

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНЫЙ ЦЕНТР НЕВРОЛОГИИ»**

На правах рукописи

ИВАНОВА МАРИЯ ВАСИЛЬЕВНА

**РОЛЬ ЛИПИДОВ МИЕЛИНА В ИММУНОПАТОГЕНЕЗЕ
РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА**

14.01.11 — Нервные болезни

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

М.Н. Захарова

Научный консультант:

доктор биологических наук,

член-корреспондент РАН

Д.Ю. Логунов

Москва — 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	4
Глава 1. Обзор литературы	13
1.1. Реакции врожденного иммунитета при рассеянном склерозе	15
1.2. Реакции В-клеточного иммунитета при рассеянном склерозе	19
1.3. Липидный состав миелиновой оболочки	21
1.4. Изменение липидного состава миелина при рассеянном склерозе	23
1.5. Реакции врожденного иммунитета с участием липидов	25
1.6. Взаимодействие липидов миелина с Т-клетками	27
1.7. В-клеточные реакции против липидов миелина	28
1.8. Препараты для лечения РС, воздействующие на реакции иммунитета с участием липидов	34
Глава 2. Материалы, методология и методы исследования	36
2.1. Обследованные пациенты	36
2.2. Забор, обработка и хранение биологического материала	38
2.3. Выделение периферических мононуклеарных клеток из крови	39
2.4. Клеточные линии	39
2.5. Культивирование клеток	40
2.6. Инкубация клеток с липидами миелина	40
2.7. Определение активности транскрипционных факторов	41
2.8. Оценка цитотоксичности липидов	42
2.9. Определение концентрации цитокинов и хемокинов	42
2.10. Исследование антител к липидам миелина	44
2.11. Статистическая обработка результатов	44
Глава 3. Результаты	46
3.1. Влияние липидов на активность транскрипционных факторов	46
3.2. Рецепторы врожденного иммунитета, взаимодействующие с липидами	50
3.3. Влияние липидов на секрецию цитокинов	

и хемокинов в культурах клеток	52
3.4. Клиническая характеристика пациентов с рассеянным склерозом	55
3.5. Клинические прогностические факторы при рассеянном склерозе	61
3.6. Влияние липидов на секрецию цитокинов моноклеарными клетками	62
3.7. Профили цитокинов в цереброспинальной жидкости	77
3.8. Антитела к липидам миелина в биологических жидкостях	78
Глава 4. Обсуждение результатов	81
Заключение	95
Выводы	95
Практические рекомендации	96
Список сокращений и условных обозначений	97
Список литературы	99
Приложения	121
Приложение 1	121
Приложение 2	123

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Рассеянный склероз (РС) – самое распространенное хроническое воспалительное демиелинизирующее заболевание ЦНС, поражающее в основном молодое, трудоспособное население и неминуемо приводящее к инвалидности. РС больны около 2,5 млн человек в мире [140]. Заболевание характеризуется клиническим полиморфизмом, разнообразием изменений, выявляемых при МРТ и других методах лабораторно-инструментальной диагностики [6]. Значительные различия также имеются в темпах прогрессирования заболевания. Заболевание может носить доброкачественный характер, что характеризуется почти полным отсутствием проявлений без применения иммуномодулирующей терапии в течение десятков лет и злокачественный, при котором в течение нескольких месяцев пациент оказывается полностью зависимым от посторонней помощи [3]. Наконец, между пациентами имеются выраженные различия в ответе на иммуномодулирующую терапию. В настоящее время эффективных методов прогнозирования течения заболевания и ответа на терапию при РС не существует [12]. Основой для разработки эффективных биомаркеров при РС является понимание патогенетических особенностей заболевания, лежащих в основе его полиморфизма.

Несмотря на многолетнее изучение, патогенез заболевания остается во многом неясным. Основной причиной развития демиелинизирующих заболеваний считаются различные аутоиммунные процессы, некоторыми авторами обсуждается гипотеза о важном значении инфекционных агентов в запуске и

развитии демиелинизирующего процесса [5]. Ведущим механизмом, лежащим в основе развития воспалительных реакций, приводящих к развитию демиелинизирующего процесса, длительное время рассматривались Т-клеточные иммунные реакции, направленные на белковые компоненты миелина [9]. В настоящее время все больше внимания уделяется реакциям В-клеточного иммунитета и врожденного иммунитета.

Липиды составляют 70% сухого веса миелиновой оболочки. Они имеют важное структурное и функциональное значение, их состав при демиелинизирующих заболеваниях претерпевает выраженные изменения. Показано участие липидов на всех этапах развития демиелинизирующего процесса. В животных моделях была показана энцефалитогенность гликолипидов миелина. Введение цереброзида и сульфатида приводит к развитию экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ) у мышей, кроме того, было показано, что указанные гликолипиды способны усиливать энцефалитогенность основного белка миелина (ОБМ) [109]. При добавлении антител к цереброзиду *in vitro* к клеткам-предшественникам олигодендроцитов происходит нарушение процессов созревания олигодендроцитов. Согласно данным ряда исследователей, происходит распознавание комплексов молекул, схожих с МНС-I комплексами гистосовместимости, CD1, которые связываются с липидами, с некоторыми гликолипидами (ганглиозиды) Т-клеточными рецепторами разных субпопуляций лимфоцитов [96]. У больных рассеянным склерозом чаще обнаруживаются антитела к липидам, чем у здоровых лиц.

Известно, что некоторые из рецепторов врожденной иммунной системы (паттерн-распознающих рецепторов), такие как Толл-подобные рецепторы (TLR), играют важную роль в развитии патологического процесса при демиелинизирующих заболеваниях ЦНС [122]. В результате взаимодействия этих рецепторов с лигандами происходит активация транскрипционных факторов, например NF- κ B, и повышение экспрессии определенного набора цитокинов, что приводит к инициации и модулированию иммунопатологических реакций.

В экспериментах с культурами клеток, а также животных моделях была показана способность различных липидов, как экзогенных (бактериальных), так и эндогенных, в том числе некоторых липидов, входящих в состав миелиновой оболочки, принимать участие в реакциях врожденного иммунитета. Результаты исследований, проведенных на клеточных линиях и периферических мононуклеарных клетках, выделенных от здоровых доноров, указывают на то, что липиды могут стимулировать или ингибировать продукцию различных цитокинов и хемокинов, таких как IL-8, MCP-1 и др. [42]. В животных моделях было показано, что некоторые липиды миелина, такие как лактозилцерамиды или окисленные фосфолипиды могут влиять на тяжесть ЭАЭ [103].

Таким образом, представляется вероятным, что липиды могут выступать в качестве лигандов рецепторов врожденного иммунитета или провоспалительных агентов, потенцирующих активность рецепторов врожденного иммунитета, и влиять на течение воспалительного процесса при демиелинизирующих заболеваниях. Однако в настоящее время механизмы взаимодействия липидов миелина с компонентами врожденной иммунной системы и их роль в развитии патологического процесса неясны. Характеристика различных липидов миелина по способности вызывать и потенцировать иммунные реакции, инициируемые активацией паттерн-распознающих рецепторов врожденного иммунитета, может иметь большое значение для понимания механизмов развития заболевания и патогенетической основы гетерогенности течения РС.

Ряд наблюдений указывает на важную роль гуморального иммунитета при РС. У здоровых людей и больных РС различается фенотипический состав В-лимфоцитов. При введении моноклональных антител к CD20 (ритуксимаб, окрелизумаб), снижающих численность В-клеточной популяции, происходит значительное уменьшение активности заболевания, как в животных моделях, так и у людей [70; 108]. Роль В-клеточного звена иммунитета также была показана в некоторых животных моделях РС. У мышей с дефицитом В-клеток при иммунизации рекомбинантным миелиновым олигодендроцитарным

гликопротеином (МОГ) не развивается ЭАЭ. Введение таким животным В-клеток или сыворотки, полученных от диких мышей, приводило к развитию клинических и гистологических признаков заболевания [97]. Об активации В-лимфоцитов у больных РС говорит выявление при изоэлектрофокусировании (ИЭФ) олигоклональных полос (ОСВ), состоящих из иммуноглобулинов, 70-97% больных [84]. В менингеальных оболочках пациентов с РС определяются структуры, содержащие В-клетки, схожие с лимфоидными фолликулами [98].

Среди антител, составляющих ОСВ, присутствуют иммуноглобулины классов G и M, мишени которых пока не определены. Во многих работах было показано, что при РС чаще, чем у здоровых, встречаются антитела к различным классам липидов [28; 106; 148]. В ряде исследований было показано диагностическое, прогностическое значение выявления антител к липидам миелина, была изучена связь с проводившимся лечением. Однако к настоящему моменту спектр антител к липидам миелина при РС и их значение изучены неполно. Характеристика В-клеточного ответа на липиды миелина при РС, а также определение взаимосвязей между наличием определенных антител и клиническими особенностями заболевания может помочь выявить важные прогностические биомаркеры при РС.

Цель исследования

Изучение роли липидов в формировании иммунного ответа при рассеянном склерозе, включая определение их диагностического и прогностического значения в зависимости от клинических особенностей заболевания.

Задачи исследования

1. Проанализировать профили цитокинов, хемокинов и факторов роста, вырабатываемых в ответ на стимуляцию липидами миелина периферических мононуклеарных клеток, полученных от больных с различными вариантами течения рассеянного склероза и здоровых добровольцев. Исследовать профили

цитокинов, хемокинов и факторов роста в цереброспинальной жидкости у пациентов с рассеянным склерозом.

2. Изучить взаимосвязи различных клинических вариантов течения РС (доброкачественное течение, ремиттирующее течение с высокой активностью заболевания, РС с быстрыми темпами нарастания инвалидности) с профилями цитокинов, хемокинов и факторов роста, определяющихся в ЦСЖ и секретируемых периферическими мононуклеарными клетками в ответ на стимуляцию липидами миелина.

3. Оценить активность транскрипционных факторов и профиль секретируемых цитокинов в ответ на взаимодействие липидов миелина с различными типами паттерн-распознающих рецепторов в клеточных линиях.

4. Исследовать профили антител к различным липидам миелина у больных рассеянным склерозом и сыворотке крови у здоровых добровольцев и оценить их связь с клиническими особенностями заболевания.

5. На основе полученных данных определить диагностическое и прогностическое значение антител к липидам миелина, а также реакций врожденного иммунитета с участием липидов миелина при РС.

Научная новизна

Впервые охарактеризован механизм активации клеток врожденной системы иммунитета липидами миелина. Проанализирован эффект различных классов липидов миелина на активность основных воспалительных транскрипционных факторов (NF- κ B, NFAT, AP-1), выявлены рецепторы врожденной иммунной системы, взаимодействующие с липидами миелина (Clec6 и Mincle) и проведена их характеристика по способности взаимодействовать с различными классами липидов миелина, изучен профиль цитокинов, секретирующихся в ответ на это взаимодействие.

Впервые показано развитие толерантности клеток врожденного иммунитета у пациентов с ремиттирующим течением (RPC) с высокой активностью

заболевания и пациентов с быстрыми темпами нарастания инвалидности, которая выражалась в подавлении секреции провоспалительных цитокинов и хемокинов при стимуляции периферических моноклеарных клеток этих пациентов ганглиозидами (в первую очередь, GM4).

Впервые проведен анализ спектров антител к гликолипидам миелина в российской группе пациентов с рассеянным склерозом и определены взаимосвязи выявления антител с клиническими особенностями заболевания.

Теоретическая и практическая значимость работы

Определены механизмы взаимодействия липидов миелина с врожденной иммунной системой: выявлены рецепторы врожденной иммунной системы, с которыми способны взаимодействовать липиды миелина, охарактеризовано влияние липидов миелина на активность различных транскрипционных факторов и профили цитокинов, экспрессия которых индуцируется липидами миелина.

Доказано, что реакции врожденного иммунитета с участием липидов миелина играют двойственную роль при РС, приводя к подавлению секреции как провоспалительных, так и противовоспалительных факторов, которая реализуется, в первую очередь при высокой активности заболевания и течении с высокими темпами нарастания инвалидности.

Отсутствие нарушения секреции цитокинов, хемокинов и факторов роста периферическими моноклеарными клетками под воздействием липидов при рассеянном склерозе может рассматриваться как протективный фактор и свидетельствует в пользу развития доброкачественного варианта течения заболевания. Полученные данные указывают на возможность применения подхода по изучению реакций врожденного иммунитета с участием липидов миелина для прогнозирования течения рассеянного склероза.

Установлен маркер активности воспалительного процесса при РС - увеличение концентрации интерферон-гамма-индуцируемого белка-10 (IP-10) в цереброспинальной жидкости.

Показано, что в прогрессировании заболевания участвуют В-клетки, что характеризуется выработкой аутоантител к ганглиозиду GM1 и подтверждает их участи в хронизации патологического процесса при РС.

Методология и методы исследования

Объектом исследования были пациенты с РС. Пациентам проводились сбор анамнеза, неврологический осмотр, забор крови, в случае необходимости МРТ и люмбальная пункция.

Для изучения реакций врожденного иммунитета с участием липидов миелина были использованы различные культуры иммунных клеток: клеточные линии, экспрессирующие разные виды паттерн-распознающих рецепторов, а также первичные культуры мононуклеарных клеток, выделенные из периферической крови пациентов с различным течением РС и здоровых добровольцев. Реакции липидов с рецепторами врожденного иммунитета были охарактеризованы по активности транскрипционных факторов, включающихся в ответ на взаимодействие рецепторов врожденного иммунитета с собственными лигандами, а также по изменению концентраций цитокинов и хемокинов в ответ на взаимодействие клеток с липидами.

Для исследования антител к липидам миелина использовались сыворотка крови и ЦСЖ пациентов с РС.

Положения, выносимые на защиту

1. При РС выявляется сложный комплекс иммунопатологических реакций с участием липидов миелина, характеризующийся дисбалансом провоспалительных и противовоспалительных факторов в крови и ЦСЖ. Профиль цитокинов, хемокинов и факторов роста, секретируемых при стимуляции периферических мононуклеарных клеток липидами миелина, различается у пациентов с РС и здоровых лиц. Эффект липидов миелина на секрецию цитокинов периферическими мононуклеарными клетками различается в зависимости от

структуры липида.

2. Профили секреции цитокинов, хемокинов и факторов роста периферическими мононуклеарными клетками крови у пациентов с РС под воздействием липидов миелина связаны с клиническим вариантом течения заболевания и различаются при ремиттирующем РС с высокой активностью заболевания, РС с быстрыми темпами нарастания инвалидности и доброкачественном течении РС.

3. Липиды миелина способны взаимодействовать с рецепторами врожденного иммунитета, приводя к увеличению активности провоспалительных транскрипционных факторов и секреции специфических профилей цитокинов и хемокинов в клеточных линиях. Наблюдаемый эффект различается в зависимости от структуры липида.

4. Профиль цитокинов, хемокинов и факторов роста в ЦСЖ различается у пациентов с РС и группы сравнения, а также в зависимости от активности заболевания при РС.

5. Выявление в сыворотке пациентов с рассеянным склерозом антител к липидам миелина связано с клиническими особенностями заболевания

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 124 листах машинописного текста, содержит 11 таблиц и иллюстрирована 9 рисунками. Диссертация построена из следующих разделов: введение, обзор литературы, описание материалов и методов, результаты исследования, обсуждение, выводы и практические рекомендации, список литературы. Библиографический указатель содержит 16 отечественных и 142 зарубежных источников литературы и 11 собственных публикаций автора, подготовленных по теме диссертационной работы.

Данное исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБНУ «Научный центр неврологии». Протокол № 10 от 06.11.13

Степень достоверности и апробация результатов

Диссертация апробирована и рекомендована к защите на заседании сотрудников отделения анестезиологии и реанимации с палатами реанимации и интенсивной терапии, первого, второго, третьего, пятого, шестого неврологических, нейрохирургического отделений, отделения лучевой диагностики, научно-координационного отдела, отделения нейрореабилитации и физиотерапии лаборатории клинической нейрофизиологии, ДНК-лаборатории, лаборатории эпидемиологии и профилактики заболеваний нервной системы, лаборатории патологической анатомии, лаборатории гемореологии, гемостаза и фармакокинетики (с клинической лабораторной диагностикой) Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр неврологии» Протокол № 5 от 18.08.2016 г.

Материалы диссертации были представлены на: 12th International Congress of Neuroimmunology (Майнц, 2014); XX Всероссийской конференции «Нейроиммунология. Рассеянный склероз» (Санкт-Петербург, 2015); II конгресс РОКИРС «Рассеянный склероз и другие демиелинизирующие заболевания» Вопросы патогенеза, диагностики и терапии» (Ярославль, 2015); 31st Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (Барселона, 2015) XXII Российский национальный конгресс «Человек и лекарство» (Москва, 2016); XXI Всероссийской конференции «Нейроиммунология. Рассеянный склероз» (Санкт-Петербург, 2016), 2nd Congress of the European Academy of Neurology (Копенгаген, 2016).

Глава 1. Обзор литературы

Рассеянный склероз является хроническим воспалительным и нейродегенеративным заболеванием, поражающим головной и спинной мозг. Заболевание проявляется снижением зрения, нарушением функции черепных нервов, пирамидными, координаторными, тазовыми расстройствами, нарушениями чувствительности и высших корковых функций [16]. Для РС характерно наличие диссеминации патологического процесса в пространстве и времени. Заболевание характеризуется широким полиморфизмом клинических, морфологических и радиологических проявлений [1; 2]. Выраженность клинических проявлений может колебаться от практически полного отсутствия симптоматики без применения какой-либо терапии на протяжении нескольких десятилетий при доброкачественном течении заболевания, которое отмечается у 6-64% пациентов с РС [127], до стремительного нарастания инвалидности и практически полной зависимости от помощи окружающих в течение нескольких месяцев при злокачественном течении заболевания. РС является мультифакториальным заболеванием, в запуске которого принимает участие множество генетических факторов и факторов окружающей среды [8]. Воздействие провоцирующих факторов реализуется через совокупность сложных иммунологических механизмов, включающих множество клеточных и неклеточных патофизиологических процессов, принадлежащих к реакциям как врожденного, так и приобретенного иммунитета, которые постоянно изменяются в ходе развития заболевания.

Долгое время основное внимание в изучении патогенеза рассеянного

склероза уделялось реакциям Т-клеточного иммунитета. Известно, что при ЭАЭ CD4⁺ Т клетки активируются в периферической крови, затем проникают в ЦНС и реактивируются антиген-презентирующими клетками (АПК), что приводит к запуску воспалительных реакций. В результате секреции провоспалительных цитокинов происходит привлечение моноцитов в ЦНС, а также активация наивных CD4⁺ Т клеток, обусловленная распространением эпитопов, что, в свою очередь, ведет к дальнейшему развитию воспаления [104]. TH1 и TH17 клетки являются основными субпопуляциями CD4⁺ Т клеток, участвующими в развитии аутоиммунного ответа при РС. CD8⁺ Т клетки чаще, чем CD4⁺ Т-клетки обнаруживаются в очагах, расположенных как в белом, так и в сером веществе, их количество имеет прямую корреляцию с выраженностью аксонального повреждения [57]. Миелин-специфичные CD8⁺ Т-клетки активируются в результате распространения эпитопов даже в моделях ЭАЭ, в основе которых лежит активация CD4⁺ Т-клеток, что также указывает на важную роль CD8⁺ Т-клетки в развитии заболевания [83].

Высокая активность аутореактивных Т-клеток при РС может быть связана с нарушением функции регуляторных клеток, таких как FOXP3-экспрессирующие регуляторные CD4⁺Т-клетки (TReg) и IL-10-продуцирующие Т-регуляторные клетки 1 типа (TR1) [101; 149]. Несмотря на небольшую численность подобных клеток в ЦНС, при РС может быть нарушена селекция этих клеток в тимусе, что приводит к неадекватной супрессии аутореактивных Т-клеток. У пациентов с РС было выявлено снижение численности популяции Т-регуляторных клеток и/или нарушение их супрессивной функции, по сравнению со здоровыми людьми [4; 150]. Таким образом, для РС характерна дисрегуляция взаимодействий регуляторных и эффекторных клеток, что приводит к росту численности аутореактивных клеток адаптивного иммунитета, способных инфильтрировать ЦНС и проводить к развитию воспалительного процесса на ее территории.

Несмотря на очевидное важное значение Т-клеточного иммунитета в патогенезе РС, развитие заболевания нельзя полностью объяснить нарушениями

Т-клеточного звена иммунитета. В последние годы отмечается возрастание интереса к другим компонентам иммунной системы, таких как врожденный иммунитет и В-клеточное звено приобретенного иммунитета.

1.1. Реакции врожденного иммунитета при рассеянном склерозе

Врожденный иммунитет включает в себя афферентное звено, которое исторически было направлено на распознавание компонентов инфекционных агентов, и эфферентное, включающее компоненты для борьбы с чужеродными агентами [27]. Каждое из них имеет гуморальные и клеточные компоненты. К клеточным компонентам врожденного иммунитета относятся в основном миелоидные клетки, среди которых мононуклеарные клетки (моноциты и макрофаги — моноциты, мигрировавшие в определенный орган и реализующие там свои функции, а также дендритные клетки) и полиморфонуклеарные фагоциты (нейтрофилы, базофилы и эозинофилы). На территории ЦНС основное значение имеют макрофаги и дендритные клетки, а также специфический тип клеток, внешне сходных с макрофагами — клетки микроглии, мигрирующие в ЦНС в ходе эмбрионального развития из желточного мешка [113]. Клеточные компоненты врожденного иммунитета экспрессируют так называемые паттерн-распознающие рецепторы (PRR) — рецепторы, распознающие определенные высококонсервативные молекулярные паттерны (PAMPs, pathogen-associated molecular patterns) различных микроорганизмов и молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением тканей собственного организма (DAMPs, damage-associated molecular patterns), т.е. стереотипные группы молекул, имеющих структурные сходства. Среди паттерн-распознающих рецепторов наиболее изучены Толл-подобные рецепторы, NOD-подобные рецепторы [14]. В ответ на взаимодействие PRR с собственными лигандами происходит включение внутриклеточных биохимических каскадов, приводящих к активации эффекторного звена врожденного иммунитета: повышению экспрессии различных цитокинов и других биологически активных молекул, адгезии, хемотаксису

лейкоцитов и фагоцитозу чужеродных агентов, активации приобретенного иммунитета [15].

Афферентное звено гуморального компонента врожденного иммунитета включает белки, напрямую контактирующие с чужеродным агентом, запуская реакции врожденного иммунитета, такие как манноза-связывающий белок, CD14, липополисахарид-связывающий белок (LBP) и др. Эффекторное звено гуморального компонента врожденного иммунитета включает белки острой фазы, компоненты комплемента, противомикробные белки, такие как лизоцим и дефензины.

В патологический процесс при РС вовлечены многие компоненты врожденного иммунитета. Так, компоненты комплемента были обнаружены в тканях головного мозга пациентов с РС [144]. Один из патоморфологических типов демиелинизации, описанных в 2000г. Lucchinetti, опосредован активацией системы комплемента [94]. Ингибирование компонентов системы комплемента в модели ЭАЭ приводило к уменьшению активности заболевания [74]. У мышей с недостаточностью компонента C3 комплемента и фактора В, течение заболевания было более мягким [112]. Определялось повышение уровня растворимого CD14 (sCD14) в сыворотке крови у пациентов с РС, по сравнению со здоровыми добровольцами. Концентрация маркера имеет обратную корреляцию с активностью заболевания [95]. Уровень растворимого рецептора конечных продуктов неферментативного гликозилирования, напротив был понижен у пациентов с РС, по сравнению со здоровыми добровольцами, и имел обратную корреляцию с баллом по шкале EDSS и частотой обострений [142].

Одним из ключевых компонентов врожденного иммунитета, принимающих участие и в развитии иммунопатологического процесса при РС, являются клеточные элементы врожденного иммунитета: микроглия и макрофаги. В исследованиях на модели ЭАЭ у трансгенных мышей было показано, что образующиеся из моноцитов макрофаги участвуют в иницировании демиелинизирующего процесса, тогда как микроглия отвечает за удаление

продуктов разрушения нервной ткани [157]. Это указывает на возможную нейропротективную и противовоспалительную роль микроглии. Известно, что при болезни Альцгеймера нейродегенеративный процесс частично обусловлен нарушением нейропротективной функции микроглии. Возможно, схожий механизм имеет значение в развитии нейродегенеративного процесса при РС [72]. В то же время в норме нейроны секретируют ингибиторы фагоцитарной активности микроглии. При отсутствии этого влияния микроглия может вызывать повреждения аксонов [114]. Активированная микроглия может быть причиной дисфункции астроцитов, нарушения баланса между их провоспалительными и противовоспалительными свойствами, что, в свою очередь, ведет к увеличению выраженности воспалительных реакций, аксонального повреждения и приостановлению процессов ремиелинизации за счет ингибирования созревания олигодендроцитов [103].

Появляется все больше данных, указывающих на то, что микроглия и астроциты при нарушениях гомеостаза могут активироваться и продуцировать нейротоксичные медиаторы воспаления (цитокины, хемокины, активные формы кислорода), что способствует развитию процессов аксонального повреждения и нейродегенерации [56]. Эти клетки реализуют свое патологическое значение на самых ранних этапах заболевания: уже после первого обострения в очагах и неизменном внешне белом веществе увеличивается численность и активность клеток микроглии и макрофагов [124]. Клетки микроглии, окружающие аксоны поврежденных нейронов, могут активироваться и служить источником формирования нового очага воспаления. Кроме того, они могут быть иметь значение в развитии атрофии головного мозга на ранних стадиях заболевания [46].

Функции микроглии отчасти опосредованы каскадами, связанными с PRR, в первую очередь TLR. Клетки микроглии мышей экспрессируют различные виды TLR (TLR 1-9). При воздействии на клетки микроглии собственных лигандов TLR происходит ее активация и увеличение экспрессии провоспалительных цитокинов

и хемокинов, а также молекул МНС II класса [119].

Изучению значения различных TLR в развитии патологического процесса при РС посвящено относительно большое количество исследований. В экспериментах на животных моделях было показано, что запуск каскада, приводящего к активации NF- κ B и экспрессии провоспалительных факторов, необходим для индукции ЭАЭ [69; 125]. Данные, полученные на животных моделях и у людей, свидетельствуют в пользу того, что при активации TLR2 происходит дифференцировка Т-клеток в фенотип Th1, секреция провоспалительных цитокинов, ингибирование созревания олигодендроцитов и подавление ремиелинизации, ухудшение функционирования Treg и даже изменение их фенотипа на Th17. Указанные изменения способствуют индукции ЭАЭ и возникновению рецидивов РС [73; 116; 128]. Взаимодействие TLR3 с собственными лигандами приводит к подавлению ЭАЭ у SJL/J мышей в результате повышения экспрессии IFN- β , а также индуцирует протективные реакции астроцитов, рост аксонов и нейрональных прогениторных клеток [147]. Было показано, что TLR4 участвует в индукции ЭАЭ. В то же время введение животным небольших доз липополисахарида (LPS – собственного лиганда TLR4) приводило к отсроченному развитию заболевания после индукции [34]. У мышей, нокаутированных по гену TLR4, ЭАЭ протекал в более тяжелой форме [100]. TLR4, возможно, играет роль в ответе на терапию IFN- β [36]. Активация TLR7 в модели ЭАЭ приводит как к провоспалительному, так и противовоспалительному эффекту, однако считается, что последний преобладает [91]. При лечении интерфероном бета (IFN- β) показано повышение экспрессии TLR7 [47]. В некоторых моделях ЭАЭ было выявлено увеличение экспрессии TLR8, однако его значение пока не ясно [76]. В клетках пациентов с РС выявлена пониженная экспрессия TLR9, кроме того, отмечается более низкая экспрессия IL-10 в ответ на стимуляцию собственным лигандом этого рецептора, что указывает на возможный протективный эффект TLR9. У мышей, нокаутированных по TLR9, развивалась более тяжелая форма ЭАЭ. В то же время при стимуляции Treg

лигандом TLR9 происходило уменьшение их супрессивной активности [22]. При лечении IFN- β экспрессия TLR9 снижалась, и DC пациентов, получающих IFN- β , в ответ на стимуляцию лигандами TLR9 не экспрессировали провоспалительные цитокины.

1.2. Реакции В-клеточного иммунитета при рассеянном склерозе

Большое внимание в последние годы стало уделяться изучению В-клеточного ответа при РС. Важное значение В-клеток в патогенезе РС подтверждается целым рядом наблюдений. У здоровых людей и больных РС различается фенотипический состав В-лимфоцитов. У здоровых в крови циркулируют в основном наивные клетки, есть некоторое количество клеток памяти, а в ЦСЖ В-клетки выявляются редко [105]. В ЦСЖ больных РС выявляются клетки памяти (4–5%), плазматические клетки, центробласты и плазмабласты секретирующие антитела, наличие которых указывает на постоянную В-клеточную стимуляцию [39]. Отдельным подтипом В-лимфоцитов являются В-регуляторные клетки, составляющие около 5% от общего числа В-клеток. В-регуляторные клетки обладают специфическим набором поверхностных маркеров и вырабатывают противовоспалительные цитокины IL-10 и TGF- β . В модели ЭАЭ было показано, что В-регуляторные клетки способны ингибировать развитие ЭАЭ в период инициации заболевания [102]. Значение В-клеток подтверждается тем, что при введении моноклональных антител к CD20 (ритуксимаб, окрелизумаб), снижающих численность В-клеточной популяции, происходит значительное уменьшение активности заболевания как в животных моделях, так и у людей [23; 70]. Роль В-клеточного звена иммунитета была показана в некоторых животных моделях РС. У мышей с дефицитом В-клеток при иммунизации рекомбинантным MOG не развивался ЭАЭ. Введение таким животным В-клеток или сыворотки, полученных от диких мышей, приводило к развитию клинических и гистологических признаков заболевания [97].

В менингеальных оболочках у пациентов с вторично-прогредиентным

течением рассеянного склероза были выявлены структуры, подобные лимфоидным фолликулам, содержащие пролиферирующие В-клетки, которые, вероятно, участвуют в поддержании реакций гуморального иммунитета [134]. Интересно, что при первично-прогредиентном течении РС подобных структур не наблюдается, но отмечается диффузная инфильтрация менингеальных оболочек В-клетками [40].

В пользу постоянной активации В-лимфоцитов у больных РС свидетельствует выявление при изоэлектрофокусировании (ИЭФ) олигоклональных полос, состоящих из иммуноглобулинов, в 70–97% случаев [84]. У пациентов с РС без ОСВ в ЦСЖ течение заболевания более доброкачественное и часто характеризуется атипичной клинической картиной и данными МРТ. Среди антител, составляющих ОСВ, присутствуют иммуноглобулины классов G и M, мишени которых пока не определены [11]. Инtrateкальный синтез IgM постоянный, он обусловлен активацией одного из подтипов В-клеток – CD5+, синтезирующих так называемые естественные антитела, чаще всего класса IgM, направленные против филогенетически устойчивых структур [30]. Стимуляция TLR на поверхности В-клеток приводит к их поликлональной активации и продукции низкоаффинных иммуноглобулинов класса M (IgM). Активация В-клеток, независимая от Т-клеток, обычно приводит к продукции антител, направленных на компоненты бактериальной стенки, в том числе фосфатидилхолина [88]. При поликлональной активации не исключено появление аутореактивных антител, поэтому в норме существуют пути регуляции подобных клеток, при активации которых происходит подавление пролиферации В-клеток [130].

Приведенные данные показывают, что важным значением в иммунопатогенезе РС могут обладать филогенетически древние антигенные структуры, такие как липидные молекулы. Липиды могут служить молекулярным паттерном, который будет активировать паттерн-распознающие рецепторы врожденного иммунитета, давая начало развитию воспалительных реакций.

Кроме того, липидные молекулы являются потенциальными антигенами для вырабатываемых при РС антител. Все вместе это обуславливает актуальность изучения иммунопатологических реакций с участием липидов, прежде всего липидов миелина, при РС.

1.3. Липидный состав миелиновой оболочки

Многослойная миелиновая оболочка состоит на 70-75% из липидов и 20-25% из белков, которые распределены в соответствии с зарядом, липо- и гидрофобностью, относительной молекулярной массой. Липиды миелина представлены фосфолипидами (43%), холестерином (28%) и гликолипидами (29%). Липиды в миелиновой оболочке распределены неравномерно. Содержание гликолипидов больше на наружной поверхности мембраны, где они располагаются в соотношении 1:1 с холестерином, фосфолипидов – на цитоплазматической стороне. В различных отделах ЦНС состав миелина варьирует, что сказывается на его физико-химических и иммунологических свойствах [121].

Фосфолипиды миелина представлены двумя подклассами: глицерофосфолипидами и сфингомиелинами. Глицерофосфолипиды - производные фосфатидной кислоты. Из этой группы основным соединением является фосфатидилэтаноламин, также в состав миелина входят фосфатидилхолин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол. Большая часть глицерофосфолипидов миелина находится в форме плазмалогенов, где жирная кислота замещена на алифатический алкенилэфир с длинной цепью. Сфингомиелин содержится в меньшем количестве и, вместе с холестерином формирует «липидные рафты» - функционально значимые участки, в том числе участвующие в сигнальной трансдукции [156]. Холестерин, кроме того, играет важную структурную роль и определяет агрегатное состояние миелиновой оболочки.

Гликолипиды включают два подкласса: галактолипиды и ганглиозиды.

Основными галактолипидами миелина являются галактоцереброзиды (галактозилцерамиды) (24%) и сульфатиды (3,5-7%). Галактоцереброзиды представляют собой семейство соединений, которые различаются составом церамидного остатка, длиной цепи жирных кислот и наличием/отсутствием жирной кислоты в положении C2. Сульфатиды являются производными галактоцереброзидов, сульфатированными в положение 3-ОН галактозы.

Другими производными являются ацетилированные галактоцереброзиды – группа, на данный момент включающая 7 соединений, представляющих собой галактоцереброзид с галактозным остатком, ацетилированным в разные положения. Эти соединения еще называют быстромигрирующими цереброзидами (FMC –fast migrating cerebrosides), поскольку они обладают высокой подвижностью при ТСХ (тонкослойной хроматографии). Отличительной чертой этой группы является высокая гидрофобность, обуславливающей их потенциал в отношении усиления взаимодействий между липидами миелина. Поверхностные гидрофобные участки могут регулировать конечные фазы компактизации миелина и позволяют достичь метаболически стабильной структуры. Поэтому ацетилированные цереброзиды могут быть одним из ключевых звеньев в важных фазах миелиногенеза, хотя их точная роль в этом процессе, а также иммунный ответ на них при рассеянном склерозе, на настоящий момент не установлены.

Галактолипиды являются маркерными липидами миелина. Они синтезируются только в олигодендроцитах. Известно, что эти липиды придают стабильность миелину, образуют комплексы с холестерином и интегральными белками миелина. Значение галактолипидов доказано в экспериментах на животных моделях. У животных, у которых отсутствовал фермент, участвующий в синтезе сульфатидов, и таким образом отмечался дефицит сульфатидов, вначале нормальный миелин в последующем разрушался, ухудшалось проведение по нервам, что приводило к ранней гибели животных. Считается, что цереброзид и сульфатид играют важную роль в процессах дифференцировки олигодендроцитов из клеток предшественников. В экспериментальных моделях было показано, что

при введении антител к галактолипидам происходит блокирование ремиелинизации за счет остановки дифференцировки олигодендроцитов.

Ганглиозиды составляют 0,1-0,3% миелина. Они представляют собой гликофинголипиды, в состав которых входит сиаловая кислота. Известно около 120 ганглиозидов, различающихся структурой остатка олигосахаридов и сиаловой кислоты. У человека 80-90% составляют ганглиозиды GM1, GD1a, GD1b, GT1b. В миелине уровень ганглиозидов значительно ниже, чем в сером веществе мозга, при этом 90% приходится на GM1. Отличительной чертой является присутствие GM4, локализованного исключительно в миелине и мембранах олигодендроглии. Содержание GM4 увеличивается во время миелинизации с резким снижением синтеза после рождения. Было отмечено, что обмен ганглиозидов между сывороткой и ЦСЖ происходит относительно свободно.

1.4. Изменение липидного состава миелиновой оболочки при рассеянном склерозе

При РС содержание фосфолипидов в организме претерпевает изменения. В неизменном внешне белом и сером веществе повышается содержание фосфолипидов и снижается количество сфинголипидов, что предшествует запуску воспалительной реакции. Локальное повышение холина в какой-либо зоне является предвестником образования в ней очага. В очагах происходит увеличение содержания глицерофосфолипидов с насыщенными жирными кислотами или полиненасыщенными при снижении количества цереброзидов и сульфатидов. В эритроцитах пациентов с РС отмечено снижение уровня плазмалогенов и уменьшения отношения холестерина к белкам. В плазме общий уровень холестерина, фосфолипидов и триглицеридов, относительное содержание сфиномиелина падает, а фосфатидилсерин повышается, отношение холестерина к фосфолипидам, по сравнению со здоровыми, увеличивается [118; 155]. В сыворотке крови пациентов с РС уменьшается концентрация фосфатидилсерина и фосфатидилэтаноламина, увеличивается содержание фосфатидилхолина.

Галактолипиды наименее подвержены изменениям при активации

свободнорадикальных процессов при РС. Однако с помощью хроматографических методов: тонкослойной томографии (ТСХ), высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), - было показано, что в очагах РС содержание сульфатида уменьшается на 60%, а в прилегающем белом веществе – на 25%. Кроме того, описано, что при РС повышается содержание гидроксильированных галактолипидов, что может быть отражением текущего процесса дегенерации.

В очагах демиелинизации при РС происходит значительное изменение ганглиозидного состава: снижение уровня GM1 и GM2, полное исчезновение GM4, повышение GD2, GD3, GQ1, а также ганглиозидов с меньшей скоростью миграции на ТСХ. В прилегающем неизменном внешне белом веществе изменения состава ганглиозидов не выявлено, но отмечается снижение их содержания. В крови при РС определяются некоторые изменения концентрации ганглиозидов, более выраженные во время обострений [7].

Таким образом, при РС в очагах демиелинизации и в меньшей степени в неизменном внешне белом веществе происходит уменьшение количества, а затем исчезновение липидов, которые появляются на более поздних этапах миелиногенеза – цереброзидов, ганглиозида GM4, фосфатидилэтаноламина, холестерина. Это связано с тем, что филогенетически более древние соединения обладают большей метаболической стабильностью и менее уязвимы к действию различных повреждающих факторов. При моделировании структуры миелина с измененным составом при РС было предположено, что его стабильность и способность изолировать аксоны уменьшается, что согласуется с концепцией раннего аксонального повреждения при РС [141]. Интересно отметить, что при наследственных заболеваниях, при которых отмечается дефицит галактоцереброзидов или ганглиозидов, отмечается нарушение процессов дифференцировки и/или дисфункция нервной ткани [68]. Изменение состава и уровня липидов при наследственных заболеваниях приводило к активации или подавлению различных звеньев иммунной системы [60].

1.5. Реакции врожденного иммунитета с участием липидов

В ряде исследований изучено взаимодействие липидов с компонентами врожденного иммунитета. Показана способность различных липидов активировать реакции врожденного иммунитета. Недавно было определено, что мембранные липиды *Plasmodium falciparum*, вызывающего малярию, взаимодействуют с TLR2 и активируют иммунный ответ [50], а сфинголипиды стенки *Sphingobacterium spiritivorum* связываются с TLR4 [58]. Насыщенные жирные кислоты активируют TLR2 эндотелиальных клеток, что способствует выработке провоспалительных цитокинов и может усугублять эндотелиальную дисфункцию [81].

В других исследованиях было показано, что некоторые липиды способны подавлять воспалительный ответ. Так, липиды высоковирулентных штаммов *Francisella tularensis*, вызывающего туляремию, были способны ингибировать выработку цитокинов, связанных с активацией TLR2 собственными лигандами [45]. Сфингозин-1-фосфат (S1P) ингибирует продукцию CXCL8 в ответ на TLR-зависимую активацию Т-лимфоцитов [136], но потенцирует выработку провоспалительных цитокинов, индуцированную активацией TLR4, в культуре эпителиальных клеток десны человека [52]. Смесь ганглиозидов GD1a, GM1 и GT1b, а также GD1a могут ингибировать активацию TLR5 собственным лигандом [154]. GD1a, GM1, GD1b ингибируют активацию TLR7/8 собственными лигандами [137].

В экспериментах на культурах клеток и периферических мононуклеарных клетках, полученных от здоровых доноров, было показано, что некоторые липиды, которые обнаруживаются в миелине, могут влиять на продукцию цитокинов этими клетками. В небольшой выборке здоровых доноров было продемонстрировано, что липиды GM3 и GD1a могут стимулировать секрецию противовоспалительного цитокина IL-10 Т-клетками. Повышенное содержание ганглиозидов в мембранах моноцитов было связано с уменьшением продукции провоспалительных цитокинов [137]. Воздействие продуктов перекисного

окисления на эндотелиальные клетки аорты человека приводило к увеличению синтеза этими клетками моноцитарного хемотактического белка (MCP-1) и IL-8 [92]. Бета-галактозилцерамиды вызывали увеличение продукции провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6, TNF α , MIP-1 α и IL-8 периферическими мононуклеарными клетками здоровых доноров, в то же время сульфатиды и сульфатиды, содержащие в структуре алифатический остаток C16:0, обладали обратным эффектом [129]. Однако в другом исследовании было выявлено некоторое увеличение секреции цитокинов IL-6, TNF α и IL-8 при стимуляции периферических мононуклеарных клеток здоровых доноров сульфатидом [42]. Сульфатиды, содержащие в структуре алифатический остаток C24:0, индуцировали синтез провоспалительных цитокинов и хемокинов MCP-1, CCL-22 и IL-8 в моноцитах человека [35].

В исследованиях, проведенных на модели ЭАЭ у мышей, выявлялось увеличение количества лактозилцерамида в ЦНС при хроническом ЭАЭ. Лактозилцерамиды вызывали активацию микроглии и моноцитов у мышей, а также способствовали развитию процессов нейродегенерации и контролировали экспрессию цитокинов и хемокинов, участвующих в привлечении моноцитов к очагу воспаления и активации моноцитов и микроглии [103]. В другом исследовании было показано, что окисленное производное фосфатидилхолина 1-пальмитоил-2-глутароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (PGPC) уменьшает тяжесть ЭАЭ у мышей, вызывая уменьшение активации Т-клеток [75].

Существующие данные указывают на способность различных классов липидов участвовать в реакциях врожденного иммунитета. Более того, показана возможность некоторых липидов миелина влиять на выработку цитокинов иммунными клетками, что может приводить к изменению тяжести течения ЭАЭ. Однако спектр липидов, которые могут принимать участие в реакциях врожденного иммунитета, не охарактеризован, механизмы воздействия липидов на компоненты врожденного иммунитета не изучены. Неизвестно, меняются ли реакции врожденного иммунитета с участием липидов миелина при рассеянном

склерозе и имеется ли связь между врожденным иммунным ответом, направленным на липиды миелина, и течением заболевания.

1.6. Взаимодействие липидов миелина с Т-клетками и рассеянный склероз

В настоящее время известно, что реакции Т-клеточного иммунитета также могут быть связаны с воздействием липидных антигенов. В этом случае отличается механизм презентации антигена и происходящие в ответ на это реакции. Липиды взаимодействуют жирными хвостами с CD1-молекулами. CD1 представляет собой семейство МНС-I-подобных гликопротеинов, экспрессирующихся на клеточной поверхности и представляющих липидные и гликолипидные антигены Т-лимфоцитам. Семейство CD1 включает пять генов, кодирующих пять белков (CD1a-e). CD1, в отличие от МНС-I и II характеризуются низкой вариабельностью аллелей. С CD1 могут взаимодействовать такие антигены, как липиды и липопротеины бактерий, а также собственные фосфо- и сфинголипиды (в том числе сульфатиды и галактоцереброзиды) [33]. Показано, что CD1d может связывать более 170 различных липидных молекул [44]. CD1 экспрессируются на дендритных клетках, макрофагах, В-клетках, тимоцитах, микроглии, астроцитах и др. [25]. Семейство CD1 включает две группы: CD1 a-c, которые выявлены только у человека и стимулируют α -цепь TCR, и CD1d, которые обнаружены также у других животных и активируют TCR, расположенные в основном на поверхности iNKT и $\gamma\delta$ T-клеток [33]. В ответ на стимуляцию TCR в Т-клетках запускается экспрессия различных цитокинов, активация макрофагов, В-клеток, других Т-клеток и дендритных клеток. В зависимости от молекулы, представляемой CD1 и цитокинового окружения, факторы, секретлируемые клетками, несущими TCR, могут различаться, что приводит либо к усилению воспалительного ответа, либо к его ингибированию [79]. iNKT- и $\gamma\delta$ T-клетки и опосредованный ими CD1-ответ считаются промежуточным звеном между моментально активирующимися в ответ на взаимодействие с антигеном реакциями врожденного иммунитета и

приобретенным иммунитетом, на формирование которого требуется время. Цитокины, секретируемые указанными клетками, и межклеточные взаимодействия с Т- и В-клетками регулируют направление и скорость развития реакций приобретенного иммунитета.

У больных РС и в моделях РС повышена экспрессия CD1b на гипертрофированных астроцитах по краю бляшек и макрофагах/микровглии в активных очагах, в неактивных очагах она не изменена [41]. Показано, что у больных РС более многочисленна популяция $\alpha\beta$ T-лимфоцитов, реактивных к гликолипидам, причем эти клетки иногда взаимодействовали только со смесью из нескольких липидов [135]. Взаимодействие липидов с молекулами CD1 исследовалось на животных моделях РС и на материале, полученном от больных. Впервые была изучена реакция на введение животным α GalC (галактоцереброзида). В зависимости от момента введения, наличия адъюванта и индуцирующего белкового антигена, α GalC при ЭАЭ может обладать протективным или стимулирующим действием. Однако α GalC отсутствует в миелиновой оболочке, в связи с чем модель РС с использованием этого липида имеет ограничения. Исследовалось также взаимодействие CD1 с сульфатидами [80]. Было показано, что при иммунизации мышей сульфатидом, вне зависимости от того, производилась она за неделю до индукции ЭАЭ, одновременно или через неделю после, происходило уменьшение выраженности заболевания. Введение других липидов миелина, таких как сфингомиелин или GM1 не приводило к подобному эффекту.

1.7. В-клеточные реакции с участием липидами миелина при рассеянном склерозе

Антитела к липидам можно обнаружить в биологических жидкостях у здоровых людей и при широком спектре заболеваний, включая аутоиммунные, инфекционные заболевания, травмы, цереброваскулярную патологию. Особое место антител к липидам имеют при таких заболеваниях как синдром Гийена-Барре (СГБ), антифосфолипидный синдром, системная красная волчанка (СКВ) и

др. [10; 13]. В этих случаях выделяют специфические паттерны антител, которые имеют значение для диагностики и прогнозирования течения этих заболеваний. Для РС на настоящий момент четких паттернов не выделено. В то же время было проведено некоторое количество исследований, в которых изучались антитела к липидам в биологических жидкостях пациентов с РС и их взаимосвязь с клиническими особенностями заболевания.

Было показано, что титры антител классов IgG и IgM к кардиолипину при РС выше, чем в среднем в популяции. В то же время убедительных различий в скорости прогрессирования заболевания, степени инвалидизации или преобладания поражения какой-либо функциональной системы у больных с повышением титров антител к кардиолипину выявлено не было [71; 132]. При сравнении наличия антител к фосфолипидам (ФХ, ФЭ, ФС, КЛ) у больных РС во время обострения и ремиссии было выявлено, что во время обострения частота серопозитивности была в 2-4 раза выше, чем во время ремиссии причем в обоих случаях обнаруживались только антитела класса IgM. Однако недостатком последнего исследования является малый размер выборки (17 пациентов в обострении и 7 в ремиссии) [28].

В ряде работ изучалось наличие липид-специфических олигоклональных полос IgM в ЦСЖ у пациентов с РС (LS-OCMB). LS-OCMB были обнаружены у 86,8% больных. У большинства пациентов антитела связывали фосфолипиды (37/43), во многих случаях только фосфатидилхолин. У некоторых пациентов LS-OCMB были направлены только против гликолипидов, чаще всего сфингомиелина [152].

Наличие LS-OCMB у пациентов с клинически изолированным синдромом (КИС) коррелирует с более быстрым развитием второго обострения: 0,7 лет при наличии с LS-OCMB, 3,3 года при наличии только олигоклональных IgG (OCGB) и 9,9 лет при отсутствии олигоклональных полос. В мультифакториальном анализе, учитывающем пол, возраст, неврологическую симптоматику и изменения при МРТ, было показано, что присутствие одновременно OCGB и LS-OCMB в

ЦСЖ во время клинически изолированного синдрома – в 39,6 раз ($p < 0,0001$) увеличивает риск перехода в РС [31]. В другом исследовании была показана связь наличия LS-OCMB с более агрессивным течением заболевания. Частота обострений, несмотря на прием иммуномодуляторов, у больных с LS-OCMB была выше: 2,7 против 0,8 у пациентов без LS-OCMB ($p = 0,0004$) в течение 24 месяцев наблюдения [153]. При долгосрочном (в среднем, 11 лет) наблюдении за пациентами с РС, у которых были выявлены LS-OCMB, было показано, что наличие LS-OCMB связано с более быстрым прогрессированием заболевания ($p = 0,004$) и нарастанием балла по шкале EDSS ($p = 0,03$). Доля пациентов, получавших иммуномодуляторы, была одинаковой как среди больных, у которых были выявлены LS-OCMB, так и у остальных. Средний срок до перехода заболевания во вторично-прогредиентное течение от момента появления первых симптомов составил 11 лет у больных с LS-OCMB в ЦСЖ, и 22 года при их отсутствии ($p = 0,01$) [146].

Больные РС, у которых выявлялись LS-OCMB, хуже отвечали на иммуномодулирующую терапию: вероятность наступления рецидива у них была выше, а среднее время ремиссии составляло 18 месяцев против 53 месяцев у остальных пациентов ($p = 0,04$) [31]. При более длительном наблюдении, течение заболевания несмотря на прием иммуномодуляторов у больных с LS-OCMB в ЦСЖ также было более тяжелым: снижение частоты обострений на фоне применения интерферонов наблюдалось в обеих группах, однако в группе пациентов с LS-OCMB оно было значительно меньшим (51,8% против 80,8%, $p < 0,0001$), частота обострений в первый год лечения равнялась 0,8 и 0,2 у пациентов с LS-OCMB и без них, соответственно ($p < 0,001$), доля пациентов без обострений в группе больных с LS-OCMB были ниже (61,3% против 25%, $p < 0,003$). В течение первых 3-х лет лечения у пациентов без LS-OCMB балл по EDSS практически не изменился (1,4 и 1,5 в начале и конце периода, соответственно), напротив в группе пациентов с LS-OCMB он увеличился с 1,7 до 2,4. В этой группе была выше доля пациентов, у которых произошел рост балла

по EDSS (45% против 12,9%, $p < 0,0003$). Таким образом, выявление LS-OCMB может прогнозировать худший ответ больных на терапию интерферонами и являться маркером высокой воспалительной активности после лечения. В то же время показано, что у пациентов с LS-OCMB при терапии натализумабом более низкий риск развития прогрессирующей мультифокальной лейкоэнцефалопатии (ПМЛ) [151]. Авторы исследования считают, что эта взаимосвязь обусловлена большей напряженностью иммунного ответа у пациентов с LS-OCMB, что является основой для защиты от избыточной иммуносупрессии при терапии натализумабом, которая является причиной реактивации JC-вируса, вызывающего прогрессирующую мультифокальную лейкоэнцефалопатию. Эта гипотеза подтверждается данными о более высокой численности популяций В-лимфоцитов, CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов у пациентов с LS-OCMB в ЦСЖ.

В сыворотке пациентов с РС повышены титры антител к альфа-галактоцереброзиду, по сравнению со здоровыми людьми [106]. Титры антител к альфа-галактоцереброзиду также были повышены при ремиттирующем течении заболевания в модели ЭАЭ у мартышек. Авторы считают, что антитела к галактоцереброзиду могут иметь клиническое значение и являться маркером ремиттирующей формы заболевания.

Антитела к сульфатидам чаще определяются в ЦСЖ у пациентов с РС, по сравнению с пациентами с другими неврологическими заболеваниями и соматической патологией. Среди больных РС антитела к сульфатидам обнаруживались у 30% с вторично прогрессивным течением, 15% - с ремиттирующим и 14% с первично-прогрессивным. Наличие антител не коррелировало с полом и возрастом пациентов [77].

В ряде работ проводился анализ антител к ганглиозидам в биологических жидкостях пациентов с РС. Многие из этих исследований были проведены в 1980-ых-начале 1990-х [21; 51; 54; 87; 143]. Методы анализа, использовавшиеся в то время обладали недостаточными чувствительностью и специфичностью, однако позволили впервые выявить тенденцию к повышению антител к ганглиозидам при

РС. В более поздних исследованиях у пациентов с РС в ЦСЖ были выявлены антитела к GM1 (38% случаев), асиало-GM1 (23,8%), GD1a (33,3%), последние чаще выявлялись у больных с первично-прогредиентным течением [17]. Было обнаружено статистически значимое повышение антител класса IgG к GM1 в сыворотке крови у пациентов с РС, по сравнению со здоровыми добровольцами, различие в частоте выявления антител к GM1 также наблюдалось между пациентами с РС в периоды обострения и ремиссии. В другом исследовании было подтверждено увеличение частоты выявления антител к GM1 у пациентов с РС, по сравнению со здоровыми людьми [158]. В этой работе также было показано, что наличие антител к GM1 (IgM + IgG) в сыворотке не коррелирует с выраженностью атрофии мозга, измеренной при МРТ [148].

В небольшом исследовании была определена связь повышения в частоты выявления сыворотке антител к GM3 с прогредиентным течением (первичным или вторичным) заболевания. Исследовались также антитела к GM1, GD1a, GD3 и GD1b, однако значимых различий между группами выявлено не было. На основании полученных данных, авторы предположили наличие корреляции повышения антител к GM3 с аксональным повреждением и нарастанием инвалидизации при прогредиентных формах РС [131]. Однако другие исследователи опровергают данное утверждение [64].

В более поздних работах проводилось одновременное исследование профилей антител к широкому спектру компонентов миелина, среди которых были некоторые липидные антигены, в биологических жидкостях пациентов с РС. В небольшой выборке у пациентов с РС (16 человек) было показано увеличение частоты обнаружения антител к сульфатиду, окисленным формам холестерина и фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламину, лизофосфатидилэтаноламину и сфингомиелину в ЦСЖ, у пациентов с вторично-прогредиентным течением чаще выявлялись антитела к GM1 и асиало-GM1 [86]. При введении мышам с ЭАЭ антител к сульфатиду исследователи наблюдали увеличение тяжести течения заболевания. В другой работе были созданы микрочипы на 362 антигена, среди

которых были белки и липиды миелина, белки токсического шока (БТШ) [126]. Проводилась оценка различия наборов антител при разном течении РС, со здоровыми добровольцами и пациентами с СКВ, аденолейкодистрофией и болезнью Альцгеймера. Для каждого варианта течения РС (РРС, ВПРС, ППРС) был обнаружен свой набор антител, в основном к белковым эпитопам, позволяющих отличить ее от остальных со специфичностью >70%. Кроме того, проводилась оценка набора антител в сыворотке крови у больных РС, в зависимости от результатов биопсии мозга: разные патологоанатомические подтипы РС достоверно можно было отличить друг от друга с помощью набора антител. Подтип I, для которого характерно преобладание демиелинизации, обусловленной Т-клетками и макрофагами, и подтип II, при котором демиелинизация обусловлена больше воздействием антител/комплемента, различались по антителам к БТШ, белкам ЦНС, а также антителам класса IgG к 7 липидам, 3 из которых являются окисленными производными холестерина. В модели ЭАЭ было показано, что введение животным окисленных производных холестерина приводит к более тяжелому течению заболевания в виде клинического ухудшения, увеличения воспалительных инфильтратов, интенсивности демиелинизации и аксональной дегенерации. Была показана связь выявления антител к сульфатидам, GM2, GD1a, асиало-GM1, фосфатидилэтаноламину, D-эритросфингозину, смеси ганглиозидов с выраженностью атрофии головного мозга, по данным МРТ.

В работе Brennan и соавт. анализировались антитела не только к отдельным липидам (сульфатидам, галактоцереброзидам, церамидам, фосфолипиды, сфингомиелин), но и их комбинациям друг с другом. Было выявлено, что антитела вырабатываются в большей мере именно к комбинациям липидов, чем к отдельному виду липидов. Наиболее часто в ЦСЖ пациентов с РС исследователям удавалось выявить антитела к сульфатиду и комплексам с его участием [32].

Исследования, посвященные анализу антител в биологических жидкостях пациентов с РС, показывают, что у пациентов с РС чаще, чем у здоровых людей

встречаются антитела к липидам миелина. Выявлена связь между наличием антител к липидам миелина и некоторыми клиническими характеристиками, такими как скорость прогрессирования заболевания. Однако связь между повышением продукции антител к липидам, клинической и рентгенологической картиной заболевания, его прогнозом, ответом на лечение остается до конца не ясна. Кроме того, не определены конкретные мишени антител, в том числе входящих в состав LS-ОСМВ, для которых чаще всего определялась связь с клиническими особенностями заболевания.

1.8. Препараты для лечения РС, воздействующие на реакции иммунитета с участием липидов

В настоящее время для лечения РС используется препарат финголимод (FTY720), который доказал свою эффективность в нескольких крупных клинических исследованиях. В организме финголимод фосфорилируется, образуя финголимод-фосфат - молекулу, имеющую строение, схожее с липидным медиатором воспаления сфингозин-1-фосфатом (S1P). Финголимод действует на различные рецепторы S1P, которые экспрессируются на многих типах клеток и принимают участие во многих процессах, связанных с развитием РС. Финголимод-фосфат связывается с S1P₁ рецептором в лимфатических узлах, приводя к ингибированию каскада, запускаемого при связывании этого рецептора с S1P, что препятствует выходу лимфоцитов из лимфатических узлов и проникновению аутоагрессивных Т-лимфоцитов в ЦНС. Обладая возможностью проникать через ГЭБ, финголимод также воздействует на рецепторы S1P на территории ЦНС. Финголимод связывается с рецепторами S1P на нейронах и глиальных клетках и, воздействуя на каскады, запускаемые S1P, препятствует развитию процессов нейродегенерации и индуцирует процессы репарации [82]. Создание препарата, эффективного для лечения РС, в основе действия которого лежит влияние на иммунные процессы с участием липидов подтверждает возможную роль липидов в патогенезе РС. Таким образом, по современным представлениям, в патогенезе РС принимают участие, как Т-клеточное, так и В-

клеточное звено приобретенного иммунитета, а также различные компоненты врожденного иммунитета. Особое внимание в последнее время уделяется иммунным реакциям с участием В-клеток и реакциям врожденного иммунитета. Все перечисленные звенья иммунитета могут взаимодействовать с различными классами липидов, что приводит к запуску иммунных реакций. Сегодня уже показано, что иммунопатологические реакции с участием липидов миелина участвуют в патогенезе РС, однако механизмы этих реакций, а также их вклад в развитие патологического процесса охарактеризованы недостаточно. Поэтому представляется интересным исследовать механизмы взаимодействия различных классов липидов миелиновой оболочки с рецепторами врожденного иммунитета и проследить эффект этого взаимодействия и уточнить его значение в патогенезе РС, а также охарактеризовать реакции гуморального иммунитета с участием липидов миелина при РС. Дальнейшее изучение иммунопатологических реакций с участием липидов при РС может привести к выявлению новых мишеней для терапевтического воздействия при этом заболевании.

Глава 2. Материалы, методология и методы исследования

2.1. Обследованные пациенты

В исследование были включены пациенты с рассеянным склерозом (РС), здоровые добровольцы и пациенты с другими неврологическими заболеваниями. Критерием включения в группу пациентов с РС был диагноз «достоверный РС» согласно критериям МакДональда (2010), приведенными в Приложении 1, и отсутствие других неврологических заболеваний [123]. Критерием включения в группу пациентов с другими неврологическими заболеваниями было наличие невоспалительного неврологического заболевания. Критерием включения в группу здоровых добровольцев было отсутствие неврологических заболеваний. Общими критериями включения для здоровых добровольцев и всех пациентов были возраст от 18 до 65 лет, наличие информированного согласия на участие в исследовании, отсутствие онкологических, системных аутоиммунных заболеваний, тяжелых соматических заболеваний, инфекционного заболевания в течение месяца до забора материала, отсутствие беременности, окончание приема препаратов для иммунотерапии, по крайней мере, за 6 месяцев до участия в исследовании, отсутствие в анамнестических данных о приеме цитостатиков. Критериями исключения было появление клинических или лабораторных признаков аутоиммунного или онкологического заболевания в течение 6 месяцев после забора материала. За время исследования из группы здоровых добровольцев выбыл один испытуемый, у которого вскоре после забора биологического материала было выявлено аутоиммунное заболевание.

Исследование было одобрено Локальным этическим комитетом ФГБНУ «Научный центр неврологии». От каждого испытуемого было получено информированное согласие на участие в исследовании.

В исследование были включены 136 пациентов с рассеянным склерозом, среди которых было 102 пациента с ремиттирующим течением заболевания, 34 пациента с вторично-прогредиентным течением. В группу сравнения вошли 9 пациентов с другими невоспалительными неврологическими заболеваниями: 6 пациентов с болезнью двигательного нейрона, 1 пациент с болезнью Хираяма, 1 с компрессионной миелопатией, связанной с дегенеративно-дистрофическими изменениями позвоночника, 1 с конверсионным расстройством. В группу контроля были включены 57 здоровых добровольцев, соответствующих по полу и возрасту пациентам с РС. Общая характеристика участников исследования приведена в таблице 1.

Таблица 1. Общая характеристика участников исследования

Группа	Число участников	Пол (М/Ж)	Возраст, лет (Me[Q1; Q3])
Пациенты с РС	136	47/89	35 [28; 43]
Пациенты с РРС	102	35/67	31,5 [27; 40]
Пациенты с ВПРС	34	11/23	40 [36;44,5]
Здоровые добровольцы	57	17/40	35 [29; 46]
Группа сравнения	9	6/3	45 [31; 55]

Сокращения: РС — рассеянный склероз, М/Ж — мужчины/женщины, РРС — ремиттирующее течение РС, ВПРС — вторично-прогредиентное течение РС.

Всем пациентам с РС проводился неврологический осмотр, сбор анамнеза, забор крови из кубитальной вены. При необходимости, проводились люмбальная пункция и МРТ головного и спинного мозга. Оценивались такие клинические характеристики, как наличие активности заболевания, частота обострений, число обострений, длительность заболевания, длительность первой ремиссии, выраженность неврологического дефицита по расширенной шкале инвалидности

(EDSS) и выраженность дефицита по отдельным функциональным шкалам, симптоматика, с которой заболевание дебютировало, длительность заболевания до наступления прогрессивного течения и принимавшиеся ранее препараты для лечения РС [161].

У 29 пациентов с РС и 16 здоровых добровольцев из крови были выделены периферические мононуклеарные клетки для изучения профиля секреции цитокинов в ответ на стимуляцию липидами миелина. У 51 пациента с РС и пациентов из группы сравнения было проведено определение цитокинового профиля в ЦСЖ. У 111 пациентов с РС и 49 здоровых добровольцев проводилось определение антител к гликолипидам в сыворотке крови, у 35 пациентов с РС дополнительно были проанализированы антитела к липидам миелина в ЦСЖ.

2.2. Забор, обработка и хранение биологического материала

Забор, первичная обработка и хранение крови и ЦСЖ проводились в соответствии с протоколом, разработанным Teunissen и соавт. [145].

У части пациентов и здоровых добровольцев из группы забор крови для выделения периферических мононуклеарных клеток (РВМС). Забор крови осуществлялся из кубитальной вены в пробирки с ЭДТА (средний объем пробы 6 мл). РВМС выделялись из цельной крови в течение 4 ч после взятия крови.

У части пациентов с РС и всех пациентов из группы сравнения проводился забор ЦСЖ, осуществлявшийся в случае необходимости анализа ЦСЖ в рамках планового диагностического обследования.

У всех пациентов и здоровых добровольцев проводился забор крови из кубитальной вены в пробирки с активатором свертывания. В течение 4 ч после забора пробирки центрифугировались на скорости 2000 об/мин в течение 10 мин.

Сыворотка и ЦСЖ разделялись на аликвоты объемом 180 мкл в пробирки объемом 0,2 мл. Пробирки маркировались, замораживались и хранились при температуре -70°C до использования.

2.3. Выделение периферических мононуклеарных клеток из крови

Периферические мононуклеарные клетки выделялись с помощью разделения по коэффициенту плотности при центрифугировании с использованием фиколла 1077г/л. Краткое описание процедуры: образцы цельной крови аккуратно наслаивались на фиколл (5 мл) в 15 мл пробирке. Пробирки центрифугировались при 400g в течение 30 мин при комнатной температуре. Слой мононуклеарных клеток переносили с помощью стерильной пипетки в другую стерильную пробирку объемом 5 мл. Добавляли 10 мл PBS (фосфатно-солевой буфер) 1% содержанием фетальной бычьей сыворотки (1% FBS) и центрифугировали при 300g в течение 10 мин в условиях комнатной температуры. После удаления надосадка клетки ресуспендировали в 1 мл культуральной среды и считали с помощью автоматического счетчика клеток BioRad TC 20 Automated Cell Counter (BioRad, США).

PBMC рассеивали на 96-луночные планшеты по 2 x 10⁵ клеток на лунку (10⁶ клеток/мл) и культивировали в среде RPMI 1640 Complete (PAA) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) (HyClone, США), 50 ЕД/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ l-глутамин, 0,1 М NaHCO₃ (Paneco) при 37°C и 5% CO₂.

2.4. Клеточные линии

Для экспериментов по выявлению взаимодействий различных липидов миелина с рецепторами врожденного иммунитета были использованы следующие клеточные линии:

- 1) THP-1 (человеческая линия клеток острого моноцитарного лейкоза), экспрессирующие различные виды Толл-подобных рецепторов (TLR 1,2,3,4,5,6,7,8,9), NOD-рецепторы, С-лектиновые рецепторы. Клеточная линия содержит репортерный ген SEAP (secreted embryonic alkaline phosphatase – секретируемая эмбриональная щелочная фосфатаза), находящийся под контролем NF-κB-зависимого промотора.
- 2) RAW (линии макрофагоподобных клеток, трансформированных вирусом

лейкоза Абельсона), экспрессирующие различные виды Толл-подобных рецепторов (TLR 1,2,3,4,5,6,7,8,9), NOD-рецепторы, С-лектиновые рецепторы. Были использованы клеточные линии, содержащая репортерный ген SEAP, находящийся под контролем NF-κB-зависимого промотора, и линии, содержащие репортерный ген люциферазы, находящийся под контролем AP-1 или NFAT зависимого промотора.

3) HEK-293 (линии человеческих эмбриональных клеток почек), экспрессирующие отдельные виды паттерн-распознающих рецепторов: TLR2,4,5,9, Mincle-1, CLEC6. Клеточные линии содержат репортерный ген SEAP, находящийся под контролем NF-κB-зависимого промотора.

2.5. Культивирование клеток

Клетки культивировались в матрасах для клеточных культур. Для THP-1 и HEK-293 использовалась среда RPMI 1640 (PAA) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) (HyClone, США), 50 Ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина, 2мМ l-глутамин, 0,1 М NaHCO₃ (Paneco) при температуре 37°C в условиях 5% CO₂. Клетки RAW культивировались в среде DMEM (PAA) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) (HyClone, США), 50 Ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина, 2мМ l-глутамин, 0,1 М NaHCO₃ (Paneco) при температуре 37°C в условиях 5% CO₂. За 12 ч до инкубации с липидами миелина клетки пересеивались на 96-луночный планшет по 10⁵ клеток на лунку (10⁶ клеток/мл).

PBMC рассеивались на 96-луночный планшет по 2x10⁵ клеток на лунку (10⁶ клеток/мл) сразу после выделения и культивировались в среде RPMI 1640 Complete (PAA) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) (HyClone, США), 50 Ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина, 2мМ l-глутамин, 0,1 М NaHCO₃ (Paneco) при температуре 37°C в условиях 5% CO₂.

2.6. Инкубация клеток с липидами миелина

Клеточные линии THP-1, HEK-293 и RAW-Blue, а также PBMC

инкубировали со следующими липидами миелина: галактоцереброзиды (GalCer), сульфатиды из мозга быка (SigmaAldrich, Germany) ганглиозиды GM4 из мозга человека (SantaCruz Biotechnology Inc., USA), GM2 и GD1a из мозга быка (SigmaAldrich, Germany), фосфатидилхолин (PC) из яичного желтка (SigmaAldrich, Germany), холестеринсульфат и лактозилцерамиды lactosylceramides (LacCer) C12, C18 и C24 (Avanti Polar Lipids, USA). Использовались следующие концентрации липидов: 20 мкг/мл, 10 мкг/мл, 5 мкг/мл, 1 мкг/мл, 0,5 мкг/мл (последняя концентрация использовалась только в случае холестеринсульфата в связи с токсичностью других концентраций). Липиды инкубировали с культурами клеток в течение 18 часов, за исключением клеток RAW с репортерным геном люциферазой — 6 часов. После инкубации в среде, полученной из-под клеточных культур определялась транскрипционная активность факторов NF-kB, NFAT или AP-1. В среде, полученной из-под клеток RAW и PBMC определялись концентрации цитокинов и хемокинов.

2.7. Определение активности транскрипционных факторов

Транскрипционная активность фактора NFkB анализировалась по активности продукта репортерного гена секретируемой эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP), контролируемого экспрессией NFkB. Для этого 50 мкл культуральной среды смешивали с 150 мкл *n*-нитроенилфосфата (Sigma-Aldrich, Germany), разведенного в буфере для анализа SEAP. Проводилось спектрофотометрическое определение оптической плотности полученной смеси при длине волны 405 нм с последующей оценкой ее изменения в динамике через 10-110 мин. По полученным данным вычислялась активность SEAP. Результаты приводились в виде кратности прироста активности SEAP, по сравнению со значением единиц активности для среды, полученной из-под интактных клеток.

Транскрипционная активность фактора AP-1 и NFAT анализировалась по определению активности продукта репортерного гена люциферазы, находящегося под контролем экспрессии AP-1. Для этого 50мкл среды, полученной из-под

клеток смешивалось с люциферинном (Promega, США). Интенсивность флюоресценции оценивалась на приборе Synergy H4 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader (BioTek, США). Результаты приводились в виде кратности прироста интенсивности флюоресценции, по сравнению со значением единиц активности для среды, полученной из-под интактных клеток.

2.8. Оценка цитотоксичности липидов

Для оценки токсичности липидов для клеток проводился МТТ-тест - количественный колориметрический анализ для определения выживаемости клеток млекопитающих. Анализ проводился согласно стандартной методике. Короткое описание методики: к клеткам добавляли раствор соли тетразолия (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид, МТТ), инкубировали в течение 3 ч, затем добавляли ДМСО (диметилсульфоксид) [110]. Последний растворяет клеточные оболочки, в результате чего становится возможной количественная оценка реакции восстановления бледно-желтого МТТ до сине-фиолетового формазана, происходящей внутри живых клеток в связи с активностью ферментов митохондрий, с помощью спектрофотометра.

2.9. Определение концентрации цитокинов и хемокинов

Концентрации цитокинов и хемокинов измеряли в клеточной среде, полученной из-под клеток RAW и PBMC, после инкубации с указанными выше липидами, а также в ЦСЖ пациентов из группы 2. Концентрации цитокинов и хемокинов определялись с помощью мультиплексного анализа с помощью коммерческих наборов согласно инструкции производителя.

Анализ проводился с помощью наборов Bio-Plex (BioRad, США), принцип работы которых основан на технологии Luminex's xMAP® Technology. Технология предполагает одновременное точное количественное определение множества различных соединений, в нашем случае цитокинов и хемокинов. Набор состоит из магнитных микросфер, окрашенных двумя разными флуорофорами в различных соотношениях, что позволяет получить несколько десятков-сотен

различных типов микросфер. Определение цитокинов и хемокинов осуществляется на принципах сэндвич-иммуноанализа. Каждый из типов микросфер содержит антитела, взаимодействующие с определенной целевой молекулой (например, одним из цитокинов). Анализ концентраций производится на основании измерения интенсивности сигнала от меченых вторичных антител, связывающихся с молекулами, взаимодействующими с микросферами, на следующем этапе. Детекция сигнала проводилась с помощью мультиплексного анализатора Bio-Plex MAGPIX (BioRad, США), способного идентифицировать тип микросфер на основе их спектральных характеристик и интенсивность сигнала от микросфер.

Для определения цитокинов и хемокинов в среде из-под клеток RAW 264.7 (AP-1) были использован набор Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine Grp I Panel 23-Plex kit (BioRad, США), позволяющий проводить одновременное определение 23 соединений. Были определены концентрации следующих цитокинов и хемокинов: IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-17A, эотаксин, G-CSF (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор), GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор), IFN- γ (интерферон гамма), KC (кератиноцитарный хемокин), MCP-1 (моноцитарный хемотаксический белок 1), MIP-1 α (макрофагальный белок воспаления 1 α), MIP-1 β , RANTES (хемокин, выделяемый Т-клетками при активации), TNF α (фактор некроза опухолей альфа).

Для определения цитокинов и хемокинов в среде из-под PBMC и ЦСЖ был использован набор Bio-Plex Pro™ Human Cytokine Standard 27-Plex, Group-1 kit (BioRad, USA), позволяющий проводить одновременный анализ концентраций 27 соединений. Были определены концентрации следующих цитокинов и хемокинов: IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17A, эотаксин, bFGF (основной фактор роста фибробластов), G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF (тромбоцитарный фактор роста), RANTES, TNF α , VEGF (фактор роста эндотелия сосудов).

2.10. Исследование антител к липидам миелина

В сыворотке крови и ЦСЖ проводилось определение антител классов IgM и IgG к следующим липидам миелина: сульфатидам, GM1, GM2, GM3, GM4, GD1a, GD1b, GD2, GD3, GT1a, GT1b, GQ1b. Определение антител проводилось методом дот-блот с использованием коммерческой тест-системы для качественного определения антител к гликолипидам в сыворотке крови и ЦСЖ Anti-Ganglioside Dot (Generic Assays, Германия) [161]. В качестве возможных антигенов в рамках данного исследования были выбраны гликолипиды, поскольку по частоте выявления антител к ним при РС имеется наименьшее число литературных данных и наличие в их структуре сложного, часто разветвленного, гидрофильного углеводного остатка может лежать в основе их антигенного потенциала. Выбор методики был выполнен на основании данных о наиболее высокой чувствительности и воспроизводимости набора среди коммерческих тест-систем для определения антител к гликолипидам в биологических жидкостях человека [38].

Интерпретация результатов проводилась по наличию и степени выраженности изменения окраски тест-полоски в сравнении с положительным и отрицательным контролем (сыворотка крови с наличием антител к определенным липидам или отсутствием антител к липидам).

2.11. Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программ Statistica 8.0 (StatSoft, США) и GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, США). Данные по клиническим характеристикам пациентов, концентрации цитокинов в ЦСЖ представлены в виде медиан, нижнего и верхнего квартилей (Me[Q1; Q3]), минимальных и максимальных значений. Данные влиянию липидов на секрецию цитокинов, хемокинов и факторов роста РВМС приведены в виде медиан кратности изменения концентрации, по сравнению с интактными клетками. Данные по наличию антител к липидам в биологических жидкостях представлены в виде абсолютных величин и долей от общего числа участников группы. Данные

по активности факторов транскрипции в экспериментах на клеточных линиях представлены в виде кратности увеличения единиц активности по отношению к интактным клеткам средних значений и стандартных отклонений. Определение статистической значимости различий между группами при сравнении по количественному признаку проводилось с помощью непараметрического критерия Краскелла-Уоллиса при множественном сравнении и с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферрони при попарном сравнении. Определение различий между группами по частоте встречаемости того или иного признака проводилось с помощью критерия хи-квадрат с поправкой на множественность сравнений (Бонферрони) и двустороннего точного критерия Фишера. Различия считались статистически значимыми при уровне ошибки $p < 0,05$. Корреляционный анализ проводился с помощью ранговой корреляции Спирмена.

Глава 3. Результаты

Нами были изучены реакции врожденного иммунитета и гуморального звена приобретенного иммунитета с участием липидов миелина. Для изучения реакций врожденного иммунитета были использованы линии клеток, экспрессирующие различные рецепторы врожденного иммунитета, а также периферические мононуклеарные клетки и ЦСЖ пациентов с РС и здоровых людей. В ходе экспериментов с клеточными линиями была проведена сравнительная характеристика различных липидов миелина по способности активировать разные виды рецепторов врожденного иммунитета, транскрипционные факторы, участвующие в формировании воспалительного ответа и профилей цитокинов, высвобождающихся в ответ на воздействие на клетки различных липидов, *in vitro*. В экспериментах с периферическими мононуклеарными клетками пациентов было охарактеризовано изменение способности иммунных клеток секретировать цитокины в ответ на воздействие липидов миелина при РС. Был проанализирован цитокиновый профиль в ЦСЖ у пациентов с РС. В ходе изучения реакций гуморального иммунитета были проанализированы антитела к различным липидам миелина в биологических жидкостях пациентов с различным течением РС и здоровых людей.

3.1. Влияние липидов на активность транскрипционных факторов в клеточных линиях

Чтобы оценить способность липидов миелина инициировать реакции врожденного иммунитета, был проанализирован эффект различных липидов миелина на активность основных транскрипционных факторов, регулирующих

экспрессию цитокинов и хемокинов, принимающих участие в развитии воспалительного ответа, — факторов NF- κ B, AP-1, NFAT. Для этого были использованы репортерные клеточные линии (RAW-Blue), у которых экспрессией целевого транскрипционного фактора контролировалась экспрессия генов щелочной фосфатазы или люциферазы. Используемые клеточные линии также экспрессировали широкий спектр рецепторов врожденного иммунитета. Клетки были инкубированы с липидами, принадлежащими к различным классам: фосфолипиды (фосфатидилхолин), холестеринсульфат, галактолипиды (сульфатиды, галактоцереброзиды), лактозилцерамид, ганглиозиды (GM4, GM2, GD1a), - в различных концентрациях. Для того чтобы определить, влияет ли на активацию транскрипционных факторов длина алифатического хвоста липидов, были взяты лактозилцерамиды с различной длиной хвоста.

С помощью теста МТТ было показано, что использованные концентрации липидов (1-20 мкг/мл) не обладают цитотоксичностью, за исключением холестеринсульфата. В связи этим использовались более низкие концентрации холестеринсульфата (≤ 1 мкг/мл), которые не оказывали токсического влияния на клетки, согласно данным теста МТТ.

Для изучения влияния липидов миелина на активность фактора NF- κ B проводилась оценка активности фактора NF- κ B, измеренной по увеличению активности щелочной фосфатазы в среде клеток, инкубированных с липидами, по сравнению со средой интактных клеток. Среди исследованных липидов наиболее существенное влияние на активность фактора NF- κ B оказывал лишь лактозилцерамиды C18 (в 2,23 раз). Некоторые липиды оказывали незначительный эффект на активность фактора NF- κ B: при инкубации клеток с ганглиозидами происходило увеличение активности в 1,28-1,57 раз, с холестеринсульфатом - в 1,24 раз, с лактозилцерамидами C12 и C24 — в 1,47 и 1,73 раз, соответственно. При стимуляции клеток галактоцереброзидами, сульфатидами и фосфатидилхолином увеличения активности фактора NF- κ B не наблюдалось. В то же время при инкубации клеток с собственным лигандом TLR4

липополисахаридом (ЛПС) (1 мкг/мл) происходило заметно более выраженное увеличение активности NF-κB (в 3,1 раз). При стимуляции клеток собственным лигандом лектиновых рецепторов Mincle TDB (10 мкг/мл) активность фактора NF-κB также практически не изменялась (увеличилась в 1,13 раз). (Рис. 1). Более подробно изменение транскрипционной активности фактора NF-κB под воздействием различных липидов миелина охарактеризовано в Таблице 2.

Таблица 2. Изменение транскрипционной активности факторов NF-κB, AP-1 и NFAT при стимуляции культур клеток RAW-Blue липидами миелина и собственными лигандами паттерн-распознающих рецепторов

Липиды (10 мкг/мл)	Увеличение активности NF-κB, по сравнению с интактными клетками, разы±SD	Увеличение активности AP-1, по сравнению с интактными клетками, разы±SD	Увеличение активности NFAT, по сравнению с интактными клетками, разы±SD
GM4	1,28±0,09	2,83±0,31	2,07±0,03
GM2	1,37±0,08	2,44±0,12	1,77±0,07
GD1a	1,57±0,08	1,94±0,28	2,44±0,06
Галактоцереброзиды	0,8±0,08	2,26±0,59	0,9±0,1
Сульфатиды	0,8±0,04	2,09±0,07	1,46±0,06
Фосфатидилхолин	0,8±0,05	1,7±0,63	0,97±0,13
Холестеринсульфат (1 мкг/мл)	1,24±0,01	2,25±0,31	1,06±0,12
Лактозилцерамид (C24)	1,73±0,008	1,89±0,12	-
Лактозилцерамид (C18)	2,23±0,0003	2,45±0,25	-
Лактозилцерамид (C12)	1,47±0,03	2,08±0,39	-
ЛПС (TLR4, 1 мкг/мл)	3,09±0,05	3,43±0,18	-
TDB (Mincle)	1,13±0,07	2,8±0,09	3,07±0,06

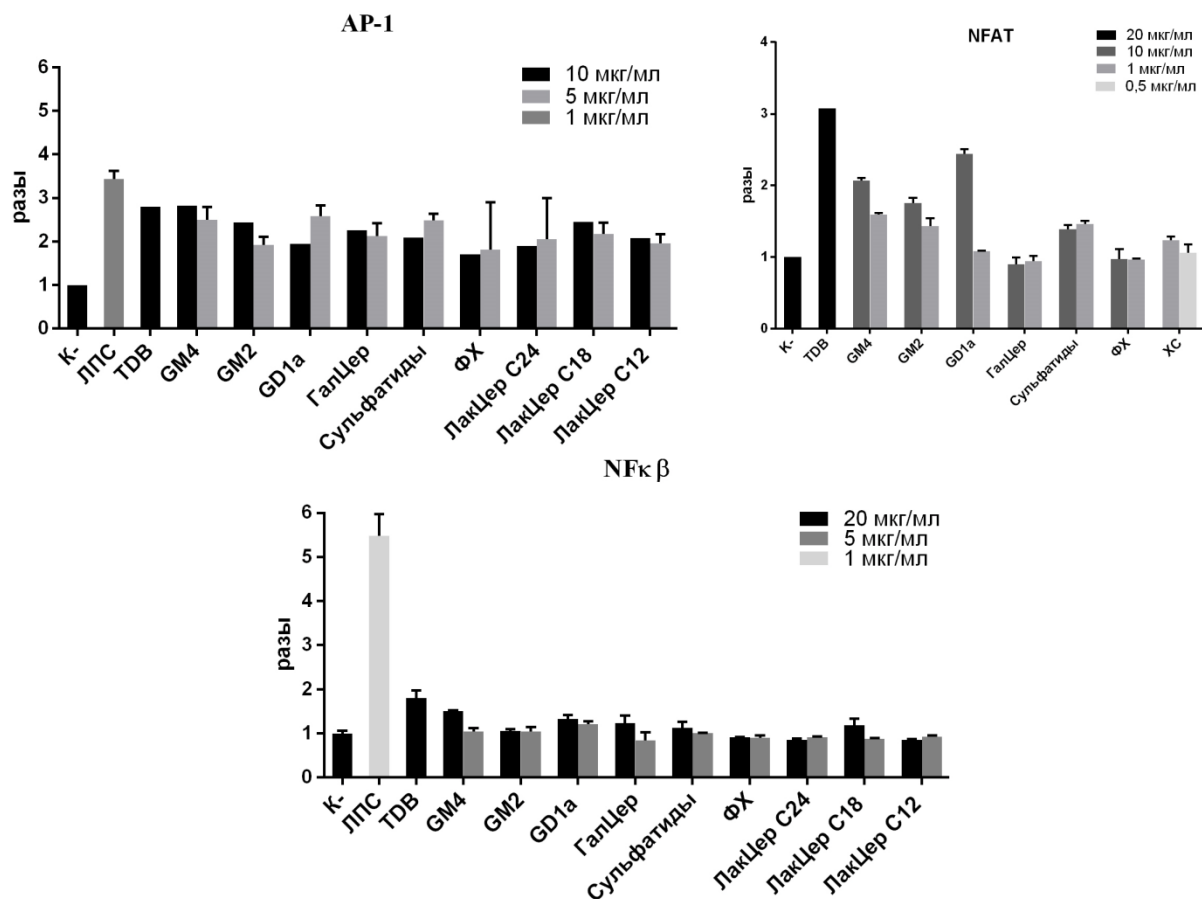


Рисунок 1. Влияние липидов миелина на активность транскрипционных факторов AP-1, NFAT, NF-κB в экспериментах на клеточных линиях RAW-Blue. К- - отрицательный контроль (интактные клетки), ЛПС — липополисахарид, ГалЦер — галактоцереброзиды, ФХ — фосфатидилхолин, ЛакЦер — лактозилцерамиды.

Все исследованные липиды, вызвали увеличение активности фактора AP-1 (Рис. 1). В наибольшей степени этот эффект отмечался при инкубации клеток с ганглиозидами GM4 (в 2,83 раза) и GM2 (в 2,44 раз) и галактоцереброзидами (в 2,26 раз) и лактозилцерамидами (до 2,45, раз при длине алифатического хвоста C18). Наименее выраженным воздействием на активность фактора AP-1 обладал фосфолипид фосфатидилхолин. При инкубации клеток с собственным лигандом TLR4 ЛПС (1 мкг/мл) было отмечено увеличение активности AP-1 в 3,43 раз, при

стимуляции клеток собственным лигандом лектиновых рецепторов Mincle TDB (10 мкг/мл) – в 2,8 раз. Таким образом, действие липидов на активность фактора AP-1 сопоставимо с действием собственного лиганда лектиновых рецепторов TDB. Более подробно изменение транскрипционной активности фактора AP-1 под воздействием различных липидов миеллина охарактеризовано в Таблице 2.

Наиболее выраженной способностью активировать фактор NFAT обладали ганглиозиды GD1a (в 2,44 раз) и GM4 (в 2,07 раз). Остальные липиды — галактоцереброзиды, холестеринсульфат, фосфатидилхолин — не вызывали существенного повышения транскрипционной активности фактора NFAT (Рис. 4). При стимуляции клеток собственным лигандом лектиновых рецепторов Mincle TDB (20 мкг/мл) – в $3,07 \pm 0,06$ раз. Более подробно изменение транскрипционной активности фактора NFAT под воздействием различных липидов миеллина охарактеризовано в Таблице 2.

Полученные данные указывают на возможность липидов запускать реакции врожденного иммунитета, а также на различие между эффектами, вызываемыми разными классами липидов. Сравнительная характеристика липидов миеллина в отношении способности повышать активность транскрипционных факторов, участвующих в развитии воспалительного ответа, представлена в Таблице 2. Наиболее выраженной способностью активировать провоспалительные транскрипционные факторы обладали ганглиозиды и лактозилцерамиды. Фосфолипид фосфатидилхолин практически не влиял на активность исследованных транскрипционных факторов. Наблюдалось выраженное увеличение активности транскрипционного фактора AP-1, которое отмечалось при взаимодействии культуры клеток с наиболее широким спектром липидов. Наименее выраженным эффектом липиды обладали в отношении фактора NF-κB.

3.2. Определение рецепторов врожденного иммунитета, взаимодействующих с липидами

Чтобы изучить, за счет взаимодействия с какими из рецепторов врожденного иммунитета происходит увеличение активности изученных

транскрипционных факторов при инкубации клеточных культур с липидами миелина были использованы клеточные культуры, экспрессирующие отдельные виды паттерн-распознающих рецепторов: HEK293- TLR2, TLR4, TLR5, TLR9, Mincle, Слесб. При инкубации с клетками, экспрессирующими отдельные виды Толл-подобных рецепторов увеличения активности транскрипционных факторов отмечено не было.

Наиболее выраженной способностью активировать транскрипционный фактор AP-1 в клетках, экспрессирующих рецепторы Mincle и Слесб, обладает ганглиозид GM2 (в 3,42 и 1,9 раз, соответственно). Меньший эффект выявлен при стимуляции клеток ганглиозидом GM4 (в 1,9 и 1,57 раз, соответственно) и галактоцереброзидами (в 2,55 и 1,87 раз, соответственно). При инкубации клеток, экспрессирующих рецептор Mincle, с его собственным лигандом TDB определялось увеличение активности транскрипционного фактора AP-1 в 2,52 раз, что сопоставимо с эффектом, вызываемым галактоцереброзидами и меньше эффекта, вызываемого ганглиозидом GM2 (в 3,42 раз).

Ганглиозид GD1a и сульфатиды вызывали увеличение активности транскрипционного фактора AP-1 в клетках, экспрессирующих рецепторы Mincle (в 2,24 раз), но не Слесб. Напротив, при стимуляции клеток, экспрессирующих Mincle, холестеринсульфатом уровень активности AP-1 не менялся, а при его воздействии на клетки, экспрессирующие Слесб, он увеличивался в 2,16 раз, что сопоставимо с эффектом, отмеченным при взаимодействии клеток, экспрессирующих рецептор Слесб, с TDB (в 2,07 раз) (Рис. 2). Фосфатидилхолин не вызывал изменения активности фактора AP-1 ни в клетках, экспрессирующих рецепторы Mincle, ни в клетках экспрессирующих Слесб.

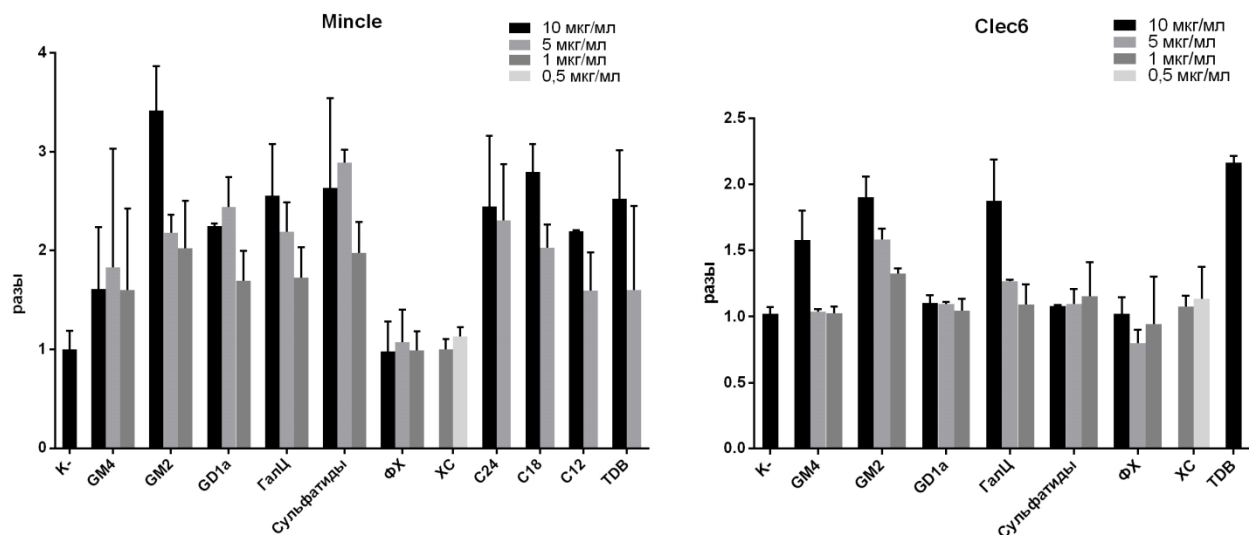


Рисунок 2. Влияние липидов на активность AP-1 в экспериментах на клеточных линиях HEK-293-Mincle и HEK-293-Clec6

Таким образом, рецепторы врожденного иммунитета Mincle в использованной нами модели активировались ганглиозидами (GM2, GD1a, в меньшей степени GM4) и галактоцереброзидами, рецепторы Clec6 активировались ганглиозидом GM2, галактоцереброзидами и холестеринсульфатом.

3.3. Влияние липидов на секрецию цитокинов и хемокинов в клеточных линиях

Различная способность липидов активировать транскрипционные факторы является основой для различия профилей цитокинов, секретируемых при их воздействии. Чтобы охарактеризовать профили секреции цитокинов, вырабатываемые в ответ на стимуляцию различными липидами миелина, было изучено влияние липидов миелина на секрецию цитокинов и хемокинов при инкубации с клеточными линиями RAW-Blue, экспрессирующими различные виды паттерн-распознающих рецепторов. Для этого концентрации цитокинов и хемокинов были проанализированы в культуральной среде клеток, инкубированных с различными липидами миелина и ЛПС — лигандом рецептора TLR-4, играющего одну из ключевых ролей в развитии воспаления.

Профиль секреции цитокинов при стимуляции клеток липидами имеет много сходств с профилем, выявляемым при добавлении ЛПС: происходит повышение концентраций IL-1 α , IL-3, IL-5, IL-6, IL12(p40), IL12(p70), IL-17A, G-CSF, IFN γ , KC, RANTES (Рис 3). Основными отличиями ЛПС от липидов по способности индуцировать продукцию цитокинов и хемокинов являются: более выраженный эффект ЛПС на концентрации цитокинов, повышение экспрессии TNF α при взаимодействии клеток с ЛПС, а также отсутствие изменений концентрации MIP-1 α и MIP-1 β при инкубации клеток с ЛПС.

Наиболее выраженным при воздействии всех липидов миелина и ЛПС было повышение концентраций IL-1 α , IL-6, G-CSF, RANTES. Повышение концентрации указанных молекул под воздействием ЛПС превосходило эффект, создаваемый липидами миелина: при инкубации клеток с ЛПС их концентрация возрастала в 7,2-10 раз, при инкубации с липидами миелина — в 1,56-4,93 раз. Среди липидов наиболее наибольшее изменение экспрессии IL-1 α , IL-6, G-CSF вызывали галактоцереброзиды и сульфатиды, при стимуляции клеток которыми происходило увеличение концентраций: IL-1 α в 2,74-3,09 раз, IL-6, - в 2,8-3,09 раз и G-CSF – в 4,93 раза. Концентрация RANTES в наибольшей степени изменялась при инкубации клеток с ганглиозидами GM2 и GD1a (в 2,8 раз). Более подробные данные об изменениях концентраций цитокинов в культуральной среде при инкубации клеток RAW-Blue с различными липидами и ЛПС приведены на Рис. 3 и в Таблице 3.

Таблица 3. Увеличение концентрации цитокинов и хемокинов в культуральной среде при стимуляции клеток липидами и ЛПС

	ЛПС	GM4	GM2	GD1a	ГалЦ	Сульфатид	ФХ	C24	C18	C12
IL1α	8,59	2,47	2,62	2,55	3,09	2,74	2,22	1,98	2,03	2,05
IL6	7,2	2,45	2,73	2,76	2,8	3,09	2,52	2,38	2,23	2,6
G-CSF	10	3,84	4,84	4,5	4,93	4,93	3,69	3,16	3,39	4,07
RANTES	10	1,92	2,79	2,8	2,05	2,08	2,52	2,62	2,18	2,2
IL-3	2,55	1,56	1,67	1,84	1,92	1,87	1,74	1,44	1,54	1,19
IL-5	1,34	1,35	1,42	1,49	1,42	1,56	1,56	1,28	1,42	1,21
IL-12(P40)	2,19	1,3	1,62	1,56	1,56	1,72	1,66	1,21	1,53	1,32
IL17A	2,43	1,5	1,61	1,62	1,91	1,88	1,68	1,39	1,50	1,22
KC	2,38	1,66	1,73	1,99	2,01	1,97	1,73	1,35	1,73	1,7

IFN γ	1,66	1,46	1,46	1,55	1,61	1,71	1,66	1,43	1,39	1,17
MIP1 α	1,14	1,42	1,52	1,57	1,87	1,68	1,79	1,49	1,44	1,17
MIP1 β	1,54	1,32	1,52	1,75	2,35	2,24	2,20	1,41	1,71	1,38

Сокращения: ЛПС — липополисахарид, ГалЦ — галактоцереброзиды, ФХ — фосфатидилхолин, С24, С18, С12 — лактозилцерамиды с различной длиной алифатического хвоста.

Выявлено некоторое различие в профилях секреции цитокинов при инкубации клеток с разными липидами. При добавлении к клеткам галактоцереброзидов и сульфатидов, GD1a уровень цитокинов IL-3, KC увеличивался в 1,84-2,01 раз, тогда как при инкубации клеток с другими липидами увеличение концентрации было менее выраженным. Для галактоцереброзидов и сульфатидов дополнительно было характерно более выраженное повышение продукции следующих цитокинов и хемокинов, по сравнению с другими гликолипидами: IL17A (в 1,88-1,91 раз), MIP-1 α (в 1,68-1,87 раз) и особенно MIP-1 β (в 2,24-2,35 раз).

Полученные данные указывают на то, что галактоцереброзиды и сульфатиды обладают наиболее выраженной способностью стимулировать секрецию провоспалительных цитокинов и хемокинов среди изученных классов липидов.

Особенностью профиля цитокинов, определяемого после инкубации клеток с фосфатидилхолином, является более выраженное увеличение концентрации TNF α (2,04 раз), по сравнению с другими липидами, при инкубации с которыми уровень этого цитокина изменялся в 0,89-1,17 раз. Кроме того, при стимуляции клеток фосфатидилхолином происходило увеличение уровня MIP-1 α в 1,79 раз и MIP-1 β в 2,20 раз, что сопоставимо с результатами, полученными при стимуляции клеток галактоцереброзидами и сульфатидами.

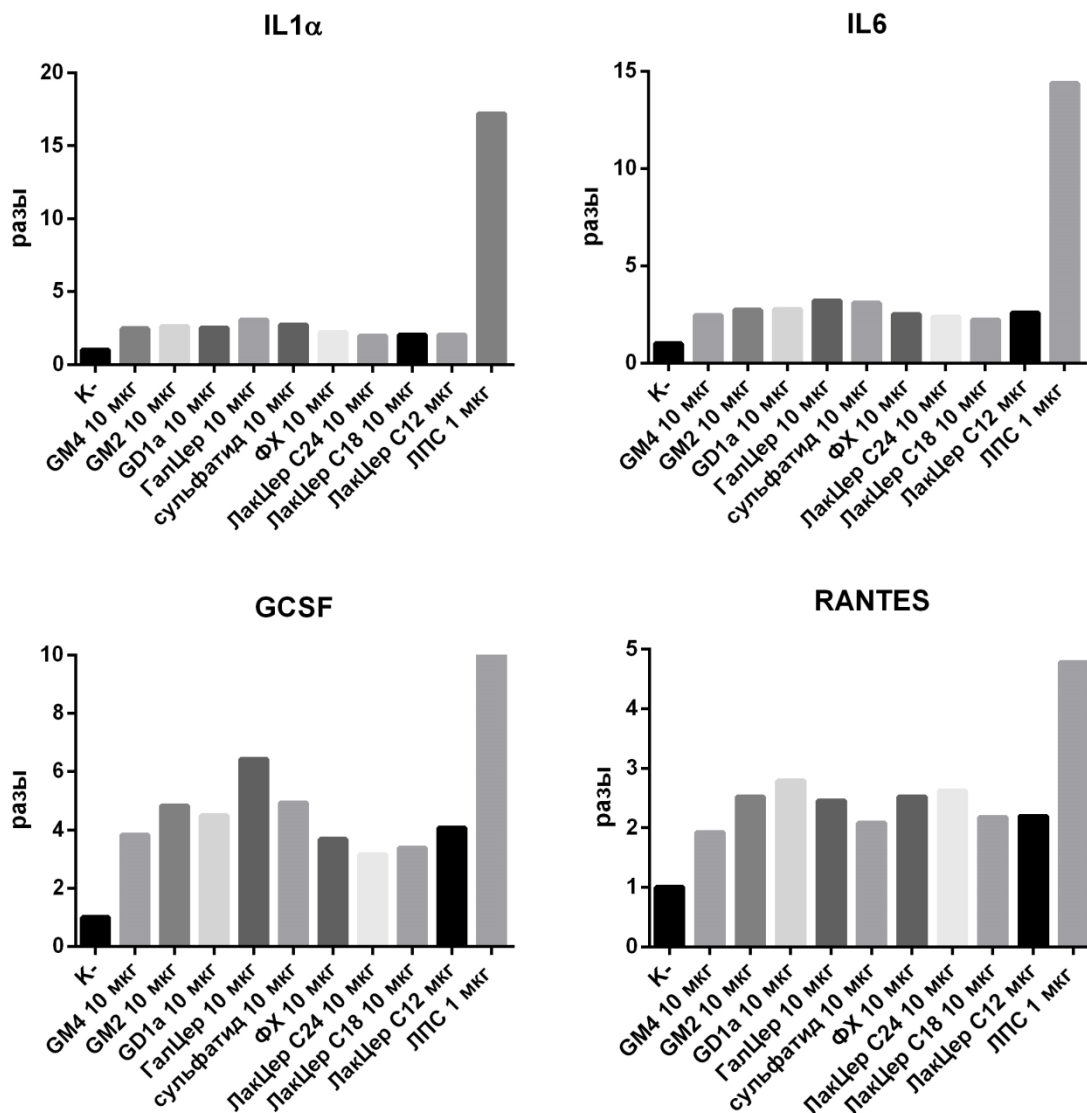


Рисунок 3. Изменение концентраций цитокинов и хемокинов при инкубации липидов миелина с клеточными линиями RAW-Blue

3.4. Клиническая характеристика пациентов с рассеянным склерозом

Нами были обследованы 136 пациентов с РС, среди которых было 102 пациента с ремиттирующим течением заболевания и 34 пациента с вторично-прогрессирующим течением заболевания. У пациентов с РС были изучены реакции врожденного иммунитета и гуморального звена приобретенного иммунитета на липиды миелина.

Для изучения реакций врожденного иммунитета был проведен анализ изменения концентраций цитокинов и хемокинов периферическими

мононуклеарными клетками крови в ответ на их стимуляцию различными липидами миелина. Профили цитокинов и хемокинов, определяемые после стимуляции периферических мононуклеарных клеток липидами сопоставлялись с профилями цитокинов, выявляемых у пациентов с РС в ЦСЖ. Изучение влияния липидов на секрецию цитокинов и хемокинов периферическими мононуклеарными клетками было проведено в группе пациентов с РС численностью 29 человек и контрольной группе, включившей 16 здоровых добровольцев. Для того, чтобы выявить различия врожденного иммунного ответа на липиды миелина, в зависимости от варианта течения заболевания, в группе пациентов с РС было выделено 3 подгруппы с наиболее резко отличающимися вариантами течения РС: 1) пациенты с доброкачественным течением РС, у которых длительность заболевания составляла 7 лет и более, в то же время балл по шкале EDSS не превышает 3 (n=12). 2) пациенты с быстрыми темпами нарастания инвалидности, у которых в течение первых 5 лет заболевания балл по шкале EDSS ≥ 5 (n=8); 3) пациенты с высокой активностью заболевания: 2 и более обострений в год и/или множественные очаги (более 10) в головном/спинном мозге, накапливающие контрастное вещество (n=7).

Возраст пациентов с РС составлял от 18 до 60 лет (39[30,75;51,25]), в подгруппе было 9 мужчин (31%) и 20 женщин (69%). В группе пациентов с доброкачественным течением РС пациенты с РС были более старшего возраста, в этой же группе отмечалась более высокая доля женщин. Наиболее молодой возраст был у пациентов в группе больных с высокой активностью заболевания. Основные клинические и демографические характеристики пациентов с различным течением РС представлены в Таблице 4.

Таблица 4. Общая характеристика пациентов с различным течением РС

	Все пациенты (n=29)	РС с быстрым нарастанием инвалидности (n=8)	Доброкачественное течение (n=12)	Активный РРС (n=7)
Возраст (Me[Q1;Q3])	38 [30; 51]	36 [31; 45]	52[48,25; 57,25]	25[23;29]
Пол (М/Ж)	9/20	3/5	3/9	3/4
EDSS (Me[Q1;Q3])	2,5 [2; 5]	7 [5; 7,5]	2[1,75; 2,5]	4 [2,5; 4,5]
Длительность заболевания, мес (Me[Q1;Q3])	74 [28,75; 189,75]	101[33,75;158,25]	251[171,75;318]	16[8; 42]
Обострение (% пациентов)	72,4	87,5	50	100
Число обострений	3 [2;5]	5 [3,5; 10,25]	2[1,75; 3]	3,5[3;4]

У пациентов с доброкачественным течением частота обострений за предшествующие 2 года перед включением в исследование составляла менее 1 за год, общее число обострений — от 2 до 8 (2[1,75;3]), длительность первой ремиссии — от 24 до 342 месяцев (180[99;180]), длительность заболевания — от 88 до 414 месяцев (251[171,75;318]), балл по шкале EDSS – от 1,5 до 3 (2[1,75;2,5]). Шесть пациентов были обследованы в фазе обострения, 6 - в фазе ремиссии. У пациентов с доброкачественным течением заболевание чаще всего дебютировало с оптического неврита (n=5) или расстройств чувствительности (n=4), реже отмечался дебют с нарушения функций других черепно-мозговых нервов (n=3).

У пациентов с быстрыми темпами нарастания инвалидности на момент включения в исследование отмечалось вторично-прогредиентное течение с обострениями, у 2-х — ремиттирующее течение. Частота обострений за предшествующие 2 года перед исследованием составляла от 1 до 3 за год, число обострений — от 2 до более чем 20 (5[3,5;10,25]), длительность первой ремиссии — от 12 до 40 месяцев (19,5[13,5;31,5]), длительность заболевания — от 36 до 336

месяцев (101[33,75;158,25]), длительность заболевания до перехода во вторично-прогредиентное течение составила от 21 до 132 месяцев (82[50;120]), балл по шкале EDSS – от 5 до 8,5 (7[5;7,5]). Семь пациентов были обследованы в фазе обострения, 1 - в фазе ремиссии. У пациентов с быстрыми темпами нарастания инвалидности наиболее часто отмечался полисимптомный дебют заболевания (n=3) или дебют с пирамидных нарушений (n=3), реже в качестве первого проявления РС выступали оптический неврит (n=1) или нарушения чувствительности (n=1).

У пациентов с PPC с высокой активностью заболевания частота обострений за предшествующие 2 года перед включением составляла от 1 до 3 в год, число обострений — от 2 до 5 (3,5[3;4]), длительность первой ремиссии — от 3 до 56 месяцев (4[3;14,75]), длительность заболевания — от 7 до 60 месяцев (16[8;42]), балл по шкале EDSS – от 2 до 8,5 (4[2,5;4,5]). Все пациенты были обследованы в фазе обострения. Заболевание дебютировало с нарушения функции черепных нервов (n=2), расстройств чувствительности (n=2), пирамидных нарушений (n=1) или сочетания различных симптомов (n=2).

Анализ профиля цитокинов и хемокинов в ЦСЖ был проведен у 51 пациент с РС. Возраст пациентов с РС составлял от 21 до 60 лет (30 [26; 38]), в группе было 18 мужчин (35,3%) и 33 женщины (64,7%). Число обострений в данной группе пациентов составляло от 1 до 4 (2[1;2,25]), длительность заболевания — от 0,5 до 240 месяцев (24[2; 48,75]), балл по шкале EDSS – от 1 до 5,5 (2,5[2;3]). 44 (86,4%) пациента были обследованы в фазе обострения. Сорока трем пациентам было проведено иммунохимическое исследование ЦСЖ, среди них у 40 (93%) в ЦСЖ были выявлены олигоклональные IgG. 38 пациентам была выполнена МРТ с контрастом, среди них накопление контрастного вещества было выявлено у 23 пациентов (60,5%). Наиболее частыми вариантами дебюта заболевания в этой группе пациентов были оптический неврит (n=10), расстройства чувствительности (n=11) и полисимптомный дебют (n=9). Реже первым симптомом РС были нарушения функций других черепных нервов (n=7),

пирамидная симптоматика (n=6), мозжечковая атаксия (n=6), нарушения высших корковых функций или атипичные симптомы (n=2).

Среди пациентов, которым проводилось определение концентраций цитокинов и хемокинов в ЦСЖ была выделена группа с более высокой активностью заболевания численностью 15 пациентов. У данных пациентов отмечались более частые обострения заболевания, число обострений у этих пациентов составляло от 2 до 4 (3[2;3]), длительность заболевания от 0,5 до 108 месяцев (8,5[2,5; 27]). Все пациенты были обследованы в фазе обострения заболевания, у всех пациентов отмечались признаки активности заболевания, по данным МРТ. Выраженность неврологического дефицита по шкале EDSS составляла от 2 до 5 (3,25[2,5; 4,375]). В Таблице 5 приведены основные клинические характеристики пациентов с РС, которым проводился анализ концентраций цитокинов и хемокинов в ЦСЖ.

Таблица 5. Клинические характеристики пациентов с РС, которым проводился анализ ЦСЖ

	Пациенты с РС (n=51)	Пациенты с высокой активностью заболевания (n=15)
Возраст, лет (Me[Q1;Q3])	30 [26; 38]	28,5 [24,25; 38,5]
Пол(М/Ж)	17/34	9/6
EDSS (M[Q1;Q3])	2,5 [2; 3]	3,25 [2,5; 4,375]
Длительность заболевания, мес (Me[Q1;Q3])	24 [2; 48,75]	8,5 [2,5; 27]
Обострение (% пациентов)	86,3	100
Число обострений	2 [1;2]	3 [2;3]
Активность, по данным МРТ (% пациентов)	60,5	100

Для характеристики гуморального иммунитета к липидам миелина проводилось определение антител к гликолипидам миелина биологических жидкостях пациентов с РС. У большинства обследованных пациентов (n=111) был

проведен анализ антител в сыворотке крови. Среди них у 78 отмечалось ремиттирующее течение (РРС), у 33 — вторично-прогредиентное (ВПРС). Группы были сопоставимы по полу. Пациенты с ВПРС были несколько старшего возраста, чем пациенты с РРС, однако это различие не было статистически значимым. Клинические характеристики пациентов с РРС и ВПРС перечислены в Таблице 6 [161].

Таблица 6. Клинические характеристики пациентов с РС

	РРС (n=78)	ВПРС (n=33)
Возраст (Me[Q1;Q3])	30,5 [25,75; 38]	41[36; 45]
Пол (М/Ж)	32/46	10/23
EDSS (Me[Q1;Q3])	2,25[2;3]	6,5[5,5;7]
Длительность заболевания, мес (Me[Q1;Q3])	26[5,75;73,5]	175,5[99;223,5]
Длительность первой ремиссии (Me[Q1;Q3])	17,5[5;46,25]	24[12;48]
Длительность заболевания до перехода в ВПРС (Me[Q1;Q3])	-	84[61,5;132]
Обострение (% пациентов)	78,2	48,5
Число обострений (Me[Q1;Q3])	2[1,75;3]	6[4,25;15]

У пациентов группы РРС частота обострений составляла от 0 до 3 обострений в год (1[0;2]), число обострений — от 1 до 12 (2[1,75;3]), длительность первой ремиссии — от 1 до 240 месяцев (17,5[5;46,25]), длительность заболевания — от 0,5 до 414 месяцев (26[5,75;73,5]), балл по шкале EDSS – от 1,5 до 4,5 (2,25[2;3]). Шестьдесят один пациент был обследован в фазе обострения, 17 в фазе ремиссии. У 16 пациентов заболевание дебютировало с оптического неврита, у 13 — с нарушения функции других черепных нервов, у 11 - с пирамидных нарушений, у 10 - с мозжечковой атаксии, у 12 - с расстройств чувствительности, у 2-х - с нарушения высших корковых функций или атипичных симптомов, у 12 -

отмечался полисимптомный дебют [161].

В группе ВПРС у 10 пациентов заболевание протекало без обострений, у 23 — с обострениями. Частота обострений в этой подгруппе составляла от 0 до 3 в год. Число обострений в группе ВПРС составило от 1 до 30 (6[4,25;15]), длительность первой ремиссии — от 1 до 130 месяцев (24[12;48]) длительность заболевания — от 27 до 400 месяцев (175,5[99;223,5]), длительность заболевания до наступления прогрессивного течения от 19 до 372 месяцев (84[61,5;132]), балл по шкале EDSS – от 4,5 до 8,5 (6,5[5,5;7]), 16 пациентов были обследованы в фазе обострения. У 5 пациентов заболевание дебютировало с оптического неврита, у 3 – с нарушения функции других черепных нервов, у 10 - с пирамидных нарушений, у 4 - с мозжечковой атаксии, у 6 - с расстройств чувствительности, у 2-х - с нарушения высших корковых функций или атипичных симптомов, у 5 - отмечался полисимптомный дебют [161].

3.5. Клинические прогностические факторы при РС

Были проанализированы клинические признаки, связанные с развитием быстрых темпов нарастания инвалидности и доброкачественного варианта течения РС.

У пациентов с быстрыми темпами нарастания инвалидности заболевание наиболее часто дебютировало с пирамидных нарушений (37,5%) или отмечался полисимптомный дебют (37,5%), для них было характерно частое развитие обострений - от 1 до 3 за год, короткий интервал между первым и вторым обострением от 12 до 40 месяцев (19,5[13,5;31,5]).

Для развития доброкачественного течения РС был характерен дебют с ретробульбарного неврита (41,7%) или расстройств чувствительности (33,3%), длинный интервал между первым и вторым обострением от 24 до 342 месяцев (180[99;180]), редкие обострения — медиана числа обострений составляла 2 при медиане длительности заболевания 251 месяц.

3.6. Влияние липидов на секрецию цитокинов периферическими мононуклеарными клетками крови больных

Чтобы изучить влияние липидов миелина на секрецию цитокинов и хемокинов периферическими мононуклеарными клетками при РС, были сопоставлены степени увеличения их концентраций после инкубации РВМС с различными липидами у пациентов с РС и здоровых добровольцев. Чтобы оценить изменение профиля секреции цитокинов, в зависимости от клинических особенностей заболевания, пациенты с РС были разделены на группы, максимально различающиеся по течению заболевания. Участники из различных групп (доброкачественное течение, пациенты с быстрыми темпами нарастания инвалидности, РРС с высокой активностью) также были сопоставлены со здоровыми добровольцами и между собой по относительному изменению концентрации цитокинов при добавлении различных липидов.

При инкубации РВМС, полученных от пациентов всех подгрупп и здоровых добровольцев, с фосфатидилхолином, концентрации всех изученных цитокинов и хемокинов оставались практически неизменными. При инкубации РВМС с различными гликолипидами (галактоцереброзидами, сульфатидами и ганглиозидами) происходило изменение концентрации некоторых провоспалительных цитокинов и хемокинов, противовоспалительных цитокинов и факторов роста.

Гликолипиды миелина подавляли продукцию определенных провоспалительных цитокинов и хемокинов, в число которых входили IL1 α , IL-6, IL-8, IL-17A, MIP-1 α , MIP-1 β , у пациентов с РС. У здоровых добровольцев концентрация указанных молекул при инкубации РВМС с липидами несколько увеличивалась, либо оставалась неизменной. Выраженность изменений концентрации провоспалительных цитокинов и хемокинов зависела от течения заболевания: в наибольшей степени она снижалась в группе пациентов с быстрыми темпами нарастания инвалидности, чуть меньше при активном РРС, у пациентов с доброкачественным течением изменения концентрации

провоспалительных цитокинов и хемокинов либо не происходило, либо оно было меньшим, чем в других группах пациентов. Эффект липидов на секрецию цитокинов и хемокинов РВМС различался также в зависимости от класса липида. Наиболее выраженными изменения были при инкубации клеток с ганглиозидами (GM4, GM2, GD1a), среди которых наибольшим эффектом обладал GM4. Концентрации IL1ra, IL6, MIP-1 α после инкубации клеток с GM4 статистически значительно различались между группами здоровых добровольцев и пациентов с быстрыми темпами нарастания инвалидности и активным РРС течением заболевания (Рис. 4). Инкубация РВМС с GM2 приводила к статистически значимому различию концентраций IL6 в группах пациентов с быстрыми темпами нарастания инвалидности и здоровых добровольцев. Стимуляция клеток GD1a — к статистически значимому различию концентраций IL1ra, IL-17A, MIP-1 β . Галактоцереброзиды и сульфатиды оказывали незначительное влияние.

Изменение концентрации провоспалительных цитокинов и хемокинов после инкубации с липидами миелина у разных групп пациентов и здоровых добровольцев приведено в Таблице 7.

Таблица 7. Изменение концентрации цитокинов и хемокинов после инкубации клеток с липидами

	IL1ra	IL6	IL8	IL-17A	MIP-1 α	MIP-1 β
GM4						
- Здоровые добровольцы	+1,17	+1,30	+1,11	+1,29	+1,22	+1,41
- Доброкачественное течение	-1,54*	-1,06	-1,20	-1,23	-1,17	1
- быстрое нарастание инвалидности	-2,04*	-2,28*	-1,96	-1,53	-2,16*	-1,76
- активный РРС	-2,11*	-1,40	-1,70	-1,63	-1,71*	-2,06*
GM2						
- Здоровые добровольцы	1,03	1,51	1,27	1,31	1,28	1,20
- Доброкачественное течение	-1,11	1,13	-1,06	-1,06	1,06	-1,12
- быстрое нарастание инвалидности	-2,04	-1,26*	-1,27	-1,07	-1,03	-1,08
- активный РРС	-1,59	-1,13	-1,23	1,03	-1,21	-1,04
GD1a						
- Здоровые добровольцы	1,06	1	1	1,33	1,28	1,26
- Доброкачественное течение	-1,30*	1,24	1,02	-1,08	1,23	1,14
- быстрое нарастание инвалидности	-1,97*	-1,25	-1,13	-1,33*	-1,27	-1,19*
- активный РРС	-1,59*	-1,30	-1,20	-1,28*	-1,24	-1,25*
Галактоцереброзиды						
- Здоровые добровольцы	-1,14	1,19	1,07	1,17	1,32	1,08
- Доброкачественное течение	-1,58	1,11	-1,07	-1,07	1,06	1
- быстрое нарастание инвалидности	-1,67	-1,24	-1,09	-1,03	-1,05	1
- активный РРС	-1,35	-1,13	-1,17	-1,18	-1,12	-1,14
Сульфатиды						
- Здоровые добровольцы	-1,14	1,31	1,22	1,33	1,17	1,21
- Доброкачественное течение	-1,44	1,18	1	-1,05	1	1,14
- быстрое нарастание инвалидности	-1,73	-1,04	1	-1,12	-1,03	1,05
- активный РРС	-1,17	1,21	1,08	1,21	1,12	1,0

* - статистически значимое различие со здоровыми добровольцами ($p < 0,05$)

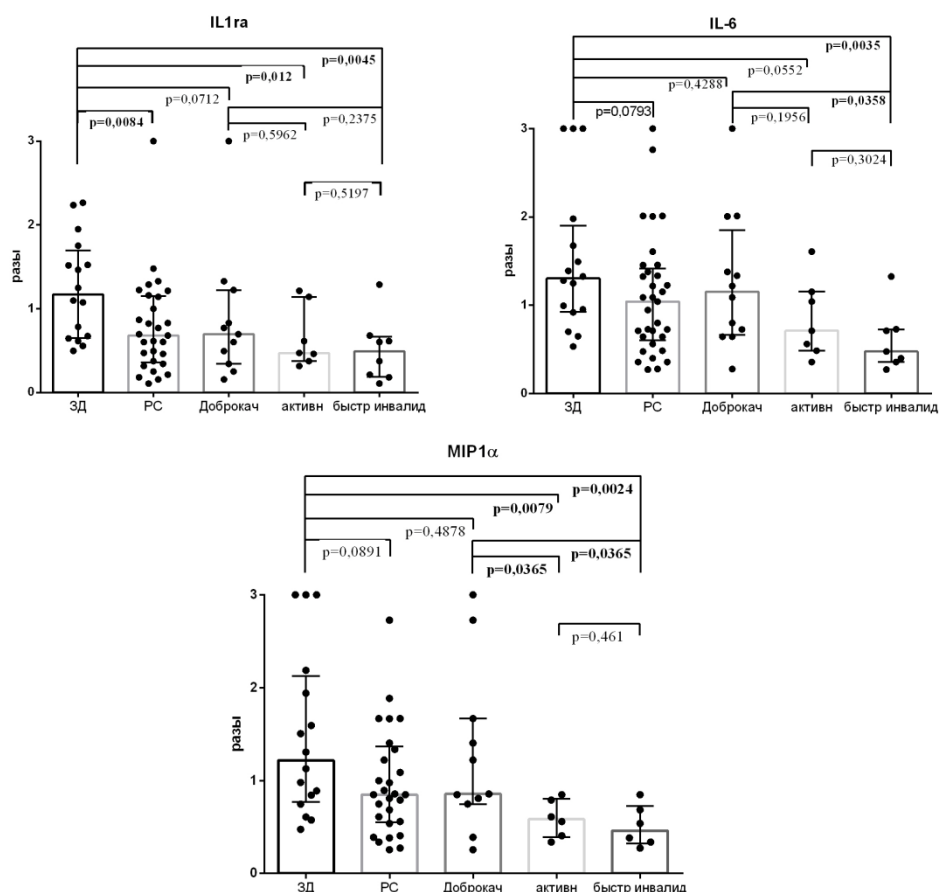


Рисунок 4. Ингибирование продукции цитокинов и хемокинов IL-6, IL1ra, MIP-1α, при инкубации РВМС с ганглиозидом GM4 у пациентов и здоровых добровольцев. ЗД — здоровые добровольцы, РС — рассеянный склероз, активн — РРС с высокой активностью, быстр инвалид — РС с быстрыми темпами нарастания инвалидности.

Различное влияние липидов на секрецию цитокинов и хемокинов при инкубации РВМС с липидами миелина можно проиллюстрировать клиническими примерами.

Клинический пример 1

Пациентка Г., 51 г.

Проходила стационарное лечение в ФГБНУ «Научный центр неврологии» в марте 2015.

Анамнез: считает себя больной с 1993 г (29 лет), когда отмечала ощущение онемения в ногах и неустойчивость при ходьбе. За медицинской помощью не

обращалась, симптоматика регрессировала самостоятельно в течение нескольких недель. В 2010 году отмечала эпизоды ощущения шума в правом ухе. За медицинской помощью не обращалась, симптоматика регрессировала самостоятельно. В 2013 году вновь появилось ощущение онемение в ногах, которое регрессировало самостоятельно в течение нескольких недель. В феврале 2015 вновь возникло онемение в ногах, которое распространилось до нижних отделов живота, затем присоединилось ощущение слабости, неловкости в ногах, в связи с чем пациентка обратилась в ФГБНУ «Научный центр неврологии».

В неврологическом статусе: Сознание ясное. Менингеальных симптомов нет. Выпадения полей зрения при ориентировочном исследовании не выявлено. Объем движений глазных яблок полный. Чувствительность на лице сохранена. При выполнении мимических проб слегка отстают левый угол рта. Нистагма нет. Глотание, фонация не нарушены. Язык по средней линии. Центральный левосторонний гемипарез с легким снижением мышечной силы в левой руке и легким снижением мышечной силы в сгибателях левого бедра. Мышечный тонус не изменен. Сухожильные и периостальные рефлексy с акцентом слева. Патологических стопных знаков нет. Координаторные пробы выполняет удовлетворительно. В позе Ромберга пошатывается. Расстройств чувствительности не выявлено. Функции тазовых органов контролирует.

EDSS: Функция зрения — 0, Стволовые функции — 1, пирамидная система — 2, мозжечковые функции — 1, чувствительность — 0, тазовые функции — 0, функции мышления — 0. Дистанция ходьбы не ограничена. EDSS 2,0.

Лабораторные и инструментальные методы исследования

общий анализ крови, общий анализ мочи, биохимический анализ крови — без патологии.

Общий анализ ЦСЖ: цитоз 7/3, белок — 0,255 г/л, глюкоза — 3,6 ммоль/л. Иммунохимическое исследование ЦСЖ: выявлен интенсивный интратекальный синтез олигоклональных IgG.

МРТ: В белом веществе полушарий большого мозга (преимущественно

перивентрикулярно), стволе головного мозга, в области левой средней ножки мозжечка, выявлены очаги повышенной интенсивности МР-сигнала в режимах T2 и FLAIR, а также в веществе спинного мозга на уровнях Th1, Th4, Th7 позвонков. Отмечено накопление контрастного вещества одним из очагов в веществе головного мозга, расположенном перивентрикулярно.

Зрительные вызванные потенциалы: Выявлено увеличение латентности пика P100 с 2 сторон.

Диагноз: Рассеянный склероз, ремиттирующее течение, обострение.

Пациентке проведена пульс-терапия метилпреднизолоном в суммарной дозе 5г с положительным эффектом в виде увеличения мышечной силы. В течение года после выписки из стационара пациентка не начала прием препаратов, изменяющих течение РС. Несмотря на это состояние пациентки продолжает оставаться стабильным.

У пациентки с доброкачественным течением РС при инкубации РВМС с гликолипидами миелина отмечено небольшое снижение концентрации провоспалительных цитокинов и хемокинов, которое было наиболее выраженным при взаимодействии клеток с ганглиозидом GM4 (максимально в 2,56 раз). Снижение секреции цитокинов при воздействии на РВМС ганглиозида GM4 у пациентки было менее выраженным, чем у пациентов со быстрыми темпами нарастания инвалидности и высокой активностью заболевания (см. Таблица 8 и Рисунок 7).

Клинический пример 2.

Пациентка П., 25 лет. Проходила стационарное лечение в ФГБНУ Научный центр неврологии в мае 2015.

Анамнез: Заболела в июне 2010, когда через несколько дней после разрешения симптомов пищевого отравления (повышение температуры тела, боли в мышцах, тошнота, рвота, нарушение стула) появилось онемение в области живота, которое затем распространилось на правую сторону туловища, правую руку и ноги. При МРТ выявлен очаг измененного сигнала в спинном мозге. Через две недели после

появления онемение самостоятельно регрессировало. До декабря 2011 года состояние оставалось стабильным, за медицинской помощью не обращалась, лечение не получала. В конце декабря 2011 года появилась слабость в правой стопе (стала подворачиваться при ходьбе) и шаткость при ходьбе. Проводилась нейрометаболическая терапия без существенного эффекта. При МРТ головного мозга (2011) выявлены очаги в белом веществе головного мозга. В октябре 2012 – ухудшение состояния в виде нарастания координаторных нарушений и слабости в левой ноге (EDSS 3 б). Проводилась пульс-терапия солу-медролом (5г) с положительным эффектом в виде уменьшения указанной симптоматики. С мая 2013 получала бетаферон. С осени 2013 отметила снижение зрения и нарушение координации в левой руке, проводилась нейрометаболическая терапия без существенного эффекта. В связи с ухудшением состояния была вынуждена оставить трудовую деятельность, передвигалась без опоры, дистанция ходьбы ограничена не была, но отмечала шаткость при ходьбе. С конца декабря 2013 принимала копаксон. С февраля 2014 отметила резкое нарастание координаторных нарушений, стала передвигаться с двусторонней опорой. В апреле 2014 проходила лечение в ФГБНУ НЦН. Проведено 3 сеанса плазмафереза (суммарно удалено 5,2 л плазмы) + метилпреднизолон 3г с небольшим положительным эффектом в виде нарастания силы в ногах и уменьшения координаторных нарушений. С лета 2014 отмечает постоянное постепенное ухудшение состояния в виде нарастания координаторных нарушений. Очередное резкое ухудшение состояния весной 2015 г. – в виде усугубления атаксии: не может самостоятельно стоять и сидеть, из-за нарушения координации в руках не может самостоятельно есть и выполнять гигиенические процедуры.

В неврологическом статусе: Сознание ясное. Снижена критика к своему состоянию. Менингеальных симптомов нет. Зрение снижено на оба глаза. Объем движений глазных яблок полный. Чувствительность на лице сохранена. Слегка сглажена правая носогубная складка. Крупноамплитудный нистагм в срединном положении глазных яблок, усиливающийся при взгляде в стороны и вверх.

Глотание не нарушено. Речь скандированная. Язык слегка девирует вправо. Оценка мышечной силы затруднена в связи с координаторными нарушениями. Центральный тетрапарез с легким снижением мышечной силы в руках и ногах. Сухожильные и периостальные рефлексы оживлены, без четкой разницы сторон. Рефлекс Бабинского с 2-х сторон. Тремор головы и туловища. Выполнение пальце-носовой пробы невозможно в связи с нарушением координации, при выполнении пяточно-коленной пробы — грубая дискоординация с 2-х сторон. Не может сидеть и стоять без поддержки. Ходьба невозможна. Легкое снижение болевой чувствительности до уровня Th8 с двух сторон, умеренное снижение вибрационной чувствительности на уровне стоп. Задержки мочеиспускания.

EDSS: Функция зрения — 3, Стволовые функции — 3, пирамидная система — 3, мозжечковые функции — 5, чувствительность — 3, тазовые функции — 2, функции мышления — 2. Ходьба невозможна, требуется помощь при пересаживании на инвалидное кресло, не может самостоятельно есть и выполнять гигиенические процедуры, но активна большую часть дня. EDSS 8,5.

Данные лабораторных и инструментальных методов исследования

Общий анализ крови, общий анализ мочи, биохимический анализ крови — без патологии. Анализ ЦСЖ не проводился в связи с отсутствием сомнений в диагнозе. МРТ: Определяются множественные сливные очаги в полушариях большого мозга, мозжечка, стволе головного мозга, гиперинтенсивные в T2 и FLAIR, некоторые пониженной интенсивности в режиме T1. Также выявлены множественные сливные очаги в шейном и грудном отделах спинного мозга. Часть очагов в веществе головного мозга накапливают контрастное вещество (Рис.5).

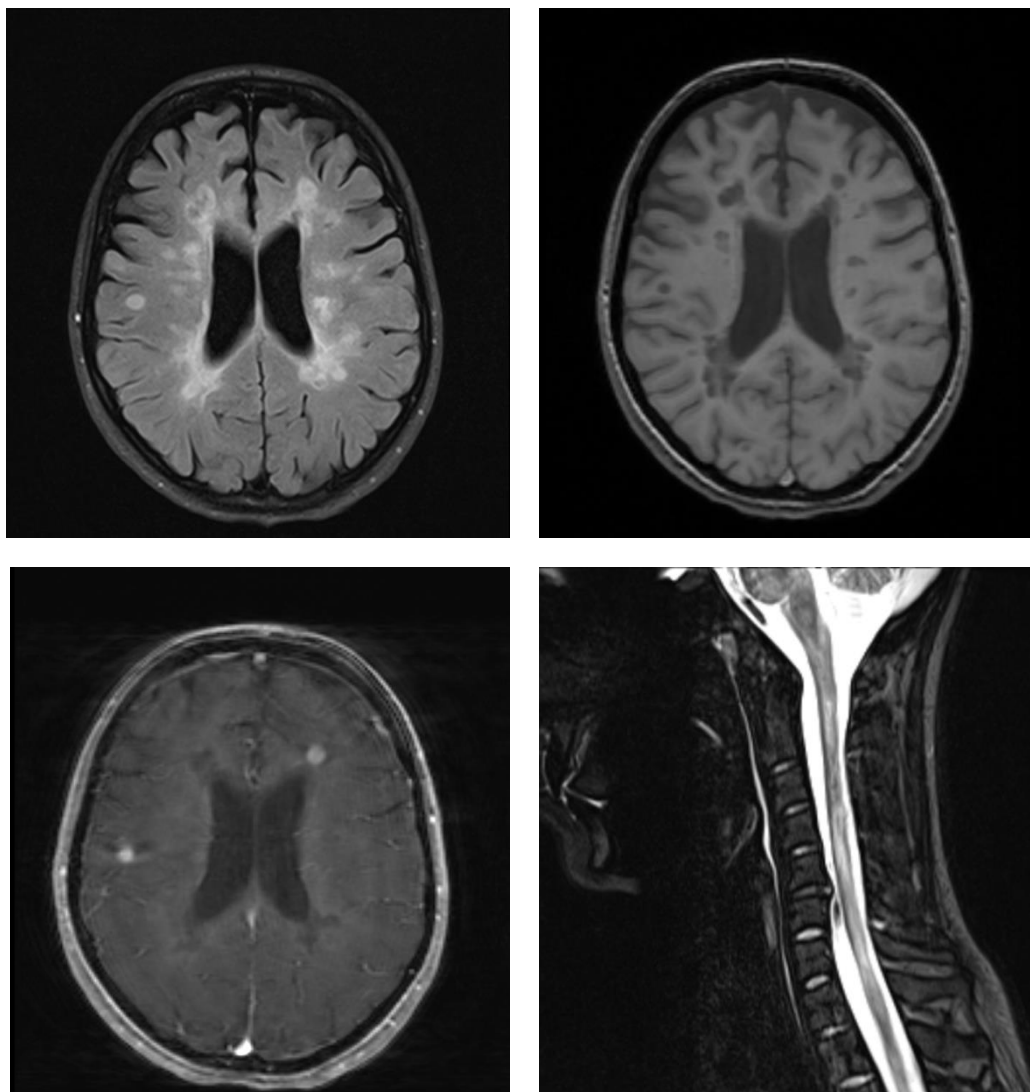


Рисунок 5. МРТ головного мозга и шейного отдела спинного мозга пациентки П., 25 лет

Диагноз: Рассеянный склероз, вторично-прогрессирующее течение, обострение.

Была предложена терапия цитостатиками (митоксантрон), от которой пациентка отказалась. Проведена пульс-терапия солу-медролом в суммарной дозе 5г без существенного эффекта.

У пациентки с быстрыми темпами нарастания инвалидности при инкубации РВМС с гликолипидами миеллина отмечено снижение концентрации провоспалительных цитокинов и хемокинов, которое было наиболее выраженным при взаимодействии клеток с ганглиозидами GM4 (максимально в 5,55 раз) и GM2 (максимально в 3,33 раза) (см. Таблица 8 и Рисунок 8). Изменение концентраций цитокинов и хемокинов при воздействии галактоцереброзидов и

сульфатидов было незначительным.

Клинический пример 3

Пациент У., 28 лет. Находился на стационарном лечении в ФГБНУ НЦН в июле 2015.

Анамнез: Болен с декабря 2014 года, когда после ОРЗ отметил выпадение правых полей зрения и ограничение движений правого глаза кнаружи. Обратился к неврологу. При МРТ головного мозга выявлены множественные очаги в полушариях большого мозга, 1 из которых накапливал контрастное вещество. Проведена пульс-терапия метипредом в суммарной дозе 5г с положительным эффектом виде улучшения зрения и регресса глазодвигательных нарушений. В дальнейшем состояние оставалось стабильным до апреля 2015, когда появилось двоение при взгляде вправо, при контрольной МРТ головного мозга (апрель 2015) отмечено накопление контрастного вещества 7 очагами в полушариях большого мозга. При МРТ шейного отдела спинного мозга определялись очаги на уровне С2, С2-С4, С7, не накапливающие контрастное вещество. Лечение не проводилось, симптоматика регрессировала. Ухудшение состояния в июне 2015, когда появилась асимметрия лица. При МРТ головного мозга определяется увеличение числа очагов и накопление контрастного вещества частью очагов (Рис.6).

Неврологический статус: Сознание ясное. Менингеальных знаков нет. Поля зрения не изменены. Глазные щели D>S, зрачки равные. Движения глазных яблок в полном объеме. Чувствительность на лице сохранена, точки выхода ветвей тройничного нерва безболезненны. При выполнении мимических проб отстают левый угол рта, несколько снижена сила в круговой мышце глаза слева. Нистагма нет. Глотание, фонация не нарушены. Повороты головы, пожимание плечами в полном объеме. Язык по средней линии. Центральный гемипарез с легким снижением мышечной силы в левой руке и ноге. Мышечный тонус не изменен. Сухожильные и периостальные рефлексы живые, с акцентом слева. Рефлекс Бабинского с 2-х сторон. Походка не изменена. Координаторные пробы

выполняет удовлетворительно. В пробе Ромберга пошатывается.

Чувствительность не нарушена. Функции тазовых органов не нарушены.

EDSS: Функция зрения — 0, Стволовые функции — 2, пирамидная система — 2, мозжечковые функции — 1, чувствительность — 0, тазовые функции — 0, функции мышления — 0. Дистанция ходьбы не ограничена. EDSS 2,5.

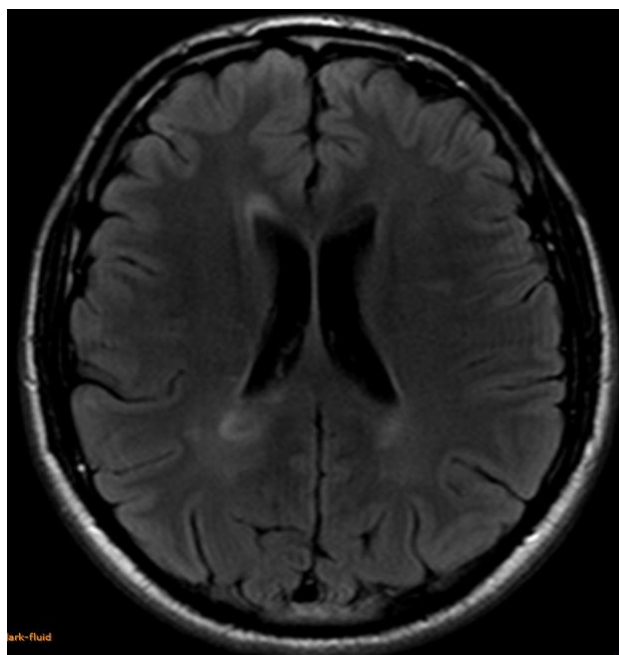
Данные лабораторных методов исследования

общий анализ крови, общий анализ мочи, биохимический анализ крови — без патологии.

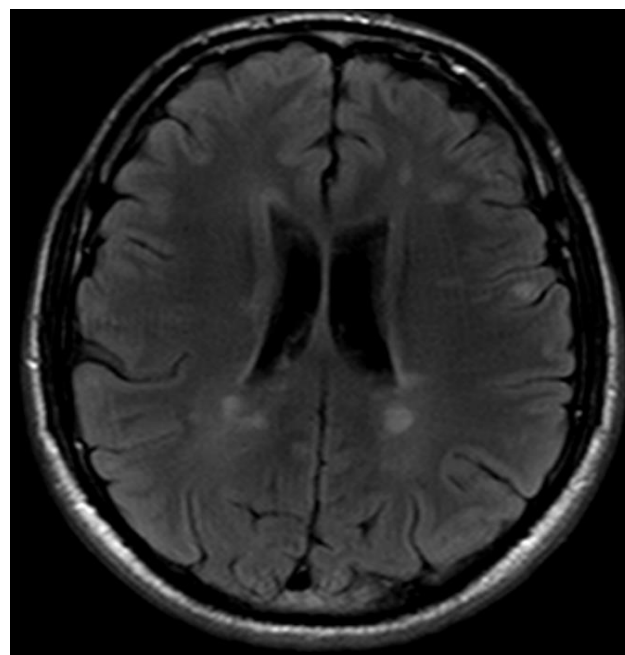
Общий анализ ЦСЖ: цитоз 2/3, белок — 0,240 г/л, глюкоза — 3,2 ммоль/л.

Иммунохимическое исследование ЦСЖ: олигоклональных IgG не выявлено.

Диагноз: Рассеянный склероз, ремиттирующее течение, обострение.



Декабрь 2014



Июнь 2015

Рисунок 6. МРТ головного мозга пациента У., 28 лет

Проведена пульс-терапия солу-медролом в суммарной дозе 5 г с положительным эффектом в виде уменьшения выраженности асимметрии лица и увеличения мышечной силы.

У пациента с активным РРС при инкубации РВМС с гликолипидами миелина отмечено снижение концентрации провоспалительных цитокинов и хемокинов, которое было наиболее выраженным при взаимодействии клеток с ганглиозидами

GM4 (максимально в 4,54 раз). При инкубации с другими липидами снижение концентраций было умеренным. Снижение секреции цитокинов при воздействии на РВМС ганглиозидов GM4 и GM2 у пациента с доброкачественным течением было менее выраженным, чем у пациентов с - быстрым нарастанием инвалидности. (см. Таблица 8 и Рисунок 7).

Таблица 8. Снижение концентрации цитокинов и хемокинов у пациентов с различным течением заболевания (клинические примеры)

	IL1ra	IL6	IL8	IL-17A	MIP-1 α	MIP-1 β
GM4						
- Доброкачественное течение (Пример 1)	-2,9	-1,56	-1,39	-1,89	-2,56	-2,04
- быстрое нарастание инвалидности (Пример 2)	-2,6	-2,78	-2,6	-5,55	-2,94	-3,7
- активный РРС (Пример 3)	-3,1	-2,08	-1,85	-4,54	-2,44	-2,5
GM2						
- Доброкачественное течение (Пример 1)	-2,22	-1,19	-1,27	-1,89	-2,04	-1,75
- быстрое нарастание инвалидности (Пример 2)	-2,5	-2,4	-2,43	-3,23	-3,33	-3
- активный РРС (Пример 3)	-1,64	-1,14	-1,78	-1,75	-1,22	-1,89
GD1a						
- Доброкачественное течение (Пример 1)	-1,09	-1,03	-1,12	-1,20	-1,51	1,16
- быстрое нарастание инвалидности (Пример 2)	-1,4	-1,13	-1,4	-1,45	-1,79	-1,58
- активный РРС (Пример 3)	-1,39	-1,22	1,04	1,07	-1,02	-1,49
Галактоцереброзиды						
- Доброкачественное течение (Пример 1)	-1,64	-1,10	-1,11	-1,27	-1,26	-1,02
- быстрое нарастание инвалидности (Пример 2)	-1,35	-1,22	-1,19	-1,61	-1,64	-1,4
- активный РРС (Пример 3)	-1,19	-1,54	1,15	-1,19	-1,20	1,05
Сульфатиды						
- Доброкачественное течение (Пример 1)	-1,49	1,21	1,06	1,07	1,33	1,14
- быстрое нарастание инвалидности (Пример 2)	-1,27	-1,2	-1,33	-1,33	-1,49	1,39
- активный РРС (Пример 3)	-1,17	-1,4	-1,33	-1,59	-1,17	-1,67

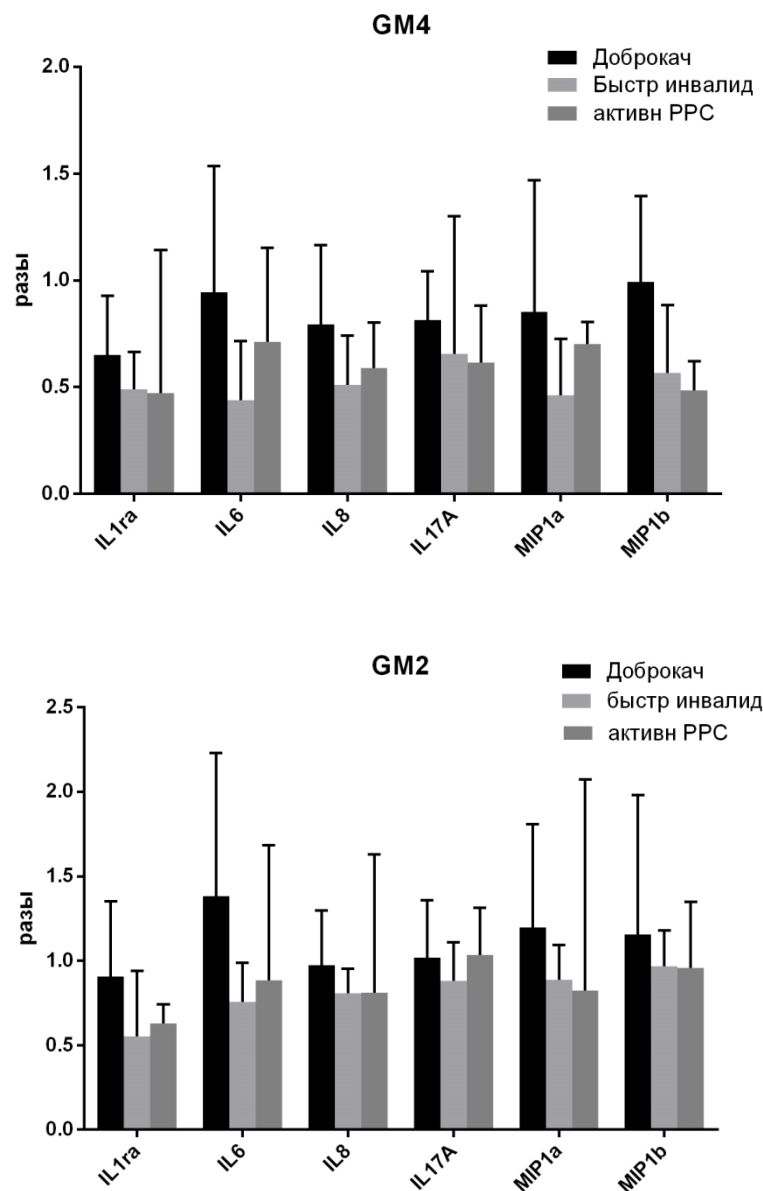


Рисунок 7. Изменение концентрации провоспалительных цитокинов и хемокинов при воздействии ганглиозидов GM4 и GM2 у пациентов с различным течением РС.

Как у пациентов, так и у здоровых добровольцев было выявлено снижение концентрации факторов PDGF, G-CSF и VEGF, цитокина IL-10 и хемокинов MCP-1 и RANTES при инкубации PBMC с различными липидами миеллина. Наиболее выраженным было снижение продукции IL-10 и MCP-1 (максимально в 5,56 и 4,01 раз, соответственно), чуть в меньшей степени уменьшались концентрации G-CSF и PDGF (максимально в 2,58 и 2,27 раз, соответственно). Изменение концентраций было примерно одинаковым при инкубации клеток с различными

классами липидов, за исключением фосфатидилхолина, при стимуляции клеток которым изменения концентрации IL-10 и MCP-1 не происходило. Концентрация G-CSF и PDGF в наибольшей степени уменьшалась под воздействием ганглиозидов (GM, GM2, GD1a). Ингибирование секреции RANTES происходило только при стимуляции клеток ганглиозидами GM4 и GM2 (максимально в 2,02 и 1,73 раз, соответственно), при инкубации PBMC с другими липидами концентрация этого хемокина практически не менялась. Концентрации IL-10, MCP-1, G-CSF, PDGF и RANTES снижались как у здоровых добровольцев, так и у пациентов. Концентрация VEGF оставалась практически неизменной при воздействии липидов на PBMC здоровых добровольцев, у пациентов ее наиболее выраженное снижение было отмечено при инкубации клеток с ганглиозидами, особенно GM4 (максимально в 2,26 раз). У пациентов с РС снижение концентраций всех перечисленных цитокинов, хемокинов и факторов роста было большим, чем у здоровых добровольцев, однако различие достигло статистической значимости только для IL-10 при инкубации с GD1a. Между группами пациентов с различным течением РС существенных различий по степени уменьшения концентраций цитокинов, хемокинов и факторов роста не выявлено. Подробная характеристика изменений концентраций IL-10, MCP-1, G-CSF, PDGF, VEGF и RANTES при стимуляции PBMC пациентов с РС и здоровых добровольцев различными липидами миелина приведена в Таблице 9.

Таблица 9. Снижение концентрации факторов роста, цитокинов и хемокинов при стимуляции липидами миелина.

	IL-10	G-CSF	PDGF	MCP-1	RANTES	VEGF
GM4						
- Здоровые добровольцы	-1,27	-1,11	-1,68	-1,72	-1,26	1
- Доброкачественное течение	-4,81	-2,57	-1,97	-4,47	-1,54	-2,26
- быстрое нарастание инвалидности	-4,05	-1,84	-2,03	-3,07	-1,86	-2,26
- активный РРС	-2,67	-1,9	-2,27	-2,33	-2,02	-2,22
GM2						
- Здоровые добровольцы	-2,09	-1,15	-1,52	-2,66	-1,26	-1,09
- Доброкачественное течение	-2,49	-1,45	-1,55	-3,88	-1,25	-1,31
- быстрое нарастание инвалидности	-5,56	-2,58	-2,14	-3,14	-1,22	-2,08
- активный РРС	-2,25	-1,68	-1,88	-1,41	-1,73	-1,81
GD1a						
- Здоровые добровольцы	-1,07	-1,25	-1,59	-2,53	-1,08	-1,02
- Доброкачественное течение	-3,16*	-1,90	-1,5	-3,55	1	-1,24
- быстрое нарастание инвалидности	-4,23*	-2,35	-1,66	-3,72	-1,06	-1,66
- активный РРС	-3,27*	-2,26	-1,93	-2,88	-1,11	-1,98
Галактоцереброзиды						
- Здоровые добровольцы	-2,46	-1,14	-1,52	-2,90	-1,16	-1,13
- Доброкачественное течение	-3,23	-1,60	-1,70	-3,14	-1,01	-1,43
- быстрое нарастание инвалидности	-3,97	-1,49	-1,82	-2,98	-1,06	-1,73
- активный РРС	-2,32	-1,58	-1,69	-2,67	-1,12	-1,77
Сульфатиды						
- Здоровые добровольцы	-2,02	-1,28	-1,47	-2,63	-1,18	-1,14
- Доброкачественное течение	-2,91	-1,57	-1,66	-3,22	1	-1,43
- быстрое нарастание инвалидности	-3,52	-1,88	-1,71	-4,01	1,09	-1,57
- активный РРС	-1,76	-1,23	-1,58	-3,55	1,03	-1,35

* - статистически значимое различие с группой здоровых добровольцев ($p < 0,05$)

3.7. Профили цитокинов в цереброспинальной жидкости

Чтобы ответить на вопрос, есть ли связь между профилем секреции цитокинов в ответ на стимуляцию липидами миелина клеточных культур и РВМС, и профилем цитокинов и хемокинов в ЦСЖ у пациентов с РС, в ЦСЖ у пациентов было проведено исследование тех же цитокинов и хемокинов, которые исследовались в среде из-под РВМС после инкубации с различными липидами миелина. Концентрации цитокинов и хемокинов в ЦСЖ у пациентов с РС были сопоставлены с данными, полученными у контрольной группы, представленной пациентами с другими заболеваниями нервной системы.

Концентрации всех исследованных цитокинов и хемокинов, кроме IP-10 (интерферон-гамма индуцируемый белок 10) и MCP-1 (моноцитарный хемотаксический фактор 1), были низкими. Концентрация IP-10 составила 11,8[7; 16,4] пг/мл у пациентов с РС и 7,5[7; 9,2] мкг/мл в группе сравнения ($p=0,0272$). Медиана уровня MCP-1 в группе пациентов с РС была равен 1,9[1,3; 2,7] пг/мл, в группе сравнения — 6[3,8; 7,3] пг/мл ($p=0,033$) (Рис. 8). В подгруппе пациентов с более высокой активностью заболевания концентрации IP-10 и MCP-1 существенно не отличались от концентраций, выявленных у остальных пациентов: уровень IP-10 составил 12,1[8,9; 17,9] мкг/мл, уровень MCP-1 — 2,05[0,98; 3,53] пг/мл. При этом среди пациентов с высокой концентрацией IP-10 ($>17,9$ пг/мл) в ЦСЖ чаще встречались пациенты с более высокой активностью заболевания (7/12), среди пациентов с низкой концентрацией MCP-1 ($<1,3$ пг/мл) в ЦСЖ преобладания пациентов с более высокой активностью заболевания не отмечалось (3/12).

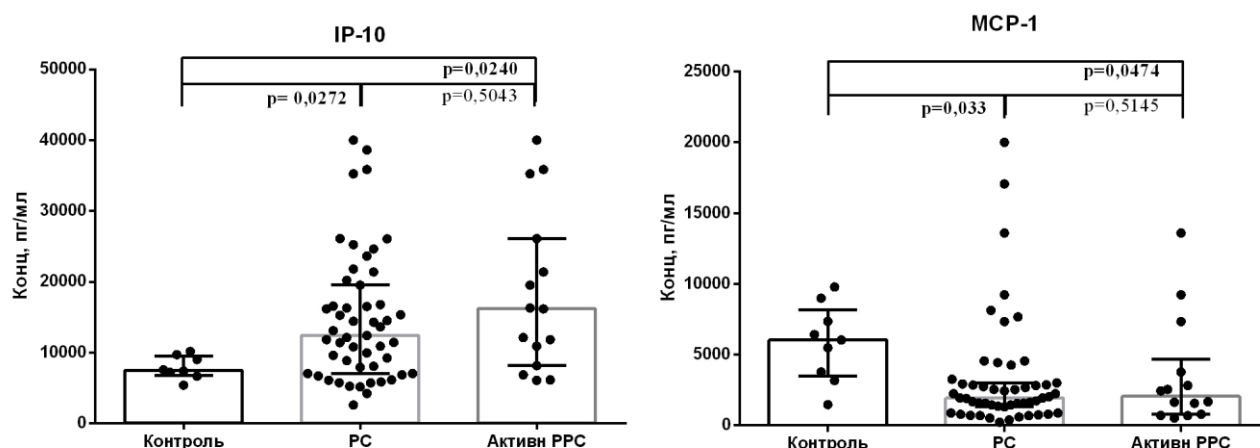


Рисунок 8. Концентрации IP-10 и MCP-1 в ЦСЖ у пациентов с РС и пациентов с другими неврологическими заболеваниями Конц — концентрация

3.8. Антитела к липидам миелина в биологических жидкостях

При анализе сыворотки крови и ЦСЖ на наличие антител к различным липидам миелина антитела к липидам определялись у 42,3% пациентов с РС (38,1% РРС и 51,4% ВПРС) и у 42,8% здоровых добровольцев. При этом антитела класса IgM были выявлены у 30,6% пациентов с РС (27,6% РРС и 37,1% ВПРС) и у 30,6% здоровых добровольцев, антитела класса IgG - у 26,1% пациентов с РС (23,7% РРС, 31,4% ВПРС) и у 22,4% здоровых добровольцев. Статистически значимых различий между группами не выявлено. В ЦСЖ антитела к липидам выявлялись лишь в редких случаях (Таблица 10). Зависимости между обнаружением антител к липидам в сыворотке и ЦСЖ выявлено не было.

Таблица 10. Выявление антител к липидам миелина в биологических жидкостях у пациентов с РС и здоровых добровольцев [161].

Липид	Антитела в сыворотке						Антитела в ЦСЖ		
	Пациенты (n=111)			Здоровые добровольцы (n=49)			Пациенты (n=35)		
	IgM	IgG	Всего	IgM	IgG	Всего	IgM	IgG	Всего
GM1	8	5	11	2	0	2	0	0	0
GM2	6	1	7	4	0	4	0	0	0
GM3	3	2	5	1	0	1	1	0	1
GM4	6	1	7	1	1	2	0	0	0
GD1a	1	2	3	0	1	1	1	0	1

GD1b	1	2	3	1	0	1	0	0	0
GD2	1	2	3	1	0	1	0	0	0
GD3	0	0	0	2	0	2	1	2	3
GT1a	0	2	2	2	1	3	0	0	0
GT1b	0	1	1	2	0	2	0	0	0
GQ1b	1	1	2	2	0	2	0	0	0
Сульфатид	25	26	37	7	9	13	0	0	0

Среди антител к липидам наиболее часто обнаруживались антитела к сульфатидам, к GM1 у пациентов с ВПРС и к GM4 у пациентов с РРС, в связи с чем была проанализирована связь выявления этих антител с наличием и формой заболевания, а также с клиническими и демографическими характеристиками.

Антитела к сульфатиду выявлялись в сыворотке у 33,3% пациентов с РС (30,3% РРС, 40% ВПРС) и у 26,5% здоровых добровольцев (Рис. 9). Антитела класса IgM были выявлены у 22,5% пациентов с РС (21% РРС, 25,7% ВПРС) и у 14,3% здоровых добровольцев, антитела класса IgG у 23,4% пациентов с РС (21% РРС, 28,6% ВПРС) и у 18,4% здоровых добровольцев. Статистически значимых различий между частотой выявления антител к сульфатиду классов IgM, IgG и общей частотой выявления антител к сульфатиду выявлено не было.

Антитела к GM1 выявлены у 21,2% пациентов с ВПРС, у 5,3% пациентов с РРС и 4,1% здоровых добровольцев (Рис. 9). Антитела класса IgM были выявлены у 18,2% пациентов с ВПРС, у 2,6% пациентов с РРС и 4,1% здоровых добровольцев, антитела класса IgG у 9,1% пациентов с ВПРС, у 2,6% пациентов с РРС и ни в одном случае не выявлялись у здоровых добровольцев. Результаты определения антител к GM1 в сыворотке крови у пациентов с РС и здоровых добровольцев представлены на Рис. 9. Различия между частотой серопозитивности по GM1 были статистически значимыми при сравнении групп ВПРС и РРС ($p=0,004$), ВПРС и здоровых добровольцев ($p=0,03$). Также значимое различие было отмечено при сравнении частоты серопозитивности по IgM к GM1 в группах ВПРС и РРС ($p=0,01$), ВПРС и здоровых добровольцев ($p=0,04$).

Антитела к GM4 выявлены 6,3% пациентов с РС (7,9% РРС, у 3% ВПРС) и

4,1% здоровых добровольцев (Рис. 9). Антитела класса IgM были выявлены у 6,6% пациентов с РРС, у 3% пациентов с ВПРС и 2% здоровых добровольцев, антитела класса IgG у 1,3% пациентов с РРС и 2% здоровых добровольцев. В этом случае имеется тенденция к более высокой частоте выявления антител GM4 класса IgM у пациентов с РРС, однако статистически значимых различий между группами не выявлено [161].

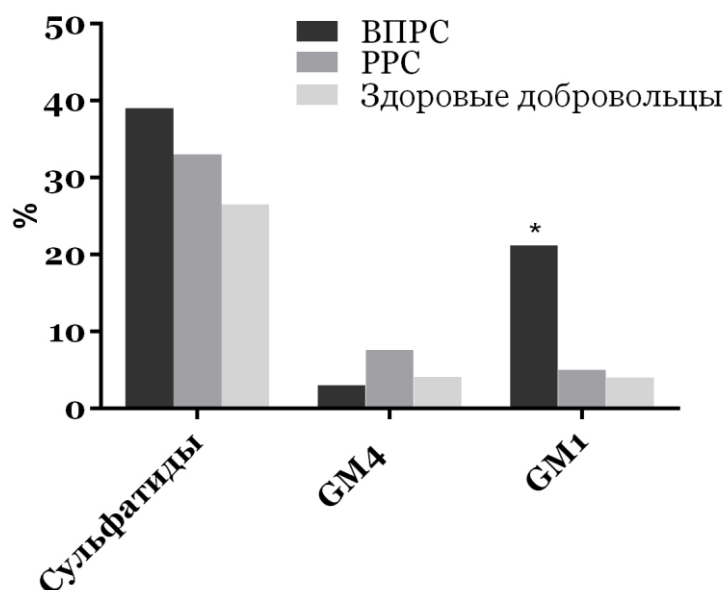


Рисунок 9. Частота выявления антител к гликолипидам в целом, сульфатиду и GM1 (IgM+IgG) у пациентов с рассеянным склерозом и здоровых добровольцев. ВПРС — пациенты с вторично-прогредиентным течением рассеянного склероза, РРС — пациенты с ремиттирующим течением рассеянного склероза, ЗД — здоровые добровольцы; * $p < 0,05$.

При анализе корреляций между наличием в сыворотке крови антител к гликолипидам в целом, сульфатиду и GM4, полом и возрастом, частотой и числом обострений, длительностью заболевания, длительностью первой ремиссии, симптоматикой в дебюте заболевания, фазой заболевания (обострение/ремиссия) взаимосвязей ни в одной из изученных групп выявлено не было. Убедительных взаимосвязей этого показателя с другими клиническими характеристиками выявлено не было.

Глава 4. Обсуждение результатов

Одной из наиболее важных задач у пациента с РС является прогнозирование течения заболевания. РС характеризуется высокой гетерогенностью: течение может варьировать от доброкачественного, при котором в течение десятилетий при отсутствии лечения у пациента отмечается минимальный неврологический дефицит до злокачественного, при котором в течение нескольких месяцев пациент уже значительно ограничен в передвижении и имеет выраженный стойкий неврологический дефицит. Своевременное прогнозирование течения заболевания является основой рационального подбора терапии и снижения темпов развития инвалидности.

Иммунологические механизмы, лежащие в основе формирования различных вариантов течения РС, до сих пор не изучены, однако в настоящее время охарактеризованы некоторые клинические и рентгенологические прогностические факторы развития доброкачественного течения и быстрого нарастания инвалидности при РС [43; 93; 127].

В нашем исследовании был проведен анализ клинических прогностических факторов развития доброкачественного течения и быстрого нарастания инвалидности при РС. Работа проведена на выборке пациентов с РС численностью 136 человек, среди которых было 102 пациента с ремиттирующим течением заболевания и 34 - с вторично-прогредиентным течением.

Показано, что наиболее важными клиническими прогностическими признаками быстрого нарастания инвалидности заболевания являются дебют с пирамидных нарушений или полисимптомный дебют, частое развитие

обострений, короткий интервал между первым и вторым обострением (19,5 месяцев). Прогностическими признаками доброкачественного течения РС являются дебют с оптического неврита или расстройств чувствительности, длинный интервал между первым и вторым обострением (180 месяцев), редкие обострения.

Наши данные согласуются результатами, полученными другими исследователями на других популяциях пациентов. Прогностическими факторами для развития доброкачественного течения РС, по данным нескольких научных групп, являются более длительный период между первым и вторым обострением, EDSS ≤ 2 через 5 лет после дебюта заболевания, низкая частота обострений в первые 5 лет заболевания, дебют заболевания с оптического неврита и расстройств чувствительности. Дополнительно было показано, что для доброкачественного течения более характерен молодой возраст дебюта заболевания и женский пол. По данным МРТ, у пациентов с доброкачественным течением РС отмечалось меньшее количество кортикальных очагов, по сравнению с пациентами с обычным ремиттирующим течением РС [37], меньшая выраженность повреждения спинного мозга, по сравнению с пациентами с вторично-прогрессирующим течением РС [26].

В качестве прогностических признаков быстрого нарастания инвалидности при РС дополнительно к выявленным нами критериям были показаны более поздний возраст начала заболевания, мужской пол, курение, дебют заболевания с двигательных нарушений, прогрессирующее течение заболевания с дебюта заболевания [63].

Однако несмотря на длительное изучение связи различных клинических критериев заболевания, ни один из них, ни даже совокупность, не позволяют прогнозировать течение заболевания у пациента достаточно точно, чтобы это могло каким-то образом повлиять на тактику ведения, выбор терапии. Поэтому помимо клинических критериев ведется поиск иммунологических биомаркеров.

В нашем исследовании было охарактеризовано значение иммунных реакций

с участием липидов миелина в развитии рассеянного склероза. Доказана способность липидов миелина стимулировать воспалительные и иммунные реакции, опосредованные компонентами врожденного иммунитета и гуморального звена приобретенного иммунитета. Проведено изучение механизмов реакций врожденного иммунитета с участием различных классов липидов миелина, среди которых фосфолипиды, галактоцереброзиды, сульфатиды, церамиды, производные холестерина. Оценена связь реакций врожденного и гуморального звена приобретенного иммунитета с особенностями течения заболевания, в том числе с развитием быстрых темпов нарастания инвалидности при РС или доброкачественного варианта течения заболевания.

В ходе экспериментов на клеточных линиях было показано, что липиды миелина могут стимулировать увеличение активности транскрипционных факторов, участвующих в развитии воспалительных реакций. Было изучено влияние липидов миелина на 3 основных фактора: NF κ B, AP-1 и NFAT. Липиды миелина вызывали увеличение активности AP-1 и NFAT и в минимальной степени влияют на активность фактора NF κ B. Липиды миелина по-разному влияют на активность транскрипционных факторов AP-1 и NFAT. Наиболее выраженное повышение активности при стимуляции липидами миелина отмечено у AP-1.

В зависимости от структуры липидов, различалась их способность активировать различные факторы транскрипции. Наименее активным липидом является фосфолипид фосфатидилхолин, который практически не вызывал увеличения активности изученных транскрипционных факторов, наибольший эффект наблюдался при стимуляции клеток ганглиозидами и лактозилцерамидами.

Сигнальные каскады транскрипционных факторов имеют ключевое значение для продукции цитокинов и хемокинов и регуляции иммунного ответа и воспалительных реакций. По данным литературы, транскрипционные факторы NF κ B, AP-1 и NFAT принимают участие в иммунопатогенезе РС и ЭАЭ.

Известно, что при комбинированной недостаточности NFAT1 и NFAT2 или различных субъединиц NFκB у мышей не удается индуцировать развитие ЭАЭ. Изолированная недостаточность NFAT1 или NFAT2 значительно уменьшает тяжесть течения ЭАЭ.

Эффект транскрипционных факторов на развитие аутоиммунных реакций при РС и ЭАЭ реализуется путем влияния на экспрессию важнейших цитокинов, хемокинов и факторов роста, участвующих в иммунопатогенезе заболевания. NFκB, AP-1 и NFAT регулируют экспрессию ключевых цитокинов и хемокинов, задействованных в патогенезе РС и ЭАЭ, таких как IL-17A, IL-6, MCP-1 и др. Все изученные липиды вызывали увеличение секреции цитокинов и хемокинов IL1α, IL6, G-CSF и RANTES в клеточных линиях RAW-Blue.

Роль этих цитокинов, хемокинов и факторов роста в развитии патологического процесса при РС ранее была изучена в нескольких исследованиях. G-CSF рассматривался в качестве потенциального препарата для лечения РС в связи со способностью вызывать мобилизацию прогениторных стволовых клеток в периферический кровоток. Однако применение G-CSF у пациентов с РС приводило к значительному ухудшению состояния пациентов [29]. Это связано с гиперстимуляцией адгезии аутореактивных Т-клеток к компонентам внеклеточного матрикса гемато-энцефалического барьера и, соответственно, повышением миграции этих клеток в ЦНС [139]. Уровни RANTES значительно повышены в вирусной животной модели РС — при энцефаломиелите мышей, вызванном вирусом Тейлора (TMEV) [120]. Известно, что полиморфизмы в промоторной области гена RANTES чаще встречаются у пациентов с РС, чем в остальной популяции [59]. IL-6 участвует в регуляции баланса между ключевыми компонентами патогенеза РС – лимфоцитами Th17 и Т-регуляторным клетками, индуцируя развитие лимфоцитов Th17 и ингибируя дифференцировку Т-регуляторных клеток. [89]. Введение мышам IL1α приводит к ухудшению течения ЭАЭ [78].

Определены рецепторы врожденного иммунитета, при воздействии на

которые липиды миелина вызывали повышение активности транскрипционного фактора AP-1. Ими оказались C-лектиновые рецепторы. Среди исследованных рецепторов наибольший эффект липиды миелина, в первую очередь ганглиозиды, оказывали на Mincle, менее выраженным было воздействие липидов миелина на Clec6.

C-лектиновые рецепторы (CLR) являются гетерогенным семейством кальций-зависимых рецепторов, классифицируемых в зависимости от способности связывать различные углеводные остатки. CLR вовлечены в различные реакции врожденного иммунитета. Считается, что C-лектиновые рецепторы распознают преимущественно углеводные антигены и не способны дифференцировать гликаны, принадлежащие чужеродным агентам, и гликаны, присутствующие в организме. В генетических исследованиях было показано значение некоторых полиморфизмов гена CLR CLEC16A в создании предрасположенности к развитию РС [115]. Также определено, что в модели ЭАЭ, индуцируемого MOG, что основным регулятором экспрессии антител к MOG является участок хромосомы 4, кодирующий гены CLR, увеличение экспрессии антител к MOG в этой модели приводило к протективному эффекту в отношении ЭАЭ [55].

Mincle (макрофаг-индуцируемый Ca^{2+} -зависимый C-лектин, или CLEC4E) и Clec6 (макрофагальный C-лектин, или MCL, CLEC4D) известны в связи со своей способностью связываться с гликолипидами микобактерий, что приводит к стимулированию развития иммунных реакций, направленных на уничтожение возбудителя [24]. Данных о роли данных CLR в развитии РС к настоящему моменту нет.

Несмотря на выраженный эффект липидов миелина на компоненты врожденного иммунитета в экспериментах на клеточных линиях, воздействие липидов миелина не приводило к увеличению экспрессии цитокинов и хемокинов в периферических мононуклеарных клетках (PBMC) пациентов с РС и даже вызывало ингибирование продукции некоторых цитокинов, таких как

провоспалительные цитокины и хемокины IL-1ra, IL-6, IL-8, IL-17A, MIP1 α , MIP1 β , противовоспалительный цитокин IL-10 и факторы VEGF, G-CSF. Супрессия секреции цитокинов была наиболее выраженной у пациентов с быстрым нарастанием инвалидности. Эти результаты указывают на то, что у пациентов с РС может отмечаться уменьшение реактивности врожденной иммунной системы, связанное с ее постоянной стимуляцией. Это предположение также подтверждается тем, что у пациентов с доброкачественным течением РС продукция некоторых цитокинов и хемокинов при стимуляции РВМС липидами миелина в меньшей степени отличается от здоровых людей.

Ранее было показано, что при стимуляции лейкоцитов больных РС α GalC, FMC7 (ацетилированный галактоцереброзид 7) или смесью FMC5 и FMC7, в отличие от здоровых людей, не происходит увеличения численности NK и NKRT-клеток, экспрессирующих CD56+CD3+, CD94+CD3+, CD161+CD3+, CD56+CD3-, и повышения секреции цитокинов, что говорит о нечувствительности этих клеток. Авторы указывают, что механизм возникновения нечувствительности в настоящее время неясен. Поскольку NKR+ Т-клетки обладают иммунорегуляторными функциями, уменьшение их числа при РС и нечувствительность могут быть связаны с нарушением подавления иммунного ответа и последующим прогрессированием нейродегенерации [61; 117].

Этот феномен схож с так называемой толерантностью к эндотоксину, которая отмечена при различных патологических состояниях, таких как сепсис, кистозный фиброз, травмы, операции, злокачественные новообразования. Его суть заключается в том, что если пытаться стимулировать иммунные клетки ЛПС, только что подвергавшиеся его воздействию, экспрессия провоспалительных цитокинов будет не увеличиваться, а падать. При этом исходный уровень секреции провоспалительных цитокинов и хемокинов у таких клеток выше, чем у интактных клеток [49]. Моноциты, толерантные к эндотоксину, также характеризуются увеличенной способностью к фагоцитозу и снижением возможности вступать в качестве антиген-представляющих клеток. В отличие от

наблюдаемого нами явления, при развитии толерантности к эндотоксину увеличивается продукция иммунными клетками противовоспалительных цитокинов, таких как IL-10 [107]. Считается, что толерантность к эндотоксину является эволюционным защитным механизмом, препятствующим развитию токсического шока [49].

Точный механизм развития толерантности к эндотоксину неизвестен. В экспериментах на клеточных линиях было показано, что происходит нарушение образования комплексов TLR4 с адаптерными молекулами (MyD88), нарушение активации Nf-kB- MAPK (митоген-активируемых протеинкиназ), а также эпигенетические модификации иммунных клеток [53; 62]. Постоянное воздействие на клетки провоспалительных цитокинов, таких как IL-1 β и TNF α , может способствовать развитию толерантности к эндотоксину. Схожая с толерантностью к эндотоксину реакция была описана также при воздействии собственных лигандов на другие TLR, например, при стимуляции TLR2 липотейхоиновой кислотой, Pam3Cysk4 и др. лигандами [48].

В пользу возможности постоянной стимуляции иммунных клеток пациентов с РС липидами миелина говорит тот факт, что липидный состав биологических жидкостей пациентов с РС меняется. В сыворотке крови пациентов с РС падает концентрация фосфатидилсерина и фосфатидилэтаноламина, в плазме крови — концентрация сфингомиелина. У пациентов ремиттирующим РС отмечается значительное увеличение уровней GM1 и GD1a и уменьшение уровня GM3 в сыворотке крови. В ЦСЖ пациентов с РС отмечено повышение концентрации сульфатидов, у некоторых пациентов также отмечено повышение концентрации GM1, GM3 и полисиалированных ганглиозидов (GQ1b, GT1b) [121].

В то же время необходимо отметить, что профиль цитокинов, выявленный в ЦСЖ, отличался от цитокинов и хемокинов, экспрессия которых изменялась под воздействием липидов как в РВМС пациентов с РС и здоровых добровольцев, так и в экспериментах на клеточных линиях. У пациентов с РС было выявлено

повышение концентрации хемокина IP-10 и уменьшение концентрации хемокина MCP-1, по сравнению с пациентами с другими невоспалительными неврологическими заболеваниями. Эти результаты согласуются с данными, полученными другими исследователями [99; 133]. IP-10 был связан с воспалительной активностью при РС и других воспалительных заболеваниях ЦНС. По данным других авторов, у пациентов с РС концентрация IP-10 повышается преимущественно в активной фазе заболевания. В нашем исследовании у большинства пациентов забор ЦСЖ проводился во время обострения заболевания, что объясняет повышение у них уровня IP-10 [133]. Среди пациентов с РС была выделена небольшая подгруппа больных с более агрессивным течением заболевания, у которых отмечались частые обострения заболевания (3 раза в год и более) и/или большое количество очагов, накапливающих контраст при МРТ. Увеличение концентрации IP-10 у этих пациентов было несколько выше, чем у остальной группы, кроме того, среди пациентов с наиболее высокими значениями концентрации IP-10 преобладали больные с высокой активностью заболевания. Это указывает на то, что IP-10 может быть потенциальным маркером активности заболевания при РС, однако для подтверждения этой гипотезы требуются дальнейшие исследования. MCP-1 является провоспалительным цитокином. Снижение его концентрации в ЦСЖ также было показано другими учеными. В то же время известно, что экспрессия MCP-1 повышена в активных очагах РС [138]. Однако при стимуляции РВМС липидами миелина было выявлено снижение секреции MCP-1 как у пациентов с РС, так и у здоровых добровольцев, причем существенной разницы между этими группами не определялось. Причина снижения концентрации MCP-1 в ЦСЖ у пациентов до конца не ясна. Экспрессия MCP-1 контролируется одним из основных цитокинов, вырабатываемых лимфоцитами фенотипа Th2, — IL-4. MCP-1 приводит к сдвигу фенотипа лимфоцитов в сторону Th2. Существует версия о том, что понижение концентрации MCP-1 в ЦСЖ при обострении РС связано с повышенной активностью лимфоцитов с фенотипом Th1 [133].

Результаты исследования антител к липидам миелина в биологических жидкостях показали, что у пациентов с РС имеется тенденция к более частому выявлению антител к гликолипидам и антител к сульфатиду в сыворотке крови, более выраженная в группе пациентов с ВПРС [161]. Об увеличении частоты серопозитивности к гликолипидам, таким как сульфатиды и ганглиозиды, также известно при системных аутоиммунных заболеваниях, таких как системная красная волчанка (СКВ), синдром Шегрена, криоглобулинемия. Антитела к сульфатидам чаще выявлялись также у пациентов с сахарным диабетом I типа, антитела к ганглиозидам — при различных видах периферических нейропатий [20; 38]. Была отмечена небольшая связь выявления антител к гликолипидам с активностью заболевания в случае СКВ, а также наличием у пациента проявлений со стороны периферической нервной системы или изменений, по данным электронейромиографии (ЭНМГ), связь с наличием проявлений со стороны ЦНС не оценивалась. Исследователи считают, что наличие антител к липидам миелина может быть обусловлено перекрестными реакциями с антигенными эпитопами бактерий, как при синдроме Гийена-Барре, или быть результатом поликлональной активации В-лимфоцитов, отмечающейся при аутоиммунных заболеваниях. В то же время авторы связывают наличие у пациентов неврологических проявлений с выявлением антител к гликолипидам [18].

Частота выявления антител к сульфатиду в сыворотке у пациентов с РС в нашем исследовании приблизительно соотносится с данными других работ (23-47%), однако в других работах была несколько меньшей доля серопозитивных здоровых добровольцев [66; 67; 77]. При использовании количественного метода оценки Nighighi и соавт. было показано, что у пациентов с РС более высокие титры антител к сульфатиду [66]. Частота выявления антител в сыворотке крови выше, чем в ЦСЖ. Однако у других исследователей антитела к сульфатиду выявлялись в ЦСЖ чаще, чем у нас, что может быть связано с методологическими различиями [32; 67]. Титры антител в сыворотке крови и ЦСЖ не коррелируют друг с другом [66]. Более частое выявление антител к сульфатиду в сыворотке

крови может говорить о том, что первичная презентация этого антигена происходит в периферических лимфатических узлах. Значимых корреляций между выявлением антител к сульфатидам и выраженностью неврологической симптоматики, активностью заболевания и темпами его прогрессирования выявлено не было. Эти данные согласуются с результатами, полученными другими учеными [32; 77].

При РРС было отмечено некоторое увеличение доли пациентов, у которых были выявлены антитела к ганглиозиду GM4, причем в большинстве случаев (5/6) это были антитела класса IgM. Интересно отметить, что у 3/6 этих пациентов в дебюте заболевания отмечались не совсем типичные симптомы, такие как судорожные припадки, эпизоды дезориентации, стойкий цефалгический синдром, в то время как среди остальной группы они были отмечены в 4/97 случаев [161]. Данных о повышенной частоте выявления антител к GM4 при РС в литературе нет, однако анализ антител к этому липиду практически не проводился. В то же время известно, что содержание GM4 в миелиновой оболочке у пациентов с РС снижается [111], что говорит о возможном участии этого ганглиозида в развитии патологического процесса.

У пациентов с ВПРС значительно чаще, чем в других группах выявлялись антитела к ганглиозиду GM1 – одному из наиболее широко представленных ганглиозидов в миелиновой оболочке [161]. В другом исследовании было показано увеличение доли серопозитивных к GM1 участников среди пациентов с РС, по сравнению со здоровыми добровольцами, однако в этой работе был меньший размер исследуемой группы, не изучались отдельно пациенты с ВПРС и использовался другой метод детекции антител [158]. По данным другой работы, также включавшей небольшое число пациентов с РС, (8 с РРС, 8 с ВПРС), антитела к GM1 и асиало-GM1 чаще встречались в ЦСЖ у пациентов с ВПРС, антитела в сыворотке крови в этом случае не анализировались [86].

Доля серопозитивных пациентов также была несколько выше среди пациентов с ВПРС также при анализе антител к сульфатидам и гликолипидам в

целом по группе, хотя этот результат не был статистически значимым. В исследованиях Villar и соавт. было показано, что наличие в ЦСЖ олигоклональных полос, состоящих из IgM, реактивных к липидам, коррелирует с более быстрым прогрессированием заболевания и более высокой скоростью увеличения объема очагов, гиперинтенсивных в T2, и выраженности атрофии головного мозга, по данным МРТ [19]. В работе Sadatipour и соавт. при анализе ганглиозидов в плазме крови методом иммуноферментного анализа (ИФА) было показано, что наличие антител к GM3 связано с прогрессивным течением РС [131]. В то же время некоторым авторам не удалось подтвердить эти результаты [64]. В совокупности, данные указывают на то, что антитела к липидам могут участвовать в развитии демиелинизирующего и нейродегенеративного процесса при РС, являясь маркерами прогрессирования заболевания или более неблагоприятного течения. В то же время требуют дальнейшего уточнения комбинации антител к липидам, имеющих наибольший прогностический потенциал и их прогностическая значимость.

Уточнение мишеней антител к липидам миелина при РС может стать основой для понимания механизмов их образования и значения развитию патологического процесса. Среди возможных механизмов образования антител при РС описаны молекулярная мимикрия, распространение эпитопов (образование антител к эндогенным эпитопам в результате высвобождения аутоантигенов в ходе воспалительного процесса), поддержание выживаемости аутореактивных клеток вирусами (например, ВЭБ) [85]. Не исключено, что антитела к липидам являются сопутствующим явлением демиелинизирующему и нейродегенеративному процессу при РС и не оказывают патологического действия. Так, известно, что у здоровых людей могут встречаться аутоантитела, способствующие элиминации остатков разрушенных клеток и поддержанию гомеостаза [65]. Напротив, они могут участвовать в иммунопатологических реакциях и вносить вклад в развитие демиелинизирующего и нейродегенеративного процесса. В пользу этого говорят исследования,

проведенные на животных моделях РС: введение мышам с экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом (ЭАЭ) антител к сульфатидам и GM4 приводило к более тяжелому течению заболевания [86; 90].

Таким образом, в дополнение к клиническим прогностическим признакам, характерным для того или иного варианта течения РС, нам удалось определить иммунологические маркеры, в первую очередь, связанные с иммунными реакциями с участием липидов миелина, указывающие на различные варианты течения. Клинико-иммунологическая характеристика пациентов с РС представлена в Таблице 11.

Данные проведенного клинико-иммунологического обследования пациентов с РС указывают на то, что для всех пациентов с РС характерно снижение секреции противовоспалительного интерлейкина IL-10, факторов роста G-CSF, PDGF, VEGF, хемокинов RANTES и MCP-1, более выраженное, чем у здоровых людей, при стимуляции РВМС гликолипидами миелина, такими как ганглиозиды (GM4, GM2, GD1a), галактоцереброзиды и сульфатидам, в ЦСЖ у пациентов с РС обнаруживается повышение концентрации хемокина IP-10 и снижение концентрации хемокина MCP-1, в сыворотке крови у пациентов часто выявляются антитела к гликолипидам миелина, в первую очередь сульфатидам, однако частота серопозитивности у пациентов с РС не отличается от здоровых людей.

Для пациентов с быстрыми темпами нарастания инвалидности характерны начало заболевания с пирамидных нарушений или полисимптомного дебюта, частые обострения заболевания, короткий интервал между первым и вторым обострением. При стимуляции РВМС этих пациентов ганглиозидами, в наибольшей степени GM4, происходит выраженное подавление продукции некоторых провоспалительных цитокинов и хемокинов: IL1 α , IL-6, IL-8, IL-17A, MIP-1 α , MIP-1 β . Полученный результат говорит о несостоятельности врожденного иммунитета у пациентов с быстрым нарастанием инвалидности и указывает на возможное прогностическое значение анализа врожденного

иммунного ответа к липидам миелина при РС.

Таблица 11. Клинико-иммунологическая характеристика пациентов с РС.

Течение РС	Клинические предикторы	Секреция провоспалительных цитокинов и хемокинов РВМС при стимуляции липидами	Секреция хемокинов, провоспалительных цитокинов и факторов роста РВМС при стимуляции липидами	Цитокины и хемокины в ЦСЖ	Антитела к липидам в сыворотке крови
Все пациенты с РС	-	-	Снижение концентрации факторов роста PDGF, G-CSF и VEGF, цитокина IL-10 и хемокинов MCP-1 и RANTES при стимуляции гликолипидами	Повышение концентрации IP-10, и снижение концентрации MCP-1 (p<0,05)*	Наиболее часто выявляются антитела к сульфатидам, GM1, GM4. Нет статистически значимых различий со здоровыми
РС с быстрыми темпами нарастания инвалидности	- дебют заболевания с пирамидных нарушений или полисимптомный дебют; - частые обострения; - короткий интервал между первым и вторым обострением.	Выраженное подавление продукции IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-17A, MIP-1 α , MIP-1 β при воздействии ганглиозидов, в наибольшей степени GM4	-	-	-
Доброкачественное	- дебют заболевания с ОН или расстройств чувствительности; - редкие обострения; - длинный интервал между первым и вторым обострением.	Отсутствие подавления продукции IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-17A, MIP-1 α , MIP-1 β при воздействии ганглиозидов, в наибольшей степени GM4	-	-	-
RPC с высокой активностью	-	Умеренное подавление продукции IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-17A, MIP-1 α , MIP-1 β при воздействии ганглиозидов, в наибольшей степени GM4	-	Выраженное повышение концентрации IP-10	-
Вторично-прогредиентное	-	-	-	-	Повышение частоты серопозитивности по антителам к GM1 (p<0,05)**

* сравнение проводилось с пациентами с другими невоспалительными неврологическими заболеваниями

** сравнение проводилось со здоровыми добровольцами пациентами с ремиттирующим течением

Для пациентов с доброкачественным течением характерны дебют заболевания с оптического неврита или расстройств чувствительности, редкие

обострения, длинный интервал между первым и вторым обострением. При стимуляции РВМС этих пациентов ганглиозидами практически не наблюдается подавления продукции провоспалительных цитокинов и хемокинов, что было также отмечено при обследовании здоровых людей.

Для пациентов с активным РРС характерно умеренное подавление продукции IL1ra, IL-6, IL-8, IL-17A, MIP-1 α , MIP-1 β при воздействии на РВМС ганглиозидов. В этой группе пациентов также чаще отмечалось выраженное повышение концентрации IP-10 в ЦСЖ, что указывает на возможную роль этого хемокина в качестве маркера активности заболевания при РС.

При вторично-прогредиентном течении РС было выявлено увеличение частоты серопозитивности по антителам к ганглиозиду GM1, по сравнению со здоровыми добровольцами и другими пациентами с РС. Этот результат говорит о возможном значении антител к GM1 как маркера прогрессирования заболевания.

Дальнейшее развитие представлений о механизмах развития гуморального ответа к липидам миелина при РС и идентификация наиболее значимых мишеней антител будет способствовать разработке новых подходов к прогнозированию течения заболевания и выявлению новых мишеней для иммуномодулирующей терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выводы

1. При рассеянном склерозе имеется дисбаланс продукции провоспалительных и противовоспалительных факторов клетками крови под воздействием липидов. У пациентов, по сравнению со здоровыми лицами, отмечается снижение продукции провоспалительных цитокинов и хемокинов (IL1ra, IL-6, IL-8, IL-17A, MIP-1 α , MIP-1 β), а также некоторых противовоспалительных цитокинов (IL-10) и факторов роста (G-CSF, PDGF) мононуклеарными клетками периферической крови при стимуляции ганглиозидами, в первую очередь, GM4.

2. Клинические особенности течения рассеянного склероза формируются в тесной взаимосвязи с реакциями врожденного иммунитета с участием липидов миелина:

- Наиболее выраженное снижение секреции провоспалительных цитокинов и хемокинов (IL1ra, IL-6, IL-8, IL-17A, MIP-1 α , MIP-1 β) периферическими мононуклеарными клетками крови под воздействием ганглиозида GM4 определялось у пациентов с быстрыми темпами нарастания инвалидности (достижение балла по расширенной шкале инвалидности 5 и более в течение 5 или менее лет от дебюта заболевания) и при высокой активности заболевания (3 и более обострений в год).
- При доброкачественном течении рассеянного склероза липиды миелина практически не влияют на секрецию провоспалительных цитокинов и хемокинов периферическими мононуклеарными клетками, что может рассматриваться как протективный фактор, указывающий на

благоприятный прогноз заболевания.

3. Впервые идентифицированы рецепторы врожденного иммунитета (Clec6 и Mincle), которые при взаимодействии с липидами способствуют активации провоспалительных транскрипционных факторов (ядерного фактора активированных Т-клеток и активирующего протеина-1). Наиболее выраженным эффектом обладали ганглиозиды и, в первую очередь, GM2, способный активировать Clec6 и Mincle в 1,9 и 3,42 раз, соответственно.
4. Выявленное повышение концентрации интерферон-гамма-индуцируемого белка-10 в цереброспинальной жидкости у пациентов с высокой активностью рассеянного склероза, может рассматриваться как предиктор агрессивного течения заболевания.
5. Вторично-прогрессирующее течение рассеянного склероза, в отличие от ремиттирующего течения, характеризуется более частым выявлением в сыворотке крови антител к ганглиозиду GM1, что свидетельствует об участии В-клеточных иммунных реакций с участием липидов миелина в патогенезе прогрессирующих форм заболевания.

Практические рекомендации

1. Определение концентрации интерферон-гамма-индуцируемого белка-10 в цереброспинальной жидкости у пациентов с РС может использоваться в качестве маркера воспалительной активности заболевания.
2. Антитела к ганглиозиду GM1, являясь молекулярными коррелятами нейродегенерации при рассеянном склерозе, могут использоваться в качестве маркера прогрессирующего течения заболевания.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВПРС -вторично-прогрессирующий рассеянный склероз

ГалЦ - галактоцереброзиды

ЛакЦер - лактозилцерамиды

ЛПС - липополисахарид

МРТ — магнитно-резонансная томография

РС — рассеянный склероз

РРС — ремиттирующий рассеянный склероз

ФХ — фосфатидилхолин

ХС - холестеринсульфат

ЦСЖ — цереброспинальная жидкость

ЭАЭ — экспериментальный аллергический энцефаломиелит

AP-1 – активирующий протеин-1

EDSS — расширенная шкала инвалидности Kurtzke

G-CSF - гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

GM-CSF - гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

HEK-293 - линии человеческих эмбриональных клеток почек

IFN- γ - интерферон гамма

IgG – иммуноглобулин класса G

IgM - иммуноглобулин класса M

IL – интерлейкин

IP-10 - интерферон-гамма-индуцируемого белка-10

КС - кератиноцитарный хемокин

MCP-1 - моноцитарный хемотаксический белок 1

MIP-1 α - макрофагальный белок воспаления 1 альфа

MIP-1 β - макрофагальный белок воспаления 1 бета

NFAT – ядерный фактор активированных Т-клеток

NF- κ B – ядерный фактор каппа бета

OSB — олигоклональные полосы

PBMC — периферические мононуклеарные клетки крови

RANTES - хемокин, выделяемый Т-клетками при активации

RAW - линии макрофагоподобных клеток, трансформированных вирусом лейкоза
Абельсона

SEAP - секретируемая эмбриональная щелочная фосфатаза

THP-1 - человеческая линия клеток острого моноцитарного лейкоза

TDB – трегалоза-6,6-дибегенат

TLR – Толл-подобные рецептор

TNF α - фактор некроза опухолей альфа

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бисага, Г.Н. Рассеянный склероз. Современные представления, диагностика, лечение / Г.Н. Бисага — Санкт-Петербург: ООО “Аспект плюс”, 2001. - 41 с.
2. Бринар В.Л. Лабораторные методы в диагностике рассеянного склероза / В.Л. Бринар, Ч.М. Позер // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. - 2002. - Т. 102 (специальный выпуск). - С. 7–15.
3. Демина, Т.Л. Рассеянный склероз: патогенез, диагностика, дифференциальный диагноз и лечение / Т.Л. Демина, М.В. Давыдовская, Н.В. Хачанова и соавт. // Неврология и ревматология. Приложение к журналу Consilium medicum. - 2008. - Т. 1. - С. 84–90.
4. Елисеева, Д.Д. Роль регуляторных Т-клеток в развитии аутоиммунных нарушений при рассеянном склерозе / Д.Д. Елисеева, И.А. Завалишин, А.В. Караулов, С. Н. Быковская // Вестник Российской академии медицинских наук. - 2012. - Т. 3. - С. 68–74.
5. Завалишин, И.А. Рассеянный склероз: современные аспекты этиологии и патогенеза / И.А. Завалишин, М.Н. Захарова // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. - 2003. - Т. 103(2) — С. 10–16.
6. Завалишин, И.А. Диагностика и лечение рассеянного склероза / И.А. Завалишин, А.В. Переседова, Н.И. Стойда и соавт. // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. - 2011. - Т. 111(6). - с. 89–96.
7. Захарова, М.Н. Липиды миелина / М.Н. Захарова // В кн.: Рассеянный склероз

Головкин В.И. Избранные вопросы теории и практики. - Москва. - 2000. - С. 69–97.

8. Захарова, М.Н. Рассеянный склероз: основные аспекты патогенеза / М.Н. Захарова, И.А. Завалишин // В кн.: Рассеянный склероз и другие демиелинизирующие заболевания: Руководство для врачей. - Москва. - 2004. - С. 60–74.

9. Захарова, М.Н. Основные аспекты патогенеза рассеянного склероза / М.Н. Захарова, И.А. Завалишин, А.В. Переседова, Д.Д. Елисеева // В кн.: Рассеянный склероз. клиническое руководство под ред. Гусева Е.И., Завалишина И.А., Бойко А.Н. - Москва: Издательство «Реал Тайм». - 2011. - С. 43–71.

10. Калашникова, Л. А. Цереброваскулярные нарушения при антифосфолипидном синдроме / Л.А. Калашникова // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. - 2011. - Т. 5, № 1. - С. 39–43.

11. Макшаков, Г.С. Современные представления об интратекальном гуморальном иммунном ответе и диагностическое значение выявления олигоклональных иммуноглобулинов при рассеянном склерозе / Г.С. Макшаков, С.В. Лапин, Е.П. Евдошенко // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. - 2016. - Т. 116, № 2-2. - С.14–20.

12. Переседова, А.В. Глатирамера ацетат (копаксон) в лечении рассеянного склероза. Результаты длительного применения: возникающие вопросы и направления дальнейших исследований / А.В. Переседова, И.А. Завалишин, Л.С. Адарчева и соавт. // Нервные болезни. - 2012. - Т. 4. - С. 26–30.

13. Супонева, Н.А. Патогенетическая и проностическая роль аутоантител к ганглиозидам периферических нервов при синдроме Гийена-Барре / Н.А. Супонева, М.А. Пирадов, С.С. Никитин и соавт. // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. - 2013. Т. 7, № 1. - С. 4–11.

14. Тухватулин, А.И. Toll-подобные рецептор и их адапторные молекулы / А.И.

Тухватулин, Д.Ю. Логунов, Д.Н. Щербинин и соавт. // Биохимия. - 2010. - Т. 75, № 9. - С. 1224–43.

15. Тухватулин, А.И. Роль паттерн-распознающих рецепторов в противоинфекционном иммунитете / А.И. Тухватулин, Д.Н. Щербинин Д.Ю. Логунов и соавт. // Вестник Российской академии медицинских наук. - 2011. - Т. 10. - С. 47–54.

16. Шмидт, Т.Е. Рассеянный склероз: руководство для врачей / Т.Е. Шмидт, Н.Н. Яхно. - Москва: МЕДпресс-информ. - 2010. - 272 с.

17. Acarín, N. Different Antiganglioside Antibody Pattern between Relapsing-Remitting and Progressive Multiple Sclerosis / N. Acarín, J. Río, A. L. Fernández et al. // Acta Neurologica Scandinavica. - 2009. - Vol. 93, № 2-3. - Pp. 99–103.

18. Alpa, M. Anti-GM1 and Anti-Sulfatide Antibodies in Patients with Systemic Lupus Erythematosus, Sjögren's Syndrome, Mixed Cryoglobulinemia and Idiopathic Systemic Vasculitis / M. Alpa, B. Ferrero, R. Cavallo et al. // Clinical and experimental rheumatology. - 2007. - Vol. 25, №4. - Pp. 556–562.

19. Álvarez-Cermeño, J.C. Intrathecal Lipid-Specific Oligoclonal IgM Synthesis Associates with Retinal Axonal Loss in Multiple Sclerosis / J.C. Álvarez-Cermeño, C. Muñoz-Negrete, F.J. Costa-Frossard et al. // Journal of the neurological sciences. - 2016. - Vol. 360. - Pp. 41–44.

20. Andersson, K. Patients with Insulin-Dependent Diabetes but Not Those with Non-Insulin-Dependent Diabetes Have Anti-Sulfatide Antibodies as Determined with a New ELISA Assay / K. Andersson, K. Buschard, P. Fredman et al. // Autoimmunity. - 2002. - Vol. 35, №7. - Pp. 463–468.

21. Arnon, R. Anti-Ganglioside Antibodies in Multiple Sclerosis / R. Arnon, E. Crisp, R. Kelley et al. // Journal of the Neurological Sciences. - 1980. - Vol. 46, №2. - Pp. 179–186.

22. Bach, J.F. Infections and Autoimmune Diseases / J.F. Bach // Journal of

Autoimmunity. - 2005. - Vol. 25. - Pp. 74–80.

23. Bar-Or, A. Rituximab in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis: A 72-Week, Open-Label, Phase I Trial / A. Bar-Or, P.A.J. Calabresi, D. Arnold et al. // *Annals of neurology*. - 2008. - Vol. 63, № 3. - Pp. 395–400.

24. Behler, F. Role of Mincle in Alveolar Macrophage-Dependent Innate Immunity against Mycobacterial Infections in Mice / F. Behler, K. Steinwede, L. Balboa et al. // *The Journal of Immunology*. - 2012. - Vol. 189, № 6. - Pp. 3121–29.

25. Bendelac, A., Mouse CD1-Specific NK1 T Cells: Development, Specificity, and Function / A. Bendelac, M. N. Rivera, S. H. Park, and J. H. Roark. // *Annual review of Immunology*. - 1997. - Vol. 15. - Pp. 535–62.

26. Benedetti, B. A Diffusion Tensor MRI Study of Cervical Cord Damage in Benign and Secondary Progressive Multiple Sclerosis Patients. / B. Benedetti, M. A. Rocca, M. Rovaris et al. // *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. - 2010. - Vol. 81, № 1. - Pp. 26–30.

27. Beutler, B. Innate Immunity: An Overview. / B. Beutler // *Molecular Immunology*. - 2004. - Vol. 40, № 12. - Pp. 845–59.

28. Bidot, C.J. Clinical and Neuroimaging Correlates of Antiphospholipid Antibodies in Multiple Sclerosis: A Preliminary Study. / C.J. Bidot, L.L.Horstman, W. Jy et al. // *BMC neurology*. - 2007. - Vol.7. - P. 36.

29. Blanco, Y. Autologous Haematopoietic-Stem-Cell Transplantation for Multiple Sclerosis / Y. Blanco, A. Saiz, E. Carreras, and F. Graus // *The Lancet. Neurology*. - 2005. - Vol. 4, № 1. - Pp. 54–63.

30. Boes, M. Role of Natural and Immune IgM Antibodies in Immune Responses. / M. Boes // *Molecular immunology*. - 2000. - Vol. 37, № 18. - Pp. 1141–49.

31. Bosca, I. Response to Interferon in Multiple Sclerosis Is Related to Lipid-Specific Oligoclonal IgM Bands / I. Bosca, L.M. Villar, F. Coret et al. // *Multiple sclerosis*. -

2010. - Vol. 16, № 7. - Pp. 810–15.

32. Brennan, K.M. Lipid Arrays Identify Myelin-Derived Lipids and Lipid Complexes as Prominent Targets for Oligoclonal Band Antibodies in Multiple Sclerosis. / K.M. Brennan, F. Galban-Horcajo, S. Rinaldi et al. // *Journal of neuroimmunology*. - 2011. - Vol. 238, № 1-2. - Pp. 87–95.

33. Brigl, M. CD1: Antigen Presentation and T Cell Function. / M. Brigl and M.B. Brenner. // *Annual review of immunology*. - 2004. - Vol. 22. - Pp. 817–90.

34. Buenafe, A.C. Lipopolysaccharide Pretreatment Modulates the Disease Course in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. / A.C. Buenafe, D.N. Bourdette, E.C. Alvord et al. // *Journal of neuroimmunology*. - 2007. - Vol. 182, № 1-2. - Pp. 32–40.

35. Buschard, K. Self-Glycolipids Modulate Dendritic Cells Changing the Cytokine Profiles of Committed Autoreactive T Cells. / K. Buschard, J.E. Månsson, B.O. Roep, T. Nikolic // *PloS one*. - 2012. - Vol. 7, № 12. - e52639.

36. Bustamante, M.F. Implication of the Toll-like Receptor 4 Pathway in the Response to Interferon- β in Multiple Sclerosis. / M.F. Bustamante, N. Fissolo,

J. Río et al. // *Annals of neurology*. - 2011. - Vol. 70, № 4. - Pp. 634–45.

37. Calabrese, M. Evidence for Relative Cortical Sparing in Benign Multiple Sclerosis: A Longitudinal Magnetic Resonance Imaging Study / M. Calabrese, M. Filippi, M. Rovaris et al. // *Multiple sclerosis*. - 2009. - Vol.15, №1. - Pp. 36–41.

38. Caudie, C. Comparison of Commercial Tests for Detecting Multiple Anti-Ganglioside Autoantibodies in Patients with Well-Characterized Immune-Mediated Peripheral Neuropathies. / C. Caudie, A. Quittard Pinon, F. Bouhour et al. // *Clinical laboratory*. - 2013. - Vol. 59, № 11-12. Pp. 1277–87.

39. Cepok, S. Short-Lived Plasma Blasts Are the Main B Cell Effector Subset during the Course of Multiple Sclerosis / S. Cepok, B. Rosche, V. Grummel et al. // *Brain*. - 2005. - Vol. 128, Pt 7. - Pp. 1667–76.

40. Choi, S.R. Meningeal Inflammation Plays a Role in the Pathology of Primary Progressive Multiple Sclerosis. / S.R. Choi, O.W. Howell, D. Carassiti, et al. // *Brain*. - 2012. - Vol. 135, Pt 10. - Pp. 2925–37.
41. Cipriani, B. Upregulation of Group 1 CD1 Antigen Presenting Molecules in Guinea Pigs with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: An Immunohistochemical Study / B. Cipriani, L. Chen, K. Hiromatsu et al. // *Brain pathology*. - 2003. Vol. 13, № 1. - Pp. 1–9.
42. Constantin, G. Sulfatides Trigger Cytokine Gene Expression and Secretion in Human Monocytes. / G. Constantin, C. Laudanna, P. Baron, and G. Berton. // *FEBS Letters*. - 1994. - Vol. 350, №1. - Pp. 66–70.
43. Correale, J. Benign Multiple Sclerosis: Does It Exist? / J. Correale, M.C. Ysraelit and M.P. Fiol. // *Current Neurology and Neuroscience Reports*. - 2012. - Vol. 12, № 5. - Pp. 601–9.
44. Cox, D. Determination of Cellular Lipids Bound to Human CD1d Molecules. / D. Cox, L. Fox, R. Tian et al. // *PloS one*. - 2009. - Vol. 4, №5. - Pp. e5325.
45. Crane, D.D. Lipids Derived from Virulent *Francisella Tularensis* Broadly Inhibit Pulmonary Inflammation via Toll-like Receptor 2 and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α / D.D. Crane, R. Ireland, J.B. Alinger, et al. // *Clinical and vaccine immunology*. - 2013. - Vol. 20, №10. - Pp. 1531–40.
46. Dendrou, C.A. Immunopathology of Multiple Sclerosis. / C.A. Dendrou, L. Fugger, and M.A. Friese // *Nature reviews. Immunology*. - 2015. - Vol. 15, №9. - Pp. 545–58.
47. Derkow, K. Multiple Sclerosis: Modulation of Toll-like Receptor (TLR) Expression by Interferon- β Includes Upregulation of TLR7 in Plasmacytoid Dendritic Cells. / K. Derkow, J.M. J. Bauer, M. Hecker et al. // *PloS one*. - 2013. - Vol. 8, № 8. - P. e70626.
48. Dobrovolskaia, M.A. Induction of in Vitro Reprogramming by Toll-like Receptor (TLR)2 and TLR4 Agonists in Murine Macrophages: Effects of TLR "homotolerance" versus "heterotolerance" on NF-Kappa B

- Signaling Pathway Components. / M.A. Dobrovolskaia, A.E. Medvedev, K.E. Thomas et al. // *Journal of immunology*. - 2003. - Vol. 170, №1. - Pp. 508–519.
49. Dobrovolskaia, M.A. Toll Receptors, CD14, and Macrophage Activation and Deactivation by LPS / M.A. Dobrovolskaia and S.N. Vogel // *Microbes and Infection*. - 2002. - Vol. 4, № 9. - Pp. 903–914.
50. Durai, P. Structure and Dynamic Behavior of Toll-like Receptor 2 Subfamily Triggered by Malarial Glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium Falciparum*. / P. Durai, R.G. Govindaraj and S. Choi // *The FEBS journal*. - 2013. Vol. 280, № 23. - Pp. 6196–6212.
51. Endo, T. Antibodies to Glycosphingolipids in Patients with Multiple Sclerosis and SLE / T. Endo, D. D. Scott, S. S. Stewart et al. // *Journal of immunology*. - 1984. - Vol. 132, № 4. - Pp. 1793–97.
52. Eskan, M.A. et al. TLR4 and S1P Receptors Cooperate to Enhance Inflammatory Cytokine Production in Human Gingival Epithelial Cells / M.A. Eskan, B. Rose, M. R. Benakanakere // *European journal of immunology*. - 2008. - Vol. 38, № 4. - Pp. 138–147.
53. Fan, H. Molecular Mechanisms of Endotoxin Tolerance / H. Fan and J.A. Cook // *Journal of endotoxin research*. - 2004. - Vol. 10, № 2. - Pp. 71–84.
54. Feix, J.B. Immune Reactivity Against Membranes Containing Ganglioside GM₁ in Chronic-Progressive Multiple Sclerosis: Observation by Spin-Membrane Immunoassay / J.B. Feix, B. Khatri, M.P. McQuillen, and S.M. Koethe // *Immunological Communications*. - 1984. - Vol. 13, № 5. - Pp. 465–474.
55. Flytzani, S. Anti-MOG Antibodies Are under Polygenic Regulation with the Most Significant Control Coming from the C-Type Lectin-like Gene Locus / S. Flytzani, P. Stridh, A.O. Guerreiro-Cacais et al. // *Genes and immunity*. - 2013. - Vol. 14, № 7. - Pp. 409–419.
56. Friese, M.A. Mechanisms of Neurodegeneration and Axonal Dysfunction in

Multiple Sclerosis / M.A. Friese, B. Schattling, and L. Fugger // Nature reviews. Neurology. - 2014. - Vol. 10, № 4. - Pp. 225–238.

57. Frischer, J.M. The Relation between Inflammation and Neurodegeneration in Multiple Sclerosis Brains / J.M. Frischer, S. Bramow, A. Dal-Bianco et al. // Brain. - 2009. - Vol. 132, Pt 5. - Pp. 1175–1189.

58. Fujiwara, N. Bacterial Sphingophospholipids Containing Non-Hydroxy Fatty Acid Activate Murine Macrophages via Toll-like Receptor 4 and Stimulate Bacterial Clearance / N. Fujiwara, S.A. Porcelli, T. Naka et al. // Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids. - 2013. - Vol. 1831, № 6. - Pp. 1177–1184.

59. Gade-Andavolu, R. RANTES: A Genetic Risk Marker for Multiple Sclerosis / R. Gade-Andavolu, D.E. Comings, J. MacMurray et al. // Multiple sclerosis. - 2004. - Vol. 10, № 5. - Pp. 536–539.

60. Gadola, S.D. Impaired Selection of Invariant Natural Killer T Cells in Diverse Mouse Models of Glycosphingolipid Lysosomal Storage Diseases. / S.D. Gadola, Silk, J.D., A. Jeans et al. // The Journal of experimental medicine. - 2006. - Vol. 203, № 10. - Pp. 2293–2303.

61. Gately, C.M. Invariant Natural Killer T-Cell Anergy to Endogenous Myelin Acetyl-Glycolipids in Multiple Sclerosis. / C.M. Gately, M. Podbielska, T. Counihan et al. // Journal of neuroimmunology. - 2013. - Vol. 259, № 1-2. - Pp. 1–7.

62. El Gazzar, M. Chromatin-Specific Remodeling by HMGB1 and Linker Histone H1 Silences Proinflammatory Genes during Endotoxin Tolerance / M. El Gazzar, B.K. Yoza, X. Chen, et al. // Molecular and cellular biology. - 2009. - Vol. 29, №7. - Pp. 1959–71.

63. Gholipour, T. Demographic and Clinical Characteristics of Malignant Multiple Sclerosis / T. Gholipour, B. Healy, N.F. Baruch et al. // Neurology. - 2011. - Vol. 76, №23. - Pp. 1996–2001.

64. Giovannoni, G. Circulating Antiganglioside Antibodies Are Not Associated with the

Development of Progressive Disease or Cerebral Atrophy in Patients with Multiple Sclerosis. / G. Giovannoni, P.R. Morris, and G. Keir. // *Annals of neurology*. - 2000. - Vol. 47, №5. - Pp. 684–685.

65. Gold, M. Pathogenic and Physiological Autoantibodies in the Central Nervous System / M. Gold, R. Pul, J.P. Bach et al. // *Immunological reviews*. - 2012. - Vol. 248, № 1. - Pp. 68–86.

66. Haghghi, S. Myelin Glycosphingolipid Immunoreactivity and CSF Levels in Multiple Sclerosis / S. Haghghi, A. Lekman, S. Nilsson et al. // *Acta neurologica Scandinavica*. - 2012. - Vol. 125, №1. - Pp. 64–70.

67. Haghghi, S. Increased CSF Sulfatide Levels and Serum Glycosphingolipid Antibody Levels in Healthy Siblings of Multiple Sclerosis Patients / S. Haghghi, A. Lekman, S. Nilsson et al. // *Journal of the neurological sciences*. - 2013. - Vol. 326, №1-2. - Pp. 35–39.

68. Handa, Y. GD3 Synthase Gene Knockout Mice Exhibit Thermal Hyperalgesia and Mechanical Allodynia but Decreased Response to Formalin-Induced Prolonged Noxious Stimulation. / Y. Handa, N. Ozaki, T. Honda et al. // *Pain*. - 2005. - Vol.117, №3. - Pp. 271–279.

69. Hansen, B.S. Multiple Toll-like Receptor Agonists Act as Potent Adjuvants in the Induction of Autoimmunity / B.S. Hansen, R.Z. Hussain, A.E. Lovett-Racke et al. // *Journal of neuroimmunology*. - 2006. - Vol.172, №1-2. - Pp. 94–103.

70. Hauser, S.L. B-Cell Depletion with Rituximab in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis / S.L. Hauser, E. Waubant, D.L. Arnold et al. // *The New England journal of medicine*. - 2008. Vol. 358, №7. - Pp. 676–688.

71. Heinzlef, O. Anticardiolipin Antibodies in Patients with Multiple Sclerosis Do Not Represent a Subgroup of Patients according to Clinical, Familial, and Biological Characteristics / O. Heinzlef, B. Weill, C. Johanet et al. // *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. - 2002. - Vol. 72, №5. - Pp. 647–649.

72. Heneka, M.T. Innate Immune Activation in Neurodegenerative Disease./ M.T. Heneka, M.P. Kummer and E. Latz. // Nature reviews. Immunology. - 2014. - Vol. 14, №7. - Pp. 463–477.
73. Herrmann, I. Streptococcus Pneumoniae Infection Aggravates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis via Toll-like Receptor 2 / I. Herrmann, M. Kellert, H. Schmidt et al. // Infection and immunity. - 2006. - Vol. 74, №8. - Pp. 4841–48.
74. Hinman, C.L. Sequence Determinants of Modified Cobra Venom Neurotoxin Which Induce Immune Resistance to Experimental Allergic Encephalomyelitis: Molecular Mechanisms for Immunologic Action / C.L. Hinman, R. Stevens-Truss, C. Schwarz, and R. A. Hudson // Immunopharmacology and immunotoxicology. - 1999. - Vol. 21, №3. - Pp. 483–506.
75. Ho, P.P. Identification of Naturally Occurring Fatty Acids of the Myelin Sheath That Resolve Neuroinflammation / P.P. Ho, J.L. Kanter, A.M. Johnson et al. // Science translational medicine. - 2012. Vol.4, №137. - Pp. 137-73.
76. Hundeshagen, A. Elevated Type I Interferon-like Activity in a Subset of Multiple Sclerosis Patients: Molecular Basis and Clinical Relevance / A. Hundeshagen, M. Hecker, B.K. Paap et al. // Journal of neuroinflammation. - 2012. - Vol.9. - Pp. 140.
77. Ilyas, A.A. Antibodies to Sulfatide in Cerebrospinal Fluid of Patients with Multiple Sclerosis / A.A. Ilyas, C. Zie-Wie and S.D. Cook // Journal of neuroimmunology. - 2003. - Vol.139, №1-2. - Pp. 76–80.
78. Jacobs, C.A. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Is Exacerbated by IL-1 Alpha and Suppressed by Soluble IL-1 Receptor / C.A. Jacobs, P.E. Baker, E.R. Roux et al. // Journal of immunology. - 1991. - Vol.146, №9. - Pp.2983–89.
79. Jahng, A.W. Activation of Natural Killer T Cells Potentiates or Prevents Experimental Autoimmune Encephalomyelitis / A.W. Jahng, I. Maricic, B. Pedersen et al. // The Journal of experimental medicine. - 2001. - Vol. 194, № 12. - Pp. 1789–99.
80. Jahng, A. Prevention of Autoimmunity by Targeting a Distinct, Noninvariant CD1d-

Reactive T Cell Population Reactive to Sulfatide / A. Jahng, I. Maricic, C. Aguilera et al. // *The Journal of experimental medicine*. - 2004. - Vol.199, №7. - Pp. 947–57.

81. Jang, H.J. Toll-like Receptor 2 Mediates High-Fat Diet-Induced Impairment of Vasodilator Actions of Insulin / H.J. Jang, H.S. Kim, D.H. Hwang et al. // *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. - 2013. - Vol.304, №10. - Pp. E1077–88.

82. Jeffery, D.R. Fingolimod: A Review of Its Mode of Action in the Context of Its Efficacy and Safety Profile in Relapsing Forms of Multiple Sclerosis / D.R. Jeffery, K.W. Rammohan, K. Hawker, and E. Fox // *Expert review of neurotherapeutics*. - 2016. - Vol.16, №1. - Pp. 31–44.

83. Ji, Q. MHC Class I-Restricted Myelin Epitopes Are Cross-Presented by Tip-DCs That Promote Determinant Spreading to CD8⁺ T Cells / Q. Ji, L. Castelli and J.M. Goverman // *Nature immunology*. - 2013. - Vol.14, №3. - Pp. 254–261.

84. Joseph, F.G. CSF Oligoclonal Band Status Informs Prognosis in Multiple Sclerosis: A Case Control Study of 100 Patients. / F.G. Joseph, C.L. Hirst, T.P. Pickersgill et al. // *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. - 2009. - Vol. 80, №3. - Pp.292–296.

85. Kakalacheva, K. Viral Triggers of Multiple Sclerosis / K. Kakalacheva, C. Münz, and J.D. Lünemann // *Biochimica et biophysica acta*. - 2011. - Vol.1812, №2. - Pp. 132–140.

86. Kanter, J.L. Lipid Microarrays Identify Key Mediators of Autoimmune Brain Inflammation / J.L. Kanter, S. Narayana, P.P. Ho et al. // *Nature medicine*. - 2006. - Vol. 12, №1. - Pp.138–143.

87. Kasai, N. Anti-Glycolipid Antibodies and Their Immune Complexes in Multiple Sclerosis / N. Kasai, A.R. Pachner, and R.K. Yu. // *Journal of the Neurological Sciences*. - 1986. - Vol. 75, №1. - Pp. 33–42.

88. Kawai, T. Lipopolysaccharide Stimulates the MyD88-Independent Pathway and

Results in Activation of IFN-Regulatory Factor 3 and the Expression of a Subset of Lipopolysaccharide-Inducible Genes / T. Kawai, O. Takeuchi, T. Fujita et al. // *Journal of immunology*. - 2001. - Vol. 167, №10. - Pp. 5887–94.

89. Kimura, A. IL-6: Regulator of Treg/Th17 Balance / A. Kimura and T. Kishimoto // *European journal of immunology*. - 2010. - Vol. 40, №7. - Pp. 1830–35.

90. Kusunoki, S. Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Guinea Pigs Using Myelin Basic Protein and Myelin Glycolipids / S. Kusunoki, R.K. Yu, and J.H. Kim // *Journal of neuroimmunology*. - 1988. - Vol.18, № 4. - Pp.303–314.

91. Lalive, P.H. TLR7 Signaling Exacerbates CNS Autoimmunity through Downregulation of Foxp3+ Treg Cells / P.H. Lalive, M. Benkhoucha, N.L. Tran et al. // *European journal of immunology*. - 2014. - Vol.44, №1. - Pp.46–57.

92. Lee, H. Role for Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha in Oxidized Phospholipid-Induced Synthesis of Monocyte Chemoattractant Protein-1 and Interleukin-8 by Endothelial Cells / H. Lee, W. Shi, P. Tontonoz et al. // *Circulation research*. - 2000. - Vol.87, №6. - Pp.516–521.

93. Lublin, F.D. Defining the Clinical Course of Multiple Sclerosis: Results of an International Survey / F.D. Lublin, S.C. Reingold, and National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis // *Neurology*. - 1996. - Vol. 46, №4. - Pp.907–911.

94. Lucchinetti, C. Heterogeneity of Multiple Sclerosis Lesions: Implications for the Pathogenesis of Demyelination / C. Lucchinetti, W. Brück, J. Parisi et al. // *Annals of neurology*. - 2000. - Vol.47, №6. - Pp. 707–717.

95. Lutterotti, A. Increased Serum Levels of Soluble CD14 Indicate Stable Multiple Sclerosis / A. Lutterotti, B. Kuenz, V.Gredler et al. // *Journal of neuroimmunology*. - 2006. - Vol.181, №1-2. - Pp.145–149.

96. Lyons, J.A. The Role of CD1-Mediated Presentation of Myelin Lipids in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis Pathogenesis /

J.A. Lyons // *Drug news & perspectives*. - 2003. - Vol.16, №9. - Pp. 574–584.

97. Lyons, J.A. Critical Role of Antigen-Specific Antibody in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Induced by Recombinant Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein / J.A. Lyons, M.J. Ramsbottom, and A.H. Cross // *European journal of immunology*. - 2002. - Vol. 32, №7. - Pp. 1905–13.

98. Magliozzi, R. Meningeal B-Cell Follicles in Secondary Progressive Multiple Sclerosis Associate with Early Onset of Disease and Severe Cortical Pathology / R. Magliozzi, O. Howell, A.Vora et al. // *Brain*. - 2007. - Vol.130, Pt 4. - Pp.1089–1104.

99. Mahad, D.J. Expression of Chemokines in the CSF and Correlation with Clinical Disease Activity in Patients with Multiple Sclerosis / D.J. Mahad, S.J. L. Howell, and M.N. Woodroffe // *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. - 2002. - Vol. 72, №4. - Pp. 498–502.

100. Marta, M. Unexpected Regulatory Roles of TLR4 and TLR9 in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis / M. Marta, A. Andersson, M. Isaksson et al. // *European journal of immunology*. - 2008. - Vol. 38, №2. - P. 565–575.

101. Martinez-Forero, I. IL-10 Suppressor Activity and Ex Vivo Tr1 Cell Function Are Impaired in Multiple Sclerosis / I. Martinez-Forero, R. Garcia-Munoz, S. Martinez-Pasamar et al. // *European journal of immunology*. - 2008. - Vol. 38, №2. - Pp. 576–586.

102. Matsushita, T. Regulatory B Cells Inhibit EAE Initiation in Mice While Other B Cells Promote Disease Progression / T. Matsushita, K. Yanaba, J.D. Bouaziz, et al. // *The Journal of clinical investigation*. - 2008. - Vol.118, №10. - Pp. 3420–30.

103. Mayo, L. Regulation of Astrocyte Activation by Glycolipids Drives Chronic CNS Inflammation / L. Mayo, S.A. Trauger, M. Blain et al. // *Nature Medicine*. - 2014. - Vol.20, №10. - Pp.1147–56.

104. McMahon, E.J. Epitope Spreading Initiates in the CNS in Two Mouse Models of Multiple Sclerosis / E.J. McMahon, S.L. Bailey, C.V. Castenada, H. Waldner, and S.D.

Miller // *Nature medicine*. - 2005. - Vol.11, №3. - Pp. 335–339.

105. Meinl, E. B Lineage Cells in the Inflammatory Central Nervous System Environment: Migration, Maintenance, Local Antibody Production, and Therapeutic Modulation. / E. Meinl, M. Krumbholz, and R. Hohlfeld // *Annals of neurology*. - 2006. - Vol.59, №6. - Pp. 880–892.

106. Menge, T. Antibody Responses against Galactocerebroside Are Potential Stage-Specific Biomarkers in Multiple Sclerosis / T. Menge, P.H. Lalive, H.C. von Büdingen, et al. // *The Journal of allergy and clinical immunology*. - 2005. - Vol. 116, №2. - Pp. 453–459.

107. Monneret, G. The Anti-Inflammatory Response Dominates after Septic Shock: Association of Low Monocyte HLA-DR Expression and High Interleukin-10 Concentration / G. Monneret, M.E. Finck, F. Venet et al. // *Immunology Letters*. - 2004. - Vol. 95, №2. - Pp. 193–198.

108. Monson, N.L. Rituximab Therapy Reduces Organ-Specific T Cell Responses and Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis / N.L. Monson, P. Cravens, R. Hussain et al. // *PloS one*. - 2011. - Vol.6, №2. - Pp. e17103.

109. Morris-Downes, M.M. Pathological and Regulatory Effects of Anti-Myelin Antibodies in Experimental Allergic Encephalomyelitis in Mice / M.M. Morris-Downes, P.A. Smith, J.L. Rundle et al. // *Journal of neuroimmunology*. - 2002. - Vol. 125, №1-2. - Pp. 114–124.

110. Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays / T. Mosmann // *Journal of Immunological Methods*. - 1983. - Vol. 65, № 1-2. - Pp. 55–63.

111. Mullin, B.R. Myelin Basic Protein Interacts with the Myelin-Specific Ganglioside GM4 / B.R. Mullin, F.X. Decandis, A.J. Montanaro, and J.D. Reid // *Brain research*. - 1981. - Vol. 222, №1. - Pp. 218–221.

112. Nataf, S. Attenuation of Experimental Autoimmune Demyelination in

Complement-Deficient Mice / S. Nataf, S.L. Carroll, R.A. Wetsel et al. // *Journal of immunology*. - 2000. - Vol. 165, №10. - Pp. 5867–73.

113. Nayak, D. Microglia Development and Function / D. Nayak, T.L. Roth, and D.B. McGavern // *Annual review of immunology*. - 2014. - Vol. 32. - Pp. 367–402.

114. Neher, J.J. Inhibition of Microglial Phagocytosis Is Sufficient To Prevent Inflammatory Neuronal Death / J.J. Neher, U. Neniskyte, J.W. Zhao et al. // *The Journal of Immunology*. - 2011. - Vol. 186, №8. - Pp. 4973–83.

115. Nischwitz, S. More CLEC16A Gene Variants Associated with Multiple Sclerosis / S. Nischwitz, S. Cepok, A. Kroner et al. // *Acta neurologica Scandinavica*. - 2011. - Vol.123, №6. - Pp. 400–406.

116. Nyirenda, M.H. TLR2 Stimulation Drives Human Naive and Effector Regulatory T Cells into a Th17-like Phenotype with Reduced Suppressive Function. / M.H. Nyirenda, L. Sanvito, P.J. Darlington et al. // *Journal of immunology*. - 2011. - Vol, 187, №5. - Pp. 2278–2290.

117. O’Keeffe, J. T-Cells Expressing Natural Killer (NK) Receptors Are Altered in Multiple Sclerosis and Responses to Alpha-Galactosylceramide Are Impaired / J. O’Keeffe, C.M. Gately, T. Counihan et al. // *Journal of the neurological sciences*. - 2008. - Vol. 275, № 1-2. - Pp. 22–28.

118. Ohler, B. Role of Lipid Interactions in Autoimmune Demyelination / B. Ohler, K. Graf, R. Bragg et al. // *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. - 2004. - Vol.1688, №1. - Pp.10–17.

119. Olson, J.K. Microglia Initiate Central Nervous System Innate and Adaptive Immune Responses through Multiple TLRs. / J.K. Olson and S.D. Miller // *Journal of immunology*. - 2004. - Vol. 173, №6. - Pp. 3916–24.

120. Pachner, A.R. Chemokine Biomarkers in Central Nervous System Tissue and Cerebrospinal Fluid in the Theiler’s Virus Model Mirror Those in Multiple Sclerosis / A.R. Pachner, L. Li, and F. Gilli // *Cytokine*. - 2015. Vol. 76, №2. - Pp. 577–580.

121. Podbielska, M. Molecular and Immunogenic Features of Myelin Lipids: Incitants or Modulators of Multiple Sclerosis? / M. Podbielska, and E. L. Hogan // *Multiple sclerosis*. - 2009. - Vol. 15, №9. - Pp. 1011–29.
122. Podda, G. Innate Immune Responses in the CNS: Role of Toll-like Receptors, Mechanisms, and Therapeutic Opportunities in Multiple Sclerosis / G. Podda, M. Nyirenda, J. Crooks, and B. Gran // *Journal of neuroimmune pharmacology: the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*. - 2013. - Vol.8, №4. - Pp. 791–806.
123. Polman, C.H. Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald Criteria / C.H. Polman, S.C. Reingold, B. Banwell et al. // *Annals of neurology*. - 2011. Vol. 69, №2. - Pp. 292–302.
124. Popescu, B.F.Gh. Pathology of Demyelinating Diseases / B.F.Gh. Popescu and C.F. Lucchinetti // *Annual review of pathology*. - 2012. - Vol. 7. - Pp. 185–217.
125. Prinz, M. Innate Immunity Mediated by TLR9 Modulates Pathogenicity in an Animal Model of Multiple Sclerosis / M. Prinz, F. Garbe, H. Schmidt et al. // *The Journal of clinical investigation*. - 2006. - Vol.116, №2. - Pp. 456–64.
126. Quintana, F.J. Antigen Microarrays Identify Unique Serum Autoantibody Signatures in Clinical and Pathologic Subtypes of Multiple Sclerosis / F.J. Quintana, M.F. Farez, V. Viglietta et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. - 2008. - Vol.105, №48. - Pp. 18889–94.
127. Ramsaransing, G.S.M. Benign Course in Multiple Sclerosis: A Review. / G.S.M. Ramsaransing, and J. De Keyser // *Acta neurologica Scandinavica*. - 2006. - Vol. 113, №6. - Pp. 359–369.
128. Reynolds, J.M. Toll-like Receptor 2 Signaling in CD4(+) T Lymphocytes Promotes T Helper 17 Responses and Regulates the Pathogenesis of Autoimmune Disease / J.M. Reynolds, B.P. Pappu, J. Peng et al. // *Immunity*. - 2010. - Vol. 32, №5. - Pp. 692–702.

129. Roeske-Nielsen, A. Beta-Galactosylceramide Increases and Sulfatide Decreases Cytokine and Chemokine Production in Whole Blood Cells / A. Roeske-Nielsen, P. Fredman, J.E. Mansson et al. // *Immunology letters*. - 2004. - Vol.91, №2-3. - Pp. 205–11.
130. Rui, L. Resistance to CpG DNA-Induced Autoimmunity through Tolerogenic B Cell Antigen Receptor ERK Signaling / L. Rui, C.G. Vinuesa, J. Blasioli, and Ch.C. Goodnow // *Nature immunology*. - 2003. - Vol.4, №6. - Pp. 594–600.
131. Sadatipour, B.T. Increased Circulating Antiganglioside Antibodies in Primary and Secondary Progressive Multiple Sclerosis / B.T. Sadatipour, J.M. Greer, and M. P. Pender // *Annals of neurology*. - 1998. - Vol. 44, №6. - Pp. 980–83.
132. Sastre-Garriga, J. Anticardiolipin Antibodies Are Not a Useful Screening Tool in a Nonselected Large Group of Patients with Multiple Sclerosis / J. Sastre-Garriga, J.C. Reverter, J. Font et al. // *Annals of neurology*. - 2001. - Vol. 49, №3. - Pp. 408–411.
133. Scarpini, E. IP-10 and MCP-1 Levels in CSF and Serum from Multiple Sclerosis Patients with Different Clinical Subtypes of the Disease / E. Scarpini, D. Galimberti, P. Baron et al. // *Journal of the neurological sciences*. - 2002. - Vol. 195, №1. - Pp.41–46.
134. Serafini, B. Detection of Ectopic B-Cell Follicles with Germinal Centers in the Meninges of Patients with Secondary Progressive Multiple Sclerosis / B. Serafini, B. Rosicarelli, R. Magliozzi et al. // *Brain pathology*. - 2004. - Vol. 14, №2. - Pp. 164–174.
135. Shamshiev, A. Self Glycolipids as T-Cell Autoantigens / A. Shamshiev, A. Donda, I. Carena et al. // *European journal of immunology*. - 1999. - Vol. 29, №5. - Pp. 1667–75.
136. Sharma, N. Sphingosine-1-Phosphate Suppresses TLR-Induced CXCL8 Secretion from Human T Cells / N. Sharma, A.S. Akhade, and A. Qadri // *Journal of leukocyte biology*. - 2013. - Vol.93, №4. - Pp. 521–528.
137. Shen, W. Inhibition of TLR Activation and up-Regulation of IL-1R-Associated

- Kinase-M Expression by Exogenous Gangliosides / W. Shen, K. Stone, A. Jales, et al. // *Journal of immunology*. - 2008. - Vol. 180, №7. - Pp. 4425–32.
138. Simpson, J.E. Expression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 and Other Beta-Chemokines by Resident Glia and Inflammatory Cells in Multiple Sclerosis Lesions / J.E. Simpson, J. Newcombe, M.L. Cuzner, and M.N. Woodroffe // *Journal of neuroimmunology*. - 1998. - Vol. 84, №2. - Pp. 238–49.
139. Snir, O. G-CSF Enhances the Adhesion of Encephalitogenic T Cells to Extracellular Matrix Components: A Possible Mechanism for Exacerbation of Multiple Sclerosis / Snir, O., G. Lavie, A. Achiron et al. // *Journal of neuroimmunology*. - 2006. - Vol. 172, №1-2. - Pp.145–155.
140. Sospedra, M. Immunology of Multiple Sclerosis / M. Sospedra, and R. Martin // *Seminars in neurology*. - 2016. - Vol.36, №2. - Pp. 115–127.
- 141 De Stefano, N. Diffuse Axonal and Tissue Injury in Patients with Multiple Sclerosis with Low Cerebral Lesion Load and No Disability / N. De Stefano, S. Narayanan, S.J. Francis et al. // *Archives of neurology*. - 2002. Vol.59, №10. - Pp. 1565–71.
142. Sternberg, Z. Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products in Multiple Sclerosis: A Potential Marker of Disease Severity / Z. Sternberg, B. Weinstock-Guttman, D. Hojnacki et al. // *Multiple sclerosis*. - 2008. - Vol. 14, №6. - Pp. 759–763.
143. Stevens, A. CSF and Serum Ganglioside Antibody Patterns in MS / A. Stevens, M. Weller, and H. Wiethölter // *Acta Neurologica Scandinavica*. - 1992. - Vol. 86, №5. - Pp. 485–489.
144. Storch, M.K. Multiple Sclerosis: In Situ Evidence for Antibody- and Complement-Mediated Demyelination / M.K. Storch, S. Piddlesden, M. Haltia et al. // *Annals of neurology*. - 1998. - Vol. 43, №4. - Pp. 465–471.
145. Teunissen, C.E. Consensus Guidelines for CSF and Blood Biobanking for CNS Biomarker Studies / C.E. Teunissen, H. Tumani, J.L. Bennett et al. // *Multiple sclerosis international*. - 2011. - Vol. 2011. - Pp. 246412.

146. Thangarajh, M. Lipid-Specific Immunoglobulin M in CSF Predicts Adverse Long-Term Outcome in Multiple Sclerosis / M. Thangarajh, J. Gomez-Rial, A.K. Hedström et al. // *Multiple sclerosis*. - 2008. - Vol. 14, №9. - Pp.1208–13.
147. Touil, T. Cutting Edge: TLR3 Stimulation Suppresses Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Inducing Endogenous IFN-Beta / T. Touil, D. Fitzgerald, G.X. Zhang et al. // *Journal of immunology*. - 2006. - Vol. 177, №11. - Pp. 7505–9.
148. Valentino, P. Anti-GM1 Antibodies Are Not Associated with Cerebral Atrophy in Patients with Multiple Sclerosis / P. Valentino, A. Labate, R. Nisticò et al. // *Multiple sclerosis*. - 2009. - Vol.15, №1. - Pp. 114–115.
149. Venken, K. Compromised CD4⁺ CD25(high) Regulatory T-Cell Function in Patients with Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis Is Correlated with a Reduced Frequency of FOXP3-Positive Cells and Reduced FOXP3 Expression at the Single-Cell Level / K. Venken, N. Hellings, M. Thewissen et al. // *Immunology*. - 2008. - Vol. 123, №1. - Pp. 79–89.
150. Venken, K. Natural Naive CD4⁺CD25⁺CD127^{low} Regulatory T Cell (Treg) Development and Function Are Disturbed in Multiple Sclerosis Patients: Recovery of Memory Treg Homeostasis during Disease Progression / K. Venken, N. Hellings, T. Broekmans, et al. // *Journal of immunology*. - 2008. - Vol. 180, №9. - Pp. 6411–20.
151. Villar, L.M. Cerebrospinal Fluid Immunological Biomarkers Associated with Axonal Damage in Multiple Sclerosis / L.M. Villar, C. Picón, L. Costa-Frossard et al. // *European Journal of Neurology*. - 2015. - Vol. 22, №8. - Pp. 1169–75.
152. Villar, L.M. Early Differential Diagnosis of Multiple Sclerosis Using a New Oligoclonal Band Test / L.M. Villar, J. Masjuan, M.C. Sádaba et al. // *Archives of Neurology*. - 2005. - Vol. 62, №4. - P. 574.
153. Villar, L.M. CSF Oligoclonal Band Patterns Reveal Disease Heterogeneity in Multiple Sclerosis / L.M. Villar, T. Masterman, B. Casanova et al. // *Journal of Neuroimmunology*. - 2009. - Vol. 211, №1. - Pp. 101–4.

154. West, A.P. Gangliosides Inhibit Flagellin Signaling in the Absence of an Effect on Flagellin Binding to Toll-like Receptor 5 / A.P. West, B.A. Dancho, and S.B. Mizel // *The Journal of biological chemistry*. - 2005. - Vol. 280, № 10. - Pp. 9482–88.
155. Wheeler, D. A Defect of Sphingolipid Metabolism Modifies the Properties of Normal Appearing White Matter in Multiple Sclerosis / D. Wheeler, V. Venkata, R. Bandaru et al. // *Brain : a journal of neurology*. - 2008. - Vol.131, Pt 11. - Pp. 3092–3102.
156. Xu, Y. Removal of Phospho-Head Groups of Membrane Lipids Immobilizes Voltage Sensors of K⁺ Channels. / Y. Xu, Y. Ramu, and Z. Lu // *Nature*. - 2008. - Vol. 451, №7180. - Pp. 826–829.
157. Yamasaki, R. Differential Roles of Microglia and Monocytes in the Inflamed Central Nervous System / R. Yamasaki, H. Lu, O. Butovsky et al. // *The Journal of experimental medicine*. - 2014. - Vol. 211, №8. - Pp. 1533–49.
158. Zaprianova, E. Serum IgG and IgM Ganglioside GM1 Antibodies in Patients with Multiple Sclerosis / E. Zaprianova, K. Majtényi, D. Deleva et al. // *Ideggyógyászati szemle*. - 2004. - Vol. 57, № 3-4. - Pp. 94–99.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

159. Воробьева, А.А. Биомаркеры рассеянного склероза (обзор литературы и собственные данные / А.А. Воробьева, М.В. Иванова, В.В. Фоминых и соавт. // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. - 2013. - Т.113, №10-2. - С. 23-31.
160. Иванова, М.В. Липиды миелина в развитии аутоиммунных реакций при рассеянном склерозе. / М.В. Иванова, А.И. Тухватулин, А.Ш. Джаруллаева, Д.Ю. Логунов, М.Н. Захарова // Журнал "Нейрохимия". - 2014. - Т.31, №4. - С. 269-275.
161. Иванова, М.В. Антитела к липидам миелина при рассеянной склерозе / М.В. Иванова, Захарова М.Н. // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. - 2016. - Т. 10, №2. - С. 23-27.
162. Захарова, М.Н. Биомаркеры при рассеянном склерозе / М.Н. Захарова, М.В. Иванова, И.А. Кочергин, О.А. Толпеева // Альманах: Демиелинизирующие заболевания. Материалы школы Научного центра неврологии (ФГБНУ НЦН) по демиелинизирующим заболеваниям нервной системы. - 2016. - С. 40-50.
163. Иванова, М.В. Аутоиммунные реакции с участием липидов миелина при рассеянном склерозе / М.В. Иванова, М.Н. Захарова // Нейроиммунология. - 2015. - Т. 13, № 1-2. - с. 44.
164. Иванова, М.В. Роль липидов миелина при рассеянном склерозе / М.В. Иванова, М.Н. Захарова // Журнал неврологии и психиатрии имени С.С.Корсакова. - 2015. - Т.8, № 2. - С. 58.
165. Иванова М.В. Дифференциальная диагностика рассеянного склероза / М.В. Иванова, Т.О. Симанив, И.С. Бакулин, и соавт. // Альманах: Демиелинизирующие заболевания. Материалы школы Научного центра неврологии (ФГБНУ НЦН) по демиелинизирующим заболеваниям нервной системы. - 2016. - С. 50-66.
166. Иванова, М.В. Влияние липидов миелина на реакции врожденного иммунитета / М.В. Иванова, А.И. Тухватулин, А.Ш. Джаруллаева, Д.Ю. Логунов, М.Н. Захарова // Нейроиммунология. - 2016. - Т. 13, № 1-2. - С. 36.

167. Ivanova, M. Antibodies to myelin lipids in multiple sclerosis / M. Ivanova, M. Zakharova // *European Journal of Neurology*. - 2016. - Vol. 23, S2. - Pp. 196.
168. Ivanova, M. Anti-glycolipid antibodies in multiple sclerosis / M. Ivanova, E. Lysogorskaia, A. Poidasheva, M. Zakharova // *Multiple Sclerosis Journal*. - 2015. - Vol. 21, S11. - P. 779
169. Ivanova M. Sulfatide autoreactivity in multiple sclerosis / M. Ivanova, A. Tukhvatulin, A. Dzharullaeva, D. Logunov, M. Zakharova // *Journal of Neuroimmunology*. - 2014. - Vol. 275. - Pp. 102-103.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Критерии Макдональда

Клинические проявления	Дополнительные данные, необходимые для постановки диагноза РС
<p>≥2 обострений; клинические признаки наличия 2 очагов или клинические признаки наличия 1 очага и достоверные анамнестические данные об обострении заболевания в прошлом</p>	<p>Нет</p>
<p>≥2 обострений; клинические признаки наличия 1 очага</p>	<p>Признаки диссеминации в пространстве: ≥1 очагов в режиме T2 в по крайней мере 2 из 4 типичных локализаций очагов РС в ЦНС (перивентрикулярно, юкстакортикально, инфратенториально или в спинном мозге) или ожидать следующего клинического обострения с возникновением симптоматики, характерной для поражения другой области ЦНС</p>
<p>1 обострение, клинические данные указывают на наличие ≥2 очагов в</p>	<p>Признаки диссеминации во времени: Одновременное присутствие</p>

ЦНС	асимптомных очагов, накапливающих контраст и не накапливающих контраст или образование новых очагов в режиме T2 или накопление контраста каким-либо очагов при контрольном исследовании или развитие второго обострения
обострение, клинические данные указывают на наличие 1 очага в ЦНС (клинически изолированный синдром)	Признаки диссеминации во времени и пространстве (см. выше)
Постепенное прогрессирование неврологической симптоматики, характерной для РС (ППРС)	<p>Прогрессирование заболевания на протяжении года (по проспективным или ретроспективным данным) + наличие 2 из 3 следующих критериев:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Признаки диссеминации в пространстве 2. Наличие ≥ 2 очагов, гиперинтенсивных в режиме T2 в спинном мозге 3. Выявление олигоклональных полос при изоэлектрофокусировании и/или повышенный IgG индекс

Приложение 2. Расширенная шкала инвалидности Kurtzke (EDSS)**Шкала оценки функциональных систем (ФС):**

1. Функции зрения
2. Стволовые функции
3. Пирамидная система
4. Мозжечковые функции
5. Чувствительность
6. Функции тазовых органов
7. Церебральные функции

Расчет балла по EDSS

0-3,5 баллов ставится только в том случае, если дистанция ходьбы не ограничена

0,0 – Норма в неврологическом статусе

1,0 – Минимальные признаки нарушений (1 балл) в одной функциональной системе (ФС), исключая церебральную.

1,5 – Минимальные признаки нарушений (1 балл) в более, чем одной ФС за исключением церебральной.

2,0 – Легкие нарушения (2 балла) в 1 ФС.

2,5 – Легкие нарушения (2 балла) в 2-х ФС.

3,0 – Умеренные нарушения (3 балла) в 1 ФС, либо легкие нарушения (2 балла) в 3-х или 4-х ФС.

3,5 – Умеренные нарушения (3 балла) в одной ФС и легкие (2 балла) в 1-2 ФС, либо умеренные нарушения (3 балла) в 2-х ФС, либо 2 балла в 5ФС.

4,0 – Выраженные нарушения (4 степени) в 1 ФС, либо сочетание меньших баллов, оговоренных для более низкого значения EDSS. Может пройти без посторонней помощи или остановки до 500 м.

4,5 – Выраженные нарушения (4 степени) в 1 ФС, либо сочетание меньших

баллов, оговоренных для более низкого значения EDSS. Может пройти без посторонней помощи или остановки около 300 м.

5,0 – Может пройти без посторонней помощи или остановки около 200м. Повседневная активность нарушена. В 1ФС-5 баллов, либо сочетание меньших баллов, оговоренных для более низкого значения EDSS.

5,5 – Может пройти без посторонней помощи или остановки около 100м. Повседневная активность ограничена. В 1ФС-5 баллов, либо сочетание меньших баллов, оговоренных для более низкого значения EDSS.

6,0 – Ходьба с односторонней поддержкой около 100 м без отдыха.

6,5 – Ходьба с постоянной поддержкой около 20 м без отдыха.

7,0 – Не может пройти даже и 5 м без помощи, может передвигаться в пределах комнаты с двусторонней опорой. Прикован к инвалидной коляске, в которую перемещается самостоятельно. Посторонняя помощь не требуется.

7,5 – Может пройти всего несколько шагов. Передвигается только в инвалидной коляске. Требуется помощь в передвижении и перемещении в коляску.

8,0 – Прикован к кровати/стулу или передвигается в инвалидной коляске. Может находиться вне постели большую часть дня. Основные функции самообслуживания сохранены. Активно пользуется руками.

8,5 – Прикован к постели большую часть дня. В некоторой степени может пользоваться руками. Самообслуживание частичное.

9,0 – Беспомощный, прикованный к постели больной. Может общаться и есть 9,5

– Полностью беспомощный, прикованный к постели больной. Не может полноценно общаться и/или есть/глотать.

10 – Смерть из-за рассеянного склероза.