

ФОМИНЫХ ВЕРА ВЛАДИМИРОВНА

**АНАЛИЗ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ И НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ
У ПАЦИЕНТОВ С АУТОИММУННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЦЕНТРАЛЬНОЙ
НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ**

14.01.11 – Нервные болезни

03.03.01 – Физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук и Государственном бюджетном учреждении здравоохранения города Москвы «Городская клиническая больница имени В.М. Буянова департамента здравоохранения города Москвы».

Научные руководители:

Кандидат медицинских наук
Доктор биологических наук, профессор

Брылев Лев Вадимович
Гуляева Наталия Валерьевна

Официальные оппоненты:

Давыдовская Мария Вафаевна доктор медицинских наук, профессор кафедры неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики лечебного факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Скальный Анатолий Викторович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой медицинской элементологии федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Российский университет дружбы народов"

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится: «__» _____ мая _____ 2019 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

Автореферат разослан «__» _____ 2019 года.

Учёный секретарь
диссертационного совета Д 001.006.01,
кандидат медицинских наук

Лысогорская Елена Владимировна

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности

Нейроиммунология и нейроиммунные взаимодействия — одна из самых «горячих» тем физиологии нервной системы и неврологии в настоящее время, так как нейровоспаление считается важным звеном патогенеза многих церебральных патологий. Для формирования наиболее полного представления о функционировании клеток иммунной системы изучаются их физиологические функции в норме и при патологии (Тишкина А.О. и др., 2014). В центральной нервной системе (ЦНС) процессы нейровоспаления и нейродегенерации в ряде случаев запускают друг друга и далее протекают параллельно, поэтому их изучение актуально для нейродегенеративных и нейровоспалительных заболеваний. Наиболее полно взаимодействие и изменение данных процессов можно проследить при аутоиммунных заболеваниях ЦНС.

Аутоиммунные заболевания ЦНС (или иммуноопосредованные в отсутствие точно выделенного патологического антигена) — это спектр мультифакторных заболеваний, при которых происходит повреждение ЦНС вследствие аутоиммунного острого или хронического воспалительного процесса. Ранее считалось, что активация иммунной системы является ведущим патогенетическим фактором при рассеянном склерозе (РС), остром рассеянном энцефаломиелите (ОРЭМ) и поражении ЦНС при системных заболеваниях. Однако сейчас спектр данных заболеваний расширен. Описаны группа аквапорин-4 (AQP4) ассоциированных синдромов, включая оптикомиелит Девика (ОМ), и группа аутоиммунных энцефалитов (АЭ) идиопатической и паранеопластической этиологии (Пирадов М.А. и др., 2015, Hermetter C. et al., 2018). С развитием магнитно-резонансной томографии (МРТ) и других высокотехнологичных методов данные заболевания стали диагностироваться раньше и чаще. Эти заболевания находятся в центре внимания «аутоиммунной неврологии», одной из наиболее социально и экономически значимых областей современной неврологии, в связи с высокой распространённостью среди лиц молодого возраста и потенциальной излечимостью.

На сегодняшний день наиболее полно изучен патогенез РС — демиелинизирующего заболевания ЦНС, одного из самых распространенных среди лиц молодого возраста (Cotsapas C. et al., 2018). Проявления РС крайне разнообразны, однако не существует достоверных маркеров, позволяющих диагностировать заболевание на ранней стадии, а также дифференцировать его от других аутоиммунных заболеваний ЦНС. Первостепенную роль в его патогенезе играют процессы нейровоспаления, однако именно с нейродегенеративными изменениями связано развитие стойкого неврологического дефицита и инвалидизации (Filippi M et al., 2013, Давыдовская М.В. и др., 2012). При отсутствии специфического лечения РС приобретает прогрессирующий характер с преобладанием процессов нейродегенерации, в связи

с чем ранняя диагностика и терапия имеют важное социально-экономическое значение (Peruzzotti-Jametti L et al., 2018). Именно при РС и ОРЭМ наиболее полно изучен механизм активации иммунной системы против антигена по механизму Т- или В-клеточного иммунного ответа (Chu F. et al., 2018). При РС также достаточно подробно изучена нейродегенерация: специфичными маркерами считаются легкие и тяжелые цепи нейрофиламентов (Cai L. et al., 2018), β -амилоид (Sladkova V et al., 2011). Отдельная роль отводится оксиду азота (NO): показано его участие в развитии процессов нейродегенерации, воспаления, нарушения проницаемости гемато-энцефалического барьера (ГЭБ) и демиелинизации в экспериментальных работах на животных и при РС. Большая часть данных получена при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите и на аутопсийном материале, тогда как результаты по исследованию состояния нитроергической системы в биологических жидкостях человека противоречивы (для нитратов/нитритов — NOx) или немногочисленны (для нитрованных по тирозину белков (НТБ) и нитрозотиолов — RSNO). Анализ компонентов системы NO при РС в соответствии с клиническими данными важен для понимания роли NO в патогенезе заболевания.

Помимо патофизиологических механизмов развития заболевания, важной проблемой является диагностика РС на ранней стадии и выявление маркеров течения заболевания. Картина МРТ и показатели олигоклонального синтеза могут быть одинаковыми при аутоиммунных заболеваниях, поэтому в ряде случаев диагноз может быть установлен только клинически при динамическом наблюдении с учетом всех инструментальных и лабораторных исследований (Louapre C. et al., 2018, Захарова М.Н. и др., 2018).

При ОМ и АЭ процессы нейровоспаления и нейродегенерации изучены неполно, либо проведена экстраполяция процессов по аналогии с происходящими при РС (Mathey G. et al., 2018). При ОМ в большей степени описаны процессы астроцитопатии вследствие взаимодействия антител с AQP4, в меньшей степени — процессы нейродегенерации (Kawachi I. et al., 2017). Кроме того, отмечается сайт-специфичность патологий с характерным поражением определенного отдела ЦНС: спинного мозга (СМ) и зрительных нервов при ОМ и массивное поражение полушарий головного мозга при ОРЭМ или диффузное поражение головного мозга при АЭ, зачастую без изменений, видимых при МРТ.

Таким образом, остается крайне актуальным комплексное рассмотрение данных патологий в рамках проблемы «аутоиммунной неврологии» с целью изучения физиологических механизмов, приводящих к повреждению структур нервной ткани, а также дифференциации патологических процессов в рамках различных заболеваний.

Отдельный интерес представляет группа АЭ — еще не охарактеризованная в российской популяции — диагностически сложная и разнородная по своим проявлениям и течению

(Давыдовская М.В. и др., 2015). Ранее проводился анализ отдельных клинических случаев (Торопина Г.Г. и др., 2013, Васенина Е.Е. и др., 2017), более полно охарактеризованы пациенты с паранеопластическими синдромами и поражением периферической нервной системы (Шнайдер Н.А. и др., 2015, Королева Е.С. и др., 2013), однако анализ когорты пациентов с поражением ЦНС не проводился. При АЭ известные антитела выявляются только при 30-40 % АЭ, тогда как остальные случаи составляют «возможные АЭ» согласно критериям Graus et al. (Graus F. et al., 2016). Однако подобная формулировка диагноза в ряде случаев затрудняет диагностику, а при резистентных, МР-негативных формах делает крайне затруднительным проведение иммуносупрессивной терапии ввиду отсутствия достаточных инструментальных данных, подтверждающих диагноз. Изучение процессов нейровоспаления и нейродегенерации, а также поиск маркеров данных процессов крайне актуальны и имеют значение как для уточнения патогенеза аутоиммунных неврологических заболеваний, так и для уточнения клинических представлений о природе неврологического дефицита у конкретного больного, проведения дифференциального диагноза и прогнозирования темпа прогрессирования болезни.

Цель исследования:

Провести анализ биохимических маркеров воспалительных и нейродегенеративных процессов у пациентов с аутоиммунными заболеваниями ЦНС (РС, ОРЭМ, ОМ, АЭ) и оценить их взаимосвязь с клиническими характеристиками.

Задачи работы

1. Охарактеризовать клинические особенности и проблемы диагностики группы АЭ на примере когорты пациентов, отобранных в неврологическом отделении многопрофильного стационара (ГБУЗ «ГКБ имени В.М. Буянова ДЗМ»).
2. Определить наличие антител к поверхностным нейрональным антигенам и рибосомальному белку Р в ЦСЖ и сыворотке крови у пациентов с АЭ и РС, изучить взаимосвязь между наличием антител и клиническими особенностями.
3. Исследовать биохимические маркеры нейродегенерации и воспаления у пациентов с АЭ, изучить ассоциацию маркеров с особенностями клинической картины заболевания и их потенциальную прогностическую значимость.
4. Исследовать биохимические маркеры нейродегенерации и воспаления у пациентов с демиелинизирующими заболеваниями: РС, ОРЭМ и ОМ, изучить ассоциацию маркеров с особенностями клинической картины заболеваний.
5. Исследовать состояние нитрической системы у пациентов на разных стадиях РС (РРС и вторично-прогрессирующего течения РС, ВПРС) в сравнении с ОРЭМ и контрольной группой.

Научная новизна

Впервые в российской популяции охарактеризована когорта пациентов с АЭ: спектр клинических проявлений, антител и биохимических маркеров нейровоспаления и нейродегенерации. Впервые использован дизайн исследования сравнения группы пациентов с АЭ с группой пациентов с демиелинизирующими заболеваниями. Показана активация процессов нейровоспаления и нейродегенерации у пациентов с данными патологиями ЦНС. Уточнены механизмы участия воспалительных процессов в патогенезе изучаемых заболеваний.

Впервые показана специфичность активации пути Ил-6 при данных патологиях и активация процессов нитрозилирования у пациентов с РС и наличием очагов в СМ, возможность использовать RSNO в качестве маркера поражения СМ. Впервые охарактеризованы маркеры, которые могут быть использованы для дифференциальной диагностики АЭ (неоптерин) и оценки тяжести течения заболевания (уровень белка, фНФТ, Ил-6). На основании полученных результатов может быть проведена дальнейшая оценка прогностической значимости на больших популяциях.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость работы состоит в описании механизмов нейровоспаления и нейродегенерации как ключевых факторов патогенеза аутоиммунных заболеваний ЦНС. В данной работе показана активация процессов нейровоспаления и нейродегенерации у пациентов с данными заболеваниями. Впервые показана специфичность пути активации Ил-6 при разных патологиях и активация процессов нитрозилирования у пациентов с РС и наличием очагов в СМ, что может иметь теоретическое значение для понимания патогенеза этих заболеваний. Практическую значимость имеет показанная возможность использования RSNO в качестве маркера поражения СМ. Кроме того, охарактеризованы маркеры, которые можно использовать для дифференциальной диагностики АЭ (неоптерин) и оценки тяжести заболевания (уровень белка, фНФТ, Ил-6). Результаты работы (в том числе, проведенный анализ группы АЭ) могут помочь при дифференциальной диагностике, оценке выраженности процессов нейродегенерации и нейровоспаления в каждом конкретном случае, а также выявить причину необратимого неврологического дефицита и спрогнозировать тяжесть течения заболевания и степени инвалидизации пациента.

Методология и методы исследования

Объектом исследования были пациенты с АЭ и демиелинизирующими заболеваниями ЦНС. Всего в исследование были включены 226 больных и 79 участников контрольной группы. В группу пациентов входили больные с РС (n=169), ОРЭМ (n=21), ОМ (n=12), АЭ (n=24).

Проведен сбор анамнеза пациентов, неврологический осмотр, детальный анализ клинической картины, оценка уровня инвалидизации по шкале EDSS, стандартные скрининговые анализы, МРТ. Проведено исследование ЦСЖ и сыворотки крови при помощи анализа антител на клеточных культурах (биочипах), иммуноферментного анализа (ИФА), флуоро- и фотометрических методов измерений. Проводилась обработка МР-изображений при помощи программы количественного анализа (Msmetrix). Инструментальные данные и результаты лабораторных исследований сопоставлялись с клиническими характеристиками. Проводилась статистическая обработка результатов исследования.

Положения, выносимые на защиту:

1. Впервые в российской популяции охарактеризована группа пациентов с аутоиммунным энцефалитом, в том числе спектр клинических проявлений, антител и особенности дифференциального диагноза.

2. Наличие олигоклонального синтеза иммуноглобулинов G указывает на вероятный паранеопластический генез энцефалита. Повышение уровня общего белка в ликворе может быть использовано в качестве прогностически неблагоприятного маркера течения аутоиммунного энцефалита.

3. Процессы нейровоспаления характерны для всех изученных заболеваний и связаны с модификацией системы интерлейкина-6.

4. Нейродегенерация характерна для рассеянного склероза, острого рассеянного энцефаломиелита, аутоиммунного энцефалита, однако ее выраженность взаимосвязана с типом заболевания и характером его течения. Максимальная активность процессов нейродегенерации и нейровоспаления наблюдалась у пациентов с тяжелым течением аутоиммунного энцефалита.

5. На всех стадиях рассеянного склероза наблюдалась активация нитрической системы, паттерн которой зависел от стадии течения заболевания и локализации поражения. Усиление процессов нитрозилирования ассоциировано с наличием очагов в спинном мозге.

6. Выявлен потенциальный маркер для дифференциальной диагностики аутоиммунных энцефалитов (неоптерин).

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов определяется значительным и достаточным для статистического анализа числом наблюдений, четкой постановкой цели и задач, использованием в работе современных нейровизуализационных, нейрофизиологических методов обследования, биохимических методов анализа жидкостей, применением адекватных методов сбора, обработки данных и статистического анализа.

Диссертация апробирована и рекомендована к защите на расширенном заседании лаборатории функциональной биохимии нервной системы, лаборатории молекулярной нейробиологии, лаборатории условных рефлексов и физиологии эмоций ФГБУН ИВНД и НФ РАН и неврологической службы ГБУЗ «ГКБ имени В.М. Буянова ДЗМ» (Протокол No 1 от 13.02.2019 г.). Материалы диссертации были представлены на: Encephalitis Conference (Лондон, Англия, 3.12.2018), Конференция “Болезни мозга: от изучения механизмов к диагностике и лечению” (Москва, Россия, 12-13.04.2018), школе Общества по болезням движения «Myoclonic and other jerky movements» (Гронинген, Голландия, 13–14.10.2016); XXI Всероссийской конференции «Нейроиммунология. Рассеянный склероз» (Санкт-Петербург, Россия, 19–22.05.2016); Molecular Neurodegeneration Conference (Хинкстон, Великобритания, 29.11 – 4.12.2015); на XIX, XX, XXI Школах-конференциях молодых ученых ИВНД и НФ РАН, Москва, (27–28.10.2015, 31.10 – 1.11.2016, 30.09 – 1.10.2017), EFNS-ENS Joint Congress of European Neurology, Турция (31.05. – 3.06.2014).

Внедрение результатов работы

Полученные результаты внедрены в практику работы 1-го неврологического отделения и Межкрупного центра рассеянного склероза № 1 ГБУЗ «ГКБ имени В.М. Буянова ДЗМ».

Публикации

По теме диссертации опубликована 21 печатная работа, в том числе 5 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации, 7 статей в международных журналах, индексируемых в базе Web of Science/Scopus.

Личный вклад автора

Автору принадлежит определяющая роль в разработке дизайна и протоколов исследования, постановке задач, обосновании выводов и практических рекомендаций. Проработаны отечественные и зарубежные источники литературы по данной тематике. Самостоятельно был проведен отбор пациентов, осмотр, анализ клинических данных и заполнение шкал, сбор материала и биохимический анализ биологических жидкостей. Самостоятельно проведены обработка и статистический анализ полученных данных.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 134 листах машинописного текста, содержит 9 таблиц и иллюстрирована 18 рисунками. Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, описание материалов и методов, результаты исследования и обсуждение, заключение, содержащее выводы и практические рекомендации, список литературы.

Библиографический указатель содержит 29 отечественных и 307 зарубежных источников литературы и 21 собственную публикацию автора по теме диссертационной работы.

2. МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Характеристика субъектов клинического обследования

Исследование проводилось на базе 1 неврологического отделения ГБУЗ «ГКБ имени В.М. Буянова ДЗМ» (заведующий к.м.н. Брылев Л.В.). Исследование биологического материала проводилось на базе лаборатории функциональной биохимии нервной системы ИВНД И НФ РАН (заведующая д.м.н. проф. Гуляева Н.В.). Всего в исследование были включены 226 больных и 79 участников контрольной группы. В группу пациентов входили больные с РС (n=169), ОРЭМ (n=21), ОМ (n=12), АЭ (n=24). Исследование было проведено в соответствии с Хельсинской декларацией по правам человека и одобрено локальным этическим комитетом ГБУЗ «ГКБ имени В.М. Буянова ДЗМ» (протокол №44). От каждого участника было получено добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Исследование состояло из трех этапов соответственно поставленным задачам исследования.

Первый этап исследования: На первом этапе исследования 102 больных, госпитализированных в ГБУЗ «ГКБ имени В.М. Буянова ДЗМ» за время проведения исследования с подозрением на аутоиммунное заболевание ЦНС (АЭ или обострение демиелинизирующего заболевания), были скринированы согласно критериям включения и исключения. Дизайн исследования представлен на рисунке 1.

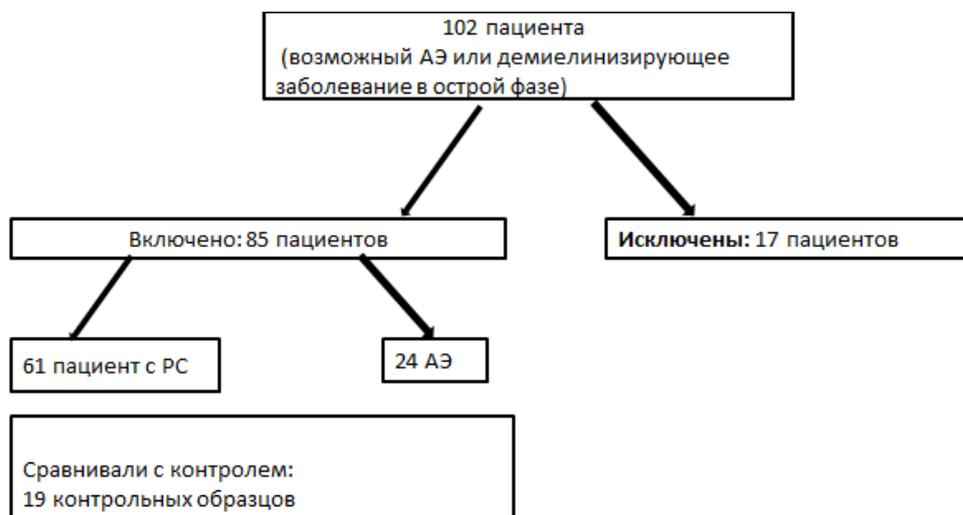


Рисунок 1 — Дизайн первого этапа исследования

Критерии включения:

- 1) возможный АЭ согласно критериям Graus и др.(Graus F. et al., 2016);
- 2) достоверный РС согласно новому пересмотру критериев McDonald W., 2017 (Thompson A. et al., 2018) во время обострения, впервые диагностированный;

3) для всех пациентов, включенных в исследование, люмбальная пункция была показана с диагностической целью по медицинским показаниям после информированного согласия.

Критерии исключения:

1) для группы с РС все другие формы РС, кроме РРС, пациенты с миелитами неясной этиологии, Aqr4- положительные пациенты (для первой и второй части исследования);

2) острая соматическая или инфекционная патология, положительные анализы HCV, HBV, HIV, реакция Вассермана;

3) иммуносупрессивная или иммуномодулирующая терапия в момент забора образцов и в течение предыдущих трех месяцев;

4) сопутствующая нейродегенеративная патология, употребление наркотических препаратов или алкоголя в анамнезе, черепно-мозговая травма, гипертоническая болезнь с поражением головного мозга и других органов мишеней;

5) пациенты с другим неврологическим диагнозом, установленным в ходе обследования.

После скрининга в исследование включили 85 пациентов: 24 пациента с возможным АЭ и 61 пациент с РС. У всех больных была детально изучена клиническая картина заболевания с использованием данных анамнеза, неврологического и соматического статуса, были выполнены МРТ головного мозга и СМ с контрастным усилением, рутинные биохимические анализы крови и ЦСЖ. У пациентов с РС неврологический дефицит оценивался по расширенной шкале двигательного дефицита Куртцке (EDSS). Клинические характеристики больных представлены в таблице 1, результаты рутинного анализа ЦСЖ в таблице 2, подробная характеристика пациентов с АЭ представлена в основном тексте диссертации.

Таблица 1 — Клиническая характеристика больных (1 этап)

	Вероятный АЭ	РС
Пациенты, число	24	61
Возраст, лет	42,6 (±16,0)	35,5 (±10,9)
Пол (мужчины/женщины)	8/16	19/42
Эпилепсия	13	11
Средний уровень EDSS, баллы (±SD)	—	3,3 (± 1)
Средний уровень EDSS, баллы (±SD) через 1 год	—	3,4 (±1)
Количество обострений в год	0,6 (±0,6)	0,3 (±0,6)
Число пациентов с обострением	7 (29%)	17 (27,8%)
Число умерших пациентов в течение года наблюдения	6	0
Нахождение в ОРИТ (число пациентов/количество дней)	9/1–14	3/0–1

Таблица 2 — Результаты клинического анализа ЦСЖ больных (1 этап)

	Вероятный АЭ	РС
Тип олигоклонального синтеза	тип 1 – 14; тип 2 – 4; тип 3 – 1; тип 4 – 2; 3 - NA	тип 1 – 4; тип 2 – 53; 4 - NA
IgG ЦСЖ (мг/л)	70,4 (±60)	57,4 (±44)

Цитоз ЦСЖ (клеток/мкл)	13 (± 27)	12 (± 7)
Уровень белка в ЦСЖ (г/л)	0,5 ($\pm 0,3$)	0,4 ($\pm 0,2$)
Уровень глюкозы в ЦСЖ (ммоль/л)	3,2 ($\pm 0,8$)	3,6 ($\pm 0,7$)

Второй этап исследования

На данном этапе обследовались группа пациентов с РРС в стадию обострения (n=52), критерии диагноза, включения и исключения аналогичны описанным ранее. Группа пациентов с ОРЭМ была сформирована из 9 пациентов с монофазным течением заболевания, диагноз был выставлен соответственно клиническим рекомендациям (Brownlee WJ et al., 2017), в течение двух лет течение заболевания было монофазным. В группе больных из спектра ОМ-подобных заболеваний с положительными антителами к AQP4 (в нашем случае ОМ) вошли 12 человек. Диагноз был установлен согласно существующим критериям (Wingerchuk DM et al., 2015).

Таблица 3 — Клиническая характеристика больных (2 этап)

	РРС	ОМ	ОРЭМ
N	52	12	9
Возраст, годы	32,6 ($\pm 8,0$)	36,0 ($\pm 6,5$)	38,0 ($\pm 10,7$)
Пол (мужчины/женщины)	22/30	2/10	5/4
Средняя длительность заболевания, месяцы	24 (от 2 до 36)	17 (от 3 до 32)	3,5 (от 0,5 до 12)
Средний уровень EDSS, баллы ($\pm SD$)	3,2 ($\pm 1,4$)	4,1 ($\pm 1,4$)	—

Третий этап исследования

На данном этапе в группу больных РС были включены 56 человек с достоверным диагнозом РС, критерии диагноза и включения аналогичны описанным ранее, однако на данном этапе параллельно больным с РРС включались больные с ВПРС. Определение клинической формы заболевания проводилось с учетом частоты выявляемых обострений и темпа нарастания неврологического дефицита в соответствии с критериями Lublin и соавт. (Lublin et al., 1996).

В качестве группы сравнения были включены 5 пациентов с ОРЭМ, критерии диагноза и включения аналогичны описанным ранее. Характеристика больных представлена в таблице 3.

Таблица 4 — Клиническая характеристика больных (3 этап)

	РРС	ВПРС	ОРЭМ
Пациенты	42	14	12
Возраст, годы	32,7 ($\pm 7,9$)	43,0 ($\pm 8,0$)	37,5 ($\pm 10,6$)
Пол (мужчины/женщины)	11/31	6/8	5/8
Длительность заболевания	27 месяцев (от 2 недель до 18,1 лет)	14,3 лет (от 4 лет до 31 года)	3,5 месяца (от 2 недель до 2,1 лет)
Средний уровень EDSS, баллы ($\pm SD$)	3,2 ($\pm 1,4$)	6,1 ($\pm 1,6$)	—
Очаги в СМ (есть/нет)	29/13	14/0	0/12
Длина очагов в СМ, число позвонков	1,6 ($\pm 0,8$)	2,8 ($\pm 1,2$)	0
Очаги в головном мозге (да/нет)	33/9	14/0	12/0

Контрольная группа

В качестве контрольной группы для первой и второй части исследования использовались неврологически здоровые добровольцы с ортопедической хирургической патологией после получения и подписания информированного согласия. Контрольные образцы ЦСЖ забирались в ходе проведения спинальной анестезии при плановой операции, образцы крови до проведения хирургической операции (n=19, медиана возраста 35 лет, от 19 до 53 лет (первый этап), и n=24, медиана возраста 34,5 лет, от 25 до 51 года (второй этап)).

Для третьей части исследования забор крови осуществлялся у здоровых добровольцев, чтобы исключить возможное влияние предоперационного стресса на измеряемые маркеры крови (более лабильные при сравнении с маркерами ЦСЖ). С учетом возрастной разницы между пациентами с РРС и ВПРС сравнение проводилось с двумя контрольными группами. Суммарно группу контроля молодого и старшего возраста составили 21 человек (n=10, средний возраст 29,3 ($\pm 4,4$) лет и n=11, средний возраст составил 47,9 ($\pm 12,3$) лет, соответственно). Контрольные группы не отличались от группы больных по полу и возрасту ($p > 0,05$).

2.2 Забор и хранение биологического материала

Забор крови осуществлялся из локтевой вены в утренние часы натощак в пробирки с активатором свертывания (Vacutainer, BD). Люмбальная пункция была выполнена пациентам по медицинским показаниям с диагностической целью после получения информированного согласия, участникам контрольной группы — при выполнении спинальной анестезии по поводу ортопедической хирургической патологии. Пробы сыворотки и ЦСЖ собирались в стерильные пробирки, проводилось центрифугирование образцов по стандартному протоколу, надосадочная жидкость отбиралась в виде аликвот и замораживалась при температуре -70°C .

2.3 Биохимические методы исследования сыворотки крови и ЦСЖ

У всех пациентов были выполнены рутинные тесты общего и биохимического анализа ЦСЖ и сыворотки крови. Для АЭ в обязательном порядке проводилось исследование ПЦР ЦСЖ на вирусы, все обследованные пациенты были ПЦР–негативны. Для всех пациентов проводилось исследование антител к AQP4 в сыворотке крови (для всех пациентов, кроме пациентов с ОМ, результаты были отрицательны), исследовались антинейрональные антитела, олигоклональные антитела, гормоны щитовидной железы, системные маркеры (СОЭ, СРБ, ревматоидный фактор, антинуклеарный фактор, антитела к dsДНК, ANCA, ssA, ssB).

В ходе работы выполнены следующие анализы:

1) Определение содержания NOx в сыворотке крови проводилось по цветной реакции образования азокрасителя при взаимодействии нитритов с реактивом Грисса после неферментативного восстановления хлоридом ванадия (III) (Miranda K.M. et al, 2001).

2) Определение содержания НТБ в сыворотке крови проводилась по разработанной нами модифицированной схеме (Fominykh V. et al., 2012).

3) Определение уровня RSNO в сыворотке крови проводили с использованием флуоресцентного зонда 4,5-диаминофлуоресцеина (DAF-2), образующего в нейтральной среде комплекс с NO с характерным спектром испускания, согласно описанным методикам (Planchet E. et al., 2006). Синтез нитрозилированного глутатиона проводился в соответствии с методикой Stamler J. S. (Stamler J. S. et al., 1996). Для определения низкомолекулярных RSNO в первой части эксперимента использовалась предварительная обработка сыворотки ацетонитрилом с последующим осаждением денатурированного белка, разделение низкомолекулярной и белковой фракции проводилось с использованием фильтров AmiconUltra – 0,5 3К (Millipore, Ireland) по методике, описанной производителем.

4) Определение антител к поверхностным нейрональным антигенам: рецептору н-метил-Д-аспартата (NMDAR), рецептору α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты 1 и 2, рецептору гамма-аминомасляной кислоты (GABA_BR), белку гена, богатого лейцином и инактивированного в глиоме, 1 (LGI1), рецептору контактин-ассоциированного белка 2 (CASPR) проводилось при помощи коммерческого набора компании Euroimmune (Германия) по стандартной схеме анализа на биочипах (иммобилизованных клетках, трансфецированных нужным антигеном). Для определения антител к рибосомальному белку Р использовали набор DrFooke Laboratory (GMBH, Германия)

5) Для определения уровня биомаркеров нейровоспаления и нейродегенерации в работе использовали коммерческие ИФА-наборы: фНФТ (EnCorBiotechnology, США; Neuromics, США и Biovendor, Чехия), Ил-6 (Вектор-Бест, Россия), ЭПО (Вектор-Бест, Россия), рИл-6Р (Affymetrix, eBioscience, Австрия), неоптерин (IBL International, Германия).

2.4 Видеоэлектроэнцефалографический мониторинг и анализ МРТ изображений

Исследование длительной видеоэлектроэнцефалографии (видеоЭЭГ) (от 4 до 24 часов) проводилось на компьютерном энцефалографе фирмы «Nicolet». Оценивалось наличие эпилептических разрядов, выраженность изменений фоновой ритмики, наличие паттерна «extreme delta brush».

МРТ выполнялось на базе ГБУЗ «ГКБ имени В.М. Буянова ДЗМ» на МРТ томографе 1,5 Тл. Проводилась оценка количества и характера очагов в головном и спинном мозге, наличие/отсутствие накопления контрастного препарата, МР-картина соотносилась с существующими критериями McDonald (Thompson A. et al., 2018) и Magnims (Rovira A. et al., 2015) для РС. Для пациентов с АЭ проводилось МРТ по протоколу эписканирования (Wellmer J. et al., 2013) с целью исключения фокальной причины эпилептических приступов. Кроме

клинического анализа у пациентов с РС использовался количественный анализ МРТ при помощи программы Msmatrix (<https://icomatrix.com>, Бельгия) с целью измерения степени атрофии, объема очагов по FLAIR, типа патологии (тип 1–4) согласно классификации Tauhid и др. (Tauhid S. et al., 2014) и определения взаимосвязи с клинико-биохимическими показателями.

2.5 Статистическая обработка результатов исследования

Количественные переменные описывали следующими параметрами: числом пациентов, средним арифметическим значением (M), стандартным отклонением от среднего арифметического значения ($M \pm SD$), для непараметрических данных использовалась медиана и 25–75 процентиля ($Me [LQ; UQ]$). Для сравнения нескольких групп по количественному признаку применяли непараметрический дисперсионный анализ (критерий Краскелла-Уоллиса) с апостериорными попарными сравнениями групп между собой с использованием критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферрони или использовали дисперсионный анализ (ANOVA) с апостериорным сравнением групп по критерию Ньюмена-Кейлса. Для выявления связи между признаками использовали коэффициент сопряженности Спирмена. Для сравнения качественных показателей в части случаев использовался точный критерий Фишера. Для оценки исследованных показателей в качестве факторов риска прогрессирования заболевания использовалась логистическая регрессия и ROC-анализ. Расчет выполнен на персональном компьютере с использованием приложения Microsoft Excel 2003, пакета статистического анализа данных Statistica 8.0 for Windows, GraphPad Prism 6 и SigmaPlot 11 (США).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Клинические характеристики пациентов с АЭ и пациентов с РС

Нами были обследованы 24 пациента с возможным АЭ согласно критериям Graus et al (2016). В данной работе нами впервые в России проанализирована когорта пациентов с АЭ в условиях многопрофильного стационара (ГБУЗ «ГКБ имени В.М. Буянова ДЗМ»). Ранее проводился анализ отдельных клинических случаев (Торопина Г.Г. и др., 2013), более полно охарактеризованы пациенты с паранеопластическими синдромами (Шнайдер Н.А. и др., 2015) и поражением периферической нервной системы (Королева Е.С. и др., 2013), однако анализ когорты пациентов с поражением ЦНС не проводился. Клинические характеристики представлены в таблице 1, детальная клиническая картина описана в основном тексте диссертации. Средний возраст больных составил 42,6 лет ($\pm 16,0$), женщин в 2 раза больше, чем мужчин. В ходе проведения дифференциального диагноза в нашем стационаре 5 человек были исключены из исследования (17% всех пациентов) с диагнозами гипопаратиреоз ($n=1$), шизофрения ($n=1$), васкулиты ЦНС ($n=2$) и нейродегенеративное заболевание ($n=1$).

При анализе первичного направительного диагноза только 41% пациентов имели диагноз возможного энцефалита, 29% составляли пациенты с фармакорезистентной эпилепсией неуточненной этиологии, по 12,5% – демиелинизирующего заболевания ЦНС и цереброваскулярная патология, у одной пациентки предполагались соматоформное расстройство. Спектр неврологических проявлений при АЭ представлен на рисунке 2.

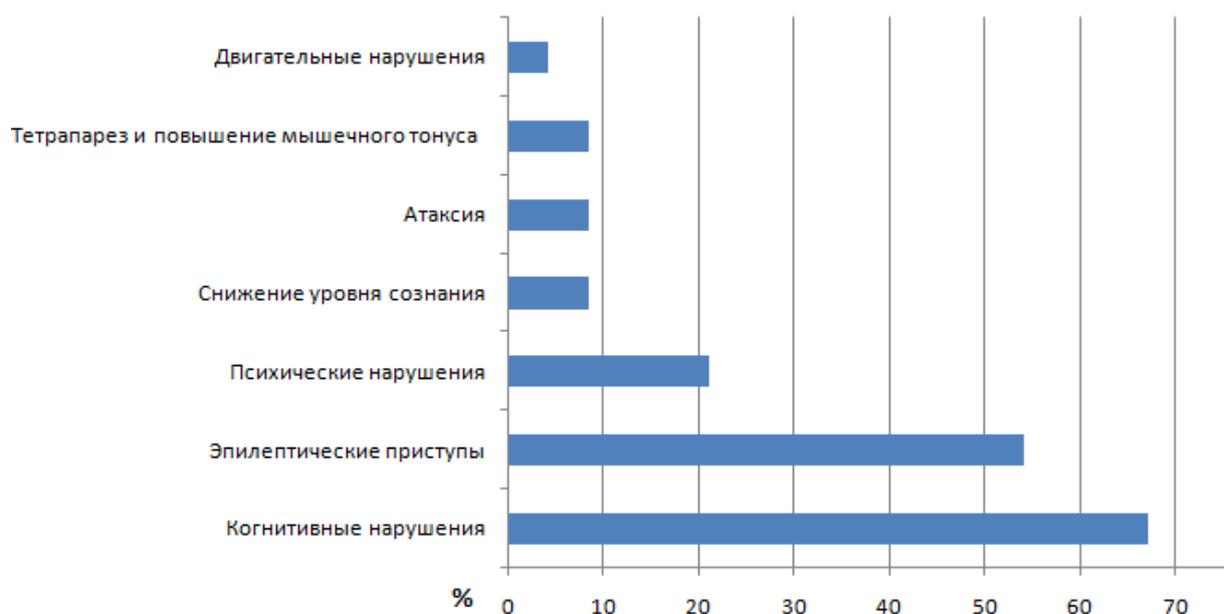


Рисунок 2 — Спектр неврологических проявлений при АЭ

Разницы по ведущим проявлениям (эпиприступы и когнитивные нарушения) между АЭ с известным антителом и без них выявлено не было. В целом, данные результаты соответствуют данным литературы о том, что когнитивные нарушения являются ведущими в синдромокомплексе АЭ (Graus F. et al., 2016), а также высокую эпилептогенность данной патологии в острой фазе течения заболевания (Geis C. et al., 2019). Результаты анализа первичных диагнозов и обращений к специалистам подтверждают необходимость настороженности к АЭ среди неврологов-эпилептологов, специалистов по демиелинизирующим заболеваниям, инфекционистов и психиатров.

Однако более высокий процент пациентов с эпиприступами и низкий – с психическими нарушениями может быть также обусловлен спецификой стационара, в котором проводилось исследование: оказание экстренной помощи пациентам (в том числе госпитализация пациентов с эпилептическими приступами) и отсутствие в структуре психосоматического отделения.

В ходе обследования были диагностированы 2 NMDAR-энцефалита, 1 CASPR, 2 LGI1, 1 GABA_B, 2 GAD, 1 анти-hu энцефалит, 2 энцефалита с антителами к SSa-SSb (результаты анализа на клетках, трансфицированных антигенами, представлены на рисунке 3).

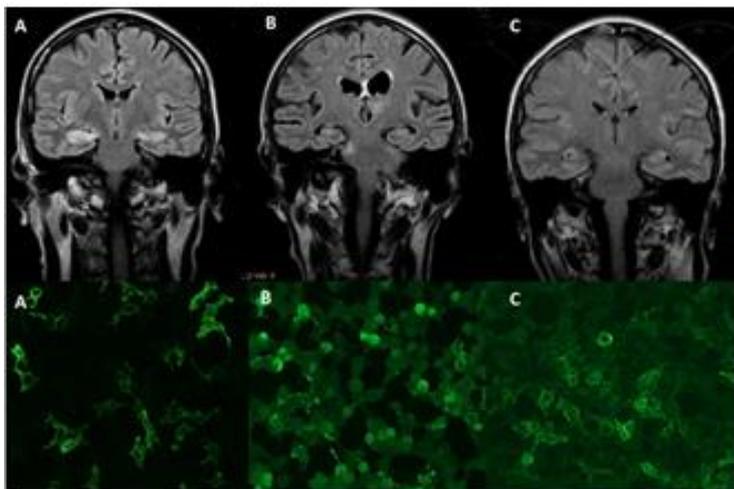


Рисунок 3 — МРТ и иммунореактивность ЦСЖ при исследовании на биочипах с НЕК-клетками, трансфицированными поверхностными нейрональными антигенами.

А: клинический случай GABA_BR – энцефалита у пациента с мелкоклеточным раком легкого
 В: клинический случай № 1: NMDAR– энцефалит у пациента с эпилептическими приступами, когнитивным снижением и раком мочевого пузыря
 С: клинический случай № 22: идиопатический LG1- ассоциированный лимбический энцефалит

Соответственно полученным результатам, 9 пациентам был поставлен диагноз АЭ с известными антителами (37,5%), у двух пациентов был диагностирован АЭ с антителами неясного значения (8,3%), у 13 пациентов был диагностирован вероятный АЭ согласно критериям Graus F. et al. (54,1%). Эти результаты соответствуют ранее полученным данным зарубежных исследователей о 40–50% возможных АЭ неясной этиологии среди пациентов в различных выборках (Yeshokumar et al., 2017, Lee et al., 2016). Мы не анализировали ряд известных антител: antiGly, antiMOG, DPPX, Iglon, поэтому полученное нами количество пациентов с АЭ неизвестной этиологии несколько выше, чем в зарубежных исследовательских центрах. Мы выявили одного пациента с позитивными антителами к рибосомальному белку Р в группе возможных АЭ. В группе АЭ были выявлены типы 1–4 олигоклонального синтеза (33,3%). Олигоклональный синтез (тип 2 и тип 4) был выявлен у всех пациентов с онкологическими заболеваниями и только у 13% пациентов с идиопатическим энцефалитом без выявленной патологии ($P < 0,05$, точный критерий Фишера).

У 13 пациентов отмечались эпилептические приступы (54%). При анализе результатов видеоЭЭГ–мониторинга нами не было выявлено паттерна «extreme delta brush», описанного при NMDAR-АЭ. У всех пациентов с эпилептическими приступами было выявлено диффузное замедление фоновой ритмики.

У 5 пациентов с АЭ (21%) были выявлены онкологические проблемы: GABA_BR-АЭ у пациента с мелкоклеточным раком легкого, NMDAR–АЭ у пациента с раком простаты и мочевого пузыря, у остальных пациентов с онкопатологией известных антител выявлено не было. У 2 пациентов неврологические симптомы появились раньше, чем было выявлено

онкологическое заболевание. Очаговое поражение головного мозга по МРТ наблюдалось у 14 пациентов (58%). 6 пациентов (25%) погибли в течение 1 года наблюдения, у трех из них была сопутствующая онкопатология. Средняя продолжительность жизни среди 6 пациентов после включения в исследование составляла 3,4 месяца ($\pm 2,8$), от 2 недель до 8 месяцев. Биохимические маркеры и клиническое течение у пациентов с эпилептическими приступами и без, у пациентов с известными антителами и без известных антител не отличались между собой.

Таким образом, при анализе нашей группы пациентов с АЭ была выявлена высокая смертность у пациентов с АЭ в ходе развития заболевания, как с онкологической, так и без онкологической патологии. Кроме того, у пациентов с паранеопластической этиологией энцефалита была выявлена более высокая встречаемость олигоклональных антител (тип 2-4), хотя ранее подобная взаимосвязь не описывалась.

В первую часть исследования были включены 68 пациентов с РС (диагноз выставлен по критериям McDonald, 2017), у 11 из них наблюдались эпилептические приступы, а у 7 — сопутствующее системное заболевание (4 пациента с анкилозирующим спондилоартритом, описаны нами отдельно (Fominykh V. et al, 2017)). Более высокий процент пациентов с эпилептическими приступами (16%) в нашей когорте пациентов с РС (Uribe-San-Martín R et al., 2014) вероятнее всего был связан с более частым наличием показаний к диагностической люмбальной пункции у данной группы пациентов. После скрининга антител к поверхностным антинейрональным антигенам мы не нашли положительных результатов в ЦСЖ и сыворотке крови у пациентов с РС. После скрининга антител к анти-рибосомальному белку Р мы выявили одну «положительную» пациентку с РС и эпилепсией, однако все остальные пациенты были негативными по данному маркеру. Таким образом, среди 92 пациентов мы выявили положительные антитела у двух пациентов (РС + эпилепсия и вероятный АЭ). Данные антитела показали свою значимость у пациентов с нейроволчанкой и нейропсихиатрическими проявлениями (Briani C, et al, 2009, Sato T. et al., 2010), однако в наших группах больных требуется изучение значимости данных антител в большей выборке пациентов.

3.2 Анализ маркеров воспаления и нейродегенерации у пациентов с АЭ, РС и контрольной группы

Уровни показателей, полученные при измерении в группах АЭ, РС и контрольной группе были сравнены между собой с использованием критерия Краскела-Уоллиса, после чего в группах с полученным различием (белок, цитоз, Ил-6, рИл-6Р, фНФТ, неоптерин, соответственно) проведено попарное сравнение с использованием теста Манн-Уитни с поправкой Бонферрони ($p < 0,017$). Не было найдено каких-либо различий для уровня Ил-6. В группе АЭ был выявлен более высокий уровень белка, фНФТ и неоптерина при сравнении с

контрольной группой ($0,5 \pm 0,3$ и $0,3 \pm 0,1$ г/л; $377,9 \pm 675,0$ и $23,9 \pm 35,0$ нг/мл; $11,8 \pm 2,0$ и $3,5 \pm 3,3$ нМ, соответственно). Сравнение РС с контрольной группой выявило более высокий уровень цитоза у пациентов с РС ($16,3 \pm 19,8$ и $3,9 \pm 1,2$ клеток/мкл), белка ($0,4 \pm 0,2$ и $0,3 \pm 0,1$ г/л), фНФТ ($98,4 \pm 100,0$ и $23,9 \pm 35,0$ нг/мл) и рИЛ-6Р ($0,2 \pm 0,1$ и $0,1 \pm 0,1$ нг/мл) (Рисунок 4).

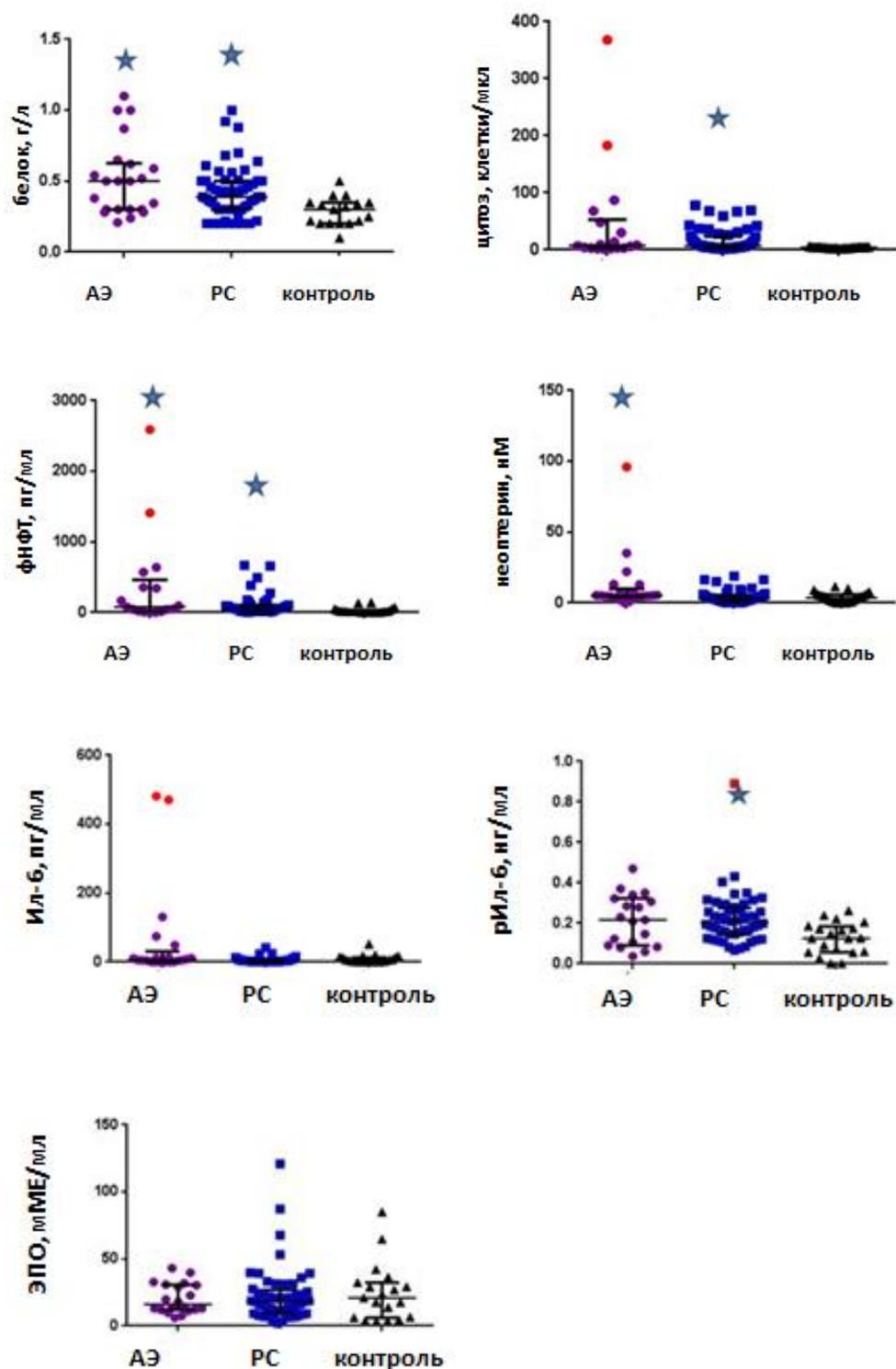


Рисунок 4 — Уровень белка, цитоза, фНФТ, неоптерина, ЭПО, Ил-6, рИл-6Р у пациентов с АЭ, РС и контрольной группе (* $p < 0,017$, критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферрони после получения достоверных различий между группами по критерию Краскелла-Уоллиса)

При сравнении АЭ с РС уровень белка и фНФТ были одинаковы, однако уровень неоптерина был выше в группе АЭ ($11,8 \pm 2,0$ и $4,3 \pm 2,1$ нМ). Дисперсионный анализ (ANOVA) не выявил зависимости между группами с эпилепсией и без. Дисперсионный анализ показал разницу в виде более высокого уровня белка ($0,7 \pm 0,3$ и $0,4 \pm 0,2$ г/л), фНФТ (1153 ± 1011 и 84 ± 72 пг/мл), Ил-6 (377 ± 228 и 8 ± 11 пг/мл) у пациентов с АЭ, умерших в течение года наблюдения (Рисунок 5).

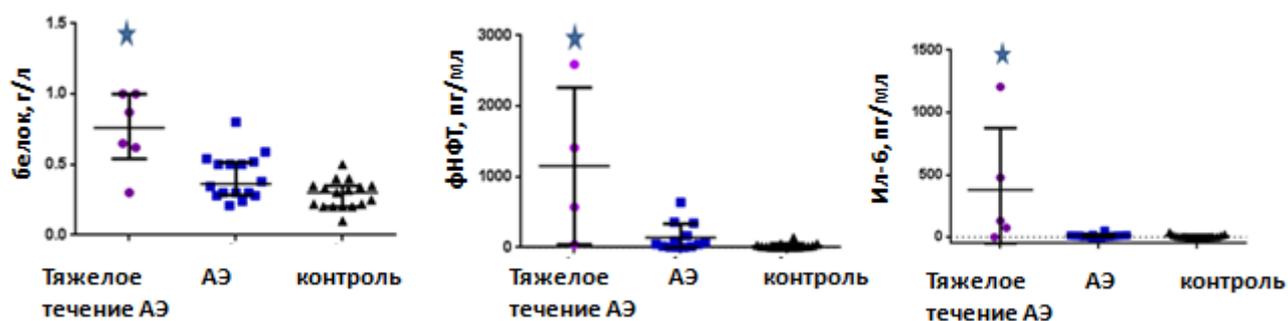


Рисунок 5 — Уровень белка, фНФТ, Ил-6 в группе АЭ с тяжелым течением, других АЭ и контрольной группе (* $p < 0,017$, критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферрони после получения достоверных различий между группами по критерию Краскелла-Уоллиса)

Одномерная логистическая регрессия показала, что уровень белка — это значимый фактор, ассоциированный с гибелью пациента (отношение шансов 21,2 при повышении на 1 г/л, доверительный интервал 1,1 до 684, $p = 0,04$), результаты были подтверждены после стандартизации для фНФТ и ИЛ-6 в ЦСЖ, однако их значимость должна быть оценена на большей группе пациентов.

В большинстве статей АЭ сравнивают с инфекционными энцефалитами (Kothur K. et al., 2017), и крайне редко с демиелинизирующими заболеваниями (Hottenrott T. et al., 2015), однако в ходе анализа клинических проявлений выяснено, что АЭ попадают в поле зрения неврологов, которые занимаются аутоиммунными патологиями ЦНС, и проводится дифференциальный диагноз с демиелинизирующими заболеваниями и другими аутоиммунными патологиями. С учетом этой специфики в данной работе представлен уникальный дизайн исследования при сравнении пациентов АЭ с РС и контрольной группой.

Мы выявили более высокий уровень неоптерина у пациентов с АЭ при сравнении с контрольной группой и группой демиелинизирующих заболеваний, как и было показано ранее (Kothur K. et al., 2017). Оценка уровня неоптерина в ЦСЖ широко используется при неврологических проявлениях у пациентов с ВИЧ, в детской неврологии в качестве маркера интратекальной иммунной активации в ЦНС (Dale R. et al., 2009), так как неоптерин имеет короткий период жизни и помогает различить острое и хроническое воспаление. В нашем исследовании уровень неоптерина был более чувствительным маркером воспаления по

сравнению с цитозом, что может помочь дифференцировать АЭ от других аутоиммунных заболеваний. Уровень фНФТ и белка были выше при РС и АЭ, что позволяет предположить активность нейродегенеративных процессов в обеих группах пациентов. Кроме того, наиболее высокий уровень был показан у пациентов с АЭ и крайне тяжелым течением заболевания, приведшим к смерти пациентов. Полученные результаты аналогичны данным Naratunayn G. et al., 2017, выявившим более высокий уровень белка у пациентов с АЭ, госпитализированных в реанимационное отделение. В нашей когорте пациентов мы обнаружили различные типы олигоклонального синтеза в группе паранеопластических АЭ, что может быть использовано для определения стратегии диагностического поиска и объема онкологического скрининга. Однако в ранних исследованиях (Constantinescu R. et al., 2017) данная зависимость не была обнаружена.

В группе РС выявлен высокий уровень рИл6-Р: возможно, различный уровень рИл-6Р и путей активации Ил-6 приводит к различному сайт-специфическому поражению при разных типах демиелинизирующих заболеваний.

3.3 Анализ МРТ в группе демиелинизирующих заболеваний ЦНС

Мы сравнили группу РС, РС с сопутствующим системным заболеванием и контрольную группу. Данные группы не отличались по уровню биохимических показателей. В группе РС с сопутствующими системными заболеваниями были найдены:

- 1) сильная корреляция выраженности неврологического дефицита, оцененная по шкале EDSS, с возрастом ($r=0,75$, $p<0,05$);
- 2) ЦСЖ Ил-6 и фНФТ с возрастом ($r=0,87$ и $0,9$, соответственно);
- 3) ЦСЖ Ил-6 с фНФТ ($r=0,82$) и EDSS ($r=0,98$).

Мы не выполняли регрессионный анализ в связи с маленьким количеством пациентов в данной группе, однако взаимосвязь ИЛ-6 и фНФТ с агрессивностью течения заболевания с возрастом крайне вероятна. Возможна роль значимой активации цитокиновой оси Ил-6 и процессов нейродегенерации у пациентов с сопутствующими системными патологиями.

У части пациентов ($n=23$) данной группы был проведен количественный анализ МРТ определен типа патологии по Tauhid S. et al., 2014. В ходе анализа не была обнаружена разница между двумя группами с системными заболеваниями и без, с эпилепсией и без, однако в общей группе был выявлен ряд физиологических взаимосвязей (обратная корреляция возраста и объема мозга, положительная корреляция между уровнем ЭПО и общим объемом мозга), а также положительная взаимосвязь между типом патологии с EDSS, Ил-6, объемом очагов по FLAIR, отрицательная — со степенью атрофии мозга и уровнем ЭПО в сыворотке крови.

3.4 Анализ маркеров воспаления и нитрозотиолов у пациентов с разными формами демиелинизирующих заболеваний (РС, ОРЭМ, ОМ, рисунок 6)

Уровень Ил-6 в сыворотке был выше в группе РС, однако статистически значимых различий продемонстрировано не было. Как было описано ранее (Uzawa A. et al., 2017) уровень свободной формы Ил-6 в ЦСЖ (перед нагреванием) был выше у пациентов с ОРЭМ и ОМ ($2,9 \pm 0,8$ и $3,1 \pm 0,3$ пг/мл, соответственно, при сравнении с контрольной группой, $0,8 \pm 0,2$ пг/мл; $p < 0,05$), но не в группе РС. Однако общее содержание Ил-6 после нагревания и дополнительного высвобождения Ил-6 из связанной формы с растворимым рецептором Ил-6 было выше во всех группах по сравнению с контролем, в том числе, и в группе РС ($p = 0,01$).

Таким образом, можно предположить, что у пациентов с РС выше уровень рИл6-Р, что и было продемонстрировано в первой части работы, а также подтверждено в ряде предыдущих исследований (Stelmasiak Z. et al., 2001). Высокий уровень рИл6-Р может быть связан с вовлечением пути, связанного с данным рецептором при РС, и другим путем взаимодействия через мембранный рецептор при ОМ и ОРЭМ.

Корреляции между уровнем Ил-6 в сыворотке и ЦСЖ найдено не было, что также отмечалось ранее в других работах (Michaloroulou M. et al., 2004). Не было выявлено корреляции между уровнем Ил-6 в ЦСЖ и уровнем RSNO, и селективного увеличения Ил-6 при наличии очагов в СМ.

Снижение уровня ЭПО было выявлено у пациентов с РС при сравнении с контрольной группой ($39,7 \pm 4,0$ и $49,8 \pm 9,0$ мМЕ/мл; $p < 0,01$), что может быть связано с хроническим длительным воспалительным процессом при РС и коротким при ОРЭМ, а также с другим патофизиологическим механизмом с преимущественным вовлечением В-клеток при ОМ.

Уровень фНФТ в ЦСЖ был выше у пациентов с РС и ОРЭМ ($p < 0,05$), тогда как у пациентов из группы ОМ не отличался от контрольной группы. Обнаружение более высокого содержания в ЦСЖ фНФТ используется как маркер степени нейродегенерации при БАС и может быть использовано для оценки нейродегенерации при РС согласно ряду исследований (Bonnan M. et al., 2017). Более информативным с целью оценки уровня нейродегенерации при обострении РС и оценки статуса об отсутствии активности при РС (по системе NEDA) считаются легкие цепи нейрофиламентов, однако их измерение требует использования специально разработанных методик (Berger T. et al., 2019). Отсутствие такого повышения при ОМ объясняется более выраженным поражением астроцитов и глиальных клеток при ОМ.

Уровень RSNO в сыворотке при множественном сравнении между группами был выше у пациентов с РС и ОМ ($p < 0,05$). Корреляции между маркерами (фНФТ, Ил-6, RSNO) и клиническими показателями выявлено не было. Гипотеза об Ил-6-зависимой активации нитрозативного стресса в СМ, разработанная *in vitro*, не была подтверждена.

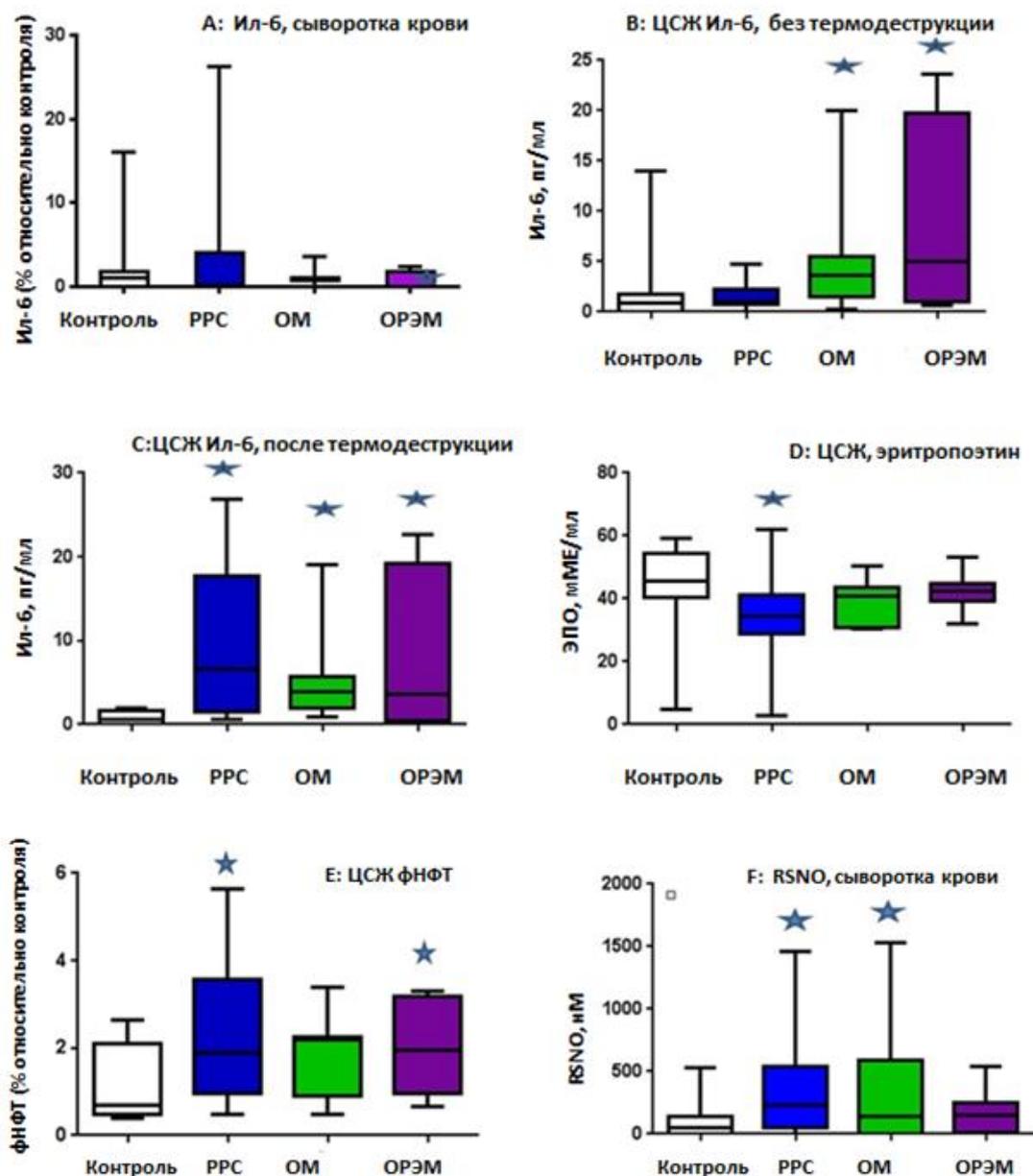


Рисунок 6 — Уровень Ил-6, ЭПО, фНФТ, RSNO в сыворотке крови и ЦСЖ пациентов с PPC, OM, ОРЭМ и контрольной группе (* $p < 0,05$, критерий Краскелла-Уоллиса с попарными сравнениями групп между собой с использованием критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферрони, отличие от контроля)

Нами не была выявлена корреляция между воспалительными маркерами и уровнем фНФТ, что может быть связано с острым процессом нейровоспаления при РС и ОРЭМ и медленным прогрессированием процессов нейродегенерации, либо с отсутствием четкой взаимосвязи между этими процессами в острой стадии.

3.5 Анализ маркеров нитрозативного стресса у пациентов с разными формами течения рассеянного склероза

Данные пациентов с РРС, ВПРС, ОРЭМ и контрольной группы были сравнены между собой (Рисунок 7). Для данного сравнения мы нормализовали уровень метаболитов NO, полученных во всех экспериментах, относительно контрольной группы.

Повышенный уровень NOx был выявлен в группе пациентов с РРС ($p=0,01$; $1,26\pm 0,47$ и $1,00\pm 0,25\%$, соответственно), тогда как уровень RSNO был выше у пациентов с РРС и ВПРС ($p<0,01$; $3,7\pm 2,3$ и $2,7\pm 1,8$ при сравнении $1,0\pm 1,1\%$, соответственно). Не было выявлено взаимосвязи между уровнем NOx и НТБ с клиническими показателями.

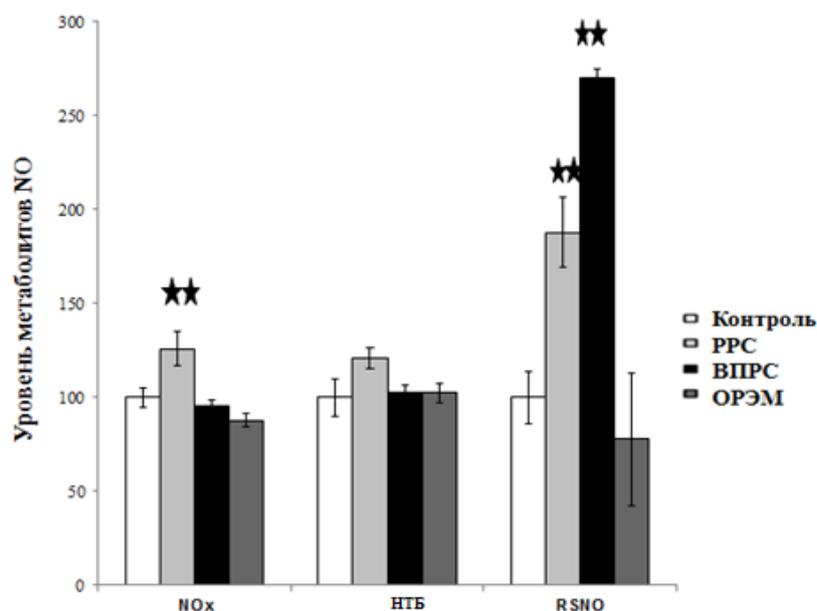


Рисунок 7 — Содержание (% от контроля) метаболитов NO в сыворотке крови (** $p<0,01$, отличие от контроля при попарном сравнении групп между собой с использованием критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферрони после полученных достоверных различий по критерию Краскела-Уоллиса при $p < 0,05$)

Таким образом, в данной части работы был изучен уровень метаболитов NO (RSNO, NOx и НТБ) на ранней и прогрессирующей стадии РС. В целом, нами были подтверждены данные предыдущих исследований (Bizzozero O. et al., 2009, 2006) и показана повышенная активность системы NO у пациентов с РС на обеих стадиях. Повышенный уровень NOx выявлен у пациентов с РРС в стадию обострения, но не у пациентов с ВПРС. Для НТБ не было найдено корреляции с клиническими показателями, что, вероятнее всего, связано со специфическими условиями образования нитротиозина в ходе активности преимущественно iNOS в острой фазе РС (Bryan N. et al., 2007). В нашем исследовании уровень RSNO не коррелировал с уровнем NOx, что соответствует данным, полученным на модели вызванного липополисахаридом энцефаломиелита (Liu L. et al., 2004). Уровень RSNO коррелировал с возрастом, как показано на рисунке 8, и полом (в группе пациентов был также выявлен более высокий уровень у мужчин при сравнении с женщинами) и поражением СМ.

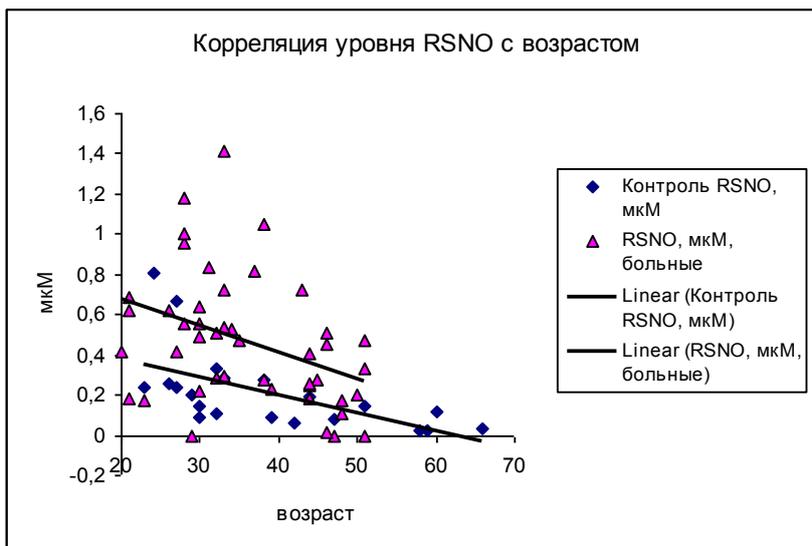


Рисунок 8 — Корреляция уровня RSNO (мкМ) в сыворотке крови и возраста

Основываясь на МРТ данных, повышение уровня RSNO было найдено только в группе с наличием очагов в СМ при сравнении с пациентами без поражения СМ и контрольной группой (Рисунок 9). При анализе корреляции уровня RSNO и объема поражения СМ (оценка в протяженности по числу позвонков) была выявлена корреляция умеренной силы ($r=0,56$, $p=0,02$).

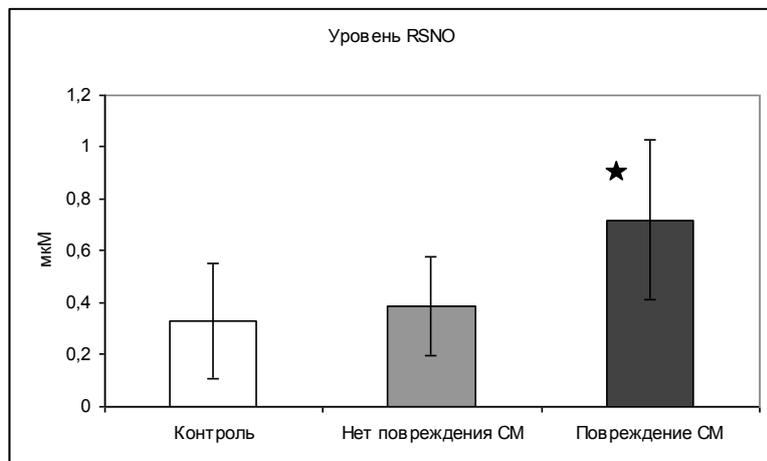


Рисунок 9 — Концентрация RSNO (мкМ) в сыворотке крови у пациентов с очагами в СМ и без очагов (* $p<0,017$, отличие от контроля и группы без повреждения СМ при попарном сравнении групп между собой с использованием критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферрони после полученных достоверных различий по критерию Краскела-Уоллиса при $p < 0,05$)

При оценке уровня RSNO, пола и возраста в качестве факторов риска возникновения очагов в СМ с использованием логистической регрессии выявлено, что уровень RSNO является фактором, от которого зависит возникновение очага в СМ, тогда как пол и возраст непосредственно такими факторами не являются (для модели логистической регрессии $p=0,0005$, коэффициент $b=-4,486$. Для RSNO $b=0,989$, $p=0,002$, отношение шансов=2,7). Интерпретация данного результата достаточно сложна, так как неясно, что является причиной:

массивное глиальное повреждение в СМ, которое можно наблюдать на периферии в результате выброса RSNO, или более высокая патологическая или компенсаторная активность процессов нитрозилирования, протекающих в СМ. Для оценки возможного вклада уровня RSNO в патологический процесс был проведен ROC-анализ. Площадь под ROC-кривой (AUC) равна 0,8 (уровень «cut-off» 1,46%, чувствительность 0,81, специфичность 0,75), что находится на уровне «хороших» значений. Таким образом, RSNO может быть рассмотрен в качестве потенциального маркера поражения СМ, однако необходимо проведение исследования на большей популяции. Далее было выявлено, что наибольший вклад вносят белковые фракции RSNO. Выявленное различие по связи повышения уровня RSNO с повреждением СМ крайне интересно, так как оно свидетельствует о специфике процесса образования очагов в СМ или о разной реакции организма на повреждение. Кроме того, из клинических наблюдений известно, что при спинальных очагах наблюдается более тяжелое течение заболевания. Подобные различия по активности NO-системы выявлялись и ранее: в работе Ljubisavljevic и соавт. (Ljubisavljevic S. et al., 2012) показано, что у крыс с экспериментальным энцефаломиелитом и животных контрольной группы наиболее высокий уровень NOx наблюдается в гомогенатах СМ, но причина такого увеличения неясна: по данным исследований (Halcaк L. et al., 2000) уровень активности NO-синтазы в СМ ниже, чем в головном. Ранее предполагалось, что более высокий уровень RSNO наблюдается за счет опосредованной Ил-6 активации iNOS, различной для головного и СМ, однако в нашем исследовании эта гипотеза не была подтверждена. Кроме того, подобное различие по уровню RSNO можно объяснить несколькими причинами: гетерогенностью ферментативных систем головного и СМ; территориальным различием гистогематического барьера; повреждением глии, более выраженным в СМ. Таким образом, в связи с увеличением в крови NOx и RSNO можно говорить об активации NO-системы при РС на всех стадиях заболевания, причем более выраженная активация наряду с увеличением проницаемости ГЭБ наблюдается в фазе обострения. С учетом клинических данных можно предполагать, что чем длительнее и массивнее протекает заболевание, тем больше активируется система NO. Однако, на основании полученных результатов мы не можем сделать вывод, патологическим или адаптивным является увеличение RSNO, так как в ряде исследований показано их протективное действие (Hernansanz-Agustín P. et al., 2013).

Заключение

В работе проведено исследование процессов нейровоспаления и нейродегенерации как потенциальных ключевых механизмов патогенеза аутоиммунных заболеваний ЦНС.

Нами впервые в российской популяции охарактеризована когорта пациентов с АЭ, описаны трудности диагностики, и необходимости проведения дополнительных исследований ЦСЖ – анализ на олигоклональные и антинейрональные антитела, что позволяет более точно

диагностировать характер и тип аутоиммунной патологии, предсказать ответ на терапию и клиническое течение. Активность воспалительных процессов и процессов нейродегенерации при АЭ сравнима с таковой при обострении РС, однако отмечено значимое повышение неоптерина, который может считаться дополнительным воспалительным маркером при АЭ. Показана большая выраженность процессов воспаления и нейродегенерации у пациентов с тяжелым течением АЭ (по уровню фНФТ, белка, Ил-6), что может быть использовано при оценке клинического прогноза и выбора агрессивности терапии.

Процессы нейровоспаления характерны для всех изученных заболеваний, однако пути Ил-6 опосредованной активации специфичны в зависимости от патологии. Сайт-специфический характер активации оси Ил-6 при различных аутоиммунных заболеваниях ЦНС может служить причиной гетерогенности и тяжести поражения. Гипотеза об Ил-6 опосредованной активации системы NO при локализации очагов в СМ, несмотря на то, что на всех стадиях РС наблюдалась активация нитрергической системы, паттерн которой зависит от стадии течения заболевания и локализации поражения. Усиление процессов нитрозилирования ассоциировано с наличием очагов в СМ.

Нейродегенеративный процесс характерен для РРС, ОРЭМ и АЭ — происходит гибель аксонов с высвобождением структурных компонентов цитоскелета, ее выраженность взаимосвязана с тяжелым течением заболевания.

Выявлены показатели, которые могут служить маркерами при дифференциальной диагностике аутоиммунных заболеваний ЦНС и предикторами их течения (неоптерин для дифференциальной диагностики АЭ, уровень белка в ЦСЖ для прогноза течения АЭ, RSNO для поражения СМ, а Ил-6 и фНФТ могут быть использованы в качестве вероятных прогностических маркеров течения АЭ и должны быть оценены на больших популяциях).

Выводы

1. Аутоиммунные энцефалиты — гетерогенная группа заболеваний, проявляющаяся сочетанием преимущественно когнитивных, психических нарушений и эпилептических приступов. Аутоиммунный энцефалит со специфическими антинейрональными антителами встречается у 37,5% пациентов (среди них преобладают аутоиммунные энцефалиты с антителами к поверхностными нейрональным антигенам — 67 %). Наличие очаговых изменений при МРТ наблюдается в 58% случаев. В 21% случаев аутоиммунный энцефалит является паранеопластическим. Частота ошибочных диагнозов при аутоиммунных энцефалитах достигает 59%.

2. Аутоиммунный энцефалит характеризуется тяжелым течением со смертностью в течение 1 года наблюдения 25%. Группа пациентов со специфическими антителами не

отличается от группы антител-негативных пациентов по клинической картине заболевания. Повышение уровня общего белка ликвора является прогностически неблагоприятным маркером течения аутоиммунного энцефалита. Олигоклональный синтез иммуноглобулинов G ассоциирован с паранеопластическим генезом энцефалита.

3. При аутоиммунном энцефалите отмечается активация процессов воспаления и нейродегенерации, сравнимая с таковой при обострении рассеянного склероза. Однако уровень неоптерина значимо повышен и является маркером воспаления при аутоиммунном энцефалите. Повышение уровня фосфорилированных тяжелых цепей нейрофиламентов, уровня белка, интерлейкина-6 регистрируется в ликворе у пациентов с тяжелым течением аутоиммунного энцефалита.

4. Изменение уровня интерлейкина-6 регистрируется при всех изученных заболеваниях центральной нервной системы, причем для рассеянного склероза характерно повышенное содержание растворимого рецептора интерлейкина-6, что свидетельствует о различных путях активации системы интерлейкина-6.

5. При ремиттирующем рассеянном склерозе, остром рассеянном энцефаломиелите и аутоиммунных энцефалитах (но не при оптикомиелите Девика) нейродегенерация связана с гибелью аксонов и высвобождением структурных компонентов цитоскелета (фосфорилированных тяжелых цепей нейрофиламентов).

6. Изменения системы оксида азота зависят от стадии рассеянного склероза (повышение уровня нитратов/нитритов и нитрозотиолов у пациентов с ремиттирующим рассеянным склерозом при обострении; повышение нитрозотиолов при вторично-прогрессирующем рассеянном склерозе). Повышенный уровень нитрозотиолов наблюдается при длительном течении заболевания и при поражении спинного мозга. Диагностическая ценность маркера может быть оценена как «хорошая».

Практические рекомендации

1. Рекомендовано внедрение в практическую работу определения анализа антител к поверхностным и внутриклеточным антинейрональным антигенам с целью постановки точного диагноза АЭ и определения тактики лечения.

2. Рекомендовано исследовать олигоклональный синтез иммуноглобулинов G при АЭ, что позволяет получить дополнительную информацию о патогенезе аутоиммунного процесса.

3. Рекомендовано использовать неоптерин в качестве дополнительного маркера дифференциального диагноза между АЭ и другими аутоиммунными заболеваниями ЦНС.

4. Рекомендована оценка уровня белка, фНФТ и Ил-6 в ЦСЖ пациентов с АЭ в качестве маркеров тяжести течения болезни и определения более агрессивной тактики лечения.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Fominykh, V. Interleukin-6, S-Nitrosothiols, and Neurodegeneration in Different Central Nervous System Demyelinating Disorders: Is There a Relationship?/ V. Fominykh, A.Vorobyeva, M.V. Onufriev, L. Brylev, M.N. Zakharova, N.V. Gulyaeva // **Journal of Clinical Neurology**. – 2018. – Vol. 14, № 3. – P.327-332.
2. Фоминых, В.В. Аутоиммунные энцефалиты: болезнь XXI века на перекрестке неврологии и психиатрии / В.В. Фоминых, Е.А. Фрей, Л.В. Брылев, Н.В. Гуляева // **Нейрохимия**. – 2018. – Т.35, № 4. – С.308-322. (Fominykh, V. Autoimmune encephalitis: a Disease of 21th century at crossroads of neurology and psychiatry /V. Fominykh, E. Frei, L. Brylev, N. Gulyaeva // **Neurochemical Journal**. – 2018. – V.12, № 4. – P.311-323.)
3. Fominykh, V. Increased S-nitrosothiols are associated with spinal cord injury in multiple sclerosis / V. Fominykh, M. Onufriev, A. Vorobyeva, L. Brylev, A.Yakovlev, M. Zakharova, N. Gulyaeva // **Journal of Clinical Neuroscience**. – 2016. –V.28. – P.38-42.
4. Fominykh, V. Coexistence of multiple sclerosis and ankylosing spondylitis: report of four cases from Russia and review of the literature / V. Fominykh, T. Shevtsova, N. Arzumianian, L. Brylev // **Journal of Clinical Neuroscience**. – 2017. –V.44. – P.230-233.
5. Воробьева, А.А. Использование тяжелых цепей фосфорилированных нейрофиламентов в качестве маркера нейродегенерации при демиелинизирующих заболеваниях ЦНС/ А.А. Воробьева, В.В. Фоминых, М.В. Онуфриев, М.Н. Захарова, Н.В. Гуляева // **Нейрохимия**. – 2014. - №3. - С. 254–259. (Vorobyeva, A.A. Phosphorylated neurofilament heavy subunits as a biomarker of neurodegeneration in demyelinating diseases of the CNS / А.А. Vorobyeva, V.V. Fominykh, M.V.Onufriev, M. N. Zakharova, N.V. Gulyaeva // **Neurochemical Journal**. – 2014. – V.8, № 3. – P.221-225.)
6. Фоминых, В.В. Иммуноферментный анализ нитрованных по тирозину белков в ткани головного мозга и цереброспинальной жидкости: методические подходы/ В.В. Фоминых, М.В. Онуфриев, И.Л. Каймовский, Д.В. Гуз, А.Б. Гехт, М.Н. Захарова, Н.В. Гуляева // **Нейрохимия**. – 2012. –Т.29, № 3– С.253-260. (Fominykh, V.V., Enzyme immunoassay for detection of protein-bound nitrotyrosine in brain tissue and cerebrospinal fluid: Methodological issues / V. V. Fominykh, M.V. Onufriev, I. L. Kaimovskii, D.V. Guz, A.B. Guekht, M. N. Zakharova, N.V. Gulyaeva // **Neurochemical Journal**. – 2012. – V.6, № 3. – P.239-245).
7. Воробьева, А.А. Биохимические маркеры аутоиммунных демиелинизирующих заболеваний центральной нервной системы / А.А. Воробьева, В.В. Фоминых, Н.В. Второва, Н.В. Гуляева, Н.А. Зигангирова, М.Н. Захарова // **Медицинский Академический журнал**. – 2012. – Т.12, №4. – С. 26-28.

8. Воробьева, А.А. Биомаркеры рассеянного склероза. Обзор литературы и собственные данные / А.А. Воробьева, М.В. Иванова, В.В. Фоминых, Н.В. Второва, Н.В. Гуляева, Н.А. Зигангирова, М.Н. Захарова // **Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова**. – 2013. – Т.113.– С. 23-31.
9. Фоминых, В.В. Система NO и нейродегенерация при демиелинизирующих заболеваниях//Тезисы доклада на XIX Школе-конференции молодых ученых, Москва, ИВНД и НФ РАН – Сборник тезисов. — 2015. - С.8.
10. Фоминых, В.В. Анализ антител к поверхностным нейрональным антигенам при аутоиммунных заболеваниях центральной нервной системы//Тезисы доклада на XX Школе-конференции молодых ученых, Москва, ИВНД и НФ РАН – Сборник тезисов. — 2016. - С.7.
11. Фоминых, В.В. Анализ уровня воспалительных маркеров и фосфорилированных цепей тяжелых нейрофиламентов у пациентов с аутоиммунными энцефалитами //Тезисы доклада на XXI Школе- конференции молодых ученых, Москва, ИВНД и НФ РАН – Сборник тезисов. — 2017. — С.7.
12. Воробьева, А.А. Биохимические маркеры аутоиммунных демиелинизирующих заболеваний центральной нервной системы/ А.А. Воробьева, В.В. Фоминых, Н.В. Второва, Н.В. Гуляева, Н.А. Зигангирова, М.Н. Захарова // **Материалы VI Сибирской межрегиональной научно-практической конференции**, Новосибирск. – 2013. – С.36-37.
13. Воробьева, А.А. Уровень тяжелых цепей нейрофиламентов, амилоида 1-40 и 1-42 в спинномозговой жидкости пациентов с оптикомиелитом и рассеянным склерозом / А.А. Воробьева, Т.О. Симанив, Н.В. Полехина, М.Е. Журавлева, М.Н. Захарова, В.В. Фоминых, Н.В. Гуляева, Н.А. Зигангирова// **Медицинский алфавит**. – 2018. – Т. 2, № 17 (354). – С.33-36.
14. Vorobyeva, A. Biochemical markers of CNS demyelinating diseases/ A. Vorobyeva, V. Fominykh, N. Vtorova, N.V. Gulyaeva, N. A. Zigangirova, M. N. Zakharova// **Journal of the Neurological Sciences**. – 2013. – Vol. 333, No. 1. – P.387.
15. Vorobyeva, A. Biochemical markers of neurodegeneration in multiple sclerosis / A. Vorobyeva, V. Fominykh, M. Zakharova, N. Gulyaeva // **Session Multiple Sclerosis Journal**. – 2013. – Vol. 19, No. 11. – P.820.
16. Fominykh, V. Nitrosative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis / V. Fominykh, M. Onufriev, A. Vorobyeva, L. Brylev, M. Zakharova, N. Gulyaeva // **Journal of Neurochemistry**. – 2013. – V.125 (Spl.1) –P.201.
17. Gulyaeva, N. Phosphorylated neurofilament heavy chain in blood serum and CSF of patients with MS and ALS / N. Gulyaeva, V. Fominykh, M. Onufriev, A. Vorobyeva, L. Brylev, M. Zakharova. Phosphorylated neurofilament heavy chain in blood serum and CSF of patients with MS and ALS // **Abstract book FENS Featured Regional Meeting, Prague, Czech Republic, 2013**.

18. Fominykh, V., Paroxysmal jerky movements in autoimmune disorders: two video case reports / V. Fominykh, I. Tukmakova, L. Brylev//Abstract book “Myoclonic and other jerky movements”, Groningen, Netherlands. – 2016 – P.1.

19. Фоминых, В.В. Анализ антител к поверхностным нейрональным антигенам при аутоиммунных заболеваниях центральной нервной системы/ В.В. Фоминых, И.В. Тукмакова, Н.А. Михайлова, Л.В. Брылев, А.Б. Гехт, Н.В. Гуляева// Нейроиммунология. – 2016.– Т.13– С.73-74 (тезисы XXI Всероссийской конференции «Нейроиммунология. Рассеянный склероз»).

20. Фоминых, В.В. Нитрозативный стресс при рассеянном склерозе: исследование метаболитов NO в сыворотке крови/ В.В. Фоминых // Материалы конференции с международным участием «Ломоносов», Москва – 2012. – С. 1-2.

21. Vorobyeva, A. Markers of neurodegeneration at different stages of MS/ A, Vorobyeva, V. Fominykh, T. Simaniv, M. Onufriev, E. Putsen, M. Zakharova, N. Gulyaeva //Abstract book EFNS-ENS Joint Congress of European Neurology, Istanbul, Turkey –2014. – P. 517.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АЭ – аутоиммунный энцефалит

ВПРС – вторично-прогрессирующее течение рассеянного склероза

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

Ил-6 – интерлейкин 6

ИФА – иммуноферментный анализ

МРТ – магниторезонансная томография

НТБ – нитрованные по тирозину белки

ОМ – оптикомиелит Девика

ОРЭМ – острый рассеянный энцефаломиелит

РС – рассеянный склероз

РРС – ремиттирующее течение рассеянного склероза

рИл-6 – растворимый рецептор интерлейкина 6

СМ – спинной мозг

ЭПО – эритропозитин

ЭЭГ — электроэнцефалография

фНФТ – фосфорилированные тяжелые цепи нейрофиламентов

ЦНС – центральная нервная система

ЦСЖ – цереброспинальная жидкость

AQP4 – аквапорин-4

CASP2R – рецептор контактин-ассоциированного белка 2

DAF2 – флуоресцентный зонд 4,5-диаминофлуоресцеина

GABA_bR – рецептор гамма-аминомасляной кислоты типа b

GAD65 – глутаматдекарбоксилаза 65

LG11 – белок гена, богатого лейцином и инактивированного в глиоме, 1

NMDAR – рецептор N-метил-D-аспартата

NO – оксид азота

NO_x – суммарный уровень нитратов и нитритов

RSNO – нитрозотиолы