

*На правах рукописи*

**ИВАНОВА МАРИЯ ВАСИЛЬЕВНА**

**РОЛЬ ЛИПИДОВ МИЕЛИНА В ИММУНОПАТОГЕНЕЗЕ  
РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА**

14.01.11 – Нервные болезни

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Москва – 2016

**Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научный центр неврологии».**

**Научный руководитель:**  
Доктор медицинских наук

**Захарова Мария Николаевна**

**Научный консультант:**  
Доктор биологических наук,  
член-корреспондент РАН

**Логунов Денис Юрьевич**

**Официальные оппоненты:**

**Котов Сергей Викторович**, доктор медицинских наук, профессор, руководитель неврологического отделения, заведующий кафедрой неврологии факультета усовершенствования врачей Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»;

**Тоголян Наталья Агафоновна**, доктор медицинских наук, профессор кафедры нервных болезней и нейрохирургии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Защита состоится:** 14 марта 2017 года в \_\_\_\_\_ часов на заседании Диссертационного совета Д 001.006.01 при ФГБНУ НЦН по адресу: 125367, город Москва, Волоколамское шоссе, дом 80.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ НЦН: 125367, город Москва, Волоколамское шоссе, дом 80 и на сайте [www.neurology.ru](http://www.neurology.ru)

**Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 года.**

**Ученый секретарь**

диссертационного совета Д 001.006.01,

кандидат медицинских наук \_\_\_\_\_ **Гнедовская Елена Владимировна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы 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 (Sospedra M. et al., 2016). Заболевание характеризуется клиническим полиморфизмом, разнообразием изменений, выявляемых при МРТ и других методах лабораторно-инструментальной диагностики. 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 (Демина Т.Л. и соавт., 2008). 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 (Переседова А.В. и соавт., 2012). 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 инициации и развитии демиелинизирующего процесса (Завалишин И.А. и соавт., 2003). 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 (Захарова М.Н. и соавт., 2011). 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) (Morris-Downes M.M. et al., 2002). 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, связанных с определенными гликолипидами (ганглиозиды) Т-клеточными рецепторами разных субпопуляций лимфоцитов (Lyons J.A., 2002). 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 (Podda G. et al., 2013). В результате взаимодействия этих рецепторов с лигандами происходит активация транскрипционных факторов, например, NF-κB, 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. (Constantin G. et al., 1994) В животных моделях было показано, что некоторые липиды миелина, такие как лактозилцерамиды или окисленные фосфолипиды могут влиять на тяжесть ЭАЭ (Mayo L. et al., 2014).

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 (Hauser S.L. et al., 2008; Monson N.L. et al., 2011). Роль В-клеточного звена иммунитета также была показана в некоторых животных моделях РС. У мышей с дефицитом В-клеток при иммунизации рекомбинантным миелиновым олигодендроглиновым гликопротеином (МОГ) не развивается ЭАЭ. Введение таким животным В-клеток или сыворотки, полученных от диких мышей, приводило к развитию клинических и гистологических признаков заболевания (Lyons J.A. et al., 2002). Об активации В-лимфоцитов у больных РС говорит выявление при изоэлектрофокусировании (ИЭФ) олигоклональных полос (ОСВ), состоящих из иммуноглобулинов, 70-97% больных (Joseph F.G. et al. 2004). В менингеальных оболочках пациентов с РС определяются структуры, содержащие В-клетки, схожие с лимфоидными фолликулами (Magliozzi R. et al., 2007).

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 (Alpa M. et al., 2007; Menge T. et al., 2005; Valentino et al., 2009). 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- $\kappa$ 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 (РРС) с высокой активностью заболевания и пациентов с быстрыми темпами нарастания инвалидности, которая выражалась в подавлении секреции провоспалительных цитокинов и хемокинов при стимуляции периферических мононуклеарных 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**

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 мононуклеарными 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.

### **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 моноклеарных клеток липидами миелина, различается у пациентов с РС и здоровых лиц. Эффект липидов миелина на секрецию цитокинов периферическими моноклеарными клетками различается в зависимости от структуры липида.
2. Профили секреции цитокинов, хемокинов и факторов роста периферическими моноклеарными 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.

### **Степень достоверности и апробация работы**

Достоверность полученных результатов определяется достаточным количеством наблюдений, четкой постановкой цели и задач, использованием в работе современных



биохимических и культуральных методов исследований, применением актуальных методов статистического анализа.

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); 31<sup>st</sup> 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), 2<sup>nd</sup> Congress of the European Academy of Neurology (Копенгаген, 2016), 32<sup>nd</sup> Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (Лондон, 2016).

### **Внедрение результатов работы**

Полученные результаты внедрены в практику работы 6-го неврологического отделения (нейроинфекционные заболевания) Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр неврологии».

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе 3 печатные работы в рецензируемых журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации.

### **Личный вклад автора**

Автору принадлежит определяющая роль в разработке протокола исследования, постановке задач, обосновании выводов и практических рекомендаций. Самостоятельно был проведен клинический осмотр пациентов, иммуноферментный анализ ЦСЖ и сыворотки крови, культуральные исследования и последующие обработка и статистический анализ полученных данных.

### **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, список сокращений, приложения. Библиографический указатель содержит 16 отечественных и 142 зарубежных источника литературы и 11 собственных публикаций автора, подготовленных по теме диссертационной работы.

## МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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. В группу контроля были включены 57 здоровых добровольцев, соответствующих по полу и возрасту пациентам с РС. Общая характеристика участников исследования приведена в Таблице 1.

Критерием включения в группу пациентов с РС был диагноз «достоверный РС» согласно критериям МакДональда (2010) и отсутствие других неврологических заболеваний. 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.

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 прогредиентного течения и принимавшиеся ранее препараты для лечения РС.

### Лабораторные методы исследования

У 29 пациентов с РС и 16 здоровых добровольцев из крови были выделены периферические мононуклеарные клетки (PBMC) для изучения профиля секреции цитокинов в ответ на стимуляцию липидами миелина. PBMC культивировались с добавлением к культуральной среде различных липидов: ганглиозидов GM4, GM2, GD1a, галактоцереброзидов, сульфатидов, фосфатидилхолина и без добавления липидов. После этого в культуральной среде проводилось определение концентраций 27 цитокинов, хемокинов и факторов роста с помощью набора Bio-Plex Pro™ Human Cytokine Standard 27-Plex, Group-1 kit (BioRad, USA): L-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , 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, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , PDGF, RANTES, TNF $\alpha$ , VEGF. Оценивался эффект липидов на секрецию различных биологически активных молекул PBMC и его связь с наличием и течением РС.

У 51 пациентов с РС и пациентов из группы сравнения было проведено определение концентраций цитокинов, хемокинов и факторов роста в ЦСЖ с помощью набора Bio-Plex Pro™ Human Cytokine Standard 27-Plex, Group-1 kit (BioRad, USA).

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. Анализ антител к гликолипидам проводился с помощью коммерческой тест-системы для качественного определения антител классов IgM и IgG к следующим гликолипидам: сульфатидам, GM1, GM2, GM3, GM4, GD1a, GD1b, GD2, GD3, GT1a, GT1b, GQ1b, - в сыворотке крови и ЦСЖ Anti-Ganglioside Dot (Generic Assays, Германия).

Результаты лабораторных исследований были сопоставлены с клиническими характеристиками, перечисленными выше.

Для изучения механизмов воздействия липидов миелина на рецепторы врожденного иммунитета были проведены эксперименты на клеточных линиях THP-1, HEK-293 и RAW-Blue, экспрессирующих различные виды паттерн-распознающих рецепторов, среди которых были Толл-подобные рецепторы (TLR2,3,4,5,7,8,9), NOD-подобные рецепторы (NLR1,2) и C-лектиновые рецепторы (Mincle, Clec6). Клетки стимулировались различными липидами миелина: ганглиозидами GM4, GM2, GD1a, галактоцереброзидами, сульфатидами, фосфатидилхолином, лактозилцерамидами и

холестеринсульфатом, - в течение 18 ч. Оценивалось изменение активности транскрипционных факторов NF- $\kappa$ B, AP-1, NFAT и изменение концентраций цитокинов, хемокинов и факторов роста в ответ на стимуляцию липидами. Транскрипционная активность факторов NF- $\kappa$ B, AP-1, NFAT анализировалась по активности продукта репортерных генов секретируемой эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP) или люциферазы. Измерение концентрации следующих цитокинов, хемокинов и факторов роста: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , 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, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , KC, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, TNF $\alpha$  - проводилось с помощью набора Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine Grp I Panel 23-Plex kit (BioRad, США).

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 о влиянии 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.

Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБНУ НЦН (протокол №10 от 06.11.13) Всеми пациентами было подписано информированное согласие.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 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. Возраст пациентов с РРС составил 31,5 [27; 40] лет, пациентов с ВПРС - 40 [36;44,5] лет. Среди пациентов с РРС было 35 мужчин и 67 женщин, среди пациентов с ВПРС — 11 мужчин и 23 женщины. Медиана балла по EDSS составила 2 [2; 3] и 6,5 [6; 7], соответственно. Длительность заболевания — 26 [5; 60] и 179 [109; 235] месяцев.

Для того чтобы выявить различия врожденного иммунного ответа на липиды миелина, в зависимости от 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 быстрыми темпами нарастания инвалидности, у которых в течение первых 5 лет заболевания балл по шкале EDSS  $\geq 5$  (n=8); 3) пациенты с РРС с высокой активностью: 2 и более обострений в год и/или множественные очаги (более 10) в головном/спинном мозге, накапливающие контрастное вещество (n=7). Основные клинические и демографические характеристики пациентов с различным течением РС представлены в Таблице 1.

**Таблица 1.** Общая характеристика пациентов с различным течением РС

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

### **Клинические прогностические факторы при РС**

Были проанализированы клинические признаки, связанные с развитием быстрыми темпами нарастания инвалидности и развитием доброкачественного течения РС.

У пациентов с быстрыми темпами нарастания инвалидности заболевание наиболее часто дебютировало с двигательных нарушений (37,5%) или отмечался полисимптомный дебют (37,5%), короткий интервал между первым и вторым обострениями от 12 до 40 месяцев (19,5[13,5;31,5]).

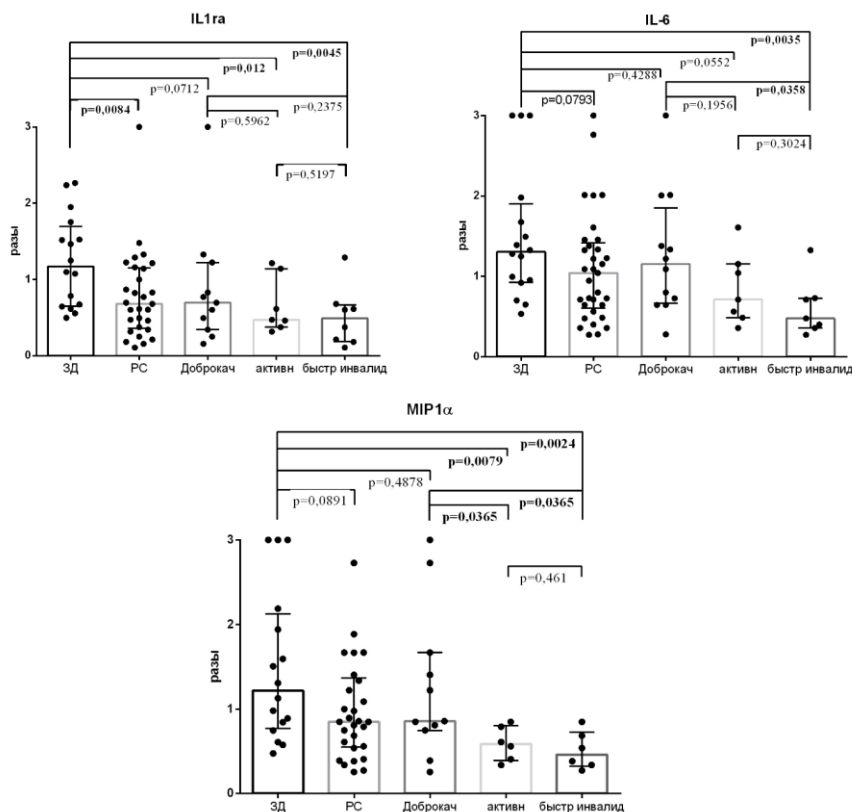
Для развития доброкачественного течения РС был характерен дебют с ретробульбарного неврита (41,7%) или расстройств чувствительности (33,3%), длинный интервал между первым и вторым обострением от 24 до 342 месяцев (180[99;180]), редкие обострения — медиана числа обострений составляла 2 при медиане длительности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

### **Влияние липидов на секрецию цитокинов мононуклеарными клетками**

Гликолипиды миелина подавляли продукцию определенных провоспалительных цитокинов и хемокинов, в число которых входили IL1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-17A, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , 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 РРС с высокой активностью, у пациентов с доброкачественным течением изменения концентрации провоспалительных цитокинов и хемокинов либо не происходило, либо оно было меньшим, чем в других группах пациентов.

Эффект на секрецию цитокинов и хемокинов РВМС различался в зависимости от структуры липидов. Наиболее выраженными изменения были при инкубации клеток с ганглиозидами (GM4, GM2, GD1a), среди которых наибольшим эффектом обладал GM4. Концентрации IL1 $\alpha$ , IL6, MIP-1 $\alpha$  после инкубации клеток с GM4 статистически значимо различались между группами здоровых добровольцев и пациентов с быстрыми темпами нарастания инвалидности и высокой активностью заболевания (Рис.1). 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 $\beta$ . Влияние галактоцереброзидов и сульфатидов было статистически незначимым. При инкубации PBMC, полученных от пациентов всех подгрупп и здоровых добровольцев, с фосфатидилхолином, концентрации всех изученных цитокинов и хемокинов оставались практически неизменными.



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

Как у пациентов, так и у здоровых добровольцев было выявлено снижение концентрации факторов роста 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 концентраций IL-10 и MCP-1 не происходило. У пациентов с РС снижение концентраций

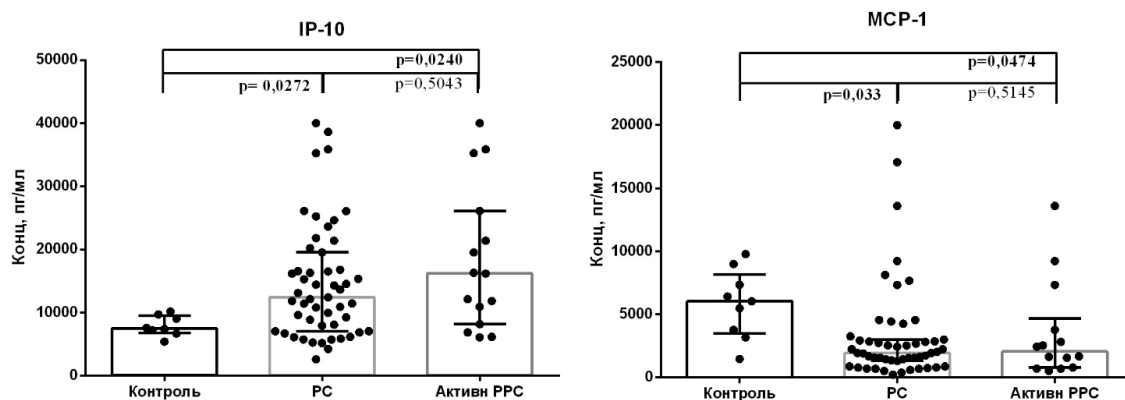


всех перечисленных цитокинов, хемокинов и факторов роста было более выраженным, чем у здоровых добровольцев, однако различие достигло статистической значимости только для IL-10 при инкубации с GD1a. Между группами пациентов с различным течением РС существенных различий по степени уменьшения концентраций цитокинов, хемокинов и факторов роста не выявлено.

### Профили цитокинов в цереброспинальной жидкости

Анализ концентраций цитокинов, хемокинов и факторов роста в ЦСЖ был проведен у 51 пациента с ремиттирующим течением РС в обострении заболевания и 9 пациентов группы сравнения, страдающих другими невоспалительными неврологическими заболеваниями. Среди пациентов была также выделена подгруппа с более высокой активностью заболевания, с более высокой частотой обострений и большей выраженностью неврологического дефицита по шкале EDSS (M=3,25).

Концентрации всех исследованных цитокинов и хемокинов, кроме IP-10 и MCP-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 равна 1,9 [1,3; 2,7] пг/мл, в группе сравнения — 6 [3,8; 7,3] пг/мл ( $p=0,033$ ) (Рис. 2). 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).



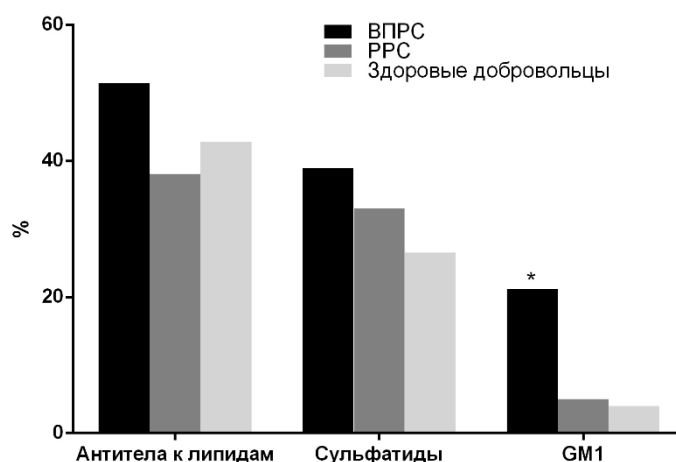
**Рисунок 2.** Концентрации IP-10 и MCP-1 в ЦСЖ у пациентов с РС и пациентов с другими неврологическими заболеваниями, Конц — концентрация

### Антитела к липидам миелина в биологических жидкостях

Анализ антител к гликолипидам миелина был проведен в сыворотке крови 78 пациентов с РРС, 33 пациентов с ВПРС и 49 здоровых добровольцев, а также в ЦСЖ 35 пациентов с РРС.

Антитела к липидам определялись у 38,1% пациентов с РРС, 51,4% пациентов с ВПРС и у 42,8% здоровых добровольцев. Статистически значимых различий между группами не выявлено. В ЦСЖ антитела к липидам выявлялись лишь в редких случаях. Зависимости между обнаружением антител к липидам в сыворотке и ЦСЖ выявлено не было. Среди антител к липидам наиболее часто обнаруживались антитела к сульфатидам, к GM1 у пациентов с ВПРС. Антитела к сульфатидам выявлялись в сыворотке у 30,3% пациентов с РРС, 40% пациентов с ВПРС и у 26,5% здоровых добровольцев (Рис. 3). Статистически значимых различий между частотой выявления антител к сульфатидам классов IgM, IgG и общей частотой выявления антител к сульфатидам 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. 3). 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 ( $p=0,04$ ).



**Рисунок 3.** Антитела к липидам миелина в сыворотке крови. \*  $p<0,05$ .

При анализе корреляций между наличием в сыворотке крови антител к гликолипидам в целом, сульфатиду и клиническими и демографическими показателями, взаимосвязей ни в одной из изученных групп выявлено не было. Была выявлена корреляция наличия антител к GM1 и числом обострений в группе пациентов с ВПРС ( $p=0,03$ ). Убедительных взаимосвязей этого показателя с другими клиническими характеристиками не определялось.

### **Клинико-иммунологические маркеры различных вариантов течения РС**

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 сульфатиды, 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, короткий интервал между первым и вторым обострениями. При стимуляции РВМС этих пациентов ганглиозидами, в наибольшей степени GM4, происходит выраженное подавление продукции некоторых провоспалительных цитокинов и хемокинов: IL1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-17A, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ . Полученный результат говорит о развитии толерантности клеток врожденного иммунитета к провоспалительным стимулам у пациентов с быстрыми темпами нарастания инвалидности и указывает на возможное прогностическое значение анализа врожденного иммунного ответа к липидам миелина при РС.

Для пациентов с доброкачественным течением характерны дебют заболевания с оптического неврита или расстройств чувствительности, редкие обострения, длинный интервал между первым и вторым обострениями. 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 ремиттирующим течением с высокой активностью заболевания характерно умеренное подавление продукции IL1ra, IL-6, IL-8, IL-17A, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  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.

Клинико-иммунологическая характеристика пациентов с РС представлена в Таблице 2.

Таблица 2. 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 РВМС 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 IL1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-17A, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ 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 IL1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-17A, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ при воздействии ганглиозидов, в наибольшей степени GM4	-	-	-
РРС с высокой активностью	-	Умеренное подавление продукции IL1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-17A, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ при воздействии ганглиозидов, в наибольшей степени GM4	-	Выраженное повышение концентрации IP-10	-
Вторично-прогрессирующее	-	-	-	-	Повышение частоты серопозитивности по антителам к GM1 ( $p<0,05$ )**

\* сравнение проводилось с пациентами с другими невоспалительными неврологическими заболеваниями

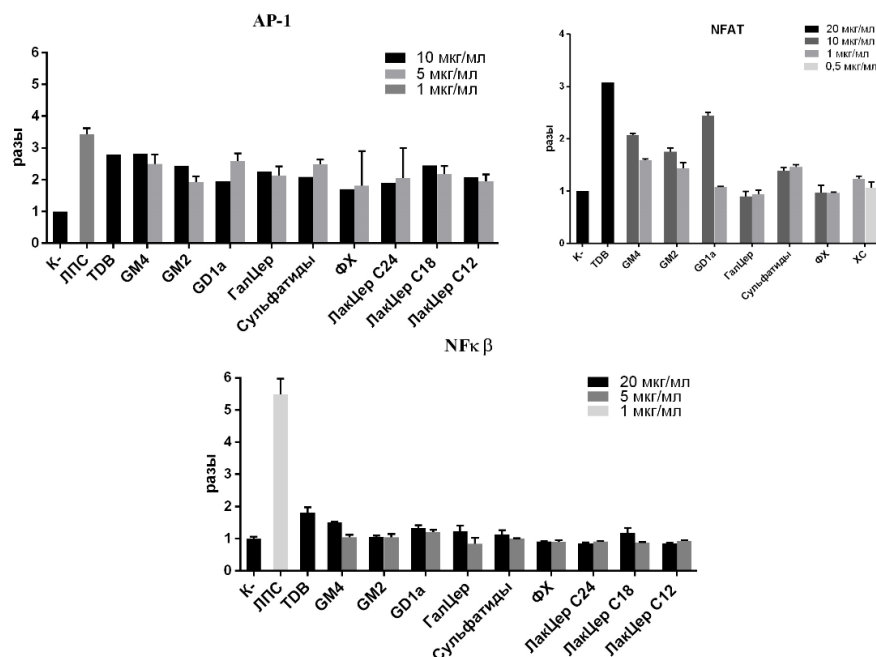
\*\* сравнение проводилось со здоровыми добровольцами и пациентами с ремиттирующим течением

## Механизмы взаимодействия липидов с компонентами врожденного иммунитета

Чтобы изучить механизмы воздействия липидов на компоненты врожденного иммунитета, в экспериментах на клеточных линиях была проведена сравнительная характеристика различных липидов миелина по способности активировать разные виды рецепторов врожденного иммунитета, транскрипционные факторы и влиять на секрецию цитокинов, хемокинов и факторов роста.

### Влияние липидов на активность транскрипционных факторов в клеточных линиях

Среди исследованных липидов наиболее существенное влияние на активность фактора NF-κB оказывал лишь лактозилцерамиды C18 (в 2,23 раз). В основном, при стимуляции клеток липидами миелина существенного увеличения активности фактора NF-κB 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) (Рис. 4).



**Рисунок 4.** Влияние липидов миелина на активность транскрипционных факторов AP-1, NFAT, NF-κB в экспериментах на клеточных линиях RAW-Blue.

Все исследованные липиды, вызывали увеличение активности фактора AP-1 (Рис. 4). 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). Наименее выраженным воздействием на активность

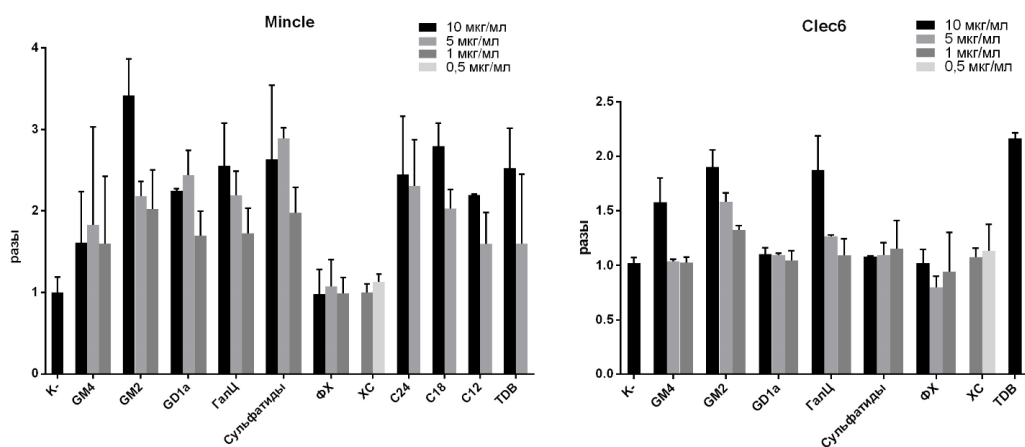
фактора AP-1 обладал фосфолипид фосфатидилхолин. Действие липидов на активность фактора AP-1 было сопоставимо с действием собственного лиганда лектиновых рецепторов TDB.

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.

Полученные данные указывают на возможность липидов запускать реакции врожденного иммунитета, а также на различие между эффектами, вызываемыми разными классами липидов. Наиболее выраженной способностью активировать провоспалительные транскрипционные факторы обладают ганглиозиды и лактозилцерамиды.

#### Определение рецепторов врожденного иммунитета, взаимодействующих с липидами

При инкубации клеток, экспрессирующими отдельные виды Толл-подобных рецепторов (TLR 2,3,4,5,7,8,9), NOD-подобных рецепторов (NLR1,2) с липидами миелина увеличения активности транскрипционных факторов отмечено не было. В то же время, было показано, что 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 (Рис. 5).



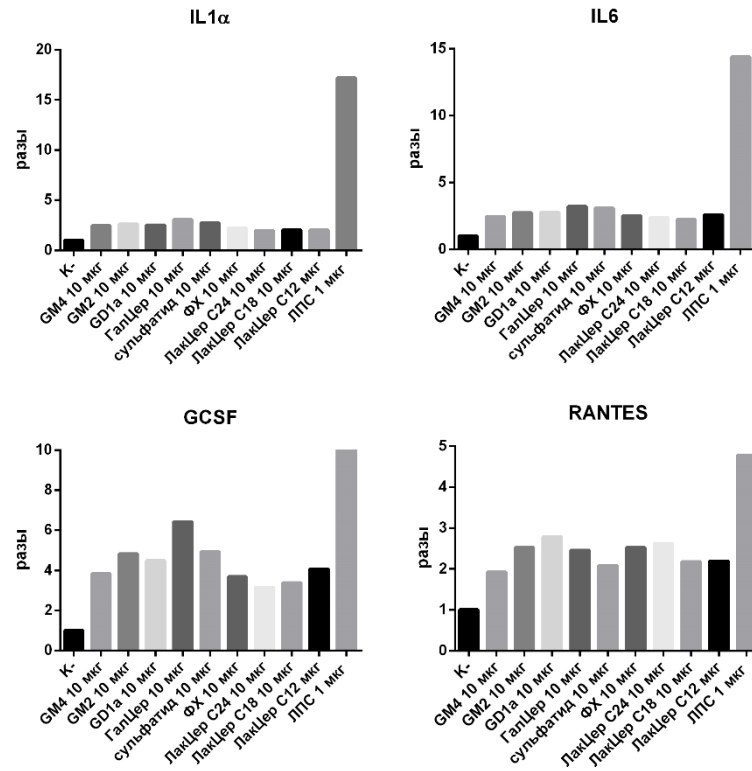
**Рисунок 5.** Влияние липидов на активность AP-1 в экспериментах на клеточных линиях HEK-293-Mincle и HEK-293-Clec6

Наиболее выраженной способностью активировать транскрипционный фактор AP-1 в клетках, экспрессирующих рецепторы Mincle и Clec6b, обладает ганглиозид GM2 (в 3,42 и 1,9 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).

#### Влияние липидов на секрецию цитокинов и хемокинов в клеточных линиях

Профиль секреции цитокинов, хемокинов и факторов роста при стимуляции клеток RAW-Blue липидами был схожим с профилем, выявляемым при добавлении ЛПС - лигандом рецептора TLR-4, играющего одну из ключевых ролей в развитии воспаления: выявлялось повышение концентраций IL-1 $\alpha$ , IL-3, IL-5, IL-6, IL12(p40), IL12(p70), IL-17A, G-CSF, IFN $\gamma$ , KC, RANTES. Основными отличиями ЛПС от липидов по способности индуцировать продукцию цитокинов и хемокинов являются: более выраженный эффект ЛПС на концентрации цитокинов, повышение экспрессии TNF $\alpha$  при взаимодействии клеток с ЛПС, а также отсутствие изменений концентрации хемокинов MIP-1 $\alpha$  и MIP-1 $\beta$  при инкубации клеток с ЛПС. Наиболее выраженным при воздействии всех липидов миелина и ЛПС было повышение концентраций IL-1 $\alpha$ , IL-6, G-CSF, RANTES (Рис. 6). Среди липидов наибольшее изменение экспрессии IL-1 $\alpha$ , IL-6, G-CSF вызывали галактоцереброзиды и сульфатиды, при стимуляции клеток которыми происходило увеличение концентраций: IL-1 $\alpha$  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).





**Рисунок 6.** Изменение концентраций цитокинов и хемокинов при инкубации липидов миелина с клеточными линиями RAW-Blue

## 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 (IL1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-17A, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ ), 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 (IL1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-17A, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ ) 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 T-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-прогредиентное 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 НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. 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.
2. **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.
3. **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.
4. 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.
5. **Иванова М.В.** Дифференциальная диагностика рассеянного склероза / М.В. Иванова, Т.О. Симанив, И.С. Бакулин, А.А. Воробьева, А.В. Васильев, М.Н. Захарова // Альманах: Демиелинизирующие заболевания. Материалы школы

Научного центра неврологии (ФГБНУ НЦН) по демиелинизирующим заболеваниям нервной системы. - 2016. - С. 50-66.

6. **Ivanova, M.** Sulfatide autoreactivity in multiple sclerosis / M. Ivanova, A. Tikhvatulin, A. Dzharullaeva, D. Logunov, M. Zakharova // *Journal of Neuroimmunology*. - 2014. - Vol. 275. - Pp. 102-103.
7. **Иванова, М.В.** Аутоиммунные реакции с участием липидов миелина при рассеянном склерозе / М.В. Иванова, М.Н. Захарова // *Нейроиммунология*. - 2015. - Том 12, № 1-2. - С. 44.
8. **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.
9. **Ivanova, M.**, Anti-glycolipid antibodies in multiple sclerosis / M. Ivanova, E. Lysogorskaia, A. Poidasheva, M. Zakharova // *Multiple Sclerosis Journal*. - Vol. 2015, №1, S11. - P. 779.
10. **Ivanova, M.** Antibodies to myelin lipids in multiple sclerosis / M. Ivanova, M. Zakharova // *European Journal of Neurology*. - 2016. - Vol. 23, S2. - P. 196.
11. **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.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

- ВПСР - 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
- АР-1 – активирующий протеин-1
- EDSS — расширенная шкала инвалидности Kurtzke
- G-CSF - гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
- GM-CSF - гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
- НЕК-293 - линии человеческих эмбриональных клеток почек
- IFN- $\gamma$  - интерферон гамма
- IgG – иммуноглобулин класса G
- IgM - иммуноглобулин класса M
- IL – интерлейкин
- IP-10 - интерферон-гамма-индуцируемого белка-10
- КС - кератиноцитарный хемокин
- МСР-1 - моноцитарный хемотаксический белок 1
- MIP-1 $\alpha$  - макрофагальный белок воспаления 1 альфа
- MIP-1 $\beta$  - макрофагальный белок воспаления 1 бета
- NFAT – ядерный фактор активированных Т-клеток
- NF- $\kappa$ B – ядерный фактор каппа бета
- PBMC — периферические мононуклеарные клетки крови
- RANTES - хемокин, выделяемый Т-клетками при активации
- RAW - линии макрофагоподобных клеток, трансформированных вирусом лейкоза Абельсона
- SEAP - секретлируемая эмбриональная щелочная фосфатаза

THP-1 - человеческая линия клеток острого моноцитарного лейкоза

TDB – трегалоза-6,6-дибегенат

TLR – Толл-подобные рецепторы

TNF $\alpha$  - фактор некроза опухолей альфа