці крові у 35 % хворих РС (рис. 1Б) та не визначалася у жодного здорового досліджуваного. У хворих на РРС нами отримано статистично незначущу різницю між поширеністю ДНК до EBV у період рецидиву (група MS(R1)) та у стадії ремісії (група MS(R2)) - 33,3 % проти 28,1 %, відповідно.

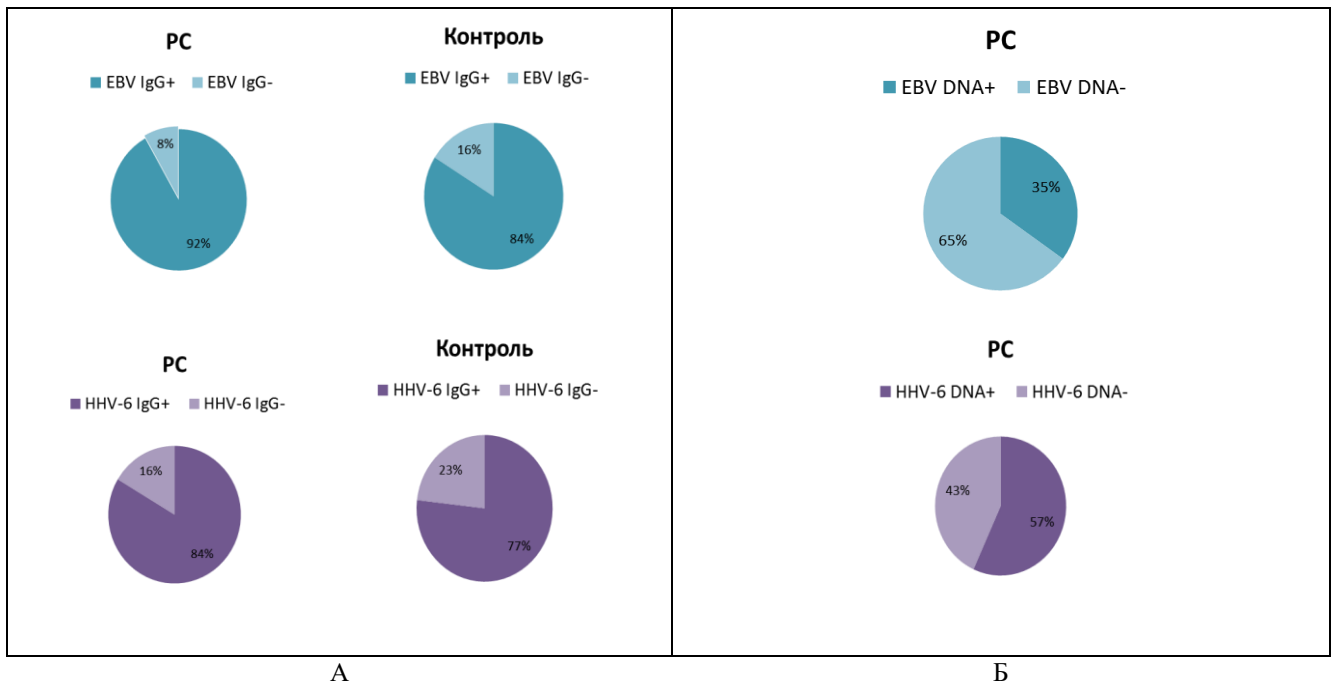


Рисунок 1. А. Показники виявлення Ig G проти EBNA1 та HHV-6 . Б. Показники виявлення ДНК EBV та HHV-6 у сироватці крові

Аналіз результатів дослідження в групі ПРС показав, що у 45 % пацієнтів у період рецидиву (група (MS)P1) визначалася ДНК до EBV, що достовірно більше, ніж у пацієнтів підгрупи (MS)P2 (31,2 %) ($p=0,0472$). ДНК HHV-6 у сироватці крові була виявлена у 57 % хворих на РС та знову ж - не визначалася у жодної здорової людини з групи контролю. У сироватці крові хворих на РРРС нами отримано статистично значущу

різницю ($p=0,0486$) між поширеністю ДНК HHV-6 у стадії рецидиву та ремісії (64 % проти 47 % відповідно). В групі хворих ПРС ДНК HHV-6 визначалася у 69 % пацієнтів в стадії рецидиву, що достовірно більше ($p=0,0488$), ніж у пацієнтів у стадії ремісії (54,2 %). Присутність ДНК EBV та HHV-6 в сироватці крові свідчить про активацію вірусів та літичну стадію інфекції.

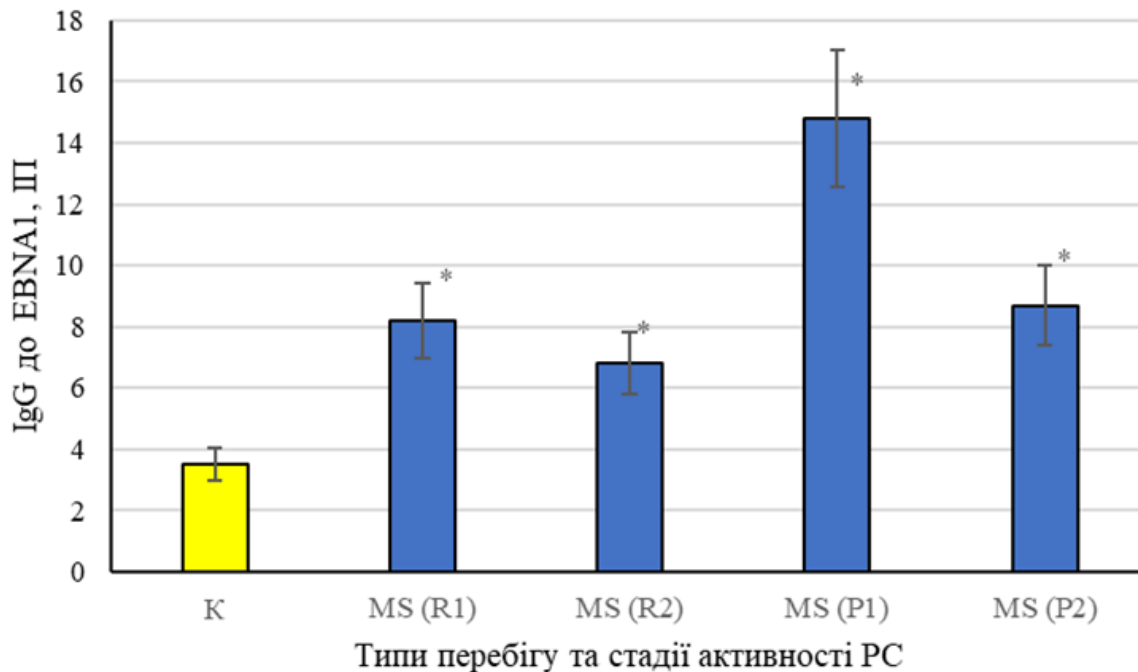


Рисунок 2. Вміст IgG до EBNA1 у сироватці крові (M ± σ); * $p < 0,05$ при порівнянні з контрольною групою.

Найвищий середній рівень IgG до EBNA1 - 14,8 ПІ, визначався у пацієнтів з найтяжчим перебігом РС (група (MS)P1); а у групі (MS)P2 - складав 8,7 ПІ (статистично значуща різниця ($p=0,0456$)). У хворих з РРРС середній вміст IgG до EBNA1 у групі MS(R1)

визначався на рівні 8,2 ПІ, а у групі MS(R2) – складав 6,8 ПІ. Середній вміст IgG у загальній групі хворих з ПРС у 1,6 разів перевищував показники групи хворих з РРРС ($p=0,0465$). Середній рівень IgG до EBNA1 у групі контролю склав 3,5 ПІ та був достовірно нижче, ніж при усіх типах перебігу РС.

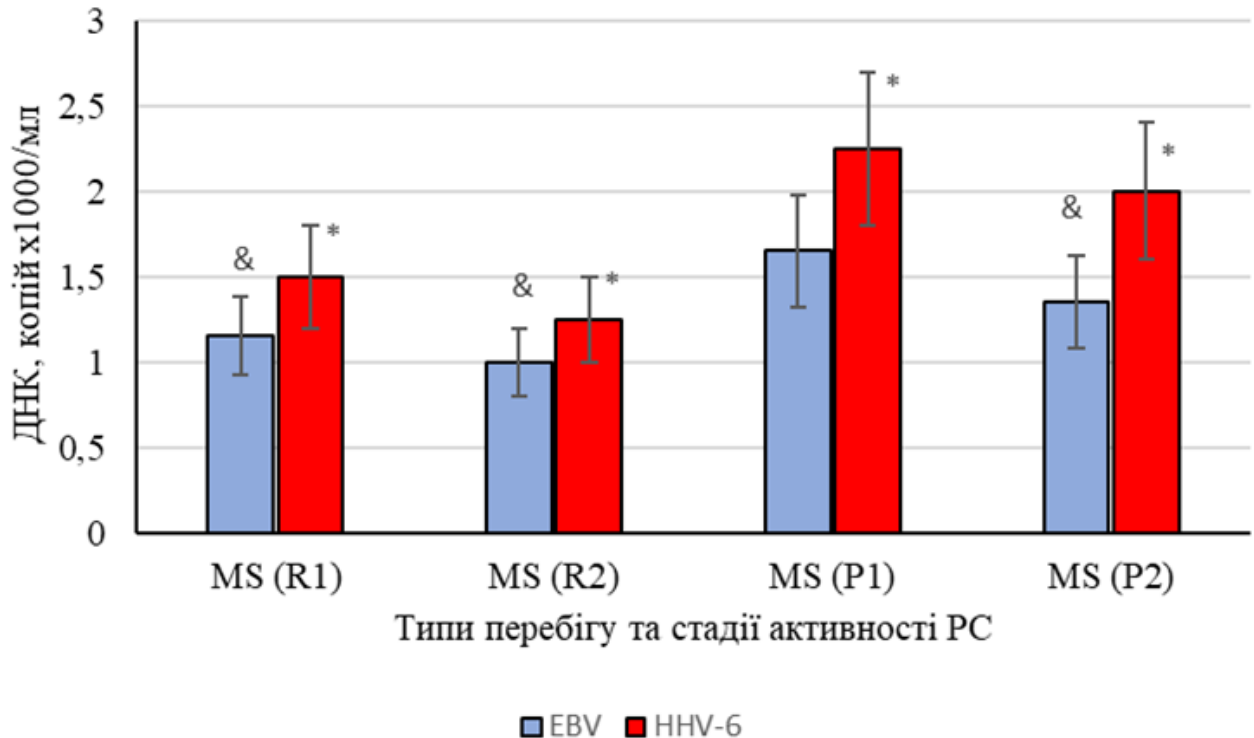


Рисунок 3. Кількісне визначення ДНК EBV та HHV-6 у сироватці крові пацієнтів з різними типами перебігу РС; &-достовірна різниця показників кількості ДНК копій EBV у порівнянні у порівнянні з групою (MS)P1 ($p<0,05$); * -достовірна різниця показників кількості ДНК копій HHV-6 у порівнянні між групами ($p<0,05$).

У роботі було визначено також кількість ДНК EBV та HHV-6 у сироватці крові хворих РС методом ПЛР- показники варіювали від невизначеної кількості до $3,7 \times 10^3$ копій/мл для EBV і до $4,5 \times 10^3$ копій/мл для HHV-6. У пацієнтів з ПРС вірусне навантаження EBV та HHV-6, як в період загострення, так і в період стабілізації, було значно більшим, ніж у хворих з РРРС (рис. 3). Найнижча середня кількість ДНК була виявлена у пацієнтів групи MS(R2) (РРРС із ремісією) (EBV- $1,0 \times 10^3$ копій/мл та HHV-6 - $1,25 \times 10^3$ копій/мл), а найвища – у пацієнтів групи (MS) P1 (ПРС із загостренням) (EBV - $1,65 \times 10^3$ копій/мл та HHV-6 - $2,3 \times 10^3$ копій/мл). Кількість ДНК EBV в період загострення у пацієнтів групи (MS)P1 в 1,4 рази перевищувала показники групи MS(R1) (статистично значуща різниця ($p=0,0499$)); статистично значущої різниці кількості ДНК EBV між у групами MS(R1) та MS(R2) і групами (MS)P1 та (MS)P2 не визначалося. Кількість ДНК HHV-6 в період загострення у пацієнтів

групи (MS)P1 в 1,5 рази перевищувала показники групи MS(R1) (статистично значуща різниця ($p=0,0487$)), а в період ремісії у пацієнтів групи (MS)P2 в 1,6 рази перевищувала показники групи MS(R2) (статистично значуща різниця ($p=0,0468$)).

ДНК HHV-6 у сироватці крові хворих РС при усіх формах перебігу виявлялося частіше ніж ДНК EBV, та у більшій кількості. ДНК HHV-6 не виявлялося у здорових осіб, але 77 % з них мали IgG до HHV-6. Для визначення зв'язку між наявністю IgG до HHV-6 у сироватці крові та маркерами запалення усі досліджені були розподілені на групи серопозитивних та серонегативних осіб: (К HHV-6+) – серопозитивні здорові донори; (К HHV-6-) – серонегативні здорові донори; (PC HHV-6+) – серопозитивні пацієнти з РС; (PC HHV-6-) – серонегативні пацієнти з РС. У цих групах нами було досліджено рівні прозапальних цитокинів - IL-1 β , IFN- γ , IL-12 та протизапального цитокину IL-10 (рис. 4).

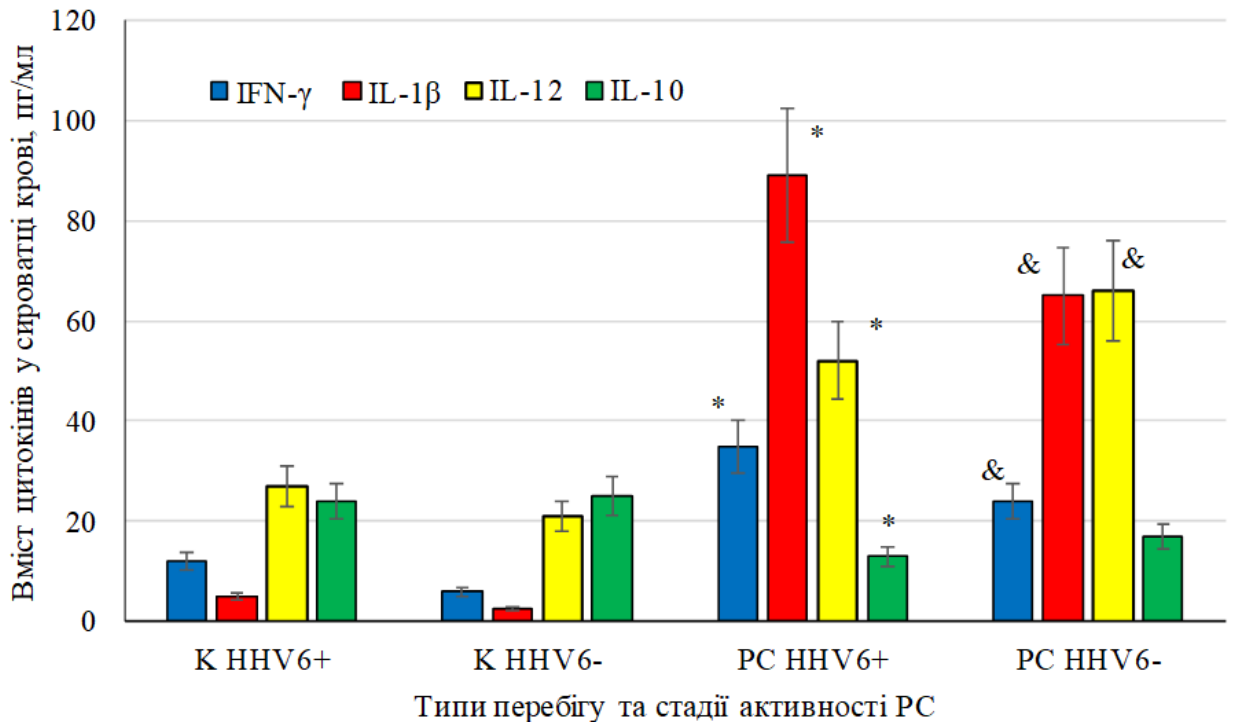


Рисунок 4. Порівняння сироваткових рівнів про/протизапальних цитокінів (pg/ml) у HHV-6 серопозитивних/серонегативних пацієнтів з РС та здорових осіб (PC HHV-6+ – серопозитивні пацієнти з РС; PC HHV-6– серонегативні пацієнти з РС; К HHV-6+ – серопозитивні здорові донори; К HHV-6- серонегативні здорові донори); *-достовірна різниця показників цитокінів (PC HHV-6 +) у порівнянні з контролем ($p < 0,05$). & -достовірна різниця показників цитокінів (PC HHV-6-) у порівнянні з контролем ($p < 0,05$).

При визначенні рівнів сироваткових цитокінів було показано, що концентрації IL-1 β , IFN- γ та IL-12 були значно вищими у пацієнтів з РС, як у серопозитивної, так і у серонегативної групи порівняно зі здоровими особами, тоді як концентрації IL-10 були нижчими у хворих на РС, ніж у здорових. У хворих групи РСННВ-6+ визначалася висока концентрація IL-1 β (89 пг/Мл), достовірно вища ніж у групі РСННВ-6- (65 пг/Мл), а концентрація IL-12 була підвищена в обох цих групах. У хворих групи РСННВ-6+ спостерігалися достовірно підвищені відносно здорових серопозитивних донорів рівні IFN- γ - в 2,4 рази, IL-1 β - у 18 разів та IL-12 - в 2,4 рази. В групах здорових осіб КННВ-6 + та КННВ-6- рівні IL-1 β були виключно низькі (5 пг/мл та 2 пг/мл відповідно), а рівні IFN- γ та IL-12 були невисокі та не мали достовірних відмінностей між цими групами. Вміст протизапального цитокіну IL-10 у групі РСННВ-6+ був достовірно знижений вдвічі від показнику у здорових осіб ($p < 0,05$). Також виявлена різниця у продукції IL-10 між ННВ-6-серопозитивними та ННВ-6-серонегативними пацієнтами з РС ($p < 0,05$). Концентрація IL-10 у здорових обох груп К ННВ-6 + та

К ННВ-6 була майже однаковою: 24 пг/мл та 25 пг/мл.

В роботі було проведено кореляційний аналіз між вмістом сироваткових IgG до EBNA1 та рівнями цитокінів у хворих РС з різним перебігом (рис. 5).

Вивчаючи кореляційну залежність між вмістом IgG до EBNA-1 та рівнями цитокінів було отримано позитивний зв'язок в групі пацієнтів ПРРС у стадії загострення (MS(R1)) з IL-1 β (+0,682) та в групі пацієнтів у стадії клінічно-радіологічної ремісії MS(R2) з IFN- γ (+0,334), IL-1 β (+0,404) і IL-12 (+0,420) та зворотній зв'язок з регуляторним протизапальним цитокіном IL-10 (-0,419). В групі пацієнтів з ПРРС на етапі стабілізації MS(P2) визначалася кореляція між IgG до EBNA1 та рівнем IL-1 β помірної сили (+0,527). Отже, у обстежених було встановлено пряму кореляцію між рівнем IgG до EBNA1 та прозапальними цитокінами, а також для групи MS(R2) зворотню кореляцію з протизапальним цитокіном. Зв'язок вмісту сироваткових IgG до EBNA1 з клінічними показниками та рівнями цитокінів у пацієнтів з РС мав відмінності в залежності від форми хвороби, стадії та перебігу РС.

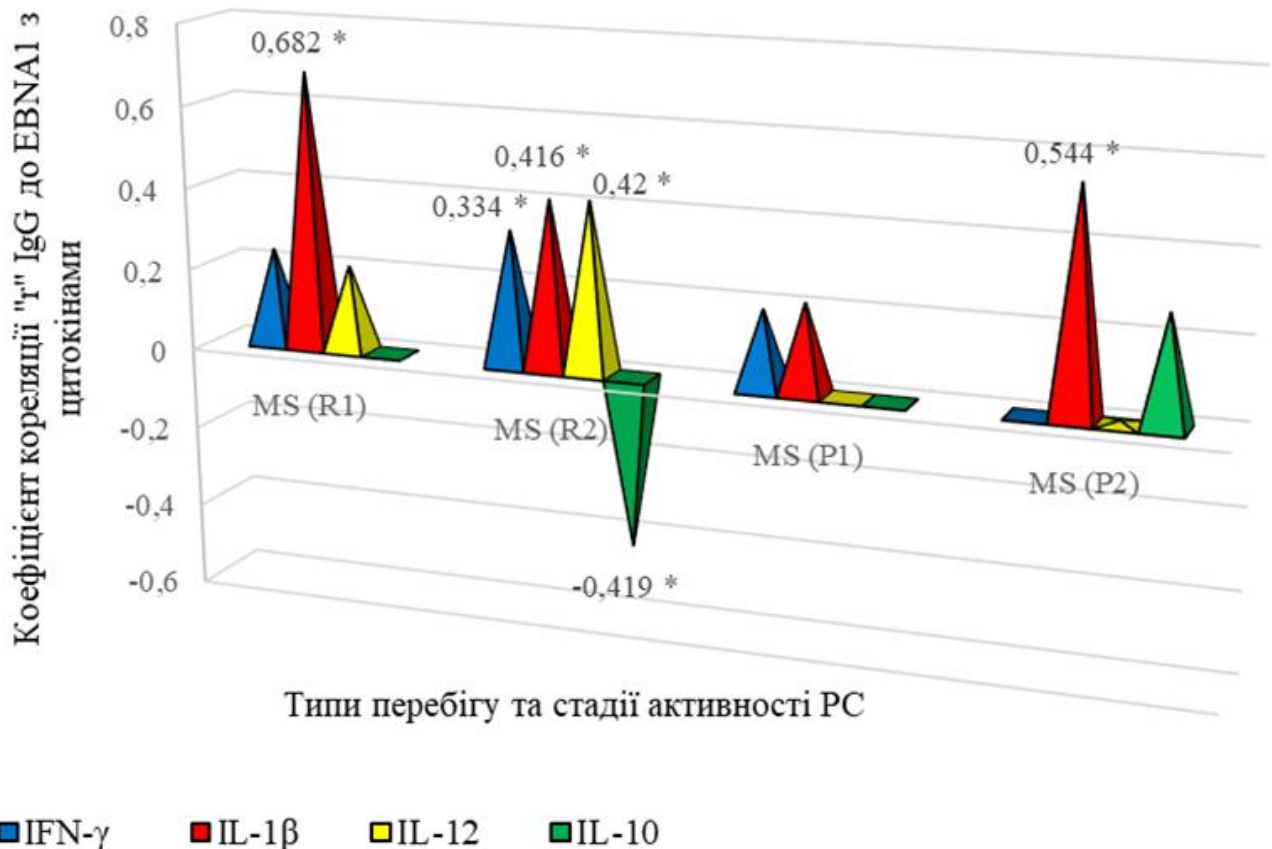


Рисунок. 5. Кореляційний зв'язок вмісту IgG до EBNA1 з цитокінами у сироватці крові пацієнтів з різними типами перебігу РС; * - слабкий при коефіцієнті кореляції $r \leq 0,3$, помірної сили при $0,3 < r < 0,7$ та сильний при $r \geq 0,7$

Дослідження цитокинового профілю сироватки крові виявило прозапальну активацію регуляторної ланки гуморального імунітету як у пацієнтів з ПРС, так й у пацієнтів з РРРС у стадії загострення, про що свідчили значно підвищені рівні IL-1 β (рис. 6). У пацієнтів підгрупи MS(R1) спостерігалися достовірно підвищені відносно контролю середні рівні IFN- γ - в 3 рази, IL-1 β - в 28,5 рази та IL-12 - в 1,4 рази. При цьому вміст IL-10 достовірно не відрізнявся від показнику здорових осіб. В підгрупі MS(R2) рівень IL-10 в 1,5 рази перевищував показник контрольної групи ($p < 0,05$), а рівень IFN- γ був достовірно нижче показнику в підгрупі MS(R1) та не мав достовірних відмінностей від контролю. Як і у пацієнтів з РРРС в стадії загострення, рівень IL-1 β в підгрупі MS(R2) був достовірно підвищений відносно показнику здорових осіб ($p < 0,05$). Виявлено виражену прозапальну активацію регуляторної ланки гуморального імунітету у групах з РРРС, про що свідчили підвищені рівні IFN- γ , IL-1 β та IL-12. У той же час, в групі пацієнтів з РРРС у стадії клінічно-радіологічної ремісії підвищена продукція прозапальних цитокинів, зокрема IL-1 β та IL-12,

супроводжувалася компенсаторним зростанням IL-10.

Стан цитокиногенезу у пацієнтів підгрупи MS(P1) свідчив про більш виражену некомпенсовану прозапальну активацію – на тлі достовірно підвищених відносно показників здорових осіб рівнів IFN- γ (в 5,1 рази), IL-1 β (в 45,6 рази) та IL-12 (в 1,7 рази) в сироватці крові, спостерігався знижений в 1,9 рази відносно контролю рівень IL-10 ($p < 0,05$). У пацієнтів з ПРС на етапі стабілізації, що склали підгрупу MS(P2), також було виявлено достовірно підвищені відносно контролю рівні IFN- γ , IL-1 β та IL-12 (в 4 рази; 39,3 рази та 1,5 рази відповідно), проте вміст IL-10 був достовірно підвищений відносно показнику в підгрупі MS(P1) але не мав достовірних відмінностей від контролю.

Для визначення взаємозв'язку стану цитокиногенезу з клінічною активністю захворювання було проведено кореляційний аналіз між показниками вмісту досліджених цитокинів в сироватці крові та показником інвалідації пацієнтів за шкалою EDSS. Виявлено наявність кореляційного зв'язку між показником інвалідації та рівнем IL-1 β ($r = 0,349$, $p = 0,031$), який є одним із важливих маркерів запалення.

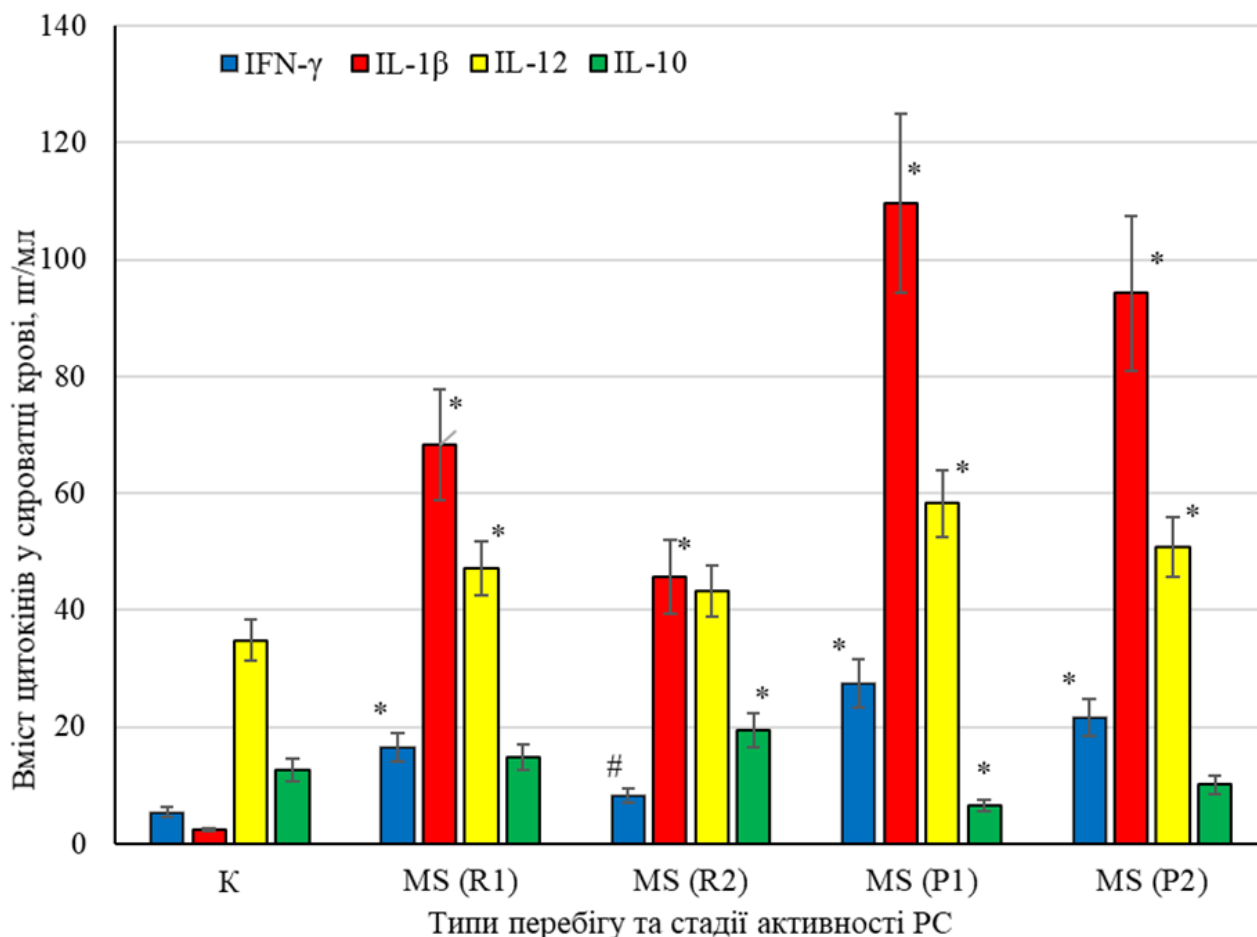


Рисунок 6. Концентрація цитокінів у сироватці крові пацієнтів з різними типами перебігу РС та здорових осіб; * ($p < 0,05$) відносно групи контролю; # ($p < 0,05$) при порівнянні між групами хворих.

Виявлено також зв'язок між погіршенням клінічного стану пацієнтів з ПРС на етапі неухильного прогресування захворювання та підвищенням вмісту IFN- γ та IL-1 β в сироватці крові. У пацієнтів з ПРС не залежно від етапу прогресування спостерігалася наявність цитокінового дисбалансу, про що свідчило підвищення рівнів IL-1 β , IL-12 та IFN- γ , більш виражене, ніж у пацієнтів з PPPC, на тлі зниження вмісту IL-10.

Ще одними з можливих патогенних кандидатів, які приймають участь у запальних процесах при РС, розглядаються ендогенні ретровіруси людини (HERV), особливо члени сімейства W (HERV-W), що було підтверджено метааналізом 43 досліджень [5,6,9].

Наше дослідження було спрямоване на аналіз впливу концентрації глікопротеїну HERV-W у сироватці крові а різні типи перебігу та стадії активності РС (рис. 9).

Вміст глікопротеїну HERV-W у підгрупі хворих ПРС з неухильним прогресуванням MS(P1) склав 8,3 \pm 2,4 нг/мл проти 4,3 \pm 1,9 нг/мл у підгрупі пацієнтів з

PPPC у стадії загострення MS(R1); у підгрупі MS(R2) пацієнтів з PPPC у стадії ремісії - склав 2,4 \pm 1,7 нг/мл ($p < 0,05$) та підгрупі MS(P2) з ПРС на етапі стабілізації - 5,0 \pm 2,4 нг/мл. Результати дослідження показали, що в групі пацієнтів MS(P1) концентрація глікопротеїну була найвищою при порівнянні з іншими групами хворих (в 2 рази вище ніж у групі MS(R1), в 1,6 разів – ніж у групі MS (P2) та в 4 - ніж у групі MS(R2)). У групі контролю концентрація глікопротеїну була найнижчою 0,2 \pm 0,1 нг/мл ($p < 0,05$) при порівнянні з усіма групами хворих.

Нами було встановлено, що вміст глікопротеїну HERV-W у сироватці крові у групі пацієнтів ПРС з неухильним прогресуванням MS(P1) був значно вищим, ніж у інших груп хворих з РС, та корелював з клінічним перебігом захворювання і рівнем інвалідизації EDSS.

Для вивчення взаємодії між рівнем глікопротеїну HERV-W та концентраціями сироваткових про/протизапальних цитокінів у різних підгрупах хворих РС ми провели кореляційне дослідження (рис. 8).

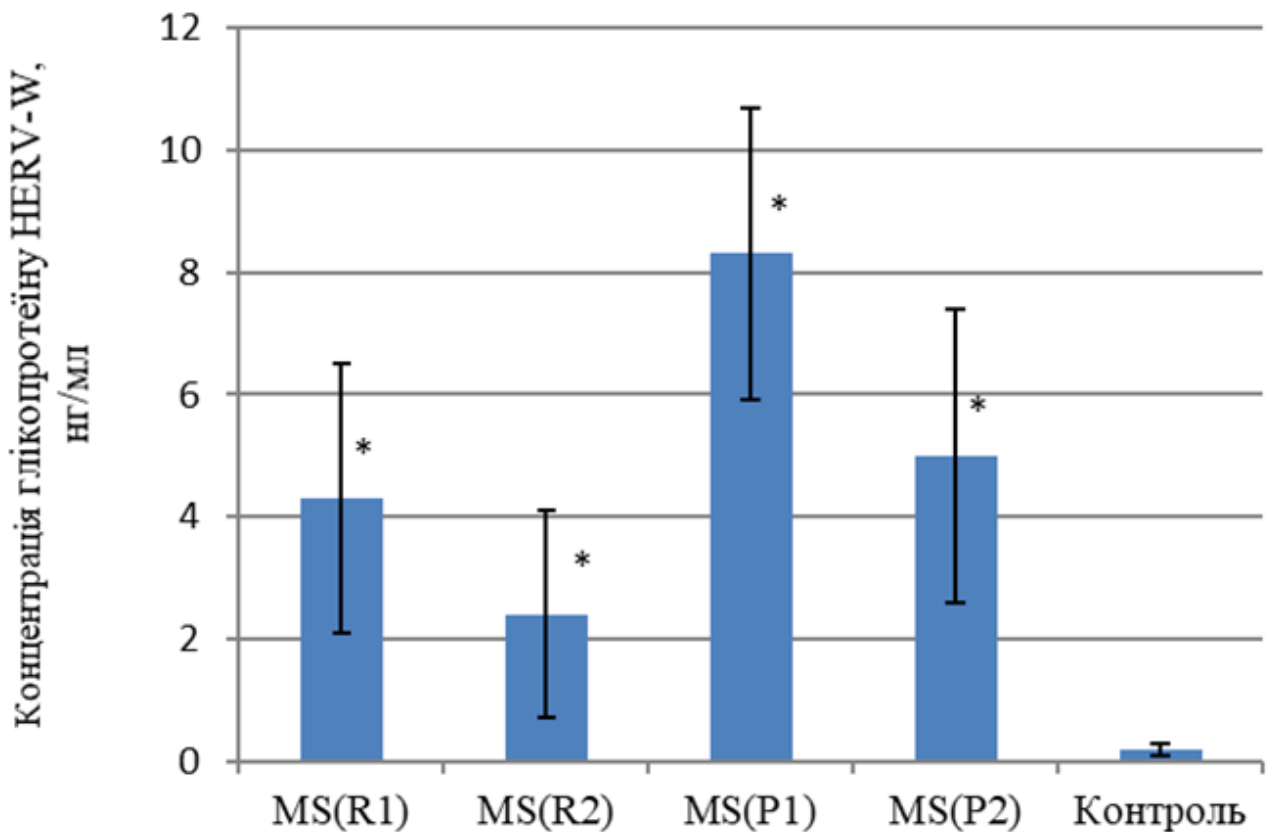


Рисунок 7. Вміст глікопротеїну HERV-W у сироватці крові пацієнтів з різними типами перебігу РС та здорових осіб ($M \pm \sigma$); * -достовірна різниця показників вмісту глікопротеїну HERV-W у групах пацієнтів з РС у порівнянні з контролем ($p < 0,05$).

Вивчаючи кореляційну залежність між глікопротеїном HERV-W та IL-1 β , IFN- γ , IL-10 та IL-12, було отримано значущий позитивний зв'язок в підгрупі MS(P1) з прозапальним IL-1 β (+0,412) та зворотній негативний (-0,533) з регуляторним IL-10, що свідчить про тенденцію до зниження прозапального демієлінізуючого впливу підвищеної концентрації глікопротеїну на підставі неухильного прогресування захворювання у групі MS(P1). В період стабілізації, в групі MS(P2) отримана позитивна кореляційна залежність з IL-12 (0,384). У підгрупі пацієнтів з PPPC у стадії загострення (MS(R1)) отримана зворотня негативна кореляція з IFN- γ (-0,363) та IL-12 (-0,375), у стадії клінічно-радіологічної ремісії MS(R2) значимих кореляцій не отримано.

В нашому дослідженні встановлено, що вміст глікопротеїну HERV-W у сироватці крові був вищим в групі пацієнтів з неухильним прогресуванням РС та корелював з клінічним перебігом захворювання та рівнем інвалідації EDSS, що свідчить про те, що вплив ендегенних ретровірусів на патогенез розсіяного склерозу реалізується через підтримку запальних станів, підживлюючих аутоімунний розлад.

Висновки

Доведено взаємозв'язок високого рівня вірусного навантаження за вмістом специфічних IgG до EBNA1 і HHV-6 та кількістю копій ДНК EBV і HHV-6 у сироватці крові хворих на РС з прогресуючим типом перебігу хвороби у порівнянні з рецидивно-ремітуючим.

У всіх досліджуваних групах пацієнтів з РС, окрім групи P2, спостерігалася помірна кореляція індексу позитивності за IgG до EBNA1 з IL-1 β та помірна зворотна кореляція з IL-10, що можна розглядати як доказ зв'язку між реактивацією вірусу у контексті прозапального профілю цитокінів.

Встановлено, що серопозитивні пацієнти з РС щодо IgG EBV та IgG HHV-6 частіше зустрічаються при прогресуючому перебігу хвороби та мають високий рівень цитокінів IL-1 β та IFN- γ у порівнянні із серонегативними, а рівні IL-10 навпаки є нижчими.

Концентрація глікопротеїну HERV-W була також значно вищою у всіх груп хворих РС в порівнянні з групою контролю та корелювала з клінічним перебігом захворювання і рівнем інвалідації за шкалою EDSS, що свідчить про істотне значення ендегенних ретровірусів у патогенезі розсіяного склерозу.

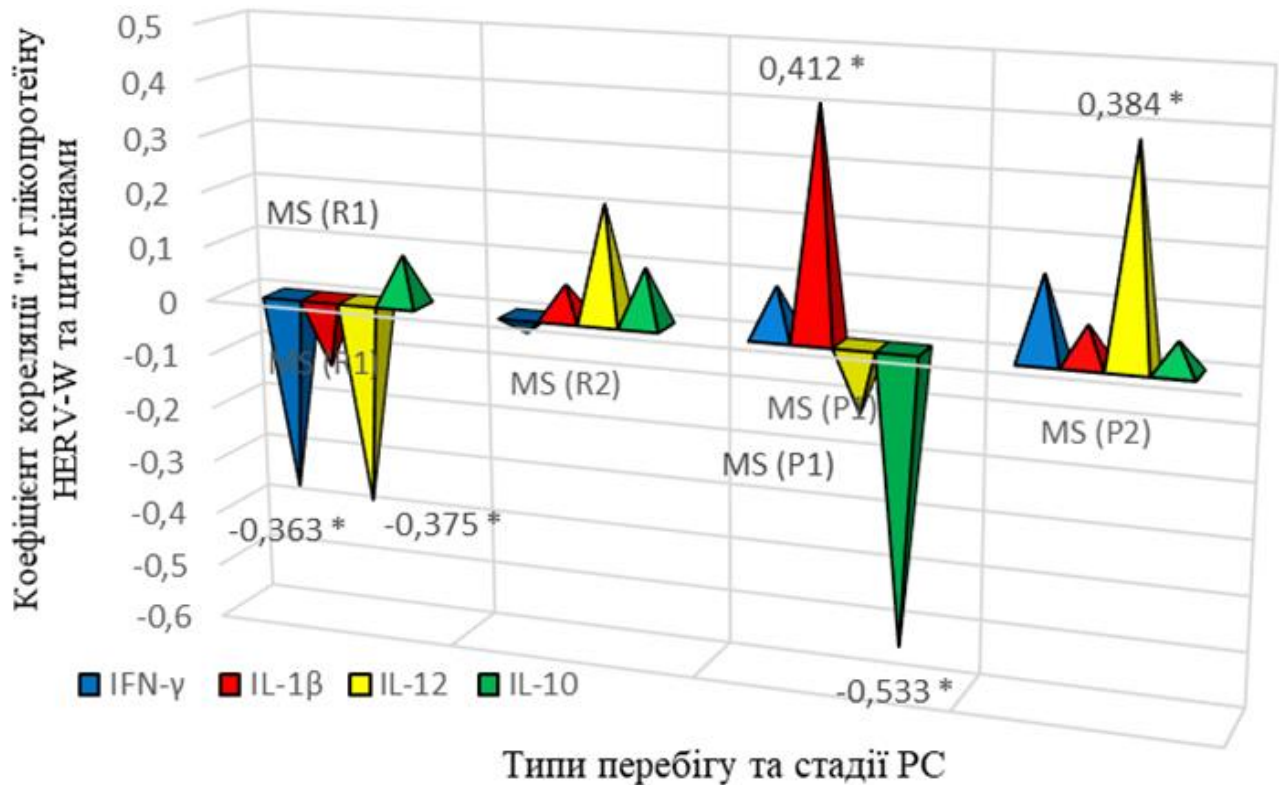


Рисунок. 8. Зв'язок між рівнем глікопротеїну HERV-W та рівнями цитокінів у сироватці крові пацієнтів з різними типами перебігу РС (* - слабкий при коефіцієнті кореляції $r \leq 0,3$, помірної сили при $0,3 < r < 0,7$, та сильний при $r \geq 0,7$)

Отримані результати дозволяють зробити висновок, що EBV-інфекція та HHV-6 і ретровіруси відіграють важливу роль в патогенезі розсіяного склерозу, приймаючи участь в загостренні і прогресуванні хвороби шляхом впливу на системну відповідь цитокінів.

Study of the influence of viruses of the family Herpesviridae 4, 6 types and human endogenous retroviruses on the course of multiple sclerosis
Oleg Kolyada, Irina Kuchma, Tatyana Kolyada, Anatoly Sklyar, Lyudmila Tynnyka

Introduction. During the last decades, the hypothesis about the key pathogenetic role in the development of multiple sclerosis (MS) of viruses of the Herpesviridae family and human endogenous retroviruses (HERV) has been increasingly confirmed. The study of the relationship between the state of cytokinesis and the activity of MS, as well as the type of disease course is one of the topical areas of research into the immunopathogenesis of MS since cytokines are key factors in the development of inflammation in the central nervous system (CNS). The heterogeneity of the disease suggests that MS is not caused or triggered by a single virus, but a combination of them may act as a trigger in genetically susceptible individuals. **The aim of our work** was to establish the role of EBV and HHV-

6 infections and endogenous retroviruses HERV-W in the pathogenesis of multiple sclerosis, which is mediated by their participation in the exacerbation and progression of the disease by affecting the systemic response of cytokines. **Materials and methods.** An examination of 98 patients registered in the Department of Neuroinfections and Multiple Sclerosis of the National Institution "Institute of Neurology, Psychiatry and Narcology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine" were carried out. The criterion for inclusion in the study was the presence of a verified diagnosis of "multiple sclerosis" in accordance with the order of the Ministry of Health of Ukraine No. 487, August 17, 2007 (code G35 according to ICD-10). Depending on the activity of the disease, the following subgroups were formed: MS(R1) - a subgroup of patients with relapsing-remitting type of MS (RRMS) in the exacerbation stage (clinical and radiological activity), n=24. MS(R2) - a subgroup of patients with relapsing-remitting type of MS in the stage of clinical and radiological remission, n=42. MS(P1) - a group of patients with progressive types of MS (PMS) with steady progression, n=21. MS(P2) - a group of patients with progressive types of MS at the stage of stabilization, n=11. The control group consisted of 27 practically healthy individuals, the inclusion criteria of which were the absence of acute infections for at least 1 month before the examination, the absence of chronic inflammatory, allergic, and autoimmune diseases. Immunological studies were carried out in the laboratory of

clinical immunology and allergology of the National Institution "Mechnikov's Institute of Microbiology and Immunology of National Academy of Sciences of Ukraine". Determination of the content of IgM and IgG to the nuclear antigen of EBV (EBNA1) and HHV-6, the levels of IFN- γ , IL-1 β , IL-10, IL-12 and glycoprotein HERV-W in blood serum was carried out by the method of solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with using test systems certified in Ukraine. Determination of EBV and HHV-6 DNA in blood serum was carried out by polymerase chain reaction (PCR). Statistical processing of the obtained data was carried out using the program STATISTICA 11.0 (StatSoft, Inc) and XLSTAT 19.6 (Addinsoft). Spearman's correlation analysis was used to determine the relationship between phenomena. **Results and discussion.** The analysis of clinical data of patients with different types of the course of MS showed differences in indicators important in prognostic terms, such as the severity and duration of onsets, the degree of disability, the completeness and duration of clinical remissions, the frequency and duration of relapses, the peculiarities of the course with various neurological syndromes that occur in genetically predisposed person as a result of the action of one or more environmental factors. The presence of specific IgG to EBNA1 and HHV-6 was revealed, as well as the qualitative and quantitative determination of the DNA of these viruses in the blood serum of patients with multiple sclerosis in comparison with control group depending on the clinical course of the disease as a result of the screening of persistent viral infections initiated with the development of MS and the response of the body's immune system. The presence of EBV and HHV-6 DNA in blood serum indicated the activation of the viruses and the lytic stage of the infection. All groups of the study patients were divided into groups of seropositive and seronegative individuals to determine the relationship between the presence of IgG to HHV-6 in blood serum and markers of inflammation: the levels of IL-1 β , IFN- γ , and IL-12 were increased in 18; 2,4; 2,4 times, respectively, compared to the control group in seropositive patients. Based on studies of the levels of IL-1 β , IFN- γ , IL-12, and IL-10 cytokines, it was shown that the content of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in the MSHHV-6+ group was reduced by half compared to the level in healthy individuals. It was shown that the relationship between serum IgG to EBNA1 and clinical indicators and levels of cytokines in patients with MS varies depending on the form of illness, stage and course of MS due to the strong correlation between serum IgG to EBNA-1 and levels of cytokines. A study of the cytokine profile of blood serum revealed pro-inflammatory activation of the regulatory component of humoral immunity in both patients with PMS and patients with RRMS in the acute stage, as evidenced by significantly increased levels of IL-1 β . It was demonstrated that the content of HERV-W glycoprotein in the blood serum was higher in the group of patients with steady progression of MS and correlated with the clinical course of the disease and Expanded Disability Status Scale

(EDSS) at the studying the level of HERV-W glycoprotein in the blood serum of patients with different types of course and activity of MS. This suggests that the influence of endogenous retroviruses on the pathogenesis of multiple sclerosis is realized through the support of inflammatory conditions that nourish the autoimmune disorder.

Conclusions. The relationship between a high level of viral load based on the content of specific IgG to EBNA1 and HHV-6 and the number of EBV and HHV-6 DNA copies in the blood serum of MS patients with the progressive type of the course of the disease in comparison with the relapsing-remitting type has been proven. A temperate correlation of the positivity index for IgG to EBNA1 with IL-1 β and a temperate inverse correlation with IL-10 were observed in all studied groups of MS patients, except for the P2 group, which can be considered as evidence of a relationship between viral reactivation in the context of a pro-inflammatory cytokine profile. It was established that seropositive patients with MS for IgG EBV and IgG HHV-6 was more common in the progressive course of the disease and have high levels of cytokines IL-1 β and IFN- γ compared to seronegative ones, and levels of IL-10, on the contrary, was lower. The concentration of HERV-W glycoprotein was also significantly higher in all groups of MS patients compared to the control group and correlated with the clinical course of the disease and the level of disability according to the EDSS scale, which indicates the significant importance of endogenous retroviruses in the pathogenesis of multiple sclerosis. The data obtained allow us to conclude that EBV infection and HHV-6 and retroviruses play an important role in the pathogenesis of multiple sclerosis, participating in the exacerbation and progression of the disease by affecting the systemic response of cytokines.

Keywords: *Herpesviridae* 4, 6 types, human endogenous retroviruses, multiple sclerosis

References

1. Functional and metabolic characteristics of peripheral blood mononuclear phagocytes in patients with different clinical course of multiple sclerosis / Koliada O. M., Vdovichenko N. I., Kolyada T. I., Bilozorov O. P. *Regulatory Mechanisms in Biosystem*. 2020. Vol. 11, № 4, P. 454–500. <https://doi.org/10.15421/022075> Web of Science.
2. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis / Sklyar A. I., Toryanyk I. I., Osolodchenko T. P., Ponomarenko S. V. *Pathologiya*. 2020. T. 17, № 3 (50). C. 390–401. <https://doi.org/10.14739/2310-1237.2020.3.221870> Web of Science.
3. Vdovichenko N. I., Kolyada O. M., Tupotilov O. V. Peculiarities of cytokine profile in patients with different types of course of multiple sclerosis. *Immunologiya ta allergologiya: nauka ta practica*. 2020. № 1. C. 12–16. <https://doi.org/10.37321/immunology.2020.01-02>
4. The prevalence of aa and ag haplotypes, taking into account different types of flow, the degree of severity of

neurological deficiency and the nature of prognosis in patients with sporadic and family forms of multiple sclerosis/ Voloshina N., Negreba T., Kolyada T., Pohuliaieva T. M. *Norwegian Journal of Development of the International Science*. 2020. № 43 (1). C. 25–28.

5. Modulating effect of HERV-W ENV on peripheral blood monocytes in patients with different types of multiple sclerosis / Koliada O.M., Vdovichenko N.I., Koliada T.I., Tupotilov O.V. *Pathologia*. 2022. Vol. 19 (1). P. 32–39. DOI: <https://doi.org/10.14739/2310-1237>. Web of Science.

6. Dolei A. The aliens inside us: HERV-W endogenous retroviruses and multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*. 2018. Vol. 24 (1). P. 42–47. <https://doi.org/10.1177/1352458517737370>.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>

7. Donati D. Viral infections and multiple sclerosis. *Drug Discov Today Dis Models*. 2020. Vol. 32. P. 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2020.02.003>.

<https://www.sciencedirect.com>

8. The role of Epstein-Barr virus in multiple sclerosis: from molecular pathophysiology to in vivo imaging / Guan Y., Jakimovski D., Ramanathan M. [et al.]. *Neural Regen Res*. 2019. Vol. 14. P. 373–386. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.2454625>. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>

9. PHERV-W envelope protein fuels microglial cell-dependent damage of myelinated axons in multiple sclerosis/ Kremer, D., Gruchot, J., Weyers, V., Oldemeier, L. [et al.]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2019. Vol. 116 (30). P. 15216–15225. <https://doi.org/10.1073/pnas.1901283116>

10. Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, and multiple sclerosis susceptibility a multiethnic study / Langer-Gould Annette, Wu Jun, Robyn Lucas [et al.]. *Neurology*. 2017. Vol. 89 (13). P. 330–337. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004412>

11. Kolyada T. I., Zelenskaya A. D., Tupotilov A. V. Modern methods for studying biomarkers of multiple sclerosis. *Annals of Mechnikov Institute*. 2016. № 4. P. 27–33. URL:http://nbuv.gov.ua/UJRN/ami_2016_4_5.