

ВОЗМОЖНОСТИ АНТИ В-КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ ПРИ РАССЕЯННОМ СКЛЕРОЗЕ

Евдошенко Е.П.^{1,2,4}, Маслянский А.Л.⁷,
Заславский Л.Г.^{1,2,4}, Скоромец А.А.⁴, Зюзгин И.С.^{2,3},
Рябыкина О.Е.^{2,3}, Тотолян Н.А.⁴, Зуева Е.Е.⁵, Лапин С.В.⁶,
Тотолян Арег А.⁶

¹ Ленинградская областная клиническая больница (ЛОКБ), отделение неврологии

² Ленинградский областной центр рассеянного склероза

³ Ленинградская областная клиническая больница (ЛОКБ), отделение трансплантации костного мозга

⁴ Кафедра неврологии с клиникой Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. академика И.П. Павлова

⁵ Лаборатория клинической иммунологии и молекулярной диагностики ЦЛД СПбГМУ им. академика И.П. Павлова

⁶ НМЦ по молекулярной медицине МЗиСР РФ на базе Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. академика И.П. Павлова

⁷ ФГУ «Центр сердца крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова», Санкт-Петербург

Резюме. В статье обсуждается новая роль В-клеток в патогенезе рассеянного склероза, отношения Т-В клеток в развитии воспаления и механизмы наилучшей терапевтической интервенции для достижения В-клеточной дилепции. Приведен клинический случай резистентного течения РС и эффект после проведения курса анти В-клеточной терапии.

Впервые было использовано сочетание митоксантрона и ритуксимаба для достижения максимального терапевтического эффекта. Использовались клинические, радиологические и лабораторные методы оценки эффективности терапии.

Ключевые слова: В-клетки, рассеянный склероз, ритуксимаб, митоксантрон.

Evdoshenko E.P., Maslyancky A.L., Zaslavsky L.G., Skoromets A.A., Ziuzgin I.S., Riabykina O.E., Totolian N.A., Zueva E.E., Lapin S.V., Totolian Areg A.

OPPORTUNITIES OF ANTI B-CELL THERAPY IN MULTIPLE SCLEROSIS

Abstract. A new role of B-cells in pathogenesis of multiple sclerosis (MS), their relations with B-cells in development of inflammation and probable mechanisms of advanced therapeutic intervention in order to reach B-cell depletion are subject to discussion in present article. Here we describe a clinical case of MS with a resistant clinical course, and results of anti B-cell treatment. To attain maximal clinical effect, a novel therapeutic regimen (a combination of rituximab and mitozantrone) was applied. Clinical, radiological and laboratory methods were used to substantiate the efficiency of treatment. (*Med. Immunol.*, vol. 11, N 1, pp 63-70)

Рассеянный склероз (РС) является хроническим воспалительным демиелинизирующим за-

болеванием ЦНС, которое ввиду своей распространенности (50 случаев на 100 тыс. населения) и преимущественным поражением лиц трудоспособного возраста имеет важное медикосоциальное значение. На сегодняшний день РС представляется мультифакториальным заболеванием, ведущим патогенетическим механизмом которого, лежащим в основе воспаления, является аутоиммунный процесс. Многочисленные доказательства аутоиммунной природы РС получены в серии экспериментальных и клинических работ.

Адрес для переписки:

Евдошенко Евгений Петрович,
отделение неврологии,

Областная клиническая больница.

194291, Санкт-Петербург, пр. Луначарского, 47-49.

Тел.: (911) 740-23-89.

Факс: (812) 592-78-40.

E-mail: centerms@gmail.com

Ведущим методом лечения рассеянного склероза становится иммуносупрессивная терапия. И на сегодняшний день эффект таких препаратов, как глюкокортикоидные гормоны, митоксантрон, циклофосфамид, натализумаб и другие доказан результатами крупных рандомизированных исследований. Современной тенденцией является переход от методов неселективной иммуносупрессии к использованию таргетных препаратов, нацеленных на звенья иммунной системы. В последние годы в лечении широкого круга аутоиммунных заболеваний с успехом использовался подход, основанный на В-клеточной деплеции. Ранее нами был проанализирован зарубежный опыт применения ритуксимаба при аутоиммунных заболеваниях [9]. В частности, этот препарат был использован при демиелинизирующих заболеваниях ЦНС, в том числе при РС.

Данная терапия стала возможна благодаря появлению в терапевтическом арсенале ритуксимаба (мабтеры) – химерного моноклонального антитела против В-клеточного антигена CD20. Это позволило в 2005 году нескольким группам исследователей провести пилотные исследования данного препарата у нескольких больных резистентным к стандартной терапии первично прогрессирующим и вторичнопрогрессирующим РС. Препарат использовался в стандартном режиме в дозе 375 мг/м² четырехкратно с интервалом в неделю. Была показана принципиальная возможность достижения В-клеточной деплеции в периферической крови и ликворе и клинического улучшения у части больных [2, 6, 8]. Обращало на себя внимание существенное снижение содержания не только В-клеток, что было ожидаемым, но и Т-клеток (CD3⁺) в ликворе больных на фоне проведенной терапии. В то же время не наблюдалось закономерной динамики интраклеточной продукции иммуноглобулинов.

При оценке динамики содержания В-клеток ликвора через 24 недели после проведения терапии у большей части больных речь шла о существенном снижении числа В-клеток, однако полная деплеция не достигалась.

Принципиально существует два пути повышения эффективности анти В-клеточной терапии РС. Во-первых, возможно изменение режима введения с использованием более высоких разовых доз ритуксимаба с целью достижения более высоких концентраций препарата за гематоэнцефалическим барьером. В настоящее время данный подход был с успехом использован в рамках клинического исследования второй фазы HERMES (Helping to Evaluate Rituxan in Relapsing – Remitting Multiple Sclerosis) и продемонстрировал хорошую эффективность и переносимость.

Другой подход связан с использованием комбинации ритуксимаба и цитостатических препаратов, активных в отношении В-клеточной популяции. Обоснованием такого подхода может служить доказанный синергизм ритуксимаба и химиопрепаратов в лечении некоторых аутоиммунных заболеваний (например, комбинации ритуксимаба и метотрексата или циклофосфамида в терапии ревматоидного артрита) [4]. Синергизм ритуксимаба и цитостатических препаратов также хорошо доказан в онкогематологической практике в лечении лимфопролиферативных заболеваний. Одним из механизмов этого явления служит способность ритуксимаба подавлять экспрессию антиапоптотического Bcl-xL белка, что повышает чувствительность В-лимфоцитов к апоптозу [5]. Нам представляется оптимальным сочетание двух вышеперечисленных подходов с целью достижения максимальной эффективности терапии.

Идеальным кандидатом для комбинированной терапии у больных РС в силу ряда причин представляется митоксантрон. Данный препарат характеризуется хорошим проникновением через гематоэнцефалический барьер. Его эффективность в лечении РС в настоящее время доказана. В исследованиях *in vitro* показан ингибирующий эффект митоксантрона на пролиферацию Т- и В-клеток. Особый интерес вызывают данные о способности митоксантрона даже в субтерапевтических концентрациях индуцировать апоптоз В-лимфоцитов, прежде всего относящихся к субпопуляции В-клеток памяти (CD19⁺CD27⁺) [1, 3, 7]. В данной работе нами впервые в отечественной литературе опубликован собственный опыт применения ритуксимаба при РС и впервые в мировой практике апробирована комбинированная терапия (ритуксимаб с митоксантроном) у пациента с тяжелой резистентной формой РС.

Клиническое наблюдение

Женщина 1956 г.р. европеоидной расы, не курит. В 1994 г. (38 лет) перенесла ретробульбарный неврит справа, при обследовании было выявлено замедление проведения импульса по правому зрительному нерву на зрительно вызванных потенциалах (ЗВП), наличие олигоклонального синтеза IgG в ликворе, отсутствие его в сыворотке. На МРТ головного мозга – более 9 гиперинтенсивных очагов в режиме T2 и 2 активных очага, накапливающих контраст, характерные для рассеянного склероза. В неврологическом статусе без очаговой симптоматики. Был установлен диагноз клинически изолированный синдром. Проведена пульс-терапия метилпреднизолоном 3 г на курс с положительной динамикой. Вторая клиническая атака через 8 месяцев: гемипарезия

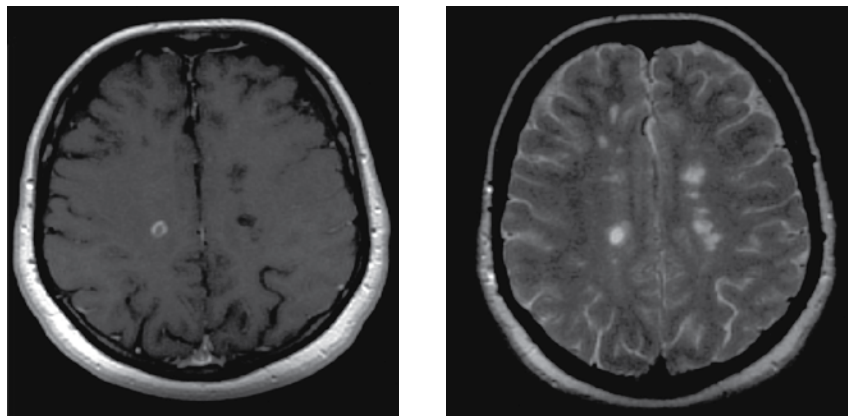


Рисунок 1. МРТ головного мозга пациентки (2005 г.)

справа, мягкая атаксия в руке. В дальнейшем средняя частота рецидивов составляла 1 эпизод в год. Терапия обострений – 3 г метилпреднизолона внутривенно. Противорецидивную терапию пациентка не получала. К январю 2005 г. EDSS составил 4,0 балла. При исследовании методом МРТ выявлялись активно накапливающие контраст (Гадовист®) T1 очаги. МРТ от 2005 г. представлена на рисунке 1.

Была назначена противорецидивная терапия глатирамером ацетата (Копаксон®) в стандартной схеме 20 мг подкожно каждый день. На фоне терапии была отмечена стабилизация состояния пациентки, а именно прекращение рецидивов, стабилизация EDSS на уровне 4,0 балла. Переносимость терапии – отличная. С октября 2006 г. (1 год и 10 месяцев на терапии глатирамера ацетатом) было отмечено нарастание EDSS до 6,0 (на 2 балла) к декабрю 2006 г. Проведена пульс-терапия метилпреднизолоном в стандартной дозе без видимого эффекта. Диагностирована вторично-прогрессирующая форма РС (ВПРС). В связи с прогрессированием заболевания, вторичной неэффективностью глатирамера ацетата с 17.01.2007 была начата терапия: митоксантроном 12 мг/м² каждые 3 месяца в сочетании с метилпреднизолоном 1 г внутривенно. Копаксон был отменен. Отмечена стабилизация состояния в виде EDSS 6,0; без рецидивов. Переносимость терапии хорошая, без нежелательных явлений.

10.10.2007 г. пациентка была доставлена в Ленинградский областной центр рассеянного склероза с центральным тетрапарезом (в руках до 2 баллов в ногах 0-1 балл, нарушение функций тазовых органов по типу задержки, межъядерной офтальмоплегией и грубым нистагмом) EDSS – 9,0. Зафиксировано тяжелое обострение. МРТ головного мозга и спинного мозга: выявлен спинальный T2 очаг на уровне С3-С5 с признаками отека на T1 активно накапливающий контраст (Гадовист®), характерный для РС. Начата терапия

метилпреднизолоном 1 г ежедневно внутривенно № 5 – без отчетливой положительной динамики. Динамика заболевания пациентки представлена на рисунке 2.

Учитывая тяжесть течения заболевания, его глубокий инвалидизирующий характер, резистентность к стандартно проводимой терапии (сохранение тяжелых обострений на фоне суммарной дозы митоксантрона 60 мг), после проведения консилиума было принято решение о проведении сочетанной иммуносупрессивной терапии. Пациентка подписала информированное согласие.

Протокол терапии.

Первый день: ритуксимаб 1 г + митоксантрон 20 мг + метилпреднизолон 1 г внутривенно капельно согласно разработанному протоколу. Премедикация стандартная.

Четырнадцатый день: ритуксимаб 1 г + метилпреднизолон 1 г внутривенно капельно согласно разработанному протоколу.

Оценка лабораторных и клинических параметров. Нейровизуализация.

Нейровизуализация осуществлялась на аппарате МРТ 1.5 Т (Magnetom Vision; Siemens AG, Germany®). Стандартный протокол сканирования и контрастирования гадовистом (Bayer Shering Pharma, Germany®)

Оценка лабораторных показателей.

Периферическая кровь (ПК) и спинномозговая жидкость (СМЖ) исследовались до, во время и после курса терапии. ПК забиралась стандартным методом из периферической вены в вакуумный контейнер. Одновременно производился забор СМЖ. Контрольными точками явились 15.11.2007 (до начала терапии) и 16.05.2008 (через 24 недели). Клинический анализ крови в интервале между инфузиями ритуксимаба осуществлялся ежедневно.

Типирование клеточных популяций осуществлялось методом проточной цитометрии

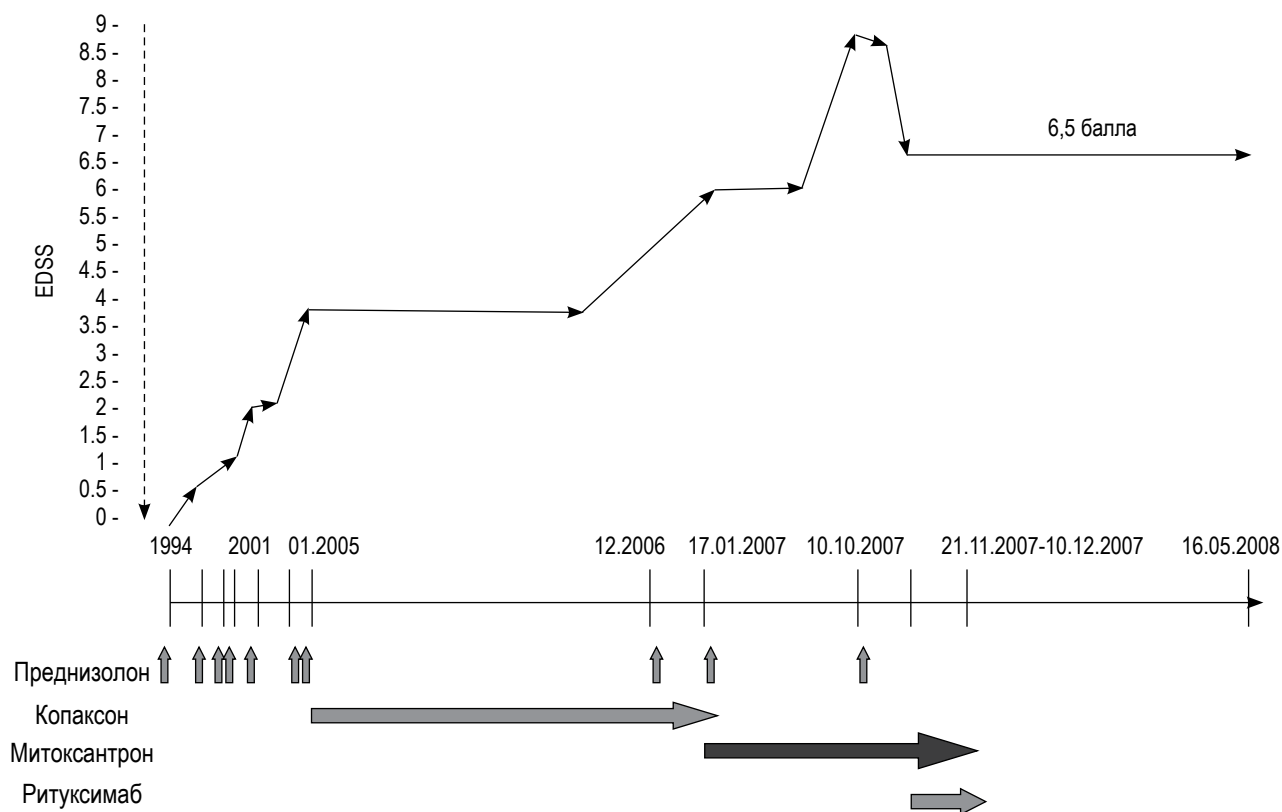


Рисунок 2. Динамика EDSS и проводимая терапия

на проточном цитофлуориметре Cytomics FC500 фирмы Beckman Coulter, USA, с использованием 2 меток исходно и через 6 месяцев после проведения терапии. Антитела использовались фирмы Beckman Coulter, USA. Определялись маркеры Т-клеток CD3⁺CD19⁻, Т-хелперы CD3⁺CD4⁺, цитотоксические Т-лимфоциты CD3⁺CD8⁺, популяция естественных киллеров CD3⁻CD(16⁺56⁺)⁺, Т-клетки, несущие маркеры активации CD3⁺HLA-DR⁺, Т-клетки с фенотипом иммунорегуляторных CD4⁺CD25⁺ и В-лимфоциты CD3⁻CD19⁺.

Исследование гуморального звена включало: оценку олигоклонального синтеза IgG и легких

цепей по стандартной методике (изоэлектрофокусирование белков СМЖ и сыворотки с иммуноблоттингом IgG), IgG, IgM, IgA в сыворотке крови.

Также оценивались стандартная биохимическая панель, общий анализ мочи. ЭКГ и ЭХО-КГ.

Клинические шкалы и нейрофизиологическое обследование.

EDSS, Multiple Sclerosis Functional Composite (MSFC) test оценивались по стандартной методике.

Зрительные вызванные потенциалы (ЗВП) проводились по стандартной методике: при сти-

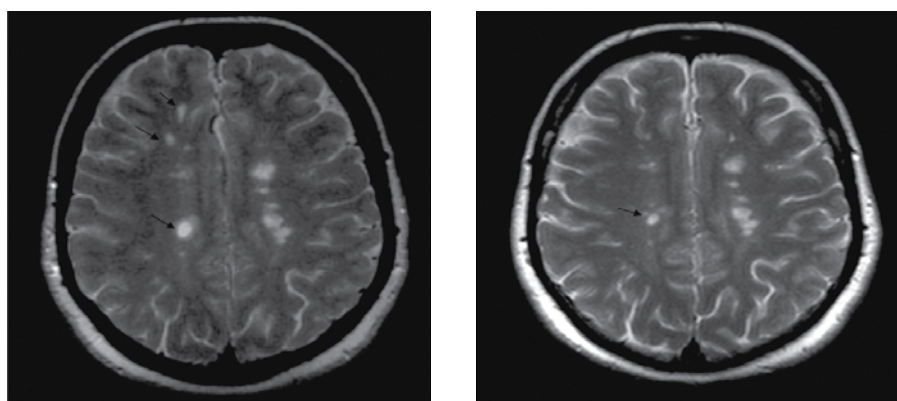


Рисунок 3. МРТ головного мозга. Слева: Pd+T2 (2005 г.). Справа: Pd+T2 (2008 г.)

муляции реверсивным шахматным паттерном, основные потенциалы № 75, P100, № 145.

Токсичность оценивалась стандартно по шкале токсичности CTC-NCIC criteria.

Результаты и обсуждение

После проведенной комбинированной терапии получен быстрый терапевтический ответ. За первые 10 дней было достигнуто снижение EDSS с 9,0 до 6,5 балла. На протяжении 48 недель сохранялась стабилизация EDSS на уровне 6,5 балла, без дальнейшей поддерживающей терапии. Снижение активности заболевания было зафиксировано на МРТ в виде уменьшения объема некоторых очагов на T2 и отсутствием активных очагов. Данные представлены на рисунках 3 и 4.

Приведем наиболее значимые результаты функциональных и нейрофизиологических тестов. MSFC тест: PASAT – 327 правильных ответов на 19.11.07; 36 правильных ответов на 15.05.08.

ЗВП: P (100) слева = 143 мс (19.11.07); P (100) слева = 135 мс (15.05.08); P (100) справа = 138 мс (19.11.07); P (100) справа = 126 мс (15.05.08). Учитывая полученные данные, можно осторож-

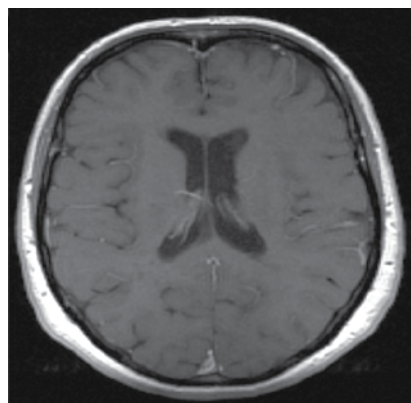


Рисунок 4. МРТ головного мозга (2008 г.). После проведенной терапии. Отсутствие накопления контраста при использовании Гадовиста

но предположить развитие процессов ремиелинизации.

Получена полная В-клеточная деплеция в периферической крови и ликворе после проведения комбинированной терапии, сохраняющаяся

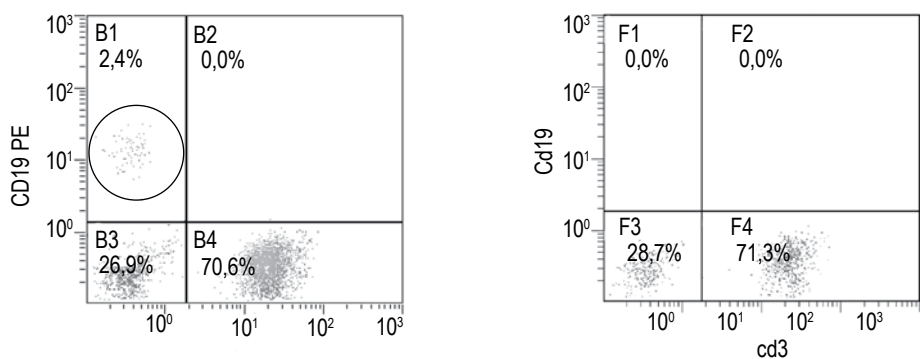


Рисунок 5. CD19⁺ типирование клеток периферической крови. Слева: 15.11.2007. Справа: 16.05.2008

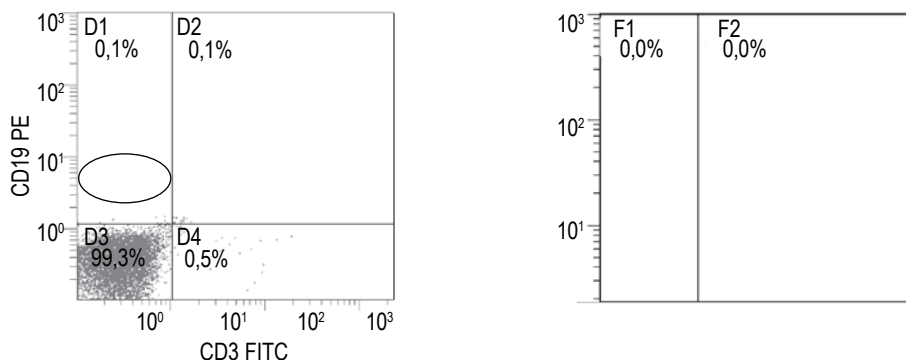


Рисунок 6. CD19⁺ типирование клеток ликвора. Слева: 15.11.2007. Справа: 16.05.2008

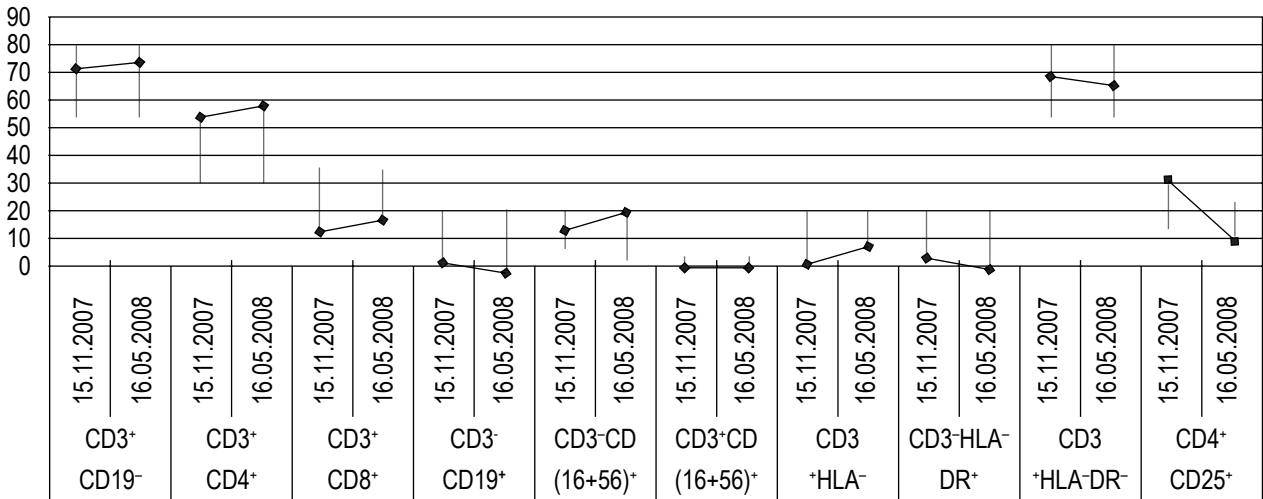


Рисунок 7. Динамика клеток с CD-типированием в периферической крови

на протяжении 24 недель. Данные иммунофенотипирования клеток периферической крови и ликвора представлены на рисунках 5 и 6.

Динамика иммунологических показателей периферической крови на фоне проведенной терапии представлена на рисунке 7. Исходно определяемое снижение субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и числа клеток, несущих поздний маркер активации, наиболее вероятно отражает влияние проводимой иммуносупрессивной терапии – митоксантирона и пульс-терапии метилпреднизолоном. Повышение числа иммунорегуляторных клеток CD4⁺CD25⁺ на фоне прогрессирующего течения

заболевания в периферической крови при отсутствии этих клеток в ликворе, по нашему мнению, может отражать неэффективность гомеостатических механизмов, направленных на подавление аутоиммунного ответа.

В результате проведенной терапии отмечалась стойкая значимая динамика со стороны прежде всего показателей гуморального звена иммунитета: к 6 месяцу терапии было задокументировано достижение полной деплеции В-лимфоцитов в периферической крови и ликворе пациентки, что сопровождалось снижением уровня сывороточного IgG. На сегодняшний день нет четких количественных критериев в оценке олигокло-

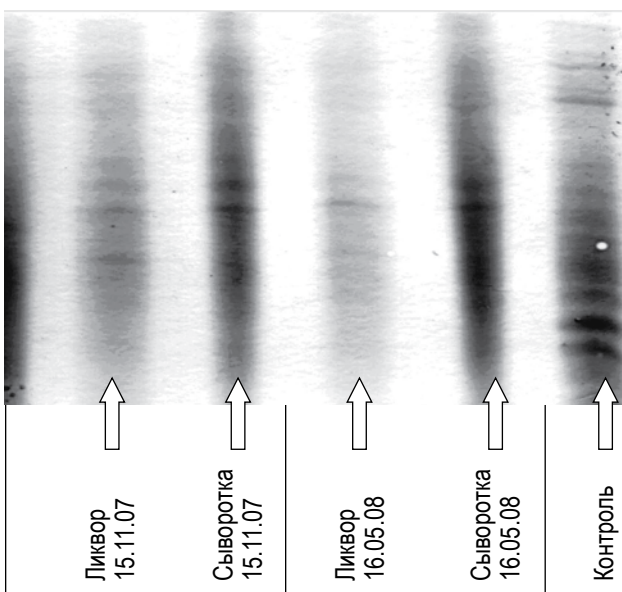


Рисунок 8. Определение олигоклонального синтеза IgG

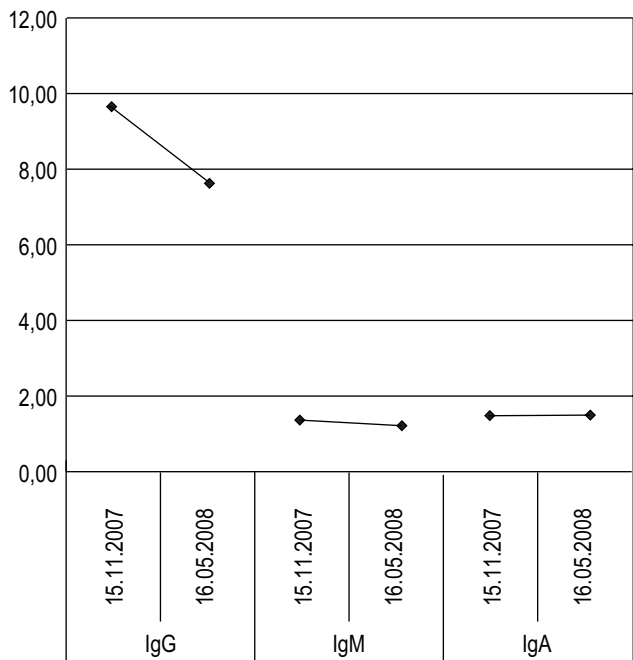


Рисунок 9. Динамика IgG, IgM, IgA в сыворотке

нального синтеза IgG, но мы отметили явное снижение числа полос в ликворе (рис. 8 и 9). При этом следует отметить, что уровень общего белка в ликворе был одинаковым в обоих образцах.

Постановка иммуноблоттинга проводилась нами одновременно в обоих образцах биологического материала (ликвор исходно и через 24 недели после проведенной деплеции) на одном геле, что позволяло более точно оценить динамику содержания олигоклональных цепей. Следует отметить, что в связи с тем, что зрелые плазматические клетки-продуценты IgG не несут CD20 – антигена и поэтому не являются мишенью действия ритуксимаба, данный эффект (снижение IgG) мы предположительно объясняем элиминацией за указанный период времени короткоживущей популяции данных клеток.

Динамика клеточного звена иммунитета разнонаправлена и сложнее поддается интерпретации. Снижение содержания популяций Т-клеток (в нашем случае до неопределяемых значений) в ликворе ранее была описана у больных РС, прошедших эффективный курс терапии ритуксимабом, и безусловно должна быть расценена как позитивный факт [2]. Мы предполагаем, что он отражает важность Т-В-клеточных взаимодействий в патогенезе РС, и, в частности, в привлечении популяций Т-клеток в ЦНС. Прирост числа CD3⁺CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов и нормализация числа клеток Т-лимфоцитов, несущих поздний маркер активации в периферической крови, по нашему мнению, отражает отсутствие формирования вторичного иммунодефицита, отчасти, возможно, в связи с отменой митоксантрона и глюкокортикоидов. Клинически у пациентки также не отмечалось признаков формирования иммунодефицитного состояния (отмечался единичный эпизод ОРВИ за 6 месяцев).

Нежелательные явления и безопасность проводимой терапии

Токсичность оценивалась стандартно по CTC-NCIC CRITERIA.

Период наблюдения был разделен на 3 этапа: 1) во время инфузии и после (в течение 24 часов); 2) 1-4 недели; 3) 4-24 недели.

За первый этап наблюдения не было зафиксировано каких-либо нежелательных явлений. На втором этапе: снижение лейкоцитов до $2,8 \times 10^9/\text{л}$ на 13-й день, без изменения других показателей крови. Развитие нейтропении 4-й степени (лейкоциты – $1,7 \times 10^9/\text{л}$; нейтрофилы – $0,2 \times 10^9/\text{л}$) на 16-й день после первого курса. Токсичность 4-й степени. Длительность агранулоцитоза составила 7 дней. Пациентка находилась в онкогематологическом отделении, были приняты все необходимые меры предосторожности. За время нахождения в агранулоцитозе не было

выявлено каких-либо признаков инфекции и/или подъема температуры тела. На 25-й день после первого курса терапии формула периферической крови полностью восстановилась. Колонистимулирующие факторы не применялись. Со стороны других органов и систем не было выявлено каких-либо патологических изменений.

В третьем периоде наблюдения, на 18-й неделе, было зафиксировано острое респираторное заболевание длительностью 3 дня, с признаками катарального ринита, не потребовавшее противовирусной терапии.

Таким образом, проведенная комбинированная терапия позволила достичь клинической стабилизации состояния пациентки несмотря на высокую резистентность ко всем стандартным видам лечения. Остаются неясными такие вопросы, как определение предикторов максимального ответа на подобную терапию (учитывая иммунологическую гетерогенность РС), продолжительность эффекта, достигаемого после однократного цикла В-клеточной деплеции, безопасность терапии. Однако имеющиеся данные еще раз показывают, что В-клетки играют важную роль в патогенезе такого тяжелого заболевания, как рассеянный склероз, а подходы, основанные на их деплеции, позволяют существенно расширить терапевтический арсенал.

Список литературы

1. Bellosillo B., Colomer D., Pons G., Gil J. Mitoxantrone, a topoisomerase II inhibitor, induces apoptosis of B-chronic lymphocytic leukaemia cells // Br. J. Haematol. – 1998. – Vol. 100, N 1. – P. 142-146.
2. Cross A.H., Stark J.L., Lauber J., Ramsbottom M.J., Lyons J.A. Rituximab reduces B cells and T-cells in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients // J. Neuroimmunol. – 2006. – Vol. 180, N 1-2. – P. 63-70.
3. Duddy M., Bar-Or A. B-cells in multiple sclerosis // Int. MS J. – 2006. – Vol. 13, N 3. – P. 84-90.
4. Edwards J.C., Szczepanski L., Szechinski J., Filipowicz-Sosnowska A., Emery P., Close D.R., Stevens R.M., Shaw T. Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis // N. Engl. J. Med. – 2004. – Vol. 350, N 25. – P. 2572-2581.
5. Jazirehi A.R., Huerta-Yepez S., Cheng G., Bonavida B. Rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) inhibits the constitutive nuclear factor- $\{\kappa\}$ B signaling pathway in non-Hodgkin's lymphoma B-cell lines: role in sensitization to chemotherapeutic drug-induced

apoptosis // Cancer Res. – 2005. – Vol. 65, N 1. – P. 264-276.

6. Monson N.L., Cravens P.D., Frohman E.M., Hawker K., Racke M.K. Effect of rituximab on the peripheral blood and cerebrospinal fluid B-cells in patients with primary progressive multiple sclerosis // Arch Neurol. – 2005. – Vol. 62, N 2. – P. 258-264.

7. Neuhaus O., Wiendl H., Kieseier B.C., Archelos J.J., Hemmer B., Stuve O., Hartung H.P. Multiple sclerosis: Mitoxantrone promotes differential effects on immunocompetent cells in vitro //

J. Neuroimmunol. – 2005. – Vol. 168, N 1-2. – P. 128-137.

8. Stuve O., Cepok S., Elias B., Saleh A., Hartung H.P., Hemmer B., Kieseier B.C. Clinical stabilization and effective B-lymphocyte depletion in the cerebrospinal fluid and peripheral blood of a patient with fulminant relapsing-remitting multiple sclerosis // Arch Neurol. – 2005. – Vol. 62, N 10. – P. 1620-1623.

поступила в редакцию 14.12.2008

принята к печати 05.02.2009