



Полнотранскриптомное профилирование моноклеарных клеток крови пациентов с радиологически изолированным синдромом позволяет выявить нарушения, характерные для скорой манифестации симптомов рассеянного склероза

Козин М.С.^{1,2}, Кабаева А.Р.³, Омарова М.А.³, Бойко А.Н.^{1,3}, Фаворова О.О.^{1,2}, Кулакова О.Г.^{1,2}

¹ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва; ²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. акад. Е.И. Чазова» Минздрава России, Москва; ³ФГБУ «Федеральный центр мозга и нейротехнологий» ФМБА России, Москва
¹Россия, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1; ²Россия, 121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, 15А; ³Россия, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1, стр. 10

Цель исследования — поиск в моноклеарных клетках крови различий транскрипционных профилей группы лиц с радиологически изолированным синдромом (РИС), у которых в последующие три года наблюдения произошла манифестация симптомов рассеянного склероза (РС), и группы пациентов с РИС, у которых за это время манифестации симптомов РС не произошло.

Материал и методы. В исследование включены 19 пациентов с РИС (9 мужчин и 10 женщин), из которых у шести за три года наблюдения произошла манифестация симптомов РС. Проведено сравнение профилей транскрипции моноклеарных клеток крови между группами пациентов с РИС, у которых за это время проявились или не проявились симптомы РС. Работу проводили в формате проспективного исследования; время сбора образцов крови принимали за точку отсчета. Полнотранскриптомное профилирование выполняли методом секвенирования РНК на приборе MGISEQ-200. Анализ дифференциальной экспрессии генов осуществляли при помощи пакета DESeq2 для языка программирования R. Последующий анализ включал построение сети взаимодействий белковых продуктов обнаруженных дифференциально экспрессированных генов на основе данных базы STRING, выделение кластера взаимодействующих белков и анализ обогащения этого кластера участниками путей, аннотированных в базе данных KEGG.

Результаты. Экспрессия 146 генов значимо ($p < 0,05$; $|\log_2 FC| > 1$) различалась в исследуемых группах пациентов с РИС: у пациентов с последующей манифестацией симптомов РС экспрессия 67 генов была ниже, а 79 — выше, чем у пациентов без симптомов РС. Снижение экспрессии двух генов из 67 (ADGRG7 и LGALS9C) оставалось значимым при использовании поправки на множественное сравнение ($p_{adj} = 2,17 \cdot 10^{-11}$ и $p_{adj} = 6,19 \cdot 10^{-6}$ соответственно). Анализ сети взаимодействий белковых продуктов дифференциально экспрессирующихся генов позволил выделить кластер, включающий 12 генов: APBB2, CCL4, CCL4L2, CDH2, DAZL, FOSB, H2BC17, JUN, KLF4, KLF5, MAPK8IP1, SYCE1; он перепредставлен компонентами пути “Toll-like receptor signaling pathway”.

Заключение. Профили транскрипции моноклеарных клеток крови различаются в группах пациентов с РИС, у которых за три года последующего наблюдения произошла или не произошла манифестация симптомов РС. Возможность использовать снижение уровней экспрессии генов ADGRG7 и LGALS9C, обнаруженное в настоящей работе, в качестве признака скорой конверсии РИС в РС требует подтверждения на независимых выборках.

Ключевые слова: радиологически изолированный синдром; рассеянный склероз; секвенирование РНК; транскриптом; моноклеарные клетки периферической крови; анализ путей.

Контакты: Максим Сергеевич Козин; kozimax1992@gmail.com

Для ссылки: Козин МС, Кабаева АР, Омарова МА, Бойко АН, Фаворова ОО, Кулакова ОГ. Полнотранскриптомное профилирование моноклеарных клеток крови пациентов с радиологически изолированным синдромом позволяет выявить нарушения, характерные для скорой манифестации симптомов рассеянного склероза. Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2024;16(Прил. 2):31–37. DOI: 10.14412/2074-2711-2024-2S-31-37

Global transcriptome profiling of blood mononuclear cells from individuals with radiologically isolated syndrome reveals abnormalities characteristic of the rapid manifestation of multiple sclerosis symptoms

Kozin M.S.^{1,2}, Kabaeva A.R.³, Omarova M.A.³, Boyko A.N.³, Favorova O.O.^{1,2}, Kulakova O.G.^{1,2}

¹N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia, Moscow;

²National Medical Research Center for Cardiology, Ministry of Health of Russia, Moscow;

³Federal Center for Brain and Neurotechnologies, Federal Medical and Biological Agency of Russia, Moscow

¹1, Ostrovityanova St., Moscow 117997, Russia; ²15A, Third Cherepkovskaya St.,

Moscow 121552, Russia; ³1, Ostrovityanova St., Build. 10, Moscow 117997, Russia

Objective: to look for differences in the transcriptome profiles in mononuclear blood cells of a group of patients with radiologically isolated syndrome (RIS) who developed symptoms of multiple sclerosis (MS) in the following three years of observation and a group of patients with RIS who did not develop MS during this period.

Material and methods. The study included 19 patients with RIS (9 men and 10 women), six of whom developed symptoms of MS during the three-year follow-up period. The transcription profiles of blood mononuclear cells were compared between the groups of patients with RIS who developed or did not develop MS symptoms during this period. The work was conducted in the format of a prospective study; the time of blood collection was taken as the reference point. Full transcriptome profiling was performed using RNA sequencing on an MGISEQ-200 platform. Differential gene expression analysis was performed using the DESeq2 package for the R programming language. Subsequent analysis involved constructing a network of interactions between the protein products of the detected differentially expressed genes based on data from the STRING database, identifying a cluster of interacting proteins, and analyzing the enrichment of this cluster by participants in pathways annotated in the KEGG database.

Results. The expression of 146 genes differed significantly ($p < 0.05$; $|\log_2FC| > 1$) in the studied groups of patients with RIS: in patients with subsequent manifestation of MS symptoms, the expression of 67 genes was lower and expression of 79 genes was higher than in patients without MS symptoms. The decrease in expression of two of the 67 genes (ADGRG7 and LGALS9C) remained significant even after correction for multiple comparisons ($p_{adj} = 2.17 \cdot 10^{-11}$ and $p_{adj} = 6.19 \cdot 10^{-6}$, respectively). Analyzing the network of interactions between the protein products of the differentially expressed genes allowed the identification of a cluster of 12 genes: APBB2, CCL4, CCL4L2, CDH2, DAZL, FOSB, H2BC17, JUN, KLF4, KLF5, MAPK8IP1, SYCE1; it is over-represented by components of the Toll-like receptor signaling pathway.

Conclusion. The transcriptome profiles of blood mononuclear cells differ in groups of patients with RIS who did or did not develop MS symptoms during the three-year follow-up period. The decrease in the expression level of ADGRG7 and LGALS9C genes detected in this study as a sign of rapid conversion of RIS to MS needs to be confirmed in independent samples.

Keywords: radiologically isolated syndrome; multiple sclerosis; RNA sequencing; transcriptome; peripheral blood mononuclear cells; pathway analysis.

Contact: Maksim Sergeevich Kozin; kozinmax1992@gmail.com

For reference: Kozin MS, Kabaeva AR, Omarova MA, Boyko AN, Favorova OO, Kulakova OG. Global transcriptome profiling of blood mononuclear cells from individuals with radiologically isolated syndrome reveals abnormalities characteristic of the rapid manifestation of multiple sclerosis symptoms. *Nevrologiya, neiropsikhiatriya, psichosomatika = Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics.* 2024;16(Suppl.2):31–37. DOI: 10.14412/2074-2711-2024-2S-31-37

Радиологически изолированный синдром (РИС) – нозологическая форма, при которой у индивидов при проведении магнитно-резонансной томографии (МРТ) мозга обнаруживаются изменения, характерные для тяжелого хронического заболевания центральной нервной системы (ЦНС) – рассеянного склероза (РС), при отсутствии какой-либо клинической симптоматики. Впервые диагностические критерии РИС были сформулированы в 2009 г. в работе D.T. Okuda и соавт. [1].

В ходе динамического наблюдения за большими группами лиц с РИС установлено, что они подвержены высокому риску развития достоверного РС. При этом течение РИС гетерогенно: время до манифестации симптомов РС варьирует в широких пределах. По данным наиболее крупного на сегодняшний день проспективного исследования, включавшего 451 пациента с РИС, в течение 10 лет манифестация симптомов РС происходит у 51,2% пациентов, тогда как у остальных за столь длительный период наблюдения не отмечается ухудшения состояния [2].

В настоящее время для двух препаратов – диметилфумарата и терифлуномида – проведены рандомизированные плацебоконтролируемые клинические исследования у пациентов с РИС [3, 4]. При применении обоих препаратов наблюдали снижение вероятности появления клинических событий за время наблюдения. Тем не менее ряд авторов полагают, что перед принятием решения о применении этих препаратов следует выполнить несколько условий: подтвердить правильность постановки диагноза РИС, стратифицировать риск возникновения первого клинического проявления, а также собрать дополнительные данные, подтвержда-

ющие благоприятный баланс между выгодами и рисками в долгосрочной перспективе [5]. Выявление лиц с высокой вероятностью конверсии РИС в РС остается необходимым условием для выбора оптимальной тактики ведения пациентов.

С момента выделения РИС в отдельную нозологическую форму активно проводился поиск признаков, указывающих на скорую конверсию РИС в РС. В этом направлении были достигнуты определенные успехи; выявлен ряд признаков повышенного риска развития РС: демографических (возраст постановки диагноза до 37 лет), радиологических (наличие спинальных или инфратенториальных очагов на МРТ) [2, 6, 7] и лабораторных маркеров (наличие олигоклональных IgG только в цереброспинальной жидкости – ЦСЖ) [7, 8]. Несмотря на значительные успехи, достигнутые в этом направлении, можно констатировать, что о механизмах перехода РИС в РС известно чрезвычайно мало. Использование геномных подходов на уровне транскриптома и мирнома позволяет не только проводить поиск новых маркеров скорого перехода РИС в РС, но и анализировать молекулярные механизмы, лежащие в его основе, как это было сделано в нескольких исследованиях [9, 10].

Настоящая работа выполнена в формате проспективного исследования с использованием метода полнотранскриптомного профилирования мононуклеарных клеток периферической крови (МНК), собранных у пациентов с РИС до развития у них клинических проявлений РС.

Цель исследования – поиск дифференциально экспрессирующихся генов, отличающих пациентов с РИС, у которых произошла манифестация клинических симпто-

мов РС в течение последующих 3 лет наблюдения, от лиц, у которых манифестации симптомов РС за это время не произошло.

Материал и методы. В исследование включено 19 неродственных индивидов (9 мужчин и 10 женщин), которым в соответствии с критериями Okuda [1] был поставлен диагноз РИС. Клинические и демографические характеристики пациентов представлены в табл. 1. Подбор пациентов для исследования и наблюдение за пациентами осуществляли в ФГБУ «Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России» (ФГБУ ФЦМН ФМБА России).

С целью выявления РИС всем участникам исследования проводили в ФГБУ ФЦМН ФМБА России МРТ-исследование на приборе Optima MR450w с магнитным полем 1,5 Тл. Протокол был одинаковым для всех пациентов, он включал последовательность режимов FLAIR, T1, T2, SWAN, DWI и STIR. У пациентов с РИС собирали кровь для последующего анализа и инициировали наблюдение за ними в течение 3 лет. У шести пациентов за это время произошла манифестация симптомов РС.

Всем участникам исследования выполняли люмбальную пункцию. Для обнаружения олигоклональных антител ЦСЖ и сыворотку анализировали с использованием изоэлектрического фокусирования и иммунофлуоресценции. Результаты интерпретировали в соответствии с Международным консенсусом по обнаружению олигоклональных IgG [11].

От всех участников получено информированное согласие. Исследование одобрено этическим комитетом РНИМУ им. Н.И. Пирогова (протокол № 1206 от 01.02.2021).

Выделение РНК. Периферическую кровь всех обследуемых собирали в вакуумные пробирки, содержащие ЭДТА. МНК выделяли методом центрифугирования на градиенте фиколл-гистопак (Sigma-Aldrich, США). Собранные клетки лизировали при помощи реагента QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, США), и до непосредственного выделения РНК образцы хранили при температуре -80 °С. Тотальную РНК выделяли при помощи наборов RNeasy Mini Kit (Qiagen, США). Количество выделенной РНК оценивали при помощи спектрофотометра NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, США), качество – по индексу целостности РНК (RNA Integrity Number, RIN) при помощи системы капиллярного гель-электрофореза QIAxcel Advanced System (Qiagen, США). Для дальнейшего исследования использовали только образцы с RIN >8.

Секвенирование РНК и анализ данных. Полнотранскриптомное профилирование проводили методом высокопроизводительного секвенирования РНК (RNA-seq). Библиотеки для секвенирования готовили из 1 мкг тотальной РНК с помощью набора MGIEasy RNA Library Prep Set (MGI) согласно протоколу производителя. Секвенирование осуществляли на приборе MGISEQ-200. Анализ качества прочтений проводили при помощи программного обеспечения (ПО) FastQC. Адаптерные последовательности и прочтения низкого качества были отфильтрованы с использованием ПО SOAPnuke Version 2.1.8 и исключены из дальнейшего анализа. Выравнивание прочтений на референсный геном проводили при помощи ПО STAR Version 2.7.6a. В качестве референсного генома использовали актуальную версию генома человека (Genome sequence, primary assembly, GRCh38) из проекта GENCODE.

Подсчет прочтений, выравненных на определенный ген, проводили при помощи опции GeneCounts в ПО STAR. Анализ дифференциальной экспрессии генов осуществляли при помощи пакета DESeq2 для языка программирования R. Батч-эффект (batch effect, или пакетный эффект), а также пол пациентов как источник биологической вариативности учитывали путем включения соответствующей переменной в дизайн-формулу DESeq2. Значимыми считали различия, характеризующиеся значением $p < 0,05$ и отношением уровней экспрессии > 2 . Для учета проблемы множественных сравнений использовали поправку Бенджамини–Хохберга.

Биоинформатический анализ данных. При помощи веб-сервиса базы данных белок-белковых взаимодействий STRING версии 12.0 [12] строили сеть взаимодействий белковых продуктов дифференциально экспрессирующихся генов. Отдельные кластеры взаимодействующих в сети белков выделяли методом k-средних [13]. Анализ перепредставленности наиболее крупного из выделенных кластеров участниками путей, аннотированных в базе данных KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), проводили при помощи гипергеометрического теста [14].

Таблица 1. Характеристика пациентов с РИС, у которых за 3 года наблюдения произошла или не произошла манифестация симптомов РС

Table 1. Characteristics of patients with RIS who did or did not have MS symptoms manifestation during 3-year follow-up

Характеристика	РИС-РС*	РИС**
Число обследуемых	6	13
Пол, мужчины/женщины	1/5	8/5
Средний возраст, годы, $M \pm \sigma$	28,5±7,3	35,0±9,1
Время от забора крови у лиц с РИС до манифестации симптомов РС, мес, $M \pm \sigma$	13,7±5,2	—
Число обследуемых с олигоклональными IgG только в ЦСЖ (II тип синтеза)	6	8
Причины проведения МРТ головного мозга до постановки диагноза РИС:		
диспансеризация	2	3
головная боль	2	4
травма головы	0	1
головокружение	0	1
обследование гипотифиза	1	—
невралгия тройничного нерва	0	1
стресс	0	1
фасцикуляция верхнего века	1	—
тик	0	1
эпилепсия	0	1
Симптомы дебюта РС:		
чувствительные нарушения	1	—
вестибуло-атактический синдром	2	—
оптический неврит	3	—

Примечание. * – пациенты с РИС, у которых за 3 года наблюдения произошла манифестация клинических симптомов РС; ** – лица с РИС, у которых за 3 года наблюдения не произошло манифестации клинических симптомов РС.

Статистическая обработка данных. Ассоциацию риска манифестации симптомов РС за 3 года наблюдения с полом определяли у пациентов с РИС при помощи точного критерия Фишера. Для оценки значимости различий возраста в выборках использовался U-критерий Манна–Уитни. Значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты. На базе ФГБУ ФЦМН ФМБА России проведено клиническое обследование 19 пациентов с РИС, диагноз которым был поставлен на основании МРТ-исследования. Наиболее частыми причинами проведения МРТ были головная боль и плановая диспансеризация (см. табл. 1). Из этих пациентов у шести (32%) за 3 года наблюдения произошла манифестация клинических симптомов РС. Различия в соотношении мужчин и женщин, а также в возрасте участников исследования между группами с ма-

нифестацией РС и без нее были незначимы ($p=0,141$ и $p=0,145$ соответственно). У всех пациентов, у которых произошла манифестация симптомов РС за время наблюдения, на момент взятия крови выявлен II тип синтеза IgG. Среди тех, у кого манифестации симптомов за время наблюдения не произошло, было пять пациентов с I типом синтеза IgG и восемь пациентов со II типом.

Проведено полнотранскриптомное профилирование методом секвенирования РНК и сравнение профилей экспрессии генов в МНК пациентов с РИС, у которых произошла и не произошла манифестация клинических симптомов РС за время наблюдения. Уровень экспрессии 146 генов различался в сравниваемых группах пациентов ($p < 0,05$, $(|\log_2FC| > 1)$). У лиц с манифестацией симптомов РС экспрессия 67 генов была ниже, а 79 – выше, чем при РИС без манифестации симптомов РС за время наблюдения. Логарифм кратности изменения экспрессии, \log_2FC , для этих генов лежит в диапазоне от -24 до 4,5 (рис. 1). Для двух генов – *ADGRG7* и *LGALS9C* – значение p выдерживало поправку на множественное сравнение (табл. 2).

Взаимодействие белков, кодируемых генами из числа дифференциально экспрессирующихся, было проанализировано с помощью веб-сервиса базы взаимодействия белков STRING версии 12.0. Количество взаимодействий в этом наборе не превышало значения для произвольно взятого набора белков. При помощи метода k -средних был проведен поиск кластеров взаимодействующих белков. Выделен кластер, включающий 12 участников: *APBB2*, *CCL4*, *CCL4L2*, *CDH2*, *DAZL*, *FOSB*, *H2BC17*, *JUN*, *KLF4*, *KLF5*, *MAPK8IP1*, *SYCE1* (рис. 2). Набор генов, кодирующих входящие в состав этого кластера белки, был значимо перепредставлен компонентами пути “Toll-like receptor signaling pathway”, аннотированного в базе KEGG ($FDR=0,01$).

Обсуждение. Выявление пациентов с высоким риском конверсии РИС в РС остается необходимым условием для выбора оптимальной тактики их ведения.

Целью работы был поиск генов, изменение уровня экспрессии которых может свидетельствовать о скором развитии РС у пациентов с РИС. Выявление таких генов не только позволяет рассматривать их в качестве предикторов, но и может пролить свет на молекулярные механизмы, лежащие в основе этой конверсии.

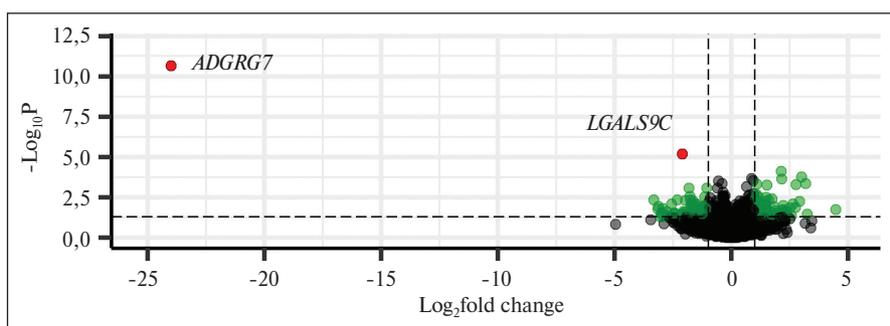


Рис. 1. Гены, дифференциально экспрессирующиеся в МНК у групп пациентов с РИС, у которых произошла и не произошла манифестация симптомов РС за 3 года наблюдения. Результаты представлены в виде диаграммы Volcano plot. Зеленым цветом отмечены гены, уровни экспрессии которых отличались более чем в 2 раза ($|\log_2FC| > 1$) и удовлетворяли условию $p < 0,05$. Красным цветом показаны гены, для которых значение p выдерживало поправку на множественное сравнение ($p_{adj} < 0,05$). Вертикальными пунктирными линиями показаны значения \log_2FC , равные -1 и 1, горизонтальная пунктирная линия соответствует значению $p=0,05$

Fig. 1. Genes differentially expressed in blood mononuclear cells in groups of patients with RIS who did or did not have MS symptom manifestation during 3-year follow-up. The results are presented in the form of a Volcano plot. Genes whose expression levels differed more than 2-fold ($|\log_2FC| > 1$) and met the $p < 0,05$ criterion are marked in green color. Genes for which the p value withstand correction for multiple comparisons ($p_{adj} < 0,05$) are shown in red. The vertical dashed lines show \log_2FC values equal to -1 and 1, the horizontal dashed line corresponds to the value of $p=0,05$

Таблица 2. Различия в уровнях экспрессии генов *ADGRG7* и *LGALS9C* между пациентами с РИС, у которых развились или не развились клинические симптомы РС за 3 года наблюдения

Table 2. Differences in *ADGRG7* and *LGALS9C* gene expression levels between individuals with RIS who did or did not develop MS clinical symptoms during 3-year follow-up

Ген	Продукт	Геномная локализация	\log_2FC	P_{adj}^*
ADGRG7	Adhesion G Protein-Coupled Receptor G7	3q12.2	-24,01	$2,17 \cdot 10^{-11}$
LGALS9C	Galectin 9C	17p11.2	-2,11	$6,19 \cdot 10^{-6}$

Примечание. * P_{adj} – значения p , выдерживающие поправку на множественное сравнение.

¹Цветные рисунки к этой статье представлены на сайте журнала: nnp.ima-press.net

При сравнении профилей транскрипции МНК лиц с РС, у которых произошла или не произошла манифестация клинических симптомов РС за 3 года наблюдения, выявлены изменения экспрессии 146 генов. Для белок-кодирующих генов из их числа построена сеть взаимодействия продуктов; выделен кластер взаимодействующих белков, который перепредставлен участниками пути “Toll-like receptor signaling pathway”, аннотированного в базе KEGG.

Толл-подобные рецепторы (Toll-like receptors, TLR) – клеточные рецепторы, играющие важную роль в активации врожденного иммунитета. Они распознают консервативные компоненты патогенов, а также участвуют в распознавании немикробных эндогенных лигандов, сигнализирующих о наличии повреждения [15]. В последние годы большое внимание уделяется изучению вклада иммунопатологических реакций, связанных с функционированием TLR, в развитие РС и экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита, основной экспериментальной модели РС (см. подробнее [16, 17]). Инфильтрированные лейкоциты и резидентные клетки ЦНС экспрессируют несколько типов TLR (особенно TLR2), экспрессия которых повышается при РС и экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите. Показано, что TLR, присутствующие на клетках врожденной иммунной системы, обеспечивают критические сигналы, участвующие в активации клеток адаптивной иммунной системы, включая аутореактивные Th1/Th17-лимфоциты, в то же время подавляя регуляторные Т-клетки.

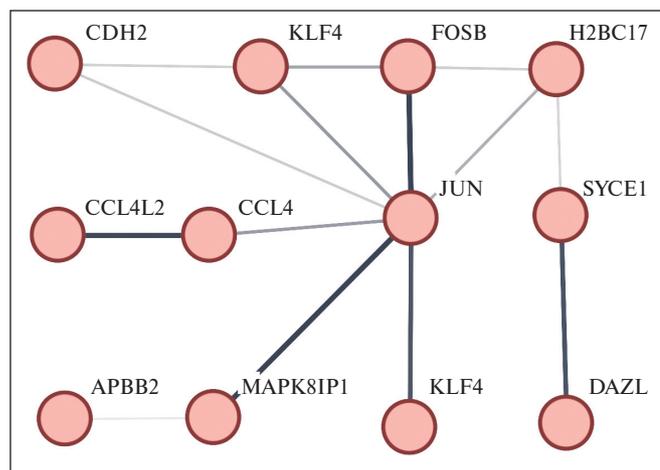


Рис. 2. Кластер взаимодействующих белков, выделенный методом *k*-средних из общего набора белковых продуктов генов, экспрессия которых в МНК различалась между группами пациентов с РС, у которых произошла и не произошла манифестация симптомов РС за время наблюдения. Толщина линий отражает доказательную силу существования этого взаимодействия по данным базы STRING версии 12.0 [12]

Fig. 2. A cluster of interacting proteins determined by the *k*-means method from the total set of protein products of genes whose expression in blood mononuclear cells differed between groups of patients with RIS who did or did not manifest MS symptoms during the follow-up period. Line thickness indicates the strength of data support of the existence of this interaction according to the STRING database version 12.0 [12]

Активация TLR приводит также к ингибированию экспрессии интерферонов I типа и индукции провоспалительных цитокинов и хемокинов; нарушается процесс созревания олигодендроцитов [16]. Результаты нашей работы согласуются с представлением о том, что дерегуляция путей, связанных передачей сигнала через TLR, является важным механизмом развития РС и может вносить вклад в конверсию РС в РС.

Среди дифференциально экспрессирующихся генов выявлены два гена, *ADGRG7* и *LGALS9C*, разница в экспрессии которых оставалась значимой при использовании поправки на множественное сравнение. Важно отметить, что продукты этих генов не входят в состав обнаруженного кластера, содержащего взаимодействующие белки TLR-сигнального пути.

Продукт гена *ADGRG7* (GPR128) – член семейства рецепторов адгезии, относящихся к суперсемейству рецепторов, сопряженных с G-белками. О его участии в патогенезе РС почти ничего не известно. В исследовании [18] *ADGRG7* выявлен как один из 480 генов, экспрессия которых снижена в образцах белого вещества пациентов с РС по сравнению с представителями контрольной группы. В нашей работе снижение экспрессии этого гена в МНК характеризовало группу, у которой в скором времени произойдет манифестация симптомов РС. Рассматривать снижение экспрессии *ADGRG7* в различных типах клеток как общий признак формирования РС представляется привлекательным, но преждевременным. Вопрос нуждается в дополнительном исследовании.

Продукт гена *LGALS9C* (Galectin 9C) рассматривают как одну из изоформ галектина-9 (Gal-9) [19, 20]. Галектины – это β-галактозид-связывающие лектины, т. е. белки, обладающие способностью высокоспецифично связывать углеводные остатки на поверхности различных клеток [21]. В нормальных условиях галектины играют важную роль в поддержании гомеостаза ЦНС, участвуя в миелинизации нейронов и в регуляции иммунных и воспалительных реакций [22]. Показано, что при нейродегенеративных заболеваниях некоторые галектины, в том числе и галектин-9, обладают нейропротекторной и противовоспалительной активностью [23]. Функциональные свойства галектина-9C практически не изучались, тогда как некоторые механизмы действия галектина-9 уже известны. Последний служит основным лигандом рецептора TIM-3 (T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3), который экспрессируется на поверхности многих субпопуляций иммунных клеток (CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, NK-клеток, моноцитов, макрофагов) и относится к ингибиторным белкам иммунологических контрольных точек (immune checkpoint). В связи с разнообразием клеток, на которых это рецептор экспрессируется, результат активации TIM-3 галектином-9 носит комплексный характер (см. подробнее [24]). Взаимодействие галектина-9 с TIM-3 приводит к подавлению ответа Th1- и Th17-клеток и способствует возникновению иммунологической толерантности, а также увеличивает иммуносупрессивную активность регуляторных Т-клеток [24].

Показана важная роль TIM-3/Gal-9 сигнального пути в патогенезе различных аутоиммунных заболеваний, в том числе РС [25, 26]. Обнаружено, что у больных РС концентрация TIM3-положительных CD4⁺-клеток значимо ниже, чем в контрольной группе [27]. Более того, показано, что

при «мягком» РС взаимодействие Tim-3/Gal-9 способствует апоптозу Т-лимфоцитов, специфичных к основному белку миелина, и этот процесс ингибируется у больных с первично-прогрессирующим РС ядерным белком Bat3 (HLA-B-Associated Transcript 3) [28]. Таким образом, функционирование пути TIM-3/GAL-9/BAT3 может участвовать в определении клинического фенотипа РС. Результаты нашей работы согласуются с этими данными литературы. Можно предположить, что снижение экспрессии гена *LGALS9C* в группе пациентов с РИС, у которых в скором времени разовьется РС, приводит к недостаточности концентрации галектина-9 и тем самым к невозможности ингибировать активность Th1 и Th17 через TIM-3.

Заключение. В целом, наше исследование впервые показало, что профиль экспрессии генов в МНК лиц с РИС, у которых в течение 3 лет наблюдения произойдет конверсия в РС, отличается от профиля тех индивидов с РИС, у которых конверсия за тот же период не произойдет. Полученные данные позволяют высказать предположение, что переход РИС в РС характеризуется дерегуляцией путей, связанных с TLR, а также с недостаточной активацией рецептора TIM3 галектином-9. Однако возможность использовать изменения уровней экспрессии генов, найденных в настоящей работе, в качестве признака скорой конверсии РИС в РС требует подтверждения на независимых выборках.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Okuda DT, Mowry EM, Beheshtian A, et al. Incidental MRI anomalies suggestive of multiple sclerosis: the radiologically isolated syndrome. *Neurology*. 2009 Mar 3;72(9):800-5. doi: 10.1212/01.wnl.0000335764.14513.1a. Epub 2008 Dec 10. Erratum in: *Neurology*. 2009 Apr 7;72(14):1284.
- Lebrun-Frenay C, Kantarci O, Siva A, et al; 10-year RISC study group on behalf of SFSEP, OFSEP. Radiologically Isolated Syndrome: 10-Year Risk Estimate of a Clinical Event. *Ann Neurol*. 2020 Aug;88(2):407-17. doi: 10.1002/ana.25799. Epub 2020 Jun 29.
- Lebrun-Frenay C, Siva A, Sormani MP, et al; TERIS Study Group. Teriflunomide and Time to Clinical Multiple Sclerosis in Patients With Radiologically Isolated Syndrome: The TERIS Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol*. 2023 Oct 1;80(10):1080-8. doi: 10.1001/jamaneurol.2023.2815
- Okuda DT, Kantarci O, Lebrun-Frenay C, et al. Dimethyl Fumarate Delays Multiple Sclerosis in Radiologically Isolated Syndrome. *Ann Neurol*. 2023 Mar;93(3):604-14. doi: 10.1002/ana.26555. Epub 2022 Dec 10.
- Preziosa P, Rocca MA, Filippi M. Radiologically isolated syndromes: to treat or not to treat? *J Neurol*. 2024 May;271(5):2370-8. doi: 10.1007/s00415-024-12294-4. Epub 2024 Mar 19.
- Okuda DT, Siva A, Kantarci O, et al; Radiologically Isolated Syndrome Consortium (RISC); Club Francophone de la Sclérose en Plaques (CFSEP). Radiologically isolated syndrome: 5-year risk for an initial clinical event. *PLoS One*. 2014 Mar 5;9(3):e90509. doi: 10.1371/journal.pone.0090509
- Okuda DT, Lebrun-Frenay C. Radiologically isolated syndrome in the spectrum of multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2024 May;30(6):630-6. doi: 10.1177/13524585241245306. Epub 2024 Apr 15.
- Кабаева АР, Бойко АН, Кулакова ОГ, Фаворова ОО. Радиологически изолированный синдром: прогноз и предикторы конверсии в рассеянный склероз. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2020;120(7-2):7-12. doi: 10.17116/jnevro20201200727 [Kabaeva AR, Boyko AN, Kulakova OG, Favorova OO. Radiologically isolated syndrome: prognosis and predictors of conversion to multiple sclerosis. *Zhurnal neurologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova = S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2020;120(7-2):7-12. doi: 10.17116/jnevro20201200727 (In Russ.)].
- Kozin M, Kiselev I, Baulina N, et al. Global transcriptome profiling in peripheral blood mononuclear cells identifies dysregulation of immune processes in individuals with radiologically isolated syndrome. *Mult Scler Relat Disord*. 2022 Feb;58:103469. doi: 10.1016/j.msard.2021.103469. Epub 2021 Dec 20.
- Munoz-San Martin M, Torras S, Robles-Cedeno R, et al. Radiologically isolated syndrome: targeting miRNAs as prognostic biomarkers. *Epigenomics*. 2020 Dec;12(23):2065-76. doi: 10.2217/epi-2020-0172. Epub 2020 Dec 8.
- Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, et al. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Arch Neurol*. 2005 Jun;62(6):865-70. doi: 10.1001/archneur.62.6.865
- Szklarczyk D, Gable AL, Nastou KC, et al. The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Res*. 2021 Jan 8;49(D1):D605-D612. doi: 10.1093/nar/gkaa1074. Erratum in: *Nucleic Acids Res*. 2021 Oct 11;49(18):10800. doi: 10.1093/nar/gkab835
- MacQueen J. Some methods for classification and analysis of multivariate observations. *Berkeley Symp Math Stat Prob*. 1967;1967:281-97.
- Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res*. 2000 Jan 1;28(1):27-30. doi: 10.1093/nar/28.1.27
- Sameer AS, Nissar S. Toll-Like Receptors (TLRs): Structure, Functions, Signaling, and Role of Their Polymorphisms in Colorectal Cancer Susceptibility. *Biomed Res Int*. 2021 Sep 12;2021:1157023. doi: 10.1155/2021/1157023
- Jafarzadeh A, Nemati M, Khorramdelazad H, Mirshafiey A. The Toll-like Receptor 2 (TLR2)-related Immunopathological Responses in the Multiple Sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2019 Jun 8;18(3):230-50. doi: 10.18502/ijaai.v18i3.1117
- Podda G, Nyrenda M, Crooks J, Gran B. Innate immune responses in the CNS: role of toll-like receptors, mechanisms, and therapeutic opportunities in multiple sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2013 Sep;8(4):791-806. doi: 10.1007/s11481-013-9483-3. Epub 2013 Jun 28.
- Vastrad B, Vastrad C. Identification of candidate biomarkers and pathways associated with multiple sclerosis using bioinformatics and next generation sequencing data analysis. *bioRxiv*. 2023. doi: 10.1101/2023.12.05.570305
- Yang RY, Rabinovich GA, Liu FT. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med*. 2008 Jun 13;10:e17. doi: 10.1017/S1462399408000719
- Sato M, Nishi N, Shoji H, et al. Functional analysis of the carbohydrate recognition domains and a linker peptide of galectin-9 as to eosinophil chemoattractant activity. *Glycobiology*. 2002 Mar;12(3):191-7. doi: 10.1093/glycob/12.3.191
- Troncoso MF, Elola MT, Blidner AG, et al. The universe of galectin-binding partners and their functions in health and disease. *J Biol Chem*. 2023 Dec;299(12):105400. doi: 10.1016/j.jbc.2023.105400. Epub 2023 Oct 26.
- Nio-Kobayashi J, Itabashi T. Galectins and Their Ligand Glycoconjugates in the Central Nervous System Under Physiological and Pathological Conditions. *Front Neuroanat*. 2021 Oct 15;15:767330. doi: 10.3389/fnana.2021.767330

23. Ramos-Martinez E, Ramos-Martinez I, Sanchez-Betancourt I, et al. Association between Galectin Levels and Neurodegenerative Diseases: Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomolecules*. 2022 Jul 31;12(8):1062. doi: 10.3390/biom12081062
24. Kandel S, Adhikary P, Li G, Cheng K. The TIM3/Gal9 signaling pathway: An emerging target for cancer immunotherapy. *Cancer Lett*. 2021 Jul 10;510:67-78. doi: 10.1016/j.canlet.2021.04.011. Epub 2021 Apr 22.
25. Anderson AC, Anderson DE. TIM-3 in autoimmunity. *Curr Opin Immunol*. 2006 Dec;18(6):665-9. doi: 10.1016/j.coi.2006.09.009. Epub 2006 Oct 2.
26. Anderson DE. TIM-3 as a therapeutic target in human inflammatory diseases. *Expert Opin Ther Targets*. 2007 Aug;11(8):1005-9. doi: 10.1517/14728222.11.8.1005
27. Feng X, Feng J. Clinical significance of Tim3-positive T cell subsets in patients with multiple sclerosis. *J Clin Neurosci*. 2016 Dec;34:193-7. doi: 10.1016/j.jocn.2016.07.007. Epub 2016 Aug 17.
28. Saresella M, Piancone F, Marventano I, et al. A role for the TIM-3/GAL-9/BAT3 pathway in determining the clinical phenotype of multiple sclerosis. *FASEB J*. 2014 Nov;28(11):5000-9. doi: 10.1096/fj.14-258194. Epub 2014 Aug 4.

Поступила/отрецензирована/принята к печати
Received/Reviewed/Accepted
17.04.2024/07.06.2024/08.06.2024

Заявление о конфликте интересов / Conflict of Interest Statement

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-75-01109 (<https://rscf.ru/project/23-75-01109/>). Исследование не имело спонсорской поддержки. Конфликт интересов отсутствует. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать. Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами.

The study was supported by Russian Science Foundation grant No. 23-75-01109 (<https://rscf.ru/project/23-75-01109/>). The investigation has not been sponsored. There are no conflicts of interest. The authors are solely responsible for submitting the final version of the manuscript for publication. All the authors have participated in developing the concept of the article and in writing the manuscript. The final version of the manuscript has been approved by all the authors.

Козин М.С. <https://orcid.org/0000-0001-6587-1243>
Кабаета А.Р. <https://orcid.org/0000-0002-0982-8520>
Омарова М.А. <https://orcid.org/0000-0002-6744-2191>
Бойко А.Н. <https://orcid.org/0000-0002-2975-4151>
Фаворова О.О. <https://orcid.org/0000-0002-5271-6698>
Кулакова О.Г. <https://orcid.org/0000-000205321-3101>