

УДК 571.27

СОЗДАНИЕ ПАНЕЛИ БИОМАРКЕРОВ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

© 2024 г. Л. А. Овчинникова¹, С. С. Джелад¹, Т. О. Симанив²,
М. Н. Захарова², Я. А. Ломакин^{1, *},
академик РАН А. Г. Габибов^{1, 3, **}, академик РАН С. Н. Иллариошкин²

Поступило 30.08.2024 г.

После доработки 10.09.2024 г.

Принято к публикации 10.09.2024 г.

Демиелинизирующие заболевания – группа гетерогенных патологий, поражающих нервную систему человека и существенно снижающих качество жизни. Одним из таких заболеваний является рассеянный склероз (РС) – воспалительное иммуноопосредованное заболевание центральной нервной системы (ЦНС), приводящее к нейродегенерации. На начальных этапах РС может мимикрировать под некоторые инфекционные, неопластические, генетические, метаболические, сосудистые и другие патологии. Точная дифференциальная диагностика данного заболевания важна для улучшения качества жизни пациентов и снижения возможных необратимых поражений ЦНС. В данной работе мы подтвердили возможность использования предложенной нами ранее кандидатной панели биомаркеров РС для отличия РС от заболеваний спектра оптиконевромиелита (ЗСОНМ) и бокового амиотрофического склероза (БАС). Мы показали, что предложенная панель ($SPTAN1_{601-644} + PRX_{451-494} + PTK6_{301-344} + LMP1_{285-330}$) позволяет с высоким уровнем чувствительности отличить РС от БАС ($AUC = 0,796$) и ЗСОНМ ($AUC = 0,779$).

Ключевые слова: рассеянный склероз, РС, аутоантитела, вирус Эпштейна-Барр, демиелинизирующие заболевания

DOI: 10.31857/S2686738924060155

ВВЕДЕНИЕ

Демиелинизирующие заболевания ЦНС – гетерогенная группа патологий, общим признаком которых является поражение нервной ткани с вовлечением олигодендроцитов, приводящее к разнообразным неврологическим нарушениям. Зачастую специфическая для каждого отдельного заболевания симптоматика может появляться не сразу, затрудняя дифференциальную диагностику и откладывая начало терапии. Одним из таких заболеваний является рассеянный склероз (РС) – иммуноопосредованное заболевание центральной нервной

системы (ЦНС), при котором поражается миелиновая оболочка нервного волокна [1]. С течением времени данное заболевание неизбежно прогрессирует, что отражает частичный переход от преимущественно локализованного острого повреждения к распространенному воспалению и нейродегенерации в сочетании с недостаточностью компенсаторных механизмов, таких как нейропластичность и ремиелинизация [2]. Однако на начальных этапах симптомы РС возможно перепутать с проявлением некоторых инфекционных, неопластических, генетических, метаболических, сосудистых и других идиопатических воспалительных демиелинизирующих расстройств [3]. При этом диагностика РС может быть произведена по критериям МакДональда на основании МРТ уже после первого эпизода клинической атаки [4], когда воспалительное поражение миелиновой оболочки необратимо. К заболеваниям, для которых необходима дифференциальная диагностика с РС относятся заболевания спектра оптиконевромиелита (ЗСОНМ), ранее классифицируемые как варианты течения РС, однако нуждающиеся в принципиально иной терапии [5, 6]. При

¹Институт биоорганической химии им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, 117997, Москва, Россия

²Научный центр неврологии, 125367, Москва, Россия

³Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, 119234, Москва, Россия

*e-mail: yasha.l@bk.ru,

**e-mail: gabibov@gmail.com

ЗСОНМ очаги воспаления локализуются преимущественно по ходу зрительного нерва и спинного мозга. Данное заболевание также характеризуется наличием антител к аквапорину-4. К первично нейродегенеративным заболеваниям относится боковой амиотрофический склероз (БАС). Для данной патологии специфична симптоматика, связанная с поражением двигательных нейронов, расположенных как в моторной коре, так и в ядрах черепных нервов и передних рогах спинного мозга. Однако диагностика БАС зачастую вызывает сложности, особенно на ранних стадиях заболевания [7].

Ранее на основании уровня сывороточных антител к потенциальным мишениям аутоиммунной агрессии нами были предложены следующие кандидатные пептидные биомаркеры РС: (протеин-тиразин киназа 6 (PTK6₃₀₁₋₃₄₄), периаксин (PRX₄₅₁₋₄₉₄), альфа-II-спектрин (SPTAN1₆₀₁₋₆₄₄)). При добавлении к представленной панели дополнительного антигена – латентного мембранный белка 1 (LMP1)

вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ) – наиболее вероятно триггера РС – диагностическая чувствительность данной панели увеличивается. Цель данного исследования – определить возможность использования предложенной панели антигенов на выборках пациентов с неврологическими заболеваниями, отличными от РС. Такая валидация позволит определить предсказательную ценность аутоантителных маркеров на основе титра антиген-специфичных аутореактивных антител у пациентов с РС, но не у пациентов с другими заболеваниями, для которых также характерно поражение ЦНС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Определение количества антиген-специфичных антител к исследуемым антигенам в сыворотках крови пациентов с РС (n=28), БАС (n=14), ЗСОНМ (n=5) проводилось методом иммуноферментного

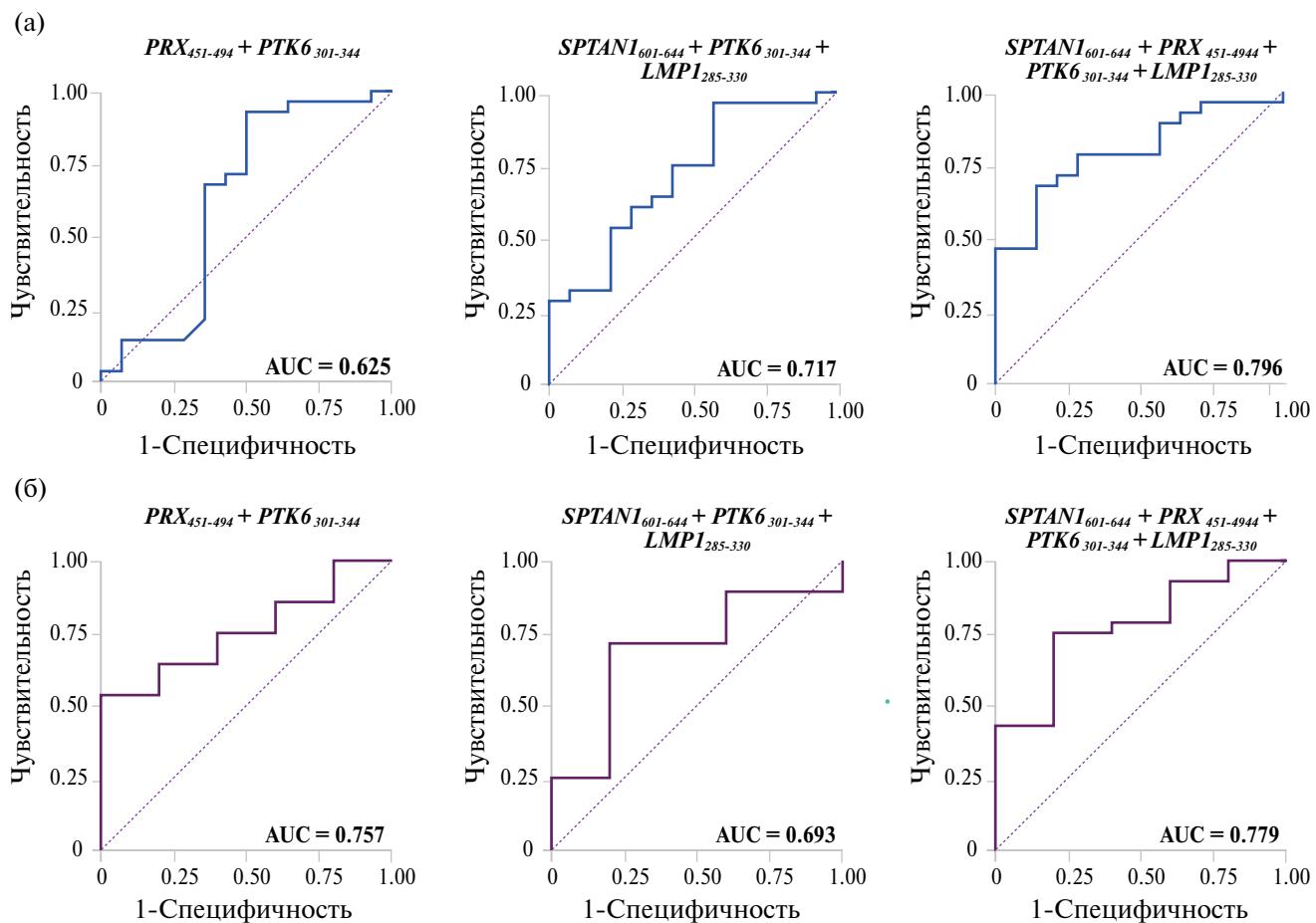


Рис 1. ROC-анализ подобранных комбинаций аутоантител и вирусного пептида вируса Эпштейна-Барр для дифференциальной диагностики РС от других нейродегенеративных заболеваний. А – ROC-кривые, полученные при сравнении эффективности кандидатных панелей для дифференциальной диагностики РС и бокового амиотрофического склероза (БАС). Б – ROC-кривые, полученные при сравнении эффективности кандидатных панелей для дифференциальной диагностики рассеянного склероза и заболеваний спектра оптиконевромиелита (ЗСОНМ). AUC (от англ. Area Under Curve) – площадь под кривой.

Таблица 1. Показатели, полученные по результатам ROC-анализа для различных комбинаций аутоантителов и вирусного пептида LMP1

Группы сравнения	Комбинация биомаркеров	AUC	ACC	SE	SP
РС и БАС	PRX ₄₅₁₋₄₉₄ PTK6 ₃₀₁₋₃₄₄	0.625	0.786	0.929	0.500
	SPTAN1 ₆₀₁₋₆₄₄ PTK6 ₃₀₁₋₃₄₄ LMP1 ₂₈₅₋₃₃₀	0.717	0.786	0.964	0.429
	SPTAN1 ₆₀₁₋₆₄₄ PRX ₄₅₁₋₄₉₄ PTK6 ₃₀₁₋₃₄₄ LMP1 ₂₈₅₋₃₃₀	0.796	0.738	0.679	0.857
РС и ЗСНОМ	PRX ₄₅₁₋₄₉₄ PTK6 ₃₀₁₋₃₄₄	0,757	0.606	0.536	1
	SPTAN1 ₆₀₁₋₆₄₄ PTK6 ₃₀₁₋₃₄₄ LMP1 ₂₈₅₋₃₃₀	0.693	0.727	0.714	0.800
	SPTAN1 ₆₀₁₋₆₄₄ PRX ₄₅₁₋₄₉₄ PTK6 ₃₀₁₋₃₄₄ LMP1 ₂₈₅₋₃₃₀	0.779	0.758	0.750	0.800

Примечание. РС – рассеянный склероз; БАС – боковой амиотрофический склероз; ЗСНОМ – заболевание спектра оптиконевромиелита; AUC (от англ. Area Under Curve) – площадь под кривой; ACC – диагностическая точность; SE – чувствительность; SP – специфичность.

анализа (ИФА). Для каждого пациента проводили по три измерения.

Для определения диагностической точности оптимальных комбинаций уровней аутореактивных IgG в сыворотке крови использовался метод анализа CombiROC [8]. Лучшие комбинации биомаркеров были определены путем анализа кривых рабочих характеристик приемника (ROC), расчета чувствительности (SE) и специфичности (SP) всех возможных комбинаций маркеров (<http://CombiROC.eu>). Для оценки достоверности полученных значений был произведен пермутационный тест.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Для создания эффективной панели кандидатных биомаркеров мы подобрали следующие комбинации пептидных мишней: (1) PRX₄₅₁₋₄₉₄ + PTK6₃₀₁₋₃₄₄; (2) SPTAN1₆₀₁₋₆₄₄ + PTK6₃₀₁₋₃₄₄ + LMP1₂₈₅₋₃₃₀; (3) SPTAN1₆₀₁₋₆₄₄ + PRX₄₅₁₋₄₉₄ + PTK6₃₀₁₋₃₄₄ + LMP1₂₈₅₋₃₃₀. Данные аутоантigenные и вирусные пептиды были использованы для определения уровня специфических антител среди тотального пула IgG периферической крови пациентов с РС, ЗСНОМ и БАС. По результатам данного анализа были построены ROC-кривые, характеризующие точность используемой панели аутоантителов для дифференциальной диагностики перечисленных нейродегенеративных заболеваний (рис. 1). Характеристики, полученные для данных ROC-кривых, представлены в табл. 1. Из полученных данных видно, что

использование двух (SPTAN1₆₀₁₋₆₄₄ + PTK6₃₀₁₋₃₄₄) или трех (SPTAN1₆₀₁₋₆₄₄ + PRX₄₅₁₋₄₉₄ + PTK6₃₀₁₋₃₄₄) аутоантителов в сочетании с вирусным белком (LMP1₂₈₅₋₃₃₀) позволяют дифференцировать РС от БАС (AUC > 0,7; рис. 1А). В свою очередь, для отличия РС от ЗСНОМ возможно использование панели двух аутоантителов без добавления вирусного пептида (PRX₄₅₁₋₄₉₄ + PTK6₃₀₁₋₃₄₄) или всех четырех антигенов (SPTAN1₆₀₁₋₆₄₄ + PRX₄₅₁₋₄₉₄ + PTK6₃₀₁₋₃₄₄ + LMP1₂₈₅₋₃₃₀) (рис. 1Б). При этом наибольшее значение площади под кривой (AUC), характеризующее большую точность распознавания, было получено для панели, содержащей все 4 биомаркера (SPTAN1₆₀₁₋₆₄₄ + PRX₄₅₁₋₄₉₄ + PTK6₃₀₁₋₃₄₄ + LMP1₂₈₅₋₃₃₀) как в случае распознавания РС и БАС (AUC=0,796), так и в случае распознавания РС и ЗСНОМ (AUC=0,779).

Далее для более надежной оценки достоверности полученных результатов и подтверждения эффективности предлагаемых панелей потенциальных маркеров РС мы провели статистический тест с перемешиванием полученных значений титров антиген-специфичных антител для каждого донора (Рис. 2). Этот статистический критерий предполагает многократное случайное перераспределение набора наблюдаемых данных для более точной оценки достоверности полученного результата. По результатам данного теста полученные значения AUC для наиболее эффективной панели (SPTAN1₆₀₁₋₆₄₄ + PRX₄₅₁₋₄₉₄ + PTK6₃₀₁₋₃₄₄ + LMP1₂₈₅₋₃₃₀) радикально отличаются от значений для перераспределенных образцов, что указывает на возможность дальнейшего применения предложенной кандидатной панели четырех биомаркеров РС. При

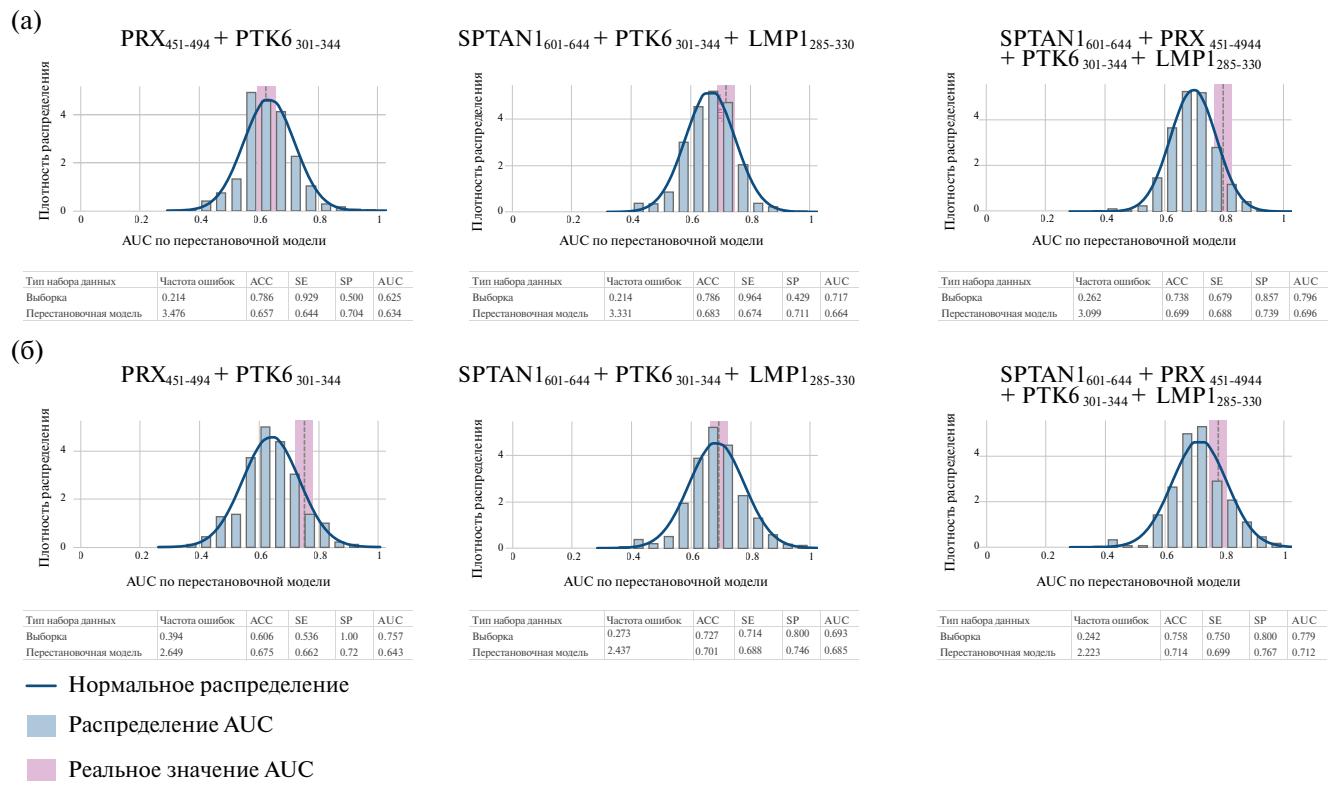


Рис. 2. Пермутационный тест (тест на перестановку). А – Различие РС от БАС (бокового амиотрофического склероза). Б – Различие рассеянного склероза от ЗСНОМ (заболеваний спектра оптиконевромиелита). AUC (от англ. Area Under Curve) – площадь под кривой; ACC – диагностическая точность; SE – чувствительность; SP – специфичность.

этом видно, что в случае использования только двух ($\text{PRX}_{451-494} + \text{PTK6}_{301-344}$) или трех ($\text{SPTAN1}_{601-644} + \text{PTK6}_{301-344} + \text{LMP1}_{285-330}$) маркеров, полученные значения AUC не являются достоверными, так как они значимо не отличаются от значений AUC при случайному распределении набора данных.

экономически эффективным и значимым серологическим биомаркером для диагностики рассеянного склероза. Мы ожидаем, что дальнейшие продолжительные исследования, включая анализ спинномозговой жидкости, подтвердят наши выводы и помогут установить роль выявленных антигенов в патогенезе рассеянного склероза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

РС является крайне гетерогенным заболеванием, которое на сегодняшний день достоверно возможно диагностировать только после первого эпизода клинической атаки. Но даже после такого эпизода симптоматические проявления РС часто бывают схожи с другими неврологическими заболеваниями. Предложенная нами кандидатная панель биомаркеров ($\text{SPTAN1}_{601-644} + \text{PRX}_{451-494} + \text{PTK6}_{301-344} + \text{LMP1}_{285-330}$) позволяет дифференцировать РС от других исследованных заболеваний ($\text{AUC}=0.796$ для БАС и $\text{AUC}=0.779$ для ЗСНОМ), что свидетельствует о ее высоком потенциале по отношению к РС. Тем не менее диагностическая ценность обнаруженных антигенов требует дальнейших исследований, и мы надеемся, что идентифицированные пептиды смогут стать удобным,

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 22-14-00219.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ 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 согласие. Все клинические образцы были использованы в работе после их деидентификации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lomakin Y.A. и др. Deconvolution of B cell receptor repertoire in multiple sclerosis patients revealed a delay in tBreg maturation. // Front. Immunol. 2022. Т. 13. С. 803229.
2. Kuhlmann T. и др. Multiple sclerosis progression: time for a new mechanism-driven framework. // Lancet Neurol. 2023. Т. 22. № 1. С. 78–88.
3. Ömerhocra S., Akkaş S.Y., İcen N.K. Multiple sclerosis: diagnosis and differential diagnosis. // Arch Neuropsychiatr. 2018. Т. 55. № Suppl 1. С. S1–S9.
4. Thompson A.J. и др. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. // Lancet Neurol. 2018. Т. 17. № 2. С. 162–173.
5. Seok J.M. и др. Differentiation between multiple sclerosis and neuromyelitis optica spectrum disorder using a deep learning model. // Sci. Rep. 2023. Т. 13. № 1. С. 11625.
6. Wingerchuk D.M. и др. International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders. // Neurology. 2015. Т. 85. № 2. С. 177–189.
7. Feldman E.L. и др. Amyotrophic lateral sclerosis. // Lancet. 2022. Т. 400. № 10360. С. 1363–1380.
8. Mazzara S. и др. CombiROC: an interactive web tool for selecting accurate marker combinations of omics data. // Sci Rep. 2017. Т. 7. С. 45477.

DEVELOPMENT OF A PANEL OF BIOMARKERS FOR DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF MULTIPLE SCLEROSIS

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

^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: yasha.l@bk.ru,

**E-mail: gabibov@gmail.com

Academician of the RAS AG Gabibov

Academician of the RAS SN Illarioshkin

Demyelinating diseases are a group of heterogeneous pathologies that affect the nervous system and reduce the quality of life. One such disease is multiple sclerosis (MS), an inflammatory autoimmune neurodegenerative disease of the central nervous system (CNS). At the initial stages, MS can mimic some infectious, neoplastic, genetic, metabolic, vascular and other pathologies. Accurate differential diagnosis of this disease is important to improve the quality of life of patients and reduce possible irreversible damage to the central nervous system. In this work, we confirmed the possibility of using our previously proposed candidate panel of MS biomarkers to distinguish MS from neuromyelitis optica spectrum diseases (NMOSD) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). We have shown that our proposed panel (SPTAN₆₀₁₋₆₄₄ + PRX₄₅₁₋₄₉₄ + PTK6₃₀₁₋₃₄₄ + LMP1₂₈₅₋₃₃₀) allows us to distinguish MS from ALS (AUC = 0,796) and NMOSD (AUC = 0,779).

Keywords: Multiple sclerosis, MS, autoantibodies, EBV, Epstein-Barr virus, Demyelinating diseases